



CAMILA UTSUNOMIA

IMPACTO DA EXPRESSÃO HETERÓLOGA DE XILOSE REDUTASES E
XILITOL DESIDROGENASES DE DIFERENTES LEVEDURAS NA
PRODUÇÃO DE ETANOL POR *Saccharomyces cerevisiae*

CAMPINAS
2014

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

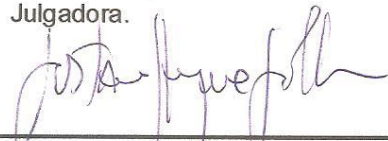
CAMILA UTSUNOMIA

**IMPACTO DA EXPRESSÃO HETERÓLOGA DE XILOSE
REDUTASES E XILITOL DESIDROGENASES DE DIFERENTES
LEVEDURAS NA PRODUÇÃO DE ETANOL POR *Saccharomyces
cerevisiae***

Este exemplar corresponde à
redação final da DISSERTAÇÃO
defendida pela candidata

CAMILA UTSUNOMIA

e aprovada pela Comissão
Julgadora.



Orientador: Prof. Dr. Gustavo Henrique Goldman
Coorientadora: Dra. Juliana Velasco de Castro Oliveira

DISSERTAÇÃO apresentada ao Instituto de
Biologia da UNICAMP para obtenção do
Título de Mestra em Genética e Biologia
Molecular, na área de Microbiologia.

**CAMPINAS,
2014**

Ut7i Utsunomia, Camila, 1989-
Impacto da expressão heteróloga de xilose redutases e xilitol desidrogenases de diferentes leveduras na produção de etanol por *Saccharomyces cerevisiae* / Camila Utsunomia. – Campinas, SP : [s.n.], 2014.

Orientador: Gustavo Henrique Goldman.
Coorientador: Juliana Velasco de Castro Oliveira.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Insetos. 2. *Saccharomyces cerevisiae*. 3. Cana-de-açúcar. 4. Xilose. I. Goldman, Gustavo Henrique. II. Oliveira, Juliana Velasco de Castro. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Impact of heterologous expression of xylose reductases and xylitol dehydrogenases from different yeasts for ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae*

Palavras-chave em inglês:

Insects

Saccharomyces cerevisiae

Sugar-cane

Xylose

Área de concentração: Microbiologia

Titulação: Mestra em Genética e Biologia Molecular

Banca examinadora:

Gustavo Henrique Goldman [Orientador]

Nádia Skorupa Parachin

Jaciane Lutz Ienczak

Data de defesa: 25-03-2014

Programa de Pós-Graduação: Genética e Biologia Molecular

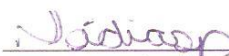
Campinas, 25 de março de 2014

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Gustavo Henrique Goldman (orientador)


Assinatura

Profa. Dra. Nádia Skorupa Parachin


Assinatura

Dra. Jaciane Lutz Ienczak


Assinatura

Dra. Aline Carvalho Da Costa

Assinatura

Dr. André Ricardo De Lima Damásio

Assinatura

RESUMO

A produção de etanol a partir de resíduos agrícolas, denominada Etanol de Segunda Geração ou Etanol Lignocelulósico, surge como uma alternativa para aumentar a produção de etanol sem necessariamente expandir as áreas destinadas ao cultivo da matéria-prima. A conversão da biomassa em etanol não é economicamente favorável a não ser que a hemicelulose seja utilizada juntamente com a celulose. Entretanto, a levedura *Saccharomyces cerevisiae* é incapaz de fermentar pentoses, açúcares liberados pela hidrólise da hemicelulose, principalmente xilose. Uma alternativa para que *S. cerevisiae* produza etanol utilizando pentoses seria modificá-la geneticamente através do uso de genes provenientes de micro-organismos que naturalmente realizam esta conversão. Com o intuito de encontrar novas leveduras assimiladoras de xilose, prospectamos o trato intestinal de larvas de seis insetos parasitas da cana-de-açúcar e dornas de fermentação alcoólica, identificando 49 isolados, dentre eles as leveduras *Rhodotorula mucilaginosa* UC11 e *Ogataea polymorpha* FT212L. Neste trabalho, foi feito o isolamento e a caracterização dos genes *xyl1* e *xyl2*, que codificam respectivamente à xilose redutase (XR) e à xilitol desidrogenase (XDH) dessas duas leveduras, assim como a clonagem e a superexpressão de tais genes na cepa industrial *S. cerevisiae* Pedra-2 (PE-2). *Rhodotorula mucilaginosa* UC11 e *O. polymorpha* FT212L foram avaliadas quanto a habilidade de crescerem em xilose, a expressão dos genes *xyl1* e *xyl2* e a medição das atividades das enzimas XR e XDH. E pela primeira vez XR e XDH de ambas as leveduras foram expressas heterologicamente em *S. cerevisiae* PE-2 gerando as cepas PE-2 Rm, PE-2 Op 1 e PE-2 Op 2, que foram testadas quanto a capacidade de utilizar xilose para crescimento e atividades das enzimas XR e XDH. Adicionalmente, neste trabalho também foi construída pela primeira vez uma cepa *S. cerevisiae* PE-2 contendo os genes de *Scheffersomyces stipitis*, uma vez que esta é uma das melhores leveduras conhecidas capazes de utilizar xilose. Para isso a cepa PE-2 foi modificada geneticamente com o plasmídeo pRH 274, contendo os genes *xyl1* e *xyl2* de *S. stipitis* e o gene *xks1* de *S. cerevisiae*, que codifica à xilulose quinase (XK), superexpressos, gerando a cepa denominada PE-2 274. Esta levedura recombinante foi caracterizada através de ensaios de curva de crescimento, medição das atividades de XR e XDH e capacidade de co-fermentar xilose e glicose a etanol em biorreator. A cepa PE-2 274 mostrou ser uma cepa de grande potencial para a produção de etanol a partir de meio contendo xilose e glicose, podendo ser a base para a geração

de uma cepa competitiva em ambiente industrial visando à produção do etanol de segunda geração.

ABSTRACT

The ethanol production from agricultural residues, called Second Generation Ethanol or Lignocellulosic Ethanol, arises as an alternative to increase the ethanol production without necessarily expanding the areas for raw material cultivation. The biomass conversion to ethanol is not economically feasible unless hemicellulose is used in addition to cellulose. However, the yeast *Saccharomyces cerevisiae* is unable to ferment pentoses, released sugars from hemicellulose hydrolysis, mainly xylose. An alternative to *S. cerevisiae* produces ethanol from pentose is the genetic engineering with genes from microorganisms which naturally perform this conversion. In order to find new yeasts capable to use xylose, we prospected the gut of sugarcane parasitic insects larvae and alcoholic fermentation tanks, identifying 49 isolates, among them the yeasts *Rhodotorula mucilaginosa* UC11 e *Ogataea polymorpha* FT212L. In this work were made the isolation and characterization of *xyl1* and *xyl2* genes, which encode xylose reductase (XR) and xylitol dehydrogenase (XDH), respectively, from these two yeasts and the cloning and overexpression of these genes in the industrial *S. cerevisiae* Pedra-2 (PE-2) strain. *Rhodotorula mucilaginosa* UC11 and *O. polymorpha* FT212L were evaluated over the ability to grow on xylose, *xyl1* and *xyl2* expression analysis and XR and XDH activity. And for the first time XR and XDH from both yeasts were heterologous expressed in *S. cerevisiae* PE-2 generating PE-2 Rm, PE-2 Op 1 and PE-2 Op 2 strains, which were tested by the capability to grow on xylose and XR and XDH activity. Additionally, in this work was constructed also for the first time a *S. cerevisiae* PE-2 strain with genes from *Scheffersomyces stipitis*, since this is one of the best known yeasts capable of utilizing xylose. For this, PE-2 was engineered with pRH 274 plasmid overexpressing *xyl1* and *xyl2* genes from *S. stipitis* and *xks1* gene from *S. cerevisiae*, which encodes xylulokinase (XK), generating the PE-2 274 strain. This recombinant strain was characterized through xylose growing assays, XR and XDH activity and xylose/glucose co-fermentation to ethanol in bioreactor. PE-2 274 showed a high potential to produce ethanol from xylose and glucose, and could be the basis for the generation of industrially competitive yeast aiming the second generation ethanol production.

