



Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Biologia Celular
Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular

Desenvolvimento de uma linhagem industrial de *Saccharomyces cerevisiae* para aplicação na produção de etanol de segunda geração a partir de correntes ricas em xilose

Danuza Nogueira Moysés

Orientador: Prof. Fernando Araripe G. Torres
Coorientadora: Dr^a. Viviane Castelo Branco Reis

Brasília, junho 2016



Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Biologia Celular
Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular

Desenvolvimento de uma linhagem industrial de *Saccharomyces cerevisiae* para aplicação na produção de etanol de segunda geração a partir de correntes ricas em xilose

Danuza Nogueira Moysés

Orientador: Prof. Fernando Araripe G. Torres

Coorientadora: Dr^a. Viviane Castelo Branco Reis

Tese de doutorado apresentada ao Departamento de Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília como requisito para obtenção do grau de Doutor em Biologia Molecular.

Brasília, junho de 2016

Trabalho realizado no Laboratório de Biotecnologia de Leveduras, do Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília (UnB), sob orientação do Professor Fernando Araripe Torres e coorientação da Dra. Viviane Castelo Branco Reis.

Danuza Nogueira Moysés

Desenvolvimento de uma linhagem industrial de *Saccharomyces cerevisiae*
para aplicação na produção de etanol de segunda geração a partir de
correntes ricas em xilose

Comissão Examinadora

Dr. Fernando Torres
Presidente e orientador
Departamento de Biologia Celular
UnB - Brasília

Dra. Talita Souza Carmo
Examinadora interna
Departamento de Biologia Celular
UnB - Brasília

Dra. Viviane Castelo Branco Reis
Coorientadora
Departamento de Biologia Celular
UnB - Brasília

Dra. Lidia Maria Pepe de Moraes
Examinadora interna
Departamento de Biologia Celular
UnB – Brasília

Dra. Elisabete José Vicente
Examinadora externa
Departamento de Microbiologia
USP – São Paulo

Dra. Janice Lisboa de Marco
Suplente
Departamento de Biologia Celular
UnB - Brasília

Dra. Elida Geralda Campo
Examinadora interna
Departamento de Biologia Celular
UnB - Brasília

“Não há nada como o sonho de criar o futuro” (Victor Hugo)

*Dedico esta tese à Miguel, a linhagem
mais incrível desenvolvida ao longo
deste trabalho*

Agradecimentos

Ao Prof. Fernando pela orientação, por ter acreditado em mim, e por toda a paciência, disponibilidade e sabedoria transmitida.

À Viviane, por todo o apoio, pela atenção e dedicação ao ensinar; pelos momentos de descontração, pelo carinho e pelas muitas caronas.

À Prof^a Lidia pela sua empolgação e disposição de sempre trocar experiências e ajudar no nosso caminho.

Ao Absai que muito me ajudou no HPLC, comemorou comigo cada resultado de etanol, e vem batalhando comigo já há alguns verões acreditando na pesquisa que fazemos.

Ao túlio, que foi meu salvador, na minha saída de licença e me deu o apoio fundamental para conseguir chegar aos resultados que cheguei.

Ao Gisele, a Neumara, a Juliana, a Theissa, ao Luciano e a Carol que ajudaram a me sentir mais em casa, em Brasília, principalmente nos primeiros anos.

Aos amigos da Petrobrás Cláudia, Rubens, Aline, Nicomédes, Bruno e os que por lá passaram. Em particular ao Yuri, Adriano e Miltinho, que me ajudaram muito no desenvolvimento do trabalho no CENPES.

A minha gerente Gina, que sem o seu apoio e confiança na importância do trabalho que eu desenvolvo, talvez não fosse possível chegar até o fim.

A todos os professores que contribuíram não só para o desenvolvimento deste trabalho, mas com a minha formação acadêmica.

À Pós-graduação, e ao Prof. Robert, que apostaram nesta parceria entre empresa e universidade, e a exceção da regra, me permitiram fazer o curso em dedicação parcial. Foram compreensíveis com todas as dificuldades, e acreditaram que esse trabalho valia a pena.

Aos meus amigos, que compreenderam as minhas ausências.

À Petrobras, que me liberou parcialmente e financiou todo o desenvolvimento desta tese, todas as idas a Brasília, e apostou no meu projeto.

Aos companheiros do laboratório de Biotecnologia de Levedura pelos momentos de descontração, pela compreensão e ajuda nos dias de trabalho corrido e insano, que eu passava em Brasília.

Em especial, a Cris, Maritza e Luiza, por toda a ajuda, por muitas ponteiras e meios emprestados, pelo carinho e atenção. E ao Daniel por gentilmente ceder o Y2STEF, e ser companheiro na luta de se trabalhar com a JP1.

Às minhas queridas linhagens, que como boas filhas, me deram muito trabalho, mas também trouxeram grandes alegrias.

Aos técnicos do laboratório que facilitaram muito a nossa vida: Dona Fátima e Dona Ivonildes, em Brasília, e ao querido Beto, no CENPES.

Ao Professor Eckhard Boles que gentilmente cedeu a EBY.VW4000, sem a qual metade do trabalho seria diferente.

E por fim, aos meus pais e minha avó, que sempre estiveram ao meu lado. Ao meu amor que foi pai e mãe em alguns momentos, aos meus presentinhos Julia e Bernardo, e a Miguel, que mesmo sem compreender, foi sempre um anjo, e ajudou muito mamãe a chegar ao fim deste caminho. Obrigada pelo amor, apoio e carinho.

RESUMO

A fermentação de xilose, o segundo açúcar mais abundante em materiais lignocelulósicos, é uma etapa crítica para viabilidade econômica da produção de etanol de segunda geração. O presente trabalho descreve estratégias de modificação genética e de adaptação metabólica usadas na obtenção da primeira linhagem industrial de *Saccharomyces cerevisiae* recombinante desenvolvida no país, capaz de fermentar a xilose presente em hidrolisados lignocelulósicos, com via da xilose isomerase integrada ao genoma. Como resultado, foi desenvolvida uma linhagem recombinante robusta capaz de converter de forma eficiente ambos os açúcares, xilose e a glicose, presentes no hidrolisado, obtendo-se alta concentração de etanol, 46 g/L, com produção do xilitol < 0,15 g/L. Esta levedura diploide foi construída de forma a estar adequada às condições de aplicação industrial, com a integração múltipla do gene *XylA* de *Piromyces* sp., interrupção das duas cópias do gene da aldose redutase endógena (*GRE3*) com cópias extras do gene codificador da xiluloquinase (*XKS1::Δgre3*), e remoção de todas as marcas de seleção dominantes. A linhagem se mostrou capaz de converter a xilose presente no hidrolisado com os melhores rendimentos já relatados, $Y_{p/s}=0,48$ g de etanol/g de xilose, em escala de bancada de 1L, com alta tolerância a inibidores (4,6 g/L ácido acético). E comprovou o papel da adaptação metabólica no ajuste metabólico para a melhora na utilização da xilose. Além dessa abordagem, o presente trabalho também trouxe o ineditismo de desenvolver, por meio de desenho racional, um transportador Hxt3 endógeno com a mutação T210V capaz de transportar xilose. O papel da alteração deste resíduo e seu equivalente homólogo se mostrou uma característica conservada entre Hxt3 e Hxt5. O transportador Hxt3 mutante foi capaz de restaurar o crescimento de levedura *hxt*-null (EBY.VW4000) em xilose permitindo um maior crescimento em comparação com os demais transportadores testados. Por fim, foram indicados novos potenciais transportadores derivados de Hxt3, Hxt5 e Hxt7 evoluídos em xilose que mostram uma melhora no crescimento e consumo de açúcares pela levedura *hxt*-null, expressando individualmente cada permease. A combinação das duas abordagens desenvolvidas aqui pode ser o caminho para o aumento da produtividade das futuras fermentações industriais para produção de etanol de lignocelulose.

ABSTRACT

Xylose is the second most abundant sugar in lignocellulosic materials and improved fermentation of this pentose is a crucial step for cost-effective cellulosic ethanol production. With this goal, we describe in this work rational metabolic engineering and evolutionary strategies in order to obtain the first Brazilian recombinant industrial *Saccharomyces cerevisiae* strain capable of efficient xylose fermentation. The genetic modifications included the integration of multiple copies of the *Piromyces* sp. xylose isomerase gene (*XylA*) and the disruption of both copies of endogenous *GRE3* (aldose reductase) with the yeast xylulokinase (*XKS1::Δgre3*). All dominant markers were excised by using Cre recombinase. The resulting recombinant strain efficiently converts xylose and glucose sugars present in lignocellulosic hydrolysate to high ethanol titer (46 g/L), low xylitol (<0,15 g/L) and was able to convert hydrolysate xylose to ethanol with a yield of 0.49 g ethanol/g xylose (the highest yield reported to date) even at high inhibitor concentration (4,6 g/L acetic acid). Evolutionary engineering of the recombinant strain proved to be essential to improve xylose utilization. We also introduced a mutation (T210V) in the *HXT3* hexose transporter, which enabled it to transport xylose, an unprecedented result. Rational design showed a conserved effect in both Hxt3 and Hxt5. The mutated Hxt3 transporter restored growth on xylose in an *hxt*-null strain (EBY.VW.4000) with enhanced growth compared to other endogenous hexose transporters tested. By using xylose evolution, we obtained potential new evolved Hxt3, Hxt5 and Hxt7 transporters that allowed improved growth on xylose by the *hxt*-null strain expressing each permease individually. The combination of the two approaches described in this work should pave the way for higher productivity of second generation lignocellulosic fermentation.

SUMÁRIO

Lista de figuras	i
Lista de tabelas	ii
Abreviaturas e Símbolos	iii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Cenário Energético mundial.....	1
1.2 Etanol de Lignocelulose	3
1.2.1 Rotas biotecnológicas para produção de etanol 2G	4
1.3 Leveduras Industriais	7
1.4 Fermentação de xilose por <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	11
1.5 Transportadores de açúcares	18
1.5.1 Transportadores de Xilose	21
2. OBJETIVOS	28
2.1 Objetivo geral.....	28
2.2 Objetivos específicos	28
2.3 Estratégia	29
3. MATERIAIS	30
3.1 Micro-organismos utilizados.....	30
3.2 Enzimas	30
3.3 Marcadores de DNA.....	31
3.4 Kits.....	31
3.5 Ferramentas de Bioinformática	32
3.6 Vetores.....	33

3.7 Meios de cultura e soluções	37
3.7.1 Meios e soluções para cultivo de micro-organismos.....	37
3.7.2 Soluções e tampões para técnicas de DNA recombinante	39
3.8 Primers	41
4. MÉTODOS	45
4.1 Digestão de DNA com enzimas de restrição.....	45
4.2 Precipitação do sistema de digestão	45
4.3 Purificação e eluição de fragmentos de DNA em gel de agarose.....	45
4.4 Ligação dos fragmentos de DNA.....	45
4.5 Desfosforilação dos vetores para ligações não direcionadas.....	46
4.6 Transforma�o de bactéria	46
4.7 Prepara�o de DNA plasmidial por lise alcalina	47
4.8 Extra�o do DNA total de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	48
4.9 Análise dos ácidos nucleicos em gel de agarose	49
4.10 Transforma�o de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	49
4.11 Sequenciamento e análise da sequência do DNA	51
4.12 Rea�o de PCR	51
4.13 PCR de Colônia	52
4.14 Purifica�o dos produtos de PCR.....	53
4.15 Real Time PCR (qPCR) - SYBR Green	53
4.16 Remo�o da Marca de Sele�o (Cre recombinase)	54
4.17 Curva de crescimento celular em microplaca.....	54

4.18 Adaptação metabólica	54
4.19 Curva de biomassa (Absorbância 600nm X peso seco)	58
4.20 Fermentação em biorreator	59
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	62
5.1 CONSTRUÇÃO DA LEVEDURA INDUSTRIAL CAPAZ DE FERMENTAR XILOSE	62
5.1.1 Integração do cassete XI em múltiplas cópias nas regiões δ da levedura industrial JP1	62
5.1.1.1 Obtenção da Marca de seleção Kan-LoxP e Zeo-LoxP.....	62
5.1.1.2 Construção do vetor pTXI	64
5.1.1.4 Integração da XI em múltiplas cópias.....	70
5.1.1.5 Remoção da marca Kan-loxP	72
5.1.1.6 Quantificação relativa do número de cópias integradas da XI	74
5.1.2 Integração da XK no gene <i>GRE3</i>	76
5.1.2.1 Construção do Vetor pBGREXKKAN.....	76
5.1.3 Adaptação Metabólica	91
5.1.5 Estudo da capacidade fermentativa em meio com xilose	99
5.1 ESTUDO DE TRANSPORTADORES DE XILOSE	110
5.2.1 Construção dos vetores de expressão dos transportadores	110
5.2.2 Comparação entre os transportadores.....	121
5.2.3 Evolução dos transportadores	124
6. CONCLUSÕES	132
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	134
8. ANEXOS	152

8.1 Anexo 1: Lista de linhagens geradas no trabalho	152
8.2 Anexo 2: Artigo publicado	153

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Diferentes estratégias de processo para etanol de segunda geração	5
Figura 2: Esquema simplificado do Sistema cre-lox em leveduras.	11
Figura 3: Resumo das vias de utilização de xilose para etanol por <i>S. cerevisiae</i> geneticamente modificada.	12
Figura 4: Estrutura 3D de HXT e efeito da substituição do resíduo T213 na afinidade por diferentes açúcares.....	23
Figura 5: Representação esquemática do mapa do vetor comercial pPICZ α A	33
Figura 6: Representação esquemática do mapa do vetor pPICK α	33
Figura 7: Representação esquemática do mapa do vetor pT	34
Figura 8: Representação esquemática do mapa do vetor pYRCre.....	34
Figura 9: Representação esquemática do mapa do vetor pBCPX.	35
Figura 10: Representação esquemática do mapa do vetor pGXKSPGI.	36
Figura 11: Representação esquemática do mapa do vetor pBGRE.....	36
Figura 12: Representação esquemática da estratégia de evolução dos transportadores e isolamento das linhagens EBYHXT.	57
Figura 13: Curva de biomassa: Absorbância a 600 nm X peso seco da linhagem JPXIXK30.1.....	58
Figura 14: Amplificação do cassete de seleção Kan-loxP.....	63
Figura 15: Representação esquemática da estratégia utilizada para construção do vetor pTXI.	65
Figura 16: Perfil de restrição de vetor pT e pBCPX (XI).....	66
Figura 17: Mapa do sítio múltiplo de clonagem do PT.....	67
Figura 18: Perfil de restrição dos plasmídios pTXI extraídos da população de clones	68
Figura 19: Perfil de restrição dos transformantes pTXI e pTXIKAN.....	69
Figura 20: Seleção dos transformantes em crescentes concentrações de antibiótico.....	71

Figura 21: Seleção dos transformantes com capacidade de crescer em xilose como única fonte de carbono.	72
Figura 22: Seleção de clones com a marca de seleção removida	73
Figura 23: Análise da quantificação relativa do gene XI nas linhagens de <i>S. cerevisiae</i> JP1, JPXI13.10, JPXI15.13, JPXI15B e JPXI33.10, por qRT-PCR	75
Figura 24: Representação esquemática da estratégia utilizada para construção dos vetores pBGREXKAN e pBGREXKZEO	76
Figura 25: Análise de restrição do vetor pBGREKAN nos clones 1-4 e do vetor pGXKSPGI	78
Figura 26: Produtos de PCR 5'GRE3KanloxP e XK3'GRE3	79
Figura 27: Representação esquemática da estratégia para deleção do <i>locus GRE3</i> e integração do cassete XK por recombinação homóloga dos produtos de PCR na levedura	81
Figura 28: PCR do gene <i>GRE3</i> genômico de JP1 selvagem, clones JPXK26, JPXK38 e JPXK26.24.....	83
Figura 29. Análise do produto de PCR para o cassete de expressão da XK.	84
Figura 30: Análise de PCR de colônia dos clones obtidos da transformação com o sistema de ligação pBGREKAN/PGIXKS	85
Figura 31. Análise do perfil de restrição da construção pBGREXKAN.	86
Figura 32: Confirmação da integração do cassete GREXKAN no <i>locus GRE3</i> por reações de PCR.	88
Figura 33: Crescimento dos transformantes após a indução da recombinase Cre em meio YPD, com e sem G418 ou higromicina B.	89
Figura 34: Confirmação por reações de PCR da integração da XK, da XI e remoção da marca kan.	90
Figura 35: Adaptação metabólica através de repiques sucessivos ao longo do tempo	93
Figura 36: placa de seleção e isolamento dos clones adaptados.....	94
Figura 37: Comparação do perfil de crescimento das linhagens JPXIXKX1 e JPXIXK30.1 em meio YPX.	95
Figura 38: Real time PCR para quantificação absoluta do número de cópias integrada do	

gene da XI.	97
Figura 39: Aspecto morfológico do crescimento final do processo adaptativo.....	99
Figura 40: Cinética da fermentação anaeróbica em meio sintético em Reator instrumentado de 1L.....	101
Figura 41: Cinética da fermentação anaeróbica do hidrolisado lignocelulósico pela linhagem JPXIXK.F1 em reator instrumentado de 1L	103
Figura 42: Alinhamento da sequência proteica dos transportadores Hxt7, Hxt3 e Hxt5.	111
Figura 43: Representação esquemática da estratégia utilizada para construção dos vetores Y2STEF5, Y2STEF3 e Y2STEF7.....	113
Figura 44: Confirmações da clonagem de HXT3 e HXT7 em pBlueScript II SK, clonagem de HXT5 em Y2STEF e PCR mutagênicos de HXT5	115
Figura 45: Análise fenotípica dos transformantes de EBYXI e EBY280.	117
Figura 46: Representação esquemática da estratégia usada para construção dos vetores Y2STEF7, Y2STEF7M, Y2STEF3 e Y2STEF3M.....	119
Figura 47: Digestão de Y2STEF, PCR dos genes dos transportadores originais e fragmentos com região mutada para recombinação e ligação em <i>S. cerevisiae</i>	120
Figura 48: Amplificação por PCR dos genes dos transportadores presentes em EBYXIHXT.....	121
Figura 49: Crescimento comparativo de EBYHXT3, 3M, EBYHXT5 e 5M.....	123
Figura 50: comparação do crescimento e consumo de açúcares pelas linhagens portando o transportador HXT selvagem (o) e mutado (M), das diferentes etapas da adaptação	126
Figura 51: comparação do crescimento e consumo de xilose pelas linhagens portando o transportador HXT selvagem (o) e mutado (M), das diferentes etapas da adaptação.	127

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Composição química dos resíduos lignocelulósicos.....	3
Tabela 2: linhagens de <i>S. cerevisiae</i> recombinante reportadas para fermentação de xilose.....	16
Tabela 3: Transportadores de açúcares da família HXT.....	19
Tabela 4: Parâmetros cinético dos principais transportadores de glicose/xilose expressos em <i>S. cerevisiae</i>	27
Tabela 5: Sequências dos primers utilizados nas reações de PCR	42
Tabela 6: Reagentes utilizados na PCR.....	51
Tabela 7: Reagentes utilizados na PCR de colônia, volume e concentração final na reação.	52
Tabela 8: Caracterização hidrolisado de bagaço de cana sacarificado gerado no CENPES (Petrobras).....	60
Tabela 9. Descrição dos pares de <i>primers</i> utilizados e os tamanhos dos produtos de PCR esperados.....	87
Tabela 10: Concentração de inibidores em diferentes hidrolisados lignocelulósicos descritos na literatura.....	103
Tabela 11: Desempenho de leveduras <i>S. cerevisiae</i> recombinantes com a via da XI em fermentações anaeróbicas em hidrolisado lignocelulósicos e meios sintéticos	106
Tabela 12: Fenótipos esperados no crescimento das linhagens em meio mínimo	117

Amp = ampicilina
ADP = adenosina difosfato
AMP = adenosina monofosfato
ATP = adenosina trifosfato
 β -gal = β -galactosidase
pb = pares de base
BSA = albumina sérica bovina
CBP= Bioprocesso consolidado
cDNA = DNA complementar
DAHP = 3-deoxi-D-arabino-heptulosonato-7-fosfato
DMSO = dimetil sulfóxido
DNA = ácido desoxirribonucleico
dATP = deoxiadenosina trifosfato
dNTP = deoxirribonucleotídeos trifosfatados
DTT = ditionitrito
EDTA = ácido etilenodiaminotetracético
EMP = Embden-Meyerhof-Parnas
EtBr = Brometo de etídeo
Furfural= 2-furaldeído
 g = força da gravidade
GEE = gases de efeito estufa
GRAS = *Generally Recognized as Safe* (geralmente reconhecido como seguro)
hph = higromicina B fosfotransferase
HPLC = *High-Performance Liquid Chromatography* (Cromatografia Líquida de Alta Performance)
HMF= 5-hidroximetilfurfural
Kan = canamicina
kb = quilobases = 1000 pares de bases
LiAOc = acetato de lítio
M = molar (mM = milimolar, μ M = micromolar)
MOPS = ácido 3-N-morfolino propano sulfônico
mRNA = ácido ribonucleico mensageiro

MSC = múltiplo sítio de clonagem
NCBI = *National Center for Biotechnology Information*
NAD⁺/NADH = nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADPH = nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
OD₆₀₀ = densidade óptica a 600 nm
ORF = *open reading frame* (fase aberta de leitura)
PCR = *polimerase chain reaction* (reação de polimerização em cadeia)
PEG = polietilenoglicol
PFK = fosfofrutoquinase
PGK = 3-fosfoglicerato quinase
pH = potencial hidrogeniônico
PPP = pentose phosphate pathway (via das pentose fosfato)
qRT-PCR = PCR em tempo real (reação de polimerização em cadeia em tempo real)
q.s.p. = quantidade suficiente para
RNA = ácido ribonucleico
RNase = ribonuclease
rpm = rotações por minuto
SCF= Sacarificação e cofermentação
SDS = *sodium dodecyl sulfate* (Dodecil Sulfato de Sódio)
SGD = *Saccharomyces Genome Database*
SHF= Sacarificação e fermentação separadas
SSF= Sacarificação e fermentação simultâneas
SSCF= Sacarificação e cofermentação simultâneas
T = timina
TM = Temperatura de anelamento
Tris = tris(hidroximetil)aminometano
UNICA = União da Indústria de Cana-de-açúcar
UV = ultravioleta
YNB = *yeast nitrogen base* (base nitrogenada de levedura)
XDH = xilitol desidrogenase
XI = xilose isomerase
XK = xiluloquinase
XR = xilose redutase
W = watt (unidade de potência)

1. Introdução

1.1 Cenário Energético mundial

A demanda mundial por energia continua crescendo rapidamente ao longo dos últimos anos, em grande parte pelo acentuado crescimento da população global e a industrialização dos países em desenvolvimento. A matriz energética mundial é baseada em combustíveis fósseis, sendo 32,4% de petróleo, 27,3% de carvão mineral, 21,4% de gás natural e apenas 10,0% de biomassa renovável (IEA, 2012). Os biocombustíveis, como o biodiesel e o etanol, representam 4,9% do consumo global de combustíveis (IEA, 2012)

O consumo exagerado de combustíveis fósseis ao longo dos anos, especialmente em núcleos urbanos, vem acumulando altos níveis de poluição e gases de efeito estufa (GEE) na atmosfera. Associado aos impactos ambientais do uso dos combustíveis fósseis, como o aumento na temperatura global e as mudanças climáticas associadas ao acúmulo de CO₂ e GEE, estão as questões políticas e sociais da distribuição das reservas de petróleo remanescentes (Dashtban *et al.*, 2009).

Este cenário abre perspectivas para o crescimento do uso de tecnologias de conversão de biomassas renováveis em químicos, biocombustíveis, energia térmica e elétrica, no conceito de biorrefinaria (Pereira Jr *et al.*, 2008). Além do estímulo pela conscientização ambiental do uso de fontes renováveis, acordos governamentais estabelecem metas de longo prazo para a inserção crescente dos biocombustíveis na matriz de combustíveis. Como exemplo desses acordos, a União Europeia, em resposta à Diretiva Europeia sobre Energias Renováveis, espera ter 10% de sua frota movida a combustíveis renováveis em 2020, dos quais 5,6% seriam de etanol (EU, 2009).

Atualmente, o etanol, o biodiesel e o biogás já fazem parte da matriz energética nacional – o primeiro chegou a ser responsável por mais de 40% do combustível da frota que circulava no país em 2009 (Jank & Nappo, 2009). O Brasil se destaca no cenário mundial como o segundo maior produtor de etanol, a partir de um processo com balanço positivo em créditos de carbono quando comparado ao etanol de milho

Introdução

(Macedo *et al.*, 2008), com redução de 61% na emissão de GEE quando comparada à gasolina (EPA, 2010)

A produção de etanol no Brasil na safra de 2014/2015 atingiu 28,66 bilhões de litros e se estima o processamento de 655,16 milhões de toneladas (t) de cana de açúcar na safra atual (2015/2016), o que levaria a uma produção 0,5% menor que na safra anterior (CONAB, 2016). A expectativa do setor é de que esta produção continue crescendo, aonde se espera em 2020 chegar a exportar mais de 20% da produção nacional (COGEN, 2009).

O etanol obtido pela fermentação do caldo de cana de açúcar, do amido do milho, do trigo, da beterraba, ou de qualquer substrato nos quais os açúcares são facilmente extraídos, é considerado como de primeira geração (Gray *et al.*, 2006). Os processos de primeira geração já são considerados processos industriais maduros, de baixo risco. Entretanto, tomando-se como base o processo de etanol brasileiro, a partir da cana de açúcar, de toda a biomassa produzida apenas 1/3, corresponde à fração que é convertida no processo a etanol, restando 2/3 correspondendo a um resíduo, formado principalmente por bagaço e palha (Nandy *et al.*, 2002).

A usina de etanol pode ser considerada uma biorrefinaria, uma vez que, além do etanol, gera uma gama de bioprodutos. Para 1 tonelada de cana processada, 100 a 150 kg de açúcar refinado, 70-90 L de etanol, 300 kg de bagaço e 980 L de vinhoto são gerados (Nandy *et al.*, 2002). Este último, para o qual não há mercado formado, é usado para fertirrigação das próprias lavouras de cana e parte usada para produção de biogás (Bai *et al.*, 2008). Estima-se que 80-90% do bagaço produzido atualmente seja usado para cogeração de energia elétrica pela queima do bagaço, tornando a unidade autossuficiente, e deixando um residual de 10-20% que poderia ser aplicado para outras tecnologias. Além dos produtos citados, a partir da fermentação ainda se aproveita o excedente de leveduras e o CO₂. O primeiro entra no mercado da indústria alimentícia ou para ração animal devido ao seu alto conteúdo proteico. Já o gás carbônico, que nas usinas mais novas é capturado, é valorizado pela indústria de refrigerantes e produtos químicos (Rodrigues, 2011).

Introdução

O bagaço da cana, assim como a palha da cana, do milho e do trigo, resíduos não aproveitados para o etanol de primeira geração, são materiais lignocelulósicos compostos essencialmente de celulose, hemicelulose e lignina. Os dois primeiros são polímeros de açúcares, no caso da celulose, composto de monômeros de D-glicose ligados por ligações β -1-4 glicosídicas (CARPITA, 1996), e no caso da hemicelulose, um heteropolímero, principalmente composto de D-xilose, um açúcar de 5 carbonos (Lee, 1997). As tecnologias de produção de etanol de segunda geração a partir de resíduos agroindustriais têm como objetivo a liberação desses monômeros, e a utilização dos mesmos na fermentação a etanol.

1.2 Etanol de Lignocelulose

O Brasil possui uma diversificada gama de biomassa residual de composição lignocelulósica, tendo o bagaço de cana de açúcar como o mais representativo, não só pelas quantidades geradas, como pela facilidade logística. O bagaço de cana de açúcar já se encontra acumulado na própria instalação industrial e o etanol de segunda geração poderia se beneficiar da mesma rede de distribuição de produto do etanol da 1ª geração. Logo, a disponibilidade deste resíduo nas usinas, o coloca como uma excelente matéria-prima para a produção de biocombustíveis e bioprodutos de segunda geração (Pereira Jr. *et al.*, 2008).

De acordo com a composição dos resíduos lignocelulósicos apresentados na tabela 1, observa-se o grande potencial de conversão destes materiais em seus respectivos açúcares, uma vez que mais de 50% da composição dos mesmos poderia em teoria ser convertidos a açúcares e fermentados a etanol (Pereira Jr. *et al.*, 2008).

Tabela 1: Composição química dos resíduos lignocelulósicos.

	CELULOSE (%)	HEMICELULOSE (%)	LIGNINA (%)	PROTEÍNA (%)	CINZAS (%)
Bagaço de cana de açúcar	30-36	28-30	18,4	3	2,4
Palha de arroz	32-47	19-27	5-24	-	12,4
Palha de trigo	35-47	2-30	8-15	3,1	10,1
Palha de milho	42,6	21,6	8,2	5,1	4,3

Fonte: Sarkar *et al.* 2012

Introdução

O processo de conversão dos componentes lignocelulósicos dessas biomassas residuais, majoritariamente glicose e xilose, requer uma etapa de desestruturação da fibra, pré-tratamento, aliado ao uso de enzimas celulolíticas. De acordo com o pré-tratamento escolhido, por exemplo, a hidrólise ácida diluída, é possível se recuperar uma corrente rica em xilose, sem a necessidade da adição de enzimas xilanásicas, requerendo apenas o uso de celulases para a hidrólise da celulose em glicose (Pereira Jr. *et al.*, 2008).

As tecnologias de pré-tratamento foram extensivamente estudadas nas últimas 3 décadas, incluindo processos físicos, físico-químicos e biológicos (Sun & Cheng, 2002; Pereira Jr. *et al.*, 2008). A maioria dos processos em escalonamento hoje no mundo, para as tecnologias de etanol de segunda geração, contempla etapas de pré-tratamento físico e/ou físico-químicos, gerando correntes de xilose que podem ou não estar associadas a correntes ricas em glicose. Porém, um dos gargalos a ser vencido na fermentação desses hidrolisados é a formação de inibidores gerados durante estes processos termicamente ou quimicamente intensos. Dependendo da severidade do pré-tratamento, tem-se a formação de ácido acético, 2-furaldeído (furfural), 5-hidroximetilfurfural (HMF), e compostos fenólicos, derivados da degradação da hemicelulose, xilose, glicose e da lignina, respectivamente. A proporção destes componentes varia de acordo com o processo de pré-tratamento escolhido, e suas concentrações no hidrolisado podem inibir o processo fermentativo (Hah-Hägerdal *et al.*, 2007; Almeida *et al.* 2011; Ask *et al.*, 2013).

1.2.1 Rotas biotecnológicas para produção de etanol 2G

Várias rotas biotecnológica para produção de etanol a partir de resíduos lignocelulósicos vêm sendo estudadas hoje no mundo, as 5 principais estratégias de processo estão esquematizadas na figura 1, sendo elas: 1) sacarificação e fermentação separadas (SHF), 2) sacarificação e fermentação simultâneas (SSF), 3) sacarificação e cofermentação (SCF), 4) sacarificação e cofermentação simultâneas, e 5) bioprocessos consolidados (CPB) (Laluce *et al.*, 2012)

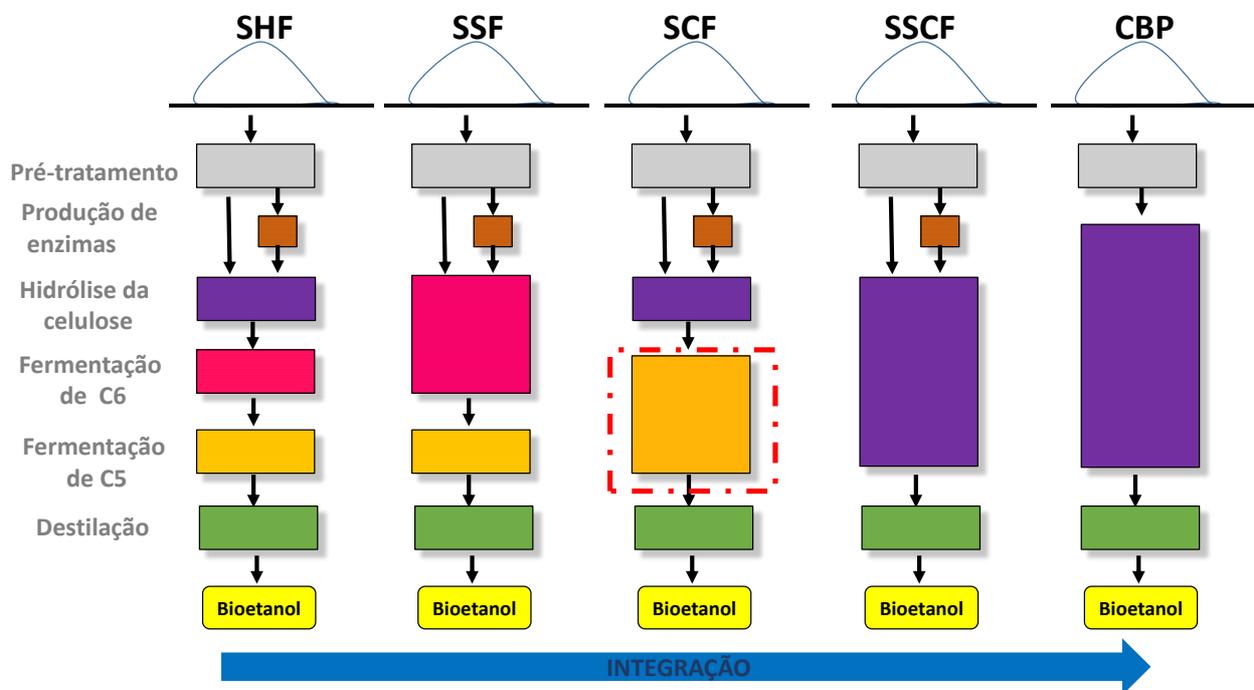


Figura 1: Diferentes estratégias de processo para etanol de segunda geração.
Destacado em vermelho a etapa de cofermentação.

No SHF, as etapas de sacarificação e fermentação ocorrem em reatores diferentes o que permite a realização de cada etapa em suas condições ótimas, por exemplo, de temperatura. Por outro lado, apresentam um custo de capital superior pela menor integração das etapas e pode levar a inibição das enzimas pelo substrato formado na etapa de hidrólise. Além disso, a contaminação por outros micro-organismos é facilitada uma vez que o processo é lento, levando por vezes mais de um dia, e gera uma solução açucarada rica em glicose (McMillan *et al.*, 2004).

No SSF, há a integração das etapas de sacarificação a de fermentação, o que reduz o risco de contaminação uma vez que o açúcar livre no meio é próximo a zero, pelo consumo imediato do açúcar formado pelo micro-organismo. Isso também mantém as enzimas desreprimidas. Além deste fator, a presença de etanol sendo produzido no meio também protege da contaminação (McMillan *et al.*, 2004). Porém, como geralmente a temperatura ótima de fermentação não corresponde a mesma

Introdução

temperatura ótima para atuação das enzimas, a taxa de hidrólise enzimática pode ser prejudicada, por não estar na temperatura ótima.

No SSCF, tem-se a sacarificação e a fermentação das duas correntes de açúcar ocorrendo no mesmo reator, o que implica na utilização de um micro-organismo que possa cofermentar (consumindo tanto açúcares C5, quanto C6). O maior nível de integração reduz os custos de capital e simplifica o processo (Teixeira *et al.*, 2000; McMillan *et al.*, 2004). Como variação deste processo, há a possibilidade da cofermentação ocorrer separada da sacarificação, como no SHF, porém com a fermentação conjunta das duas correntes (SCF). Essa variação permite a integração da etapa de fermentação, utilizando um micro-organismo capaz de fermentar açúcares C5 e C6, entretanto permite também a sacarificação nas condições ótimas da enzima.

Por fim, o processo mais integrado e biotecnologicamente mais longe de se obter alta produtividade e escalonamento até momento, é o bioprocessamento consolidado, no qual, o micro-organismo além de produzir as enzimas responsáveis pela sacarificação da biomassa, simultaneamente ocorre o processo de sacarificação e co-fermentação (Laluce *et al.*, 2012). Estratégias intermediárias nesta direção estão sendo desenvolvidas, com a expressão de celulasas em leveduras (Fugita *et al.*, 2004, Den Haan *et al.*, 2006; Amorim, 2013, revisado recentemente por Kricka *et al.*, 2014). Como prova de conceito, comprovou-se a possibilidade da cofermentação da xilose e celobiose em *S. cerevisiae* geneticamente modificada (com via para consumo de xilose), com a expressão de um transportador de celobiose e expressão intracelular da enzima β -glicosidase, que quebra este açúcar intermediário da sacarificação da fibra celulósica em glicose (Ha *et al.*, 2010). Desta forma, com a quebra da celobiose em glicose ocorrendo apenas dentro da célula, não há competição entre glicose e xilose pela entrada na célula, o que facilita a assimilação da xilose pela levedura (Ha *et al.*, 2010).

Para a viabilidade econômica da produção de etanol de 2ª geração é essencial o aproveitamento das pentoses existentes na biomassa (Weber *et al.*, 2010). Em todas as estratégias citadas, para o aproveitamento integral dos açúcares gerados, precisa-se de um micro-organismo robusto capaz de fermentar a corrente de xilose, estando ela associada ou não a uma corrente rica em glicose.

Introdução

Embora quase todas as bactérias e alguns fungos, como *Scheffersomyces stipitis* (*Pichia stipitis*), *Pachysolen tannophilus*, *Candida shehatae* e *Kluyveromyces marxianus*, *Clostridium sp*, *Bacillus macerans*, *Thermoanaerobacter ethanolicus*, *Monilia sp.*, *Neocallimastix sp.*, *Trichoderma reesei* e *Fusarium oxysporum*, *Spathaspora passalidarum*, sejam capazes de crescer em xilose, não são adequados a produção industrial, embora alguns sejam capazes de realizar o bioprocesso consolidado (CPB). Esses micro-organismos apresentam baixas taxas de produtividade, ou a produção concomitante de outros subprodutos, ou ainda requerem condições estritas de aeração que são difíceis de controlar na escala industrial (Teunissen *et al.*, 1991 *apud* Boles & Wiedemann, 2009; Laluce *et al.*, 2012, Su *et al.*, 2013). Por outro lado, a levedura *Saccharomyces cerevisiae* é uma excelente produtora de etanol, muito empregada na indústria fermentativa, por ter alta produtividade, robustez e estar bem adaptada às variações dos ambientes industriais (Della-Bianca & Gombert, 2013). Entretanto, é incapaz de fermentar xilose eficientemente (Hahn-Hägerdal *et al.*, 1994; Matsushika *et al.*, 2009). Nas últimas décadas, esta levedura foi alvo para diferentes estratégias de engenharia genética de forma a permitir a fermentação de xilose por esta levedura (revisado por Van Vleet & Jeffries, 2009; Cai *et al.*, 2012; Kim *et al.*, 2013; Moysés *et al.*, 2016 e Zhao *et al.*, 2016)

1.3 Leveduras Industriais

A levedura *S. cerevisiae* vem sendo utilizada pelo homem em diversos processos biotecnológicos ao longo de muitos séculos. Essa “domesticação” fez desse micro-organismo um dos mais importantes modelos de estudos genéticos e bioquímicos, tornando-se um dos sistemas eucarióticos mais conhecidos (Braus, 1991; Nevoigt, 2008, Feldmann, 2010). O conhecimento fundamental da fisiologia de *S. cerevisiae* resultou em um número extraordinário de linhagens de laboratório, derivadas por seleção, mutação ou manipulação genética (Ostergaard *et al.*, 2000; Nevoigt, 2008). Por outro lado, sua ampla aplicação industrial ao longo de décadas levou à seleção de linhagens mais resistentes a diversas condições ambientais como pressão osmótica, variações de pH, altas concentrações de etanol, contaminações microbianas, variações de

Introdução

temperatura, presença de inibidores, e até mesmo a pressão a qual é submetida pela altura das dornas de fermentação industrial (Zaldivar *et al.*, 2002; Silva-Filho *et al.*, 2005; Basso *et al.*, 2008, Della-Bianca & Gombert, 2013). Apesar do intenso uso de linhagens laboratoriais como modelos para testes de conceito devido à facilidade de sua manipulação genética (Nevoigt, 2008), sua aplicação industrial é, porém, limitada uma vez que estas cepas perderam as características que conferem robustez, fundamentais para a persistência nos ambientes industriais (Wheals, *et al.*, 1999; Zaldivar *et al.*, 2002; Della-Bianca & Gombert, 2013).

Apesar das vantagens das leveduras industriais, que as tornam modelos ideais para a manipulação genética para aplicação em novos processos biotecnológicos em escala industrial, elas são geneticamente mais complexas. O longo processo de seleção no ambiente industrial foi provavelmente responsável pela alta complexidade genética destas linhagens, que muitas vezes são poliploides, característica que dificulta sua manipulação genética (Gueiros, 2006; Lucena *et al.*, 2007; Carreto *et al.*, 2008). A partir do sequenciamento de leveduras industriais brasileiras (Argueso *et al.*, 2009; Babrzadeh *et al.*, 2012), foram observados diversos polimorfismos e alta heterozigotidade quando comparadas às linhagens de laboratório para as quais foram direcionados os esforços de desenvolvimento das principais ferramentas de manipulação genética.

Frente ao desafio de se manipular geneticamente leveduras industriais, Reis (2012) abriu caminho para a compreensão da complexidade genética da linhagem JP1, uma levedura da indústria canavieira da Região Nordeste (Silva-Filho *et al.*, 2005). Neste trabalho, foram construídas ferramentas genéticas para a modificação desta levedura, que se mostrou diploide e homotética. Foi desenvolvida uma linhagem de JP1 auxotrófica para uracila (duplo mutante *ura3*), e a construção de vetores para remoção de marcas dominantes com o sistema Cre-loxP, que se mostrou funcional em JP1 (Reis *et al.*, 2012b).

Hoje, algumas ferramentas moleculares estão disponíveis para a manipulação de leveduras industriais (Takahashi *et al.*, 2003; Schuller & Casal, 2005; Borges, 2009 e Reis, 2012), como vetores para integração em múltiplas cópias em regiões delta (δ) (Borges, 2009) e estratégias de recombinação baseadas no sistema Cre-loxP (Guldener, 1996),

Introdução

que permitem a integração ectópica nas sequências repetitivas TY δ e a reciclagem de marcas dominantes, respectivamente. As regiões δ são sequências de aproximadamente 50 pb amplamente espalhadas ao longo do genoma da levedura como resultado da movimentação de transposons tipo Ty1 (Feldman, 2010). Por não serem essenciais, são ótimos alvos para eventos de integração em múltiplas cópias.

S. cerevisiae possui status GRAS. Por questões de biossegurança, para aplicação em grande escala de uma levedura geneticamente modificada de classe de risco 1, como é o caso de *S. cerevisiae*, é interessante que a mesma não possua marcas dominantes e a capacidade de transferir os genes heterólogos para linhagens selvagens.

Recentemente, a CTNBio, liberou a utilização de uma levedura geneticamente modificada (OGM) para produção industrial de etanol, para a empresa BioCelere (Diário Oficial de 11 de dezembro de 2013, parecer 3877/2013). Esta foi a primeira levedura autorizada no país para a produção de etanol de segunda geração em grande escala. Curiosamente, a linhagem em questão, foi desenvolvida pela DSM (uma empresa de origem holandesa), porém, seu desenvolvimento foi descrito por Kyuper *et al.* (2005b), sendo portanto, uma linhagem de laboratório, derivada de CEN.PK102-3A com o genótipo MATa/MATa (diploide, oriunda de hibridização com ela mesma, não esporulante) (ura3-52 leu2-112 loxP-PTPI::(-266,-1)TAL1 gre3D::hphMX pUGPTPI-TKL1 pUGPTPIRPE1 KanloxP-PTPI::(-40,-1)RKI1 {pAKX002,p415ADHXKS}). Logo, o único gene desta levedura que é heterólogo é o codificador da xilose isomerase (XylA), oriundo do fungo não patogênico *Piromyces* sp., as demais construções foram para aumento da expressão dos genes naturais de levedura *XKS1*, *TAL1*, *TKL1*, *RPE1* e *RKI1* e deleção do gene *GRE3*. De acordo com o relatório apresentado a CTNBio (disponível no site da CTNBio), esta levedura foi submetida a diferentes estratégias de evolução, para tolerância a ácido acético e inibidores do hidrolisado, porém não há informações do desempenho desta linhagem em hidrolisado na literatura. Entretanto, ela abre precedente a que novas linhagens, como a que foi desenvolvida no presente trabalho, mais rapidamente sejam autorizadas para uso comercial.

Dentro deste aspecto, uma estratégia de remoção de marcas de seleção dominantes (resistência a drogas) amplamente utilizada em *S. cerevisiae* é o sistema

Introdução

baseado na ação da recombinase Cre (sistema Cre-loxP), usado para remover marcas flanqueadas por sítios *loxP* (Carter & Delneri, 2010).

A sequência *loxP* (ATAACTTCGTATAATGTATGCTATACGAAGTTAT) é encontrada no sítio *lox* do genoma do bacteriófago P1. Essa sequência é formada por dois palíndromos invertidos de 13 pb e uma sequência central de 8 pb, totalizando 34 pb. As duas sequências palindrômicas são sítios de ligação para a enzima recombinase Cre enquanto que os 8 pb centrais funcionam como espaçador e direcionam a sequência. Duas sequências que estejam orientadas na mesma direção ao serem recombinadas produzem um sítio único de *loxP* com liberação do fragmento interno entre elas (esquema na figura 2, Sauer, 1996; Carter & Delneri, 2010).

A recombinase Cre proporciona a excisão por recombinação sítio-específica. A vantagem desse sistema é que vários eventos de excisão podem ocorrer simultaneamente após a indução da expressão da recombinase, entretanto, a presença de múltiplos sítios próximos pode levar a deleção de regiões indesejadas (Sauer, 1996; Carter & Delneri, 2010). A levedura EBY.VW4000, teve 18 transportadores de hexoses nocauteados através de deleções sequenciais usando o sistema Cre-lox (Wieczorke *et al.*, 1999), entretanto, recentemente, com o sequenciamento desta levedura que vem amplamente sendo usada para estudo de transportadores, constataram que houve vários eventos de recombinação, inclusive com perda de braços cromossômicos e grandes deleções (Solis-Escalante *et al.*, 2015)

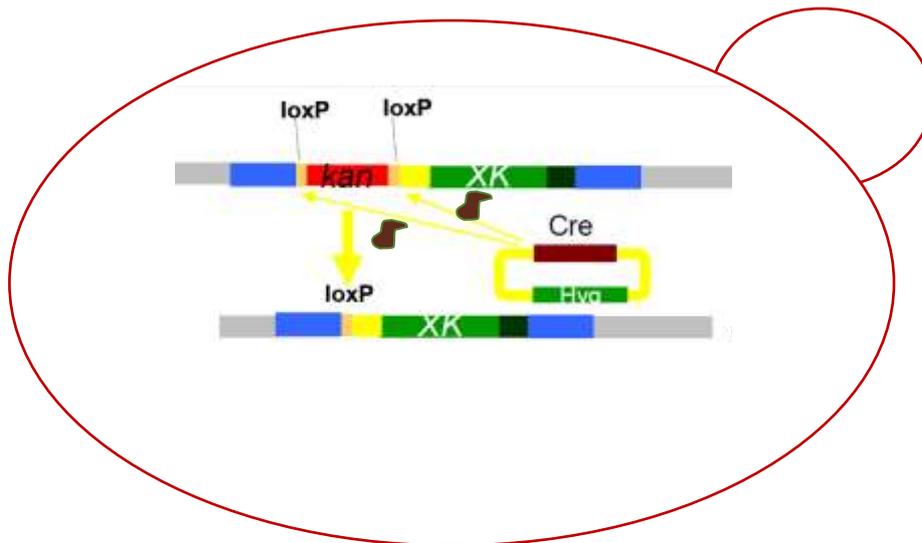


Figura 2: Esquema simplificado do Sistema cre-lox em leveduras.

Outro aspecto relevante na modificação genética das leveduras industriais para aplicação em grande escala nos processos biotecnológicos é a estabilidade das modificações. Reis (2012) construiu a primeira cepa de JP1 geneticamente modificada para utilização de xilose na qual os genes responsáveis por conferir este fenótipo estão sendo expressos a partir de vetores episomais que, a longo prazo e em larga escala, poderiam ser perdido da população. Além disso, há a possibilidade de transferência horizontal desses vetores que, somados à existência de marcas dominantes, tornam esta levedura ainda não adequada para uma aplicação industrial. A integração dos genes e a remoção das marcas de seleção são aspectos fundamentais para aplicação industrial em larga escala e foram objetivos do presente trabalho.

1.4 Fermentação de xilose por *Saccharomyces cerevisiae*

Muitos esforços têm sido feitos para se obter linhagens de *S. cerevisiae* que possam cofermentar todos os açúcares existentes na biomassa lignocelulósica. A partir da década de 90, diversos grupos investiram na engenharia metabólica de *S. cerevisiae* mostrando a viabilidade de introduzir uma via metabólica para xilose em *S. cerevisiae* interligada com a via das pentoses fosfato (PPP) (Ho & Brainard, 1998; Jeffries, 2006).

Introdução

A XR e a XDH são oxidorreduções e têm especificidade por diferentes cofatores (NADPH e NAD⁺) que precisam ser regenerados para manter o balanço redox na célula (figura 3). A levedura *S. stipitis*, por exemplo, depende de pequenas quantidades de oxigênio para recuperar o equilíbrio redox e poder eficientemente fermentar xilose por essa via (Van Djken *et al.*, 1986; Pereira Jr *et al.*, 2008; Nevoigt, 2008;). A utilização desses genes em *S. cerevisiae* não foi suficiente para permitir a eficiente fermentação da xilose em anaerobiose, acumulando grandes quantidades de xilitol (Kotter *et al.*, 1990 *apud* Brat *et al.*, 2009; Kotter & Ciriacy 1993; Ho & Brainard, 1998; Eliasson *et al.*, 2001).

A estratégia de introdução da XI de origem bacteriana ou de *Piromyces* sp. se mostrou mais independente das condições de aeração, uma vez que esta enzima não depende de cofatores (Kuyper *et al.*, 2003; Van Maris *et al.*, 2007). A XI é uma enzima dependente de cátions divalentes, como Co²⁺, Mn²⁺ ou Mg²⁺, dependendo de sua origem, mas que facilmente são encontrados no citoplasma (Van Maris *et al.*, 2007).

Ambas as estratégias foram capazes de gerar leveduras que metabolizam e crescem bem em xilose como única fonte de carbono e são capazes de fermentar xilose a etanol. Mas apesar dos vários esforços, ainda não foram desenvolvidas linhagens capazes de converter xilose a etanol tão eficientemente como convertem glicose.

Trabalhos como os de Kuyper *et al.* (2005) e Sonderegger & Sauer (2003) mostram a importância da evolução metabólica e o papel da modificação de alguns outros genes do metabolismo, para aumento da eficiência de utilização de xilose. A introdução da XI sem a etapa de evolução metabólica gera uma levedura com menor capacidade de fermentar xilose quando comparada com a via XR/XDH (Bettiga *et al.*, 2008)

Vários estudos foram realizados envolvendo a superexpressão do gene codificador da XK, de genes envolvidos na via das PPP e deleção do gene *GRE3*, que codifica uma aldose redutase que desvia a via de xilose para formação de xilitol (Van Maris *et al.*, 2007). A superexpressão do gene da XK se mostrou positiva no aumento do fluxo metabólico de xilose, aumentando a formação de etanol (Ho & Brainard, 1998; Wahlbom *et al.*, 2003a). Em 2001, Traff *et al.* confirmaram a redução de xilitol e melhora

Introdução

do fluxo de xilulose para o metabolismo central, pela combinação da deleção de *GRE3* e super expressão de XK em uma cepa com XI bacteriana.

O gene *GRE3* de *S. cerevisiae*, presente no cromossom VII, codifica uma aldose redutase dependente de NADPH, que pode atuar com uma XR (figura 3), levando a xilose presente no citoplasma a xilitol (Traff *et al.*, 2001). Inclusive, quando superexpresso, em conjunto com o gene da XDH, a aldose redutase endógena é capaz de permitir o crescimento em xilose (Toivari *et al.*, 2004), porém de forma menos eficiente do que pela expressão de genes da XR e da XDH de outros fungos.

Muitas tentativas de se expressar XI bacterianas em *S. cerevisiae* foram feitas, ao longo de décadas, com genes de *Bacillus subtilis*, *Lactobacillus pentosus*, *Clostridium thermosulfurogenes* e *E. coli*, mas não conseguiram produzir enzimas ativas (Brat *et al.*, 2009). A primeira XI bacteriana que se mostrou ativa foi a de *Thermus thermophilus* (Walfridsson *et al.*, 1996), entretanto sua atividade era muito baixa a 30°C, uma vez que sua temperatura ótima era de 80°C. Posteriormente rodadas de mutagênese e seleção melhoraram a atividade na temperatura de crescimento da levedura, mas ainda assim não era suficiente para permitir a eficiente fermentação de xilose pela levedura (Lonn *et al.*, 2003).

A partir de uma seleção de mais de 15 XI bacterianas expressas em *S. cerevisiae*, foi descoberta uma enzima de *Clostridium phytofermentans* que se mostrou com atividades próximas as da XI de *Piromyces sp.*, com a vantagem de não ser tão inibida por xilitol quanto esta última ($K_i=15\text{mM}$ e $K_i=5\text{mM}$, respectivamente) (Brat *et al.*, 2009).

Um dos melhores resultados já reportados para a produção de etanol a partir de xilose, vem de uma cepa com XI de *Piromyces sp.* que teve todos os genes da via PPP superexpressos, o gene *GRE3* deletado, seguido de uma longa evolução metabólica em aerobiose, microaerobiose e anaerobiose (Kuyper *et al.*, 2005).

Dos muitos trabalhos publicados com o desenvolvimento de *S. cerevisiae* geneticamente modificadas para metabolização de xilose, na sua maioria as modificações foram realizadas a partir de linhagens de laboratório (tabela 2, Cai *et al.*, 2011). Ambas as estratégias de rotas metabólicas continuam sendo usadas para o

Introdução

desenvolvimento de novas linhagens, com foco em: 1) melhorias das linhagens para aumentar os rendimentos e produtividade, buscando reduzir o efeito da diauxia das fermentações com xilose e glicose; 2) realizar as modificações em linhagens industriais; 3) tornar as leveduras mais resistentes aos inibidores; 4) introdução de vias utilização de arabinose, segundo açúcar mais abundante na hemicelulose (Oreb *et al.*, 2012); e 5) expressão de transportadores de celobiose e gene da β -glicosidase intracelular (Ha *et al.*, 2010).

Introdução

Tabela 2: linhagens de *S. cerevisiae* recombinante reportadas para fermentação de xilose (adaptado de Cai *et al.* 2012)

Cepa	Cepa de origem	Genótipo	Condições da fermentação anaeróbica					Referências
			meio	Xilose (g/L)	Biomassa (g/L)	Tempo (h)	Etanol (g/L)	
H1691	CEN.PK 2	<i>PsXR^G,PsXDH^G, ScXK^P</i>	Mínimo	50	5	88	6	Toivari <i>et al.</i> (2001)
H2674	CEN.PK 2	<i>PsXR^G,PsXDH^G, ScXK^G</i>	Mínimo	50	3,8	120	7	Verho <i>et al.</i> (2003)
H2673	CEN.PK 2	<i>PsXR^G,PsXDH^G, ScXK^G, GDP1^P</i>	Mínimo	50	3	120	9	Verho <i>et al.</i> (2003)
H2723	CEN.PK 2	<i>PsXR^G,PsXDH^G, ScXK^G, ΔZWF1</i>	Mínimo	50	4,2	120	9	Verho <i>et al.</i> (2003)
H2684	CEN.PK 2	<i>PsXR^G,PsXDH^G, ScXK^G, GDP1^P, ΔZWF1</i>	Mínimo	50	1,9	120	16	Verho <i>et al.</i> (2003)
TMB3001	CEN.PK 113-7A	<i>PsXR^G,PsXDH^G, ScXK^G</i>	Mineral	50	5	70	15,5	Jeppsson <i>et al.</i> (2002)
TMB3255	TMB3001	<i>PsXR^G,PsXDH^G, ScXK^G, ΔZWF1</i>	Mineral	50	5	70	21	Jeppsson <i>et al.</i> (2002)
TMB3008	CEN.PK 2-1C	<i>PsXR^G,PsXDH^G, ScXK^G, ΔGND</i>	Mineral	50	5	70	19	Jeppsson <i>et al.</i> (2002)
TMB3057	CEN.PK 2-1C	<i>PsXR^G,PsXDH^G, ScXK^G, TAL1^G, TKL1^G,RKI1^G, RPE1^G, ΔGRE3</i>	Mineral	50	5	67	17	Karhumaa <i>et al.</i> (2007)
TMB3413	CEN.PK 2-1C	<i>PsXR^P,PsXDH^P, ScXK^G, TAL1^G, TKL1^G,RKI1^G, RPE1^G, ΔGRE3</i>	Mineral	10	2	118	2,6	Runquist <i>et al.</i> (2009)
TMB3411	CEN.PK 2-1C	<i>PsXR^P,PsXDH^P, ScXK^G, TAL1^G, TKL1^G,RKI1^G, RPE1^G, GXF1^G, ΔGRE3</i>	Mineral	10	2	118	2,4	Runquist <i>et al.</i> (2009)
TMB3001 C1	TMB3001	<i>PsXR^G,PsXDH^G, ScXK^G, mutação e seleção</i>	Minimo	10	NR	NR	2,5	Sonderegger & Sauer (2003)
1400 (pLNH32)	1400	<i>PsXR^P,PsXDH^P, ScXK^P</i>	Complexo	50	30	47	17	Ho &Brainard (1998)
TMB3399	USM21	<i>PsXR^G,PsXDH^G, ScXK^G</i>	Mineral	20	3,7	18	1	Wahlborn <i>et al.</i> (2002)
TMB3400	TMB3399	<i>PsXR^G,PsXDH^G, ScXK^G, mutação e seleção</i>	Mineral	50	5	96	17	Karhumaa <i>et al.</i> (2007)
MA-R4	IR-2	<i>PsXR^G,PsXDH^G, ScXK^G</i>	Complexo	45	2,8	48	15,3	Matsushika <i>et al.</i> (2009)
MA-R5	IR-2	<i>PsXR^G,PsXDH(D207A/I208R/F209S)^G, ScXK^G</i>	Complexo	45	2,8	48	16,2	Matsushika <i>et al.</i> (2009)
TMB3102	CEN.PK 2-1C	<i>TtXI^P, ΔGRE3</i>	Mineral	50	10	70	10,5	Traff <i>et al.</i> (2001)
TMB3104	CEN.PK 2-1C	<i>TtXI^P, ScXK^P, ΔGRE3</i>	Mineral	50	10	70	0	Traff <i>et al.</i> (2001)
INVSc1/pRS406/pWOXYLA	INVSc1	<i>OsXI^P</i>	Mínimo	50	5	140	19,5	Madhavan <i>et al.</i> (2009a)
INVSc1/pRS406XKS/pRS405/pWOXYLA	INVSc1	<i>OsXI^P, ScXK^G</i>	Mínimo	50	5	140	20	Madhavan <i>et al.</i> (2009a)
INVSc1/pRS406XKS/pILSUT1/pWOXYLA	INVSc1	<i>OsXI^P, ScXK^G, SUT1^G</i>	Mínimo	50	5	140	19	Madhavan <i>et al.</i> (2009a)
ADAP8	INVSc1/pRS406XKS/pILSUT1/pWOXYLA	<i>OsXI^P, ScXK^G, SUT1^G, Adaptação em xilose</i>	Complexo	20	5	116	6,4	Madhavan <i>et al.</i> (2009b)
TMB3066	CEN.PK 2-1C	<i>PisXI^P, ScXK^G, TAL1^G, TKL1^G,RKI1^G, RPE1^G, ΔGRE3</i>	Mineral	50	5	67	21	Karhumaa <i>et al.</i> (2007)
RW202-AFX	CEN.PK113-5D	<i>PisXI^P, adaptação em xilose</i>	Mineral	20	1,8	114	8,2	Kuyper <i>et al.</i> (2004)
RWB217	CEN.PK 102-3A	<i>PisXI^P, ScXK^P, TAL1^G, TKL1^G,RKI1^G, RPE1^G, ΔGRE3</i>	Mineral	20	1,7	44	8,4	Kuyper <i>et al.</i> (2005a)
RWB218	RWB217	<i>PisXI^P, ScXK^P, TAL1^G, TKL1^G,RKI1^G, RPE1^G, ΔGRE3 Adaptação xilose e glicose</i>	Mineral	20	1,85	24	8	Kuyper <i>et al.</i> (2005b)
BWY10Xyl	Barra Grande	<i>CpXI^P, Adaptação em xilose</i>	Mineral	25	3,2	138	10	Brat <i>et al.</i> (2009)
H131-A3-ALCS		<i>CpxyIA, xyl3, TAL1, TKL1, RPE1, RKI1, evoluida</i>	Mineral	40	0,05	17	30	Zhou <i>et al.</i> ,(2012)
CIBTS0735		<i>PisxylA^P,XKS1,TAL1,TKL1,RPE1,RKI1,Δarg1,Δgre3,GXF1, evoluida</i>	Complexo	40	0,63	17,5	24	Diao <i>et al.</i> (2013)
GS1.11-26	HDY.GUF5	<i>CpxyIA,XKS1,TAL1,TKL1,RPE1,RKI1,HXT7,AraT,AraA,AraB,AraD,TAL2,TKL2, evoluida</i>	Complexo	35	1,3	16,1	17	Demeke <i>et al.</i> (2013)

XR= xilose redutase, XDH= xilitol desidrogenase, XI= xilose isomerase, GDP1= gliceraldeido 3-fosfato desidrogenase de *Kluyveromyces lactis*, GFX1= transportador de *C. intermedia*, GND1= 6-fosfogluconato desidrogenase, GRE3= aldose redutase, ScXK= xiluloquinase de *S. cerevisiae*, TAL1= transaldolase, TKL1=transcetolase, ZWF1= glicose-6-fosfato desidrogenase, SUT1= transportador de *P. stiptis*, RKI1= ribose 6-fosfato-cetoisomerase. P e G sobrescritos correspondem a genes em plasmídeo (P) ou integrados no genoma (G). *Ps*, *PIS*, *Os*, *SC* e *Tt* antes de cada gene corresponde a genes de originais de *P. stiptis*, *Pyromices sp.*, *Orpinomyces sp.*, *S. cerevisiae* e *Thermus thermophilus*, respectivamente.