SUMÁRIO

| | | |
|-----------|---|----|
| 1 | Introdução..... | 1 |
| 2 | Revisão bibliográfica..... | 5 |
| 2.1 | Etanol de Primeira Geração..... | 5 |
| 2.1.1 | Processo de fermentação alcoólica brasileiro..... | 6 |
| 2.2 | Biomassa Lignocelulósica..... | 7 |
| 2.1 | Bagaço de cana-de-açúcar..... | 8 |
| 2.2 | Etanol Lignocelulósico..... | 9 |
| 2.3 | Vias de metabolização da xilose..... | 11 |
| 2.4 | Micro-organismos assimiladores de pentoses..... | 13 |
| 2.5 | Cepas recombinantes de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 14 |
| 2.6 | Cepas domésticas e industriais de <i>S. cerevisiae</i> | 17 |
| 2.7 | Busca por leveduras que naturalmente fermentam xilose..... | 18 |
| 2.7.1 | As leveduras <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> e <i>Ogataea (Hansenula) polymorpha</i> | 20 |
| 3 | Objetivos..... | 25 |
| 3.1 | Objetivo geral..... | 25 |
| 3.2 | Objetivo específico..... | 25 |
| 4 | Materiais e Métodos..... | 27 |
| 4.1 | Cepas e plasmídios..... | 27 |
| 4.2 | Isolamento e caracterização das leveduras <i>R. mucilaginosa</i> e <i>O. polymorpha</i> | 27 |
| 4.2.1 | Coleta das amostras e isolamento das leveduras..... | 27 |
| 4.2.2 | Identificação molecular dos isolados..... | 28 |
| 4.2.2.1 | Extração de DNA..... | 28 |
| 4.2.2.2 | Amplificação e sequenciamento da região ITS2..... | 28 |
| 4.2.3 | Caracterização das leveduras..... | 29 |
| 4.2.3.1 | Curvas de crescimento..... | 29 |
| 4.2.3.2 | Construção das árvores filogenéticas de <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> UC11 e cepas de <i>Ogataea polymorpha</i> | 29 |
| 4.2.3.3 | Filogenia das enzimas XDH1 e XDH2 de <i>Ogataea (Hansenula) polymorpha</i> | 31 |
| 4.2.3.4 | Ensaio de atividade das enzimas XR e XDH..... | 31 |
| 4.2.3.5 | Análise da expressão gênica de <i>xyl1</i> e <i>xyl2</i> | 33 |
| 4.2.3.5.1 | Cultivo das leveduras..... | 33 |
| 4.2.3.5.2 | Extração de RNA e síntese de cDNA..... | 33 |

| | | |
|-----------|---|----|
| 4.2.3.5.3 | qRT-PCR | 33 |
| 4.3 | Construção de cepas recombinantes de <i>S. cerevisiae</i> | 35 |
| 4.3.1 | Clonagem dos genes <i>xyl1</i> e <i>xyl2</i> das leveduras <i>R. mucilaginosa</i> UC11 e <i>O. polymorpha</i> FT212L no vetor bidirecional pSP-G1 | 36 |
| 4.3.1.1 | Desenho dos oligonucleotídeos e amplificação dos genes <i>xyl1</i> e <i>xyl2</i> | 36 |
| 4.3.1.2 | Ligação, clonagem e sequenciamento | 37 |
| 4.3.2 | Transformação de DNA nas cepas de <i>S. cerevisiae</i> PE-2 e SC9721 | 39 |
| 4.3.3 | Caracterização das cepas recombinantes de <i>S. cerevisiae</i> | 41 |
| 4.3.4 | Transformação dos plasmídios em <i>S. cerevisiae</i> PE-2 XK ⁺ | 41 |
| 4.4 | Co-fermentação de xilose e glicose utilizando PE-2 274 em Biorreator na condição de microaerofilia | 42 |
| 4.4.1 | Análises dos produtos das fermentações | 43 |
| 4.4.2 | Determinação da Massa seca celular | 43 |
| 4.4.3 | Avaliação estatística | 44 |
| 5 | Resultados e Discussão | 45 |
| 5.1 | Isolamento e caracterização das leveduras <i>R. mucilaginosa</i> e <i>O. polymorpha</i> | 45 |
| 5.1.1 | Identificação molecular das leveduras | 45 |
| 5.1.2 | A caracterização das leveduras | 48 |
| 5.1.2.1 | Curvas de crescimento | 48 |
| 5.1.2.2 | Árvores filogenéticas de <i>R. mucilaginosa</i> UC11 e cepas de <i>O. polymorpha</i> ... | 51 |
| 5.1.2.3 | Filogenia das enzimas XDH1 e XDH2 de <i>Ogataea (Hansenula) polymorpha</i> | 54 |
| 5.1.2.4 | Atividade das enzimas XR e XDH | 56 |
| 5.1.2.5 | Análise da expressão de <i>xyl1</i> e <i>xyl2</i> por qRT-PCR | 58 |
| 5.2 | As cepas recombinantes de <i>S. cerevisiae</i> expressando heterologamente XR e XDH ... | 63 |
| 5.2.1 | A caracterização das cepas recombinantes de <i>S. cerevisiae</i> | 64 |
| 5.2.1.1 | Atividades das enzimas XR e XDH | 64 |
| 5.2.1.2 | Curvas de crescimento | 68 |
| 5.2.2 | Co-fermentação de xilose e glicose utilizando PE-2 274 em Biorreator na condição de microaerofilia | 74 |
| 6 | Conclusão | 83 |
| 7 | Referências bibliográficas | 85 |
| Anexos | | 99 |
| | Anexo I – Método para obtenção do trato intestinal das larvas de insetos parasitas da cana-de-açúcar e isolamento dos micro-organismos | 99 |

Dedico este trabalho as minhas queridas

Batiyans Fugie Izu Utsunomiya e

Ukiko Nakamura Katsui.

Saudades para sempre!

AGRADECIMENTOS

Ao meu Orientador Prof. Dr. Gustavo H. Goldman por todo o aprendizado ao longo desses dois anos e pela oportunidade de realizar o meu Mestrado em um grande Laboratório como o CTBE. A minha Co-orientadora Dr^a. Juliana V. de Castro Oliveira, por todo o apoio na superação das dificuldades do dia-a-dia no laboratório e por todos os ensinamentos teóricos e práticos que colaboraram para que eu crescesse como profissional. A nossa técnica Aline T. Sousa, por ter me acompanhado desde o meu início no CTBE e pelo apoio e ensinamentos ao longo desses anos.

A Prof^a. Dr^a. Jaciane L. Ienczak e a Suzane Dionísio do CTBE, a Prof^a. Dr^a. Aline C da Costa da Unicamp e ao Prof. Dr. Rafael R. Andrade da Unifesp, pela disposição e colaborações que possibilitaram a realização e a análise de dados das fermentações em Biorreator.

A Prof^a. Dr^a. Nádia S. Parachin pela hospitalidade no período que estive em Brasília e pelo aprendizado que tornou possível a medição das atividades das enzimas XR e XDH.

A FAPESP pela bolsa de estudos concedida.

Aos meus amigos do laboratório, Rebeca Mariano, Renato Santos, Gustavo Borin, Lúcia Wolf, Juliana Aricette, Larissa Cruz, Eliane Santana, Camila Sanchez, e a todo o pessoal da Pesquisa Básica e do Programa Industrial do CTBE. Muito obrigada pela amizade, pelas colaborações nos experimentos (pois sem o trabalho em conjunto nada é possível), pelos nossos almoços especiais e por fazer os meus dias no CTBE mais divertidos e prazerosos. Vou levar a amizade de vocês para aonde eu for.

A minha família, minha mãe Harue K. Utsunomia, meu pai Francisco F. Utsunomia e meus irmãos Lucas K. Utsunomia e Evandro K. Utsunomia, muito obrigada por todo o apoio, amor e por estarmos sempre unidos, pois não há nada mais importante do que isso.

Ao meu namorado André Ohara, meu companheiro de todos os dias. Sua presença, força, paciência, amizade e amor, foram essenciais para que eu superasse todos os desafios e alcançasse essa conquista.

E a Deus por sempre me proteger e me iluminar.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | |
|---|----|
| Figura 1. As duas vias de utilização de xilose: a via da isomerização e a via da redução-oxidação. Adaptado de Hahn-Hägerdal; Pamment (2004). | 12 |
| Figura 2. Regiões ITS (ITS1, 5.8S e ITS2) e D1/D2 da subunidade ribossomal maior (LSU) do DNA ribossomal, sequenciados para construção das árvores filogenéticas de <i>R. mucilaginosa</i> UC11 e cepas de <i>O. polymorpha</i> | 30 |
| Figura 3. Vetor pSP-G1(PARTOW et al., 2010). | 38 |
| Figura 4. Curvas de crescimento de <i>R. mucilaginosa</i> UC11, <i>S. stipitis</i> Y-7124 e <i>S. cerevisiae</i> SC9721 em diferentes fontes de carbono. | 49 |
| Figura 5. Curvas de crescimento das leveduras isoladas como contaminantes de dornas de fermentação alcoólica. | 50 |
| Figura 6. Árvore filogenética que descreve a relação de <i>R. mucilaginosa</i> UC11 (destacada em vermelho) com espécies estreitamente relacionadas, baseada na sequências da região ITS1-5.8S-ITS2 rDNA e do domínio D1/D2 do LSU rDNA. Os valores de <i>bootstrap</i> estão indicados nos nós | 52 |
| Figura 7. Árvore filogenética que descreve a relação das cepas de <i>O. polymorpha</i> (FT1140L, FT209L, FT1139L e FT212L, destacados em vermelho) com espécies estreitamente relacionadas, baseada na sequências da região ITS1-5.8S-ITS2 rDNA e do domínio D1/D2 do LSU rDNA. Os valores de <i>bootstrap</i> estão indicados nos nós. | 54 |
| Figura 8. Filogenia das álcoois desidrogenases relacionadas à XDH1 (Hanpo2_23093) e XDH2 (Hanpo2_103565) de <i>Ogataea (Hansenula) polymorpha</i> (Hanpo), de <i>Aspergillus niger</i> (Aspini), <i>Trichoderma reesei</i> (Treesei), <i>Scheffersomyces stipitis</i> (Picsti) e <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (Sacce). | 56 |
| Figura 9. Expressão do gene <i>xyl1</i> de <i>R. mucilaginosa</i> UC11 relativa a expressão de <i>tefl</i> , em diferentes concentrações de xilose (5, 10 e 50 g/L) e em glicose (10 g/L) em 24, 48, 72 e 96 horas de crescimento. | 60 |
| Figura 10. Expressão do gene <i>xyl2</i> de <i>R. mucilaginosa</i> UC11 relativa a expressão de <i>tefl</i> , em diferentes concentrações de xilose (5, 10 e 50 g/L) e em glicose (10 g/L) em 24, 48, 72 e 96 horas de crescimento. | 60 |
| Figura 11. Expressão do gene <i>xyl1</i> de <i>O. polymorpha</i> FT212L relativa a expressão de <i>tefl</i> , em diferentes concentrações de xilose (5, 10 e 50 g/L) e em glicose (10 g/L) em 24, 48, 72 e 96 horas de crescimento. | 62 |

| | |
|---|----|
| Figura 12. Expressão do gene <i>xyl2a</i> de <i>O. polymorpha</i> FT212L relativa a expressão de <i>tef1</i> , em diferentes concentrações de xilose (5, 10 e 50 g/L) e em glicose (10 g/L) em 24, 48, 72 e 96 horas de crescimento. | 62 |
| Figura 13. Expressão do gene <i>xyl2b</i> de <i>O. polymorpha</i> FT212L relativa a expressão de <i>tef1</i> , em diferentes concentrações de xilose (5, 10 e 50 g/L) e em glicose (10 g/L) em 24, 48, 72 e 96 horas de crescimento. | 63 |
| Figura 14. Crescimento das cepas recombinantes de <i>S. cerevisiae</i> SC9721 em diferentes fontes de carbono. | 69 |
| Figura 15. Crescimento das cepas recombinantes de <i>S. cerevisiae</i> PE-2 em diferentes fontes de carbono. | 70 |
| Figura 16. Crescimento das cepas recombinantes de <i>S. cerevisiae</i> PE-2 em diferentes fontes de carbono. | 71 |
| Figura 17. Crescimento das cepas recombinantes de <i>S. cerevisiae</i> PE-2 em diferentes fontes de carbono. | 72 |
| Figura 18. Crescimento das cepas recombinantes de <i>S. cerevisiae</i> PE-XK em diferentes fontes de carbono. | 74 |
| Figura 19. Médias e desvios padrão das concentrações de glicose, etanol, biomassa, glicerol e ácido acético ao longo de 24 h das fermentações em triplicata biológica de PE-2 274 em meio 70 g/L de glicose. | 76 |
| Figura 20. Médias e desvios padrão das concentrações de xilose, etanol, biomassa, glicerol e ácido acético ao longo de 72 h das fermentações em triplicata biológica de PE-2 274 em meio 70 g/L de xilose. | 77 |
| Figura 21. Médias e desvios padrão das concentrações de glicose, xilose, biomassa, etanol, glicerol, ácido acético e xilitol ao longo de 48 h das fermentações em triplicata biológica de PE-2 274 em meio 30 g/L xilose e 70 g/L glicose. | 78 |
| Figura 22. Médias e desvios padrão das concentrações de glicose, xilose, sacarose, biomassa, etanol, glicerol, ácido acético e xilitol ao longo de 48 h das fermentações em triplicata biológica de PE-2 274 em meio 33 g/L xilose, 33 g/L glicose e 33 g/L sacarose. | 80 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1. Cepas recombinantes de <i>S. cerevisiae</i> da literatura desenvolvidas visando à melhora da assimilação de açúcares de cinco carbonos. | 16 |
| Tabela 2. Cepas e plasmídios utilizados neste trabalho..... | 27 |
| Tabela 3. Oligonucleotídeos utilizados para amplificar as regiões ITS e D1/D2 LSU do DNA ribossomal..... | 30 |
| Tabela 4. Componentes da reação para medição das atividades enzimáticas de XR e XDH..... | 32 |
| Tabela 5. Sequências dos oligonucleotídeos utilizados para a qPCR..... | 34 |
| Tabela 6. Sequência dos oligonucleotídeos utilizados nas reações de PCR para clonagem por digestão..... | 36 |
| Tabela 7. Sequência dos oligonucleotídeos utilizados nas reações de PCR para clonagem por recombinação homóloga..... | 37 |
| Tabela 8. Plasmídios e cepas recombinantes obtidos neste trabalho..... | 41 |
| Tabela 9. Cepas recombinantes PE-2 XK ⁺ com os genes de <i>R. mucilaginosa</i> UC11 e <i>O. polymorpha</i> FT212L..... | 42 |
| Tabela 10. Concentrações das fontes de carbono dos meios das fermentações utilizando PE-2 274. | 42 |
| Tabela 11. Identificação dos micro-organismos isolados do trato intestinal das larvas de insetos parasitas da cana-de-açúcar. Os parâmetros <i>E-value</i> e identidade fornecem o grau de confiabilidade da identificação..... | 46 |
| Tabela 12. Identificação das leveduras isoladas de dornas de fermentação alcoólica. Os parâmetros <i>E-value</i> e identidade fornecem o grau de confiabilidade da identificação. | 48 |
| Tabela 13. Atividade das enzimas XR e XDH de <i>R. mucilaginosa</i> UC11. Controle positivo <i>S. stipitis</i> Y-7124. | 57 |
| Tabela 14. Atividade das enzimas XR e XDH das cepas de <i>O. polymorpha</i> . Controle positivo <i>S. stipitis</i> Y-7124. | 57 |
| Tabela 15. Atividades de XR (NADPH e NADH) e de XDH das cepas de <i>S. cerevisiae</i> PE-2 Rm, PE-2 209, PE-2 274 e PE-2 pSP-G1 e de <i>S. stipitis</i> NRRL-Y7124..... | 65 |
| Tabela 16. Atividades de XR (NADPH e NADH) e de XDH das cepas de <i>S. cerevisiae</i> PE-2 Op 1, PE-2 Op 2, PE-2 209, PE-2 274 e PE-2 pSP-G1 e de <i>S. stipitis</i> NRRL-Y7124..... | 65 |