Introdução

Observa-se na tabela 2 que bons rendimentos e produtividades já foram alcançados com algumas das linhagens desenvolvidas (destacados em vermelho), com base na concentração de etanol e o tempo das fermentações observados na tabela 2. Entretanto, todos os resultados destacados na tabela, foram obtidos em meio sintético, sem a presença de inibidores, que estão presentes nos hidrolisados de segunda geração. Apesar dos bons rendimentos, observa-se em geral tempos de fermentação muito longos, o que representa aumento de custo do processo e maiores riscos de contaminação.

Ainda são poucos os trabalhos com fermentações usando os substratos reais para a produção de etanol de lignocelulose (Diao *et al.*, 2013; Demeke *et al.*, 2013a ; Parreiras *et al.*, 2014; Ko *et al.*, 2016). O desempenho das leveduras frente aos hidrolisados foi inferior as fermentações em meio sintético, com produtividades muito menores. A levedura desenvolvida por Diao *et al.* (2013), por exemplo, que como pode ser vista na tabela 2, apresentava um dos melhores resultados, levando apenas 17 horas para utilizar toda a xilose do meio, em fermentações com hidrolisado levou mais de 150 horas de processo, com uma queda de produtividade de 0,8 g/l/h para 0,1 g/l/h. Portanto, é fundamental que a avaliação das leveduras para segunda geração seja realizada não só em meio sintético, mas principalmente em substratos reais, com seus inibidores e em condições as mais próximas possíveis do processo industrial.

Muitas vezes, apenas as modificações genéticas racionais de um micro-organismo não oferecem o padrão desejado, sendo necessária a alteração em outros pontos das rotas metabólicas da levedura. Pela dificuldade de se identificar e prever cada alteração pontual do metabolismo que seria necessária, uma alternativa é fazer uso da adaptação metabólica, com base nos princípios da seleção natural. A comparação de RW217 e RW218 (Kuyper *et al.*, 2005; tabela 2) mostra o papel da adaptação metabólica, permitindo uma redução expressiva do tempo de fermentação. Adicionalmente, a avaliação das alterações globais de expressão ocorridas na levedura adaptada por técnicas avançadas de sequenciamento de alto desempenho como RNA-seq ou pela técnica de *microarray* de DNA, fornecem importantes informações para futuros pontos racionais de melhoramento genético. (Nevoigt, 2008; Kim *et al.*, 2013).

Nos últimos anos, a maioria dos trabalhos com desenvolvimento de novas linhagens, algumas delas partindo de linhagens industriais (Demeke *et al.* 2013, Diao *et al.*, 2013), incluíram etapas de adaptação metabólica, e demonstraram a importância da mesma para obtenção dos resultados observados (Lee *et al.* 2014). Alguns trabalhos com evolução das linhagens fermentadoras de xilose observaram o aumento da expressão de genes de transportadores, indicando que uma vez obtendo leveduras com rápida metabolização de xilose, o transporte da xilose pode ser um fator limitante (Wahlbom *et al.*, 2003b; Kuyper *et al.*, 2005b; Vilela *et al.*, 2015). Diao *et al.* (2013) obteve fermentações de xilose em meio sintético, com consumo quase total da xilose em 24 horas, por uma levedura que também teve o transportador de xilose, GXF1 de *Candida intermedia*, introduzido. Dentro desta linha, alguns trabalhos vêm sendo desenvolvidos no sentido de comparar e identificar melhores transportadores de xilose que possam ser futuramente expressos em *S. cerevisiae* (Colabardini *et al.* 2014, Farwick *et al.* 2014; Nijland *et al.*, 2014).

1.5 Transportadores de açúcares

Na década de 80 foi descrito o primeiro transportador de monossacarídeos em leveduras (GAL2, que codifica uma permease de galactose) (Tschopp *et al.*, 1986). A partir daí, 20 genes de transportadores de açúcares foram identificados em *S. cerevisiae*, por complementaridade funcional (tabela 3). Pela forte homologia da sequência de aminoácidos e conservação estrutural dos transportadores, principalmente com relação a 5 motivos presentes em quase todos os transportadores, independente de seus mecanismos de ação e substrato (Saier *et al.*, 1996; Leandro *et al.*, 2009).

Introdução

Tabela 3: Transportadores de açúcares da família HXT

Transportador	substrato	Km (mM)	Similaridade	Referência
Hxt1 570aa [DF]	Glicose	100	86% Htx3	Kruckeberg (1996); Reifenberg <i>et al.</i> (1997); Liu <i>et al.</i> (2004)
	Frutose	>300		
	Manose	ND		
Hxt2 567aa [DF]	Glicose	10; 1,5; 60; 83	81% hxt3 69% Gal2, HXT6 e HXT7	Kruckeberg & Bisson (1990); Reifenberg <i>et al.</i> (1997); Kruckeberg <i>et al.</i> (1999); Maier <i>et al.</i> (2002)
	Frutose	19		
	Manose	ND		
Hxt3 567aa [DF]	Glicose	60	86,4% hxt1 75% hxt6-7 e htx4	Kruckeberg (1996); Reifenberg <i>et al.</i> (1997); Liu <i>et al.</i> (2004)
	Frutose	125		
	Manose	ND		
Hxt4 560aa [DF]	Glicose	9	86% Hxt6 e hxt7	Johston <i>et al.</i> (1994); Reifenberg <i>et al.</i> (1997); Liu <i>et al.</i> (2004)
	Frutose	52		
	Manose	ND		
Hxt5 592aa [DF]	Glicose	10	72% hxt1	Kruckeberg (1996); Diderich <i>et al.</i> (1997); Liu <i>et al.</i> (2004)
	Frutose	40		
	Manose	>100		
Hxt6 e Hxt7 570aa [DF]	Glicose	1-2	99,7% entre eles 83% hxt4	Kruckeberg (1996); Reifenberg <i>et al.</i> (1997); Boles & Hollenberg (1997); Liu <i>et al.</i> (2004)
	Frutose	2,6-4,6		
	Manose	ND		
Hxt8 569aa [DF]	Glicose	ND	70% Hxt6-7 e hxt4; 67% Gal2	Kruckeberg (1996); Wiczorke <i>et al.</i> (1999)
	Frutose	ND		
	Manose	ND		
Hxt9 e Hxt11 567aa [DF]	Glicose	ND	97% ente eles 71% Hxt6-7	Kruckeberg (1996); Wiczorke <i>et al.</i> (1999); Liu <i>et al.</i> (2004)
	Frutose	ND		
	Manose	ND		
	Galactose	ND		
Hxt10 546aa [DF]	Glicose	ND	79% Hxt2	Kruckeberg (1996); Boles & Hollenberg (1997); Wiczorke <i>et al.</i> (1999)
	Frutose	ND		
	Manose	ND		
	Galactose	ND		
Hxt12	ND	ND	>97% Hxt11 *	Kruckeberg (1996); Boles & Hollenberg (1997);
Hxt13 e Hxt17 564aa Hxt15 e Hxt16 567aa[DF]	Glicose	ND	90-99% entre os 4 <58% outros Hxts	Kruckeberg (1996); Boles & Hollenberg (1997); Wiczorke <i>et al.</i> (1999)
	Frutose	ND		
	Manose	ND		
Hxt14 540aa[DF]	Galactose	ND	<38% com outros HXTs	Kruckeberg (1996); Boles & Hollenberg (1997); Wiczorke <i>et al.</i> (1999)
Gal2 574aa[DF]	Glicose	2	72% Hxt6-7	Nishizawa <i>et al.</i> (1995); Kruckeberg (1996); Reifenberg <i>et al.</i> (1997); Boles & Hollenberg (1997)
	Galactose	3 e >20		
Rgt2 763aa [s/ transporte]	Sensor de glicose		60%Snf3	Kruckeberg (1996); Özcan & Johnston (1999)
Snf3 884aa [s/ transporte]	Sensor de glicose		26-30% Hxts	Kruckeberg (1996); Özcan & Johnston (1999)

*sequência interrompida pela adição de 2pb, proteína selvagem não expressa.

Adaptado de Leandro *et al.* (2009)

Introdução

A principal família de transportadores de açúcares em *S. cerevisiae* é a família HXT (transportadores de hexoses); esta família de proteínas é composta por Hxt1-17p, Gal2p e dois sensores de glicose Rgt2p e Snf3p (Boles & Hollenberg, 1997). Estes dois últimos, apesar de não serem capazes de transportar açúcares, parecem ter divergido do grupo de forma a atuar como receptores sinalizando quanto à concentração de açúcares no meio extracelular (Özcan *et al.*, 1998). Esta sinalização influencia os níveis de expressão de genes na célula ligados a via glicolítica, inclusive, levando a indução ou inibição da expressão dos próprios HXTs (Özcan *et al.*, 1998).

Os transportadores de *S. cerevisiae* atuam no transporte de açúcares para dentro da célula, de acordo com a concentração do mesmo no meio extracelular, por difusão facilitada (DF), um mecanismo independente de energia (Iagunas, 1993 *apud* Leandro *et al.*, 2009). Outras leveduras, como *S. stipitis*, também possuem transportadores que por transporte ativo, realizam o transporte contra o gradiente de açúcar, geralmente acoplado a um transporte simultâneo de próton(s) e induzidos pela baixa concentração de açúcares extracelular.

Os transportadores de hexose mais importantes em *S. cerevisiae* são HXT1-4, 5, 6 e 7, pois são os únicos que conseguem restabelecer sozinhos o crescimento em glicose de levedura nocaute para os outros transportadores (Reifenberg *et al.*, 1997). Hxt7 é o transportador mais expresso na célula, correspondendo a um transportador de alta afinidade, reprimido em altas concentrações de glicose. Hxt1 e Hxt3 são transportadores de baixa afinidade e tem expressão induzida por glicose. Hxt2 também tem alta afinidade por glicose e é induzido apenas em baixas concentrações de glicose sendo reprimido tanto em alta de glicose quanto na ausência deste açúcar, inclusive, em alta de glicose a célula elimina por endocitose estes transportadores presentes na membrana. Hxt5 e Hxt4 são ambos de média afinidade, o primeiro é regulado pelo crescimento celular e não pela concentração de açúcar no meio, enquanto o segundo é induzido em baixa concentração de glicose e reprimido em alta (Leandro *et al.* 2009).

De acordo com Rintala *et al.* (2008) a expressão dos transportadores HXT é influenciada pela concentração de oxigênio no meio. Sendo aumentada em condições de baixo oxigênio, porém é reduzida na ausência de oxigênio. Fermentações geralmente

são realizadas em condição de anaerobiose. Nesta condição, o transporte de xilose pelos transportadores nativos de *S. cerevisiae*, podem estar sendo limitados pela baixa expressão dos mesmos. A superexpressão de transportadores com promotores constitutivos pode minimizar este efeito.

1.5.1 Transportadores de xilose

Os transportadores da família Hxt são regulados por glicose e a concentração de O₂ (Rintala *et al.*, 2008). Estudos de fermentação de xilose por leveduras recombinantes com a via de xilose introduzida, e mesmo as adaptadas para crescimento em xilose, apontam que um dos principais gargalos para a fermentação de xilose possivelmente seria a entrada de xilose na célula (Runquist *et al.*, 2010; Cai *et al.*, 2012).

Subtil & Boles (2012) comprovaram que o transporte de xilose para dentro da célula é limitado pela inibição competitiva dos transportadores nativos de *S. cerevisiae* por glicose. A partir de uma linhagem de *S. cerevisiae* nocaute para via glicolítica (4 hexoquinases deletadas) capaz de crescer em xilose (via exógena para xilose introduzida), observaram que o crescimento desta levedura era inibido pelo aumento da concentração de glicose no meio em relação a xilose, mesmo sem a glicose ser metabolizada.

Além disso, na ausência de glicose *HXT1*, *HXT4* e *GAL2* têm a transcrição limitada ou bloqueada, e Hxt7 e Hxt5 parecem ser os principais responsáveis pela internalização da xilose, quando esta é a única fonte de carbono.

Diversos grupos vêm buscando identificar transportadores de xilose que possam ser expressos em *S. cerevisiae*, com destaque para transportadores de *S. stipitis*, *Candida intermedia*, fungos filamentosos como *Tichoderma reesei*, *Neurospora crassa* e *Aspergillus nidulans* (Hector *et al.*, 2008; Leandro *et al.*, 2008; Runquist *et al.*, 2009; Du *et al.*, 2010; Colabardini *et al.*, 2014). Devido ao fato desses micro-organismos serem capazes de crescer e, em alguns casos, até fermentar xilose, esperava-se encontrar transportadores específicos para xilose com alta afinidade. Mais de 80 genes putativos para transportadores de açúcares já foram testados em expressão heteróloga em *S. cerevisiae*, entretanto, mais de 70% deles não se mostraram funcionais, e mesmo

Introdução

aqueles que foram expressos pela levedura, apenas 3 apresentavam maior afinidade por xilose que glicose, sendo portanto transportadores específicos de xilose (tabela 4)(Weierstall *et al.*, 1999; Hector *et al.*, 2008; Jeffries, 2009; Du *et al.* 2010; Young *et al.* 2011, Young *et al.* 2013; Ferreira *et al.*, 2013; Wang *et al.*,2015;) Na tabela 4 são apresentados os transportadores que foram expressos em *S. cerevisiae* com seus parâmetros cinéticos em relação ao transporte de xilose e glicose. Outra abordagem também utilizada foi a evolução destes transportadores, por mutagênese e seleção em xilose ou evolução por crescimento em leveduras nocaute para transportadores nativos. Mais de 50 transportadores já foram testados em *S. cerevisiae*, e este número cresce a cada dia conforme mais genomas são sequenciados e novos transportadores putativos são descritos. Alguns trabalhos conseguiram sucesso em aumentar a atividade destes transportadores, porém, quando expressos em *S. cerevisiae* na presença de glicose e xilose, ainda apresentavam maior afinidade por glicose do que por xilose (Saloheimo *et al.*, 2007; Hector *et al.*, 2008; Leandro *et al.*, 2008; Runquist *et al.*, 2009; Young *et al.*, 2011). Os transportadores heterólogos, mesmo os com afinidade aumentada para xilose, quando comparados à capacidade natural de Hxt7 de transportar xilose, sua atividade é inferior à deste transportador nativo (Jojima *et al.*, 2010; Young *et al.*, 2011).

Alguns avanços foram alcançados na redução da diauxia das fermentações de xilose e glicose em *S. cerevisiae* pela superexpressão de *HXT7*. Oreb *et al.* (2012), citam ter obtido um transportador evoluído de Hxt7 com maior afinidade por xilose que por glicose, pela substituição de apenas um aminoácido no resíduo T213. Este mesmo grupo desenvolveu uma estratégia para evolução e seleção de transportadores em *S. cerevisiae*, a partir de uma linhagem em que todos os transportadores Hxts nativos foram deletados e a via glicolítica nocauteada (4 hexo/glicoquinasas deletadas) (Farwick *et al.*, 2014). Com esta linhagem, pela introdução de um transportador específico e a via metabólica do açúcar para o qual se esperava evoluir o transportador, a seleção e evolução foi obtida forçando-se a levedura a repiques sucessivos no açúcar alvo adicionando-se crescentes concentrações de glicose no meio. Dessa forma, ao final do processo, se obteve um transportador que tem a capacidade de transportar o açúcar alvo mesmo na presença de glicose no meio.

Introdução

Kasahara *et al.* (2011) estudaram a estrutura da proteína Hxt7 em busca de resíduos importantes para o reconhecimento do substrato e transposição do mesmo para dentro da célula. Neste estudo, a partir da substituição de resíduos nas posições alvo, glicina 209 (G209) e treonina 213 (T213), estudaram o efeito dessas modificações na capacidade de transporte na presença de diferentes açúcares, associados às mudanças estruturais do transportador. Concluíram que G209 é um resíduo chave para determinação da alta afinidade de transporte e que T213 é um resíduo importante no reconhecimento do substrato, ambos situados na cavidade de translocação do açúcar. A substituição do resíduo T213 por cisteína (C) ou valina (V) levou a uma alteração na estrutura do poro, afetando a distância entre os resíduos D340 e T213, na figura 4a é apresentada a estrutura hipotética da proteína Hxt7 selvagem.

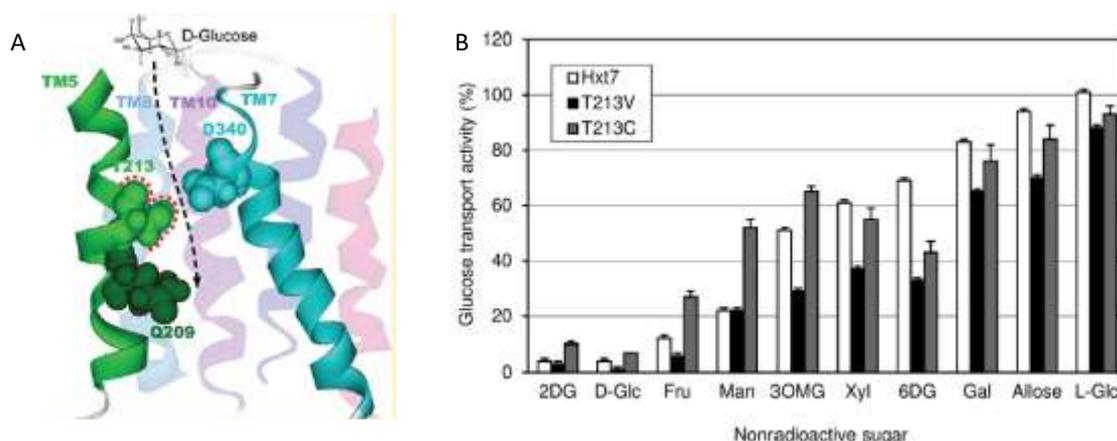


Figura 4: Estrutura 3D de HXT e efeito da substituição do resíduo T213 na afinidade por diferentes açúcares (fonte: Kasahara *et al.*, 2011). A) Estrutura central 3D hipotética de Hxt7. Estrutura gerada pelo programa MODELER com base na similaridade de sequência e alinhamento de Hxt7 com GIT como estrutura de referência, vista lateral. B) Especificidade do substrato de Hxt7 selvagem, T213V e T212C mutantes. Atividade foi medida por 5 s com 1 mM d¹⁴C glicose como substrato na presença dos açúcares indicados na concentração de 20mM. 2DG= 2-deoxiglicose, D-Glc=D-glicose, Fru= frutose, Man= manose, 3OMG=3-o-metil-D-glicose, Xyl=xilose, 6DG=6-deoxiglicose, Gal=galactose, L-Glc= L-glicose.

Corroborando com a citação de Oreb *et al.* (2012), no estudo de Kasahara (2011), de acordo com a figura 4b, pode-se observar que a afinidade do transportador por glicose diminui na presença de xilose, enquanto a atividade é similar ao transportador selvagem quando apenas glicose está presente. Apesar de Oreb *et al.* (2012) não discutirem qual substituição levou ao aumento da afinidade por xilose, e o

Introdução

estudo de Kasahara *et al.* (2011) não discutir sobre este aspecto, ele dá indícios de que a substituição do resíduo T213 por valina, pode ser importante na transformação do transportador de alta afinidade por glicose em um transportador com maior afinidade por xilose, comparado a sua versão selvagem.

O resíduo T213 de Hxt7 está em uma região da sequência de aminoácidos extremamente conservada entre os Hxts, o que sugere papel similar nos transportadores desta família. Apesar de Hxt7 ser o transportador mais estudado para superexpressão em leveduras geneticamente modificadas para fermentação de xilose (Apel *et al.*, 2016), talvez não seja o transportador ideal para a fermentação em processo de batelada. No processo de fermentação em batelada, as concentrações de açúcar no início do processo são em geral altas, reduzindo ao longo do tempo pelo consumo dos mesmos. No início do processo de batelada há a indução principalmente de transportadores de baixa afinidade por glicose, uma vez que a mesma é abundante, enquanto ao final do processo há a participação principalmente de transportadores de alta afinidade, quando a concentração de glicose no meio é baixa. A fermentação da xilose na presença de glicose é retardada até que a concentração de glicose esteja baixa, condição em que se observa a diauxia. Para garantir que a xilose seja consumida no início do processo e seu consumo seja concomitante com a glicose um transportador de xilose de baixa afinidade seria suficiente, contanto que a afinidade por xilose fosse superior a de glicose. Ao final do processo, um transportador de alta afinidade por xilose seria mais eficiente, entretanto, na completa depleção da glicose, os próprios transportadores nativos de glicose (Hxt6 e 7) são capazes de transportar xilose. Se compararmos com os valores de V_{max} de Hxt7 com os demais transportadores (tabela 4), nota-se que a velocidade de assimilação da xilose por este transportador ainda é superior aos demais transportadores heterólogos, o que inclusive permite fermentações com consumo similar ao de glicose quando os mesmos são expressos constitutivamente em leveduras *hxt*-nocaute (Gonçalves, *et al.*, 2014). Entretanto a afinidade ($1/K_m$) por glicose é mais de 200 vezes maior do que a de xilose, levando a um atraso da fermentação quando os açúcares estão juntos (Gonçalves, *et al.*, 2014).

Dentro desta ótica, o presente trabalho estudou a evolução de transportadores de alta, baixa e média afinidade (Hxt7, Hxt3 e Hxt5) de forma a torná-los capazes de

Introdução

transportar xilose mais eficientemente para dentro da célula. A estratégia envolveu a substituição do resíduo T213 (ou seu equivalente homólogo) por Valina, seguida de evolução por crescimento em xilose e 2-deoxiglicose (análogo à glicose), gerando pressão competitiva pelo transporte entre estes dois açúcares.

Farwick *et al.* (2014) recentemente desenvolveram um trabalho similar, inicialmente focando no transportador Hxt7 e Gal2. Neste trabalho, a partir de uma levedura nocaute para transportadores de açúcares e com a via de utilização de glicose interrompida, ele testou tanto a substituição racional de T213 por 7 aminoácidos (A, G, V, S, C, D e N) quanto a evolução de mutações espontâneas pelo crescimento em xilose com gradativo aumento de glicose. E observou pela evolução que em *HXT5* houve substituição espontânea de T234 por S (equivalente a T213 do *HXT7*) porém, como houve dificuldade na evolução de *HXT7*, nenhuma mutação espontânea foi observada. Já quando da substituição racional, a substituição de T213 por glicina, serina e asparagina mostraram melhoras no transporte de xilose na presença de glicose. Apesar de buscarem testar também a substituição por valina, conforme sugerido no presente trabalho, no trabalho de Farwick *et al.* (2024) foram usados *primers* randômicos para as substituições A/G/V e avaliada a substituição apenas após a seleção e adaptação em xilose e glicose, portanto é possível que a substituição de T213V não tenha surgido pelo PCR degenerado.

Neste mesmo trabalho, as mutações hxt7 (N370S) e resíduo homólogo em Gal2 (N376F), levaram a transportadores que não mais permitiam o crescimento da levedura em glicose. Entretanto, as mutações também levaram a redução da velocidade de transporte da xilose (tabela 5). Novos estudos aliando a caracterização estrutural dos transportadores (Kasahara *et al.*, 2011), a homologia entre as sequências e a estratégia de evolução dos mesmos em leveduras nocaute para transportadores de hexose, trouxeram novas mutações em regiões chave, como hxt7 (F79S) (Apel *et al.*, 2016), Hxt36 (N367I) e Hxt36 (N367A) (Nijland *et al.*, 2014). Curiosamente as mutações que levaram a completa abolição do consumo de glicose, foram ou no resíduo T213 de Hxt7 ou seu homólogo equivalente em outro transportador, ou no resíduo N370 de Hxt7 ou seu equivalente. Os mesmos resíduos que já haviam sido identificados anteriormente por Kasahara *et al.* (2011) como os resíduos chave tanto para a afinidade por glicose e

Introdução

pela seletividade, nos estudos estruturais. A mutação pontual do resíduo T213 por valina, uma mutação que ainda não emergiu dos estudos de evolução deste transportador, foi então alvo do presente estudo.

Tabela 4: Parâmetros cinético dos principais transportadores de glicose/xilose expressos em *S. cerevisiae*.

Transportador	Linhagem	Características da linhagem	Xilose		Glicose		Referência
			Km (mM)	Vmax (nmol/min/mgDCW)	Km (mM)	Vmax (mmol/min/mgDCW)	
ScHxt1	H2219/pYX212-HXT1	Δ hxt1-7 Δ gal2	880 \pm 8	750 \pm 94	NR	NR	[1]
ScHxt1	KY73/HXT1mnX-pVT	Δ hxt1-7 Δ gal2	NR	NR	46	NR	[2]
ScHxt2	H2219/pYX212-hxt2	Δ hxt1-7 Δ gal2	260 \pm 130	340 \pm 10	NR	NR	[1]
ScHxt2	KY73/HXT2mnX-pVT	Δ hxt1-7 Δ gal2	NR	NR	3.3	NR	[2]
ScHxt4	H2219/pYX212-HXT4	Δ hxt1-7 Δ gal2	170 \pm 120	190 \pm 23	NR	NR	[1]
ScHxt7	H2219/pYX212-HXT7		130 \pm 10	110 \pm 7	NR	NR	
ScHxt7	EBY.VW4000/pRS62 N-HXT7	Δ hxt1-17 Δ gal2	200.3 \pm 13.2	67 \pm 2	0.5 \pm 0.1	26 \pm 1.1	[3]
ScHxt7 (N370S)	EBY.VW4000/pRS62 N-HXT7-N370S	Δ stl1 Δ agt1 Δ mph2 Δ mph3 Δ yd1247w Δ yjr160c	169.9 \pm 26.3	24.1 \pm 1.6	10.8 \pm 1.0	47.3 \pm 1.2	
ScHxt7	KY73/HXT7mnX-pVT	Δ hxt1-7 Δ gal2	NR	NR	0.67 \pm 0.05	610 \pm 60 *	[2]
ScHxt7 (T213V)			NR	NR	0.40 \pm 0.02	120 *	[4]
ScHxt7 (D340C)			NR	NR	0.43 \pm 0.05	430 \pm 40*	[2]
ScHxt7	JBEI-9012/HXT7	Δ hxt1-7 Δ gal2	161 \pm 22	101,6	NR	NR	[12]
ScHxt7 (F79S)	JBEI-9011/ HXT7m	Δ hxt1-7 Δ gal2	228 \pm 45	186	NR	NR	
ScGal2	EBY.VW4000/pRS62 N-GAL2	Δ hxt1-17 Δ gal2	225.6 \pm 15.8	91.3 \pm 3.2	1.5 \pm 0.2	27.2 \pm 0.9	[3]
ScGal2 (N376F)	EBY.VW4000/pRS62 N-GAL2-N376F	Δ stl1 Δ agt1 Δ mph2 Δ mph3 Δ yd1247w Δ yjr160c	91.4 \pm 8.9	37.3 \pm 1.3	ND	BD	[3]
CiGxf1	TBM3201/pHxt7-GXF1	Δ hxt1-17 Δ gal2	48.6 \pm 6.5	64.19	2.0 \pm 0.6	10.5	[5]
CiGxs1	TBM3201/pHXT7-GXS1	Δ stl1 Δ agt1 Δ mph2 Δ mph3	0.4 \pm 0.1	6.5 \pm 1.5	0.012 \pm 0.004	4.3 \pm 0.3	
CiGsx1	EBY.VW4000/	Δ hxt1-17 Δ gal2	0.026 \pm 0.066	0.0072	NR	NR	[9]
CiGsx1 F ^{38j} 39M ⁴⁰	p414-TEF-CiGXS1	Δ stl1 Δ agt1 Δ mph2 Δ mph3 Δ yd1247w Δ yjr160c	0.721 \pm 0.116	0.015	NR	NR	
SsSut1	RE700/YEpSUT1	Δ hxt1-7	145 \pm 1.0	132 \pm 1.0	1.5 \pm 0.1	45.0 \pm 1.0	[6]
SsSut4	EBY.VW4000/pRS31 6-TDHP-SUT1	Δ hxt1-17 Δ gal2	16.6 \pm 0.3	122 \pm 2.4	1.3 \pm 0.1	105 \pm 4.2	[7]
SsXut1	EBY.VW4000/pRS31 6-TDHP-XUT1		Δ stl1 Δ agt1 Δ mph2 Δ mph3 Δ yd1247w Δ yjr160c	0.46 \pm 0.02	116 \pm 5.8	0.91 \pm 0.01	
SsYyp29	EBY.VW4000/pRS42 9-HXT7p-XYP29	Δ hxt1-17 Δ gal2	56 \pm 9.4	0.69 \pm 0.04	BD	BD	[8]
NcAn25	EBY.VW4000/pRS42 9-HXT7p-AN25	Δ stl1 Δ agt1 Δ mph2 Δ mph3 Δ yd1247w Δ yjr160c	175.7 \pm 21.4	0.61 \pm 0.05	BD	BD	
NcAn25.R4.18			28.2 \pm 6.3	6.5 \pm 0.3			[13]
DhXylh	W303-1A/pRS42K-XYLH		1.4 [†]	1.6 [†]	NR	NR	[10]
ScHxt36			108	62.5	6	60	
ScHxt36 (N367I)	DS715054/pRS313-HXT7p-HXT36	Δ glk1 Δ hxx1 Δ hxx2 Δ gal1	40	23	ND	ND	[11]
ScHxt36 (N367A)			25	29	171	71	

*Vmax = pmol/10⁷ cells/5s. DWC= peso seco, NR= não reportado; ND, não detectável; BD, abaixo do limite de detecção; [†]Km e Vmax foram calculados desconsiderando a influência do sistema de transporte endogeno.[1]Saloheimo *et al.* 2007; [2] kasahara *et al.* 2010; [3] Farwick *et al.* 2014; [4] kasahara *et al.* 2011; [5] Leandro *et al.* 2006; [6] Weierstall *et al.* 1999; [7] Jeffries *et al.* 2015; [8] Du *et al.* 2010; [9] Young *et al.* 2013; [10] Ferreira *et al.* 2013; [11] Nijland *et al.*,2014; [12] Apel *et al.*, 2016 e [13] wang *et al.*,2015.

2. OBJETIVOS

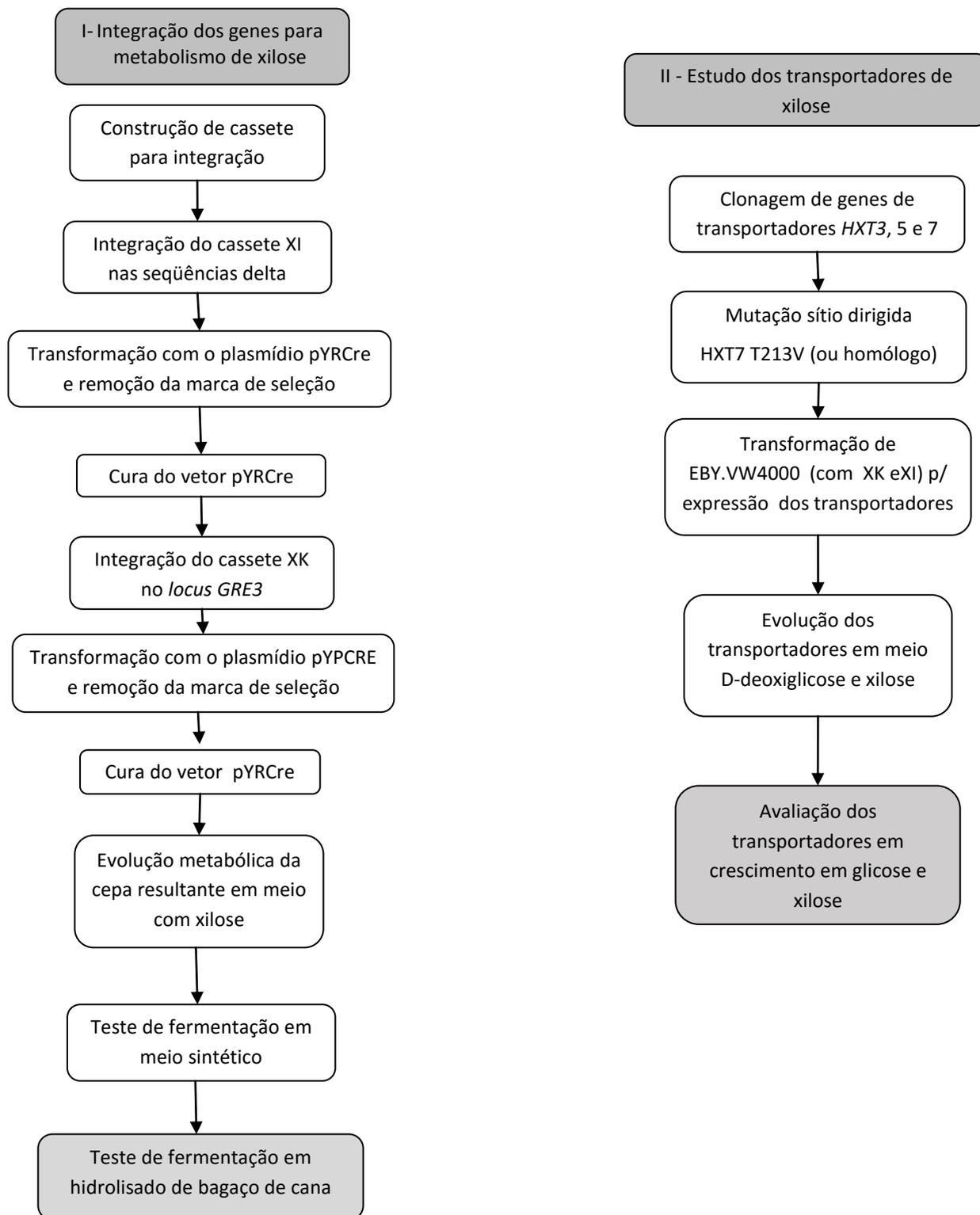
2.1 Objetivo geral

Este projeto tem como objetivo geral o desenvolvimento de uma linhagem industrial de *S. cerevisiae* capaz de fermentar xilose para a produção de etanol a partir de resíduos lignocelulósicos.

2.2 Objetivos específicos

- ✓ Construção de cassetes de integração para os genes xilose isomerase (XI) e xiluloquinase (XK).
- ✓ Integração do cassete de expressão de XI nas sequências delta da linhagem industrial de *S. cerevisiae* JP1.
- ✓ Integração do cassete de expressão de XK nos dois alelos do gene *GRE3* (deleção de *GRE3*).
- ✓ Remoção sequencial das marcas de seleção dominantes por meio do sistema Cre/lox de excisão por recombinação.
- ✓ Adaptação metabólica em meio contendo xilose em condições de aerobiose e anaerobiose.
- ✓ Estudo das cinéticas de crescimento e fermentação em meio sintético e em hidrolisado de bagaço de cana.
- ✓ Clonagem de genes codificadores de transportadores de alta, baixa e média afinidade por glicose.
- ✓ Testar a hipótese de que a mutação pontual em T213 de Hxt7 e seu equivalente homólogo nos demais transportadores, melhoraria a capacidade de transportar xilose.
- ✓ Evolução dos transportadores em pressão competitiva de xilose e 2-deoxiglicose.
- ✓ Comparação da eficiência no transporte de xilose dos transportadores em levedura mutante *null* para transportadores de açúcar.

2.3 Estratégia



3. MATERIAIS

3.1 Micro-organismos utilizados

- ***Escherichia coli*** linhagem DH5- α (Invitrogen) – *endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17supE44 relA1 Δ lacU169 (ϕ 80lacZ Δ M15) IU169 dcoR phoA.*

- ***Escherichia coli*** linhagem XL10 Gold (Stratagene) - Tet^r Δ (*mcrA*)183 Δ (*mcrCBhsdSMR-mrr*)173 *endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac Hte [F' proAB lac^qZ Δ M15 Tn10 (Tet^r) Amy Cam^r]*

- ***Saccharomyces cerevisiae*** linhagem JP1 (industrial)

Linhagem industrial isolada em 2005 na usina Japungu (Paraíba) produtora de bioetanol no nordeste brasileiro (Silva-Filho *et al.*, 2005).

- ***Saccharomyces cerevisiae*** EBYVW4000 (Wieczorke *et al.*,1999), linhagem criada a partir de CEN.PK2-1C, pela deleção sequencial de 18 transportadores de açúcares. Esta linhagem é capaz de crescer em maltose, porém é incapaz de crescer em glicose, frutose ou galactose.

Genótipo: MAT α *leu2-3,112 ura3-52 trp1-289 his3- Δ 1 MAL2-8^c SUC2 hxt17 Δ hxt13 Δ ::loxP hxt15 Δ ::loxP hxt16 Δ ::loxP hxt14 Δ ::loxP hxt12 Δ ::loxP hxt9 Δ ::loxP hxt11 Δ ::loxP hxt10 Δ ::loxP hxt8 Δ ::loxP hxt514 Δ ::loxP hxt2 Δ ::loxP hxt367 Δ ::loxP gal2 Δ stl1 Δ ::loxP agt1 Δ : :loxP ydl247w Δ : :loxP yjr160c Δ ::loxP snf3 Δ ::loxP rgt2 Δ ::loxP*

3.2 Enzimas

- **Enzimas de restrição**

As enzimas EcoRI, Sall, BamHI, XhoI, HindIII, EcoRV, BglI, SacII e HpaI foram fornecidas pela New England Biolabs, Promega, QBiogene e Fermentas Life Sciences e utilizadas como indicado pelos fabricantes.

- **RNase A**

RNase A (“DNAse-free”) 10 mg/mL

Acetato de sódio pH 4,8 50 mM

Materiais

Fervida em banho-maria por 10 minutos

- **Ligases**

T4 DNA ligase – *New England Biolabs*

T4 DNA ligase – *USB Corporation*

T4 DNA ligase – kit pGEM®-T System I (Promega)

- **Fosfatases**

Para as reações de desfosforilação de vetores linearizados com apenas uma enzima foi utilizada a enzima fosfatase alcalina antártica (*Antarctic Phosphatase*) da New England Biolabs, conforme especificação do fabricante. Esta enzima remove grupos fosfato da extremidade 5' diminuindo a taxa de religação dos vetores linearizados

- **Polimerases**

Nas reações em cadeia da polimerase (PCR) nas quais o produto de PCR foi usado para clonagem do gene de interesse foi utilizada a DNA polimerase de alta fidelidade *Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase* da empresa New England Biolabs. Nas reações de PCR com objetivo de confirmação dos insertos foi utilizada a *Easy taq DNA polimerase* (Labtrade Brazil).

3.3 Marcadores de DNA

- DNA de fago λ digerido com EcoRI e HindIII
- *2-Log DNA ladder* (0,1-10 kb)(New England Biolabs)
- *1 kb Plus ladder* (Invitrogen)
- *O' Gene Ruler™ 1 kb Plus DNA Ladder* (Fermentas)

3.4 Kits

- ***QIAquick Gel Extraction Kit*** (Qiagen) – utilizado para extração e purificação de DNA de gel de agarose.
- ***QIAquick PCR purification kit*** (Qiagen) – utilizado para purificação dos produtos de PCR.

Materials

- **Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System** (Promega) – utilizado para purificação dos produtos de PCR.
- **DyEnamic ET DYE Terminator Cycle Sequencing** – utilizado no sequenciamento.

3.5 Ferramentas de Bioinformática

Busca de sequências de DNA, RNA, Proteína e Genoma:

GenBank (NCBI) - (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)

Saccharomyces Genome Database (SGD) - <http://www.yeastgenome.org/>)

Uniprot- (<http://www.uniprot.org/>)

Desenho de Iniciadores (*primers*):

Primer3Plus–(<http://www.bioinformatics.nl/cgi-in/primer3plus/primer3plus.cgi/>)

Cálculo do conteúdo de G+C:

“Genomics %G~C Content Calculator” -
(http://www.sciencebuddies.org/mentoring/project_ideas/Genom_GC_Calculator.shtml)

Análises de restrição:

NEBcutter V2.0 - (<http://tools.neb.com/NEBcutter2/index.php>)

Manipulação de sequências:

The Sequence Manipulation Suite (<http://bioinformatics.org/sms/index.html>)

Alinhamento:

BLAST- (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)

ClustalW - (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>)

3.6 Vetores

pPICZ α (Invitrogen) - vetor comercial que possui a marca *Sh ble* (resistência a zeocina)

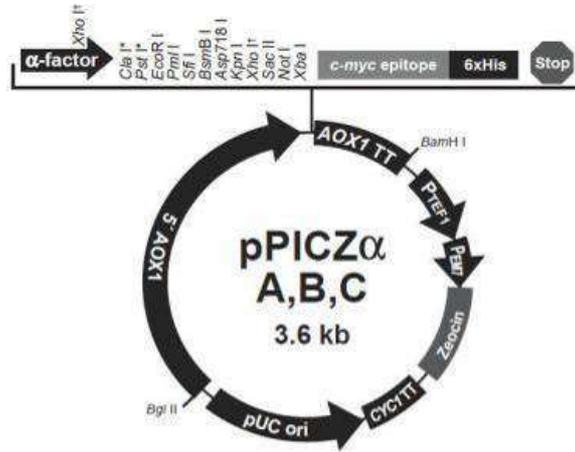


Figura 5: Representação esquemática do mapa do vetor comercial pPICZ α

pPICK α (Batista, 2012) - Vetor construído no laboratório de Biologia Molecular da UnB pela substituição da marca *Sh ble* do vetor pPICZ α pela marca *Kan^R* obtida por PCR com a enzima *Phusion[®]* usando como *template* o vetor comercial pPICK9 (Invitrogen).

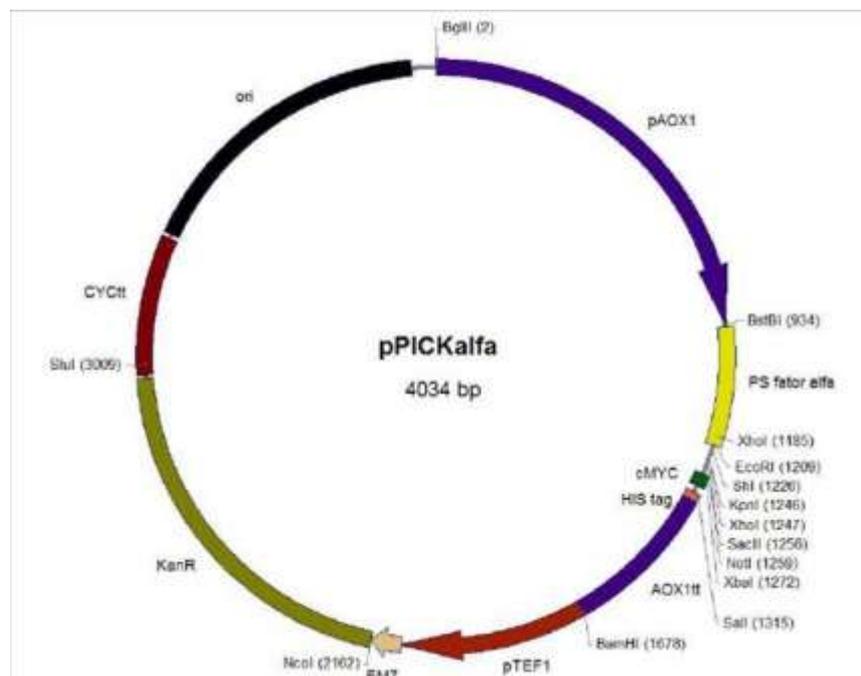


Figura 6: Representação esquemática do mapa do vetor pPICK α .

pT (Borges, 2009) – Vetor integrativo construído no laboratório contendo as seqüências Ty δ , para integração nas regiões delta presentes em *S. cerevisiae*.

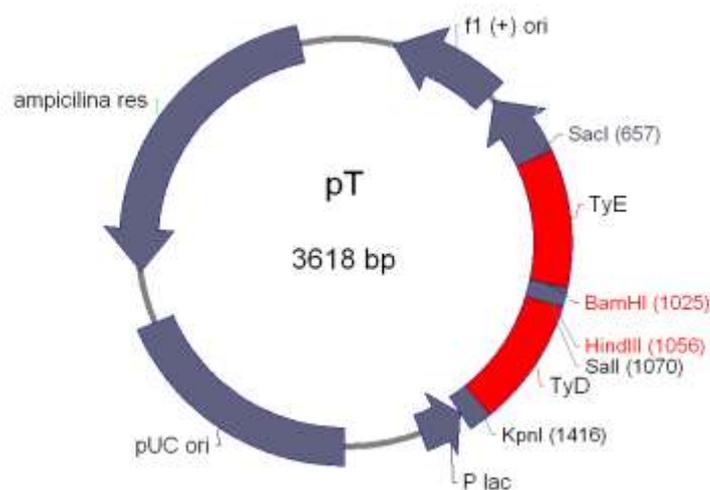


Figura 7: Representação esquemática do mapa do vetor pT

pYRCre (Reis, 2012) - Vetor construído em laboratório com cassete para expressão de Cre recombinase (2,1 kb), onde a Cre recombinase está sob controle do promotor induzível do gene *GAL1*. Vetor replicativo com marca de seleção higromicina B.

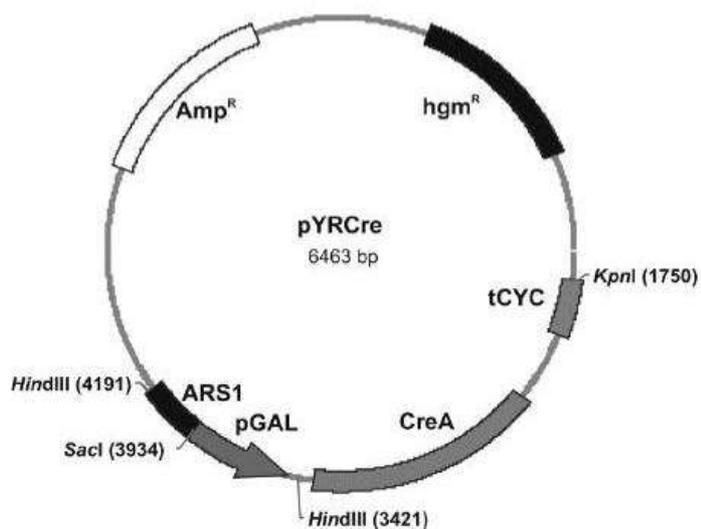


Figura 8: Representação esquemática do mapa do vetor pYRCre.

Materiais

pBCPX (Reis, 2012)- Vetor construído no laboratório contendo cassete da xilose isomerase (para a região promotora e terminadora do cassete de expressão foram utilizados 1480 pb da região *upstream* ao gene *PGK1* e 276 pb *downstream*), flanqueados por 100 pb do 5' e 3' do gene *CAN1*. Vetor de clonagem, obtido a partir do vetor comercial pBlueScript® II SK (Stratagene)

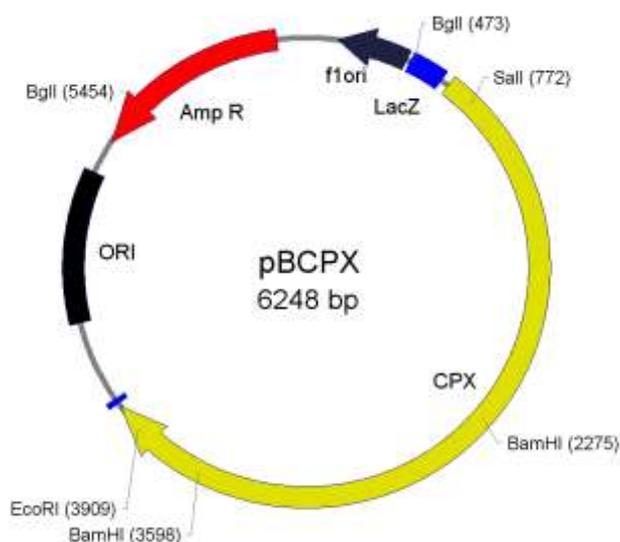


Figura 9: Representação esquemática do mapa do vetor pBCPX.

pGXKSPGI (Reis, 2012)- Vetor construído no laboratório contendo cassete da xiluloquinase - *XKS1* - (região promotora do gene *PGI* e terminadora do próprio gene *XKS1*). Vetor de clonagem, obtido a partir do vetor comercial vetor pGEM®T (Promega).

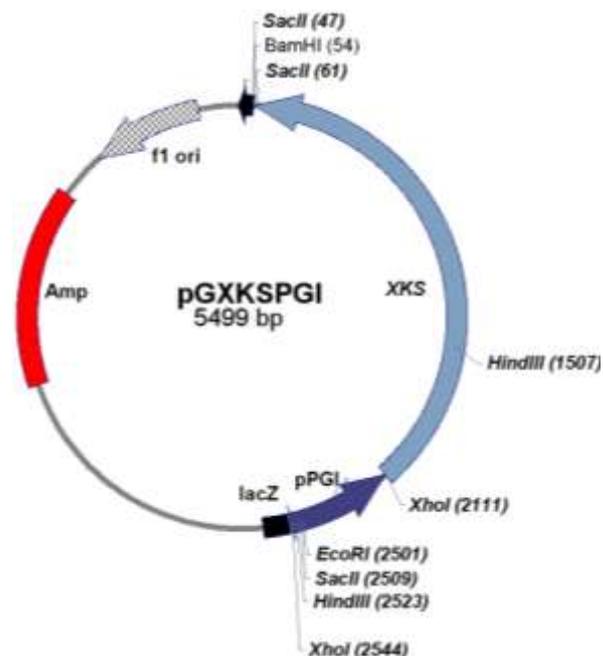


Figura 10: Representação esquemática do mapa do vetor pGXKSPGI.

pBGRE (Reis, 2012) - Vetor construído no laboratório contendo região 5' (230 pb) e 3' (220 pb) do gene *GRE3* (codifica uma Aldose Redutase). Vetor de clonagem, obtido a partir do vetor comercial pBlueScript® II SK (Stratagene).

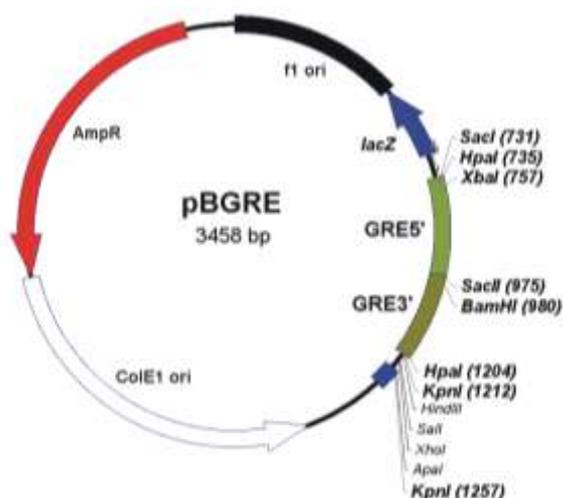


Figura 11: Representação esquemática do mapa do vetor pBGRE.

3.7 Meios de cultura e soluções

Todos os meios de cultura e soluções utilizados para cultivo de micro-organismos foram esterilizados em autoclave a 121°C por 20 minutos ou, quando indicado, em filtros 0,22 µm 25 mm estéril (Millipore).

3.7.1 Meios e soluções para cultivo de micro-organismos

- **Meio Luria-Bertani (LB)**

Peptona caseína 1,0% (p/v)

Extrato de levedura 0,5% (p/v)

NaCl 1,0% (p/v)

O pH foi ajustado para 7,2. Para o meio sólido foi adicionado 15 g/L de ágar bacteriológico.

- **Meio SOB**

Extrato de levedura 0,5% (p/v)

Peptona de caseína 2% (p/v)

NaCl 0,0584% (p/v)

KCl 0,0186% (p/v)

O pH ajustado para 7,2.

- **Meio YPD**

Extrato de levedura 1,0% (p/v)

Peptona de caseína 2,0% (p/v)

Glicose 2,0% (p/v)

O extrato de levedura e a peptona (meio 2YP) foram autoclavados separadamente da glicose. Depois misturados numa proporção de 1:1. Para o meio sólido foi adicionado 15 g/L de ágar bacteriológico. Para preparo de levedura

Materiais

Competente, utiliza-se uma variação deste meio, chamado YPDA, pela adição de adenina (para a concentração final 80 mg/L).

- **YNB (sem aminoácidos)**

Yeast Nitrogen Base without Amino Acids (Difco) 0,167% (p/v)

NH₄SO₄ 0,5% (p/v)

* Esterilização por filtração (membrana 0,22µm). Foi preparada uma solução estoque 10X concentrada, armazenada a 4°C protegida da Luz. Para meio sólido foi adicionado 15 g/L de ágar bacteriológico. Antes do uso foi adicionado ao meio 2% - 5% do açúcar apropriado (ex. glicose), como fonte de carbono.

- **Solução estoque de ampicilina 500X (50 mg/mL)**

Ampicilina 50 mg

Água destilada (q. s. p.) 1 mL

*Esterilizada por filtração.

- **Solução estoque do antibiótico geneticina G418 (50 mg/mL)**

G418 50 mg

Água destilada (q. s. p.) 1 mL

*Esterilizada por filtração.

- **Solução estoque do antibiótico zeocina (100 mg/mL)**

Este antibiótico foi obtido da Invitrogen na concentração de 100 mg/mL

Materiais

Trizma base 1,78 M

Acido bórico 1,78 M

EDTA 0,16 M

O pH foi ajustado para 8,4.

- **Tampão Tris-acetato EDTA (TAE) 20X**

Trizma base 40 mM

EDTA 1 mM

A solução teve seu pH ajustado para 8,5 com ácido acético.

- **Tampão de amostra para DNA 5X**

TAE 20X 50,00% (v/v)

Glicerol 30,00% (v/v)

Azul de Bromofenol 0,25% (p/v)

Xilenocianol 0,25% (p/v)

- **Solução de brometo de etídeo**

Brometo de etídeo 1,0% (p/v)

Água destilada (q. s. p.) 100 mL

Extração de DNA de levedura

- **Tampão Sorbitol-EDTA (SE)**

Sorbitol 0,9 M

EDTA 100 mM

O pH da solução foi ajustado para 7,5

- **Solução de liticase**

Liticase (Sigma) 100 mg/mL em água.

Materiais

- **Solução TE20**

Trizma base 10 mM

EDTA 20 mM

O pH da solução foi ajustado para 7,5 com ácido clorídrico 2 M.

Transformação de S. cerevisiae

- **Tampão *One-step***

Acetato de lítio (estoque 1M) 0,2 M

PEG 4000 40% (p/v)

DTT 100 mM

Soluções estéreis preparadas separadamente e misturadas no momento do uso.

3.8 Primers

Na Tabela 5 estão listados os *primers*, com suas respectivas sequências, temperatura de anelamento (T_m) e sítios de restrição. Os códons de iniciação e terminação da tradução estão em negrito, assim como a sequência *loxP*. Os *primers* foram desenhados a partir de sequência depositadas no banco de dados NCBI e SGD (*Saccharomyces Genome Database*), e das próprias sequências dos vetores usados neste trabalho. Todos os *primers* foram sintetizados pela empresa IDT sendo dissolvidos em Tris-HCl 4 mM (pH 8,0) para solução estoque. A solução de trabalho foi diluída em H₂O milliQ para uma concentração de uso de 5 μ M ou 10 μ M.

Materials

Tabela 5: Sequências dos primers utilizados nas reações de PCR.