Tabela 17. Médias do etanol produzido em 24 horas e em 48 horas de fermentação, rendimentos de açúcar total em etanol (η_E), produtividades volumétricas em etanol (P_V) e seus respectivos desvios padrão, das fermentações de PE-2 274. A análise estatística foi realizada aplicando o teste de Tukey..... 79

Tabela 18. Etanol produzido, rendimento (η_E), fator de conversão de xilose a xilitol ($Y_{\text{xilitol/xilose}}$) e fatores de conversão de ART em etanol ($Y_{E/ART}$), glicerol ($Y_{\text{glicerol/ART}}$) e ácido acético ($Y_{\text{ác. acético/ART}}$) das fermentações de PE-2 274, NAN-127 e MA-R4..... 81

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|------------------------------------|--|
| 5-HMF | 5-Hidroximetilfurfural |
| AR | Aldose redutase |
| BLAST | <i>Basic Local Alignment Search Tool</i> |
| BSA | <i>Bovine serum albumin</i> |
| C5 | Cinco carbonos |
| C6 | Seis carbonos |
| cDNA | <i>Complementary DNA</i> |
| CMC | Carboximetilcelulose |
| CO₂ | Gás carbônico |
| CTBE | Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol |
| DNA | <i>Deoxyribonucleic acid</i> |
| dNTP | <i>Deoxynucleotide solution mix</i> |
| EDTA | <i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i> |
| EUA | Estados Unidos da América |
| GEE | Gases do efeito estufa |
| HCl | Ácido clorídrico |
| HPLC | Cromatografia líquida de alta eficiência |
| H₂SO₄ | Ácido Sulfúrico |
| IPTG | <i>Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside</i> |
| ITS | Região espaçadora interna transcrita |
| ITS 1 | Região espaçadora interna transcrita 1 |
| ITS 2 | Região espaçadora interna transcrita 2 |
| Kb | Kilobase |
| Kcat | Coeficiente de eficiência catalítica |
| k_La | Coeficiente volumétrico de transferência de O ₂ |
| K_m | Constante de Michaelis-Menten |
| LB | Luria-Bertani |
| LiAc | Acetato de Lítio |
| LSU | Subunidade ribossomal maior |
| mRNA | <i>Messenger Ribonucleic acid</i> |
| NAD⁺ | <i>Nicotinamide adenine dinucleotide</i> |
| NADH | <i>Nicotinamide adenine dinucleotide, reduced</i> |
| NADPH | <i>Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate</i> |
| NaOH | Hidróxido de sódio |
| NCBI | <i>National Center for Biotechnology Information</i> |
| O₃ | Ozônio |

| | |
|----------------------------|---|
| OD | Densidade ótica |
| PCR | <i>Polymerase chain reaction</i> |
| PEG | Polietilenoglicol |
| PE-2 | Pedra-2 |
| PPP | Via pentose fosfato |
| Pró-álcool | Programa Nacional do Álcool |
| qRT-PCR | PCR quantitativo em tempo real |
| RAxML | <i>Randomized Axelerated Maximum Likelihood</i> |
| RNA | <i>Ribonucleic acid</i> |
| RT-PCR | <i>Reverse transcription polymerase chain reaction</i> |
| TAE | Tris-Acetato-EDTA |
| tef1 | Fator de elongação 1 |
| T_m | Temperatura de <i>melting</i> |
| Unicamp | Universidade Estadual de Campinas |
| USP | Universidade de São Paulo |
| XDH | Xilitol desidrogenase |
| XDH1 | Xilitol desidrogenase 1 |
| XDH2 | Xilitol desidrogenase 2 |
| X-GAL | <i>5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galacto-pyranoside</i> |
| XI | Xilose isomerase |
| XK | Xilulose quinase |
| XP5 | D-xilose-5-fosfato |
| XR | Xilose redutase |
| YNB | <i>Yeast Nitrogen Base</i> |
| YNB ura⁻ | <i>Yeast Nitrogen Base</i> sem uracila e uridina |
| YPD | <i>Yeast Extract Peptone Dextrose</i> |
| Y-PER | <i>Yeast Protein Extraction Reagent</i> |

1 INTRODUÇÃO

Atualmente o petróleo é a principal matéria-prima empregada na geração de produtos químicos e combustíveis. No entanto, o rápido esgotamento desse recurso finito, o aumento da emissão de gases do efeito estufa (GEE), principalmente CO₂, e preocupações com a segurança energética (conceito que alia segurança de território, recursos naturais e fornecimento de combustíveis vitais, com questões de desenvolvimento econômico e sustentabilidade) (DHENIN, 2009) fortalecem o interesse por fontes de energia alternativas e não baseadas em petróleo (DUKES, 2003; GNANSOUNOU; DAURIAT, 2010; AGARWAL, 2007). Hoje os biocombustíveis, principalmente etanol, biodiesel e biogás, são produzidos em larga escala a partir de tecnologias bem estabelecidas, utilizando fontes renováveis de energia (PERALTA-YAHYA, et al., 2012; GOLDEMBERG; COELHO; GUARDABASSI, 2008). A produção mundial de biocombustíveis cresceu rapidamente entre os anos de 2007 a 2012, sob a liderança dos Estados Unidos e do Brasil, primeiro e segundo maiores produtores de bioetanol, respectivamente (CHUM et al., 2013). Entre as opções mais viáveis, o etanol, também conhecido como etanol de primeira geração, se destaca por se tratar de um biocombustível bem adaptado para uso em meios de transporte em diversos países, principalmente através da fermentação do amido do milho (nos Estados Unidos) e da sacarose da cana-de-açúcar (no Brasil) (AGARWAL, 2007; PERALTA-YAHYA et al., 2012).

Entretanto, por ser derivada principalmente de culturas agrícolas, a produção de biocombustíveis em larga escala causa preocupação com relação ao possível impacto na biodiversidade local, origem da matéria-prima e uso da terra, que têm como consequência a competição com culturas alimentares (NAIK et al., 2010). No caso do Brasil, o aumento do preço do açúcar observado nos últimos anos no mercado mundial tem motivado grandes companhias a favorecerem a produção de açúcar ao invés de etanol (JAGGER, 2013). Além disso, para acompanhar a demanda crescente por etanol é necessário o desenvolvimento de novas tecnologias para a obtenção de mais etanol por tonelada de cana-de-açúcar (DIAS, et al., 2012; HAHN-HAGERDAL, et al., 2006).

Neste sentido, em razão da lignocelulose ser a biomassa mais abundante do planeta, renovável e rica em açúcares (cerca de 70% da sua composição) (PERALTA-YAHYA, 2012), o

seu uso surge como uma das principais estratégias para aumentar a produção de etanol sem necessariamente ampliar as áreas destinadas ao cultivo da matéria-prima e sem competir com a produção de alimentos e ração animal (HO; CHEN; BRAINARD, 1998; SALES, 2010; LIMAYEM; RICKE, 2012). Estimasse que o uso do total de resíduos de culturas e também das perdas da colheita possa gerar cerca de 491 bilhões de litros de etanol por ano, aproximadamente 16 vezes mais que a produção atual de etanol no mundo (SARKAR et al., 2012). No caso do Brasil, o bagaço de cana-de-açúcar é o principal resíduo gerado no agronegócio, pois uma tonelada de cana-de-açúcar moída para a produção de açúcar e etanol resulta em cerca de 250 kg desse resíduo (SOUZA, 2013). Dessa forma, o bagaço tem sido considerado uma matéria-prima promissora para a produção do etanol lignocelulósico, ou de segunda geração, e se espera que a produção desse biocombustível por meio dessa tecnologia resulte em menor impacto no meio ambiente que a produção do etanol de primeira geração (MACRELLI et al., 2012). Embora o bagaço seja utilizado pelas usinas para a co-geração de energia elétrica, o uso de aproximadamente 25% para a produção do etanol lignocelulósico já representaria um aumento considerável na produção mundial desse biocombustível (LIMA, 2011).

No entanto, independente do material lignocelulósico utilizado o custo de produção do etanol de segunda geração ainda é bastante elevado (MACRELLI et al., 2012), com isso, barreiras biotecnológicas devem ser superadas para garantir que este biocombustível seja produzido de forma comercialmente viável, dentre elas a completa e rápida utilização de todos os tipos de açúcares que compõe a celulose e a hemicelulose (HAHN-HÄGERDAL et al., 2007). A fermentação desses açúcares representa um desafio único, pois além dos polissacarídeos da parede celular formarem uma arquitetura extremamente complexa, recalcitrante, a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, um dos micro-organismos mais eficazes na produção de etanol, é incapaz de naturalmente fermentar pentoses como a xilose, o segundo açúcar mais abundante da biomassa lignocelulósica depois da glicose (ALVIRA et al., 2010). Em consequência disso, *S. cerevisiae* tem sido modificada geneticamente de forma intensa (ZHOU et al., 2012) com o intuito de gerar um micro-organismo capaz de converter eficientemente pentoses a etanol em condições industriais (HAHN-HAGERDAL et al., 2007). Neste sentido, com o objetivo de gerar um micro-organismo que fermentasse eficientemente xilose a etanol neste trabalho foram caracterizadas leveduras naturalmente capazes de utilizar xilose, *Rhodotorula mucilaginosa* UC11 isolada do trato intestinal da larva do inseto *Migdolus fryanus* (parasita da cana-de-açúcar),

e *Ogataea (Hansenula) polymorpha* FT212L isolada como contaminante de dornas de fermentação alcoólica, bem como os seus genes *xyl1* e *xyl2* que codificam as enzimas XR e XDH, respectivamente. E pela primeira vez foi realizada a introdução heteróloga desses genes na cepa industrial *S. cerevisiae* Pedra-2 (PE-2), gerando as cepas PE-2 Rm, PE-2 Op 1 e PE-2 Op 2, e também dos genes *xyl* e *xyl2* de *Scheffersomyces stipitis*, uma das leveduras que melhor fermenta xilose a etanol, e do gene *xks1* de *S. cerevisiae*, gerando a cepa PE-2 274. As leveduras recombinantes obtidas foram avaliadas quanto à capacidade de utilizar xilose para crescimento, atividade das enzimas XR e XDH e, a melhor delas, quanto à capacidade co-fermentar xilose e glicose a etanol em biorreator.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Etanol de Primeira Geração

O etanol de primeira geração é produzido através da fermentação dos açúcares de produtos agrícolas como cana-de-açúcar, milho, trigo, beterraba e mandioca, culturas que crescem de forma renovável na maioria dos climas ao redor do mundo. Por ter origem em culturas agrícolas, o etanol não possui as impurezas presentes nos combustíveis derivados de petróleo, como óxidos de enxofre e seus particulados, que representam a principal fonte de poluição em grandes áreas metropolitanas, além de reduzir a emissão de GEE e precursores de ozônio (O₃) (óxidos de nitrogênio, monóxido de carbono e compostos orgânicos voláteis), reduzindo os impactos negativos desses poluentes na saúde humana (GOLDEMBERG; GUARDABASSI, 2010; SALDIVA, 2009).

O Brasil foi o país pioneiro na produção de etanol combustível com a implantação do Programa Nacional do Álcool (Pró-álcool) em 1975, com a proposta de reduzir a importação de petróleo (GOLDEMBERG; COELHO; GUARDABASSI, 2008). O etanol foi rapidamente adotado, inicialmente, como aditivo oxigenado e depois como combustível para transporte primário, no Brasil, Estados Unidos, Canadá e vários países europeus (STEPHEN; MABEE; SADDLER, 2011). Hoje, os Estados Unidos é o maior produtor mundial (em 2012 produziam cerca de 49 bilhões de litros), onde o etanol é produzido através da sacarificação do amido de milho seguido da fermentação (RENEWABLE FUELS ASSOCIATION, 2013; GOLDEMBERG; COELHO; GUARDABASSI, 2008). O Brasil é segundo maior produtor mundial, e segundo o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, na Safra de 2012/2013 produziu cerca de 23,5 bilhões de litros de etanol através da fermentação direta da sacarose da cana-de-açúcar (UNIÃO DOS PRODUTORES DE BIOENERGIA, 2012).