Produto	Primer	Sequência (5' → 3')	T _m (°C)	Sítio
Xilose Isomerase	XIF	CGAATTCACAATGGCTAAGGAATACTTC	78,0	
	XIR	TTATTGGTACATAGCAACGATAG	62,0	
Actina (Real time PCR)	ACT-F	GATTGGCCGGTAGAGATTTGACT	56,8	
	ACT-R	AAGTCCAAGGCGACGTAA	55,1	
Xilose isomerase (real time PCR)	XI-F	GTCAAGCCTGGATGGAAATCA	55,5	
	XI-R	AGCTCTAGGCATAGCGTCCA	57,9	
GRE3 (aldose redutase)	REF1	<u>ACGAGCTCGTTAAC</u> ATATTTTATTATCGGAACTCTAG	60	SacI/ HpaI
	GRER1	TTGGATCCATCCGCGGCCCAATCGTCTTGAAGGATTG	62,0	BamHI/ SacII
	REF2	TTGGATCCGCTGTGGTGTCTATCCACG	62,0	BamHI
	GRER2	GTGGTACCGTTAACGTTGAAATGGAAGCTGCTATTA	60	KpnI / HpaI
Fusão 5'GRE-Kan-XK-3'GRE3	KPGI-F	TGAAAACCTTGCTTGAGAAGGTTTTGGGACGCTCGAAGGCTTTAATTTGCAAGCTAGAT TCTATAACTTCGTATAATGTATGCTATACGAAGTTATGGATCCGAGGTCGACGGTATCGATAAGCTTG	70	BglII
	XKG3-R	TACCGTTAAC GTTGAAATGG AAGCTGCTATTAATATCCCG ATAGATATCC GGTTACTCAAATGATTTTGG GACCGCTTG CTCTCTGGTGTCTATTTTA <u>GGCCGCGGGATTGGATCCG</u>	66	
Gene de resistência a G418 (Canamicina) ou Zeocina	ZeoBlaF3	<u>CGGATCCATAACTTCGTATAATGTATGCTATACGAAGTTATAGATCTCCACACACCATAGCTTCAAATG</u>	66,1	BglII/ BamHI
	ZeoBlaR3	<u>CGGATCCATAACTTCGTATAGCATAATTATACGAAGTTATAGATCTAGCTTGCAAATTAAGCTTCGAG</u>	66,6	BglII/ BamHI
Xiluloquinase	XKSF	TCTCGAGTTAATGTTGTGTTTCAGTAATTCAGAGA	70	XhoI
	XKSR	<u>TGGATCCGCGGTCTCTCTCGTTGCTGGTCGCTCACCT</u>	92	BamHI/ SacII

Materiais

Cassete HXT em Y2STEF	5'p356Sac1_F	<u>CCATGATTACGAATTCGAGCTC</u>	53	SacI
	3'p356Hind3_R	<u>ACAGCTGCGGCCAGTGCCAAGCTT</u>	62,5	PvuII/ HindIII
Amplificação do HXT5 HXT3 e HXT7	5F_hxt7	<u>GGATCCATGTCACAAGACGCTGCTATTG</u>	61,4	BamHI
	3'R_hxt7	<u>GCGGCCGCTTATTTGGTGCTGAACATTCTCT</u>	64,4	NotI
	5F_hxt5	<u>AGATCTATGTCGGAACCTTGAAAACGCTC</u>	58,5	BglII
	3'R_hxt5	<u>GCGGCCGCTTATTTTTCTTTAGTGAACATCCTTT</u>	62	NotI
	5F_hxt3	<u>GGATCCATGAATTCAACTCCAGATTTAATATCTCC</u>	61	BamHI
	3'R_hxt3	<u>GCGGCCGCTTATTTCTTGCCGAACATTTCTTG</u>	64,4	NotI
Primers mutagênicos para transportadores HXT7, HXT5 e HXT3	mut5' hxt7	CCAATTGATGATTGTTGCCGGTATTTTC	57	
	mut3' hxt7	GAAAATACCGGCAACAATCATCAATTGG	57	
	mut5' hxt5	TACCAATTAATGATCGTTTTCGGTATCTTT	54,8	
	mut3' hxt5	AAAGATACCGAAACGATCATTAAATTGGTA	54,8	
	mut5' hxt3	CCAACTGATGATTGCTTGGGTATTTTC	57	
	mut3' hxt3	GAAAATACCAAACAATCATCAGTTGG	57	
Inseção região homologia ao promotor TEF1	tef_hxt7_F	TTAGAAAGAAAGCATAGCAATCTAATCTAAGTTTTAA TTACAAAGGATCCATGTCACAAGACGCTGCTATTG	61,4	BamHI
Inseção região homologia ao terminador PGK do cassete HXT	tPGK_hxt7_R	CCTTACCTTC CAATAATTCC AAAGAAGCAC CACCACCAGTAGAGACATGGGCGGCCGCTTATTTGGT GCTGAACATTCTCT	64,4	NotI
Inseção região homologia ao promotor TEF1	tef_hxt3_F	TTAGAAAGAAAGCATAGCAATCTAATCTAAGTTTTAA TTACAAAGGATCCATGAATTCAACTCCAGATTTAATAT CTCC	61	BamHI
Inseção região homologia ao terminador PGK do cassete HXT	tPGK_hxt3_R	CCTTACCTTCCAATAATTCCAAAGAAGCACCACCACCA GTGAGACATGGGCGGCCGCTTATTTCTTGCCGAACAT TTTCTTG	64,4	NotI

Materiais

Os *primers* para *Real Time PCR* foram desenhados usando a ferramenta *Primers3Plus*. Foram estabelecidas as seguintes regras para o desenho dos *primers* para qRT-PCR: fragmento amplificado com tamanho entre 50 e 150 pb; T_m de 55-60°C; porcentagem de C+G entre 20-80%; foram evitadas repetições consecutivas da mesma base (mais de 4), principalmente de G e os 4 nucleotídeos da extremidade 3' não devem ter mais do que 2 C e/ou G.

4. MÉTODOS

4.1 Digestão de DNA com enzimas de restrição

As digestões foram realizadas conforme instruções dos fabricantes das enzimas. O tempo de incubação, os tampões, as temperaturas de reação, as concentrações de DNA e enzima variaram de acordo com o material a ser digerido e a eficácia da enzima. Geralmente, foram utilizadas 10 U de enzima para cada 5 µg de DNA, incubados a 37°C por 3 h. Teve-se o cuidado de observar se o volume da enzima não tinha ultrapassado 10% do volume final da reação, com a finalidade de evitar a degradação inespecífica do DNA pela enzima, devido aos níveis de glicerol.

4.2 Precipitação do sistema de digestão

A precipitação dos sistemas de digestão foi realizada adicionando-se acetato de sódio a uma concentração final de 0,3 M no sistema. Após homogeneização, foi adicionado o equivalente a 2,5 volumes do sistema de etanol 100%. A mistura foi incubada em água-gelo por 30 min-1h. Realizou-se então uma centrifugação a 12.000 x *g* por 30 min a 4°C. O precipitado foi lavado (sem ressuspender) com 1 mL de etanol 70% gelado e novamente submetido a centrifugação a 4°C por 20 min. Após secagem por exposição ao ar, o precipitado foi ressuspendido em 20 µL de H₂O.

4.3 Purificação e eluição de fragmentos de DNA em gel de agarose

Após digestão dos plasmídios com as enzimas de restrição apropriadas, os fragmentos de DNA contendo as sequências de interesse foram aplicados em gel de agarose e submetidos a eletroforese. Os fragmentos de DNA de interesse foram recortados do gel e purificados utilizando-se o kit *QIAquick Gel Extraction*, conforme as especificações do fabricante.

4.4 Ligação dos fragmentos de DNA

Nos sistemas de ligação, as concentrações de DNA (razão molar vetor:inserto) variaram entre 1:3 e 1:6. O sistema foi incubado a uma temperatura de 16°C por pelo menos 14 h, ou por 2 h e 30 min a 25°C. A quantidade de T4 DNA ligase para cada sistema de ligação foi feita de acordo com as recomendações de cada fabricante.

4.5 Desfosforilação dos vetores para ligações não direcionadas

Para sistemas de ligação não direcionados de fragmentos de DNA foi necessário desfosforilar as extremidades do vetor linearizado. A reação de desfosforilação foi realizada utilizando-se 100 ng DNA, 1 U da enzima *Antarctica Phosphatase* (New England Biolabs) e tampão fornecido pelo fabricante. O sistema foi incubado a 37°C por 30 minutos e seguido de inativação da enzima a 65°C por 15 minutos.

4.6 Transformação de bactéria

Preparo das células quimicamente competentes

O preparo de células de *E. coli* competentes pelo método de choque térmico com cloreto de rubídio foi realizado a partir de modificações do proposto originalmente por (Hanahan, 1983 *apud* Sambrook *et al.*, 2001). As células da linhagem de *E. coli* foram inoculadas em 5 mL de meio SOB e incubadas a 37°C, sob agitação (200-250 rpm), por 12-16 horas. Uma alíquota de 2 mL do pré-inóculo foi adicionado a 50 mL de meio SOB. A cultura de células foi incubada a 37°C sob agitação (250 rpm), até atingir a OD₆₀₀ de 0,2-0,3. Em seguida transferida para tubos de centrifugação estéreis, incubando-os no gelo por 15 min. Após a incubação, as células foram coletadas por centrifugação (3.000 g por 5 min a 4°C), e o sedimento foi ressuspenso em 16 mL de tampão de transformação I pH 5,8 (12 g/L RbCl; 9,9 g/L MnCl₂·4H₂O; 1,5 g/L CaCl₂·2H₂O; 150 mL glicerol 100%; 30 mL 1 M acetato de potássio [pH 7,5]). A solução de transformação I foi esterilizada por filtração com pH ajustado para 5,8 com 0,2 M ácido acético. Após adição da solução de transformação I as células foram incubadas novamente por 15 min no gelo e submetidas a uma nova centrifugação (mesmas condições). As células foram então ressuspenso em 4 mL de tampão de transformação II pH 6,5 (1,2 g/L RbCl; 11 g/L CaCl₂·2H₂O; 150 mL glicerol 100%; e 20 mL de 1M MOPS [pH 6,8]), esterilizado por filtração e ajustado o pH com KOH. Alíquotas de 100 µL de células por tubo foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e estocadas a -80°C.

Transformação das células quimicamente competentes

Para transformação, o sistema de ligação foi adicionado a uma alíquota de células competentes (até 10% do volume de células) e incubados no gelo por 30 minutos. O sistema de transformação foi submetido a choque térmico de 42°C durante 90 segundos ou a 37°C por 5 minutos. Em seguida foi adicionado 1 mL de meio LB e as células foram incubadas por 1 hora a 37°C. Um volume de 20 µL, 200 µL e o pellet restante de células foram semeadas em placas de Petri com meio LB-ágar e o antibiótico apropriado, ampicilina (100 µg/mL), canamicina (50 µg/mL), ou em meio LB-ágar (baixo sal, 0,5% NaCl) com zeocina (25 µg/mL).

4.7 Preparação de DNA plasmidial por lise alcalina (adaptado de Sambrook *et al.*, 2001 e Birboim & Dolly, 1979)

Preparação de DNA plasmidial em pequena escala (mini-prep)

Colônias individuais de bactéria foram inoculada em 5 mL de meio LB contendo o antibiótico adequado e cultivadas a 37°C por 16 a 20 horas sob agitação de 200 a 250 rpm. Estas células foram coletadas por centrifugação a 10.000 *g* por 2 minutos a 4°C, descartando-se o sobrenadante. Opcionalmente, o sedimento foi lavado com 500 µL de STE, para remoção de excesso de meio LB, seguida de mais uma etapa de centrifugação nas condições anteriores. O sedimento foi ressuspenso em 200 µL de TE (10 mM Tris-HCl [pH 8,0] e 0,1 mM EDTA), e adicionou-se 360 µL de solução II recém preparada (0,2 M NaOH e 1% SDS). A amostra foi homogeneizada, com cuidado, por inversão do tubo e incubada por 5 minutos a temperatura ambiente. Em seguida foram adicionados 300 µL de solução III pH 5,2 (3 M acetato de sódio e 2 M ácido acético) gelada ao lisado, procedendo-se nova homogeneização por inversão do tubo, gentilmente. A amostra foi então incubada no gelo por 5 minutos e submetida a centrifugação a 10.000 *g* por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi transferido para outro tubo contendo 750 µL de isopropanol. A solução foi homogeneizada por inversão e submetida a uma nova centrifugação a 10.000 *g* por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspenso em 200 µL de TE. Foram adicionados 110 µL acetato de amônio 7,5 M e

Métodos

misturou-se o sistema vigorosamente por aproximadamente 1 min seguida de nova centrifugação (10.000 *g*/10 min) e o sobrenadante transferido para um novo tubo. O DNA foi precipitado pela adição de 750 μ L de etanol 100% gelado seguindo-se centrifugação a 10.000 *g* por 5 min. O sobrenadante foi descartado cuidadosamente e o precipitado foi lavado (sem ressuspender) com 1 mL de etanol 70% gelado. Após secagem por exposição ao ar, o precipitado foi diluído em 50 μ L de TE ou H₂O milliQ com RNase A (20 μ g/mL). O DNA plasmidial foi estocado a -20°C até o uso. Alternativamente, em alguns casos (ex. para sequenciamento) foi usado o Kit comercial *QIAprep Spin Miniprep Kit* (Qiagen) conforme orientação do fabricante.

Preparação de DNA plasmidial em média escala (midi-prep)

O procedimento foi o mesmo do descrito para a preparação de plasmídios em pequena escala. Apenas os volumes das soluções utilizadas foram ajustadas ao volume de cultura de 50 mL. A análise e a estocagem do material, também seguiram os procedimentos da mini-preparação. Em alguns casos, foi utilizado o kit *QIAGENTip100-500* (Qiagen), seguindo-se as instruções do fabricante.

4.8 Extração do DNA total de *Saccharomyces cerevisiae*

As linhagens foram crescidas até a fase estacionária em 40 mL de meio YPD em um frasco de 250 mL. As células foram coletadas por centrifugação a 3.000 *x g* durante 5 min a temperatura ambiente e ressuspensas em 3 mL de tampão SE. Em seguida foi adicionado 10 μ L da solução de liticase (20 mg/mL), sendo essa suspensão de células incubada a 37°C. Após 60 min de incubação, a suspensão foi coletada a 3.000 *g* durante 5 min e as células ressuspensas em 3 mL de TE20. A seguir foi adicionado 0,5 mL de SDS 10% sendo agitado por inversão do tubo e incubado a 65°C durante 30 min. Ao final do período de incubação foi adicionado 1,5 mL de acetato de potássio 5 M, e a suspensão incubada no gelo por 30 min. A seguir a suspensão foi submetida a centrifugação a 10.000 *g* a 4°C por 5 min. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado com 5 mL de etanol 70% e coletado a 10.000 *g* por 5 min. Após secar foi

Métodos

ressuspendido em 200 µL de TE acrescido de 4 µL de RNase A a 4 mg/mL. O DNA foi quantificado em gel de agarose 0,8% e estocado a -4°C.

4.9 Análise dos ácidos nucleicos em gel de agarose

A eletroforese em gel de agarose utilizada para análise dos fragmentos de DNA foi feita de acordo com Sambrook *et al.* (2001). O gel foi preparado com agarose na concentração de 0,8-1,0% (p/v) e em tampão de corrida TAE 1X, adicionado de brometo de etídeo para concentração final de 0,5 µg/mL, depois de derretido. As amostras e os marcadores moleculares foram aplicados no gel e submetidos a eletroforese com voltagem ajustada entre 1 a 5 V/cm. Para visualização das bandas de DNA, o gel foi exposto à luz ultravioleta.

4.10 Transformação de *Saccharomyces cerevisiae*

Transformação Rápida

As transformações da levedura *S. cerevisiae* com os vetores de expressão foram realizadas utilizando o método de transformação em fase estacionária descrito por Chen *et al.* (1992). A levedura foi crescida por 12-16 horas em meio YPD a 30°C sob agitação de 250 rpm até atingir a fase estacionária. Um volume de 200 µL de células foi coletado por centrifugação a 10.000 *g* por 10 segundos sendo ressuspendido em tampão One Step, ao qual foram adicionados de 100 a 2000 ng de DNA plasmidial, para um volume final de 100 µL. As células foram incubadas a 45°C durante uma hora e semeadas em placas de meio mínimo SD (YNB + 2% glicose). No caso da seleção com G418, Higromicina ou Zeocina, após a incubação a 45°C, o tampão One Step foi removido por centrifugação e foi adicionado 1 mL de meio YPD ao sistema, sendo incubado por 2hs em shaker a 30°C. Posteriormente, as células foram semeadas em placas de meio mínimo SD (YNB + 2% glicose) com o antibiótico apropriado (200 µg/mL de G418, 200 µg/mL zeocina ou 200 µg/mL de higromicina B). As placas foram incubadas em estufa a 30°C por 72 horas.

Métodos

Transformação de alta eficiência

Uma colônia da levedura foi inoculada em 5 mL de meio YPDA e incubada a 30°C, sob agitação de 200 rpm, por 12-16 horas. Foram adicionados $2,5 \times 10^8$ células em 50 mL de meio pré-aquecido 2YPDA para uma concentração final de 5×10^6 células/mL. As células foram incubadas a 30°C sob agitação (200 rpm) até atingir a concentração de no mínimo 2×10^7 células/mL. Enquanto isso, 1 mL do DNA carreador (DNA de esperma de Salmão – 2 mg/mL) foi desnaturado em água fervente por 5 minutos e colocado no gelo com água imediatamente. Após as células atingirem a densidade desejada (~4 h), elas foram sedimentadas (3.000 g/ 5 min/20°C) e, em seguida, ressuspensas em 25 mL de água estéril. Esta etapa foi feita duas vezes. Uma nova centrifugação foi feita com as células agora ressuspensas em 1 mL de água estéril sendo, então, transferidas para um tubo de microcentrífuga para uma nova coleta (3.000 g/30 s). As células foram ressuspensas em 1 mL de água estéril e dispensadas em alíquotas de 100 µL. Após outra centrifugação (3.000 g/30 s) as células foram ressuspensas em 336 µL do seguinte *mix*:

Componentes	Volume (µL) por transformação
PEG 3350 50%(p/v)	240 µL
Acetato de Lítio 1M	36 µL
DNA carreador (2 mg/mL)	50 µL
	<hr/>
	Total 336 µL

Foi adicionado DNA num volume total de 34 µL. As células foram ressuspensas vigorosamente e incubadas num banho a 42°C por 40 min. Após o choque térmico as células foram sedimentadas (3.000 g/30 s) e ressuspensas em 1 mL de água estéril. Foram semeadas em meio MD no volume máximo de 150 µL por placa de células transformadas. No caso de seleção por antibiótico, as células sedimentadas foram ressuspensas em 1 mL de meio YPD e incubadas a 30°C por 2-3 h. Posteriormente, foram semeadas em placa contendo meio YPD com o antibiótico adequado. As placas foram incubadas a 30°C por 48 h (Gietz & Schiestl, 2007).

4.11 Sequenciamento e análise da sequência do DNA

As reações de sequenciamento foram realizadas no sequenciador automático MegaBACE 1000 (Molecular Dynamics). Foi utilizado cerca de 100 ng de DNA, 5 pmoles dos *primers* apropriados e o kit *DyEnamic ET DYE Terminator Cycle Sequencing*. O DNA utilizado no sequenciamento foi quantificado por espectrofotometria utilizando equipamento Nanodrop2000 (Thermo Scientific). A qualidade da sequência obtida no sequenciamento automático foi analisada utilizando as ferramentas de bioinformática: Phred, Phrap, CAP3 disponíveis na página: www.unb.br/ib/cel/biomol. Depois da análise da qualidade, as sequências foram comparadas com o programa BLAST para análise de identidade com sequências já depositadas no GenBank.

4.12 Reação de PCR

As condições que foram utilizadas para a realização das reações de PCR estão representadas na tabela 6 e o ciclo da PCR listado em seguida.

Tabela 6. Reagentes utilizados na PCR.

Reagentes	Concentração final
dNTP (2,0 mM) 10X	200 mM
Tampão 10X	1X
MgCl ₂ (50 mM)	2,0 mM
Taq DNA polimerase	0,04 U
<i>Primers</i> 5' (5 μM)	0,2 μM
<i>Primers</i> 3' (5 μM)	0,2 μM
DNA Molde	≤10 ng

Ciclo da PCR:

Desnaturação inicial 94°C 1min →→[Desnaturação 94°C 45 s - 1 min→
Anelamento 50-60°C, 30 - 45 s→ Extensão 72°C 1 min/kb] ↯(Ciclo - 30 vezes) →→,
Extensão final 72°C , 3x tempo de extensão→→ 4°C ∞

Métodos

Para a polimerases de alta fidelidade, *Phusion*[®] DNA polimerase (Finnzymes) as condições adotadas foram as recomendadas pelo fabricante.

4.13 PCR de Colônia

As colônias recombinantes foram coletadas, uma a uma, com a ponta de um palito e dissolvida em 5 µL de H₂O. Em seguida, foi feito um *mix* da reação de PCR com os reagentes em comum e, posteriormente, distribuídos nos tubos com as colônias dissolvidas. A condição da reação esta descrita na tabela 7 e o ciclo em seguida.

Tabela 7. Reagentes utilizados na PCR de colônia, volume e concentração final na reação.

Reagentes	Volume por reação	Concentração final
dNTP (2,0 mM) 10X	1,5 µL	200 µM
Tampão 10X	1,5 µL	1X
MgCl ₂ (50 mM)	0,6 µL	2 mM
Taq DNA polimerase (5 U/µL)	0,04 µL	0,013 U
Primers 5' (5 µM)	0,6 µL	2 µM
Primers 3' (5 µM)	0,6 µL	2 µM
H ₂ O milliQ	<u>5,16µL</u>	
Total do <i>mix</i>	10µL	
Colônia + H ₂ O milliQ	<u>5 µL</u>	
Total	15 µL	

Ciclo da PCR

Desnaturação inicial 94°C 3min →→[Desnaturação 94°C , 1 min→ Anelamento 50-60°C, 30 - 45 s→ Extensão 72°C 1 min/Kb] ↯(Ciclo - 30 vezes) →→, Extensão final 72°C , 3x tempo de extensão→→ 4°C ∞

4.14 Purificação dos produtos de PCR

Para purificação dos produtos de PCR foram utilizados os *kits QIAquick PCR purification kit* (Qiagen) ou *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega), seguindo-se as recomendações do fabricante.

4.15 Real Time PCR (qRT-PCR) - SYBR Green

A Quantificação relativa do número de cópias gênicas foi feita pela técnica de *Real Time* qRT-PCR utilizando o equipamento *7500 Fast Real Time PCR System* (Applied Biosystems), com o kit de detecção *Fast SYBR® Green Master Mix* (Applied Biosystems) e quantificação absoluta no equipamento Rotor-Gene Q da (Qiagen). A reação e o ciclo foram os recomendados pelo fabricante. Para uma reação de 10 µL, foram adicionados 5 µL de SYBR Green 2X, 0,8 µL do par de *primers* na concentração de 50 µM, 2 µL do DNA genômico, e completando-se o volume com H₂O milliQ, e nas mesmas proporções para reações de 20 µL. O programa para a reação foi: 95°C por 20 s, 40 ciclos de 95°C por 3 min e 60°C por 30 s. A especificidade do produto formado foi verificada por meio da curva de dissociação feita logo após a reação conforme o programa: 95°C/15 s, 60°C/1 min, 95°C/15 s e 60°C/15 s. A análise dos dados foi feita pelo método comparativo CT ($\Delta\Delta CT$) (Livak & Schmittgen, 2001), para a quantificação relativa e pelo método da curva padrão para a quantificação. As reações foram feitas em triplicata.

Para a construção da curva padrão foi usado o plasmídeo pBCPX (para XI) e o Y2STEF (para *URA3*), ambos foram digeridos com NotI, de forma a linearizá-los, foram quantificados e diluídos de forma a obter soluções na faixa de 10⁹ a 10⁵ moléculas do plasmídeo. Foi adicionado 1µL de glicogênio 20 ng/µL na água milliQ usada para as diluições sucessivas para evitar perdas de DNA por absorção no plástico. Para o cálculo do número de moléculas foi usada a equação abaixo:

$$Y = \frac{X \text{ (g/}\mu\text{L) DNA}}{\text{Tamanho do vetor linear (kb) x 649}} \times 6,022 \times 10^{23}$$

4.16 Remoção da Marca de Seleção (Cre recombinase)

Para remoção da marca de seleção flanqueada pelo loxP foi usado o protocolo descrito por Carter & Delneri (2010). Uma colônia da levedura contendo o cassete de seleção flanqueado por sítios *loxP* e o vetor pYRCre foi inoculada em 5 mL de meio YPRaf (1% extrato de levedura, 2% peptona e 2% rafinose) com 200 µg/mL higromicina B. A cultura foi incubada a 30°C, sob agitação (~200 rpm), durante a noite. No dia seguinte a quantidade de célula necessária para iniciar o inóculo com uma $OD_{600} = 0,3$ foi submetida a centrifugação (3.000 *g*/5 min) e lavadas com H₂O destilada estéril. Após uma nova centrifugação as células foram ressuspensas em 10 mL de meio YPGal (1% extrato de levedura, 2% peptona, 2% galactose) com 200 µg/mL higromicina B. A cultura foi incubada a 30°C por 3 horas sob agitação. Posteriormente 1 mL da cultura foi semeada em meio YPD. As células foram incubadas a 30°C por 24 h. Posteriormente as células foram repicadas para uma nova placa de YPD para obter se colônias isoladas.

4.17 Curva de crescimento celular em microplaca

Foram feitos pré-inóculos em 10 mL de meio YPD com adição de G418 para o estudo dos transportadores ou em meio YPX (1% extrato de levedura, 2% peptona, 2% xilose) para JPXIXK, crescidas a 30 °C sob agitação de 200 rpm por 20 horas. As células crescidas foram lavadas em água estéril no mínimo 2 vezes e inoculadas para um OD (600nm) inicial de 0,05 em 2 mL meio YPX (com adição de G418 para estudo de transportadores, por poço na microplaca de 12 poços. As leituras da OD a 600nm foram feitas pelo leitor de placas Epoch 2 Microplate Spectrophotometer (BioTek Instruments, Inc, Winooski, VT, EUA) utilizando o software Cen5 v2.07, com leituras a cada 30min e curvas de crescimento de 72 a 96 horas.

4.18 Adaptação metabólica

Adaptação de JPXIXK em meio com xilose

A levedura recombinante JPXIK1 foi crescida inicialmente em meio YPDX (1% extrato de levedura, 2% peptona, 2% xilose e 0,5% glicose), para obtenção de biomassa para início da adaptação. E sempre que necessário ao descongelamento de alíquotas de

Métodos

repiques anteriores os mesmos foram inicialmente crescidos neste meio para recuperação das células previamente ao início da adaptação. As células foram inoculadas em meio YPX para uma OD (600nm) de 0,2 em um volume final de 50 mL em frascos do tipo Erlenmeyer de 250 mL, crescidas a 30°C a 200 rpm. O crescimento foi monitorado por leitura de OD (600nm) e sempre que a cultura atingia OD entre 1,5 e 2,5, era realizada a passagem para um novo meio, para uma OD inicial de 0,2. Assim foram realizados repiques sucessivos. Nos primeiros repiques o meio YPX continha 20 g/L de xilose. Quando crescimento atingiu um μ de 0,14, foi realizado um repique apenas alterando a concentração de xilose do YPX, para 10 g/L. E os repique seguintes foram todos com 50 g/L de xilose. A partir do repique 19, foi iniciado o crescimento anaeróbico, realizado com o mesmo volume de 50 mL, em frasco tipo de penicilina, com septo de borracha e lacre, com uma agulha de seringa com filtro de algodão hidrofóbico espetado, de forma a permitir a saída de CO₂. Os meios da condição anaeróbica foram purgados com N₂, antes da transferência do inóculo, e as amostragens foram realizadas com auxílio de uma seringa, de forma a minimizar a entrada de oxigênio. Após 5 repiques anaeróbicos em YPX 5%, o crescimento passou a ser realizado em meio mínimo (YNB 1X + 0,5 g/L sulfato de amônia) com 5% xilose com adição de 0,01g/L ergosterol + 0,42 g/L Tween 80 (solução estoque diluída em etanol). Ao final, foram realizados dois últimos crescimentos em meio mínimo em aerobiose, conforme início da adaptação. Os clones foram isolados em placa com meio YPX e, paralelamente, em meio mínimo com 5% xilose. Clones com crescimento mais rápido foram selecionados e semeados em um segundo repique em placas com meio mínimo. A cada repique uma alíquota da população crescida foi preservada em glicerol 25% em freezer a - 80 °C.

A taxa específica de crescimento (μ) foi calculada de acordo com a equação abaixo

$$\mu = \frac{2,303(\text{Log}N - \text{log}N_0)}{(t - t_0)}$$

Estudo dos transportadores

A proposta do trabalho foi obter diferentes transportadores a partir das sequências originais de *HXT3*, *HXT5* e *HXT7*, através da modificação pontual do aminoácido T213 (treonina) do Hxt7 pela valina (V) (e seu correspondente homólogo nos demais transportadores), e através da evolução da levedura em meio com xilose e 2-deoxyglicose. O 2-deoxyglicose é um análogo da glicose, que pode competir com a xilose na entrada na célula, porém não é metabolizado na via glicolítica.

A adaptação metabólica e evolução dos transportadores foi realizada a partir do repique sucessivo do crescimento da levedura EBYXI contendo cada um dos transportadores em microplaca de 12 poços num volume final de 2mL. Os primeiros 10 repiques foram realizados por crescimento em meio YPX com adição de G418, realizando a passagem para uma nova placa com uma OD (600 nm) inicial de aproximadamente 0,1. Cada repique foi realizado aproximadamente a cada 4 dias no início da adaptação e mais ao final a cada 48hs, garantido a passagem no início da fase estacionária do crescimento. Após os primeiros 10 repiques em meio com YPX, uma vez que as leveduras apresentavam rápido crescimento em xilose, foram adicionadas a cada repique sucessivo, concentrações crescentes: 0,1 g/L, 0,5 g/L, 1 g/L, 5 g/L e 12 g/L de 2-deoxyglicose no meio YPX com 10 g/L de xilose. Esta última concentração correspondendo à razão equimolar entre os açúcares. Ao longo de todo o processo foi adicionado G418 de forma a evitar a perda do plasmídeo com os genes da XI e XK. A cada repique uma alíquota das culturas crescidas foi preservada em glicerol 25% em freezer a - 80°C.

Ao final do processo foram isolados clones para cada uma das leveduras com seus respectivos transportadores em meio YPX-ágar (com G418), conforme esquematizado na figura 12.

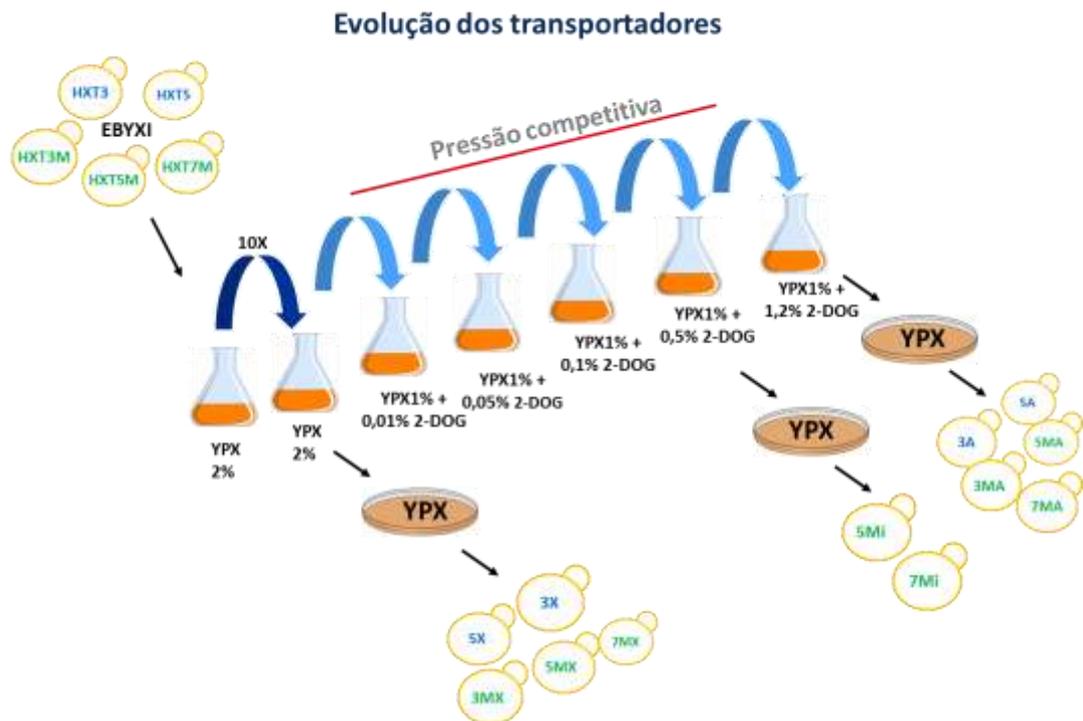


Figura 12: Representação esquemática da estratégia de evolução dos transportadores e isolamento das linhagens EBYHXT. Linhagens antes da adaptação: HXT3=EBYHXT3, HXT3M=EBYHXT3M, HXT5=EBYHXT5, HXT5M=EBYHXT5M, HXT7M=EBYHXT7M. Linhagens isoladas após a adaptação em xilose: 3X=EBYHXT3X, 3MX=EBYHXT3MX, 5X=EBYHXT5X, 5MX=EBYHXT5MX, 7MX=EBYHXT7MX. Linhagens intermediárias da evolução 5Mi=EBYHXT5Mi, 7Mi=EBYHXT7Mi. Linhagens isoladas ao final da evolução: 3A=EBYHXT3A, 3MA=EBYHXT3A, 5A=EBYHXT5A, 5MA=EBYHXT5MA, 7MA=EBYHXT7MA.

A comparação dos transportadores foi realizada pelo crescimento em YPX e YPD, com avaliação do crescimento por leitura de OD a 600nm e avaliação do consumo de açúcares por HPLC. O crescimento foi realizado em placas de 24 poços com 1 mL de volume final e inóculo inicial de 0,05 de OD 600nm, a partir do pré-inóculo crescido em YPD e lavado 3X com água estéril. O crescimento das microplacas de 12 poços e eventualmente de 24 poços foi realizado a 30°C em shaker a 200 rpm.

4.19 Curva de biomassa (Absorbância 600nm X peso seco)

Foi construída a curva de biomassa (peso seco) por densidade ótica da linhagem JPXIXK30.1. Para tal, as células foram crescidas por 20 horas em meio YPX (2% Peptona, 1% extrato de levedura e 2% xilose) em shaker a 250 rpm, 32°C. As células foram coletadas (3.000x g, 5 min), lavadas três vezes em água estéril e ressuspensas em um volume equivalente ao volume originalmente coletado. Em seguida foram realizadas diversas diluições sucessivas, e lidas as absorbâncias no leitor de densidade ótica (comprimento fixo 600nm).

Para determinar o peso seco, 20 mL da cultura de células, lavadas, foram filtrados em membranas de acetato de celulose 0,22 µm (Millipore). As membranas com e sem a biomassa foram secas em estufa a 90°C, até estabelecer peso constante, e posteriormente pesadas. Tanto as leituras de OD, quanto o peso das membranas foi realizado em triplicata o que pode ser visto na figura 13.

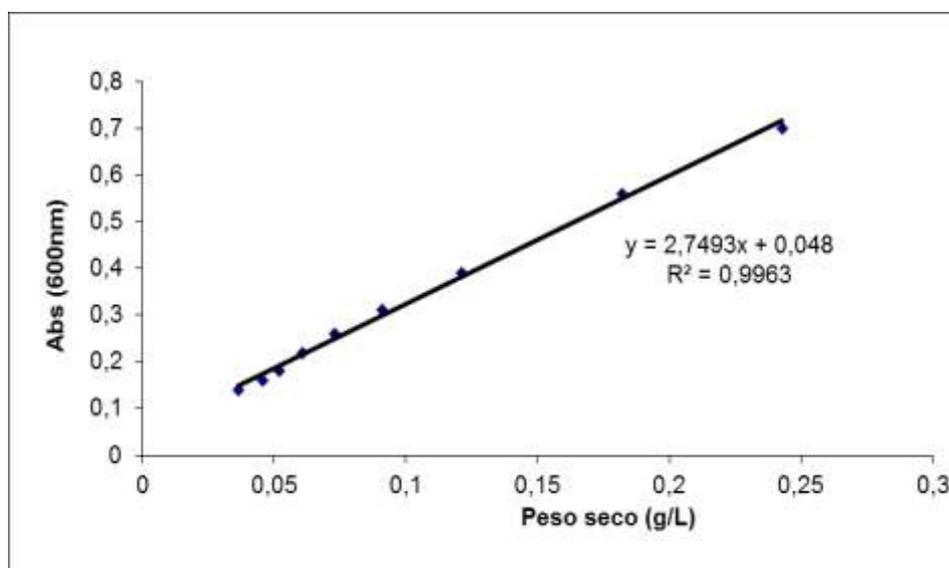


Figura 13: Curva de biomassa: Absorbância a 600 nm X peso seco da linhagem JPXIXK30.1

4.20 Fermentação em biorreator

Foram realizadas as fermentações em reator BioFlo 110 (New Brunswick Scientific Co., Inc.) em vaso de volume nominal de 1,3L, com Volume útil de 800mL. As células microbianas foram crescidas em frascos tipo Erlenmeyer em meio YPX (1% extrato de levedura, 2% peptona e 2% xilose), no período de 30 a 48 h, em shaker a 250 rpm, na temperatura de 30°C, e em seguida, a biomassa foi coletada a 3000 g por 5 min, lavadas com água estéril e ressuspensas em um volume final de 10 mL para inoculação no reator de maneira a atingir a concentração final de 1,3 a 1,6 g/L de células microbianas. No início da fermentação foi adicionado 50 ng/mL de antibiótico byozin (PROZYN) e 0,01g/L ergosterol + 0,42g/L Tween 80 (solução estoque diluída em etanol).

Nas fermentações em meio YPX (5,5% xilose) ou YPDX (5,5% xilose e 2% glicose) o meio foi previamente autoclavado e purgado por 1 h com N₂ para gerar condição anaeróbica. Entretanto, ao longo do processo não houve entrada de gás de forma a evitar possível evaporação do meio e carreamento de etanol. No caso da fermentação do hidrolisado, o mesmo não foi esterilizado e a condição de anaerobiose foi mantida pelo próprio consumo do oxigênio pelas células microbianas nas primeiras horas de processo. O pH foi monitorado e controlado em pH 6,0 pela adição automatizada de KOH 1M ou HCL 1M. As fermentações foram realizadas com temperatura controlada a 30°C, com agitação de 200 rpm. Foram realizadas amostragens a cada 3 horas, separando amostras para monitoramento da biomassa e amostras para avaliação dos metabólitos por HPLC, que foram submetidos imediatamente a centrifugação a 10.000 g e o sobrenadante foi congelado a -20°C.

Para fermentações do hidrolisado lignocelulósico foi usado hidrolisado de bagaço de cana de açúcar gerado na planta piloto (procedimento interno da empresa) armazenado em câmara fria. Previamente aos testes de fermentação o hidrolisado foi sacarificado. A corrente líquida rica em xilose foi neutralizada com hidróxido de amônia até atingir pH 5,0 e adicionada de sólido rico em celulose (celulignina), também neutralizado a pH 5,0. O sólido foi adicionado ao longo do processo de sacarificação por 72 h usando-se as enzimas comerciais Cellic Ctec 3 (Novozymes) adicionada no início do processo e o tenso ativo PEG (5%) junto com o sólido. Após a etapa de sacarificação, o

Métodos

hidrolisado sacarificado foi coletado (5.000 g/20 min) para separação da fração sólida e recuperação da fração líquida correspondente ao meio sacarificado (C5 e C6) livre de sólidos, usado nas fermentações.

Na tabela 8, está representada uma caracterização do hidrolisado sacarificado, livre de sólidos, gerado de acordo com o procedimento descrito acima, usado na fermentação.

Tabela 8: Caracterização hidrolisado de bagaço de cana sacarificado gerado no CENPES (Petrobras). Composição determinada por HPLC.

Componente	concentração g/L
glicose	70,5
xilose	51,2
celobiose	2,2
arabinose	5,5
acetato	5,1
lactato	0
5-HMF	0,03
furfural	0,19

Para estes experimentos cabe ressaltar que não houve suplementação do hidrolisado com nutrientes ou sais, nem carregados pelo inóculo, uma vez que o mesmo foi lavado e ressuspenso em água estéril. Os micronutrientes e fontes de nitrogênio são derivados da própria matéria prima (bagaço de cana) e da neutralização do hidrolisado com hidróxido de amônio, quando há a formação de sulfato de amônio no meio em alta concentração (aproximadamente 1 g/L). Para garantir a comparação dos resultados entre lotes diferentes de hidrolisados, caso necessário, é corrigida a concentração de açúcares, com adição de glicose e/ou xilose (sólido, diluído diretamente no hidrolisado) de forma a atingir as concentrações padronizadas.

Os parâmetros de acompanhamento da fermentação foram: glicose, xilose, xilitol, acetato, lactato, arabinose, glicerol, HMF, furfural e etanol, avaliados por HPLC (Cromatografia de alta performance). As condições cromatográficas foram:

Métodos

Fase Móvel: H₂SO₄ 5 mM

Fluxo: 0,700 mL.min⁻¹

Temperatura: 65°C

Detector: RID a 35°C

Coluna: Bio-Rad Aminex HPX-87H

Vol. de injeção: 20 µL.

Tempo de corrida: 25 a 30min

Determinação dos Parâmetros Fermentativos

As concentrações inicial e final dos açúcares (no último tempo de fermentação amostrado) foram usadas para o cálculo do rendimento de etanol (Y_{p/s}), de acordo com a fórmula abaixo, considerando os dois açúcares como substrato convertido em etanol.

$$Y_{p/s} = \Delta \text{ etanol} / (\Delta \text{ glicose} + \Delta \text{ xilose})$$

Para cálculo do rendimento de etanol pelo consumo da xilose, foi considerado para cálculo o intervalo de valores de etanol e xilose da fase na qual toda a glicose havia sido depletada do meio.

A produtividade volumétrica de etanol (g/L.h) foi calculada com base na avaliação cinética da curva de produção de etanol, estabelecendo como intervalo de tempo usado para o cálculo o ponto em que a curva de produção de etanol atinge seu máximo ou o platô. Da mesma forma, a taxa de consumo de xilose (g/L.h⁻¹), também foi calculada de acordo com a cinética da curva de consumo deste açúcar, considerando a região da curva que precede seu valor mínimo ou ponto em que se atinge um platô.

A produtividade específica foi calculada pela divisão da produtividade volumétrica pela concentração da biomassa inicial g (peso seco de células)/L, obtendo-se g/g/h.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CONSTRUÇÃO DA LEVEDURA INDUSTRIAL CAPAZ DE FERMENTAR XILOSE

5.1.1 Integração do cassete XI em múltiplas cópias nas regiões δ da levedura industrial JP1

5.1.1.1 Obtenção da Marca de seleção Kan-LoxP e Zeo-LoxP

A primeira etapa deste estudo foi a obtenção da marca de resistência Kan^R flanqueada pela sequência *loxP*. Esta marca confere resistência a canamicina em bactérias e a gentamicina (G418) em leveduras.

O gene de resistência *kan* foi amplificado por PCR com a enzima DNA polimerase Phusion[®] de alta fidelidade, utilizando o par de *primers* ZeoblasF3 e ZeoblasR3. Estes *primers* foram construídos de forma a adicionar em cada extremidade uma sequência *loxP*, além dos sítios de restrição para BamHI (externo a *loxP*) e BglII (entre *loxP* e *kan*). Essa sequência permite a excisão da marca de seleção por recombinação dos sítios *loxP* promovida pela enzima Cre Recombinase, possibilitando a reciclagem desta marca de seleção.

O cassete Kan-*loxP* (1,7 kb) foi obtido usando o vetor pPICK α como molde, gerando um cassete de resistência Kan/G418, com promotor *TEF1* para levedura, *EM7* para bactéria e o terminador de transcrição do gene *CYC1*, além das sequências *loxP* nas extremidades 5' e 3' deste cassete (figura 14).

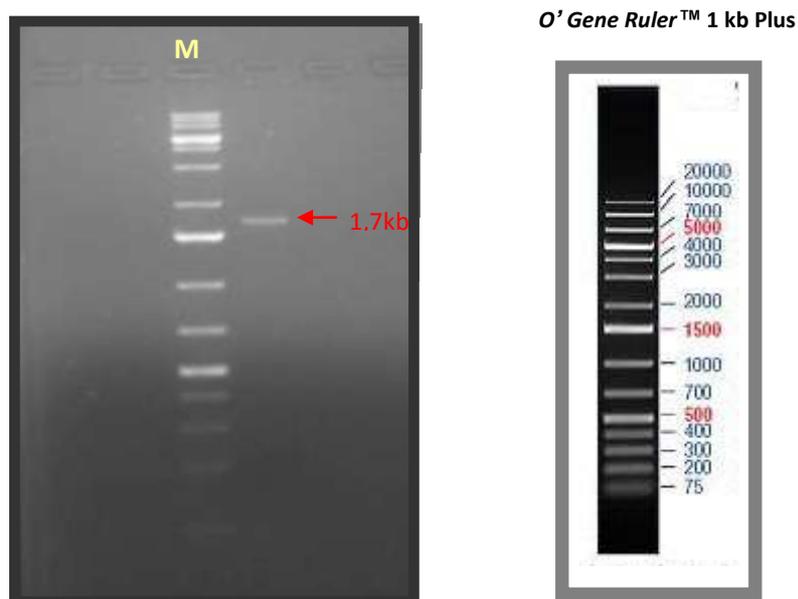


Figura 14: Amplificação do cassete de seleção Kan-loxP. Análise feita por eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo. **1:** produto do PCR (Kan-loxP); **M:** Marcador *O' Gene Ruler* 1kb Plus Ladder (Fermentas).

Com a mesma estratégia, o cassete de resistência a zeocina foi amplificado por PCR usando-se o vetor pPICZ α A, que se difere do vetor anterior apenas pela substituição do gene *kan* pelo gene *sh ble* (resistência a Zeocina), com os mesmos promotores e terminadores. Foi obtido um fragmento de aproximadamente 1,3 kb correspondendo ao tamanho esperado para o cassete Zeo-LoxP, flanqueado por sequências LoxP nas regiões 5' e 3' do cassete.

Tanto o fragmento correspondente ao cassete Kan-loxP obtido na reação de PCR, quanto o fragmento correspondente ao cassete Zeo-loxP, foram usados nas estratégias que envolveram integração de genes no genoma da levedura industrial JP1. Após a purificação, os mesmos foram ligados aos vetores construídos no presente trabalho, e descritos a seguir.

5.1.1.2 Construção do vetor pTXI

O vetor pT foi desenvolvido por Borges (2009) no laboratório de Biologia Molecular da UnB. Este é um vetor integrativo que contém um sítio múltiplo de clonagem flanqueado por uma região homóloga a sequência do transposon Ty (T1), correspondentes à região δ . O primeiro, chamado de TyD, por estar à direita do sítio múltiplo de clonagem, e outro, TyE, por estar à esquerda. Internamente a estas sequências, há um sítio de corte de restrição pela enzima XhoI, que permite linearizar o mesmo, gerando um fragmento que pode ser usado para integração por recombinação homóloga nos múltiplos sítios de região δ presentes no genoma de *S. cerevisiae*.

Com o objetivo de integrar XI em múltiplas cópias no genoma de *S. cerevisiae*, o cassete de expressão da XI (sob o controle do promotor *PGK1*) foi extraído do vetor pBCPX (Reis, 2012) e clonado no vetor pT, de acordo com a estratégia esquematizada na figura 15.

Resultados e Discussões

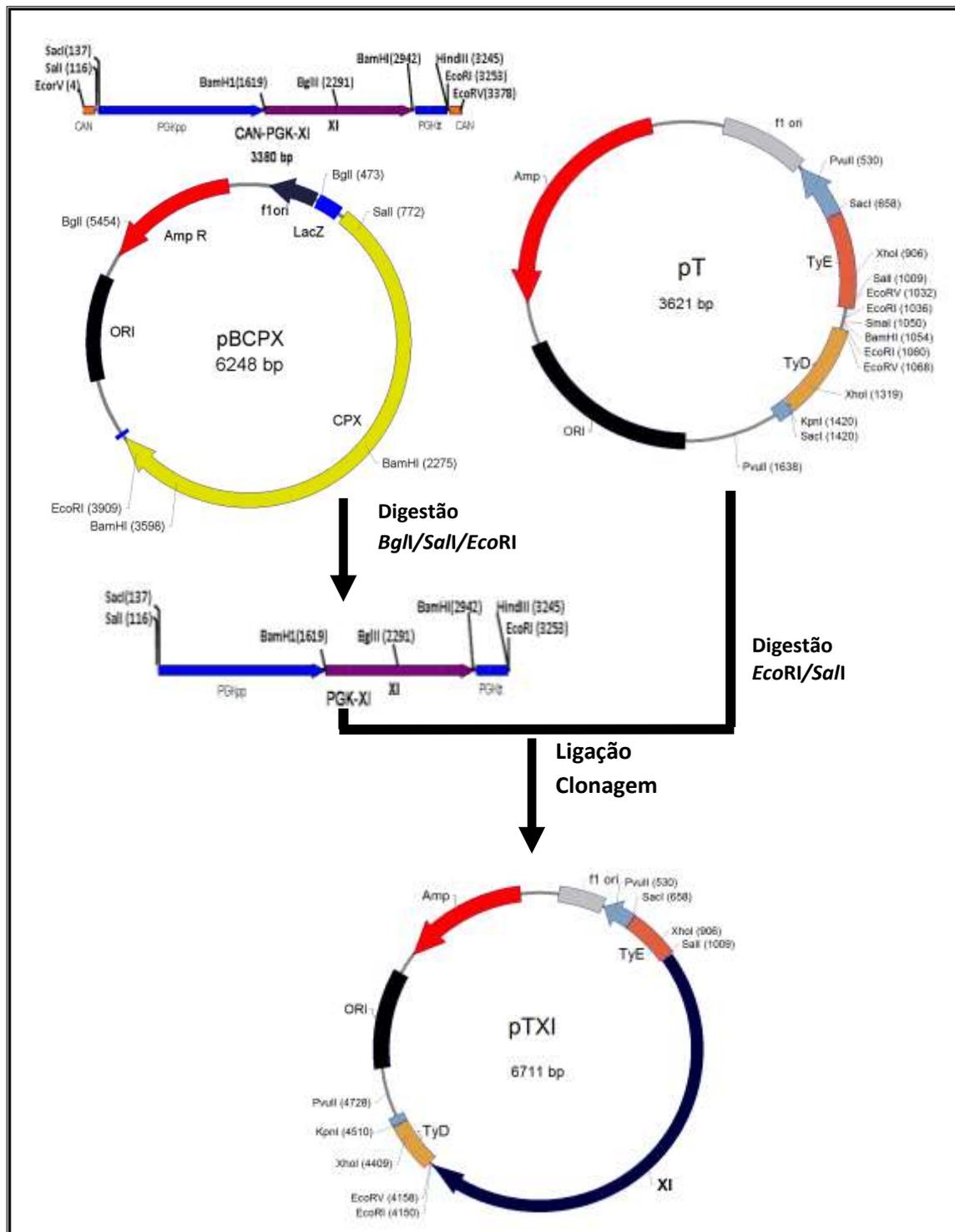


Figura 15: Representação esquemática da estratégia utilizada para construção do vetor pTXI.

O plasmídeo pBCPX foi cortado sequencialmente com as enzimas *SalI*, *BglI* e *EcoRI*, respectivamente nesta ordem, gerando 4 fragmentos: 3,1 kb, 1,5 kb, 1,2 kb e 300 pb (figura 16). A enzima *BglI* foi usada apenas para facilitar o isolamento da banda do

Resultados e Discussões

cassete da XI no gel de agarose, uma vez que fragmenta o restante do vetor em partes menores. O fragmento de 3,1 kb corresponde ao cassete da XI cortado na posição 5' pela enzima de restrição Sall e pela EcoRI na posição 3'. O mesmo foi isolado e eluído do gel. O cassete da XI foi em seguida, usado em reação de ligação com o vetor PT linearizado pela digestão com estas duas enzimas e precipitado para a remoção de sais e enzimas. O sistema de ligação foi usado na transformação de bactérias *E. coli* competentes da linhagem XL10 Gold, semeadas em meio LB sólido contendo 100 µg/mL de ampicilina, para a seleção dos clones.

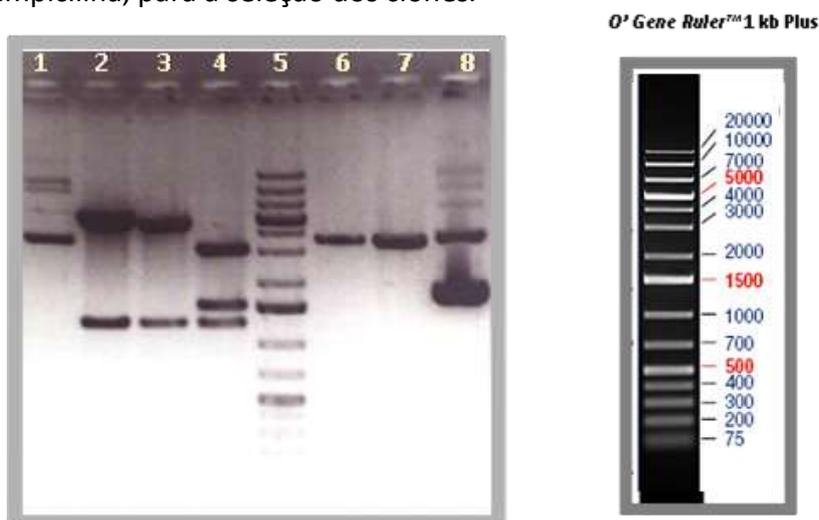


Figura 16: Perfil de restrição de vetor pT e pBCPX (XI). Poço 1: pBCPX intacto, poço 2: pBCPX digerido com BglI, poço 3: pBCPX digerido com BglI e Sall, poço 4: pBCPX digerido com BglI, Sall e EcoRI, poço 5: Marcador O'Gene Ruler 1Kb plus, poço 6: pT digerido com Sall, poço 7: pT digerido com Sall e EcoRI, poço 8: pT intacto.

Vários clones foram selecionados aleatoriamente para averiguar se houve ligação no vetor de integração. Mais de 70 clones foram avaliados pelo perfil de restrição com BamHI após extração de DNA plasmidial em pequena escala (miniprep), ou por PCR de colônia com os *primers* XIF e XIR. Nenhum clone apresentou o padrão de restrição esperado pelo corte com BamHI (3 bandas: 5 kb, 1,3 kb e 300pb) correspondente ao vetor pTXI. Portanto, todos os clones avaliados correspondiam ao vetor pT religado.

A etapa da ligação foi repetida mais 3 vezes variando-se a proporção vetor inserto (1:3 a 1:5), obtendo-se grande quantidade de clones com o vetor religado. Em função da dificuldade em se amostrar clones contendo o Inserto, foi realizado um teste partindo-

Resultados e Discussões

se do cassete XI e do vetor pT linearizado, ambos isolados do gel, em reações de ligação com o vetor desfosforilado e não desfosforilado, com e sem o inserto. Em todos os casos foram obtidos vários clones, e novamente, todos os aleatoriamente selecionados possuíam o vetor religado. Este estudo indicou que mesmo após a reação de desfosforilação do vetor ainda restavam alguns vetores com 5' fosfato, capazes de se religar. Além disso, não pode ser confirmada a digestão total de pT com EcoRI, uma vez que o fragmento menor eliminado após a digestão com as duas enzimas seria de apenas 23 pb, não visível no gel da digestão (figura 16).

O vetor pT foi sequenciado para elucidar se o sítio múltiplo de clonagem havia sofrido alguma recombinação. A sequência da região foi confirmada conforme apresentado na figura 17, contendo dois sítios para EcoRI, ao invés de apenas um sítio conforme descrito por Borges (2009), porém, em ambos os casos a linearização do vetor com as duas enzimas em sequência, Sall e EcoRI, ainda seria possível. Contudo, a digestão completa com a segunda enzima não poderia ser confirmada, pois o fragmento gerado era muito pequeno para visualização no gel. A grande quantidade de vetores religados dá indícios de que a digestão tenha sido parcial.

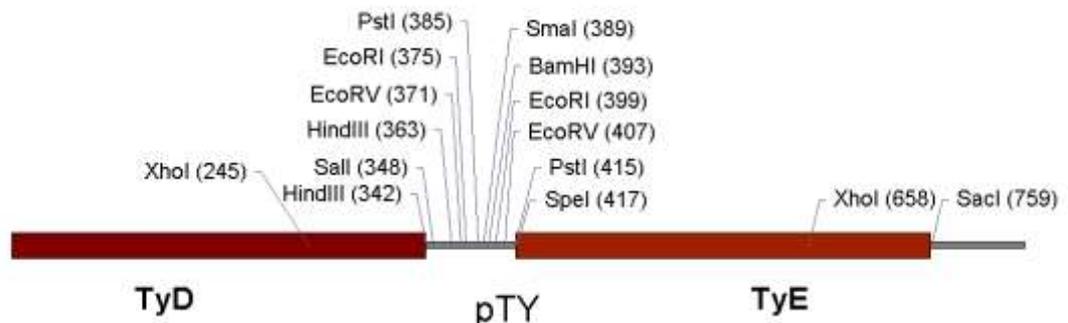


Figura 17: Mapa do sítio múltiplo de clonagem do pT.

Com o objetivo de investigar se na população de clones obtidos haviam clones com o inserto, uma placa com mais de 300 colônias (da ligação com o inserto) foi lavada com 1 mL de meio e utilizada como inóculo para a extração de DNA plasmidial. Os diversos plasmídios da população foram linearizados com EcoRV, gerando dois fragmentos, um de 6,7 kb correspondendo ao vetor pT com o inserto (nomeado pTXI) e um mais forte de 3,5 kb correspondendo ao vetor pT religado (figura 18). A presença do

Resultados e Discussões

inserto na população de plasmídios também foi confirmada por uma reação de PCR com o par de *primers* XIF e XIR.

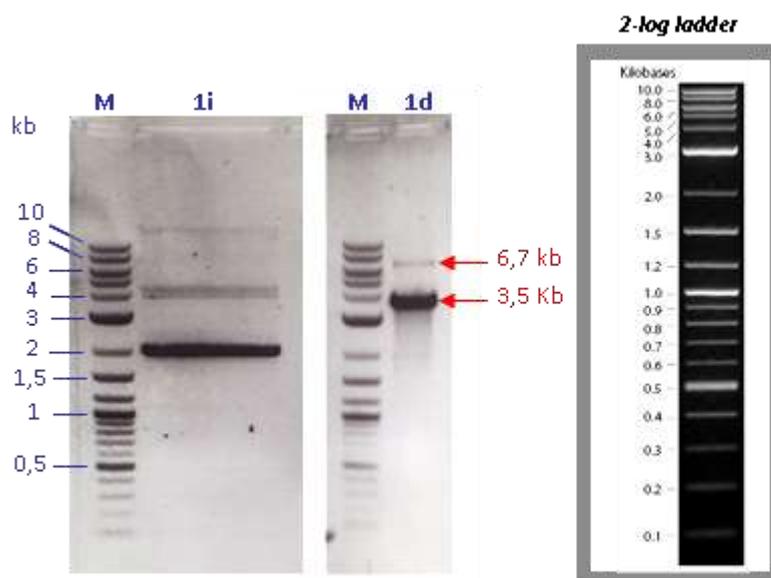


Figura 18: Perfil de restrição dos plasmídios pTXI extraídos da população de clones. M) Marcador 2-log DNA Ladder (0.1-10.0kb); 1i) pTXI da população intacto; 1d) pTXI da população digerido com EcoRV. Gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo.

De forma a aumentar a probabilidade de recuperação do plasmídio pTXI, a população de plasmídios foi cortada com a enzima *Sma*I e em seguida, usados na transformação de *E. coli* XL10-gold. Com isso, se esperava enriquecer relativamente a fração de plasmídios no qual o inserto se inseriu no sítio de corte com *Eco*RI que eliminou o fragmento que continha o sítio *Sma*I (figura 17). Nesse caso, plasmídios religados seriam linearizados.

Após a transformação foram obtidos vários clones, dos quais 10 foram analisados quanto ao padrão de restrição com *Eco*RV. Três clones apresentaram a banda de 6,7 kb correspondente ao pTXI (figura 19a).