Apesar dos Estados Unidos serem o maior produtor mundial de etanol utilizando o milho como matéria-prima, o etanol da cana-de-açúcar é mais vantajoso por diversas razões, entre elas: (1) em um ciclo de vida as emissões de GEE são reduzidas em 84% (em volume), enquanto o etanol de milho reduz as emissões em 30%; (2) o custo de produção é 60 % menor do que o custo de produção a partir do milho, e (3) o rendimento em litros de etanol por hectare (6470 L/ha) é significativamente maior do que o rendimento do etanol de milho (4180 L/ha). Além disso, há sérias limitações sobre a expansão da área dedicada à produção de etanol a partir de milho, pois

nos EUA a plantação de milho compete com o cultivo da soja, que consequentemente leva a questão da competição com a produção de alimentos (GOLDEMBERG; GUARDABASSI, 2010).

No Brasil a cana-de-açúcar é cultivada desde o século 16. O sucesso do plantio dessa cultura altamente produtiva em diversas regiões do país é devido ao sistema C4 de fotossíntese que é bem adaptado ao clima tropical (DE SOUZA E BUCKERIDGE, 2010; BUCKERIDGE et al., 2012). Para a produção do etanol, o colmo é moído para extrair o caldo e o bagaço remanescente é queimado para originar calor ou eletricidade necessária para o funcionamento da usina (GOLDEMBERG; GUARDABASSI, 2010). O etanol é utilizado como aditivo oxigenado e intensificador de gasolina (misturado na proporção de 20%, E-20, a 26%, E-26, de etanol anidro) ou em motores específicos para etanol hidratado e também em veículos com a tecnologia *flex fuel* nos quais o etanol pode ser adicionado na forma E-100 (etanol 100%) (GOLDEMBERG; COELHO; GUARDABASSI, 2008). Atualmente, o etanol substitui aproximadamente 50% da gasolina que seria utilizada no Brasil caso não existisse esse combustível como opção (LEE et al., 2013; GOLDEMBERG, 2007).

2.1.1 PROCESSO DE FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA BRASILEIRO

A produção comercial brasileira de etanol combustível é realizada principalmente através de dois processos: batelada alimentada com reciclo de células também conhecida como processo *Melle-Boinot*, tecnologia predominante nas destilarias brasileiras adotado em cerca de 75% delas (BASSO; BASSO; ROCHA, 2011), e pelo processo de fermentação contínua. Em ambos os processos utiliza-se *S. cerevisiae* como micro-organismo produtor de etanol na fermentação do caldo e/ou melão da cana-de-açúcar (DORTA et al., 2006).

Em processos de batelada alimentada, um ou mais nutrientes são adicionados ao reator continuamente, enquanto que o caldo da fermentação pode ser removido de forma semi-contínua ou não ser removido. A fermentação contínua envolve a adição de meio fresco e estéril continuamente no reator, enquanto que o efluente é removido na mesma taxa que a alimentação fazendo com que o volume permaneça constante (RAMASWAMY; MARCOTTE, 2004).

A principal peculiaridade de ambos os processos é o fato da levedura ser separada do meio fermentado e 90-95% das células serem reutilizadas em fermentações subsequentes depois de serem lavadas com ácido sulfúrico diluído para reduzir a contaminação bacteriana (BASSO et

al., 2008; WHEALS et al., 1999). O reciclo celular ocorre duas vezes por dia em uma temporada de produção de 200-250 dias (BASSO; BASSO; ROCHA, 2011). A alta densidade celular (8-17% v/v) e a temperatura de 33-35°C contribuem para que menos açúcar seja desviado para crescimento celular (BASSO et al. 2008), obtendo-se um elevado rendimento na produção do etanol (90-92%) (WHEALS et al., 1999). No processo de *Melle-Boinot*, o tempo de alimentação normalmente leva de 4 a 6 horas e a fermentação é finalizada em 6 a 10 horas (BASSO et al., 2008). No fim da fermentação, o licor fermentado é destilado produzindo uma mistura azeotrópica de etanol hidratado 95,5% v/v, e para a produção do etanol anidro a água é removida com carboidrato desidratado ou com uma peneira com tamanho molecular apropriado onde a água é adsorvida (BASSO; BASSO; ROCHA, 2011). Quando comparado com o modo contínuo, a batelada alimentada apresenta maiores rendimentos e produtividades, menor nível de contaminação e facilidade na limpeza (BASSO; BASSO; ROCHA, 2011).

2.2 Biomassa Lignocelulósica

A biomassa lignocelulósica, que engloba resíduos agrícolas como palha de milho, palha de trigo e bagaço de cana-de-açúcar, representa a biomassa renovável mais abundante do planeta, onde a sua produção anual mundial é estimada em 1×10^{10} milhões de toneladas (SANCHEZ; CARDONA, 2008). Além disso, este material não é utilizado para alimentação humana, sendo assim o seu uso não gera questionamentos uma vez que não compete diretamente com suprimentos alimentares (STEPHEN; MABEE; SADDLER, 2011).

A biomassa lignocelulósica é composta principalmente por celulose (30–60%), hemicelulose (20–40%) e lignina (10–30%). Celulose e hemicelulose são carboidratos estruturais enquanto a lignina é um polímero fenólico. A quantidade de cada componente depende da origem da biomassa (BABEL et al., 2007). A estrutura composta por celulose, hemicelulose e lignina é responsável pela alta resistência contra hidrólise e ataque enzimático (ADSUL et al., 2011).

A celulose é um polímero de glicose (D-glucopiranosil- β -1,4-D-glucopiranoose) altamente ordenado. Materiais celulósicos possuem domínios cristalinos separados por regiões menos ordenadas, anamorfos. A estrutura cristalina da celulose é altamente resistente à hidrólise química e enzimática devido a sua estrutura composta por cadeias de celodextrinas precisamente arranjadas. Estas regiões anamorfos são potencialmente pontos para o ataque enzimático e

químico. A celulose é degradada em monômeros de glicose por ácidos ou por enzimas denominadas celulasas (ADSUL et al., 2011).

A hemicelulose é um heteropolímero altamente ramificado formado principalmente por xilose, glicose, manose, galactose, arabinose e em alguns materiais podem ser observados ácidos urônicos. As hemiceluloses são referidas como mananas, xilanas ou galactanas dependendo da predominância do tipo de açúcar presente no polímero. Os açúcares C5 (cinco carbonos) e C6 (seis carbonos) são ligados através de ligações glicosídicas 1,3; 1,6 e 1,4 muitas vezes acetiladas, formando uma estrutura frouxa, muito hidrofílica, a qual atua como uma cola entre a celulose e a lignina (ADSUL et al., 2011). Em comparação com a celulose, a hemicelulose é mais facilmente hidrolisada (BABEL et al., 2007).

A lignina é composta por unidades de fenilpropanóides derivadas dos correspondentes álcoois p-hidroxicinamil. A lignina é hidrofóbica e altamente resistente à degradação química e biológica. Está presente na lamela média atuando como cimento entre as paredes celulares, além de se localizar nas camadas das paredes celulares formando juntamente com as hemiceluloses uma matriz anamorfa onde as fibras de celulose estão embebidas e protegidas da biodegradação (ADSUL et al., 2011).

2.1 BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR

O bagaço de cana-de-açúcar, ou simplesmente bagaço, é o resíduo fibroso resultante da moagem dos colmos e da extração do caldo da cana-de-açúcar, considerado o principal subproduto da indústria do açúcar e etanol (PANDEY et al., 2000). Nas usinas, o bagaço é queimado nas caldeiras para suprir a demanda energética da planta industrial e a energia elétrica excedente é vendida, fazendo com que a usina seja não apenas energeticamente autossuficiente, mas também um exportador de energia (BASSO; BASSO; ROCHA, 2011). Já os resíduos do plantio da cana-de-açúcar (principalmente folhas) são previamente queimados para facilitar a colheita e são deixados no campo para fins agrícolas (FURLAN et al., 2013; PIPPO et al., 2011).