Resultados e Discussões

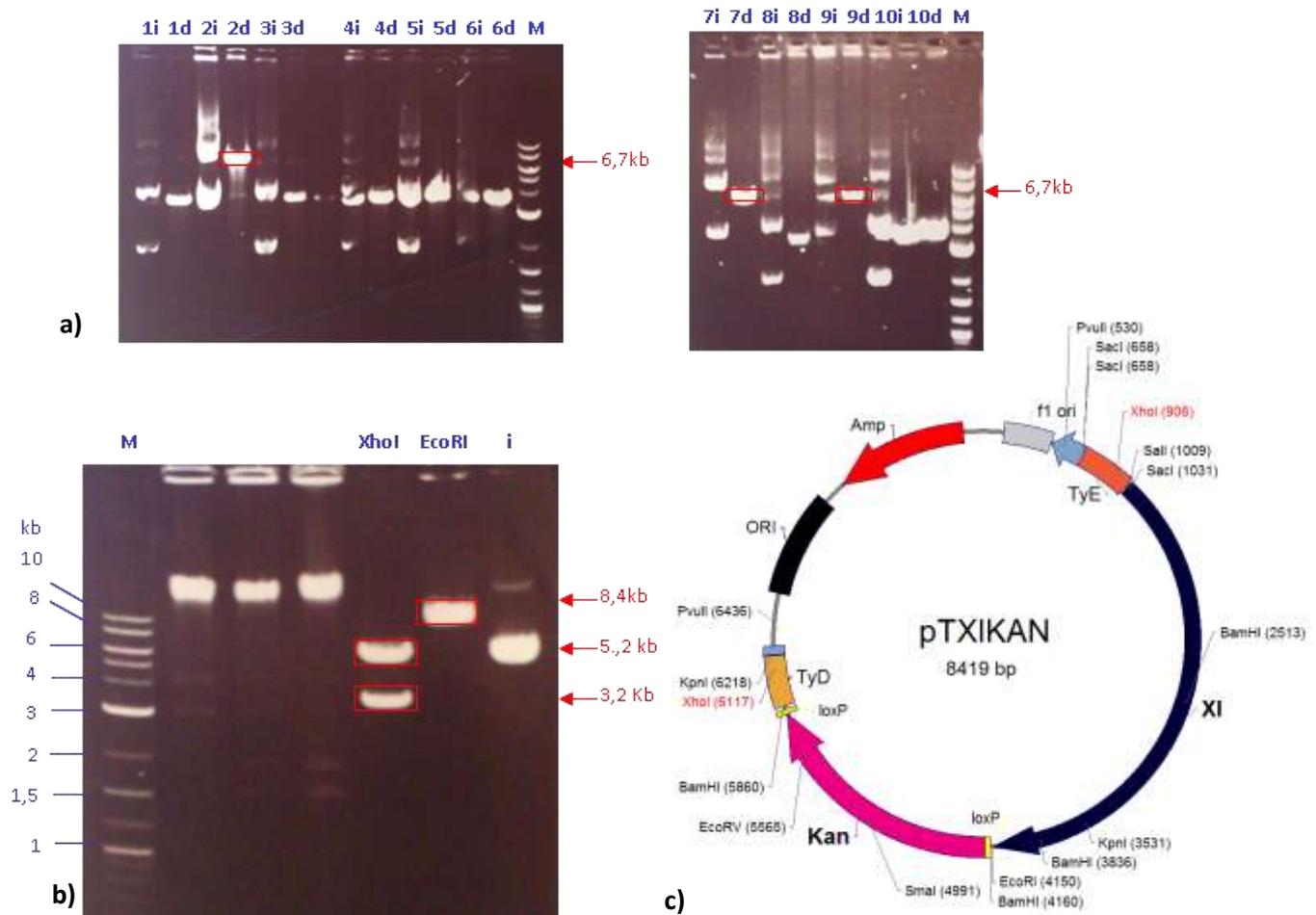


Figura 19: Perfil de restrição dos transformantes pTXI e pTXIKAN. M= 2log DNA Ladder (0.1-10.0kb); a) 1i, 2i, 3i, 4i, 5i, 6i, 7i, 8i, 9i, 10i= vetor pTXI do clone 1 ao 10 intacto, 1d, 2d, 3d, 4d, 5d, 6d, 7d, 8d, 9d, 10d= vetor pTXI do clone 1 ao 10 digerido com EcoRV. b) i= vetor pTXIKAN do clone 2 intacto, EcoRI= vetor pTXIKAN do clone 2 digerido com EcoRI, XhoI = vetor pTXIKAN do clone 2 digerido com XhoI. c) Mapa do vetor pTXIKAN. Gel de agarose 0,8%.

O clone 2 revelou a banda do plasmídeo linearizado de 6,7 kb que foi isolada do gel, purificada e usada diretamente em uma ligação com a o cassete Kan-loxP obtido por PCR anteriormente. O sistema de ligação foi usado na transformação de *E. coli* competentes, e os clones foram semeados em meio LB sólido com canamicina. Dois clones foram obtidos, os mesmos foram confirmados por PCR quanto a presença da XI e digerido com EcoRI de forma a confirmar seu tamanho linear de 8,4 kb (figura 19b).

5.1.1.4 Integração da XI em múltiplas cópias

Inicialmente foi realizada uma midiprep para obter mais de 20 µg de DNA do vetor pTXI com a marca Kan, denominado pTXIKAN, a partir de uma colônia de *E. coli* contendo o vetor obtido anteriormente. O vetor foi cortado com XhoI, sítio dentro da região do Ty, liberando um fragmento de 5,2kb que contém o cassete da XI seguido de Kan-loxP, flanqueados pela sequência do Ty (figura 19b). O fragmento foi precipitado e usado na transformação de *S. cerevisiae* JP1, pelo protocolo de transformação de leveduras de alta eficiência.

Pela presença das regiões Ty nas extremidades 5' e 3' do fragmento, a XI poderia se integrar em múltiplas cópias por recombinação homóloga nas regiões δ do genoma. Após a transformação, 86 colônias de *S. cerevisiae* foram selecionadas em YPD-ágar com 200 µg/mL de G418 e semeadas em placas com concentrações crescentes de G418: 200 µg/L, 500 µg/L, 1000 µg/L, de forma a buscar clones com um maior número de cópias da XI integradas (figura 20). Dos 86 clones, 73 foram capazes de crescer na última concentração testada, dando indícios de que mais de uma cópia da XI podem ter sido integradas em seu genoma.

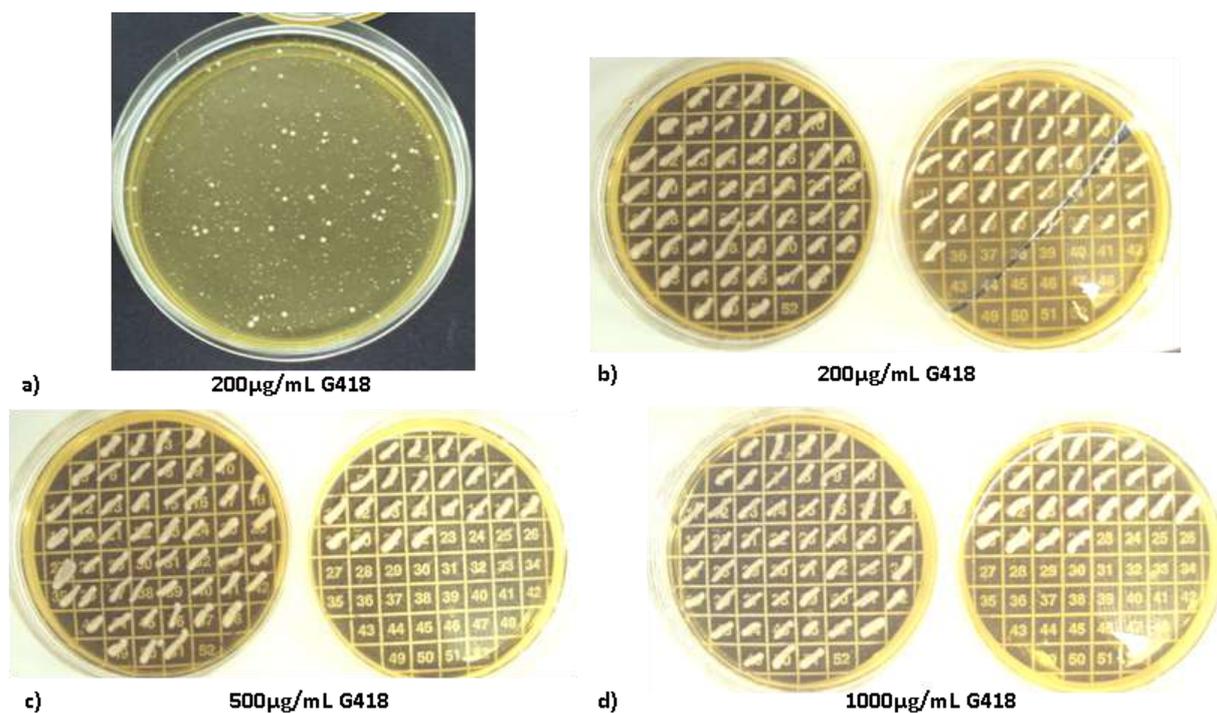


Figura 20: Seleção dos transformantes em crescentes concentrações de antibiótico. Clones 1-51A e clones 1-35B crescidos em YPD sólido. Em todas as placas, o número 52 corresponde ao controle negativo, *S. cerevisiae* JP1 selvagem **a)** placa da seleção inicial dos clones pós transformação 200 µg/mL de G418. **b)** YPD com 200 µg/mL de G418. **c)** com 500 µg/mL de G418. **d)** com 1000 µg/mL de G418.

Paralelamente, os mesmos clones foram testados em meio YNB sólido com Xilose 2% e 5% como única fonte de carbono, crescidos por até 1 mês a 30°C. Alguns clones se mostraram capazes de crescer em xilose, o que indica que a XI integrada ao genoma encontra-se funcional. O crescimento em xilose se manteve mesmo após um segundo repique em meio com xilose como única fonte de carbono, no qual o controle negativo, *S. cerevisiae* JP1 selvagem, não consegue crescer (Figura 21).

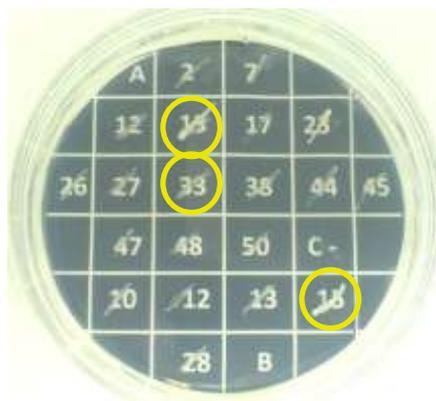


Figura 21: Seleção dos transformantes com capacidade de crescer em xilose como única fonte de carbono. Clones 2A,7A,12A,13A, 17A, 23A, 26A, 27A, 33A, 38A, 44A, 45A, 47A, 48A, 50A, e clones 10B, 12B,13B, 15B e 28B crescidos por 14 dias em YNB sólido com 5% de Xilose, segundo repique, após crescimento dos mesmo no primeiro repique em YNBX. C- = controle negativo, *S. cerevisiae* JP1. Destacados em amarelo, clones selecionados (13A, 33A e 15B).

5.1.1.5 Remoção da Marca Kan-loxP

Com base no crescimento em xilose (figura 21), os clones 13A, 33A e 15B foram selecionados para remoção da marca Kan-loxP. A presença da XI integrada foi confirmada também por PCR de colônia para os clones com melhor crescimento em xilose. Foram escolhidos 3 clones diferentes, pois a posição das integrações no genoma pode levar a eventuais deleções e alterações estruturais pela recombinação de sítios *loxP* mais afastados entre si (Carter & Delneri, 2010).

Para a remoção da marca, os 3 clones foram transformados com o vetor pYRCre pelo protocolo de transformação rápida. Este vetor permite a expressão da recombinase Cre induzida por galactose. Após transformação, uma colônia derivada de cada um dos clones anteriores foi usada para crescimento e indução da recombinase Cre. Posteriormente, foram selecionadas colônias com capacidade de crescer em meio YPD sem antibiótico, mas incapazes de crescer em meio YPD com 200 µg/mL G418 (clones sem marca Kan-loxP da integração) e 200 µg/mL higromicina B (clones sem o vetor pYRCre), indicando a perda do vetor replicativo e a remoção da marca Kan do genoma de *S. cerevisiae* (figura 22).

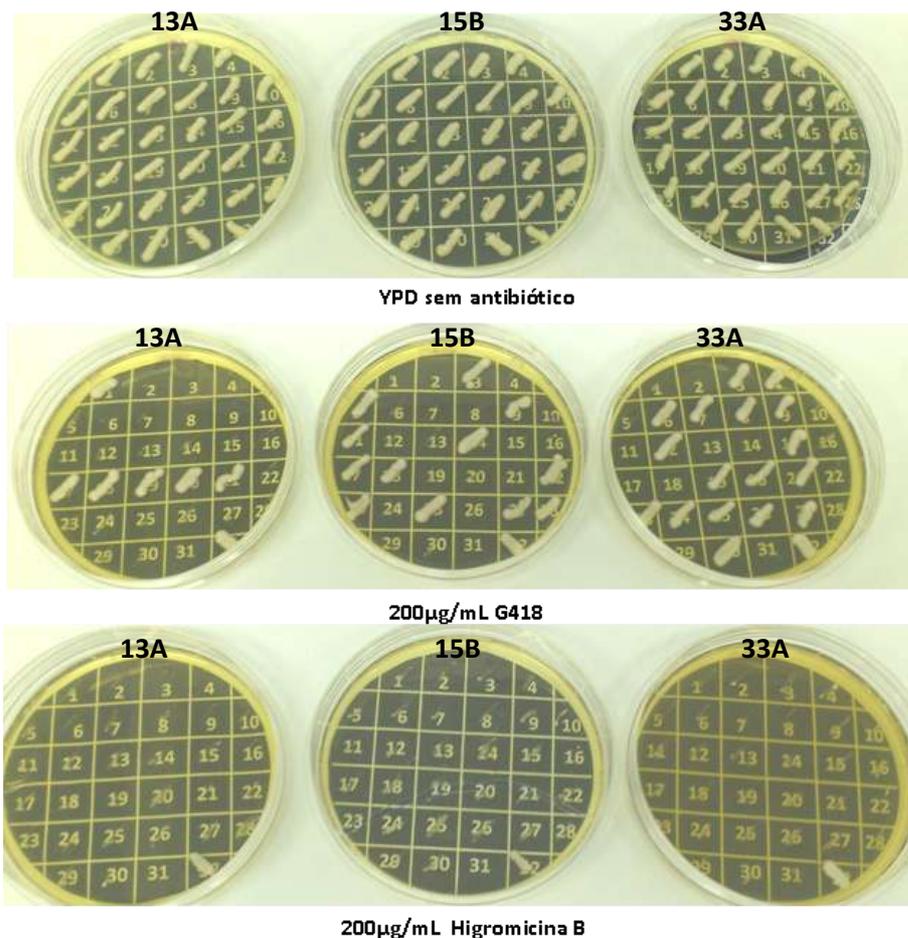


Figura 22: Seleção de clones com a marca de seleção removida. 30 clones derivados do clone JPXI13A, JPXI15B e JPXI33A, nomeados JPXI13.1 a 30, JPXI15.1 a 30, JPXI33.1 a 30 de acordo com a posição na placa, crescidos em meio YPD sólido sem antibiótico, YPD com 200µg/mL de G418 e YPD com 200µg/mL de higromicina B. Posição 31 nas placas corresponde ao controle negativo, *S. cerevisiae* JP1 selvagem e posição 32 corresponde ao controle positivo, clone 13A, 15B e 33A, respectivamente, transformados com vetor pYRCre (resistentes a canamicina e higromicina).

Paralelamente, foram feitos crescimento dos clones que tiveram a marca removida em YNB com 5% xilose como única fonte de carbono, para selecionar clones que não tivessem perdido a capacidade de crescer em xilose. A remoção da marca poderia recombinar e excluir cassetes de XI integrados em regiões próximas. Os clones, nomeados JPXI, com crescimento superior ao controle negativo (JP1 selvagem) foram repicados para um segundo crescimento em YNB xilose, aonde o controle negativo não cresce.

5.1.1.6 Quantificação relativa do número de cópias integradas da XI

Para avaliar a quantidade relativa de cópias da XI que foi integrada no DNA genômico de JP1, foram extraídos o DNA genômico de 3 clones JPXI13.10, JPXI33.11, JPXI15.13 (sensíveis a G418 e que crescem em Xilose), de JP1 selvagem e do clone 15B (sem remoção da marca Kan).

A quantificação foi realizada por *PCR* em tempo real (*qRT-PCR*), utilizando o gene codificador da actina (*ACT1*), cuja sequência foi obtida no *GeneBank*, como um controle endógeno. Para o desenho dos *primers* referentes ao gene codificador de actina (*ACT1*) e da xilose isomerase foi usada a ferramenta *Primer3Plus* (Untergasser *et al.*, 2007) obedecendo-se as regras para *qRT-PCR*. As sequências dos *primers* também foram analisadas no programa *Primer Express* quanto à formação de estruturas secundárias, sendo ajustadas de forma a evitá-las. As regiões amplificadas pelo conjunto de *primers* para actina (ACT-F e ACT-R) e pelo conjunto de *primers* para xilose isomerase (XI-F e XI-R) apresentaram tamanho estimado de 133 pb e 144 pb, respectivamente. Como os tamanhos foram similares, foi possível usar a amplificação da actina como controle endógeno da amplificação, para nivelamento das diferenças correspondentes a variações na quantidade de DNA genômico de cada amostra.

No gráfico apresentado na figura 23, observa-se que o clone 15B apresentou maior número relativo de cópias da xilose isomerase quando comparado, aos clones JPXI13.10, JPXI33.11 e JPXI15.13, este último derivado do 15B após a remoção da marca. Conforme esperado, todos apresentaram maior número de cópias do que a levedura selvagem (controle negativo), que não possui o gene da XI.

Com base na amplificação relativa do gene da XI nos clones, estima-se que o mesmo estaria em um maior número de cópias no genoma do clone JPXI15B, enquanto os clones JPXI13.10, JPXI33.11, JPXI15.13, que tiveram a marca Kan-loxP removida, apresentariam um número menor de cópias no genoma. JPXI15B perdeu algumas cópias da XI durante o evento de remoção da marca, e isso pode indicar que houve possíveis recombinações entre regiões distintas de integração, o que pode alterar outras características fenotípicas que no presente trabalho não foram avaliadas.

Resultados e Discussões

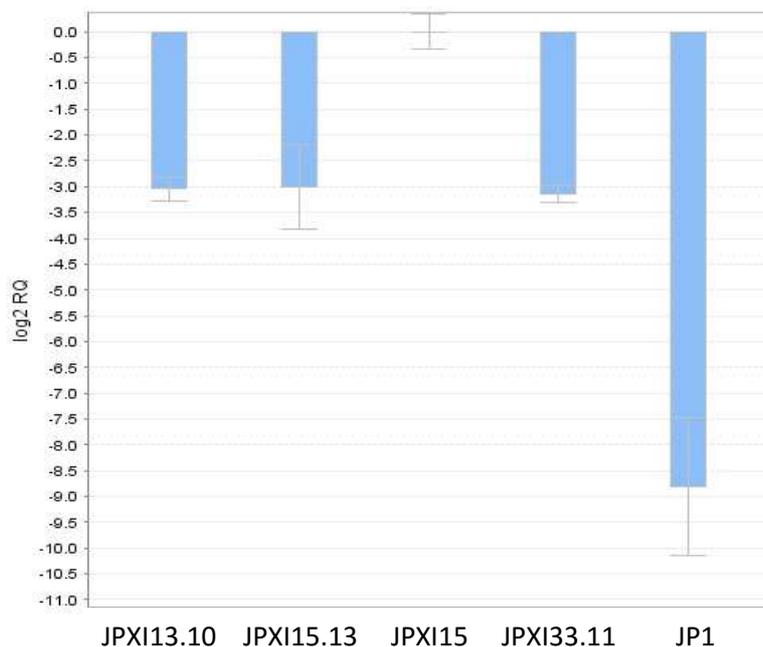


Figura 23: Análise da quantificação relativa do gene XI nas linhagens de *S. cerevisiae* JP1, JPXI13.10, JPXI15.13, JPXI15B e JPXI33.10, por qRT-PCR. O desvio padrão é referente à triplicata da reação de PCR.

Uma vez que não foi observada diferença em número de cópias entre os clones JPXI13.10 e JPXI33.10. A seleção do clone foi realizada a partir do crescimento em placa em YNB xilose 5%. O clone 13.16 foi o que se destacou, e foi usado para as etapas seguintes, sendo renomeado apenas como JPXI a partir deste ponto.

A presença da XI em múltiplas cópias no genoma de JP1 é suficiente para permitir que a mesma cresça em xilose como única fonte de carbono. Porém, o crescimento é muito lento em placa (mais de 15 dias), provavelmente pela limitação na entrada da xilulose na via PPP. Ho & Brainard (1998a) observaram que a enzima xiluloquinase (XK), responsável pela primeira etapa na entrada da xilulose na via das PPP apresenta baixa expressão quando comparada a expressão das enzimas da via glicolítica. Como etapa seguinte, o gene da XK foi superexpresso em JPXI, que apresenta a XI integrada em seu genoma.

5.1.2 Integração da XK no gene *GRE3*

5.1.2.1 Construção do Vetor pBGREXKAN

Foi concebida a seguinte estratégia com o objetivo de integrar o gene da xiluloquinase (XK) em duas cópias no genoma com a concomitante deleção do gene da aldose redutase (*GRE3*) responsável por desviar a via de xilose ao converter a xilose intracelular a xilitol (figura 24).

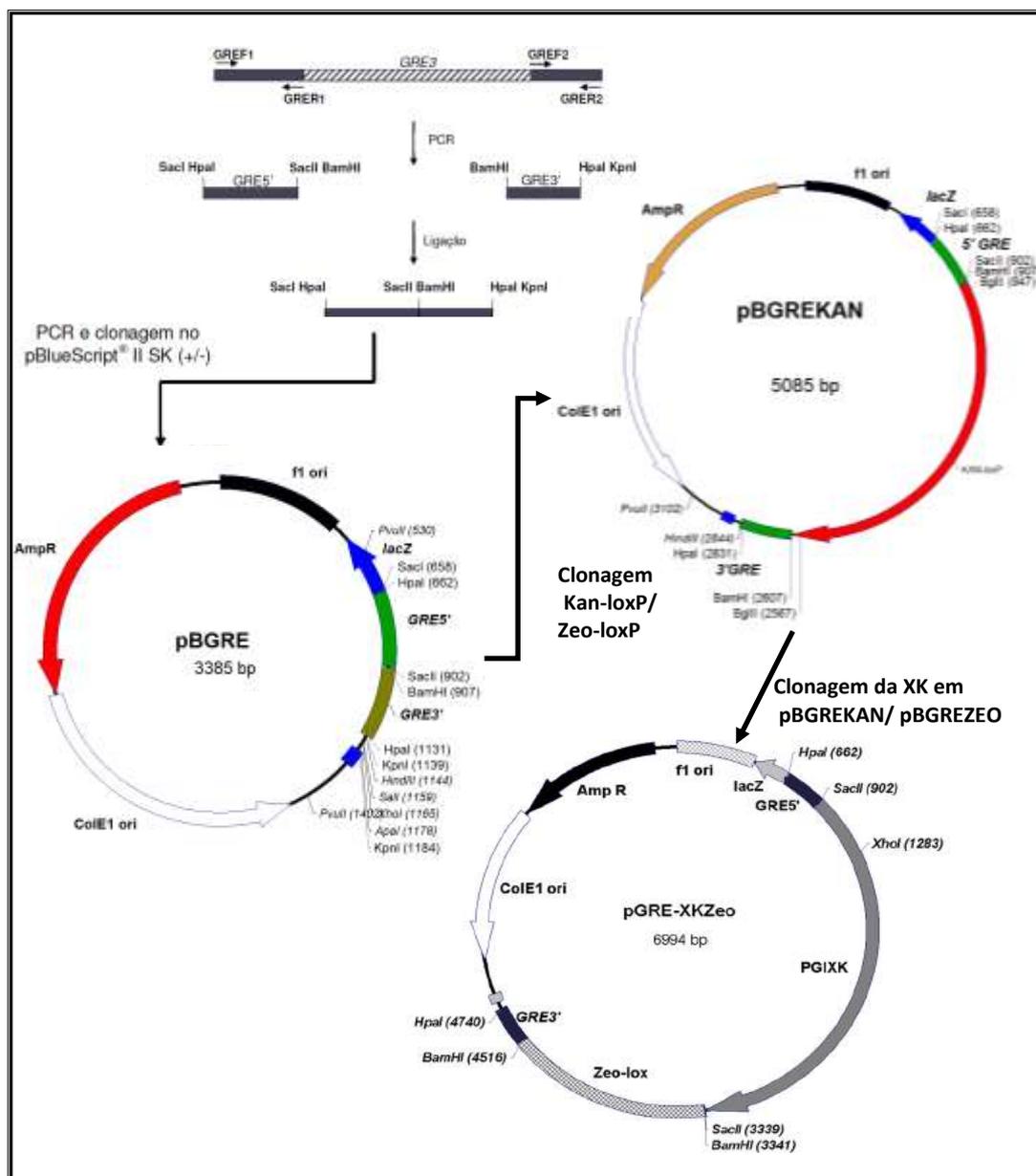


Figura 24: Representação esquemática da estratégia utilizada para construção dos vetores pBGREXKAN e pBGREXKZEO (adaptado de Reis, 2012).

Resultados e Discussões

O vetor de integração pBGRE foi construído por Reis (2012), contendo 230 pb e 220pb da sequência da região *upstream* (GRE5') e *downstream* (GRE3') do gene *GRE3* de *S. cerevisiae*, com base na sequência depositada no *GeneBank* para a linhagem S288c. Este vetor foi usado como ponto de partida para clonagem do cassete da xiluloquinase (XK) e das marcas Kan-loxP ou Zeo-loxP, para direcionamento da integração para o locus *GRE3* da levedura JPXI.

Inicialmente, o vetor pBGRE foi linearizado com BamHI, desfosforilado e usado na reação de ligação com o produto de PCR Kan-loxP, também cortado com a mesma enzima. A ligação foi usada para transformação de *E. coli* competentes e seleção diretamente em meio LB com 50 µg/mL de canamicina. Foram obtidos apenas 4 clones, entretanto todos possuíam o inserto Kan-loxP, confirmado por análise do perfil de restrição dos plasmídeos obtidos. Conforme apresentado na figura 25a, observa-se que a digestão dos plasmídeos com BamHI, libera um fragmento de 1,7 kb correspondente a Kan-loxP e um fragmento de 3,4 kb correspondente ao vetor pBGRE linear. A mesma estratégia foi realizada usando-se o produto de PCR Zeo-loxP, e a seleção dos clones diretamente em meio LB com 25 µg/mL de zeocina. Os vetores obtidos foram nomeados de pBGREKAN e pBGREZEO, respectivamente.

O cassete de expressão da XK foi construído por Reis (2012), contendo a região promotora do gene *PGI* de *S. cerevisiae* S288c, a região codificadora do gene da xiluloquinase (*XKS1*) e o terminador do próprio gene *XKS1*. O cassete foi excisado do vetor pGXKSPGI (Reis, 2012) com a enzima SacII, mesma enzima que foi usada para linearizar os vetores pBGREKAN e pBGREZEO. Observa-se, na figura 25b, que a digestão do vetor pGXKSPGI com SacII gerou dois fragmentos, um de aproximadamente 2,4 kb correspondente ao cassete da XK e um fragmento de 3,1 kb correspondente ao restante do vetor. A banda de 2.4 kb foi eluída do gel, purificada e usada em reação de ligação com o vetor pBGREKAN e pBGREZEO, ambos previamente digeridos com SacII, precipitados e desfosforilados.

Resultados e Discussões

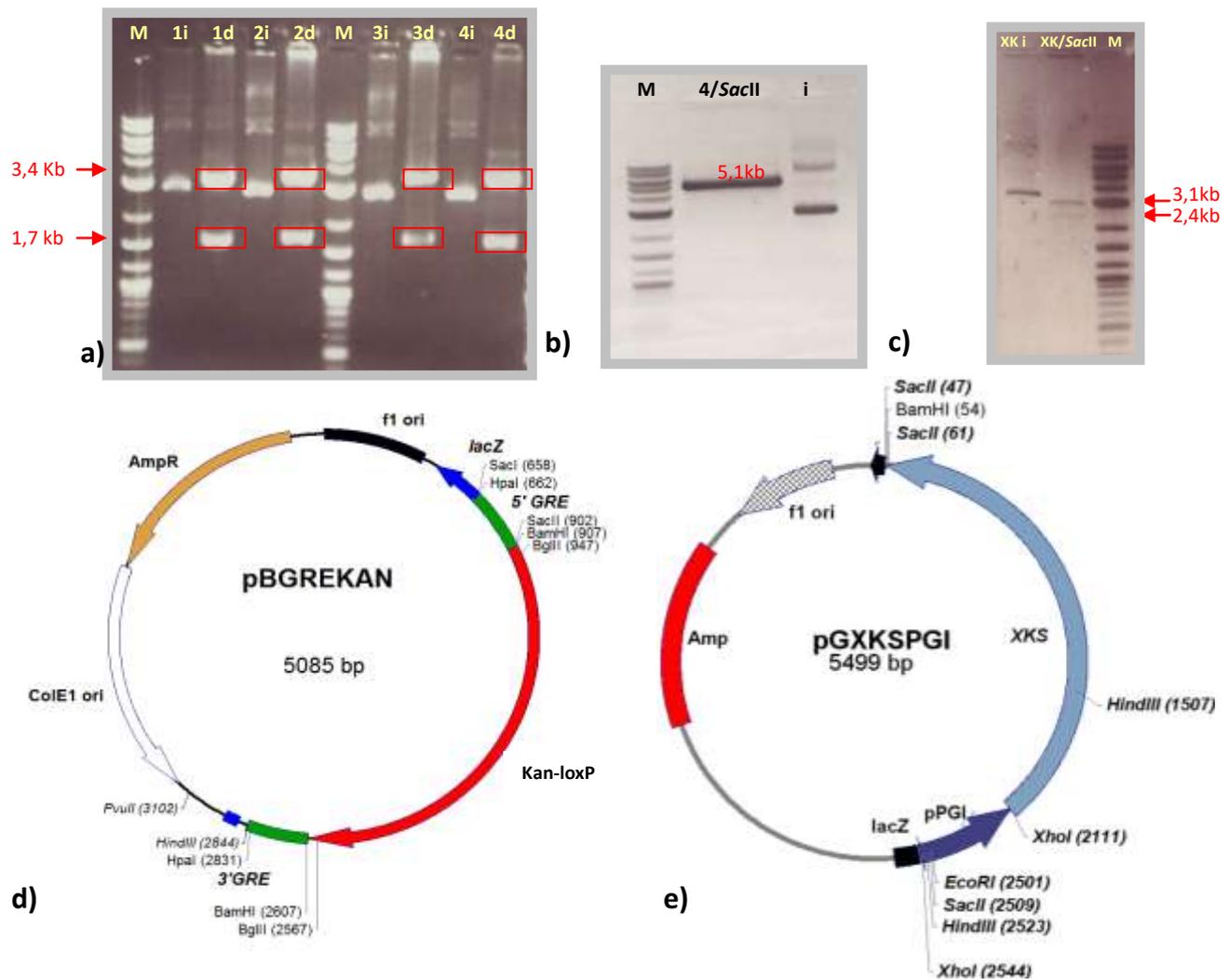


Figura 25: Análise de restrição do vetor pBGREKAN nos clones 1-4 e do vetor pGXKSPGI. a) clones pBGREKAN digeridos com *Bam*HI: 1i: clone 1 plasmídeo intacto, 1d: clone 1 digerido, 2i: clone 2, plasmídeo intacto, 2d: clone 2 digerido, 3i: clone 3, plasmídeo intacto, 3d: clone 3 digerido, 4i: clone 4, plasmídeo intacto, 4d: clone 4 digerido. b) vetor pBGREKAN clone 4 linearizado com *Sac*II, i: intacto, 4/*Sac*II: digerido c) vetor pGXKSPGI digerido com *Sac*II, XK i: vetor integro, XK/*Sac*II: digerido. d) mapa do vetor pBGREKAN e) Mapa do vetor pGXKSPGI. M: marcador 2-Log ladder.

Resultados e Discussões

Foram realizadas várias reações de ligação, variando a proporção de vetor:inserto, desde 1:2 até 1:10, seguidas de transformação de *E. coli* e seleção em canamicina ou zeocina, de acordo com a marca presente no vetor. Poucos clones (0 a 17) foram obtidos nas transformações e nenhum clone continha o inserto (cassete de expressão XK).

Alternativamente, foi desenvolvida estratégia para construção do cassete de deleção GRE3::XKkan-loxP diretamente na levedura (figura 26). De acordo com o descrito por Gibson (2009), *S. cerevisiae* é capaz de ligar um genoma inteiro de *Mycoplasma* por recombinação homóloga, bastando entre os fragmentos conterem entre 20-40 pb de sobreposição, com maior sucesso com fragmentos de 80 pb de sobreposição. Com base neste trabalho, foi desenhada a estratégia descrita na figura 27, a partir de regiões de 100pb de sobreposição.

Primeiramente, foi determinada a orientação da marca Kan-loxP no vetor pBGREKAN, por PCR com os pares de *primers* GREF1 e o ZeoblasR3. Como houve amplificação do fragmento de 1,9 Kb, foi possível confirmar por PCR a orientação no sentido horário (figura 26).

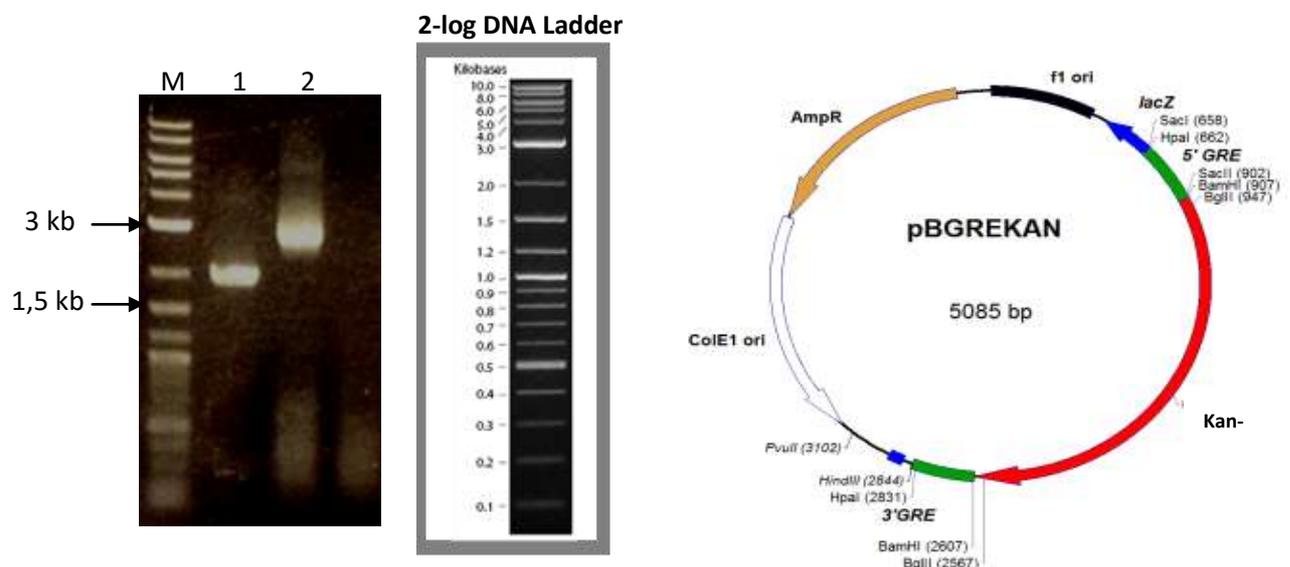


Figura 26: Produtos de PCR 5'GRE3KanloxP e XK3'GRE3. 1: fragmento contendo a região 5'GRE e o cassete Kan-loxP (5'GRE3KanloxP); 2: cassete XK flanqueado por 100bp 3'kan-loxP e 100bp 3'GRE3 (XK3'GRE3). M: marcador molecular 2-log DNA ladder. Eletroforese em gel de agarose 0,8%.

Resultados e Discussões

Para a construção do cassete de deleção GRE3::XKkan-loxP diretamente na levedura, com o mesmo conjunto de *primers* (GREF1 e o ZeoblasR3), amplificou-se por PCR o fragmento contendo a região 5'GRE e o cassete Kan-loxP a partir do vetor pBGREKAN (figura 26). Foram desenhados os seguintes *primers* para a recombinação homóloga:

KPGI-F (5'tgaaaaccttgcttgagaagggtttgggacgctcgaaggctttaattgcaagctagatctataacttcgtataatgtatgctatacgaagttatggatccgaggtcgacggtatcgataagcttg) e XKG3-R (5'taccgttaacgttgaaatggaagctgtattaatatcccgatagatatccggttactcaaagtattttgggaccgcttgctctcttggttctattttaggccgcgggattggatccg). Estes *primers* permitem a amplificação do cassete da XK do vetor pGXKSPGI adicionando, na posição 5' do cassete, 100 pb de homologia com a região terminal da sequência de Kan-loxP, e na posição 3' do cassete da XK, mais 100 nucleotídeos homólogos à região terminal do gene *GRE3* (figura 28). Desta forma, a levedura foi transformada com os dois fragmentos amplificados por PCR, os quais esperava-se que, por recombinação homóloga, se uniriam e integrariam no *locus GRE3*, conforme esquematizado na figura 27. Assim, ocorreria a interrupção do *GRE3* com a inserção dos cassetes da XK e kan-loxP.

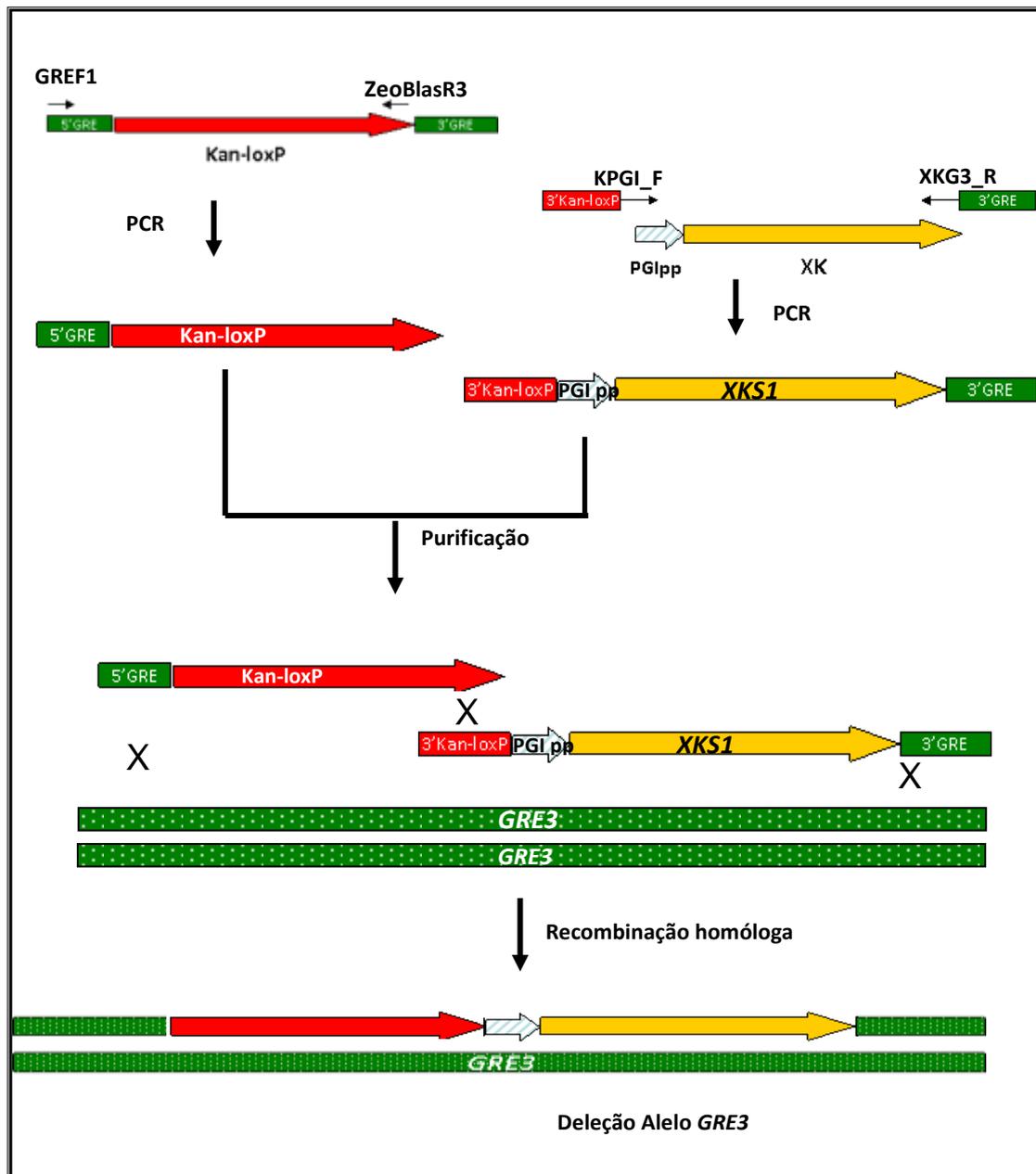


Figura 27: Representação esquemática da estratégia para deleção do *locus GRE3* e integração do cassette *XK* por recombinação homóloga dos produtos de PCR na levedura.

Os dois produtos de PCR gerados a partir da estratégia apresentada na figura 27 foram purificados para remoção das enzimas e do template com kit *Wizard® SV Gel and PCR Clean-up System* (Promega), e reunidos na proporção equimolar 1:1 para um total de 1 a 10 µg de DNA usados em cada transformação. A transformação foi realizada com a linhagem selvagem JP1 e esperava-se, após a confirmação e remoção da marca de

Resultados e Discussões

seleção, integrar a xilose isomerase novamente e realizar a seleção diretamente sobre o crescimento em xilose.

Após várias tentativas de transformação da levedura selvagem JP1, alterando-se quantidade total de DNA usado na transformação e aumentando-se o tempo de incubação a 42°C para 1 hora, foram obtidos alguns clones com capacidade de crescer na presença de G418.

O gene *GRE3* encontra-se em duas cópias no genoma da Levedura, uma vez que a linhagem JP1 é diploide (Reis, 2012). De forma a obter clones de JP1 com as duas cópias deletadas, os clones obtidos foram crescidos em concentrações crescentes do antibiótico G418, assim como descrito anteriormente para XI, seguindo-se a remoção da marca de seleção. Dez clones foram selecionados para extração do DNA genômico pelo kit *Wizard® Genomic DNA purification* (Promega) e avaliados quanto à integração por PCR. Foram realizadas reações de PCR com os *primers* GREFF e GRERR, que se anelam na extremidade do gene *GRE3*, região externa a região usada para a recombinação homóloga.

Dos 10 clones selecionados, dois apresentaram integração dupla (nos dois alelos do gene *GRE3*). Na figura 28, observa-se o resultado do PCR para 2 clones obtidos e a linhagem selvagem JP1. A reação com o DNA genômico do clone JPXK38 apresentou um produto de PCR para o *GRE3* de tamanho equivalente ao gene íntegro (~1,7 kb), mesma banda observada para JP1, e outra de tamanho maior, aonde ocorreu a integração. Enquanto, para o clone JPXK26 observa-se uma única banda de mesmo tamanho da banda superior de JPXK38, indicando a integração nas duas cópias do gene. O clone JPXK26 teve o cassete *kan-loxP* removido do genoma, conforme realizado anteriormente para os clones JPXI, dando origem ao clone JPXK26.24. Observa-se na figura 28, que após a remoção da marca de seleção (clone JPXK26.24), há uma redução de tamanho do fragmento amplificado para os dois alelos de *GRE3*. Porém, os tamanhos não condizem com a integração da XK. Esperava-se um aumento de tamanho do fragmento amplificado para aproximadamente 5,3 kb com a integração dos cassetes da XK e de *Kan-loxP* no *locus GRE3*, e um fragmento de 3,2 kb após a excisão da marca de seleção, o que não foi observado. Logo, a integração observada provavelmente

Resultados e Discussões

corresponde a integração a partir de uma possível contaminação com o plasmídeo pBGREKAN usado como molde na reação de PCR, uma vez que o tamanho esperado com a entrada só do cassette kan-loxP seria de aproximadamente 2,5 kb. Ao final, foi obtido o clone JPXK26.24, que apresenta os dois alelos do gene *GRE3* deletado, porém sem a integração da xiluloquinase nem da xilose isomerase. Este clone, denominado a partir de então JPΔGRE, pode ser útil para futuros estudos com expressão epissomal da xilose isomerase, de forma a evitar a inibição da mesma por xilitol.

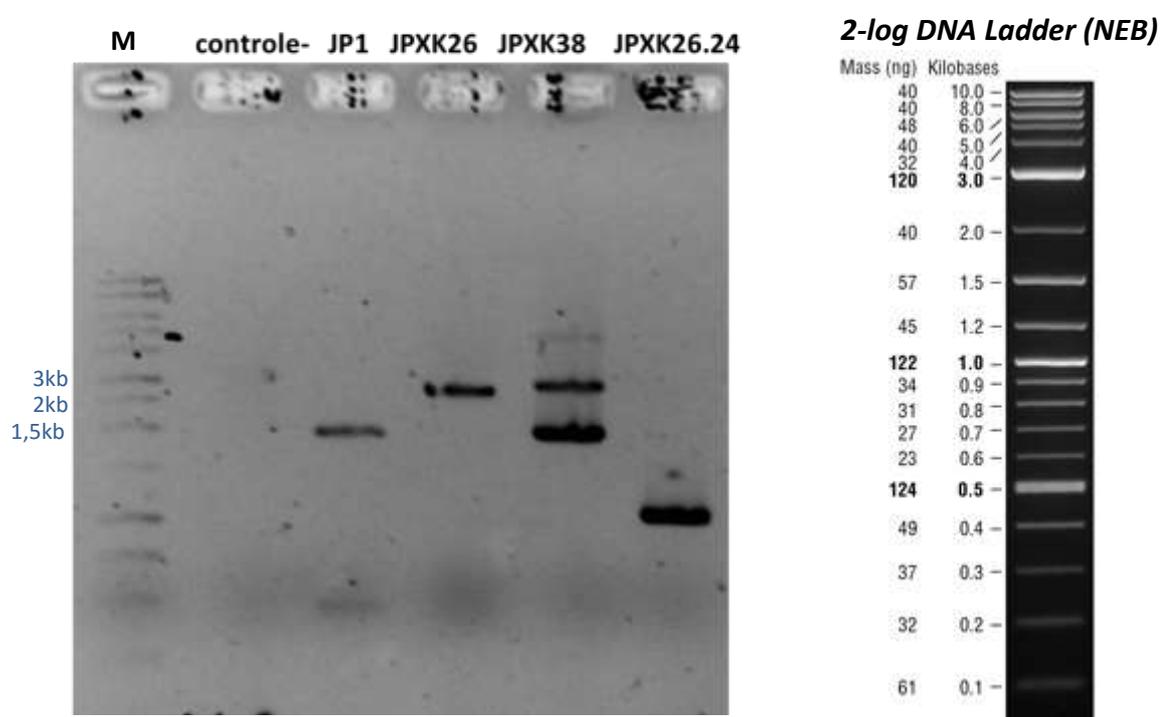


Figura 28: PCR do gene *GRE3* genômico de JP1 selvagem, clones JPXK26, JPXK38 e JPXK26.24. Marcador 2-log DNA Ladder (NEB). Reações de PCR usando o par de *primers* GREFF e GRERR.

Foram realizadas novas tentativas de integração usando ambos os fragmentos isolados do gel, para evitar a presença mesmo que residual do DNA molde. E nenhum clone foi obtido.

Após o insucesso na estratégia alternativa testada, buscou-se uma terceira estratégia para construção do plasmídeo pBGREXKAN a partir da recombinação *in vitro* e transformação de *E. coli* XL 10 gold.

Resultados e Discussões

Para amplificar o cassete de expressão da XK, foi feita uma reação de PCR contendo o par de *primers* GREXKF e GREXKR (contendo cada um 15pb de homologia ao vetor pGXKSPGI) e o vetor pGXKSPGI como molde (figura 25).

O produto de PCR de aproximadamente 2,5 Kb (Figura 29, poço 1) foi purificado e ligado ao vetor de integração pBGREKAN, previamente digerido com a enzima de restrição *SacII* (Figura 25). O sistema de ligação foi feito pelo método de *In-fusion*, conforme instruções do fabricante (*In-Fusion® HD Cloning Kit*, Clontech).

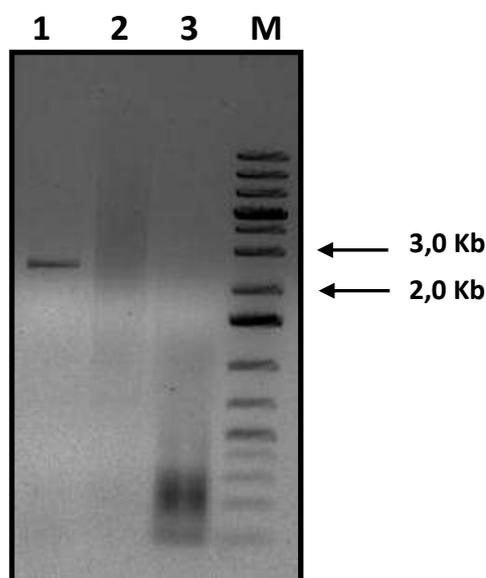


Figura 29. Análise do produto de PCR para o cassete de expressão da XK. 1) fragmento correspondente ao cassete contendo o promotor *PGI*, o gene da enzima xiluloquinase (*XKS1*) e a região terminadora do gene *XKS1*. 2) controle negativo (reação contendo como molde o vetor pBGREKAN. 3) controle negativo (reação sem DNA molde). M) marcador de massa molecular O'gene Ruler 1 Kb plus.

Bactérias da linhagem XL-10 Gold foram transformadas com o sistema de ligação contendo o vetor pBGREKAN e o inserto cassete da XK, e posteriormente semeadas em meio LB sólido com canamicina. Vários clones foram selecionados aleatoriamente para avaliar se houve ligação no vetor de integração. Para isso, reações de PCR de colônia foram feitas utilizando o par de *primers* GREF1 e GRER2,

Resultados e Discussões

os quais se anelam nas extremidades mais externa da região *GRE3* presente no vetor (5'GRE e 3'GRE). O tamanho do produto de PCR esperado é de aproximadamente 4,6 kb, o qual pode ser observado na figura 30 (poço 6).

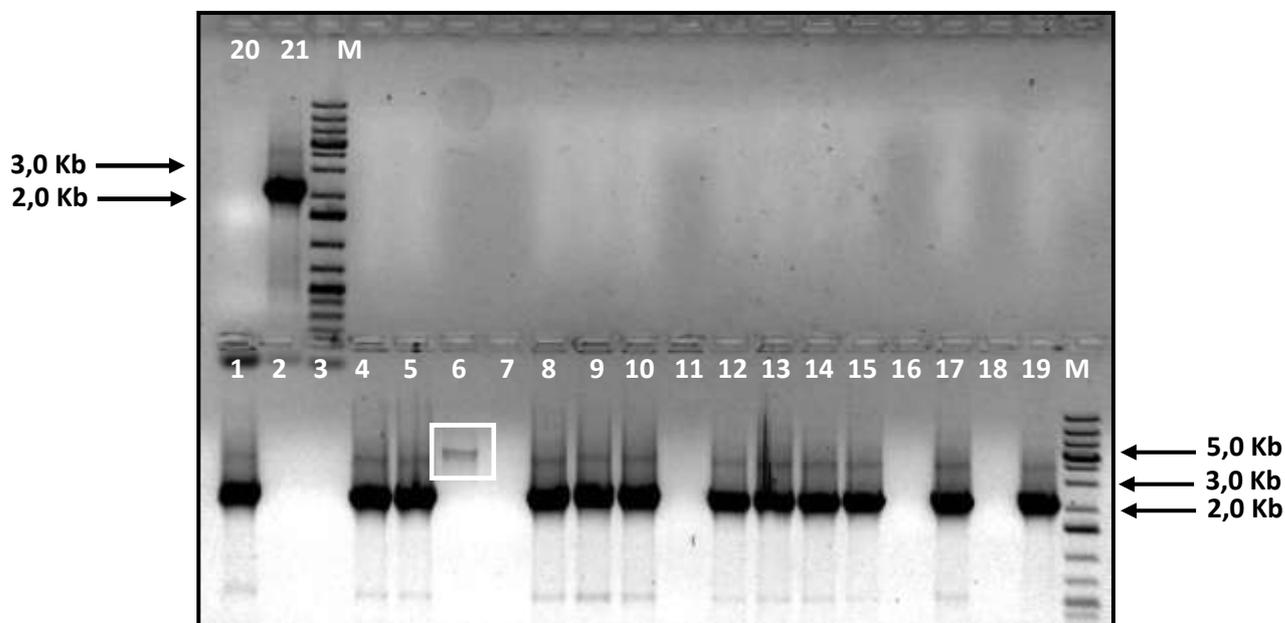


Figura 30: Análise de PCR de colônia dos clones obtidos da transformação com o sistema de ligação pBGREKAN/PGIXKS. Poços 1 a 21) clones obtidos na transformação. M) marcador de massa molecular O'gene Ruler 1 Kb plus.

Em adição à PCR, sistemas de digestões foram feitos para confirmar o perfil de restrição da construção obtida. A colônia correspondente ao clone 6 (poço 6, figura 30) foi inoculada em 5 mL de meio LB contendo canamicina, crescida por 20 horas a 37°C para a extração de DNA plasmidial (*Wizard® Plus Minipreps DNA Purification System*, Promega). Após a purificação do vetor, o mesmo foi digerido com as enzimas *SacII* e *HpaI* separadamente. Os tamanhos aproximados esperados após a digestão com a enzima *SacII* são de 2,5 kb e 5,0 kb (Figura 31A, poço 2) e com a enzima *HpaI* são de 4,6 Kb e 2,9 kb (Figura 31B, poço 2).

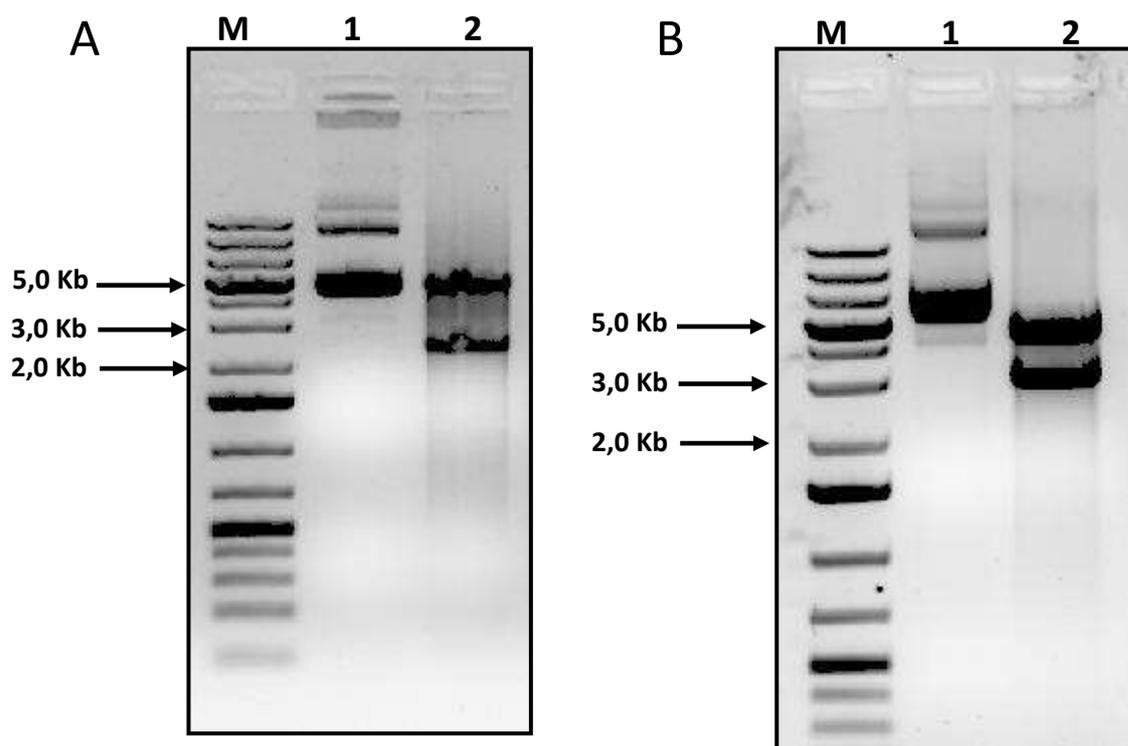


Figura 31. Análise do perfil de restrição da construção pBGREXKKAN. 1) vetor pBGREXKKAN intacto. 2) pBGREXKKAN digerido com SacII (A) ou HpaI (B). M) marcador de massa molecular O'gene Ruler 1 Kb plus.

Integração o gene da XK e deleção de *GRE3*

Após a confirmação dos perfis de restrições de pBGREXKKAN (figura 31), 30 μ g do vetor foram digeridos com a enzima HpaI, e utilizados para transformar a linhagem de *S. cerevisiae* JPXI. As células foram recuperadas por 3 horas em meio YPD líquido a 30°C e posteriormente semeadas em meio YPD-ágar contendo 300 μ g/mL de G418 e novamente incubadas a 30°C por 72 horas.

Foram obtidos cinco clones após a transformação. Os mesmos foram repicados para uma nova placa em meio YPD-ágar contendo 300 μ g/mL de G418, confirmando sua capacidade de crescer após 48 horas em uma alta concentração do antibiótico, podendo indicar uma possível integração nos dois alelos do *GRE3*. Esses clones foram inoculados em 1 mL de YPD e incubados a 30°C por 24 horas e o DNA total de cada clone foi isolado

Resultados e Discussões

e quantificado. Reações de PCR contendo 10 ng de DNA total e diferentes combinações de *primers* iniciadores foram feitas para a confirmação da integração do cassete GRE3::XKkan-loxP no *locus GRE3* (Figura 32). As combinações de *primers* e tamanhos esperados dos produtos de PCR estão descritos na tabela 9 abaixo.

Tabela 9. Descrição dos pares de *primers* utilizados e os tamanhos dos produtos de PCR esperados.

Pares de <i>primers</i>	Tamanho do produto de PCR esperado
GREFF x GRERR	~ 5,4 Kb
GRERR x ZeoF	~ 2,0 Kb
GREF1 x ZeoR	~ 4,4 Kb
XKR x ZeoR	~ 4,2 Kb

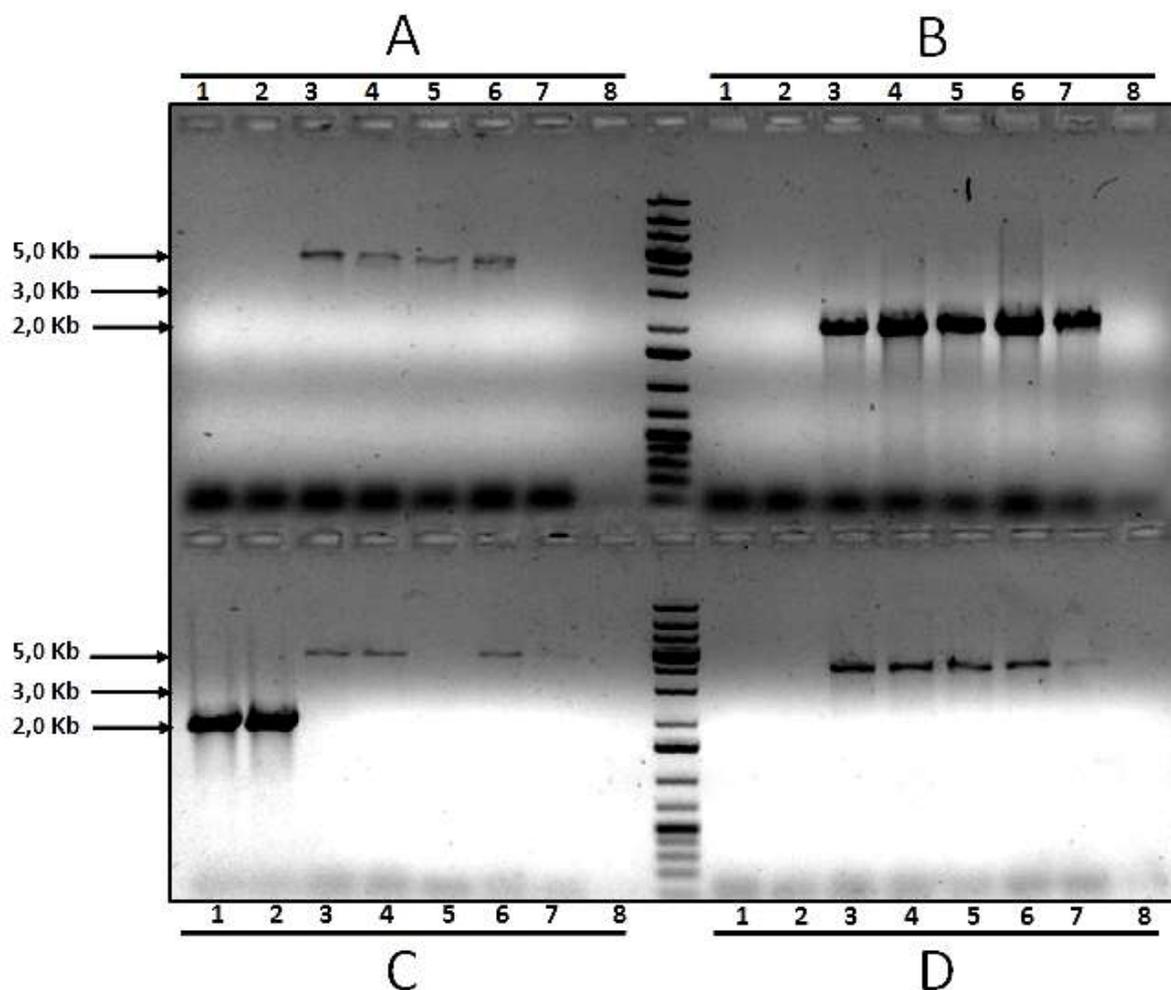


Figura 32: Confirmação da integração do cassete GREXKKAN no locus *GRE3* por reações de PCR. As reações foram feitas usando os pares de *primers* GREF1 e ZeoR (A), GRERR e ZeoF (B), GREFF e GRERR (C) e XKR e ZeoR (D). Foram usados como moldes DNA totais dos clones JPX13.16 (poços 1), JP1 (poços 2), clones 1 a 5 (poços 3 a 7) e reações sem DNA molde como controles negativos (poços 8).

Com base no resultado da figura 32, o clone 1 (poço 3) foi selecionado, uma vez que aparentemente ocorreu integração nos dois alelos de *GRE3* com uma única banda amplificada de 4,6 kb correspondente ao *GRE3* interrompido (figura 32C).

Para a remoção da marca Kan-loxP, o clone 1 foi transformado com o vetor pYRCre pelo protocolo de transformação rápida.

Após a indução da recombinase Cre, foram selecionadas colônias com capacidade de crescer em meio YPD-ágar sem antibiótico, mas incapazes de crescer em meio YPD-ágar com 200 µg/mL G418 (clones sem marca Kan-loxP da integração) e 200 µg/mL higromicina B (clones sem o vetor pYRCre), indicando a perda do vetor replicativo

Resultados e Discussões

e a remoção da marca de resistência a G418 do genoma de *S. cerevisiae* (figura 33). O clone JPXIXK1.1.2, denominado a partir de então JPXIXK1, foi selecionado para iniciar etapa de adaptação metabólica em meio contendo xilose como única fonte de carbono.

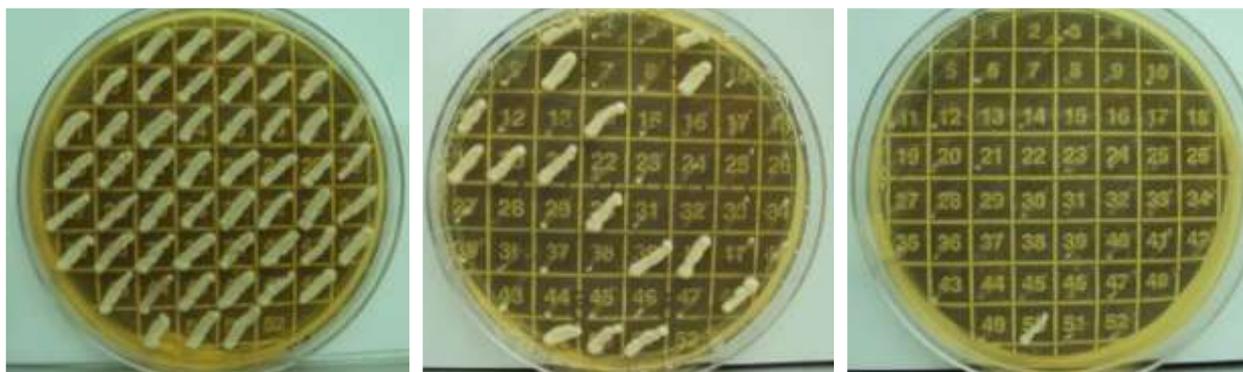


Figura 33: Crescimento dos transformantes após a indução da recombinase Cre em meio YPD, com e sem G418 ou higromicina B. A) YPD sem antibiótico; B) YPD com 200 µg/mL de G418; C) YPD com 200 µg/mL de higromicina B. 1 a 49= clones JPXIXK1.1.1 a JPXIXK1.1.49; 50= controle clone JPXIXKKANCRE (resistente a G418 e a higromicina); B) 51= JPXIXKKAN (resistente a G418).

Ao final da etapa de construção genética, a levedura JPXIXK1 possui o gene da XI integrado em regiões δ espalhadas no genoma da levedura, o gene da XK em duas cópias extras integradas no genoma no locus *GRE3* (*GRE3::XK*) e conseqüentemente, os dois alelos do gene *GRE3* interrompidos. Na figura 34a, observa-se o fragmento de 1,7 kb correspondente ao gene *GRE3* integro tanto no poço JP1 e quanto para JPXI13.16 (DNA genômico de JP1 selvagem e do clone JPXI13.16 usados como molde, respectivamente). Já para o clone JPXIXKKAN (resistente a G418), houve a amplificação de um fragmento de aproximadamente 5,3 kb, correspondendo a inserção do cassete de deleção *GRE3::XK-kan-LoxP*. Para o clone JPXIXK1 observa-se um produto de PCR de aproximadamente 3,2 kb, confirmando a excisão do cassete de resistência *kan-loxP*. De forma complementar, na figura 34b, observa-se a confirmação por PCR da presença da XI nos clones JPXI13.16 e JPXIXK1 (tamanho esperado 1,3 kb), da XK no locus *GRE3* apenas em JPXIXK1 (tamanho esperado 3,2 kb). Confirmou-se a orientação do cassete da XK no sentido invertido em relação ao gene *GRE3*, a partir da amplificação usando os primers GREFF (que se anela à região 5' de *GRE3*) e o XKF (que se anela à região 5' de *XKS1*) gerando um fragmento amplificado de 2,8 kb observado para JPXIXK1 (figura 34c e 32d).

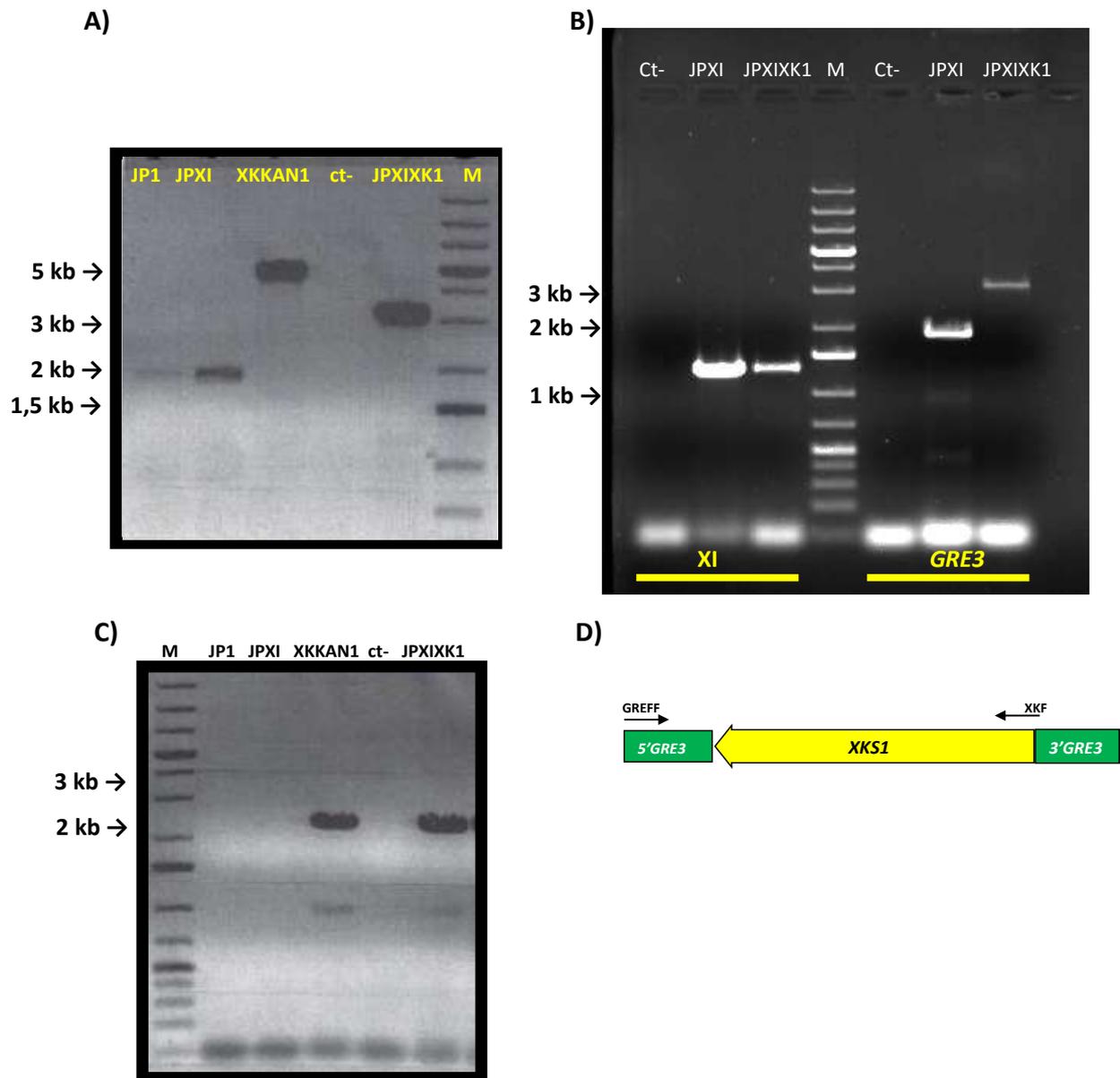


Figura 34: Confirmação por reações de PCR da integração da XK, da XI e remoção da marca kan. **A)** reações foram feitas usando os pares de *primers* GREFF e GRERR. Foram usados como molde o DNA genômico dos clones JPX13.16 (JPXI), JP1, JPXIXKAN (XKKAN, clone 1 antes da remoção da marca de seleção), controle negativo (ct-, sem DNA molde) e JPXIXK1 (clone selecionado após a remoção da marca de seleção). **B)** reações de PCR com par de *primers* XIF e XIR (XI, poços a direita do marcador) e reações usando os pares de *primers* GREFF e GRERR. Foram usados como molde o DNA total dos clones JPX13.16 (JPXI) e JPXIXK1 e controle negativo (Ct-, sem DNA molde). **C)** confirmação da orientação do cassete da XK, PCR com os *primers* GREFF e XKF, DNA dos mesmos clones usados em A. **D)** representação esquemática da orientação do cassete no locus *GRE3* de JPXIXK1 M) marcador molecular O'gene Ruler 1 Kb plus. Eletroforese em gel de agarose 1%.

O clone JPXIXK1 foi preservado em glicerol 25% em freezer a -80°C , e uma alíquota foi usada para dar início a etapa de adaptação metabólica. A cada repique

novos estoques foram preservados, correspondendo as populações JPXIXK2, JPXIXK3 e assim por diante. Sempre que necessário, uma alíquota do repique anterior foi descongelada e crescida diretamente em meio líquido YPDX0,5 (glicose 0,5%, xilose 1%, extrato de levedura 1% e peptona 2%), para dar sequência a etapa de adaptação.

5.1.3 Adaptação Metabólica

Inicialmente buscou-se realizar a adaptação metabólica a partir de repiques sucessivos em meio mínimo (YNB) com 2% de xilose, como única fonte de carbono, conforme realizado por Reis (2012) para a linhagem derivada de JP1 com a expressão episomal da via para xilose, e outros trabalhos similares (Kuyper, 2005; Zhou, 2012; Lee, 2014; Klimack, 2014; Qi *et al.*, 2015; Apel, 2016). Foi observada uma taxa de crescimento (μ) de $0,009 \text{ h}^{-1}$ para o primeiro repique de JPXIXK1, valor similar ao μ de 0,008 encontrado por Reis (2012) para a linhagem com expressão episomal dos mesmos genes. O crescimento inicial foi muito lento, levando mais de uma semana para atingir densidade ótica (OD) próxima a 1, o que favoreceu o aparecimento de contaminações microbianas reincidentes ao longo da adaptação. Com base em trabalhos recentes que obtiveram sucesso na adaptação metabólica usando meio rico (YPX), inclusive com variação da concentração de açúcares (Demeke, 2012; Diao, 2013; Hector *et al.*, 2013; Kim *et al.* 2013; Parreiras *et al.* 2014), a adaptação metabólica foi reiniciada a partir do crescimento em meio YPX, com concentrações de xilose de 10 a 50 g/L.

Apesar do indiscutível papel da adaptação metabólica em melhorar fenótipos desejáveis pelo crescimento em meios seletivos, não existem métodos padronizados para processos de adaptação. Cada trabalho usa um número de ciclos de repiques, ou número de gerações, tamanho do inóculo, fase de crescimento para o repique e além de condições de crescimento diferentes (aeróbico, anaeróbico, semianaeróbico, em batelada, reator de crescimento contínuo). O trabalho de Lee *et al.* (2014) demonstrou que a fase de crescimento usada na adaptação influencia a velocidade e o tempo em

adaptação para selecionar as características desejadas, sendo mais vantajoso manter os crescimentos sempre na fase exponencial, com transferência de um inóculo baixo para o crescimento seguinte (0,5% do volume). Com o intuito de realizar as transferências ainda na fase exponencial, no presente trabalho, os crescimentos foram iniciados com uma OD de aproximadamente 0,2 com crescimento na faixa de 1,0 a 2,5 de OD. Na figura 35, observa-se o processo de adaptação realizado ao longo de 62 dias (30 repiques sucessivos). Durante o processo foram exploradas diferentes condições de pressão seletiva, de forma a evitar que a adaptação em condição constante leve a mutações com perda de funções que são importantes em resposta a flutuações ambientais (Kvitek & Sherlock, 2013). As alterações nas condições também poderiam possibilitar a seleção de outras características que em conjunto melhorariam o desempenho da levedura para a fermentação de xilose. No início da adaptação, foi usado o meio YPX (2% xilose) em frascos tipo Erlenmeyer de 250mL com volume de 50mL de forma a garantir condição aeróbica, de forma a selecionar por uma metabolização mais rápida da xilose. Nesta primeira fase, o μ da população passou de $0,09 \text{ h}^{-1}$ (em YPX) para $0,14 \text{ h}^{-1}$ em 13 repiques, comparável as taxas de crescimento relatadas por Kuyper *et al.* (2005a), Diao *et al.* (2013), e Zhou *et al.* (2012a), que estão entre as melhores já relatadas ($0,12 \text{ h}^{-1}$, $0,187 \text{ h}^{-1}$ e $0,20 \text{ h}^{-1}$, respectivamente). Em seguida, utilizou-se um meio YPX com 1% de xilose. Com esta concentração baixa de xilose, o transporte de xilose para dentro da célula pode ser limitante, uma vez que a afinidade por xilose dos transportadores de glicose é baixa (Runquist *et al.*, 2010, Hamacher, 2002). Esperava-se com esta pressão seletiva favorecer na população leveduras que tenham alguma vantagem em relação a internalização de xilose. E em seguida um meio YPX com 5% de xilose, para garantir que a população não tenha perdido a capacidade de crescer em alta concentração de xilose. As concentrações usadas na adaptação tentaram cobrir as faixas de açúcares que se espera ter durante a fermentação do hidrolisado lignocelulósico. Após 19 repiques aeróbicos, iniciou-se uma etapa de adaptação anaeróbica (em YPX), uma vez que a adaptação aeróbica poderia não ser suficiente para a obtenção de leveduras com boa capacidade fermentativa (Reis, 2012; Klimack, 2014). Por fim, a população foi submetida ao crescimento anaeróbico em meio mínimo (YNB) com 5% de xilose, para que ao final da adaptação fosse capaz de

Resultados e Discussões

crescer mais rapidamente em meio mínimo, característica observada nos dois últimos crescimentos apresentados na figura 35 (crescimento aeróbico em meio mínimo). A taxa de crescimento em meio mínimo que era de $0,009 \text{ h}^{-1}$ para JPXIXK1 no início da adaptação, ao final do processo de adaptação metabólica passou a $0,10 \text{ h}^{-1}$ na população.

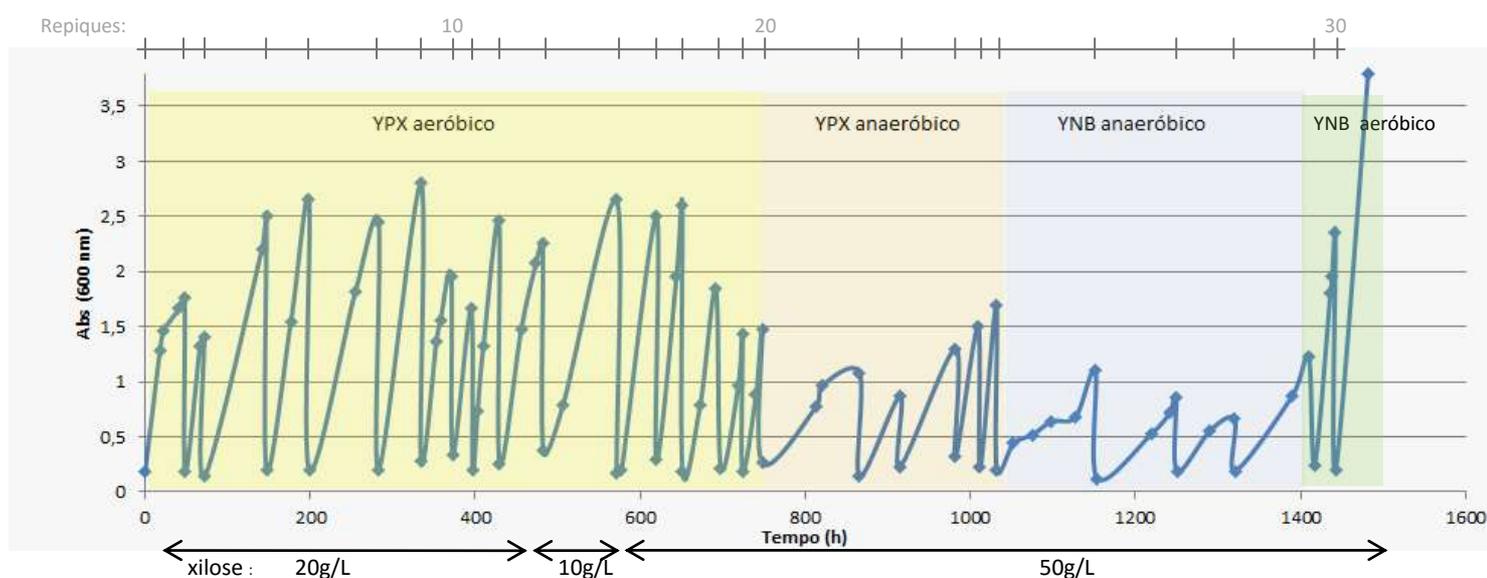


Figura 35: Adaptação metabólica através de repiques sucessivos ao longo do tempo. O gráfico apresenta de forma linear a absorvância a 600 nm do meio de cultura ao longo do crescimento da população em adaptação, cada queda de Absorbância no gráfico corresponde a um novo repique. Variações na composição do meio e condição de aeração estão destacadas no gráfico.

Ao longo do processo adaptativo, foi avaliado o consumo de xilose em alguns pontos, permitindo o crescimento até a fase estacionária, após a transferência. No repique 11, por exemplo, foi comprovado que a população apesar de crescer em um meio rico, usava a xilose como principal fonte de carbono. Houve o consumo de $7,32 \text{ g/L}$ de xilose e foram gerados $3,6 \text{ g/L}$ de biomassa, fechando o balanço de carbono em $98,4\%$. Na fase anaeróbica, no repique 26, foi observada a formação de $5,8 \text{ g/L}$ de etanol no meio, confirmando que a população era capaz de fermentar xilose a etanol.

Resultados e Discussões

Ao final do processo adaptativo a população foi semeada em YPX-ágar, para isolamento dos clones com crescimento superior. Paralelamente também foram semeadas placas com meio mínimo com xilose 2%. A figura 36 mostra o primeiro clone selecionado, e observa-se variação no crescimento na população existente. O primeiro clone isolado foi nomeado JPXIXK30.1, e foi usado em comparação com a linhagem JPXIXK1 original quanto ao crescimento em YPX (figura 37). Nota-se que pela curva de crescimento gerada no Epoch 2 Microplate Spectrophotometer, com medidas a cada 30 min, é possível evidenciar a mudança no perfil de crescimento em YPX. Apesar de uma fase *lag* mais longa de JPXIXK30.1, para a fase exponencial observa-se uma taxa de crescimento superior da linhagem adaptada, com um μ calculado de $0,27 \text{ h}^{-1}$.

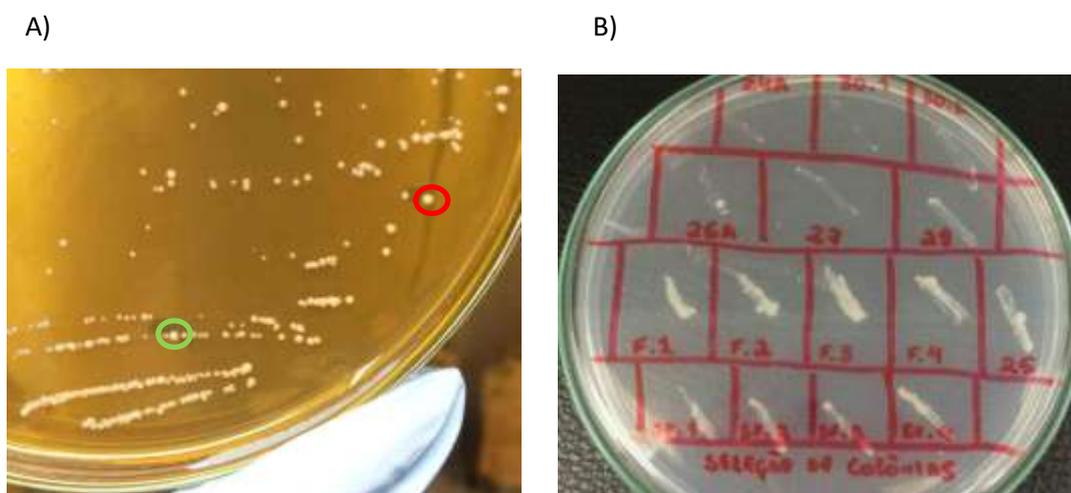


Figura 36: placa de seleção e isolamento dos clones adaptados. Clones com crescimento mais rápido em YPX (A) e crescimento em meio mínimo com xilose (B), como única fonte de carbono. Destacado em vermelho o clone JPXIXK30.1, e em verde JPXIXK30.2.

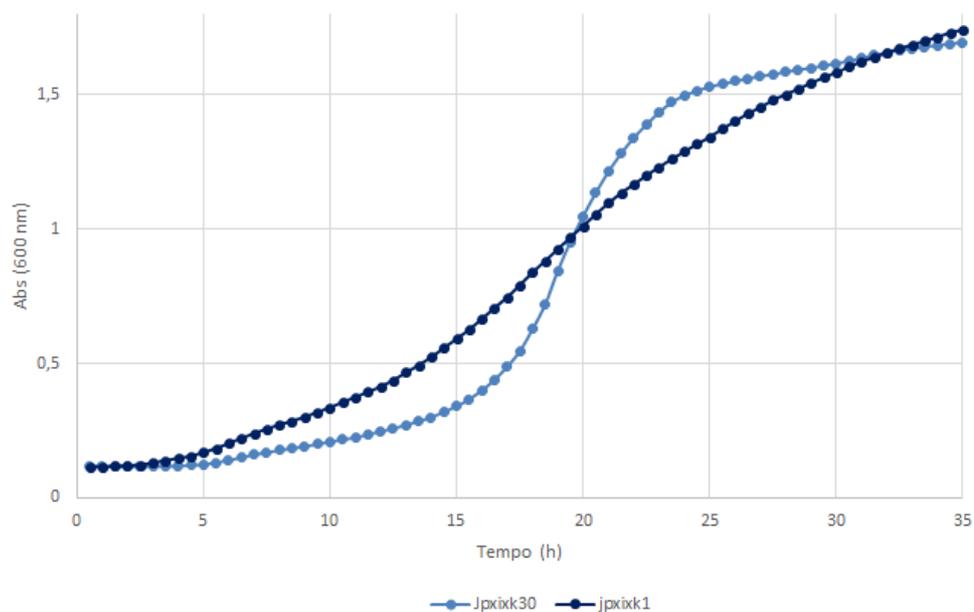


Figura 37: Comparação do perfil de crescimento das linhagens JPXIXK1 e JPXIXK30.1 em meio YPX. Curva de crescimento realizada em placa de 12 poços com volume final de 2mL a 30°C. Leituras de absorbância a 600 nm foram feitas no Epoch 2 Microplate Spectrophotometer a cada 30min. Ensaio em triplicata.

Dois clones que cresceram mais rapidamente em xilose na placa de seleção em YPX (JPXIXK30.1 e JPXIXK30.2), foram semeados em placas com meio mínimo com 2% xilose, assim como mais alguns clones promissores que cresceram diretamente nas placas de meio mínimo com xilose (figura 36b).

Com base na comprovada melhora na capacidade de crescimento em xilose da linhagem adaptada, foi realizado um PCR em tempo real (qRT-PCR) de forma a avaliar de maneira absoluta o número de cópias integradas do gene da XI, uma vez que a integração pode ter ocorrido em múltiplas cópias no genoma. Na figura 38, é apresentado o resultado do número de cópias amplificadas nas reações de qRT-PCR para cada linhagem testada tanto do gene *URA3* (um controle endógeno), quanto para o gene *XYLA* (gene da XI), para a mesma amostra. Pela relação do número de cópias

Resultados e Discussões

obtidas para cada gene, pode-se estimar o número de genes da XI integrados, já que *URA3* se encontra em duas cópias no genoma de JP1 e demais cepas derivadas, uma vez que é diploide (Reis, 2012). Esta comparação só foi possível, pois a curva padrão para os dois genes (Figura 38) apresentaram eficiência próximo a 1, os tamanhos dos fragmentos amplificados são similares, e as amplificações das amostras estavam na mesma faixa da curva padrão. Entretanto, a amplificação para duas amostras, JPXIXK30.1 e JPXI13.10, ficou próxima ao ponto mais baixo da curva padrão, com um desvio grande entre as triplicatas da mesma amostra, logo, não é possível afirmar que os valores superiores de cópias do gene da XI em relação a *URA3* são realmente diferentes (p -valor $>0,05$, teste *t de student*). Por outro lado, para as demais amostras as diferenças observadas foram significativas ($p < 0,05$, teste *t de student*), e as médias foram representativas. Observa-se que JPXI13.16 apresenta 3 cópias do gene da XI integradas no genoma, enquanto a linhagem JPXIXK1, derivada de JPXI13.16 (com integração da *XKS* e posterior remoção das marcas de seleção) apresenta 1 cópia do gene, observada pela amplificação quase duas vezes superior para o gene *URA3* (figura 38). Logo, houve perda de genes da XI nesta linhagem. No processo de remoção de marcas de seleção pelo sistema cre-lox, pode ter ocorrido recombinação de sítios loxP cicatriciais próximos (Solis-Escalante *et al.*, 2015), ou ainda pela recombinação de regiões Ty de integrações próximas. O baixo número de cópias da XI corrobora com o crescimento lento de JPXIXK1 em meio mínimo com xilose como única fonte de carbono. Entretanto, a linhagem adaptada JPXIXK30.2 apresenta aproximadamente 2 cópias do gene da XI integradas, o que significa que houve uma duplicação deste gene durante o processo de adaptação.

Resultados e Discussões

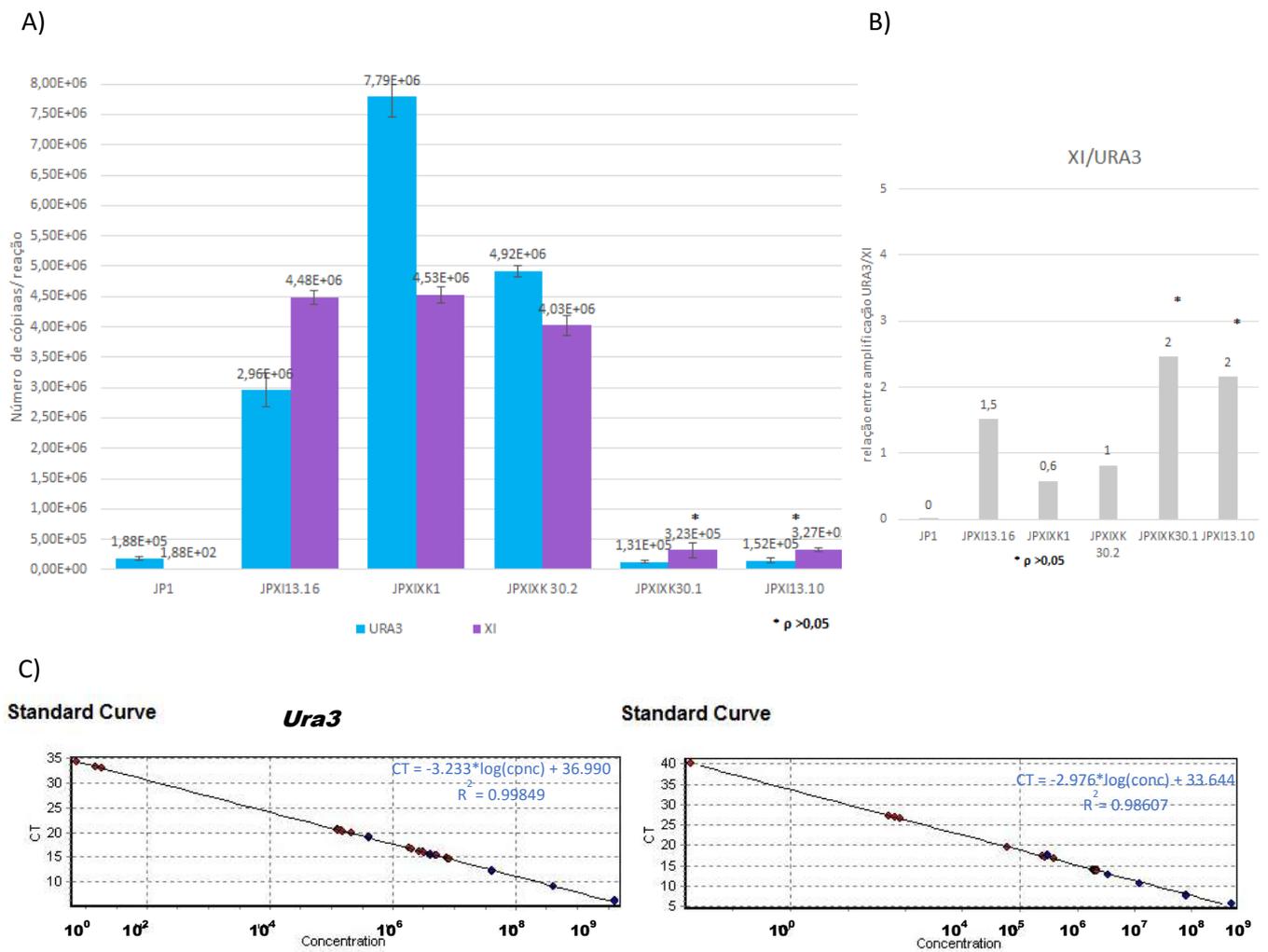


Figura 38: Real time PCR para quantificação absoluta do número de cópias integrada do gene da XI. A) Número de cópias amplificadas por reação para cada amostra. B) Relação da amplificação do gene da XI pela amplificação para *URA3* para cada amostra. C) curva padrão obtida para cada gene, pontos da curva em azul e pontos em vermelho correspondendo às amostras.

A duplicação gênica é o mecanismo mais frequentemente usado na evolução, principalmente quando o aumento do gene leva a vantagens adaptativas em pressão seletiva (Ames, 2010). Song *et al.* (2014), mostraram que as duplicações e deleções não são randômicas e existem “sítios frágeis” no genoma de *S. cerevisiae*. Sítios como os elementos Ty, que estão flanqueando o cassete da XI no presente trabalho, são sítios preferenciais para quebra e recombinação em *S. cerevisiae*, tanto para deleção quanto para duplicação (Song, 2014). Demeke *et al.* (2015) observaram duplicações em tandem de genes que codificam a XI (no caso deste estudo *CpXylA*) como consequência da

Resultados e Discussões

adaptação metabólica em xilose de uma linhagem industrial na qual os genes para metabolização de xilose foram integrados no genoma da levedura, mesmo em regiões sem elementos repetitivos. Neste trabalho, um novo mecanismo envolvendo DNA circular extracromossomal (eccDNA) com sequências de replicação autônomas (ARS) foi descrito, sendo capaz de mediar a integração de cópias extras do cassete da XI em tandem no *locus* da cópia original, na levedura adaptada. A duplicação do gene da XI parece prover vantagens adaptativas para o crescimento em xilose, sendo também observado por outro estudo de Zhou *et al.* (2012), identificando a duplicação da XI como o principal evento de recombinação durante a evolução. No caso de JPXIXK30.2, a presença dos elementos Ty flanqueando o cassete da XI pode ter favorecido esta duplicação, e é possível inclusive que outros clones ainda não avaliados quanto ao número de integrações, possam apresentar um número maior.

Ao longo do processo adaptativo, as células foram avaliadas periodicamente quanto a possíveis variações morfológicas, de forma a avaliar também a existência de células com brotamentos e características parentais típicas do crescimento em fase exponencial. Conforme observado na figura 39, imagem do último crescimento do processo adaptativo, as células apresentam morfologia condizente com a linhagem JP1, linhagem que tem como característica formar pequenos agregados com múltiplos brotamentos (observação pessoal). Ao longo do processo, foi observado de forma pontual o aparecimento, tanto de algumas poucas células com volume maior, quanto células com aspecto bacilar, ainda que de forma esporádica (menos de 5% das células). Reis (2012) também observou durante a adaptação a presença de células com formato bacilar, que voltam ao formato típico de *S. cerevisiae* em meio rico, correspondendo provavelmente a uma resposta a estresse.



Figura 39: Aspecto morfológico do crescimento final do processo adaptativo. Meio mínimo (YNB) com 5% de xilose. Microscopia ótica, aumento de 1000X.

5.1.5 Estudo da capacidade Fermentativa em meio com xilose

A primeira avaliação da capacidade fermentativa em anaerobiose foi realizada ainda ao longo da adaptação, para avaliar a capacidade geral da população em fermentar xilose. Para tal, foi realizado um crescimento de inóculo em YPX, diretamente do repique 21 (5 mL do meio crescido, para amostrar boa parte da diversidade). A Fermentação foi realizada em batelada em reator de 1L com ($V_f=800$ mL) de meio rico (YP) adicionado de aproximadamente 55 g/L de xilose e 20 g/L de glicose (figura 40a). Esta concentração de açúcares simula a corrente rica em C5 gerada no processo de etanol 2G da Petrobras. Observa-se já nesta etapa que a população é capaz de fermentar xilose com rendimento ($Y_{\text{etanol/xilose}}$) de 0,40 g/g, 78% do rendimento teórico (0,51 g/g, McMillan, 1993). Apesar de baixa produtividade de etanol da xilose ($Q=0,06$ g/l/h⁻¹, nas primeiras 48 h, considerando etanol produzido após extinção da glicose), quase toda xilose consumida foi sendo convertida majoritariamente a etanol, o que é um ótimo resultado, considerando que a população ainda estava em etapa de adaptação. O cálculo do balanço de carbono, considerando o consumo de 18 g/L de glicose, 14,5 g/L de xilose e produção de 13,3 g/L de etanol, 3 g/L de biomassa, além da formação de xilitol, glicerol e ácido acético (0,83 g/L, 1,43 g/L e 0,55 g/L,

Resultados e Discussões

respectivamente) fechou em 99,4%, o que significa que todos os componentes principais foram analisados. Outra observação determinante para continuidade do processo adaptativo, manutenção da rápida capacidade de fermentar glicose, característica parental.

Os dois primeiros clones selecionados ao final da adaptação foram avaliados quanto a capacidade fermentativa (JPXIXK30.1, JPXIXK30.2) nas mesmas condições citadas acima, e em meio apenas com xilose. Os perfis cinéticos da fermentação são apresentados na figura 40. Ao contrário do esperado, os perfis foram muito similares ao reportado para a população, sem uma aparente melhora nos rendimentos ou produtividade em relação ao perfil da população ainda no início da adaptação anaeróbica. Nota-se apenas que para o clone JPXIXK30.2, não houve formação de xilitol, enquanto para JPXIXK30.1 a produção de xilitol ficou entre 0,8 e 1,2 g/L. Outra observação é que a presença da glicose no meio levou a um consumo maior da xilose ao longo do processo, o que pode ser justificado tanto pelo aumento na biomassa inicial nas primeiras 8 horas, quanto pela indução dos transportadores de açúcares na presença de glicose.

Resultados e Discussões

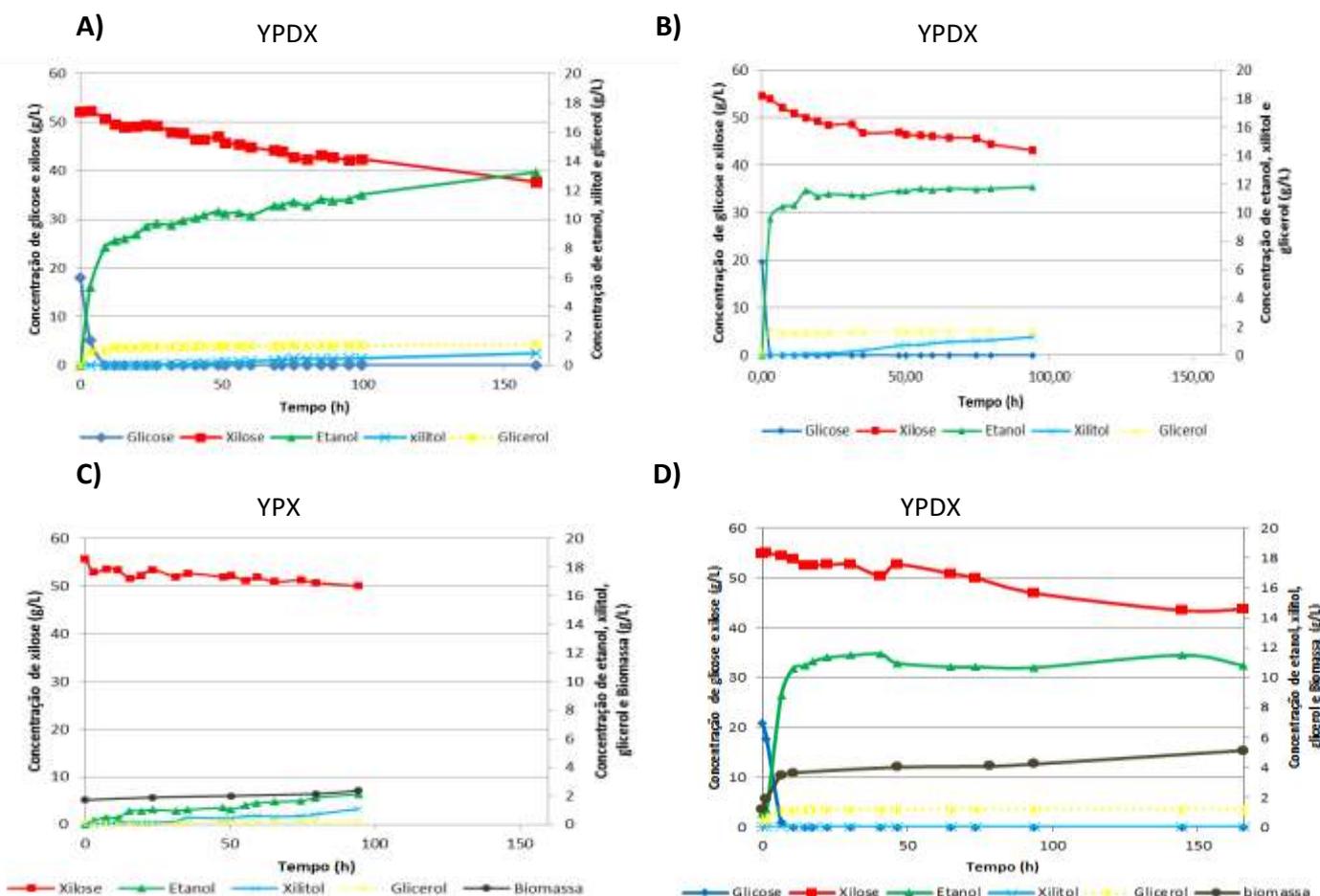


Figura 40: Cinética da fermentação anaeróbica em meio sintético em Reator instrumentado de 1L. Meio YPDX 5,5% xilose e 2% glicose e meio YPX 5,5% xilose, volume final=800mL, Inóculo inicial de 1,6g/L de células, pH=6,0. A) população JPXIXK21 em YPDX; B) clone recombinante adaptado JPXIXK30.1 em YPDX; C) clone recombinante adaptado JPXIXK30.1 em YPX; D) clone recombinante adaptado JPXIXK30.2 em YPDX.

Frente a baixa melhora na capacidade fermentativa observada para estes dois primeiros clones, foi selecionado um terceiro clone JPXIXK.F1, que foi selecionado com base no seu crescimento comparativo em placa em meio mínimo com 5% xilose. Esta segunda seleção visou buscar clones que teriam melhorado a capacidade de crescer em meio mínimo, que foi a última etapa da adaptação metabólica. Nota-se na figura 36b, que o crescimento em placa (YNB + 5% xilose) do clone JPXIXK.F1 foi superior ao de JPXIXK30.1 e 30.2 (que foram crescer com mais tempo), e similar a outros clones também promissores selecionados em meio mínimo, que poderão ser testados futuramente.

Resultados e Discussões

Na figura 41, observa-se o perfil cinético da fermentação do hidrolisado lignocelulósico de bagaço de cana por JPXIXK.F1. Este hidrolisado foi obtido na planta piloto do CENPES (Petrobras), de acordo com o procedimento padrão da empresa (informação interna da empresa). Seguindo-se da etapa de sacarificação (hidrólise enzimática com celulases) sem separação da corrente rica em xilose, com posterior remoção dos sólidos residuais do processo de sacarificação por centrifugação. Esse hidrolisado rico em açúcares C6 e C5 (aproximadamente 6,5% e 5%, respectivamente) e com baixo teor de sólidos foi usado diretamente na fermentação, sem suplementação com nutrientes, correspondendo a um processo de SCF (figura 1). O hidrolisado otimizado pelo CENPES (Petrobras) apresenta concentração alta de ácido acético (aproximadamente 5g/L), porém baixa concentração dos demais inibidores da fermentação, 5-HMF e furfural (0,008 g/L e 0,019 g/L, respectivamente) quando comparado ao obtido em outros processos (tabela 10). Porém os ácidos fracos são os inibidores que parecem ser mais críticos para a eficiência dos processos fermentativos com leveduras para etanol de segunda geração (Bellissimi *et al.*, 2009; Zhao *et al.*, 2016). O ácido acético presente no meio, afeta o metabolismo das leveduras ao acidificar o meio intracelular, uma vez que na forma ácida, o mesmo passa facilmente através da membrana celular (Tanaka *et al.*, 2012).

O acetato é hoje reconhecido como um dos principais inibidores gerados na desconstrução da biomassa lignocelulósica, uma vez que os processos de pré-tratamento já foram ajustados para reduzir a degradação de açúcares a furaldeídos (Furfural e 5-HMF). Por outro lado, a liberação do acetato está intrinsecamente relacionada à melhora na capacidade de desconstrução da biomassa, objetivo final do processo, uma vez que é componente da hemicelulose presente na cana de açúcar.

Resultados e Discussões

Tabela 10: Concentração de inibidores em diferentes hidrolisados lignocelulósicos descritos na literatura: (Adaptado de Zhao *et al.*, 2016)

Substrato	pré-tratamento	Principais inibidores (g/L)			Referências
		ácido acético	Furfural	5-HMF	
Corn stover	Ácido sulfúrico diluído	4,3	6,7	1,2	Qin et al. (2012)
Corn stover	Steam-explosion	3,3	0,15	n.d	Lu et al. (2010)
Corn stover	Steam-explosion	1,7	2,2	0,44	Du et al. (2010)
palha de arroz	Sulfato diluído	1,5	0,13	0,05	Silva et al. (2010)
palha de trigo	NaOH diluído	3,59	n.d	n.d	Toquero and Bolado (2014)
Spruce (conífera)	Pré-tratamento por sulfito	n.d	0,3	0,15	Zhu et al. (2009)
coqueiro-de-dendê	Hidrotermico	6,4	3,3	0,3	Zakaria et al. (2016)
Spruce (conífera)	Steam explosion catalisado SO ₂	4,79	1,09	1,57	Demeke et al. (2013a)
palha de trigo e feno (50/50)	NaOH diluído	0,7	n.d	n.d	Demeke et al. (2013a)
Arundo donax	Steam-explosion	6,8	0,32	0,4	Demeke et al. (2013a)
Spruce (conífera)	Ácido sulfúrico diluído	6,3	1,1	3,4	Koppram et al. (2012)

* n.d: não detectado

Conforme observado na figura 41, a linhagem JPXIXK.F1 foi capaz de fermentar o hidrolisado, com eficiência superior as outras linhagens testadas anteriormente em meio rico. Houve consumo de 64 g/L de glicose, 40 g/L de xilose e obteve-se uma concentração final de etanol de 46 g/L e baixa formação de xilitol $\leq 0,15$. A glicose é consumida logo nas primeiras 16 horas do processo, enquanto a xilose teve seu consumo gradual até atingir concentrações próximas a 10 g/L no meio, restando uma concentração residual deste açúcar ao final da fermentação.

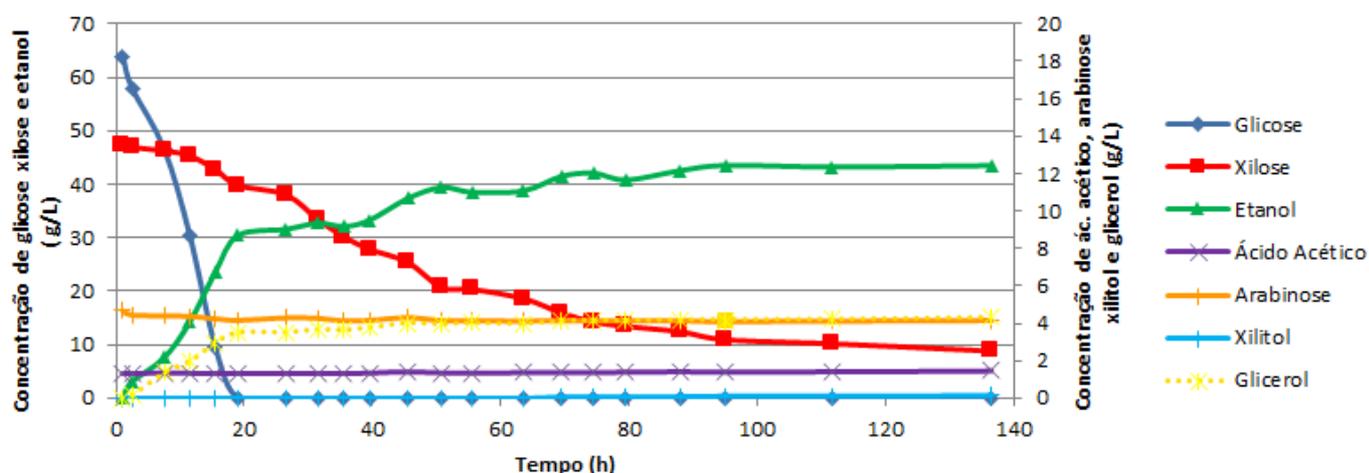


Figura 41: Cinética da fermentação anaeróbica do hidrolisado lignocelulósico pela linhagem JPXIXK.F1 em reator instrumentado de 1L. Fermentação anaeróbica do hidrolisado de bagaço de cana em reator instrumentado Bio Flo110 (New Brunswick) de 1L, Volume final de 800 mL, sem adição de nutrientes. Inóculo inicial de 1,6 g/L de células, crescido em YPX. pH=6,0.

Resultados e Discussões

Apesar do consumo sequencial dos açúcares, foram atingidas taxas de conversão altas para a xilose, com rendimento de 0,48 g etanol/g de xilose consumida, considerando apenas fase após a completa depleção da glicose. Este valor é o maior reportado na literatura para conversão de xilose a etanol, chegando próximo do valor teórico 0,51 g/g (McMillan, 1993), ainda mais quando consideramos a conversão de açúcares presentes em hidrolisados (tabela 11). Foram atingidos valores de produtividade em 48 horas de 0,8 g/L/h e produtividade específica de 0,5 g/g peso seco/h, no mesmo período, com taxa de consumo de xilose de 0,30 g/g peso seco/h até as 96 horas de processo.

A baixa produção de xilitol observada no processo, quando comparada a alta concentração de xilitol produzida pela linhagem JP1 com a mesma via expressa em vetor episomal (6 a 7 g/L no meio) (Reis, 2012), suporta a estratégia escolhida de deleção do *GRE3*, e indica que aldose redutase codificada por este gene era a principal responsável pelo desvio da via da xilose para formação de xilitol.

Na tabela 11, estão apresentados os melhores resultados obtidos pelas leveduras recombinantes reportadas até então, com a via da XI, tanto para hidrolisados quanto para meio sintético. Nota-se que JPXIXK.F1, permanece entre os melhores senão o melhor resultado em termo de concentração final de etanol e conversão de xilose do hidrolisado, principalmente se considerar a concentração de xilose presente no meio em relação a glicose, o total de xilose convertida a etanol e a concentração de inibidores do hidrolisado. A titulação final de etanol (46 g/L) em hidrolisado só é comparável ao trabalho de Diao *et al.* (2013) e Demeke *et al.* (2013), entretanto, há uma diferença de escala considerável com o primeiro trabalho, uma vez que a fermentação foi em volume de 30 mL, e no caso da levedura GS1.11-26, ela só foi capaz de fermentar a xilose do hidrolisado com baixa concentração de ácido acético. Outro aspecto relevante, foi a ausência de suplementação do hidrolisado no presente trabalho, enquanto na fermentação realizada por Demeke *et al.* (2013), houve suplementação com 1% extrato de levedura e 2% peptona.

Resultados e Discussões

Atingir concentrações de etanol superiores a 4%, de forma a reduzir o gasto energético envolvido na destilação, é um dos gargalos encontrados pelas fermentações para etanol de segunda geração, tanto pelos processos apresentarem hidrolisados diluídos em açúcares, quanto pela própria capacidade cofermentativa das linhagens em utilizar a fração rica em xilose (Gerbrandt *et al.*, 2016). A fermentação com JPXIXK.F1 conseguiu obter concentrações de etanol no meio, condizentes com os requerimentos necessários a destilação industrial deste meio fermentado.

Resultados e Discussões

Tabela 11: Desempenho de leveduras *S. cerevisiae* recombinantes com a via da XI em fermentações anaeróbicas em hidrolisado lignocelulósicos e meios sintéticos

Linhagem	Características	Tipo de Hidrolisado	Açúcares iniciais (g/L)		Conc. Final (g/L) etanol	Rendimento etanol (g/g)	Produtividade g/L/h	Taxa de consumo de xilose (g/g ⁻¹ h ⁻¹)	Produtividade específica etanol (g/g ⁻¹ h ⁻¹)	Referência	Obs
			glicose	xilose							
JPXIXK30.F1	<i>xyIA/Δgre3/XKS1</i> / evoluida	bagaço de cana, pré-tratamento ácido diluído	64	47	46,3	0,48 (xilose) 0,44 (mix)	0,8 (48h)	0,3 (96h)	0,5 (48h)	Presente trabalho	
SXA-R2P-E	* <i>xyIA 3/TAL1/XKS1/Δgre3/Δpho1 3/</i> evoluida	Palha de arroz, pré-tratamento ácido diluído carvalho, pré-tratamento ácido diluído	27,7	20,2	20,7	0,46	0,38(48h)			Ko <i>et al.</i> , 2016	alta [C] celular OD=20
GS1.11-26	<i>xyIA/XKS1/TAL1/TKL1/RPE1/RKI1/HXT7/AraT/AraA/AraB/AraD/TAL2/TKL2/</i> evoluida	Palha de trigo e feno, pré-tratamento alcalino spruce (conífera), steam-explosion catalizado (SO ₂)	68,2	28,2	45,1 ²	0,48	2,86	1,17(24h)		Demeke <i>et al.</i> , 2013a	¹ não houve considerável crescimento de etanol pelo consumo da xilose. ² suplementado com YP(1% extrato de levedura e 2% peptona)
GLBRCY 128	<i>xyIA/XYL3/TAL1/</i> evolved	corn stover, pré-tratamento AFEX	60	30	30	0,39	0,75(40h)	0,18	0,37 (40h)	Parreiras <i>et al.</i> , 2014	
CIBTS0735	<i>xyIA/XKS1/TAL1/TKL1/RPE1/RKI1/Δarg1/Δgre3/GXF1/</i> evoluida	corn stover, pré-tratamento não relatado	82,3	46,7	51,8	0,36 (xilose) 0,40 (mix)	0,43 (120h) 0,94 (48h)	0,04(120h) 0,05 (48h)	0,05 (120h) 0,12 (48h)	Diao <i>et al.</i> , 2013	em frasco (30mL)
Meio sintético		Condições									
CEN.PK-RWB217	<i>xyIA/TAL/XKS/RK1/RPE/TKL/Δgre3</i>	Batelada anaeróbica em reator, meio sintético, mix de açúcares	20	20	17	0,43					
CEN.PK-RWB218	<i>xyIA/TAL/XKS/RK1/RPE/TKL/Δgre3</i> / evoluida	Batelada anaeróbica em reator, meio sintético	20	20	15,7	0,4					
CEN.PK-RWB218	<i>xyIA, XKS1, TKL1, RPE1, RKI1, Δgre3,</i> evoluida (70 dias)	Batelada anaeróbica em reator, meio sintético	100	25	47,1	0,38				Kuyper <i>et al.</i> , 2005b	
SXA-R2P-E	<i>xyIA*3, tal1, XKS1, Δgre3, Δpho13</i> Evoluida (24 dias)	Batelada anaeróbica em reator, meio sintético		40	16,2	0,45		0,98	0,44	Lee <i>et al.</i> , 2014	
H131-A3-CS	<i>xyIA, xyI3, TAL1, TKL1, RPE1, RKI1,</i> evoluida (160 dias)	Batelada anaeróbica em reator, meio sintético		40		0,43		0,94	0,4	Zhou <i>et al.</i> , 2012	
H131-A3-ALCS	<i>xyIA, xyI3, TAL1, TKL1, RPE1, RKI1,</i> evoluida (160 dias)	Batelada anaeróbica em reator, meio sintético		40		0,41		1,87	0,77		
CIBTS0735	<i>xyIA/XKS1/TAL1/TKL1/RPE1/RKI1/Δarg1/Δgre3/GXF1/</i> evoluida	Batelada anaeróbica em frasco (30mL), YPX Batelada anaeróbica em frasco (30mL), YPDX		40	17,5	0,44		2,5	1,09	Diao <i>et al.</i> , 2013	
			80	40	53,3	0,44		5	2,22		

*em cinza, valores estimados pelo gráfico. Taxa de consumo específico de xilose e produtividade específica = (g/g⁻¹ peso seco células h⁻¹)

Outro aspecto interessante é a persistência ao longo da adaptação, de leveduras com diferentes fenótipos em relação a capacidade fermentativa de xilose. No processo de adaptação, foram criados ambientes de forma a selecionar clones com habilidade de crescer em anaerobiose e em meio mínimo, a exemplo de JPXIXK.F1. Entretanto, a dificuldade em realizar o isolamento dos clones em condições similares, pode levar ao isolamento de clones tolerantes às condições anteriores, porém mais adaptados a condições aeróbicas, como parece ser o caso de JPXIXK30.1 e JPXIXK30.2. Klimacek *et al.* (2014) comprovou que na população de leveduras adaptadas anaerobicamente, existiam indivíduos com diferentes taxas de crescimento específico, e que a seleção dos clones em meio anaeróbico pode reduzir o esforço amostral para obtenção do fenótipo selecionado.

No presente trabalho, não foram avaliados os demais clones que apresentaram fenótipo similar a JPXIXK.F1 no crescimento em meio mínimo, que podem eventualmente serem melhores do que JPXIXK.F1 na fermentação de xilose. Todas as colônias isoladas foram preservadas em freezer a -80°C , assim como o a população do último repique anaeróbico, que poderão ter a diversidade avaliada em trabalhos futuros. O presente trabalho também abre caminho para novos estudos quanto a avaliação das alterações genotípicas que levaram ao fenótipo diferenciado de JPXIXK.F1 em relação a linhagem parental, que poderá fornecer informações relevantes sobre o papel de novos genes no metabolismo de *S. cerevisiae*, importantes na fermentação de xilose.