O bagaço é um material complexo composto por cerca de 50% de celulose, 25% de hemicelulose e 25% de lignina. Em comparação com outros resíduos agrícolas, o bagaço pode ser considerado um rico reservatório de energia solar devido à alta produção desse resíduo (cerca de 80 t/ha contra 1, 2 e 20 t/ha de trigo, outras gramíneas e árvores, respectivamente) (PANDEY et al., 2000).

Além da geração de eletricidade, o bagaço pode ser empregado como matéria-prima em outros processos, como na produção de papel e celulose e de produtos baseados em fermentação. Químicos e metabólitos como álcoois e alcaloides e ração animal enriquecida com proteína (*single cell protein*), também já foram produzidos a partir de processos envolvendo bagaço de cana-de-açúcar (PANDEY et al., 2000).

2.2 Etanol Lignocelulósico

Apenas um terço da biomassa da cana-de-açúcar é transformado em etanol enquanto os dois terços remanescentes permanecem na forma de bagaço e palha de cana-de-açúcar (BUCKERIDGE et al., 2012). Devido ao altíssimo potencial energético, nasce o interesse de utilizar os açúcares que constituem os resíduos lignocelulósicos para a produção de etanol combustível, surgindo, assim, o etanol lignocelulósico ou de segunda geração. Outras razões justificam o interesse por esse biocombustível, como o baixo custo da matéria-prima, o fim da competição direta e indireta com a produção de alimentos e ração animal, além da redução dos riscos ambientais (degradação do solo e poluição da água e do ar), características que estão associadas aos biocombustíveis de primeira geração (GNANSOUNOU; DAURIAT, 2010; STEPHEN; MABEE; SADDLER, 2012).

Uma das alternativas para a produção industrial de etanol lignocelulósico é a rota bioquímica, que significa a hidrólise ácida ou enzimática da biomassa lignocelulósica seguida da fermentação dos açúcares resultantes (FURLAN et al., 2013). Através da rota bioquímica a produção do etanol lignocelulósico ocorre principalmente através das seguintes etapas: (a) pré-tratamento da biomassa; (b) hidrólise da celulose e da hemicelulose, (c) fermentação dos açúcares e, por fim, (d) recuperação de produtos e de subprodutos (ALVIRA ET AL, 2010; STEPHEN; MABEE; SADDLER, 2012). Durante o pré-tratamento, a biomassa é submetida a condições que promovem a ruptura da estrutura da matriz fibrosa do material, resultando na separação da hemicelulose da cadeia polimérica de celulose as quais estão entrelaçadas pela lignina. Em seguida, a hidrólise dos polímeros celulose e hemicelulose promove a liberação de açúcares simples que são, então, fermentados a etanol por uma levedura que seja capaz de fermentar tanto hexoses como pentoses. A levedura utilizada deve ser capaz de lidar com os compostos inibidores que são gerados durante o pré-tratamento e que estão invariavelmente associados a açúcares

derivados da biomassa. A destilação e desidratação da solução aquosa de etanol produz um etanol com grau de pureza de 99,9%, adequado para uso como combustível. A recuperação de subprodutos depende do tipo de matéria-prima e do processo de pré-tratamento, podendo incluir uma gama de produtos como derivados da lignina e celulose não hidrolisada (STEPHEN; MABEE; SADDLER, 2012). Para processos de segunda geração, a expectativa é que o balanço energético seja melhor do que os métodos atuais empregados para a produção de etanol a partir dos açúcares da cana-de-açúcar e do milho (LARSON, 2006).

No entanto, desafios biotecnológicos impedem o desenvolvimento de um processo economicamente viável para a produção de etanol a partir da biomassa lignocelulósica. Dentre eles, os principais são redução e eliminação de químicos utilizados no pré-tratamento, diminuição do custo e quantidade de enzimas empregadas na etapa de hidrólise e a necessidade de um micro-organismo eficiente que seja capaz de fermentar todos os açúcares disponíveis (ALVIRA et al., 2010).

Na produção de biocombustíveis líquidos tipicamente o material lignocelulósico é pré-tratado em processo termoquímico ácido (JÖNSSON et al., 2013). No entanto, pelo fato do tratamento ácido ser inespecífico consequentemente ocorre à formação de subprodutos químicos indesejados que inibem os micro-organismos produtores de etanol (CHANDEL; DA SILVA; SINGH, 2013). Os inibidores gerados podem ser divididos nos seguintes principais grupos: derivados de furano, como furfural e 5-hidroximetilfurfural (5-HMF); compostos fenólicos, ácidos orgânicos (levulínico, fórmico e ácido acético); e metais pesados (níquel, alumínio, cromo e etc.). Sobre altas temperaturas e pressão a xilose pode ser degradada a furfural e, similarmente, o 5-HMF pode ser formado através da degradação de hexoses. O desarranjo do furfural e do 5-HMF leva a formação de ácido fórmico, o ácido levulínico é formado pela degradação do 5-HMF, e os compostos fenólicos são geralmente formados a partir do desarranjo parcial da lignina e também durante a degradação de carboidratos (PALMQVIST; HAHN-HÄGERDAL, 2000). Tais compostos são considerados inibidores, pois afetam a fisiologia dos micro-organismos e frequentemente resultam na diminuição da viabilidade celular, reduzido rendimento em metabólito e produtividade diminuída (CHANDEL; DA SILVA; SINGH, 2013). Neste sentido, melhorias econômicas na produção do etanol de segunda geração poderiam ser alcançadas com a eliminação dos inibidores presentes nos hidrolisados. Inúmeros métodos (físico, físico-químicos, químico e biológico) vêm sendo estudados visando a detoxificação de hidrolisados

lignocelulósicos, mas abordagens utilizando engenharia genética tem permitido a geração de cepas competitivas resistentes a inibidores, sendo esta considerada uma das estratégias mais promissoras para superar a extensa variedade de compostos inibidores e permitir uma fermentação com alto rendimento e produtividade a partir de hidrolisados lignocelulósicos (CHANDEL; DA SILVA; SINGH, 2013).

Somado a isso, a fermentação incompleta e ineficiente dos carboidratos presentes na biomassa lignocelulósica é considerada um dos principais problemas para a produção economicamente favorável do etanol lignocelulósico (KIM et al., 2013). A fermentação de hexoses é extremamente eficiente, entretanto, a fermentação de pentoses representa um desafio único. *Saccharomyces cerevisiae*, principal levedura empregada na produção do etanol de primeira geração é incapaz de naturalmente fermentar pentoses como a D-xilose, o segundo açúcar mais abundante da biomassa lignocelulósica depois da glicose. Como consequência disso, essa levedura tem sido extensivamente manipulada geneticamente a fim de incorporar uma via de assimilação de xilose eficiente e superar um dos principais gargalos que impede a consolidação da produção do etanol de segunda geração (HAHN-HÄGERDAL et al., 2007a; VAN MARIS et al., 2007; VAN VLEET; JEFFRIES, 2009; KIM et al., 2013a). A inabilidade de *S. cerevisiae* fermentar todos os açúcares presentes no hidrolisado lignocelulósico e a busca por novas alternativas que possam torná-la uma eficiente fermentadora de xilose é o principal foco deste trabalho.

2.3 Vias de metabolização da xilose

A fermentação de açúcares de cinco carbonos é possibilitada por duas vias bioquímicas distintas as quais levam a conversão de pento-aldoses em xilulose: a via baseada na redução/oxidação e a via baseada na isomerização (Figura 1) (BETTIGA et al., 2008).