A robustez da levedura JPXIXL30.F1, na fermentação de hidrolisado lignocelulósico, provavelmente deve-se ao background industrial desta linhagem. Nota-se na tabela 11 que esta linhagem se mostrou a mais tolerante a hidrolisados com alta concentração de ácido acético, mantendo a melhor taxa específica de consumo de xilose e rendimento de etanol, tanto considerando o rendimento relativo ao consumo da xilose quanto para o rendimento total (Ye/s, todos os açúcares). A linhagem JP1 foi comparada a outras linhagens industriais brasileiras e se mostrou a mais termotolerante entre as linhagens testadas (CAT-1, PE-2, BG-1 e levedura de panificação), com consequente maior produção de glicerol, biomassa e etanol quando crescida a 37°C

Resultados e Discussões

(Della-Bianca & Gombert, 2013). Nota-se na figura 42 que, logo no início do processo, foram gerados aproximadamente 4 g/L de glicerol, entretanto, na fase de consumo apenas da xilose não se observou considerável acréscimo de glicerol. As leveduras industriais apresentaram melhor desempenho que as de laboratório quanto à tolerância a altas concentrações de álcool e quanto ao estresse ácido. Esta última, foi a característica que mais as destacou em relação as leveduras de laboratório, indicando ser a pressão seletiva mais relevante no ambiente industrial (Della-Bianca & Gombert, 2013), que pode estar relacionada a tolerância ao ácido acético observada no presente trabalho. A termotolerância e resistência a variações de pH parecem características coerentes com a própria variação ambiental que historicamente esta levedura vem tolerando no processo de etanol de 1ª geração, ainda mais sendo isolada do Nordeste (Silva-Filho *et al.* 2005; Della-Bianca *et al.* 2013). Estas duas características, aliadas a robustez na tolerância aos inibidores presentes no hidrolisado, observada no presente trabalho, sugere um grande potencial de aplicação da linhagem JPXIXK.F1 em outras configurações de processo, como o SSCF (figura 1), no qual temperaturas mais elevadas são vantajosas ao processo.

Recentemente, PE-2 e CAT-1 foram modificadas para fermentação de xilose pela via da XR/XDH e testadas na fermentação de um hidrolisado de sabugo de milho (“corn cob”) sintético simulado, com 1,7 g/L de glicose, 30g/L de xilose, 2,6g/L de ácido acético 2.3 g/L, 1,2 g/L de furfural e 0,1 g/L de HMF (Romani *et al.*, 2015). Obtiveram produtividade de etanol de 0,16 g/l/h em condição microaeróbica, em 48 horas, atingindo a produção de 8,1 g/L de etanol e 4,6 g/L de xilitol. A linhagem recombinante de PE-2 foi melhor do que a derivada de CAT-1 no consumo de xilose. Essa linhagem industrial recombinante se mostrou também superior à linhagem de laboratório com a mesma construção. O que corrobora a importância do background das linhagens industriais na maior tolerância as condições estressantes, como a fermentação de hidrolisados lignocelulósicos. Entretanto, esta linhagem industrial derivada de PE-2, apresenta desempenho inferior à desenvolvida no presente trabalho, e produz grande quantidade de xilitol durante o processo, mesmo em condições de aeração favoráveis. Comparativamente, a linhagem JPXIXK.F1 se encontra numa etapa a frente em relação a possibilidade de aplicação industrial, uma vez que a mesma não apresenta marcas

dominantes de seleção e todas as construções foram integradas no genoma da levedura, ao passo que a expressão da via XR/XDH em PE-2 é episomal (Romani *et al.* 2015).

O resultado obtido com JPXIXK.F1, demonstrou a importância da evolução metabólica no ajuste do metabolismo de xilose para produção de etanol. E comprovou que a introdução apenas do gene da XI, com superexpressão da *XKS1* e deleção de *GRE3* aliadas à adaptação metabólica são suficientes para obtenção de uma linhagem industrial recombinante para eficiente fermentação de hidrolisados lignocelulósicos ricos em xilose.

Apesar do ótimo resultado em termos de rendimento e capacidade de conversão de xilose a etanol, observa-se ao final da fermentação um residual de xilose da ordem de 10g/L e uma desaceleração no consumo deste açúcar. Acredita-se que este perfil seja em função da limitação de transporte deste açúcar pelos transportadores inespecíficos de *S. cerevisiae* para este açúcar. A expressão de transportadores com maior afinidade por xilose pode vir a solucionar esse problema e talvez aumentar a produtividade, levando a um consumo mais rápido e integral da xilose presente no meio.

5.1 ESTUDO DE TRANSPORTADORES DE XILOSE

5.2.1 Construção dos vetores de expressão dos transportadores

A levedura *S. cerevisiae* possui 34 proteínas pertencentes a família de permeases de açúcares, sendo 18 delas transportadores de hexoses (Hxt1-17 e Gal2), dos quais Hxt1, hxt2, hxt4, hxt5, hxt7 se mostraram capazes de transportar xilose e recuperar o crescimento de leveduras nocaute para os transportadores de glicose, com vias de consumo de xilose introduzidas (Hamacher *et al.*, 2002; Saloheimo *et al.*, 2007). De forma similar, no presente trabalho se estudou o desenvolvimento de transportadores com diferentes capacidades de transportar xilose, com base no crescimento em meio com xilose. Os genes de transportadores de açúcar foram testados na levedura *S. cerevisiae* EBY.VW4000 (Wieczorke *et al.*, 1999), uma levedura nocaute para todos os transportadores de glicose da família *HXT* ($\Delta hxt1-17$) e *GAL2*, sendo incapaz de crescer em glicose. A levedura foi gentilmente cedida pelo Prof. Eckhard Boles da Universidade de Frankfurt. Esta levedura foi transformada, pelo protocolo de transformação rápida, com um vetor episomal contendo os cassetes da XI e da XK (Reis, 2012), que a torna capaz de crescer em xilose, uma vez que lhe seja reintroduzido um transportador capaz de transportar este açúcar para dentro da célula (levedura nomeada de EBYXI). Esta levedura permite a seleção e análise dos transportadores de xilose, com base na capacidade de crescimento da mesma em meio com xilose. Como controle, foi realizada a introdução do mesmo vetor episomal, porém sem os cassetes da XI e da XK, linhagem nomeada de EBY280, conferindo em ambos os casos resistência ao antibiótico G418.

Foram testados 3 transportadores da família *HXT* de *S. cerevisiae*, Hxt3 (baixa afinidade), Hxt5 (média afinidade) e Hxt7 (alta afinidade). Os mesmos foram amplificados do próprio DNA genômico de JP1, por PCR com a enzima taq polimerase de alta fidelidade e ligados ao vetor comercial pBlueScript® II SK (Stratagene) previamente digerido com EcoRV e clonados em *E.coli* XL10-gold (Figura 44a)

Resultados e Discussões

O alinhamento das sequências proteicas dos três transportadores, a partir da sequência obtida no *Genebank* para a levedura *S. cerevisiae* S288C (figura 42), mostra um alto grau de homologia entre as sequências, principalmente na região próxima ao resíduo T213 de Hxt7. Esta observação indica um possível efeito similar da substituição de T213V e seu equivalente homólogo nos demais transportadores. Para alteração do resíduo T213 (treonina) do Hxt7 pela valina (V), e do mesmo aminoácido nas suas posições correspondentes a esta região conservada nos outros 2 Hxts (figura 42), foram construídos *primers* mutagênicos para os 3 transportadores, com a substituição de 2 bases do códon para Treonina, levando a troca para o códon da valina, mantendo no mínimo 10 bases homóloga antes e depois da substituição, permitindo o anelamento dos *primers*.

```

1  MSQDA-----AIAEQTP-VEHLSAVDSASHSVLSTPSNK 33 P39004 HXT7_YEAST
1  MNSTP-----DLISPQKSSSENSNADLPSSSQVMNMPEEK 35 P32466 HXT3_YEAST
1  MSELENAHQGPLGEGSATVSTNSNSYNEKSGNSTAPGTAAGYNDNLAQAKPVSSY--ISHEG 58 P38695 HXT5_YEAST
   *.. : . : . :
34  AERDEIKAYGEGEEHEPVVEIPKRPASAYVTVSIMCINIIFGGFVFGWDTGTTISGFINQT 93 P39004 HXT7_YEAST
36  GVQDDFQ-----AEADQVLTNPNTGKGGAYVTVSICCVNVAFFGGFVFGWDTGTTISGFVAQT 90 P32466 HXT3_YEAST
59  PPKDELEEL----QKEVDKLEKKSDDLFFVSVCCLMVAFGGFVFGWDTGTTISGFVVRQT 114 P38695 HXT5_YEAST
   *: : : . : **: *: :*****: **
94  DFIRRFGMKHKDGTNYLSKVRTGLIVSIFNIGCAIGGIILSKLGDVGRKVGIVVVIY 153 P39004 HXT7_YEAST
91  DFLRRFGMKHKDGSYLSKVRTGLIVSIFNIGCAIGGIILAKLGDVGRKMGIVVVIY 150 P32466 HXT3_YEAST
115 DFIRRFGSTRANGTTYLSVVRTGLMVSIFNIGCAIGGIVLSKLGDMYGRKIGLMTVVIY 174 P38695 HXT5_YEAST
   **:**** .: :*: ***,*****:*****:*,*****:*, *****
154 IIGIIIQIASINKWYQYFIGRIISGLGVGGIIVLSPMLISEVSPKHLRGLTVSCYQLMIT 213 P39004 HXT7_YEAST
151 IIGIIIQIASINKWYQYFIGRIISGLGVGGIIVLSPMLISEVAPKEMRGLTVSCYQLMIT 210 P32466 HXT3_YEAST
175 SIGIIIQIASIDKWYQYFIGRIISGLGVGGITVLPMLISEVSPKQLRGLTVSCYQLMIT 234 P38695 HXT5_YEAST
   *****:*****:*****:*,*****:*,*:*****:*,*****:
214 AGIFLGYCTNFGTKNYSNSVQWRVPLGLCFAWALFMIGGMTFVPESPRYLAEVGKIEEAK 273 P39004 HXT7_YEAST
211 LGIFLGYCTNFGTKNYSNSVQWRVPLGLCFAWALFMIGGMTFVPESPRYLVEAGQIDEAR 270 P32466 HXT3_YEAST
235 FGIFLGYCTNFGTKNYSNSVQWRVPLGLCFAWSIFMIVGMTFVPESPRYLVEVGKIEEAK 294 P38695 HXT5_YEAST
   *****:*****:*****:*,*****:*,*:*****:*,*****:

```

Figura 42: Alinhamento da sequência proteica dos transportadores Hxt7, Hxt3 e Hxt5. Destacado em vermelho na sequência acima, o resíduo T213 do Hxt7 e região conservada equivalente de Hxt5 e Hxt3. Apresentado na figura apenas parte da sequência alinhada (resíduos 1 a 270, de aproximadamente 570 resíduos de aminoácidos da proteína completa). Alinhamento realizado com o programa *Uniprot*, com base na sequência depositada no *Genebank* para *S. cerevisiae* S288C.

Resultados e Discussões

Dando continuidade a construção dos vetores de expressão com os genes dos transportadores, os vetores (pBluescript II SK) com os genes dos transportadores foram digeridos com BamHI e NotI para *HXT3* e *HXT7*, e com BglII e NotI no caso de *HXT5* (sítios presentes nos *primers* usados na amplificação dos mesmos). Na figura 44a, observa-se a liberação do fragmento correspondendo a região codificadora de *HXT3* e o *HXT7* (ambos com aproximadamente 1,7 kb) e um fragmento de 2,9kb correspondendo ao vetor pBluescript II SK. Os fragmentos foram extraídos do gel e usados em ligação com o vetor Y2STEF, derivado do vetor YEP352, contendo a marca auxotrófica *URA3*, promotor *TEF1* da *S. cerevisiae* S288c, o terminador PGK e gene da eGFP (entre o promotor e o terminador) flaqueado pelos sítios BamHI e NotI (Paiva, 2016). O Vetor Y2STEF foi digerido com estas mesmas enzimas de forma a eliminar o fragmento correspondente a eGFP (700pb) (figura 44a), foi extraído do gel e usado na construção do vetor Y2STEF3, 5 e 7, conforme esquema apresentado na figura 43.

Resultados e Discussões

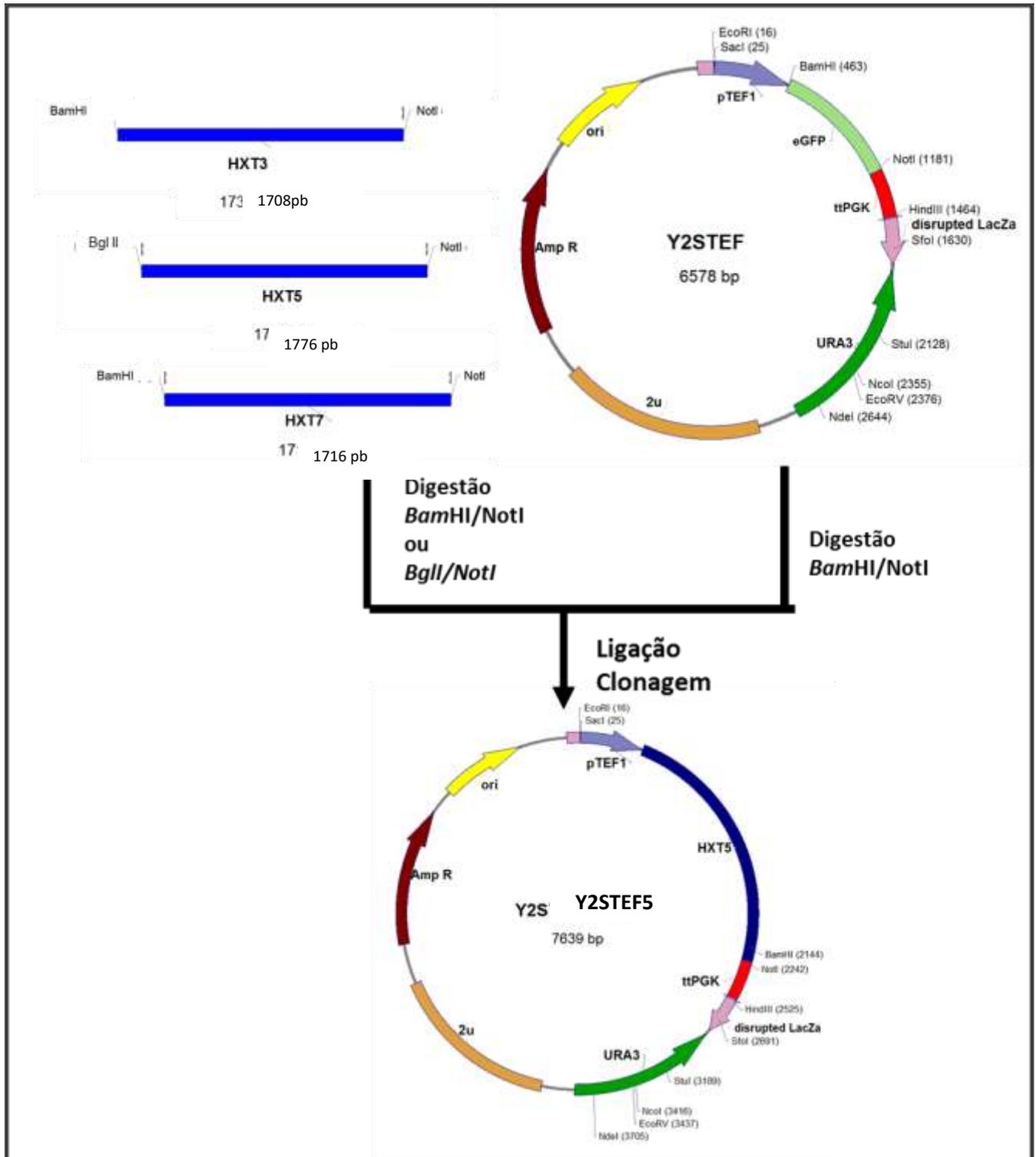


Figura 43: Representação esquemática da estratégia utilizada para construção dos vetores Y2STE5, Y2STE3 e Y2STE7.

Resultados e Discussões

Após inúmeras tentativas de ligação e clonagem dos genes do *HXT5*, *HXT3* e *HXT7* ao vetor Y2STEF, apenas clones com *HXT5* foram confirmados por digestão com EcoRI e HindIII, liberando o cassete *HXT5* de aproximadamente 2,5Kb (figura 44b). Recentemente, Farwick *et al.* (2014) citou a mesma dificuldade de clonagem destes transportadores, que parecem ser tóxicos para *E. coli*, exigindo crescimento em baixa temperatura para reduzir a expressão do gene. Foram realizadas clonagens com as linhagens de *E. coli* XL10-gold e DH5- α , com crescimento a 30°C, que foi o único protocolo que permitiu a obtenção de clones, porém, quando realizada a seleção por extração de DNA plasmidial e digestão, tanto para *HXT3* quanto para *HXT7*, todos os clones apresentavam versões recombinadas do vetor.

O vetor Y2STEF5 foi usado para transformação de *S. cerevisiae* EBYXI e EBY280, pelo protocolo de transformação rápida e foram obtidos vários clones capazes de crescer sem a adição de uracila ao meio. Para a transformação, as células foram crescidas em YP maltose 1% com 200 μ g/mL de G418, e após a transformação, semeadas em placas com meio mínimo com 1% de maltose, suplementado com 20 mg/L de triptofano, 20 mg/L de histidina e 30 mg/L de leucina (sem uracila).

Para a construção dos vetores Y2STEF3 e Y2STEF7, e a construção dos vetores com as regiões codificadoras mutadas (T213V), optou-se pela construção desses vetores diretamente na levedura, por recombinação homóloga. Primeiramente, testamos esta alternativa para construção do vetor com o *HXT5* mutado. Foram construídos *primers* que se anelam ao promotor *TEF1* e ao terminador *PGK* presentes no vetor Y2STEF. Os novos *primers* foram usados em combinação com os *primers* mutagênicos em duas reações distintas de PCR, de forma a gerar dois produtos de PCR, um com a parte do promotor *TEF1* (+ de 200 pb) e a região codificadora de *HXT5* (até 10 pares de base após a mutação) e outro produto de PCR com parte da região codificadora de *HXT5* (10 pb antes da mutação) até a região do promotor *PGK* (+ de 200 pb). Esperava-se recombinar a região homóloga ao promotor e o terminador de cada produto de PCR com o vetor Y2STEF que apresenta a região do promotor e do terminador completa, além da recombinação entre os produtos de PCR, na região de aproximadamente 30 pb de homologia, correspondendo a região da mutação sítio dirigida. Apenas quando os 3

Resultados e Discussões

eventos de recombinação ocorrem há o fechamento do vetor de expressão com o gene do transportador completo, que poderia permitir o crescimento na ausência de uracila e, caso o transportador fosse funcional, o crescimento em glicose.

O próprio vetor Y2STEF5 linearizado com EcoRV e desfosforilado foi usado como DNA molde para os produtos de PCR. O vetor Y2STEF linearizado com as duas enzimas BamHI/NotI (com a liberação do fragmento correspondente a eGFP) foi isolado do gel de agarose e purificado sendo posteriormente usado junto com os dois produtos de PCR (também isolados do gel de agarose e purificados, figura 44c), para a transformação de alta eficiência das leveduras EBYXI e EBY280. Foram usados numa proporção molar de 1:5:5 (vetor: produto PCR 5A: produto de PCR 5B) somando um total de aproximadamente 1 µg de DNA para essa transformação. Como controle foi usado o próprio vetor Y2STEF linearizado e o vetor circular (controle positivo da transformação). O crescimento e a seleção foram realizados conforme descrito anteriormente para o Y2STEF5.

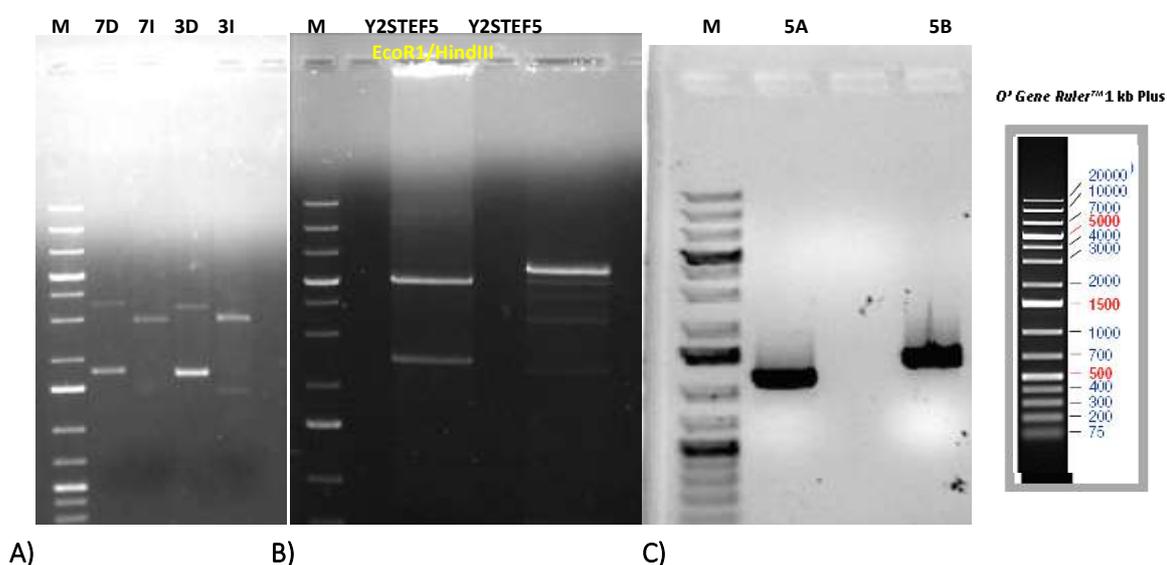


Figura 44: Confirmações da clonagem de HXT3 e HXT7 em pBlueScript II SK, clonagem de HXT5 em Y2STEF e PCR mutagênicos de HXT5. A) Digestão com BamHI/NotI de pBlueScript II SK com genes *HXT3* ou *HXT7*. 7D: miniprep do clone 7.5 (pBHXT7) digerido, 7I: pBHXT7 integro; 3D: miniprep do clone 3.5 (pBHXT3) digerido. 3I: pBHXT3 Integro. **B)** Digestão Y2STEF5 com EcoRI e HindIII, para liberação do cassete HXT5, vetor digerido e integro (a direita). **C)** PCR mutagênico de *HXT5*, 5A: promotor + região 5' *HXT5* até a região mutada (aprox. 1,1 kb), 5B: região 3' do *HXT5* a partir da região mutada + terminador (aprox. 1,5kb), controle negativo (sem DNA, poço do meio); M: Marcador molecular O' Gene ruler 1 kb plus.

Resultados e Discussões

Após a transformação de EBYXI e EBY280, foram obtidos vários clones com *HXT5* mutado, nenhum clone nos controles negativos e alguns clones no controle positivo (Y2STEF circular). Todos os clones obtidos das transformações com *HXT5* original e com *HXT5* mutado foram testados quanto à capacidade de recuperar o crescimento em glicose, e paralelamente em meio mínimo com maltose, suplementado com os aminoácidos nas quais a EBYXI é deficiente, exceto uracila. De forma complementar, foi avaliado o crescimento sem a suplementação dos aminoácidos, para confirmar o fenótipo parental. Na tabela 12, há um resumo dos fenótipos esperados para cada construção. Conforme esperado, houve crescimento dos clones com *HXT5* (EBYXI ou EBY280 + Y2STEF5) e *HXT5M* (EBYXI ou EBY280+ Y2STEF5M) em meio mínimo (Ura⁻, Leu⁺, Trip⁺ e His⁺) com glicose, enquanto os controles sem o transportador foram incapazes de crescer em glicose. Nenhum clone foi capaz de crescer na ausência de triptofano, leucina e histidina, apesar de todos terem crescido em meio com maltose suplementado com os 4 aminoácidos, confirmando o fenótipo parental. Na figura 45 observa-se o crescimento dos diferentes clones obtidos e dos controles em YP maltose 2% e YP glicose 2%, aonde nota-se que apenas os clones com *HXT5* ou *HXT5M* foram capazes de crescer em glicose. Como controle positivo das placas, foi usada a levedura selvagem JP1 e como controles negativos para crescimento em glicose as linhagens EBYXI e EBY280. Conforme esperado, observa-se na figura 45, que o plasmídeo Y2STEF sem *HXT5* não restabelece a capacidade de EBYXI crescer em glicose. Logo, as leveduras que conseguem crescer em glicose apresentam o gene de *HXT5* e *HXT5M* sendo expressos e funcionais.

Resultados e Discussões

Tabela 12: Fenótipos esperados no crescimento das linhagens em meio mínimo

Linhagens	Ura ⁻	His ⁻ Leu ⁻ Trip ⁻	glicose	maltose	xilose
EBY.VW4000	-	-	-	+	-
EBYXI	-	-	-	+	-
EBY280	-	-	-	+	-
EBYHXT5	+	-	+	+	+
EBYHXT5M	+	-	+	+	+
EBY280HXT5	+	-	+	+	-
EBY280HXT5M	+	-	+	+	-
EBYXI +Y2STEF	+	-	-	+	-
EBY280 +Y2STEF	+	-	-	+	-
JP1	+	+	+	+	-

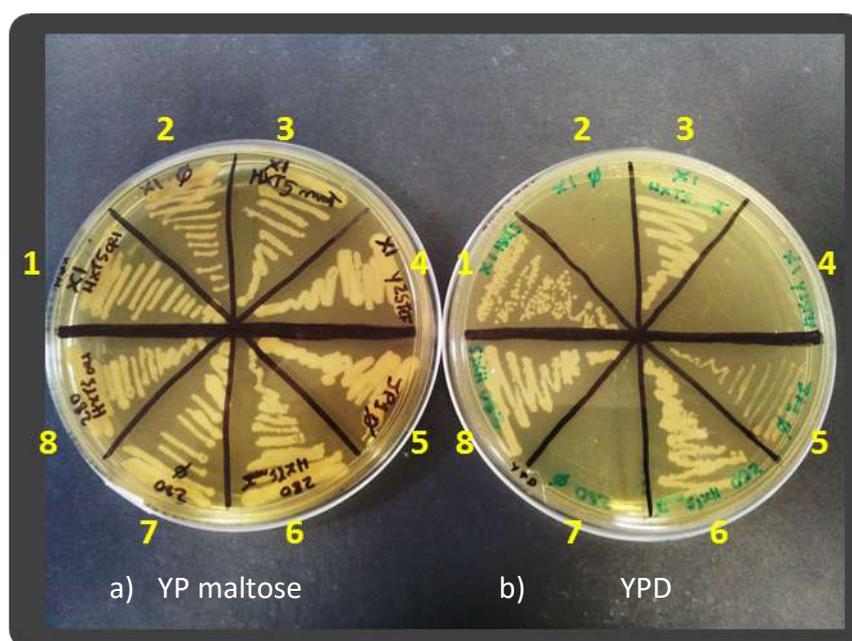


Figura 45: Análise fenotípica dos transformantes de EBYXI e EBY280. Crescimento em YP + maltose (A) e YPD (B). 1: EBYXI transformada com o vetor Y2STEF5, 2: EBYXI controle (transformação sem DNA), 3: EBYXI transformada com o vetor Y2STEF+ mais os produtos de PCR para *HXT5M*, 4: EBYXI transformada com o vetor Y2STEF, 5: JP1 Selvagem, 6: EBY280 transformada com o vetor Y2STEF + os produtos de PCR para *HXT5* mutado, 7: EBY280 controle (transformação sem DNA), 8: EBY280 transformada com o vetor Y2STEF5.

Resultados e Discussões

Uma vez confirmado o sucesso da recombinação e construção do plasmídeo com transportador mutado diretamente na levedura, a mesma estratégia foi usada para os transportadores *HXT7* e *HXT3*, tanto para construção dos plasmídeos com transportador mutado quanto para a sequência original de cada gene.

Para a recombinação dos genes dos transportadores com o vetor Y2STEF linearizado com BamHI/NotI (figura 47) foram desenhados *primers* com 50pb de homologia com o promotor *TEF1* (e homologia a região 5' de *HXT3* ou *HXT7*) e 50pb de homologia com o terminador *PGK* (e homologia com a região 3' do *HXT3* ou *HXT7*). Ambos foram usados em reações de PCR com os vetores pBHXT3 ou pBHXT7 (pBlueScript II SK + *HXT3* ou *HXT7*, figura 43), obtendo-se os produtos de PCR do tamanho esperado (figura 47). Os mesmos *primers* foram usados em conjunto com os *primers* mutagênicos para cada transportador, de acordo com o esquema da figura 46, gerando dois produtos de PCR. Tanto os produtos de PCR quanto o vetor linearizado e desfosforilado foram isolados do gel de agarose e usados conforme descrito para a transformação usando *HXT5* mutado. Entretanto, a seleção dos clones foi feita diretamente pelo crescimento em meio mínimo com glicose (suplementado Ura⁻, Leu⁺, Trip⁺ e His⁺).

Resultados e Discussões

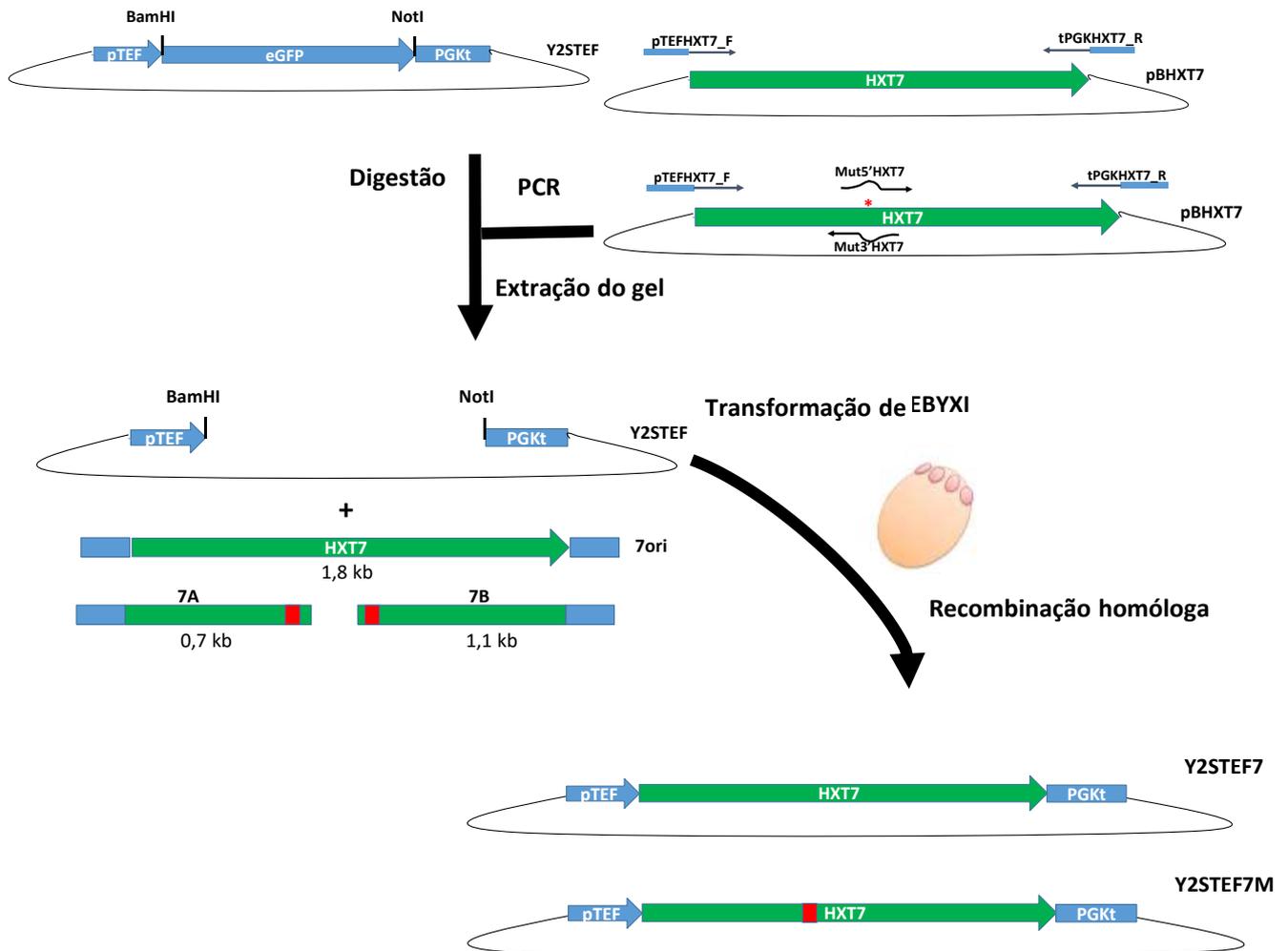


Figura 46: Representação esquemática da estratégia usada para construção dos vetores Y2STEF7, Y2STEF7M, Y2STEF3 e Y2STEF3M. Os produtos do PCR mutagênico e do PCR das sequências originais dos genes *HXT* foram recombinados com o vetor Y2STEF linearizado BamHI/NotI em *S. cerevisiae* EBXYI, gerando os plamídeo Y2STEF3, 3M, 7 ou 7M na levedura.

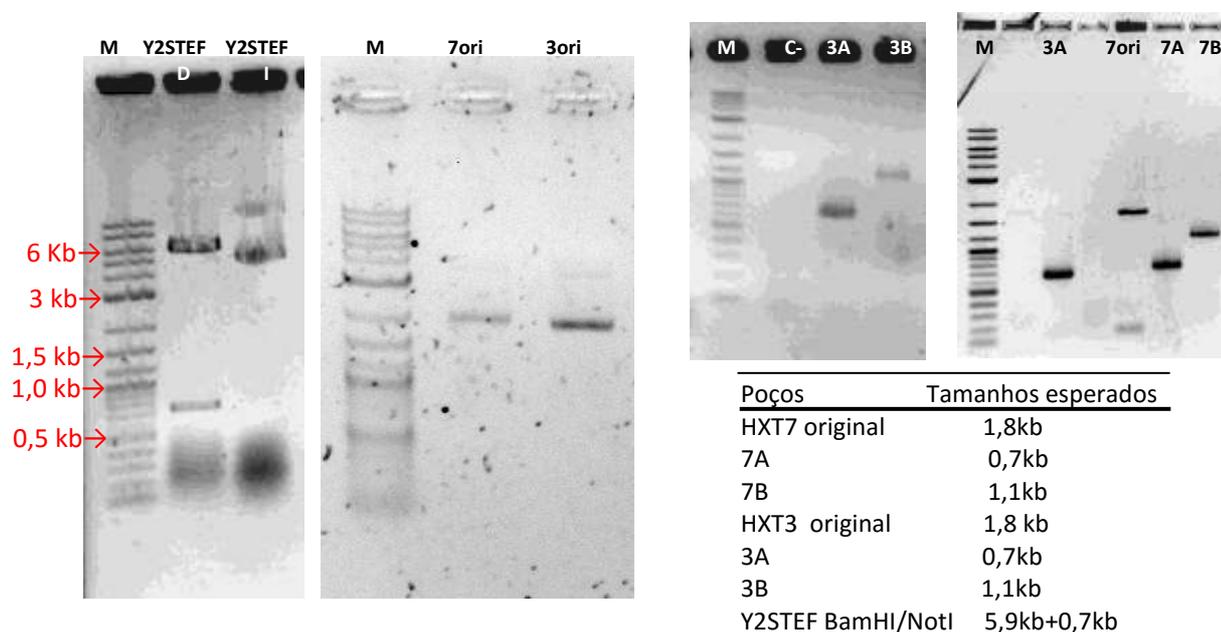


Figura 47: Digestão de Y2STEF, PCR dos genes dos transportadores originais e fragmentos com região mutada para recombinação e ligação em *S. cerevisiae*. A) Y2STEF digerido BamHI/NotI e integro. B) PCR do gene *HXT7* (7ori) e *HXT3* (3ori) com *primers* para recombinação homóloga; C) PCR mutagênico de *HXT3*, 3A: 50pb do promotor + região 5' *HXT3* até a região mutada, 3B: região 3' do *HXT3* a partir da região mutada + 50 pb do terminador, C- : controle negativo (sem DNA); D) PCR mutagênico de *HXT7*, 7A: 50 pb do promotor + região 5' *HXT3* até a região mutada, 7B: região 3' do *HXT3* a partir da região mutada + 50 pb do terminador; e PCR de *HXT7* original (7ori) e repetição de 3A (vide c) ; C- :controle negativo (sem DNA) M: Marcador molecular 2-Log DNA ladder. Eletroforese em gel de agarose 1%.

Após a transformação de EBIXI foram obtidos poucos clones, mesmo após repetidas tentativas. Entretanto, foram obtidos clones EBYHXT3, EBYHXT3M e EBYHXT7M. Os 3 clones tiveram seus fenótipos confirmados, assim como descrito anteriormente para *HXT5* e *HXT5M*. Infelizmente não foi possível obter clones portando o transportador Hxt7 selvagem.

A presença dos transportadores também foi confirmada pela amplificação dos cassetes de expressão, a partir dos *primers* que se anelam no vetor, na região externa ao cassete HXT (figura 48a).

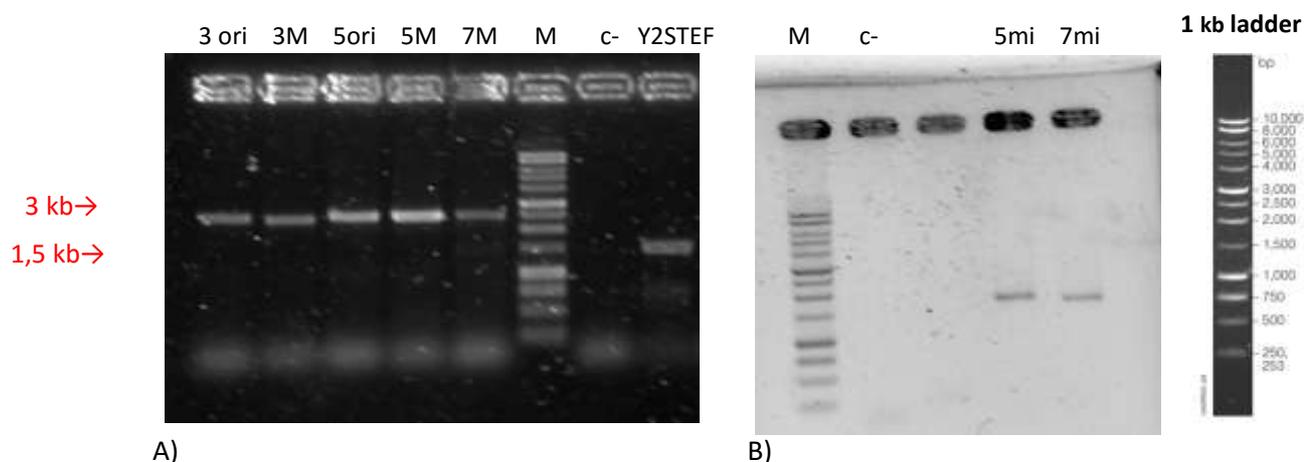


Figura 48: Amplificação por PCR dos genes dos transportadores presentes em EBYXIHXT. A) produto de PCR correspondente ao cassette HXT7 (7ori), HXT5 (5ori), HXT5M (5M), HXT3 (3ori) e HXT5M (5M) com primers que se anelam ao vetor, região externa (tamanho esperado 2,5 kb). B) produto de PCR correspondente ao gene HXT5M e HXT7M de clones intermediários da evolução (5mi e 7mi), respectivamente (tamanho esperado, 1,7 kb). Foram usados como DNA molde, em cada caso, o DNA total de EBYXIHXT extraído pelo método rápido. C- : controle negativo (sem DNA); M: Marcador molecular 1 kb DNA ladder (Promega). Eletroforese em gel de agarose 0,8%.

5.2.2 Comparação entre os transportadores

Cada linhagem EBYXIHXT construída apresenta um plasmídeo epissomal com a XK e a XI e outro plasmídeo contendo o gene do transportador. Como todos os transportadores estão sob a regulação do mesmo promotor constitutivo *TEF1* e os genes já se mostraram funcionais em glicose, as diferenças na capacidade de crescimento da levedura devem corresponder a uma melhor eficiência do transporte e não na diferença na expressão dos transportadores. Logo, a comparação entre os transportadores pode ser realizada a partir do acompanhamento da velocidade de crescimento da levedura em meio com xilose como única fonte carbono, ou alternativamente pela velocidade de consumo deste açúcar.

De forma a avaliar a capacidade de crescimento de EBYHXT5 e 3 frente as linhagens portando os respectivos transportadores mutados, foi realizado crescimento comparativo em placa de 12 poços em meio YPX (2% xilose) e YP (sem xilose) (com

Resultados e Discussões

200µg/mL G418). Na figura 49, nota-se que houve um pequeno crescimento em meio YP de todas as linhagens, uma vez que o pré-inóculo foi crescido em meio rico YPD. As células foram lavadas 3 vezes antes de serem usadas no experimento, mas sabe-se que *S. cerevisiae* quando crescida em meio rico é capaz de armazenar carboidratos de reserva (François & Parrou, 2001). Apesar deste pequeno crescimento, que rapidamente entra em fase estacionária, observa-se expressivo crescimento de EBYHXT5, 5M e 3M, demonstrando que estes transportadores são capazes de transportar xilose. Quando se compara o crescimento entre EBYHXT5 e EBYHXT5M, nota-se que a versão mutada do transportador parece ter uma capacidade de transporte melhorada em relação a sua versão original (figura 49). Para *HXT3* e *HXT3M* a diferença no crescimento é ainda mais evidente, uma vez que *HXT3* parece não ser capaz de transportar xilose, ou se sim, com baixa eficiência, caso se considere o pequeno crescimento que aparece após 60 horas.

Hxt3 é um transportador de glicose de baixa afinidade que em estudos anteriores não se mostrou capaz de transportar xilose e restabelecer o crescimento de levedura nocaute para transportadores (Saloheimo *et al.*, 2007). Logo, o resultado apresentado na figura 49 corrobora com o relatado na literatura. Entretanto o ligeiro crescimento ao final da do estudo indica que a pressão seletiva em crescimento em meio com xilose pode vir a selecionar variantes mutadas deste transportador que venham a permitir o transporte deste açúcar.

O resultado observado para o crescimento de EBYHXT3M, comparativamente ao crescimento da linhagem portando o gene selvagem *HXT3*, comprova que a mutação pontual do resíduo T210V torna o transportador Hxt3 capaz de transportar xilose. Essa descoberta é algo inédito, nunca antes reportado. Por meio do desenho racional, com base na homologia entre os transportadores, este trabalho desenvolveu um novo transportador de hexose capaz de transportar xilose. E comprovou o papel da mutação pontual no resíduo T210V de Hxt3 e seu homólogo em Hxt5 na melhora do transporte de xilose por estes transportadores.

Resultados e Discussões

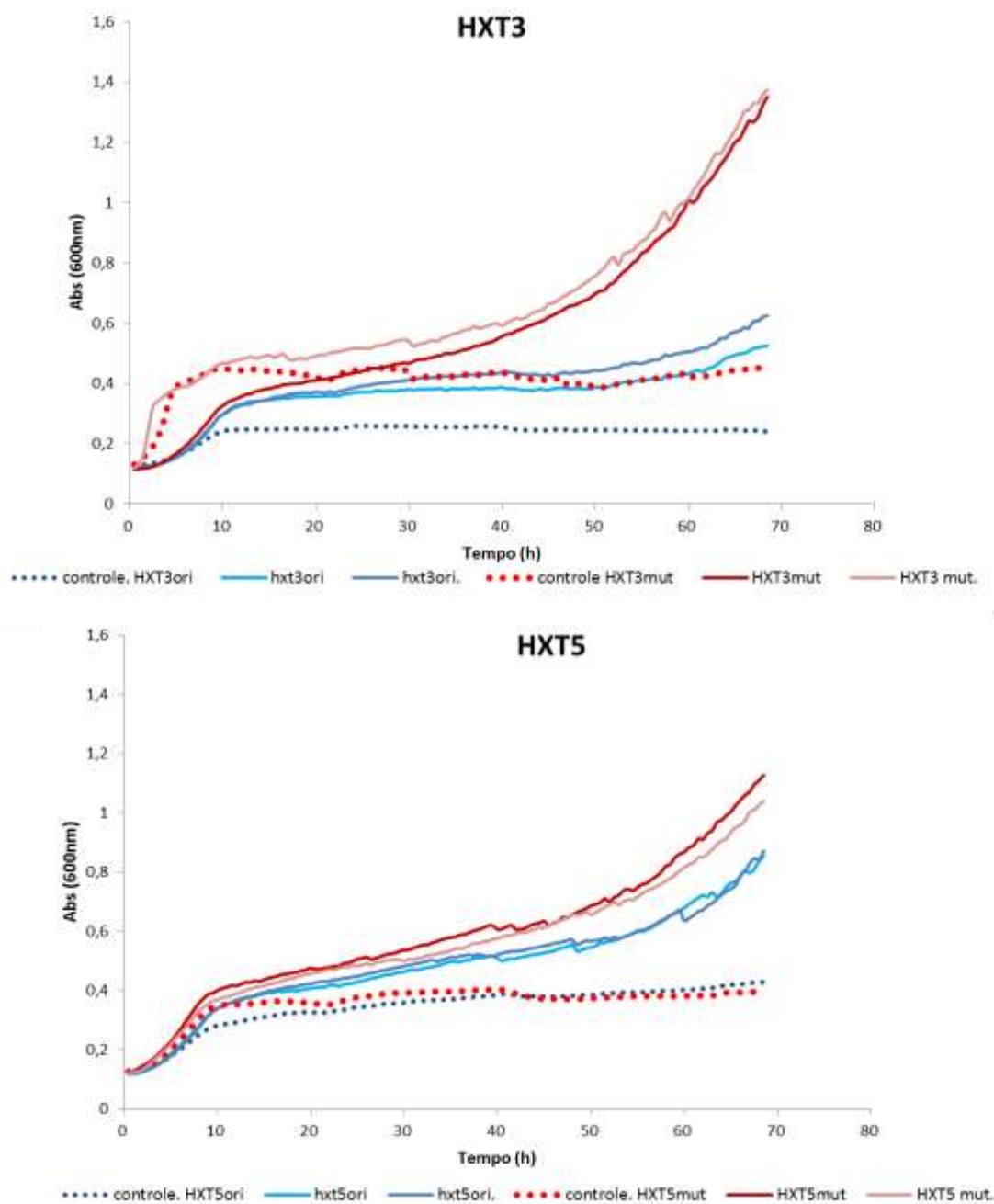


Figura 49: Crescimento comparativo de EBYHXT3, 3M, EBYHXT5 e 5M. Meio YPX 2% de xilose e meio YP (sem xilose) nos controles, em microplaca de 12 poços, temperatura de 30°C, sob agitação. Em vermelho *HXT3* ou 5 mutados, em azul *HXT3* ou 5 com sequências originais. Curvas pontilhadas correspondem aos respectivos controles.

Quando comparamos o crescimento observado entre as leveduras com HXT5M e HXT3M, observamos que HXT3M permitiu um crescimento maior e mais rápido do que HXT5M para as mesmas condições, indicando uma capacidade de transporte superior,

uma vez que o background das leveduras, vetor e cassete de expressão são os mesmos, excetuando-se a região codificadora do gene.

A superexpressão dos transportadores HXT capazes de transportar xilose em leveduras recombinantes fermentadoras de xilose mostraram melhora na fermentação pela expressão constitutiva de cada um deles em separado (Sedlak & Ho, 2004). Entretanto, apesar de aumentar a produtividade, o consumo dos açúcares na cofermentação ainda foi sequencial, devido a maior afinidade dos transportadores nativos por glicose.

5.2.3 Evolução dos transportadores

Buscando-se obter ainda mutações que possam gerar um transportador com maior afinidade por xilose do que por glicose, as 5 linhagens de EBYHXT obtidas foram submetidas a evolução, por 10 repiques sucessivos em YPX, seguido do acréscimo gradativo de 2-deoxiglicose (2-DOG) no meio. Este açúcar é análogo da glicose, sendo transportado para dentro da célula como a glicose, porém, a levedura não consegue metabolizar este açúcar pela via glicolítica, não o usando para seu crescimento. Desta forma, a levedura que conseguisse crescer em meio com xilose e 2-DOG em concentração equimolar (última condição da evolução), deveria ter um transportador que teria preferência ao transporte de xilose (que permite o crescimento celular) a 2-DOG. Assim, esperava-se obter um transportador que não fosse inibido competitivamente por glicose (ou 2-deoxiglicose).

Sreenath & Jeffries (1999) utilizaram 2-deoxiglicose para seleção de linhagens de *S. stipitis* com melhor capacidade de crescer em xilose, uma vez que este açúcar bloqueia a via glicolítica. Oreb *et al.* (2012), conseguiram evoluir um transportador para arabinose através de um sistema de *screening* e evolução de transportadores similar ao proposto neste trabalho, porém, ao invés de bloquear quimicamente a via glicolítica, deletaram 4 genes de hexoquinases da via glicolítica. Neste caso, a evolução do transportador foi obtida, submetendo a levedura a crescer sob crescente concentração de glicose no meio em competição com a arabinose. A combinação dessas duas

Resultados e Discussões

estratégias, uso de 2-deoxiglicose e crescimento sob pressão competitiva dos açúcares, parece um caminho mais simples na evolução de um transportador com maior afinidade por xilose, uma vez que não implica na deleção de mais genes, numa linhagem que já sofreu diversas deleções (Solis-Escalante *et. al.*, 2015).

As cinco linhagens (EBYHXT3, 3M, 5, 5M e 7M) foram inicialmente submetidas a 10 repiques sucessivos em meio YPX (com G418), de forma a melhorar a capacidade de crescimento em xilose. Conforme esperado, ao longo desta adaptação a levedura EBYHXT3 foi quem apresentou um crescimento menor no início, porém em poucas transferências seu crescimento passou a ser similar ao das outras linhagens. Ao final desta primeira adaptação, foram isoladas colônias em placa YPX (com G418), nomeadas EBYHXT3X, 3MX, 5X 5MX e 7MX. A segunda etapa da evolução foi realizada, adicionando-se sucessivamente 0,1 g/L, 0,5 g/L, 1g/L, 5 g/L e 12g/L de 2-DOG no meio YPX (1% xilose), a cada repique. Ao final desta etapa, foram isoladas colônias em placa com YPX (com G418), nomeadas EBYHXT3A, 3MA, 5A, 5MA e 7MA. Alternativamente foram isolados também duas linhagens do crescimento com 5g/L de 2-DOG, nomeadas de EBYHXT5Mi e EBYHXT7Mi, que tiveram a presença do gene do transportador confirmado por PCR a partir do DNA total extraído pelo método rápido (Moriya *et al.*, 2006) (Figura 48b). Para os demais isolados não houve amplificação na reação de PCR, nem com reações com os *primers* internos dos transportadores, nem com os *primers* que se anelavam no plasmídeo.

A avaliação final da evolução destes transportadores foi realizada pela capacidade da levedura crescer na presença de glicose e xilose, e pela avaliação do consumo desses açúcares. Foi feito o crescimento em placas de 24 poços, em triplicata, em meio YPX e em meio YPDX (a 30°C e 200 rpm), e acompanhados os crescimentos por 13, 22 e 72h (YPDX) e 48h (YPX). O ponto de 13h (YPDX) e 48h (YPX), foram usados para comparação do consumo dos açúcares por todas as 17 linhagens obtidas neste trabalho. Nas figuras 49 e 50, estão apresentados os resultados obtidos para este ensaio.

Resultados e Discussões

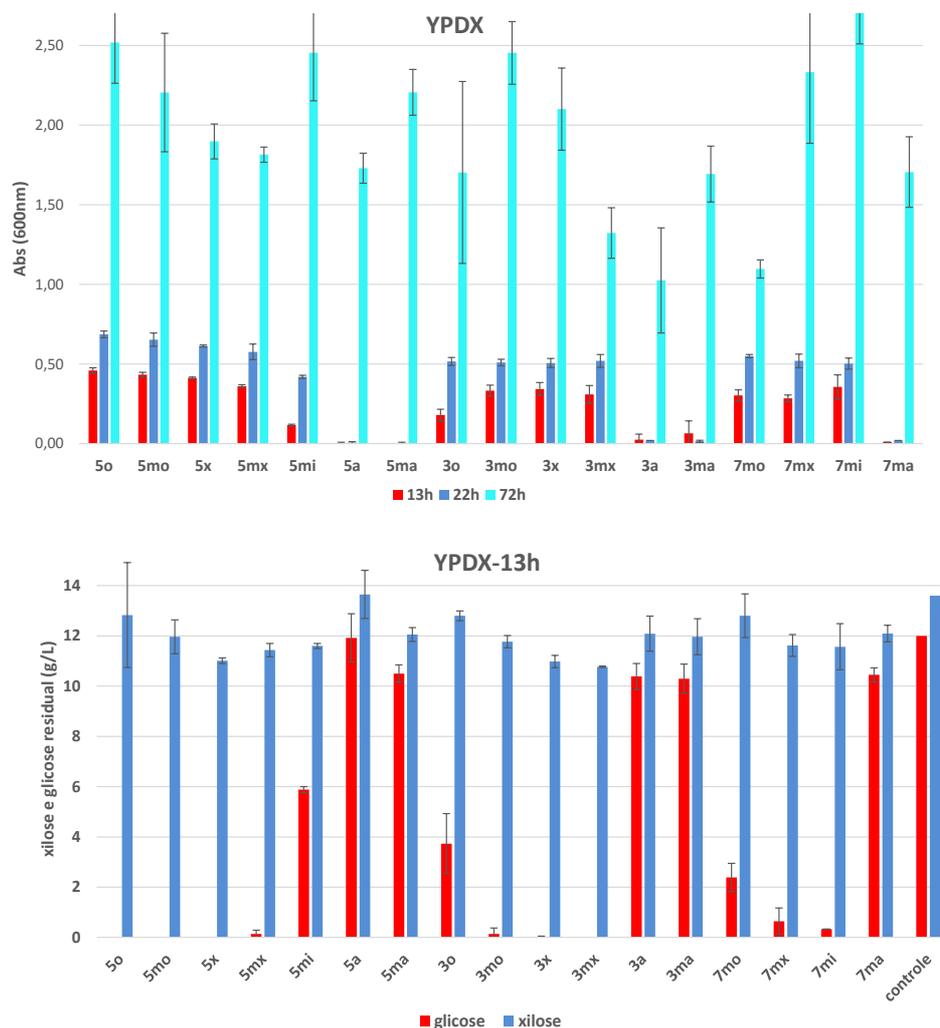


Figura 50: comparação do crescimento e consumo de açúcares pelas linhagens portando o transportador HXT selvagem (o) e mutado (M), das diferentes etapas da adaptação. Crescimento em placas de 24 poços em meio YPDx (com G418), $V_f = 1$ mL. Inóculo inicial de 0,05 OD (600nm). Amostragens em 13, 22 e 72 horas de crescimento para leitura de OD 600nm e 13horas para avaliação dos açúcares. Controle= meio não inoculado. Pré-inóculo crescido em YPD, (lavado 3X). Crescimento a 30°C e 200rpm em shaker. Análise de açúcar residual realizado por HPLC. Barras de desvio correspondem ao erro padrão, teste realizado em triplicata.

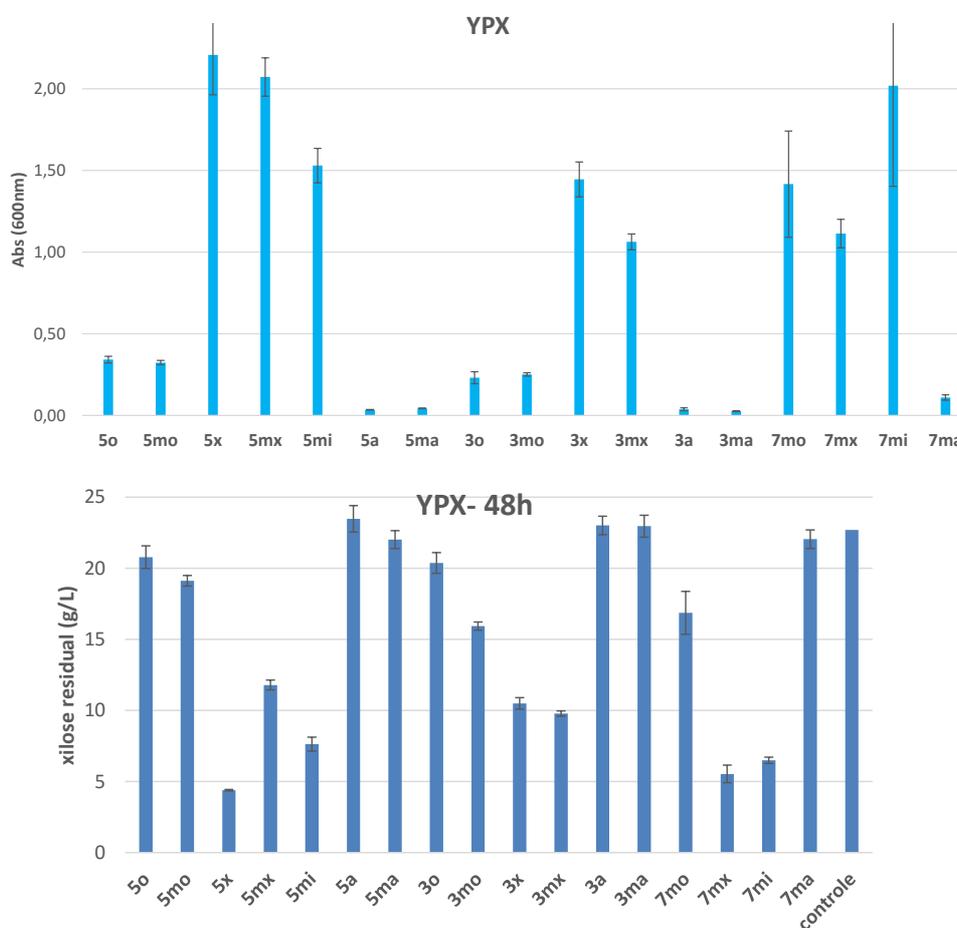


Figura 51: comparação do crescimento e consumo de xilose pelas linhagens portando o transportador HXT selvagem (o) e mutado (M), das diferentes etapas da adaptação. Crescimento em placas de 24 poços em meio YPX (com G418), $V_f = 1$ mL. Inóculo inicial de 0,05 OD (600 nm). Controle= meio não inoculado. Pré-inóculo crescido em YPD, (lavado 3X). Crescimento a 30°C e 200 rpm em shaker, por 48 horas. Análise de açúcar residual realizado por HPLC. Barras de desvio correspondem ao erro padrão, teste realizado em triplicata.

Conforme observado nas figuras 49 e 50, as linhagens adaptadas (EBYHXT3A, 3MA, 5A, 5MA e 7MA), obtidas após a pressão seletiva do crescimento em 2-DOG, cresceram muito lentamente nos dois meios testados, indicando que o transportador presente nestas linhagens pode ter sofrido mutações que o tornaram menos seletivo por glicose, porém também influenciaram na capacidade de transporte de ambos os açúcares. Farwick *et al.* (2014), Nijland *et al.* (2014) e Wang *et al.* (2015) obtiveram em estudos parecidos transportadores com uma mutação pontual (região homóloga ao resíduo N370 de HXT7) que apresentavam maior afinidade por xilose do que o transportador

Resultados e Discussões

selvagem. Porém, em todos os casos foi observado que esta alteração levava também a uma redução na capacidade de crescimento da levedura. No presente estudo observou-se um crescimento tardio (72h). Esta característica também foi observada no pré-inóculo e nas placas de isolamento dos clones.

Como não foi possível confirmar por PCR a presença dos transportadores ao final da evolução, foi realizada a análise para estes clones do consumo de açúcares no tempo de 72 h do experimento anterior. Como resultado, houve consumo dos açúcares, com preferência a glicose, apesar do consumo de parte da xilose, por todos. Confirmando que o transportador ainda se encontra funcional nas linhagens, apesar da aparente reduzida capacidade de transporte.

A tendência de redução na capacidade de transporte também pode ser observada pela redução do consumo de açúcares por EBYHXT5Mi se comparada a EBYHXT5MX, aonde há um consumo equivalente de xilose, porém para a primeira esse consumo ocorre ainda na presença de glicose. Esta primeira foi isolada do repique (YP 1% xilose e 0,5% 2-DOG) que antecede ao isolamento das linhagens adaptadas.

Para todas as linhagens com os transportadores, nota-se uma melhora no consumo de xilose após a primeira etapa da adaptação em meio com xilose que acompanhado de um maior crescimento quando comparado com as linhagens de antes da adaptação (gráficos YPX, figura 50). A diferença que não é tão evidente no meio YPDX, mas nota-se uma pequena melhora no consumo da xilose quando comparado aos respectivos transportadores antes da linhagem ser adaptada, mesmo ainda sendo sequencial ao consumo da glicose.

Apel *et al.* (2016), recentemente descreveu a evolução do transportador Hxt7 com uma estratégia similar, por crescimentos sucessivos apenas em xilose, e obteve uma levedura (Δhxt) com o transportador Hxt7 com mutação no resíduo F79S. Este transportador apresenta afinidades similares ao selvagem, mas com aumento de 2 vezes no V_{max} (186,4 nmol.min⁻¹.mg⁻¹). Como não houve mudança na afinidade, o transportador ainda dá preferência ao transporte de glicose ao de xilose. Entretanto, a expressão deste transportador comparado ao selvagem permitiu um mais rápido

Resultados e Discussões

consumo da xilose em meio com glicose e xilose, da mesma forma como o observado no presente trabalho.

Entretanto, as diferenças na capacidade de transporte pela etapa de adaptação apenas em xilose, só se confirmariam com o isolamento dos respectivos plasmídeos e reintrodução na levedura EBYXI não adaptada. Caso a velocidade de transporte não fosse o fator limitante ao crescimento, e sim o ajuste das vias metabólicas para consumo da xilose, a diferença observada poderia ser reflexo de um ajuste metabólico da linhagem e não mutações no transportador.

A levedura EBYXIHXT apresenta dois plasmídeos, um com resistência a ampicilina e canamicina (plasmídeo com cassetes de XK e XI) e o plasmídeo Y2STEFHXT com resistência apenas a canamicina. A partir do DNA total extraído das linhagens finais foi realizada a transformação de células de *E. coli* competentes, semeadas em LB sólido com ampicilina. Os vários clones obtidos foram em seguida palitados para duas placas de comparação, uma com LB+canamicina e outra com ampicilina, para identificar clones que fossem sensíveis a canamicina e resistentes a ampicilina (contendo o vetor com transportador). Dos vários clones obtidos nenhum se mostrou sensível a canamicina. Todos os cultivos e a transformação foram realizados a 30°C, já que na etapa de construção dos vetores não foi possível obtenção de clones de *E. coli* com o vetor para HXT7 e HXT3. Como alternativa poderia se “curar” a levedura do vetor com resistência a canamicina (e G418), antes de tentar recuperar os vetores Y2STEFHXT.

A busca por transportadores de xilose com maior afinidade por xilose do que por glicose parece ser um caminho muito longo ainda a ser percorrido. A redução da afinidade por glicose parece estar de alguma forma ligada a capacidade de transporte para ambos os açúcares (Nijland *et al.* 2014, Farwick *et al.*, 2014).

Considerando a superexpressão com promotores constitutivos, mesmo com maior afinidade do transportador por glicose, a escolha HXT3M, parece interessante. Gonçalves *et al.* (2014), observou que superexpressão do transportador de baixa afinidade Hxt1 em uma linhagem *hxt*-nocaute permitiu um consumo mais mais eficiente das correntes com xilose e glicose juntas, quando comparada a superexpressão de Hxt2,

Resultados e Discussões

Hxt5 e Hxt7, apesar de não levar ao completo consumo dos açúcares. Em sendo o HXT3M um transportador também de baixa afinidade, sua capacidade de transportar glicose quando em baixa concentração é reduzida, portanto, é possível que inicie mais cedo o consumo da xilose quando comparado, por exemplo, a um transportador de alta afinidade, como Hxt7, capaz de se ligar a glicose mesmo em concentrações muito baixas.

Para estratégias de processo de etanol 2G envolvendo a cofermentação, como o SCF (figura 1), em batelada simples, conforme testado no presente trabalho, a expressão conjunta de HXT3M e transportadores heterólogos de alta afinidade por xilose, como GXf1 (Diao *et al.*,2013), pode ser uma combinação conveniente para permitir alta produtividade. O HXT3M permitiria uma maior capacidade de transporte quando os açúcares estivessem em alta concentração no meio, enquanto poderia se beneficiar da atuação dos transportadores de alta afinidade por xilose para o consumo do residual de xilose na fermentação, mesmo com baixa V_{max} .

Em outras estratégias de processo como o SSCF (figura 1), com a sacarificação (C6) concomitante a cofermentação (Laluce *et al.*,2012), na qual o uso de JPXIXK.F1 seria mais promissor por tolerar temperaturas mais altas quando comparada as linhagens de laboratório e as demais industriais testada por Della-Bianca & Gombert (2013), a limitação do transporte de xilose durante a fermentação pode ser um fator ainda mais crítico. Em processos de SSCF a concentração de xilose no meio seria alta no início, enquanto a concentração de glicose seria baixa, ou bem próxima a zero, pelo consumo imediato da mesma, conforme esse açúcar é formado no meio pela quebra da celulose. De acordo com a afinidade dos transportadores presentes na levedura, o consumo da xilose pode ser favorecido pela quase ausência de glicose livre e alta concentração de xilose, além da indução dos transportadores endógenos pela concentração baixa de glicose. Entretanto, se forem transportadores de alta afinidade por glicose, como o Hxt7, mesmo em baixa concentração, a glicose ainda seria preferencialmente transportada em detrimento a xilose. Pelo perfil de consumo de xilose pela JPXIXK.F1 em concentrações baixas ou na ausência de glicose (figura 41), transportadores de alta afinidade por glicose parecem ser os principais responsáveis pela internalização da

Resultados e Discussões

xilose. Em SSCF com JPXIXK.F1, caso hxt7 fosse o principal responsável pelo consumo de xilose, se esperaria que o transporte da xilose fosse mais inibido em SSCF do que no caso estudado (SCF), aonde chega a completa ausência de glicose no meio.

Na fermentação do hidrolisado por JPXIXK.F1 (figura 41) observou-se que a maior velocidade de consumo de xilose e produção de etanol ocorrem logo após o consumo total da glicose. Este fator, possivelmente se justifica pela presença de transportadores induzidos pela presença de glicose. Na ausência de glicose, *HXT5* e *HXT3* não só são inibidos, como também removidos da membrana e degradados. Como a fermentação da xilose por JPXIXK.F1 depende apenas dos transportadores endógenos, é possível que o residual de xilose observado seja por limitação dos transportadores, uma vez que têm baixa afinidade por xilose.

No entanto, a estratégia de superexpressão de transportadores com melhorada capacidade de transporte, como o *HXT3* mutado construído no presente trabalho, ou ainda, caso comprovado, os *HXT3Mx*, *HXT5x*, *HXT5Mx* e *HXT7Mx*, parece ser promissora no aumento da produtividade dos processos fermentativos com a levedura JPXIXK.F1.

6. CONCLUSÕES

Os objetivos do presente trabalho foram alcançados, com o desenvolvimento da primeira levedura industrial desenvolvida no país, capaz de fermentar hidrolisado lignocelulósico, com vias integradas ao genoma e sem marcas de resistência, portanto, adequada a aplicação nos processos para etanol de segunda geração.

A linhagem JPXIXK.F1 se mostrou uma levedura robusta com taxas de rendimento de etanol superior ao reportado na literatura até a presente data para fermentação de hidrolisados lignocelulósicos com alta concentração de ácido acético.

A integração dos genes da XI e da XK com deleção de *GRE3* associado a adaptação metabólica se mostrou suficiente para o desenvolvimento de uma boa linhagem cofermentadora.

A adaptação metabólica exerceu um papel fundamental no ajuste metabólico necessário a melhora de crescimento e da capacidade fermentativa da levedura selecionada.

A etapa de isolamento dos clones após a adaptação, e o *screening* dos mesmos exige especial atenção, uma vez que em meio a população existem fenótipos diferente coexistindo.

De forma inédita, a partir do desenho racional, foi desenvolvido um transportador HXT3 mutado capaz de transportar xilose com melhor eficiência que os demais transportadores testados. Corroborando a importância do resíduo T210 no transporte da xilose. E esta característica é conservada entre os transportadores da mesma família.

Foram gerados transportadores de alta, média e baixa afinidade por glicose com aparente melhora no transporte de xilose e possíveis mutações que os tornaram mais eficientes no transporte de xilose. Entretanto, as mutações envolvidas no aumento relativo da afinidade do transportador por xilose em detrimento a glicose, parecem estar de alguma forma relacionadas, aonde a redução da afinidade a glicose afeta também a capacidade de transporte de xilose.

Conclusões

O presente trabalho, além de apresentar um componente acadêmico pelas informações novas que foram geradas sobre as alterações no metabolismo de *S. cerevisiae* necessárias para utilização de xilose, também tem um forte componente de inovação tecnológica com aplicação em uma das áreas mais importantes da economia nacional, a produção de biocombustíveis. A linhagem desenvolvida é considerada uma tecnologia estratégica pela Petrobras, e fortalece a interação entre a indústria e academia, no sentido de buscar a viabilidade econômica e aumento da escala da produção de etanol de segunda geração no país.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, J.R., RUNQUIST, D., SÀNCHEZ NOGUÉ, V., LIDÉN, G., GORWA-GRAUSLUND, M.F. (2011). Stress-related challenges in pentose fermentation to ethanol by the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol J* 6:286-299.
- AMES, R. M., RASH, B. M., HENTGES, K. E., ROBERTSON, D. L., DELNERI, D., & LOVELL, S. C. (2010). Gene duplication and environmental adaptation within yeast populations. *Genome biology and evolution*, 2, 591-601..
- ARAUJO, J.A. (2012). Modificações genéticas em leveduras para expressão de celulases. Tese de Doutorado. UNB. ICB. Departamento de Biologia Celular. Brasília-DF.
- ARGUESO, J. L., CARAZZOLLE, M. F., MIECZKOWSKI, P. A., DUARTE, F. M., NETTO, O. V., MISSAWA, S. K., (...) & DOMINSKA, M. (2009). Genome structure of a *Saccharomyces cerevisiae* strain widely used in bioethanol production. *Genome Research*, 19(12), 2258-2270.
- ASK, MI, BETTIGA, M., MAPELLI, V. & OLSSON, L. (2013) the influence of HMF and Furfural on redox balance and energy state of xilose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Biofuels* 6(1): 22
- BAI, F. W.; ANDERSON, W. A.; MOO-YOUNG, M. (2008). Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks. *Biotechnol. Adv.* 26: 89-105.
- BABRZADEH, F., JALILI, R., WANG, C., SHOKRALLA, S., PIERCE, S., ROBINSON-MOSHER, A., NYREN, P., SHAFER, R.W., BASSO, L.C., AMORIM, H.V., OLIVEIRA, A. J., DAVIS, R.W., RONAGHI, M., GHARIZADEH, B. & STAMBUK, B.U. (2012). Whole-genome sequencing of the efficient industrial fuel-ethanol fermentative *Saccharomyces cerevisiae* strain CAT-1. *Mol Genet Genomics* 287:485–494
- BASSO, L. C.; AMORIM, H. V.; OLIVEIRA, A. J.; LOPES, M. L. (2008). Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil. *FEMS Yeast Res.* 8: 1155-1163

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BATISTA, V.D.F. (2012). Construção de um vetor para expressão heteróloga em *Pichia pastoris*. Departamento de Biologia Celular, UnB, Brasília. 1-69.
- BRAUS, G. H. (1991). Aromatic amino acid biosynthesis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: a model system for the regulation of a eukaryotic biosynthetic pathway. *Microbiological Reviews*, v. 55, n. 3, p. 349–370.
- BELLISSIMI, E.; VAN DIJKEN, J.P.; PRONK, J.T.; VAN MARIS, A.J. (2009). Effects of acetic acid on the kinetics of xylose fermentation by an engineered, xylose-isomerase-based *Saccharomyces cerevisiae* strain. *FEMS Yeast Res.* 9:358–364.
- BOLES, E. & HOLLENBERG, C.P. (1997). The molecular genetics of hexose transport in yeasts. *FEMS Microbiol Rev* 21:85-111.
- BORGES , T.F.A. (2009). Construção de um vetor integrativo em múltiplas cópias para *Saccharomyces cerevisiae* utilizando sequências delta. Dissertação de Mestrado. UNB. ICB. Departamento de Biologia Celular. Brasília-DF.
- BRAT, D., BOLES, E. & WIEDEMANN, B. (2009). Functional expression of a bacterial xylose isomerase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol* 75:2304-2311
- CAI, Z., ZHANG, B. & LI, Y. (2012). Engineering *Saccharomyces cerevisiae* for efficient anaerobic Xylose Fermentation: Reflections and Perspectives. *Review. Biotechnol. J.* 7: 34-46.
- CARRETO, L., EIRIZ, M. F., GOMES, A. C., PEREIRA, P. M., SCHULLER, D., & SANTOS, M. A. (2008). Comparative genomics of wild type yeast strains unveils important genome diversity. *BMC Genomics*, 9(1), 524.
- CARTER, Z. & DELNERI, D. (2010). New generation of *loxP*-mutated deletion cassettes for the genetic manipulation of yeast natural isolates. *Yeast* 27:765-775
- CARPITA, N. C. (1996). Structure and biogenesis of the cell walls of grasses. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47: 445-476.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CHEN, D. C.; YANG, B. C.; KUO, T. T. (1992). One-step transformation of yeast in stationary phase. *Curr. Genet.* 21: 83-84
- COLABARDINI, A. C.; RIES, L. N. A.; BROWN, N. A.; DOS REIS, T. F.; SAVOLDI, M.; GOLDMAN, M. H. S.; MENINO, J.F.; RODRIGUES, F; GOLDMAN, G. H.(2014) Functional characterization of a xylose transporter in *Aspergillus nidulans*. *Biotechnol Biofuels.* 7(1).
- CONAB, Companhia Nacional de Abastecimento.(2016) Dados disponíveis no site: www.CONAB.gov.br. Acesso em março/2016.
- CTNBIO, COMISSÃO NACIONAL DE BIOSSEGURANÇA, informações sobre as normas e legislações relativas a biossegurança disponíveis no site: www.CTNBIO.gov.br. Acesso em março de 2013
- DASHTBAN, M.; SCHRAFT, H.; QIN, W. (2009). Fungal bioconversion of lignocellulosic residues; opportunities & perspectives. *Int. J. Biol. Sci.* 5(6): 578-595.
- DELLA-BIANCA, B. E.; BASSO, T. O.; STAMBUK, B. U.; BASSO, L. C.; GOMBERT, A. K. (2013). What do we know about the yeast strains from the Brazilian fuel ethanol industry? *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97 (3): 979–991.
- DELLA-BIANCA, B. E.; GOMBERT, A. K. (2013) Stress tolerance and growth physiology of yeast strains from the Brazilian fuel ethanol industry. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology.* 104:1083–1095.
- DEMEKE, M. M., DIETZ, H., LI, Y., FOULQUIÉ-MORENO, M. R., MUTTURI, S., DEPREZ, S., ... & VERPLAETSE, A. (2013). Development of a D-xylose fermenting and inhibitor tolerant industrial *Saccharomyces cerevisiae* strain with high performance in lignocellulose hydrolysates using metabolic and evolutionary engineering. *Biotechnology for biofuels*, 6(1), 1.
- DEMEKE, M. M., DUMORTIER, F., LI, Y., BROECKX, T., FOULQUIÉ-MORENO, M. R., & THEVELEIN, J. M. (2013b). Combining inhibitor tolerance and D-xylose

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- fermentation in industrial *Saccharomyces cerevisiae* for efficient lignocellulose-based bioethanol production. *Biotechnology for biofuels*, 6(1), 1.
- DEMEKE, M.M.; FOULQUIÉ-MORENO, M.R.; DUMORTIER, F.; THEVELEIN, J.M. (2015). Rapid Evolution of Recombinant *Saccharomyces cerevisiae* for Xylose Fermentation through Formation of Extra- chromosomal Circular DNA. *PLoS Genet* 11(3): e1005010. doi:10.1371/journal.pgen.1005010evolução
- DEN HAAN, R.; ROSE, S. H.; LYND L. R.; VAN ZYL W. H. (2006).Hydrolysis and fermentation of amorphous cellulose by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Metab. Eng.* 9(1): 87-94.
- DIAO, L.; LIU, Y.; QIAN, F.; YANG, J.; JIANG, Y.; YANG, S.(2013) Construction of fast xylose-fermenting yeast based on industrial ethanol-producing diploid *Saccharomyces cerevisiae* by rational design and adaptive evolution. *BMC Biotechnology*. 13,110.
- DIDERICH, J.A.; SCHEPPER, M. ; VAN HOEK,P ; LUTTIK, M.A.;VAN DIJKEN, J.P.; PRONK, J.T.; KLAASSEN, P.; BOELENS, H.F.; DE MATTOS, M.J.; VAN DAM, K; KRUCKEBERG ,A.L. (1999) Glucose uptake kinetics and transcription of HXT genes in chemostat cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*. 274(22):15350-9
- DU, J., LI,S. & ZHAO, H. (2010). Discovery and characterization of novel D-xylose-specific transporters from *Neurospora crassa* and *Pichia stipitis*. *Mol. Biosyst.* 6: 2150-2156
- ELIASSON, A., HOFMEYER, J.S., PEDLERA, S., HAHN-HÄGERDALA, B. (2001) The xylose reductase/xylitol dehydrogenase/xylulokinase ratio affects product formation in recombinant xylose-utilising *Saccharomyces cerevisiae*. *Enzyme and Microbial Technology* 29: 288–297
- EPA. (2010). Renewable Fuel Standard Program (RFS2) Regulatory Impact Analysis. Disponível em: <https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-08/documents/420r10006.pdf>. Acesso em 18 de junho de 2016.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- EU (2009) Directive 2009/28/EC of the European Parliament and of the Council of 23 April 2009 on the Promotion of the Use of Energy from Renewable Sources and Amending and Subsequently Repealing Directives 2001/77/EC and 2003/30/EC. <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=URISERV:en0009>. Acesso em 10 de junho de 2015.
- FARWICK, A., BRUDER, S., SCHADEWEG, V., OREB, M., BOLES, E.(2014) Engineering of yeast hexose transporters to transport d-xylose without inhibition by D-glucose. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 111 (14) 5159-5164
- FELDMANN, H. (2010). *Yeast: Molecular and Cell Biology*. Wiley- VCH Verlag GmbH & Co. Weinheim. 334p.
- FERREIRA, D.; NOBRE, A.; SILVA, M.L.; FARIA-OLIVEIRA, F.; TULHA, J.; FERREIRA, C.; LUCAS, C.(2013). XYLH encodes a xylose/H⁺ symporter from the highly related yeast species *Debaryomyces fabryi* and *Debaryomyces hansenii*. *FEMS Yeast Res.* 13(7), 585-96.
- FRANÇOIS, J., & PARROU, J. L. (2001). Reserve carbohydrates metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS microbiology reviews*, 25(1), 125-145.
- FUJITA, Y.; ITO, J.; UEDA, M.; FUKUDA, H.; KONDO, A. (2004). Synergistic saccharification, and direct fermentation to ethanol, of amorphous cellulose by use of an engineered yeast strain codisplaying three types of cellulolytic enzyme. *Appl Environ. Microbiol.* 70: 1207-1212.
- GERBRANDT, K.; CHU, P. L.; SIMMONDS, A.; MULLINS, K. A.; MACLEAN, H. L.; GRIFFIN, W. M.; SAVILLE, B. A. (2016). Life cycle assessment of lignocellulosic ethanol: a review of key factors and methods affecting calculated GHG emissions and energy use. *Current opinion in biotechnology*, 38: 63-70.
- GIBSON, D. G. (2009) Synthesis of DNA fragments in yeast by one-step assembly of overlapping oligonucleotides. *Nucleic Acids Res.*, 37(20): 6984-6990.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- GIETZ, R.D. & SCHIESTL, R.H. (2007). High-efficiency yeast transformation using the LiAc/SS carrier DNA/PEG method. *Nature Protocols* 2: 31-34
- GONÇALVES, D. L.; MATSUSHIKA, A.; BELISA, B.; GOSHIMA, T.; BON, E. P.; STAMBUK, B. U.(2014). Xylose and xylose/glucose co-fermentation by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strains expressing individual hexose transporters. *Enzyme and Microbial Technology*. 63, 13-20.
- GRAY, K. A.; ZHAO, L.; EMPTAGE, M. (2006). *Bioethanol. Curr. Opin. Chem. Biol.* 10: 141-146.
- GUEIROS, R. S. (2006). Otimização das técnicas de manipulação genética de leveduras industriais para aplicação na produção de álcool combustível. Dissertação de Mestrado. UFPE. CCB. Ciências biológicas. 67p.
- GÜLDENER, U.; HECK, S.; FIEDLER, T.; BEINHAUER, J.; HEGEMANN, J. H. (1996). A new efficient gene disruption cassette for repeated use in budding yeast. *Nucl. Acids Res.* 24(13): 2519-2524.
- HA, S.; GALAZKA, J. M.;KIM, S. R.;CHOI, J.;YANG, X.;SEO, J.;GLASS, N. L.; CATE J. H. D.; JIN, Y. (2010). Engineered *Saccharomyces cerevisiae* capable of simultaneous cellobiose and xylose fermentation. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 108: 504-509.
- HAHN-HÄGERDAL, B., JEPPSSON, H., SKOOG, K. & PRIOR, B.A. (1994). Biochemistry and physiology of xylose fermentation by yeast. *Enzyme and Microb Technol* 16:933-943.
- HAHN-HÄGERDAL, B., KARHUMAA, K., FONSECA, C., SPENCER-MARTINS, I., GORWA-GRAUSLUND, M. F. (2007). Towards industrial pentose-fermenting yeast strains. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 74: 937-953.
- HAMACHER, T.; BECKER, J.; GÁRDONYI, M.; HAHN-HÄGERDAL, B.; BOLES, E.(2002). Characterization of the xylose-transporting properties of yeast hexose transporters and their influence on xylose utilization. *Microbiology*. 148(9), 2783-2788.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- HANAHAN, D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. J. Mol. Biol. 166: 557-580. *apud*: SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. (2001). Molecular cloning: A laboratory manual. Second edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- 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.(2003). Xylose metabolism in the anaerobic fungus sp. strain E2 follows the bacterial pathway. Arch Microbiol, 180: 134-141.
- HECTOR, R. E., QURESHI, N., HUGHES, S. R. & COTTA, M. A. (2008). Expression of a heterologous xylose transporter in a *Saccharomyces cerevisiae* strain engineered to utilize xylose improves aerobic xylose consumption. Appl Microbiol Biotechnol, 80: 675-684.
- HO, N. W., CHEN, Z. & BRAINARD, A. P. (1998). Genetically engineered *Saccharomyces* yeast capable of effective cofermentation of glucose and xylose. Appl Environ Microbiol, 64: 1852-1859.
- IEA, 2012, Key World Energy Statistics 2012. (2013) Disponível em [http:// www.iea.org](http://www.iea.org) . Acesso em março de 2013.
- JANK, M.S. & NAPPO, M. (2009). Etanol de cana-de-açúcar: uma solução energética global sob ataque. In Abramovay, R. Biocombustíveis: a energia da controvérsia. São Paulo: Editora SENAC. p.19-57.
- JEFFRIES, T.W. (2006). Engineering yeasts for xylose metabolism. Curr Opin Biotechnol 17: 320-326.
- JEFFRIES, T. W., BAE, J., LIN, B. C. Y., & VAN VLEET, J. R. H. (2015). Sugar transport sequences, yeast strains having improved sugar uptake, and methods of use. U.S. Patent Application 14/560,749.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- JOJIMA, T.; OMUMASABA, C. A.; INUI, M. & YUKWA, H. (2010). Sugar transporters in efficient utilization of mixed sugar substrates: current knowledge and outlook. *Appl. Micro. Biotechnol*, 85:471-480.
- KIM, S.R.; KWEE, N.R.; KIM, H.; JIN, Y.S. (2013) Feasibility of xylose fermentation by engineered *Saccharomyces cerevisiae* overexpressing endogenous aldose reductase (GRE3), xylitol dehydrogenase (XYL2), and xylulokinase (XYL3) from *Scheffersomyces stipitis*. *FEMS Yeast Res.* 2013.13(3), 312-21.
- KIM, S. R., SKERKER, J. M., KANG, W., LESMANA, A., WEI, N., ARKIN, A. P., & JIN, Y. S. (2013). Rational and evolutionary engineering approaches uncover a small set of genetic changes efficient for rapid xylose fermentation in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS One*, 8(2), e57048.
- KASAHARA, T. & KASAHARA, M. (2010). A two dimensional comprehensive study: Identification of a key residue determining substrate affinity in the yeast glucose transporter Hxt7. *Journal of Biological Chemistry*. 2010. 285(34), 26263–26268.
- KASAHARA, T., SHIMOGAWARA, K. & KSAHARA, M. (2011). Crucial effects of amino acid side chain length in transmembrane segment 5 on substrate affinity in yeast glucose transporter Hxt7. *Biochemistry*. 50:8674-8681.
- KHRAMTSOV, N.; MCDADE, L.; AMERIK, A.; YU, E.; DIVATIA, K.; TIKHONOV, A.; MINTO, M.; KABONGO-MUBALAMATE, G.; MARKOVIC, Z.; RUIZ-MARTINEZ, M.; HENCK, S. (2011). Industrial yeast strain engineered to ferment ethanol from lignocellulosic biomass. *Biores. Technol.* 102: 8310-8313.
- KLIMACEK, M., KIRL, E., KRAHULEC, S., LONGUS, K., NOVY, V., & NIDETZKY, B. (2014). Stepwise metabolic adaptation from pure metabolization to balanced anaerobic growth on xylose explored for recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbial Cell Factories*, 13(1), 1.
- KÖTTER, P. & CIRIACY, M. (1993). Xylose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol* 38:776-783

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- KRICKA, W., FITZPATRICK, J., & BOND, U. (2014). Metabolic engineering of yeasts by heterologous enzyme production for degradation of cellulose and hemicellulose from biomass: a perspective. *Front Microbiol*, 5, 174.
- KUYPER, M., HARHANGI, H. R., STAVE, A. K., WINKLER, A. A., JETTEN, M. S., DE LAAT, W. T., DEN RIDDER, J. J., OP DEN CAMP, H. J., VAN DIJKEN, J. P. & PRONK, J. T. (2003). High-level functional expression of a fungal xylose isomerase: the key to efficient ethanolic fermentation of xylose by *Saccharomyces cerevisiae*? *FEMS Yeast Res*, 4: 69-78.
- KUYPER, M., TOIRKENS, M. J., DIDERICH, J. A., WINKLER, A. A., VAN DIJKEN, J. P. & PRONK, J. T. 2005. Evolutionary engineering of mixed-sugar utilization by a xylose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae* strain. *FEMS Yeast Res*, 5: 925-934
- KVITEK, D. J. & SHERLOCK, G. (2013) Whole Genome, Whole Population Sequencing Reveals That Loss of Signaling Networks Is the Major Adaptive Strategy in a Constant Environment. *PLoS Genet* 9(11): e1003972. doi:10.1371/journal.pgen.1003972
- LAGUNAS R. (1993). Sugar transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Rev.* 10:229-242.
- LALUCE, C., SCHENBERG, A C GALLARDO JC, CORADELLO L F. & POMBEIRO-SPONCHIAD, S. R. (2012). Advances and developments in strategies to improve strains of *Saccharomyces cerevisiae* and process to obtain the lignocellulosic ethanol- a review. *Appl Biochem Biotechnol.* 166(8): 1908-1926
- LEANDRO, M.; GONÇALVES, P.; SPENCER-MARTINS, I. (2006) Two glucose/xylose transporter genes from the yeast *Candida intermedia*: first molecular characterization of a yeast xylose-H⁺ symporter. *Biochem. J.* 395, 543-549.
- LEANDRO, M. J., SPENCER-MARTINS, I. & GONÇALVES, P. (2008). The expression in *Saccharomyces cerevisiae* of a glucose/xylose symporter from *Candida intermedia* is affected by the presence of a glucose/xilose facilitator. *Microbiology* 154:1646:1655

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- LEANDRO, M. J., FONSECA, C. & GONÇALVES, P. (2009). Hexose and pentose transport in ascomycetous yeasts: an overview. *FEMS Yeast Res.* 9:511-525
- LEE, J. (1997). Biological conversion of lignocellulosic biomass to ethanol. *Journal of Biotechnology*, 56(1):1-24
- LEE, W.J.; KIM, M.D.; RYU, Y.W.; BISSON, L.F.; SEO, J.H. (2002). Kinetic studies on glucose and xylose transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 60, 186–191.
- LEE, S. M., JELLISON, T., & ALPER, H. S. (2014). Systematic and evolutionary engineering of a xylose isomerase-based pathway in *Saccharomyces cerevisiae* for efficient conversion yields. *Biotechnology for Biofuels*, 7(1), 1.
- LÖNN, A., TRÄFF-BJERRE, K.L., OTERO, R.R.C., ZYL, W.H.V. & HAHN-HÄGERDAL, B.(2003). Xylose isomerase activity influences xylose fermentation with recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strains expressing mutated *xyIA* from *Thermus thermophilus*. *Enzyme Microb Technol* 32: 567-573.
- LUCENA, B. T. L., SILVA-FILHO, E. A., COIMBRA, M. R., MORAIS, J. O. F., SIMÕES, D. A., & MORAIS JR, M. A. (2007). Chromosome instability in industrial strains of *Saccharomyces cerevisiae* batch cultivated under laboratory conditions. *Genet Mol Res*, 6(4), 1072-1084.
- MACEDO, I. C.; SEABRA, J. E. A.; SILVA, J. E. A. R. (2008). Greenhouse gases emissions in the production and use of ethanol from sugarcane in Brazil: The 2005/2006 averages and the prediction for 2020. *Biomass and Bioenergy* 32: 582-595.
- MADHAVAN, A., TAMALAMPUDI, S., USHIDA, K., KANAI, D., KATAHIRA, S., SRIVASTAVA, A., FUKUDA, H., BISARIA, V.S. & KONDO, A. (2009). Xylose isomerase from polycentric fungus *Orpinomyces*: gene sequencing, cloning, and expression in *Saccharomyces cerevisiae* for bioconversion of xylose to ethanol. *Appl Microbiol Biotechnol* 82:1067-1078.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- MATSUSHIKA, A., INOUE, H., KODAKI, T. & SAWAYAMA, S. (2009). Ethanol production from xylose in engineered *Saccharomyces cerevisiae* strains: current state and perspectives. *Appl Microbiol Biotechnol* 84:37-53.
- McMILLAN, J. D. (1993). Xylose fermentation to ethanol. A review (No. NREL/TP--421-4944). National Renewable Energy Lab., Golden, CO (United States).
- McMILLAN, J. (2004) Biotechnological Routes to Biomass Conversion. Disponível em: www.nrel.gov/docs/gen/fy04/36831g.pdf.
- MORIYA, H.; SHIMIZU-YOSHIDA, Y.; KITANO, H. (2006). *In vivo* robustness analysis of cell division cycle genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS Genet*, 2(7), e111.
- NANDY, T., SHASTRY S, KAUL, S. N.(2002).Wastewater management in a cane molasses distillery involving bioresources recovery. *J Env. Management*. 65:25-38
- NEVOIGT, E. (2008). Progress in Metabolic Engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 72: 379 – 412
- NIJLAND, J. G.; SHIN, H. Y.; DE JONG, R. M.; DE WAAL, P. P.; KLAASSEN, P.; DRIESSEN, A. J. (2014).Engineering of an endogenous hexose transporter into a specific D-xylose transporter facilitates glucose-xylose co-consumption in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology for Biofuels*. 2014. 7(1), 168.
- OREB, M., DIETS, H., FARWICK, A. & BOLES, E. (2012). Novel strategies to improve co-fermentation of pentoses with D-glucose by recombinante yeast strains in lignocellulosic hydrolyses. *Bioengineered*. 3(6):347-51.
- OSTERGAARD, S.; OLSSON, L.; NIELSEN, J. (2000). Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, v. 64, n. 1, p. 34–50.
- ÖZCAN, S., DOVER, J. & JOHNSTON, M. (1998).glucose sensing and signaling by two glucose receptors in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Embo. J.*, 17:2566-2573

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- PAIVA, D. P. (2016). Desenvolvimento de uma linhagem industrial de *Saccharomyces cerevisiae* para fermentação de amido. Tese apresentada na Universidade de Brasília. 137 p.
- PEREIRA JR., N., COUTO, M. A. P. G. & SANTA ANNA, L. M. M. (2008). Biomass of Lignocellulosic Composition for Fuel Ethanol Production within the Context of Biorefinery. Rio de Janeiro: UFRJ, 2. 46. (Series on Biotechnology).
- QI, X., ZHA, J., LIU, G. G., ZHANG, W., LI, B. Z., & YUAN, Y. J. (2015). Heterologous xylose isomerase pathway and evolutionary engineering improve xylose utilization in *Saccharomyces cerevisiae*. *Frontiers in Microbiology*, 6:1165.
- REIFENBERGER, E, BOLES, E. & CIRIACY, M. (1997). Kinetic characterization of individual hexose transporters of *Saccharomyces cerevisiae* their relation to the triggering mechanisms of glucose repression and their relation to triggering mechanisms of glucose repression. *Eur J Biochem* 245:324-333.
- REIS, V. C. (2012). Modificações genéticas em linhagem industrial de *Saccharomyces cerevisiae* para fermentação de xilose. Tese apresentada na Universidade de Brasília. 181 p.
- REIS V. C.;NICOLA, A. M.; DE SOUZA OLIVEIRA NETO O.; BATISTA, V. D.; DE MORAES, L. M.; TORRES, F. A. (2012b). Genetic characterization and construction of an auxotrophic strain of *Saccharomyces cerevisiae* JP1, a Brazilian industrial yeast strain for bioethanol production. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 39(11): 1673-1683.
- RINTALA, E., WIEBE, M. G., TAMMINEN, A., RUOHONEN, L. & PENTTILÄ, M. (2008). Transcription of hexose transporters of *Saccharomyces cerevisiae* is affected by change in oxygen provision. *BMC Microbiology*. 8:53
- RODRIGUES, J. A. R. (2011). Do engenho à biorrefinaria: a usina de açúcar como empreendimento industrial para a geração de produtos bioquímicos e biocombustíveis. *Química Nova*, 34(7), 1242-1254. Disponível em: <https://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422011000700024>

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ROMANÍ, A.; PEREIRA, F.; JOHANSSON, B.; DOMINGUES, L. (2015). Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* ethanol strains PE-2 and CAT-1 for efficient lignocellulosic fermentation. *Biores. Technol*, 17: 150-158.
- RUNQUIST, D.; HAHN-HAGERDAL, B.; RADSTROM, P. (2010). Comparison of heterologous xylose transporters in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Biofuels*. 3(5).
- RUNQUIST, D., FONSECA, C., RADSTROM, P., SPENCER-MARTINS, I. & HAHN-HAGERDAL, B. (2009). Expression of the Gxf1 transporter from *Candida intermedia* improves fermentation performance in recombinant xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 82: 123-130.
- SALOHEIMO, A., RAUTA, J., STASYK, O. V., SIBIRNY, A. A., PENTTILA, M. & RUOHONEN, L. (2007). Xylose transport studies with xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae* strains expressing heterologous and homologous permeases. *Appl Microbiol Biotechnol*, 74:1041-052.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. (2001). *Molecular cloning: A laboratory Manual*. Second edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- SAUER, B. (1996). Multiplex Cre/lox recombination permits selective site-specific DNA targeting to both a natural and an engineered site in the yeast genome. *Nucleic Acids Res*, 24 (23):4608-4613.
- SAIER, M. H. & CRASNIER, M. (1996). Inducer exclusion and the regulation of sugar transport. *Res Microbiol*. 147: 482-489.
- SARKAR, N.; GHOSH, S. K; BANNERJEE, S.; AIKAT, K. (2012). Bioethanol production from agricultural wastes: An overview. *Renewable Energy*. 37:19-27
- SCHULLER, D. & M. CASAL. (2005). The use of genetically modified *Saccharomyces cerevisiae* strains in the wine industry. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. 68:292-304

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- SEDLAK, M., & HO, N. W. (2004). Characterization of the effectiveness of hexose transporters for transporting xylose during glucose and xylose co-fermentation by a recombinant *Saccharomyces* yeast. *Yeast*, 21(8), 671-684.
- SOLIS-ESCALANTE, D., VAN DEN BROEK, M., KUIJPERS, N. G., PRONK, J. T., BOLES, E., DARAN, J. M., & DARAN-LAPUJADE, P. (2015). The genome sequence of the popular hexose-transport-deficient *Saccharomyces cerevisiae* strain EBY. VW4000 reveals LoxP/Cre-induced translocations and gene loss. *FEMS yeast research*, 15(2), fou004.
- SONDEREGGER, M. & SAUER, U. (2003). Evolutionary Engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for anaerobic growth on xilose. *Appl. Environ microbial.*69:1990-1998.
- SONG, W., DOMINSKA, M., GREENWELL, P. W., & PETES, T. D. (2014). Genome-wide high-resolution mapping of chromosome fragile sites in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(21), E2210-E2218.
- SU, Y. K., WILLIS, L. B., & JEFFRIES, T. W. (2015). Effects of aeration on growth, ethanol and polyol accumulation by *Spathaspora passalidarum* NRRL Y-27907 and *Scheffersomyces stipitis* NRRL Y-7124. *Biotechnology and Bioengineering*, 112(3), 457-469.
- SUBTIL, T. & BOLES, E. (2011). Improving L-arabinose fermenting *Saccharomyces cerevisiae* cells by heterologous expression of L-arabinose transporting sugar transporters. *Biotech for Biofuels*. 4:38
- SUBTIL, T. & BOLES, E. (2012). Competition between pentoses and glucose during uptake and catabolism in recombinant *Saccharomyces cerevisiae* cells by heterologous expression of L-arabinose transporting sugar transporters. *Biotech for biofuels*.5(1):14
- SUN, Y.; CHENG, J. (2002). Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Biores. Technol.* 83: 1–11.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- TAKAHASHI, T.; NOZAWA, M.; HARA, S.; MIZOGUCHI, H. (2003). High fidelity segregation of a YE_p vector in [cir⁰] strains of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biosci Bioeng.* 96(5):413-20.
- TANAKA, K., ISHII, Y., OGAWA, J. & SHIMA, J. (2012). Enhancement of Acetic Acid Tolerance in *Saccharomyces cerevisiae* by Overexpression of the HAA1 Gene, Encoding a Transcriptional Activator. *Appl Environ Microbiol.* 78(22): 8161–8163.
- TEIXEIRA, L C; LINDEN, J C. & SCHROEDER, H. A. (2007). Simultaneous saccharification and cofermentation of peracetic acid-pretreated biomass. *Appl Biochem. Biotech.* 84:11-127
- TRÄFF, K.L.; CORDERO, R.R.O.; VAN ZYL, W.H. & HAHN-HÄGERDAL, B. (2001) Deletion of the GRE3 Aldose Reductase Gene and Its Influence on Xylose Metabolism in Recombinant Strains of *Saccharomyces cerevisiae* Expressing the xylA and XKS1 Genes. *Appl. Environ Microbiol.* 67: 5668–5674
- TOIVARI, M. H.; SALUSJÄRVI, L.; RUOHONEN, L.; & PENTTILÄ, M. (2004). Endogenous xylose pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(6): 3681-3686.
- UNICA- Informações disponíveis online no site: www.unica.com.br. Acesso em Março/2013.
- UNTERGASSER, A., NIJVEEN, H., RAO, X, BISSELING, T., GEURTS, R., & LEUNISSEN, J.A.M. (2007). *Primer3Plus*, an enhanced web interface to *Primer3*. *Nucleic Acids Res* 35:W71-W74
- VAN DIJKEN, J. P. E., VAN DEN BOSCH, J. J., HERMANS, L. R., DE MIRANDA & SCHEFFERS, W.A. (1986). Alcoholic fermentation by “non fermentative” yeast. *Yeast* 2:123-127.
- VAN MARIS, A.J.A; WINKLER, A A; KUYPER, M; LAAT, W.T.A.M; DIJIKEN, JP & PRONK, J.T.(2007). Development of efficient xylose fermentation in *Saccharomyces*

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- cerevisiae*: Xilose isomerase as a key componet. Adv Biochem Engin/Biotechnol. 108:170-204
- VAN VLEET, J. H., & JEFFRIES, T. W. (2009). Yeast metabolic engineering for hemicellulosic ethanol production. Current Opinion in Biotechnology, 20(3), 300-306.
- VERDUYN, C., POSTMA, E., SCHEFFERS, W.A & DIJKEN, J.P.(1990). Physiology of *Saccharomyces cerevisiae* in anaerobic glucose-limited chemostat cultures. J. Gen Microbiol. 136:395-403
- VILELA, L. F.; DE ARAUJO, V. P.; PAREDES, R. S.; BON, E. P.; TORRES, F. A.; NEVES, B. C.; ELEUTHERIO, E. C. (2015).Enhanced xylose fermentation and ethanol production by engineered *Saccharomyces cerevisiae* strain. AMB Express.5(1), 16.
- WALFRIDSSON, M., BAO, X., ANDERLUND, M., LILIUS, G., BULOW, L. & HAHN-HÄGERDAL, B. (1996). Ethanolic fermentation of xylose with *Saccharomyces cerevisiae* harboring the *Thermus thermophilus* xylA gene, which expresses an active xylose (glucose) isomerase. Appl Environ Microbiol 62: 4648-4651.
- WAHLBOM, C. F., VANZYL, W. H., JONSSON, L. J., HAHN-HAGERDAL, B. & OTERO, R. R. (2003a). Generation of the improved recombinant xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae* TMB 3400 by random mutagenesis and physiological comparison with *Pichia stipitis* CBS 6054. FEMS Yeast Res, 3: 319-326.
- WAHLBOM, C. F.; OTERO, R. R. C.; VAN ZYL, W. H.; HAHN-HÄGERDAL, B.; JÖNSSON, L. J. (2003b) 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. Applied and Environmental Microbiology. 69(2), 740-746.
- WANG, M., YU, C., & ZHAO, H. (2015). Directed evolution of xylose specific transporters to facilitate glucose-xylose co-utilization. Biotechnology and Bioengineering 113(3):484-91

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- WANG, C.; BAO, X.; LI, Y.; JIAO, C.; HOU, J.; ZHANG, Q.; ZHANG, W.; LIU, W.; SHEN, Y.(2015b). Cloning and characterization of heterologous transporters in *Saccharomyces cerevisiae* and identification of important amino acids for xylose utilization. *Metabolic Engineering*. 30, 79-88.
- WEBER, C., FARWICK, A., BENISCH, F., BRAT, D., DIETZ, H., SUBTIL, T. & BOLES, E. (2010). Trends and challenges in the microbial production of lignocellulosic bioalcohol fuels. *Appl Microbiol Biotechnol* 87:1303-1315.
- WEIERSTALL, T.; HOLLENBERG, C. P.; BOLES, E. (1999) Cloning and characterization of three genes (SUT1–3) encoding glucose transporters of the yeast *Pichia stipitis*. *Molecular Microbiology*. 1999. 31(3), 871-883.
- WIECZORKE, R.; KRAMPE, S.; WEIERSTALL, T.; FREIDEL, K.; HOLLENBERG, C. P.; BOLES, E. (1999). Concurrent knock-out of at least 20 transporter genes is required to block uptake of hexoses in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS letters*. 464(3), 123-128.
- WHEALS, A.E., BASSO, L.C., ALVES, D.M.G., AMORIM, H.V. (1999). Fuel ethanol after 25 years. *Trends in Biotechnology*, 17 (12):482-487
- YOUNG, E., POUCHER, A., COMER, A., BAILEY, A., ALPER, H. (2011). Functional survey for heterologous sugar transport proteins, using *Saccharomyces cerevisiae* as a host. *Appl Environ Microbiol* 77:3311-3319.
- YOUNG, E. M., TONG, A., BUI, H., SPOFFORD, C., & ALPER, H. S. (2013). Rewiring yeast sugar transporter preference through modifying a conserved protein motif. *Proceedings of the National Academy of Sciences*.111(1), 131-136
- ZALDIVAR, J. BORGES, A., JOHANSSON, B., SMITS, H., VILLAS-BÔAS, S., NIELSEN, J., & OLSSON, L. (2002). Fermentation performance and intracellular metabolite patterns in laboratory and industrial xylose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 59, n. 4-5, p. 436–42,

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ZHAO, X., XIONG, L., ZHANG, M., & BAI, F. (2016). Towards efficient bioethanol production from agricultural and forestry residues: Exploration of unique natural microorganisms in combination with advanced strain engineering. *Bioresource Technology*. 215:84-91.

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

8. Anexos

8.1 Anexo 1: Lista de Linhagens desenvolvidas no trabalho

Linhagens	Característica	Referência
EBY.VW4000	MAT α leu2-3,112 ura3-52 trp1-289 his3- Δ 1 MAL2-8c SUC2 hxt17 Δ hxt13 Δ ::loxP hxt15 Δ ::loxP hxt16 Δ ::loxP hxt14 Δ ::loxP hxt12 Δ ::loxP hxt9 Δ ::loxP hxt11 Δ ::loxP hxt10 Δ ::loxP hxt8 Δ ::loxP hxt514 Δ ::loxP hxt2 Δ ::loxP hxt367 Δ ::loxP gal2 Δ stl1 Δ ::loxP agt1 Δ : :loxP ydl247w Δ : :loxP yjr160c Δ ::loxP snf3 Δ ::loxP rgt2 Δ ::loxP	Wieczorke <i>et al.</i> ,1999
EBYXI	EBY.VW4000 + pYXIXK (<i>XylA</i> , <i>XKS1</i> , Kan ^R)	presente trabalho
EBY280	EBY.VW4000 + pY280 (Kan ^R)	presente trabalho
EBY280HXT5	EBY280 + Y2STEF5 (<i>HXT5</i> , <i>URA3</i>)	presente trabalho
EBY280HXT5M	EBY280 + Y2STEF5 (<i>HXT5</i> mutado T234V, <i>URA3</i>)	presente trabalho
EBYHXT5	EBYXI + Y2STEF5 (<i>HXT5</i> , <i>URA3</i>)	presente trabalho
EBYHXT5x	EBYHXT5 adaptada em 10 repiques em xilose	presente trabalho
EBYHXT5A	EBYHXT5x evoluída em xilose e 2-DOG	presente trabalho
EBYHXT5M	EBYXI+ Y2STEF5 (<i>HXT5</i> mutado T234V, <i>URA3</i>)	presente trabalho
EBYHXT5Mx	EBYHXT5M adaptada em 10 repiques em xilose	presente trabalho
EBYHXT5Mi	EBYHXT5MX evoluída em xilose e até 0,5% 2-DOG	presente trabalho
EBYHXT5MA	EBYHXT5MX evoluída em xilose e 2-DOG final	presente trabalho
EBYHXT3	EBYXI+ Y2STEF5 (<i>HXT3</i> , <i>URA3</i>)	presente trabalho
EBYHXT3x	EBYHXT3 adaptada em 10 repiques em xilose	presente trabalho
EBYHXT3A	EBYHXT3x evoluída em xilose e 2-DOG final	presente trabalho
EBYHXT3M	EBYXI+ Y2STEF5 (<i>HXT3</i> mutado T210V, <i>URA3</i>)	presente trabalho
EBYHXT3Mx	EBYHXT3M adaptada em 10 repiques em xilose	presente trabalho
EBYHXT3MA	EBYHXT3MX evoluída em xilose e 2-DOG final	presente trabalho
EBYHXT7M	EBYXI+ Y2STEF5 (<i>HXT5</i> mutado T234V, <i>URA3</i>)	presente trabalho
EBYHXT7Mx	EBYHXT5M adaptada em 10 repiques em xilose	presente trabalho
EBYHXT7Mi	EBYHXT5MX evoluída em xilose em até 0,5% 2-DOG	presente trabalho
EBYHXT7MA	EBYHXT5MX evoluída em xilose e 2-DOG final	presente trabalho
JP1	linhagem industrial, diplóide, homotática (<i>MAT a</i> / α)	Silva-filho <i>et al.</i> , 2005
JPA GRE	<i>gre3Δ::loxP/gre3Δ::loxP</i>	presente trabalho
JPXI	JP1 + <i>XylA</i>	presente trabalho
JPXIXK1	JPXI + <i>gre3Δ::XKS1 / gre3Δ::XKS1</i>	presente trabalho
JPXIXK30.1	JPXIXK1 adaptada em 30 repiques em xilose	presente trabalho
JPXIXK30.2	JPXIXK1 adaptada em 30 repiques em xilose	presente trabalho
JPXIXK.F1	JPXIXK1 adaptada em 30 repiques em xilose	presente trabalho

8.2 Anexo 2: Artigo publicado



Review

Xylose Fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*: Challenges and Prospects

Danusa Nogueira Moysés ^{1,2}, Viviane Castelo Branco Reis ¹, João Ricardo Moreira de Almeida ³,
Lidia Maria Pepe de Moraes ¹ and Fernando Araripe Gonçalves Torres ^{1,*}

¹ Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília, Brasília, DF 70910-900, Brazil; danuzamoyses@petrobras.com.br (D.N.M.); vireis@unb.br (V.C.B.R.); lmoares@unb.br (L.M.P.M.)

² Petrobras Research and Development Center, Biotechnology Management, Rio de Janeiro, RJ 21941-915, Brazil

³ Embrapa Agroenergia, Laboratório de Genética e Biotecnologia, Parque Estação Biológica s/n, Av. W3 Norte, Brasília, DF 70770-901, Brazil; joao.almeida@embrapa.br

* Correspondence: ftorres@unb.br; Tel.: +55-61-3107-3119

Academic Editor: ChulHee Kang

Received: 30 November 2015; Accepted: 27 January 2016; Published: 25 February 2016

Abstract: Many years have passed since the first genetically modified *Saccharomyces cerevisiae* strains capable of fermenting xylose were obtained with the promise of an environmentally sustainable solution for the conversion of the abundant lignocellulosic biomass to ethanol. Several challenges emerged from these first experiences, most of them related to solving redox imbalances, discovering new pathways for xylose utilization, modulation of the expression of genes of the non-oxidative pentose phosphate pathway, and reduction of xylitol formation. Strategies on evolutionary engineering were used to improve fermentation kinetics, but the resulting strains were still far from industrial application. Lignocellulosic hydrolysates proved to have different inhibitors derived from lignin and sugar degradation, along with significant amounts of acetic acid, intrinsically related with biomass deconstruction. This, associated with pH, temperature, high ethanol, and other stress fluctuations presented on large scale fermentations led the search for yeasts with more robust backgrounds, like industrial strains, as engineering targets. Some promising yeasts were obtained both from studies of stress tolerance genes and adaptation on hydrolysates. Since fermentation times on mixed-substrate hydrolysates were still not cost-effective, the more selective search for new or engineered sugar transporters for xylose are still the focus of many recent studies. These challenges, as well as under-appreciated process strategies, will be discussed in this review.

Keywords: xylose; lignocellulosic ethanol; fermentation; *Saccharomyces cerevisiae*

1. Introduction

The rapid depletion of fossil fuel reserves, global warming, and geopolitical issues has triggered a worldwide quest for sustainable renewable energy sources. Several biofuels have been considered but bioethanol remains as the most widely used alternative to conventional fuels for several reasons, including its high octane value and efficient combustion.

Although some bacteria, such as *Zymomonas mobilis* and genetically-modified *Escherichia coli*, are capable of fermenting sugars [1], the yeast *Saccharomyces cerevisiae* is still the organism of choice for industrial production of ethanol. This is essentially due to its high ethanol tolerance and the ability to ferment under strictly anaerobic conditions. Additionally, unlike its prokaryotic counterparts, *S. cerevisiae* withstands low pH and is insensitive to bacteriophage infection, which is particularly relevant in large industrial processes.

Currently, bioethanol is produced either from starch or from the sucrose fraction of some edible agricultural crops, such as corn, sugar cane, and sugar beet. For economic and environmental reasons agricultural residues and other low-value sources of carbohydrates are highly considered for bioethanol production [2]. These include corn stover, sugar cane bagasse, wheat straw, non-recyclable paper, and switchgrass. Lignocellulosic biomass is essentially composed of cellulose, hemicellulose, pectin, and lignin [3], with glucose being the main sugar constituent, but pentose sugars, such as D-xylose and L-arabinose, may represent up to 20% [4]. Despite its immense potential, the use of lignocellulosic substrates for bioethanol production faces three main challenges:

1. A pre-treatment step involving the use of extreme physicochemical conditions and hydrolytic enzymes is required to release fermentable sugars [5,6];
2. Some compounds derived from the pre-treatment steps (e.g., furfuraldehydes, acetate, formate, phenolic derivatives) are known to inhibit fermentation [7,8];
3. Pentoses are not readily fermented by *S. cerevisiae* [3,9].

Although pentose fermentation is accomplished by non-*Saccharomyces* yeasts, such as *Kluyveromyces marxianus*, *Scheffersomyces (Pichia) stipitis*, *Pachysolen tannophilus*, and *Candida shehatae*, [10,11] they have not been considered for large-scale processes. Hence, most work involving pentose fermentation in yeast is focused on generating genetically-modified *S. cerevisiae* strains with heterologous xylose metabolic pathways. The challenges are innumerable and will be discussed in this review.

2. Xylose Metabolic Pathways

Xylose catabolism occurs through three different pathways in microorganisms, but only two have been introduced into *S. cerevisiae* (Figure 1) [12,13]. Filamentous fungi and some yeasts use an oxidoreductive pathway which involves two reactions. First, xylose is reduced to xylitol by a NAD(P)H-dependent xylose reductase (XR) encoded by *XYL1* [14]. Then, xylitol is oxidized to 5-xylulose by a NADP⁺-dependent xylitol dehydrogenase (XDH) encoded by *XYL2* [15]. Bacteria use a xylose isomerase pathway (XI) to convert xylose directly to 5-xylulose (reviewed in [16]). In both pathways, 5-xylulose is phosphorylated to 5P-xylulose, which is further metabolized through the pentose phosphate pathway (PPP) and glycolysis.

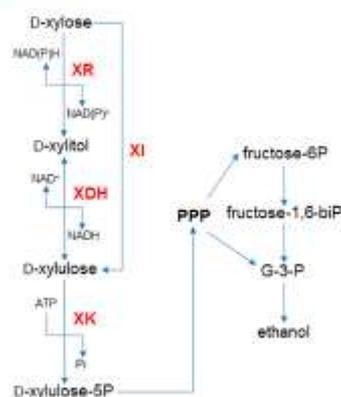


Figure 1. Xylose fermentation in *S. cerevisiae*. The fungal pathway uses xylose reductase (XR) and xylitol dehydrogenase (XDH), whereas the bacterial pathway uses xylose isomerase (XI). Both pathways produce D-xylulose which is converted to D-xylulose-5P by endogenous xylulokinase (XK). D-Xylulose-5P then enters the pentose phosphate pathway (PPP) where it is further metabolized to form ethanol under appropriate conditions. Arrows indicate the direction of the chemical reactions.

Unlike fungi and bacteria, Archae possess an oxidative xylose catabolic pathway. In this pathway, xylose is oxidized exclusively to the tricarboxylic acid cycle intermediate α -ketoglutarate through upon the action of xylose dehydrogenase, xylonate dehydratase, 2-keto-3-deoxyxylonate dehydratase, and α -ketoglutarate semialdehyde dehydrogenase [17]. This pathway shows similarities to proposed oxidative pentose degradation pathways to α -ketoglutarate found in few bacteria, e.g., *Azospirillum brasilense* and *Caulobacter crescentus*, and in the Archaeon *Sulfolobus solfataricus* [13]. Since this pathway involves many genes it has not been used yet to engineer *S. cerevisiae*. On the other hand, as will be discussed below, both XR/XDH and XI pathways have been extensively employed to construct *S. cerevisiae* strains capable of fermenting xylose with different rates of success.

3. Engineering *Saccharomyces* with the XR/XDH Pathway

Despite orthologous genes encoding functional XR and XDH have been identified in *S. cerevisiae*, this yeast is not able to grow solely on xylose [18,19]. Overexpression of native aldose reductase and xylitol dehydrogenase genes allowed growth on xylose, albeit with limited growth rates [20]. Even before this native pathway for xylose consumption was identified, heterologous pathways from naturally xylose-assimilating yeasts were used to engineer *S. cerevisiae*. The *S. stipitis* XR/XDH pathway is the most frequently used to engineer yeast for xylose fermentation, although an important limitation was identified; while XR preferentially uses NADPH as a cofactor, XDH exclusively uses NAD⁺ [16] (Figure 1). This leads to xylitol excretion due to cofactor imbalance, reducing carbon assimilation and ethanol production in the engineered strains. Several strategies have been employed to solve this problem, the redirection of carbon fluxes from NADPH to NADH consuming reactions being the most common denominator. This includes an adding external electron acceptor to the fermentation media [21,22], connecting furfuraldehyde reduction with xylose metabolism [23], altering the ammonium assimilation pathway [24], channeling carbon fluxes through a recombinant phosphoketolase pathway in a xylose-consuming strain [25], and altering cofactor preference of XR and XDH [26]. These strategies normally result in engineered strains with lower yields of xylitol production.

4. Engineering *Saccharomyces* with the XI Pathway

Despite presenting the advantage of not requiring pyridine nucleotide cofactors many prokaryotic XI (encoded by *xyIA*) showed no activity when expressed in *S. cerevisiae* [27–30]. This was attributed to several reasons, including protein misfolding, post-translational modification, improper disulfide bridge formation, sub-optimal internal pH, and absence of specific metal ions [31].

The first functional *xyIA* expressed in yeast was that from *Thermus thermophilus* which showed low activity at 30 °C because its maximal activity occurs at 85 °C [32]. A mutant *TixyIA* showed an improvement in ethanol yield at 40 °C, but no production occurred at 30 °C [33]. Since then, other prokaryotic XI were expressed in *S. cerevisiae* with moderate success [31,34–36].

The first successful recombinant *S. cerevisiae* carrying a XI pathway was obtained with the expression of the eukaryotic *xyIA* from the anaerobic fungus *Piromyces* sp E2 [37]. The recombinant strain showed considerably high XI activity of 1.1 U · mg⁻¹, but still low growth rates in xylose under aerobic conditions and no growth in anaerobiosis. Prolonged adaptation in xylose under anaerobic conditions resulted in the isolation of a strain (RWB202-AFX) which showed a specific growth rate of 0.03 h⁻¹ and ethanol yield of 0.42 g · g⁻¹ [38].

The poor rates of xylose fermentation in *S. cerevisiae* have been attributed to xylitol formation, by the activity of an endogenous non-specific aldose reductase (Gre3) and limited activity of xylulokinase (XK) and non-oxidative PPP enzymes [30]. In an attempt to overcome these metabolic bottlenecks, the genes encoding XK, ribulose 5-phosphate isomerase, ribulose 5-phosphate epimerase, transketolase, and transaldolase were overexpressed in strain RWB202-AFX and GRE3 was deleted [39]. The resulting strain was submitted to anaerobic adaptation in xylose and a clone (RWB218) was obtained with a specific growth rate of 0.12 h⁻¹ and ethanol yield of 0.41 g · g⁻¹ [40]. Additionally, in batch fermentation in wheat straw hydrolysate the ethanol yield approached the theoretical value (0.51 g · g⁻¹) in 55 h and

xylitol production was not observed; in fed-batch fermentation on corn stover hydrolysate, ethanol yield was $0.46 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$ after 35 h [30]. Likewise, *xylA* from the fungus *Orpinomyces* was functionally expressed in *S. cerevisiae* showing high activity ($1.91 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$), but the resulting strain showed slow growth in xylose [41]. This strain was further modified by overexpressing *XKS1* (which encodes XK) and a heterologous sugar transporter (*PsSUT1*) following evolutionary engineering. When grown in a complex medium supplied with 0.01 M borate at 35°C the resulting strain showed an increment on the growth rate (0.133 h^{-1}), ethanol production ($Y_E = 0.48 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$ and $Q_E = 0.191 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$), and low xylitol production ($0.04 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$) [41,42].

XI from the anaerobic bacterium *Clostridium phytofermentans* (*CpXylA*) was successfully expressed in an industrial *S. cerevisiae* strain [43]. The main advantage of *CpXylA* is that it shows low susceptibility to xylitol inhibition with a K_i three times smaller than that of *PyXylA*. Anaerobic batch fermentation with the recombinant yeast strain expressing *CpXylA* showed ethanol productivity of $0.03 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ and ethanol yield of $0.43 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$, with xylitol production of $0.18 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$. XI and XK from *Prevotella ruminicola* were co-expressed in *S. cerevisiae*, which was also submitted to evolutionary engineering, resulting in a 3.8-fold increase in specific growth rate (0.23 h^{-1}). Microaerobic fermentation using the adapted strain in xylose showed $0.041 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ productivity, $4.8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ xylitol, and 82.9% of the theoretical ethanol yield [44].

An evolved recombinant yeast expressing *Burkholderia cenocepacia xylA* showed the best ethanol yield ($0.45 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$) and productivity ($0.42 \text{ g} \cdot \text{cell}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) described so far. This strain does not accumulate xylitol and co-consumes glucose and xylose under anaerobic conditions [45,46]. Recently, the activity of four *xylA* genes from mammal gut bacteroidetes (*Bacteroides vulgatus*, *Tannerella* sp., *Paraprevotella xylaniphila*, and *Alistipes* sp.) were assessed in two *S. cerevisiae* strains: one overexpressing XK and non-oxidative PPP enzymes and with a disrupted *GRE3* gene, and another with an additional disruption of *CYC3* [47]. Both strains were evolved in xylose medium with a plasmid expressing XI from *B. vulgatus*. After that, the adapted strain was cured and transformed with plasmids expressing *xylA* from the other different sources described above. All recombinant clones were able to ferment xylose, thus highlighting the usefulness of a xylose-adapted strain to screen for XI activity in *S. cerevisiae*.

It is known that *S. cerevisiae* naturally metabolizes xylulose [48]. This observation led to an interesting approach for ethanol production which is based on the secretion of XK. The cell surface display of *XylA* from *Clostridium cellulovorans*, together with overexpression of *ScXKS1*, led the recombinant yeast to produce $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ethanol under anaerobic conditions [49].

5. Additional Genetic Modifications

From the results shown above it is clear that the simple introduction of the XR/XDH or XI pathways is not enough to ensure effective xylose fermentation by the recombinant yeast. Kinetic modeling shows that a higher level of XK expression and overexpression of sugar transporters (which will be discussed later) are the most advantageous modifications in recombinant yeast [50]. However, overexpression of XK may affect yeast growth and ethanol production [51]. Other important enzymes for xylose metabolism are non-oxidative PPP enzymes with transaldolase playing a key role as it limits xylose flux [52].

Other important genetic modifications involve the elimination of competitive pathways and the increase of cofactor regeneration in oxidoreduction pathway. Competitive pathways can convert intracellular xylose to xylitol, thus leading to xylitol accumulation. In the case of the XI pathway, xylitol accumulation is undesirable not only by draining intracellular xylose, but also it inhibits most XI and breaks metabolic flux [53]. In *S. cerevisiae* the deletion of *GRE3*, an unspecific aldose reductase that can convert xylose to xylitol [54], is an important step to decrease xylitol production [55]. In the case of the oxidoreduction pathway, the overexpression of *GDP1* (a fungal NADP⁺-dependent D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Kluyveromyces lactis*) regenerates NADPH without CO₂ production, thus facilitating anaerobic xylose fermentation. Additionally, deletion of *ZWF1* (glucose-6-phosphate dehydrogenase), which catalyzes the first step of the pentose phosphate pathway,

avoids competition for NADPH production [56]. Additionally, deletion of *PHO13* (a phosphatase) in recombinant yeast overexpressing *S. stipitis* *XYL3* (XK), increased yeast growth and ethanol production in a xylose medium [57].

In silico models are an important tool to analyze an engineered microorganism for the efficient production of a desired product from new substrates. One such model proposes that in recombinant yeast for the oxidoreduction pathway, the deletion of the NADP⁺-dependent glutamate dehydrogenase gene (*GDH1*) and overexpression of the NAD⁺-dependent *GDH2* increases the specificity of XR for NADH [23]. This strategy led to decreased xylitol byproduct and increased ethanol yield. Other examples show that when *GAPN* (non-phosphorylating NADP⁺-dependent glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase) is expressed in xylose-recombinant yeast, ethanol yield increases up to 25% in a glucose/xylose mixture with reduction in glycerol and xylitol formation [58].

Furthermore, these genetic modifications more directly linked to xylose consumption pathway, and there are some others genes detected through synthetic genomic array (SGA) whose modification affected xylose consumption. SGA identified four genes (*ALP1*, arginine transporter; *ISCI*, mitochondrial membrane-localized inositol phosphosphingolipid phospholipase; *RPL20B*, component of 60S larger ribosomal subunit; *BUD21*, a component of small ribosomal subunit) that, when individually deleted, improved xylose consumption to levels similar to those of recombinant XI/XK yeasts [59]. Although it is not clear how these genes act on xylose metabolism this result shows that adjustments on these unpredicted targets are important in order to obtain improvements in xylose consumption.

6. Evolutionary Engineering

As mentioned previously, the introduction of a xylose pathway in *S. cerevisiae* is not enough to promote efficient conversion of xylose to ethanol since it is often the case that a desired phenotype is not associated to a single gene or to any obvious modification [60]. Pathway networks often interact with each other, as well as with the exogenous pathway, promoting many challenges for the production of the desired product [61]. Additionally, overexpression or gene knockout is not sufficient to obtain the expected outcome, as it is often needed to perform extensive transcription re-programming according to metabolic flux.

One method which permits the selection of simultaneous genetic modifications in network pathways in order to improve its performance is evolutionary engineering, involving reprogramming the cell's innate metabolism at different levels. This method is based on adaptive evolution, a natural process in which organisms undergo mutations that confer a tolerance to environmental changes [62]. Natural evolution is slow, but there are means to accelerate this process, mainly for microorganisms because of their fast growth. The microorganism is placed under environmental selection and after some time the survived population will exhibit the desired phenotype due to "natural" mutations which permitted adaptation. Another approach involves yeast mutagenesis (chemical or physical), followed by selection of the desired phenotype. For example, when *S. cerevisiae* with no genetic modifications for xylose consumption was evolved in xylose medium, the resulting strain had the activities of endogenous XR and XDH increased seven- and 60-fold, respectively [63].

Combining mutagenesis and evolutionary engineering approaches is often the best choice to obtain the desired phenotype. For example, after recombinant TMB3001 yeast strain expressing *XYL1*, *XYL2I*, and *XKS1* was submitted to EMS mutagenesis, followed by three rounds of metabolic adaptation, some isolated clones had improved ethanol production and others only consumed xylose [64]. Other works involving adaptive evolution of the oxidoreduction pathway report improved ethanol production [65–67].

A recombinant industrial strain for *CpXylA* was submitted to EMS mutagenesis, genome shuffling, and evolutionary engineering in a complex medium with D-xylose [68]. The resulting strain produced 32% more ethanol than the parental strain and XI activity had a 17-fold improvement. In another study, a recombinant strain for *PyXylA* was obtained with overexpression of PPP enzymes and XK and

was further submitted to evolutionary engineering. The final strain showed one of the best ethanol productions so far ($Y_E = 0.438 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$, $Q = 0.687 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$), with a specific growth rate of 0.148 h^{-1} and very low xylitol production ($Y_X < 0.01 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$) [69]. Inverse metabolic engineering identified 32 copies of *PyXylA* in the final evolved strain and global transcriptional analysis showed that the xylose pathway and PPP had overexpressed genes. Additionally, the fermentative pathway and amino acids metabolism genes showed altered levels of expression in the evolved strain.

The amplification of gene-encoding XI seems to be an important consequence of yeast evolutionary adaptation on xylose. Recently, it was shown that the adaptation on xylose of an industrial yeast strain carrying integrated *CpXylA* involved the formation of an extrachromosomal circular DNA element (eccDNA) intermediate [70]. This intermediate, which carried *CpXylA* and an ARS (autonomous replicating sequence) element, eventually integrated in tandem at the original locus, resulting in a strain with high xylose fermentation capacity.

A powerful genetic tool called global transcription machinery engineering (gTME), which allows reprogramming the innate metabolism of the cell by creating mutations in key proteins involved in transcription, has been successfully used to perform global transcription changes. For example, an improvement in ethanol and glucose tolerance in yeast was obtained by using a *spt15* mutant library [71]. *SPT15* is a TATA-binding protein which has an important role in promoter specificity. Additionally, new genes involved in ethanol tolerance were identified by using gTME [72]. Despite its usefulness, few works have described the use of this technique for xylose consumption. When gTME was applied in *S. cerevisiae* for xylose fermentation, the final strain had improved the capacity to consume xylose, but ethanol production had decreased [73]. In another work, gTME was used to adapt *S. cerevisiae* to corn cob hydrolysate as a substrate [74]; the resulting strain produced $11.9 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ethanol after 71 h.

7. Xylose Uptake

Many *S. cerevisiae* strains have been genetically engineered for the conversion of xylose into ethanol by improving metabolic flux for xylose utilization [75]. Most of them rely on the capacity of endogenous hexose transporters for xylose uptake, since *S. cerevisiae* lacks a xylose-specific transport system. Studies using evolutionary engineering strategies to obtain fast xylose-utilizing yeast resulted in increased expression of hexose transporters in the evolved strain [40,46,76]. Overexpression of both heterologous and native transporters may improve ethanol productivity [77–80]. However, the lack of efficient xylose transporters is only evident when xylose metabolism is not rate-limiting or when xylose concentration decreases down to 0.05%–0.4%, due to the low affinity of nonspecific transporters [75,78].

S. cerevisiae has 18 hexose transporters (Hxt1–17 and Gal2) capable of transporting glucose into the cell, although only seven (Hxt1–7) are responsible for glucose internalization acting as facilitators. They are divided into three types of glucose transporters according to their affinities for glucose: high-affinity transporters Hxt6, Hxt7, and Gal2 (with K_m 1–2 mM); intermediate-affinity transporters Hxt2, Hxt4, and Hxt5 (with K_m ~10 mM); and low-affinity transporters Hxt1 and Hxt3 (with K_m 50–100 mM) [81,82]. The Hxt7, Hxt5, Gal2, Hxt1, and Hxt4 transporters are xylose-permissive, taking up xylose with 200-fold lower affinity and slower rates, depending on the concentration of xylose and glucose outside the cell [83,84]. Hxt7 and Hxt5 seem to be the main transporters responsible for xylose uptake when xylose is the only carbon source available or in co-fermentation when glucose reaches low levels [84]. High concentrations of glucose (>200 mM) severely represses *HXT7* and *HXT5* transcription, while inducing transcription of *HXT1* and *HXT3*, but when glucose concentration drops below 2% in the mixed sugar medium, *HXT4* transcription is induced and, as fermentation proceeds and xylose progressively becomes more available than glucose, *HXT5* is de-repressed and *HXT7* transcription is induced (by low levels of glucose) [83]. *HXT5* and *HXT7* are also expressed in the absence of glucose when *HXT4* and *HXT1* transcription decrease. *HXT1* showed the highest level of expression when glucose was fermented, while *HXT7* had the highest level when xylose was fermented [80,83]. It was shown that a low concentration of glucose ($0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) could improve xylose

utilization, when compared with xylose alone [85]. This should be due to the inducible increase in the expression of *HXT7* by low glucose levels. *GAL2* transcription is repressed in the presence of glucose, but when constitutively expressed, Gal2 and Hxt7 exhibited the highest xylose uptake rates between the endogenous hexose transporters [84] (Table 1).

Glucose and xylose should be co-consumed to reduce fermentation time and to reach productivity compatible to industrial economically-viable processes. However, xylose is usually consumed only after significant glucose depletion from the medium, therefore displaying diauxic fermentation [66]. Simultaneous utilization of xylose and glucose was shown to be limited due to inhibition of xylose uptake by glucose. Since the endogenous hexose transport system favors glucose even when glucose metabolism was disrupted, the inhibitory effect of glucose over the use of xylose remains [86]. To overcome this, several putative genes or known heterologous xylose transporters and engineered endogenous transporters were expressed in *S. cerevisiae* in the last decade [87–92] (Table 1). The development of hexose transporter-null strains, such as EBY.VW4000 in which more than 20 hexose transporter genes were deleted, was an important tool for screening and characterization of new transporters by functional complementation of growth on glucose [93], or xylose when a xylose pathway is introduced [84,87,89,91,94]. A strain was used for transporter screening and evolution based on a hexose transporter-null strain with an introduced xylose pathway and disrupted glucose metabolism [95]. The resulting strain was unable to grow on glucose alone, even when a functional hexose transporter was expressed. However, it could grow on mixed sugars if the transporter favored the uptake of xylose over glucose. This was a useful tool for developing transporters with new properties, like enhanced affinity for xylose with no inhibition by glucose.

Unlike *S. cerevisiae*, there are many natural pentose-assimilating species having both low-affinity and high-affinity sugar transport systems for xylose uptake, comprising proton symporters and facilitated-diffusion transporters. Numerous putative genes emerging from increasing genome data seems to be good candidates for new xylose-specific heterologous transporters. More than 80 heterologous transporters have already been expressed in *S. cerevisiae*. *SUT1*, *SUT2*, *XUT1*, *XUT3* (*Xyp33*), *XUT4*, *Xyp29* (*STL12*), *SUT3* (*Xyp37*) from *S. stipitis* [89–91,96,97], *GXS1* and *GXF1* from *Candida intermedia* [87,90], At5g59250 from *Arabidopsis thaliana* [77], An29-2 and An25 from *Neurospora crassa* [89], and *xtrD* from *Aspergillus nidulans* [92], MgT05196 from *Meyeromyces guilliermondii* [98] and *Xylh* from *Debaryomyces hansenii* [99] have been shown to enable the *HXT*-null *S. cerevisiae* strains to transport xylose. More than 80 percent of these surveyed genes annotated as putative or known sugar transporters were not functional in *S. cerevisiae*, probably due to misfolding or improper localization. While most of them showed preference for glucose over xylose, just three of them were characterized as xylose-specific transporters: An25 and *Xyp29* are xylose facilitators, with no glucose uptake activity [89], and recently-reported *Xut1*, also transport glucose, but with lower affinity and lower V_{max} when compared with xylose uptake kinetic parameters (Table 1) [97]. *Gxs1*, a glucose/xylose H⁺ symporter, was the first proton symporter from yeast reported that could transport xylose against the concentration gradient [87]. As expected for this type of transporter, it had a high affinity for xylose compared with other transporters (Table 1), but the uptake activity was very slow and the affinity for glucose was higher than for xylose. A conserved motif (G-G/F-XXXG) was identified based on the sequence similarity of *GXS1* with other xylose transporter genes and were able to improve the V_{max} two-fold by modifying residues F³⁸I³⁹M⁴⁰ [91]. This approach was responsible for changing selectivity of the transporter which no longer transported glucose. This result could be used to rewire the native hexose transporter *Hxt7* and *Rgt2* from *S. stipitis* into xylose-specific transporters (by modifying I³⁹M⁴⁰ and F³⁸M⁴⁰, respectively). However, in all these cases, the uptake activities of these heterologous transporters were too low to dramatically improve co-fermentation productivity [78,89,91,99].

Table 1. Kinetic parameters of yeast glucose/xylose transporters.

Transporter	Strain/Plasmid Construction	Strain Characteristics	Xylose		Glucose		Reference
			K_m (mM)	V_{max} (nmol/min/mg)	K_m (mM)	V_{max} (mmol/min/mg)	
ScHxt1	H2219/pYX212-HXT1	$\Delta hxt1-7\Delta gal2$	880 ± 8	750 ± 94	NR	NR	[88]
ScHxt1	KY73/HXT1mnX-pVT	$\Delta hxt1-7\Delta gal2$	NR	NR	46	NR	[100]
ScHxt2	H2219/pYX212-hxt2	$\Delta hxt1-7\Delta gal2$	260 ± 130	340 ± 10	NR	NR	[88]
ScHxt2	KY73/HXT2mnX-pVT	$\Delta hxt1-7\Delta gal2$	NR	NR	3.3	NR	[100]
ScHxt4	H2219/pYX212-HXT4	$\Delta hxt1-7\Delta gal2$	170 ± 120	190 ± 23	NR	NR	[88]
ScHxt7	H2219/pYX212-HXT7	$\Delta hxt1-7\Delta gal2$	130 ± 10	110 ± 7	NR	NR	
ScHxt7	EBY.VW4000/pRS62N-HXT7	$\Delta hxt1-17 \Delta gal2$ $\Delta stl1 \Delta agt1 \Delta mph2$	200.3 ± 13.2	67 ± 2	0.5 ± 0.1	26 ± 1.1	[94]
ScHxt7 (N370S)	EBY.VW4000/pRS62N-HXT7-N370S	$\Delta mph3 \Delta yjl247w$ $\Delta ytr160c$	169.9 ± 26.3	24.1 ± 1.6	10.8 ± 1.0	47.3 ± 1.2	
ScHxt7			NR	NR	0.67 ± 0.05	610 ± 60 *	[100]
ScHxt7 (T213V)	KY73/HXT7mnX-pVT	$\Delta hxt1-7\Delta gal2$	NR	NR	0.40 ± 0.02	120 *	[101]
ScHxt7 (D340C)			NR	NR	0.43 ± 0.05	430 ± 40 *	[100]
ScGal2	EBY.VW4000/pRS62N-GAL2	$\Delta hxt1-17 \Delta gal2$ $\Delta stl1 \Delta agt1 \Delta mph2$	225.6 ± 15.8	91.3 ± 3.2	1.5 ± 0.2	27.2 ± 0.9	[94]
ScGal2 (N376F)	EBY.VW4000/pRS62N-GAL2-N376F	$\Delta mph3 \Delta yjl247w$ $\Delta ytr160c$	91.4 ± 8.9	37.3 ± 1.3	ND	BD	[91]
CiGxf1	TBM3201/pHxt7-CXF1	$\Delta hxt1-17 \Delta gal2$ $\Delta stl1 \Delta agt1 \Delta mph2$	48.6 ± 6.5	64.19	2.0 ± 0.6	10.5	[87]
CiGxs1	TBM3201/pHxt7-GXS1	$\Delta mph3$	0.4 ± 0.1	6.5 ± 1.5	0.012 ± 0.004	4.3 ± 0.3	
CiGxs1		$\Delta hxt1-17 \Delta gal2$ $\Delta stl1 \Delta agt1 \Delta mph2$	0.026 ± 0.066	0.0072	NR	NR	
CiGxs1 P ³⁸ P ³⁹ M ⁴⁰	EBY.VW4000/p414-TEF-CiGXS1	$\Delta mph3 \Delta yjl247w$ $\Delta ytr160c$	0.721 ± 0.116	0.015	NR	NR	[91]
SsSut1	RE700/YEpSUT1	$\Delta hxt1-7$	145 ± 1.0	132 ± 1.0	1.5 ± 0.1	45.0 ± 1.0	[96]

Table 1. Cont.

Transporter	Strain/Plasmid Construction	Strain Characteristics	Xylose		Glucose		Reference
			K_m (mM)	V_{max} (nmol/min/mg)	K_m (mM)	V_{max} (mmol/min/mg)	
SsSut4	EBY.VW4000/pRS316-TDHP-SUT1	$\Delta hxt1-17 \Delta gal2$	16.6 ± 0.3	122 ± 2.4	1.3 ± 0.1	105 ± 4.2	[99]
SsXut1	EBY.VW4000/pRS316-TDHP-XUT1	$\Delta stl1 \Delta agt1 \Delta mph2$	0.46 ± 0.02	116 ± 5.8	0.91 ± 0.01	80 ± 1.0	
SsXyp29	EBY.VW4000/pRS429-HXT7p-XYP29	$\Delta mph3 \Delta yjl247w$ $\Delta ytr160c$	56 ± 9.4	0.69 ± 0.04	BD	BD	[89]
NcAn25	EBY.VW4000/pRS429-HXT7p-AN25		175.7 ± 21.4	0.61 ± 0.05	BD	BD	
DhXylh	W303-1A/pRS42K-XYLH		1.4 [†]	1.6 [†]	NR	NR	[99]
ScHxt36			108	62.5	6	60	
ScHxt36 (N367I)	D8715054/pRS313-HXT7p-HXT36	$\Delta gk1 \Delta hxt1 \Delta ark2 \Delta gal1$	40	23	ND	ND	[102]
ScHxt36 (N367A)			25	29	171	71	

V_{max} = mmol/min/mg DW (dry weight); NR, not reported; ND, not determinable; BD, below detectable limit; [†] K_m and V_{max} were calculated dismissing the influence of endogenous transport system; * V_{max} = pmol/10⁷ cells/5 s; Sc = *Saccharomyces cerevisiae*; Ci = *Candida intermedia*; Ss = *Scheffersomyces stipitidis*; Nc = *Neurospora crassa*; Dh = *Debaryomyces hansenii*.

As summarized on Table 1, the native hexose transporters showed the highest xylose uptake activities, even when compared with xylose-specific transporters, like *CiGsx1* ($E^{38}P^{39}M^{40}$), *SsXyp29*, *NcAn25*, and *SsXut1*. Actually, when *HXT7* was constitutively overexpressed in an *HXT*-null xylose-consuming strain, it could ferment xylose at similar rates as glucose when each sugar was the only carbon source. However, as expected, in mixed sugar medium xylose fermentation was delayed [80]. For *Hxt7*, substrate affinity ($1/K_m$ value) is more than 200-fold higher for glucose than for xylose, making this sugar a second choice sugar when competing with glucose, even when glucose is in low concentration. Hence, metabolic engineering strategies to reduce endogenous hexose transporter affinity for glucose or to raise the affinity for xylose—in a way that xylose becomes the first choice sugar in co-fermentation—would probably bring the productivity of ethanol to similar rates as glucose fermentation in a non-xylose-metabolic-rate-limiting strain. Under this scenario, the use of structural characterization data available for *Hxt7* and *Gal2*, with determination of crucial residues involved in glucose affinity, selectivity, and translocation of substrate [100,101], together with the strain developed for evolution and screening of transporters described above [95], boosted studies of evolution of native transporters. A strain with evolved *Hxt7* and *Gal2* transporters that were no longer inhibited by glucose, after mutating a single residue, *Hxt7* (N370S) and *Gal2* (N376F) were obtained [94] (Table 1). This substitution led to a decrease in V_{max} for both transporters, and completely abolished glucose uptake from *Gal2*. All of the mutated transporters uninhibited by glucose had a mutation at either N370/376 or Y213/219 residues already pointed out elsewhere [101]. Using a similar strategy for transporter evolution, a chimeric *Hxt36*, a functional glucose transporter constructed by *Hxt3*-*Hxt6* fusion, was evolved [102]. That study used a more severe selection pressure (growth on 0.5%–1% xylose with increasing glucose up to 10%) to obtain an *Hxt36* (N367I) transporter, which did not allow growth on glucose (slow growth on xylose) and, by rational amino acid substitution, an *Hxt36* (N367A) transporter with lower affinity for glucose than xylose. A strain harboring *Hxt36* (N367A) was able to co-ferment glucose and xylose, although consumption rates were lower than for glucose alone, probably due to the reduction in V_{max} for xylose (Table 1) [102]. The position N367 of *Hxt36* corresponds to the same N370/376 seen before for *Hxt7* and *Gal2* [94]. As hexose transporter sequences are conserved, these studies of structural homology could be applied to predict rational designs for rewiring new xylose transporters. In conclusion, the strategy of transporter evolution seems to be a promising way to obtain an efficient xylose transporter with high and moderate affinities, such as those encountered in glucose transporters.

8. Effects of Lignocellulosic Hydrolysate Inhibitors on Xylose Fermentation

Monosaccharides from cellulose and hemicellulose fibers of biomass must be released before yeast fermentation. For this, a pre-treatment step, which involves the use of extreme physicochemical conditions and an enzymatic hydrolysis step, is applied. In addition to monomeric sugars, several other compounds are released and formed during liquefaction of biomass in the pre-treatment and hydrolysis steps. Indeed, lignocellulosic hydrolysates contain several other compounds and several of them inhibit yeast metabolism. The common groups are organic acids (most usual is acetic acid, derived from hemicellulose deacetylation); furaldehydes (furfural and 5-hydroxymethyl-furfural, formed by dehydration of pentoses and hexoses, respectively); and phenolic derivatives (generated from lignin breakdown) (reviewed in [103]). The presence and concentration of these compounds will vary according to the biomass used, pre-treatment, and hydrolysis conditions [103]. However, even in lower concentrations, these compounds can inhibit yeast metabolism, prolonging the lag phase, damaging cellular membranes, and leading to cytoplasm acidification, thus reducing ethanol yield and productivity [6].

Yeast tolerance to lignocellulosic derived inhibitors is not only strain-dependent, but also dependent of the carbon source to be fermented, once yeast is much more affected when fermenting xylose than glucose [104–107]. Yeast shows much slower sugar consumption rate for xylose and this may lead to depletion of key metabolites and cofactors that might be especially important in

stressful conditions imposed by lignocellulosic hydrolysates [108]. Thus, a number of strategies to improve xylose fermentation performance and concurrently reduce the influence of lignocellulosic hydrolysate inhibitors on recombinant strains have been developed, including construction of recombinant strains expressing detoxifying enzymes [23], transcription factors [106], mutagenesis and breeding [105,109], and evolutionary engineering strategies to increase tolerance to single inhibitors or to the hydrolysate [105,110]. In addition, strategies to improve yeast tolerance by propagation on hydrolysate media before hydrolysate fermentations have been shown to improve yeast performance [111,112]. Despite the success of some strategies, few of the improvements towards lignocellulosic hydrolysate inhibitors were performed in industrial strains. Thus, further studies are needed to elucidate the interactions of xylose metabolism with inhibitor tolerance, and are especially important to generate new, robust industrial strains.

9. Insights on Industrial Application

Certainly, there will be no single solution for the development of a yeast (or yeast strains) suitable to all xylose industrial fermentation processes since the challenges discussed above are more or less critical depending on process configurations. For example, xylose uptake is still a challenge only if xylose is co-fermented with glucose; however, adaptation or genetic modification to improve tolerance to inhibitors presented in the hydrolysate would be a greater challenge. The hydrolysate contains inhibitors, such as furanals, phenolic compounds, and weak acids, e.g. acetic acid. This acid is intrinsically related with biomass deconstruction, the advances in pre-treatment process technologies could avoid high levels of the first two inhibitors; however, acetic acid concentration would increase with the improved biomass deconstruction [26]. Under large scale fermentations conditions, there are still more desirable adaptations to tolerate (pH, temperature, high ethanol, and other stress fluctuations), which lead the search for yeasts with more robust backgrounds, like industrial strains, as engineering targets. As presented above, a good fermentation productivity on hydrolysate was achieved by using a genetically-modified industrial strain submitted to evolutionary engineering on hydrolysate, and, additionally, genes that are related to stress tolerance were identified [68]. Recently, the influence of addition of hydrolysate during yeast propagation using an industrial xylose consuming *S. cerevisiae* was shown [112]. This strategy had a huge effect on yeast performance, increasing the final ethanol production yields by 80%.

Although there are plenty of studies on the development of new strains for xylose fermentation, few works have focused on process strategies using these yeasts. A process strategy largely used in first generation ethanol production from sugar cane for cost reduction is cell recycling. A study using immobilized recombinant yeast cells for fermentation of corn stover hemicellulosic hydrolysate showed the possibility of recycling cells for five batches with no significant reduction in ethanol yield [113]. In a process with cell recycling, it would be expected that the diauxic fermentation of mixed sugars could be, to some extent, desirable to control the replacement of a developed and adapted xylose-consuming strain from some derived population less efficient for xylose fermentation. This could lead to the selection of a more robust xylose fermenting population.

10. Conclusions

With the global interest in sustainable development with the use of lignocellulosic residues to produce biofuels and other value-added products in the context of biorefineries, it is of utmost importance to improve the ability of *S. cerevisiae* to metabolize xylose. There are still many metabolic bottlenecks that need to be addressed, such as xylose uptake, improvement of catalytic efficiency of xylose isomerases, xylitol formation, and increased specific growth in xylose. In addition to genetic modification by the introduction/modification of native or exogenous metabolic pathways, it is clear that adaptive engineering plays a crucial role in this process. Due to the metabolic complexity involved in the development of xylose-fermenting yeast it is important to use metabolic engineering associated with other modern techniques, such as gTME to accelerate physiological adaptation in

xylose. The careful optimization of the engineered yeast by the use of a combination of different approaches should represent a forthcoming challenge. Finally, studies on process strategies with a large variety of newly-developed xylose-fermenting strains should be encouraged in order to establish an economically viable industrial process for ethanol production from xylose-containing lignocellulosic hydrolysates.

Acknowledgments: This work was supported by CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Brazil), CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Brazil) and Petrobras.

Author Contributions: All authors contributed equally in writing this review.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Dien, B.S.; Cotta, M.A.; Jeffries, T.W. Bacteria engineered for fuel ethanol production: Current status. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2003**, *63*, 258–266. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. 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* **2006**, *311*, 506–508. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Van Maris, A.J.A.; Abbott, D.A.; Bellissimi, E.; van den Brink, J.; Kuyper, M.; Luttik, M.A.; Wisselink, H.W.; Scheffers, W.A.; van Dijken, J.P.; Pronk, J.T. Alcoholic fermentation of carbon sources in biomass hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*: Current status. *Antonie Van Leeuwenhoek* **2006**, *90*, 391–418. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Hahn-Hägerdal, B.; Galbe, M.; Gorwa-Grauslund, M.F.; Liden, G.; Zacchi, G. Bioethanol—The fuel of tomorrow from the residues of today. *Trends Biotechnol.* **2006**, *24*, 549–556. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Galbe, M.; Zacchi, G. A review of the production of ethanol from softwood. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2002**, *59*, 618–628. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Klinke, H.B.; Thomsen, A.B.; Ahning, B.K. Inhibition of ethanol-producing yeast and bacteria by degradation products produced during pre-treatment of biomass. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2004**, *66*, 10–26. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Mussatto, S.I.; Roberto, I.C. Alternatives for detoxification of diluted-acid lignocellulosic hydrolysates for use in fermentative processes: A review. *Bioresour. Technol.* **2004**, *93*, 1–10. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Palmqvist, E.; Hahn-Hägerdal, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: Inhibitors and mechanisms of inhibition. *Bioresour. Technol.* **2000**, *74*, 25–33. [[CrossRef](#)]
9. Barnett, J.A.; Payne, R.W.; Yarrow, D. *Yeasts: Characteristics and Identification*, 2nd ed.; Cambridge University Press: Cambridge, UK, 1990.
10. Olsson, L.; Hahn-Hägerdal, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates for ethanol production. *Enzym. Microb. Technol.* **1996**, *18*, 312–331. [[CrossRef](#)]
11. Margaritis, A.; Bajpai, P. Direct fermentation of D-xylose to ethanol by *Kluyveromyces marxianus* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* **1982**, *44*, 1039–1041. [[PubMed](#)]
12. Wang, P.Y.; Johnson, B.F.; Schneider, H. Fermentation of D-xylose by yeasts using glucose isomerase in the medium to convert D-xylose to D-xylulose. *Biotechnol. Lett.* **1980**, *2*, 273–278. [[CrossRef](#)]
13. Stephens, C.; Christen, B.; Fuchs, T.; Sundaram, V.; Watanabe, K.; Jenal, U. Genetic analysis of a novel pathway for D-xylose metabolism in *Candida crescentus*. *J. Bacteriol.* **2007**, *189*, 2181–2185. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Verduren, C.; Kleef, R.; Frank Jzn, J.; Schreuder, H.; Dijken, J.P.; Scheffers, W.A. NAD(P)-H-dependent aldose reductase from the xylose-fermenting yeast *Pichia stipitis*. *Antonie Van Leeuwenhoek* **1985**, *51*, 562–562. [[CrossRef](#)]
15. Rizzi, M.; Klein, C.; Schulze, C.; Bui-Thanh, N.A.; Dellweg, H. Xylose fermentation by yeasts. 5. Use of ATP balances for modeling oxygen-limited growth and fermentation of yeast *Pichia stipitis* with xylose as carbon source. *Biotechnol. Bioeng.* **1989**, *34*, 509–514. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Hahn-Hägerdal, B.; Karhumaa, K.; Fonseca, C.; Spencer-Martins, I.; Gorwa-Grauslund, M.F. Towards industrial pentose-fermenting yeast strains. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2007**, *74*, 937–953. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

17. Johnsen, U.; Dambeck, M.; Zaiss, H.; Fuhrer, T.; Soppa, J.; Sauer, U.; Schönheit, P. D-xylose degradation pathway in the halophilic archaeon *Haloflexax volcanii*. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 27290–27303. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Chang, Q.; Griest, T.; Hartler, T.; Petrash, J. Functional studies of aldo-keto reductases in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta* **2007**, *1773*, 321–329. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Traff, K.L.; Jonsson, L.J.; Hahn-Hägerdal, B. Putative xylose and arabinose reductases in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **2002**, *19*, 1233–1241. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Toivari, M.H.; Salusjarvi, L.; Ruohonen, L.; Penttilä, M. Endogenous xylose pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* **2004**, *70*, 3681–3686. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Wahlbom, C.F.; Hahn-Hägerdal, B. Furfural, 5-hydroxymethyl furfural, and acetoin act as external electron acceptors during anaerobic fermentation of xylose in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Bioeng.* **2002**, *78*, 172–178. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Öhgren, K.; Bengtsson, O.; Gorwa-Grauslund, M.F.; Galbe, M.; Hahn-Hägerdal, B.; Zacchi, G. Simultaneous saccharification and co-fermentation of glucose and xylose in steam-pretreated corn stover at high fiber content with *Saccharomyces cerevisiae* TMB3400. *J. Biotechnol.* **2006**, *126*, 488–498. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Almeida, J.R.M.; Bertilsson, M.; Hahn-Hägerdal, B.; Lidén, G.; Gorwa-Grauslund, M.-E. Carbon fluxes of xylose-consuming *Saccharomyces cerevisiae* strains are affected differently by NADH and NADPH usage in HMF reduction. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2009**, *84*, 751–761.
24. Roca, C.; Nielsen, J.; Olsson, L. Metabolic engineering of ammonium assimilation in xylose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae* improves ethanol production. *Appl. Environ. Microbiol.* **2003**, *69*, 4732–4736. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Sonderegger, M.; Schumperli, M.; Sauer, U. Metabolic engineering of a phosphoketolase pathway for pentose catabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* **2004**, *70*, 2892–2897. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Almeida, J.R.M.; Runquist, D.; Sánchez Nogué, V.; Lidén, G.; Gorwa-Grauslund, M.F. Stress-related challenges in pentose fermentation to ethanol by the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. J.* **2011**, *6*, 286–299. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. 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.* **1987**, *53*, 1996–2000. [[PubMed](#)]
28. Amore, R.; Wilhelm, M.; Hollenberg, C.P. The fermentation of xylose—An analysis of the expression of *Bacillus* and *Actinoplanes* xylose isomerase genes in yeast. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1989**, *30*, 351–357. [[CrossRef](#)]
29. Moes, C.J.; Pretorius, I.S.; van Zyl, W.H. Cloning and expression of the *Clostridium thermosulfurogenes* D-xylose isomerase gene (*xyIA*) in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Lett.* **1996**, *18*, 269–274. [[CrossRef](#)]
30. Gárdonyi, M.; Hahn-Hägerdal, B. The *Streptomyces rubiginosus* xylose isomerase is misfolded when expressed in *Saccharomyces cerevisiae*. *Enzym. Microb. Technol.* **2003**, *32*, 252–259. [[CrossRef](#)]
31. Van Maris, A.J.; Winkler, A.A.; Kuyper, M.; de Laat, W.T.; van Dijken, J.P.; Pronk, J.T. Development of efficient xylose fermentation in *Saccharomyces cerevisiae*: Xylose isomerase as a key component. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **2007**, *108*, 179–204. [[PubMed](#)]
32. Walfridsson, M.; Bao, X.; Anderlund, M.; Lilius, G.; Bulow, L.; Hahn-Hägerdal, B. Ethanol fermentation of xylose with *Saccharomyces cerevisiae* harboring the *Thermus thermophilus xyIA* gene, which expresses an active xylose (glucose) isomerase. *Appl. Environ. Microbiol.* **1996**, *62*, 4648–4651. [[PubMed](#)]
33. Lönn, A.; Tråff-Bjerre, K.L.; Cordero Otero, R.R.; van Zyl, W.H.; Hahn-Hägerdal, B. Xylose isomerase activity influences xylose fermentation with recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strains expressing mutated *xyIA* from *Thermus thermophilus*. *Enzym. Microb. Technol.* **2003**, *32*, 567–573. [[CrossRef](#)]
34. Ha, S.J.; Kim, S.R.; Choi, J.H.; Park, M.S.; Jin, Y.S. Xylitol does not inhibit xylose fermentation by engineered *Saccharomyces cerevisiae* expressing *xyIA* as severely as it inhibits xylose isomerase reaction *in vitro*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2011**, *92*, 77–84. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Kim, D.M.; Choi, S.H.; Ko, B.S.; Jeong, G.Y.; Jang, H.B.; Han, J.G.; Jeong, K.H.; Lee, H.Y.; Won, Y.; Kim, I.C. Reduction of PDC1 expression in *S. cerevisiae* with xylose isomerase on xylose medium. *Bioprocess. Biosyst. Eng.* **2012**, *35*, 183–189. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

36. Aeling, K.A.; Salmon, K.A.; Laplaza, J.M.; Li, L.; Headman, J.R.; Hutagalung, A.H.; Picataggio, S. Co-fermentation of xylose and cellobiose by an engineered *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2012**, *39*, 1597–1604. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Kuyper, M.; Harhangi, H.R.; Stave, A.K.; Winkler, A.A.; Jetten, M.S.; de Laat, W.T.; den Ridder, J.J.; Op den Camp, H.J.; van Dijken, J.P.; Pronk, J.T. High-level functional expression of a fungal xylose isomerase: The key to efficient ethanolic fermentation of xylose by *Saccharomyces cerevisiae*? *FEMS Yeast Res.* **2003**, *4*, 69–78. [[CrossRef](#)]
38. 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.* **2004**, *4*, 655–664. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. 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.* **2005**, *5*, 399–409. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Kuyper, M.; Toirkens, M.J.; Diderich, J.A.; Winkler, A.A.; Dijken, J.P.; Pronk, J.T. Evolutionary engineering of mixed-sugar utilization by a xylose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae* strain. *FEMS Yeast Res.* **2005**, *5*, 925–934. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Madhavan, A.; Tamalampudi, S.; Srivastava, A.; Fukuda, H.; Bisaria, V.S.; Kondo, A. Alcoholic fermentation of xylose and mixed sugars using recombinant *Saccharomyces cerevisiae* engineered for xylose utilization. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2009**, *82*, 1037–1047. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Madhavan, A.; Tamalampudi, S.; Ushida, K.; Kanai, D.; Katahira, S.; Srivastava, A.; Fukuda, H.; Bisaria, V.S.; Kondo, A. Xylose isomerase from polycentric fungus *Orpingtonces*: Gene sequencing, cloning, and expression in *Saccharomyces cerevisiae* for bioconversion of xylose to ethanol. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2009**, *82*, 1067–1078. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Brat, D.; Boles, E.; Wiedemann, B. Functional expression of a bacterial xylose isomerase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* **2009**, *75*, 2304–2311. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Hector, R.E.; Dien, B.S.; Cotta, M.A.; Mertens, J.A. Growth and fermentation of D-xylose by *Saccharomyces cerevisiae* expressing a novel D-xylose isomerase originating from the bacterium *Prevotella naniticola* TC2-24. *Biotechnol. Biofuels* **2013**, *6*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Vilela, L.F.; de Mello, V.M.; Reis, V.C.; Bon, E.P.; Goncalves, D.L.; Torres, F.A.; Neves, B.C.; Eleutherio, E.C. Functional expression of *Burkholderia cenocepacia* xylose isomerase in yeast increases ethanol production from a glucose-xylose blend. *Bioresour. Technol.* **2013**, *128*, 792–796. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Vilela, L.F.; de Araujo, V.P.; Paredes, R.S.; Bon, E.P.; Torres, F.A.; Neves, B.C.; Eleutherio, E.C. Enhanced xylose fermentation and ethanol production by engineered *Saccharomyces cerevisiae* strain. *AMB Express* **2015**, *5*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Peng, B.; Huang, S.; Liu, T.; Geng, A. Bacterial xylose isomerases from the mammal gut Bacteroidetes cluster function in *Saccharomyces cerevisiae* for effective xylose fermentation. *Microb. Cell Fact.* **2015**, *14*, 70. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Hahn-Hägerdal, B.; Jeppsson, H.; Skoog, K.; Prior, B.A. Biochemistry and physiology of xylose fermentation by yeasts. *Enzym. Microb. Technol.* **1994**, *16*, 933–943. [[CrossRef](#)]
49. Ota, M.; Sakuragi, H.; Morisaka, H.; Kuroda, K.; Miyake, H.; Tamaru, Y.; Ueda, M. Display of *Clostridium cellulovorans* xylose isomerase on the cell surface of *Saccharomyces cerevisiae* and its direct application to xylose fermentation. *Biotechnol. Prog.* **2013**, *29*, 346–351. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Parachin, N.S.; Bergdahl, B.; van Niel, E.W.; Gorwa-Grauslund, M.E. Kinetic modelling reveals current limitations in the production of ethanol from xylose by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Metab. Eng.* **2011**, *13*, 508–517. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
51. 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-xylokinase activity. *Appl. Environ. Microbiol.* **2003**, *69*, 495–503. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Senac, T.; Hahn-Hägerdal, B. Effects of increased transaldolase activity on D-xylose and D-glucose metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* cell extracts. *Appl. Environ. Microbiol.* **1991**, *57*, 1701–1706. [[PubMed](#)]
53. Yamanaka, K. Inhibition of D-xylose isomerase by pentitols and D-lyxose. *Arch. Biochem. Biophys.* **1969**, *131*, 502–506. [[CrossRef](#)]

54. Kuhn, A.; van Zyl, C.; van Tonder, A.; Prior, B.A. Purification and partial characterization of an aldo-keto reductase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* **1995**, *61*, 1580–1585. [[PubMed](#)]
55. Traff, K.L.; Otero Cordero, R.R.; van Zyl, W.H.; Hahn-Hagerdal, B. Deletion of the *GRE3* aldose reductase gene and its influence on xylose metabolism in recombinant strains of *Saccharomyces cerevisiae* expressing the *xyIA* and *XKSI* genes. *Appl. Environ. Microbiol.* **2001**, *67*, 5668–5674. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Verho, R.; Londesborough, J.; Penttila, M.; Richard, P. Engineering redox cofactor regeneration for improved pentose fermentation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* **2003**, *69*, 5892–5897. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Van Vleet, J.H.; Jeffries, T.W.; Olsson, L. Deleting the para-nitrophenyl phosphatase (pNPPase), *PHO13*, in recombinant *Saccharomyces cerevisiae* improves growth and ethanol production on D-xylose. *Metab. Eng.* **2008**, *10*, 360–369. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Bro, C.; Regenberg, B.; Forster, J.; Nielsen, J. *In silico* aided metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for improved bioethanol production. *Metab. Eng.* **2006**, *8*, 102–111. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
59. Usher, J.; Balderas-Hernandez, V.; Quon, P.; Gold, N.D.; Martin, V.J.; Mahadevan, R.; Baetz, K. Chemical and synthetic genetic array analysis identifies genes that suppress xylose utilization and fermentation in *Saccharomyces cerevisiae*. *G3* **2011**, *1*, 247–258. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
60. Baley, J.E. Lessons from metabolic engineering for functional genomics and drug discovery. *Nat. Biotechnol.* **1999**, *17*, 616–618. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
61. Petri, R.; Schmidt-Dannert, C. Dealing with complexity: Evolutionary engineering and genome shuffling. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2004**, *15*, 298–304. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Aguilera, J.; Andreu, P.; Randez-Gil, E.; Prieto, J.A. Adaptive evolution of baker's yeast in a dough-like environment enhances freeze and salinity tolerance. *Microb. Biotechnol.* **2010**, *3*, 210–221. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Attfield, P.V.; Bell, P.J.L. Use of population genetics to derive nonrecombinant *Saccharomyces cerevisiae* strains that grow using xylose as a sole carbon source. *FEMS Yeast Res.* **2006**, *6*, 862–868. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Sonderegger, M.; Sauer, U. Evolutionary engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for anaerobic growth on xylose. *Appl. Environ. Microbiol.* **2003**, *69*, 1990–1998. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Scalcinati, G.; Otero, J.M.; Vleet, J.R.; Jeffries, T.W.; Olsson, L.; Nielsen, J. Evolutionary engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for efficient aerobic xylose consumption. *FEMS Yeast Res.* **2012**, *12*, 582–597. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Kim, S.R.; Kwee, N.R.; Kim, H.; Jin, Y.S. Feasibility of xylose fermentation by engineered *Saccharomyces cerevisiae* overexpressing endogenous aldose reductase (*GRE3*), xylitol dehydrogenase (*XYL2*), and xylulokinase (*XYL3*) from *Scheffersomyces stipitis*. *FEMS Yeast Res.* **2013**, *13*, 312–321. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
67. Klimacek, M.; Kirl, E.; Krahulec, S.; Longus, K.; Novy, V.; Nidetzky, B. Stepwise metabolic adaption from pure metabolization to balanced anaerobic growth on xylose explored for recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Microb. Cell Fact.* **2014**, *13*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
68. Demeke, M.M.; Dietz, H.; Li, Y.; Foulquie-Moreno, M.R.; Mutturi, S.; Deprez, S.; Den Abt, T.; Borini, B.M.; Liden, G.; Dumortier, F.; *et al.* Development of a D-xylose fermenting and inhibitor tolerant industrial *Saccharomyces cerevisiae* strain with high performance in lignocellulose hydrolysates using metabolic and evolutionary engineering. *Biotechnol. Biofuels* **2013**, *6*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
69. Zhou, H.; Cheng, J.S.; Wang, B.L.; Fink, G.R.; Stephanopoulos, G. Xylose isomerase overexpression along with engineering of the pentose phosphate pathway and evolutionary engineering enable rapid xylose utilization and ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae*. *Metab. Eng.* **2012**, *14*, 611–622. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
70. Demeke, M.M.; Foulquie-Moreno, M.R.; Dumortier, F.; Thevelein, J.M. Rapid evolution of recombinant *Saccharomyces cerevisiae* for xylose fermentation through formation of extra-chromosomal circular DNA. *PLoS Genet.* **2015**, *11*, e1005010. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
71. Alper, H.; Moxley, J.; Nevoigt, E.; Fink, G.R.; Stephanopoulos, G. Engineering yeast transcription machinery for improved ethanol tolerance and production. *Science* **2006**, *314*, 1565–1568. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
72. Yang, J.; Bae, J.Y.; Lee, Y.M.; Kwon, H.; Moon, H.Y.; Kang, H.A.; Yee, S.B.; Kim, W.; Choi, W. Construction of *Saccharomyces cerevisiae* strains with enhanced ethanol tolerance by mutagenesis of the TATA-binding protein gene and identification of novel genes associated with ethanol tolerance. *Biotechnol. Bioeng.* **2011**, *108*, 1776–1787. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

73. Liu, E.; Hu, Y. Construction of a xylose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae* strain by combined approaches of genetic engineering, chemical mutagenesis and evolutionary adaptation. *Biochem. Eng. J.* **2010**, *48*, 204–210. [[CrossRef](#)]
74. Liu, H.; Liu, K.; Yan, M.; Xu, L.; Ouyang, P. gTME for improved adaptation of *Saccharomyces cerevisiae* to corn cob acid hydrolysate. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2011**, *164*, 1150–1159. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
75. Cai, Z.; Zhang, B.; Li, Y. Engineering *Saccharomyces cerevisiae* for efficient anaerobic xylose fermentation: Reflections and perspectives. *Biotechnol. J.* **2012**, *7*, 34–46. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
76. Wahlborn, 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. Microbiol.* **2003**, *69*, 740–746. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
77. Hector, R.E.; Qureshi, N.; Hughes, S.R.; Cotta, M.A. Expression of a heterologous xylose transporter in a *Saccharomyces cerevisiae* strain engineered to utilize xylose improves aerobic xylose consumption. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2008**, *80*, 675–684. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
78. Runquist, D.; Hahn-Hägerdal, B.; Radström, P. Comparison of heterologous xylose transporters in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Biofuels* **2010**, *17*, 3–5. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
79. Diao, L.; Liu, Y.; Qian, F.; Yang, J.; Jiang, Y.; Yang, S. Construction of fast xylose-fermenting yeast based on industrial ethanol-producing diploid *Saccharomyces cerevisiae* by rational design and adaptive evolution. *BMC Biotechnol.* **2013**, *13*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
80. Gonçalves, D.L.; Matsushika, A.; Belisa, B.; Goshima, T.; Bon, E.P.; Stambuk, B.U. Xylose and xylose /glucose co-fermentation by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strains expressing individual hexose transporters. *Enzym. Microb. Technol.* **2014**, *63*, 13–20. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
81. Reifemberger, 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.* **1997**, *245*, 324–333.
82. Diderich, J.A.; Schepper, M.; van Hoek, P.; Luttik, M.A.; van Dijken, J.P.; Pronk, J.T.; Klaassen, P.; Boelens, H.F.; de Mattos, M.J.; van Dam, K.; et al. Glucose uptake kinetics and transcription of *HXT* genes in chemostat cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 15350–15359. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
83. Sedlak, M.; Ho, N.W. Characterization of the effectiveness of hexose transporters for transporting xylose during glucose and xylose co-fermentation by a recombinant *Saccharomyces* yeast. *Yeast* **2004**, *21*, 671–684. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
84. Hamacher, T.; Becker, J.; Gárdonyi, M.; Hahn-Hägerdal, B.; Boles, E. Characterization of the xylose-transporting properties of yeast hexose transporters and their influence on xylose utilization. *Microbiology* **2002**, *148*, 2783–2788. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
85. 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.* **2002**, *60*, 186–191. [[PubMed](#)]
86. Subtil, T.; Boles, E. Competition between pentoses and glucose during uptake and catabolism in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Biofuels* **2012**, *5*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
87. Leandro, M.; 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.* **2006**, *395*, 543–549. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
88. Saloheimo, A.; Rauta, J.; Stasyk, O.V.; Sibirny, A.A.; Penttilä, M.; Ruohonen, L. Xylose transport studies with xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae* strains expressing heterologous and homologous permeases. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2007**, *74*, 1041–1052. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
89. Du, J.; Li, S.; Zhao, H. Discovery and characterization of novel D-xylose-specific transporters from *Naturopora crassa* and *Pichia stipitis*. *Mol. Biosyst.* **2010**, *6*, 2150–2156. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
90. Young, E.; Pouchet, A.; Comer, A.; Bailey, A.; Alper, H. Functional survey for heterologous sugar transport proteins, using *Saccharomyces cerevisiae* as a host. *Appl. Environ. Microbiol.* **2011**, *77*, 3311–3319. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
91. Young, E.M.; Tong, A.; Bui, H.; Spofford, C.; Alper, H.S. Rewiring yeast sugar transporter preference through modifying a conserved protein motif. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2013**, *111*, 131–136. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

92. Colabardini, A.C.; Ries, L.N.A.; Brown, N.A.; Dos Reis, T.F.; Savoldi, M.; Goldman, M.H.S.; Menino, J.E.; Rodrigues, F.; Goldman, G.H. Functional characterization of a xylose transporter in *Aspergillus nidulans*. *Biotechnol. Biofuels* **2014**, *7*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
93. Wiczorke, R.; Krampe, S.; Weierstall, T.; Freidel, K.; Hollenberg, C.P.; Boles, E. Concurrent knock-out of at least 20 transporter genes is required to block uptake of hexoses in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* **1999**, *464*, 123–128. [[CrossRef](#)]
94. Farwick, A.; Bruder, S.; Schadeweg, V.; Oreb, M.; Boles, E. Engineering of yeast hexose transporters to transport D-xylose without inhibition by D-glucose. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2014**, *111*, 5159–5164. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
95. Oreb, M.; Dietz, H.; Farwick, A.; Boles, E. Novel strategies to improve co-fermentation of pentoses with D-glucose by recombinant yeast strains in lignocellulosic hydrolysates. *Bioengineering* **2012**, *3*, 347–351. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
96. Weierstall, T.; Hollenberg, C.P.; Boles, E. Cloning and characterization of three genes (*SUT1-3*) encoding glucose transporters of the yeast *Pichia stipitis*. *Mol. Microbiol.* **1999**, *31*, 871–883. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
97. Jeffries, T.W.; Bae, J.; Liu, B.C.Y.; van Vleet, J.R.H. Sugar Transport Sequences, Yeast Strains Having Improved Sugar Uptake, and Methods of Use. U.S. Patent Application Publication US 2009/0325241 A1, 31 December 2009.
98. Wang, C.; Bao, X.; Li, Y.; Jiao, C.; Hou, J.; Zhang, Q.; Zhang, W.; Liu, W.; Shen, Y. Cloning and characterization of heterologous transporters in *Saccharomyces cerevisiae* and identification of important amino acids for xylose utilization. *Metabol. Eng.* **2015**, *30*, 79–88. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
99. Ferreira, D.; Nobre, A.; Silva, M.L.; Faria-Oliveira, E.; Tulha, J.; Ferreira, C.; Lucas, C. *XYLH* encodes a xylose/H⁺ symporter from the highly related yeast species *Debaryomyces fabryi* and *Debaryomyces hansenii*. *FEMS Yeast Res.* **2013**, *13*, 585–596. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
100. Kasahara, T.; Kasahara, M. A two dimensional comprehensive study: Identification of a key residue determining substrate affinity in the yeast glucose transporter Hxt7. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 26263–26268. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
101. Kasahara, T.; Shimogawara, K.; Kasahara, M. Crucial effects of amino acid side chain length in transmembrane segment 5 on substrate affinity in yeast glucose transporter Hxt7. *Biochemistry* **2011**, *50*, 8674–8681. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
102. Nijland, J.G.; Shin, H.Y.; de Jong, R.M.; de Waal, P.P.; Klaassen, P.; Driessen, A.J. Engineering of an endogenous hexose transporter into a specific D-xylose transporter facilitates glucose-xylose co-consumption in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Biofuels* **2014**, *7*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
103. Almeida, J.R.M.; Modig, T.; Petersson, A.; Hahn-Hägerdal, B.; Lidén, G.; Gorwa-Grauslund, M.F. Increased tolerance and conversion of inhibitors in lignocellulosic hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **2007**, *82*, 340–349. [[CrossRef](#)]
104. Ask, M.; Bettiga, M.; Duraiswamy, V.; Olsson, L. Pulsed addition of HMF and furfural to batch-grown xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae* results in different physiological responses in glucose and xylose consumption phase. *Biotechnol. Biofuels* **2013**, *6*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
105. Demeke, M.M.; Dumortier, F.; Li, Y.; Broeckx, T.; Foulquié-Moreno, M.R.; Thevelein, J.M. Combining inhibitor tolerance and D-xylose fermentation in industrial *Saccharomyces cerevisiae* for efficient lignocellulose-based bioethanol production. *Biotechnol. Biofuels* **2013**, *6*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
106. Wallace-Salinas, V.; Signori, L.; Li, Y.-Y.; Ask, M.; Bettiga, M.; Porro, D.; Thevelein, J.M.; Branduardi, P.; Foulquié-Moreno, M.R.; Gorwa-Grauslund, M. Re-assessment of YAP1 and MCR1 contributions to inhibitor tolerance in robust engineered *Saccharomyces cerevisiae* fermenting undetoxified lignocellulosic hydrolysate. *AMB Express* **2014**, *4*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
107. Wang, X.; Jin, M.; Balan, V.; Jones, A.D.; Li, X.; Li, B.-Z.; Dale, B.E.; Yuan, Y.-J. Comparative metabolic profiling revealed limitations in xylose-fermenting yeast during co-fermentation of glucose and xylose in the presence of inhibitors. *Biotechnol. Bioeng.* **2014**, *111*, 152–164. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
108. Bergdahl, B.; Heer, D.; Sauer, U.; Hahn-Hägerdal, B.; van Niel, E.W. Dynamic metabolomics differentiates between carbon and energy starvation in recombinant *Saccharomyces cerevisiae* fermenting xylose. *Biotechnol. Biofuels* **2012**, *5*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

109. Smith, J.; van Rensburg, E.; Görgens, J.F. Simultaneously improving xylose fermentation and tolerance to lignocellulosic inhibitors through evolutionary engineering of recombinant *Saccharomyces cerevisiae* harbouring xylose isomerase. *BMC Biotechnol.* **2014**, *14*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
110. Bellissimi, E.; van Dijken, J.P.; Pronk, J.T.; van Maris, A.J.A. Effects of acetic acid on the kinetics of xylose fermentation by an engineered, xylose-isomerase-based *Saccharomyces cerevisiae* strain. *FEMS Yeast Res.* **2009**, *9*, 358–364. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
111. Alkasrawi, M.; Rudolf, A.; Lidén, G.; Zacchi, G. Influence of strain and cultivation procedure on the performance of simultaneous saccharification and fermentation of steam pretreated spruce. *Enzym. Microb. Technol.* **2006**, *38*, 279–286. [[CrossRef](#)]
112. Tomás-Pejó, E.; Olsson, L. Influence of the propagation strategy for obtaining robust *Saccharomyces cerevisiae* cells that efficiently co-ferment xylose and glucose in lignocellulosic hydrolysates. *Microb. Biotechnol.* **2015**, *8*, 99–105. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
113. Zhao, J.; Xia, L. Ethanol production from corn stover hemicellulosic hydrolysate using immobilized recombinant yeast cells. *Biochem. Eng. J.* **2010**, *49*, 28–32. [[CrossRef](#)]



© 2016 by the authors; licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons by Attribution (CC-BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

“Não são as espécies mais fortes que sobrevivem, nem as mais inteligentes, e sim a que melhor se adapta às mudanças.”

Charles Darwin (por.Leon C. Megginson)

Nota: Frase proferida por Leon C. Megginson, professor da Louisiana State University, num discurso em 1963, onde apresenta a sua interpretação da ideia central de "A Origem das Espécies" de Charles Darwin.