Para a maioria dos fungos e leveduras fermentadoras de xilose, a conversão de D-xilose a D-xilulose ocorre pela via da redução/oxidação mediada por duas enzimas. A D-xilose é inicialmente reduzida a D-xilulose pela xilose redutase (XR: gene *xy1I*; EC 1.1.1.21) e então oxidada a D-xilulose pela xilitol desidrogenase (XDH: gene *xy12*; EC 1.1.1.9). Por fim, a xilulose quinase (XK: gene *xks1*; EC 2.7.1.17) fosforila a D-xilulose em D-xilose-5-fosfato (XP5) a qual é posteriormente metabolizada na via pentose fosfato (PPP) (MATSUSHIKA et al., 2009b).

Grande parte das xiloses redutases já identificadas apresenta uma dependência estrita ao NADPH como cofator, enquanto a xilitol desidrogenase é específica para o cofator NAD^+ (HECTOR et al., 2011). Dessa forma, durante as reações mediadas por XR e XDH ocorre o acúmulo do excesso de NADH e a depleção de NAD^+ , resultando em um desbalanço redox intracelular (MATSUSHIKA et al., 2009b). Aerobicamente, o excesso de NADH pode ser reoxidado pela mitocôndria, mas em condições anaeróbicas, o excesso de NADH é acumulado e a utilização de xilose fica mais lenta e em alguns casos cessa (HECTOR et al., 2011). Acredita-se que o desbalanço de cofatores seja um dos principais responsáveis pela fermentação de xilose ineficiente, o que resulta no acúmulo de xilitol como consequência da inabilidade da célula oxidar os cofatores reduzidos na falta de oxigênio (KIM et al., 2013; HAHN-HÄGERDAL et al, 2007a). Para a otimização da via XR/XDH, a engenharia de proteínas utilizando estratégias como mutagênese sítio dirigida nos sítios de ligação dos cofatores e *redesign* de proteínas têm sido empregadas com sucesso para modificar as especificidades dos cofatores (KIM et al., 2013).

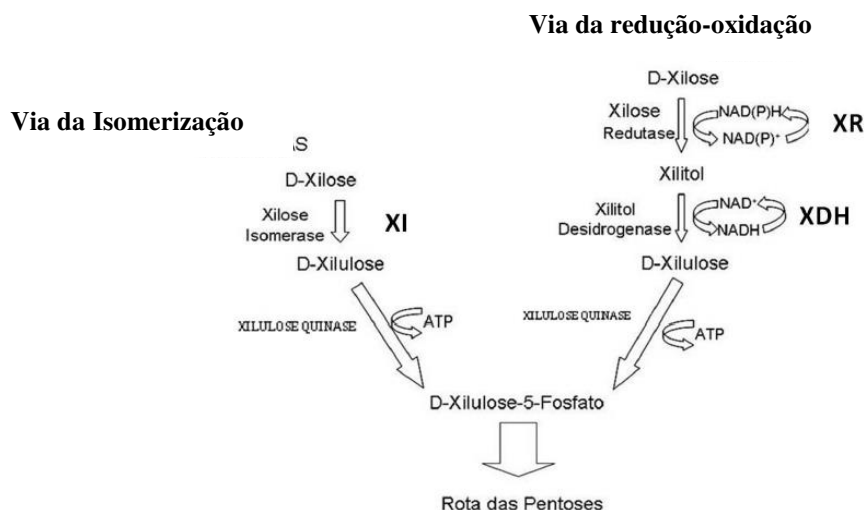


Figura 1. As duas vias de utilização de xilose: a via da isomerização e a via da redução-oxidação. Adaptado de Hahn-Hägerdal; Pamment (2004).

Já a maioria das bactérias, alguns fungos filamentosos e plantas utilizam-se da via da isomerização para a conversão de D-xilose diretamente a D-xilulose (Figura 1). Nesta via, é necessária somente a enzima metal-íon-dependente xilose isomerase (XI: gene *xylA*; EC 5.3.1.5) (HO; CHEN; BRAINARD, 1998; ZHOU et al., 2012; MATSUSHIKA et al., 2009b). E assim como na via da redução/oxidação, a D-xilulose é fosforilada a X5P pela XK e então metabolizada

na PPP. A via da isomerização elimina o desbalanço de cofatores que acompanha a produção excessiva de xilitol (ZHOU et al., 2012).

No entanto, mesmo a via da redução/oxidação possuindo dois defeitos intrínsecos, a secreção de xilitol e o desbalanço de cofatores, ela é considerada termodinamicamente mais vantajosa que a via da isomerização nos quesitos taxa de consumo de xilose e produção de etanol (KIM et al., 2013). Karhumaa et al. (2007) compararam duas cepas recombinantes isogênicas de *S. cerevisiae* quanto a capacidade de fermentarem xilose, uma contendo a via XR-XDH de *S. stipitis* e a outra a via XI de *Piromyces* sp. Mesmo a XI de *Piromyces* sp. apresentando um K_m (coeficiente de Michaelis-Menten) inferior ao K_m da XR de *S. stipitis*, significando que a XI possui afinidade ligeiramente maior pela xilose, foi observado que a baixa atividade da XI (2 a 20 U.mg de proteína⁻¹) não foi suficiente para possibilitar o mesmo crescimento e taxa de fermentação, em meio contendo xilose, obtidos pela cepa contendo a via XR-XDH (atividade da XR de 17 a 48 U.mg de proteína⁻¹).

2.4 Micro-organismos assimiladores de pentoses

A hemicelulose é um polímero heterogêneo que libera principalmente xilose e arabinose e a maioria dos micro-organismos apresenta baixa eficiência na fermentação desses açúcares C5 (ADSUL et al., 2011). No entanto, algumas leveduras são naturalmente capazes de assimilar xilose, como *Scheffersomyces stipitis* (*Pichia stipitis*), *Pachysolen tannophilus* e *Candida shehatae*, que metabolizam esse açúcar principalmente pela via da redução/oxidação. Diferente das XRs da maioria das leveduras assimiladoras de xilose, a enzima dessas leveduras pode utilizar não apenas NADPH como também NADH como cofator, permitindo a recirculação dos cofatores entre as etapas de redução e oxidação da via da xilose (BABEL et al., 2007), evitando o desbalanço de cofatores normalmente observado (HECTOR et al., 2011). No entanto, sabe-se que micro-organismos nativos que fermentam xilose a etanol não possuem a robustez necessária para sobreviver a este processo e fermentar xilose a etanol eficientemente (KIM et al., 2013). Dentre as condições estressantes impostas pela fermentação industrial, se encontram a alta concentração de etanol, elevada temperatura, estresse osmótico (devido às altas concentrações de açúcares e sais), acidez, contaminação bacteriana (ALVES, 1994) e reciclo celular (BASSO et al., 2008). Neste sentido, a viabilidade do etanol lignocelulósico em escala industrial é impedida pela

inabilidade de cepas de leveduras e bactérias converterem todos os açúcares disponíveis em etanol, condição que poderia ser revertida através da construção de cepas capazes de fermentarem hexoses e pentoses sobre condições robustas de operação (ADSUL et al., 2011).

S. cerevisiae é a principal levedura utilizada na produção industrial de etanol de cana-de-açúcar ou milho, pois apresenta alta eficiência na conversão glicose – etanol, elevada tolerância a este composto, resistência e robustez aos inibidores presentes nas altas concentrações de melaço, além de não apresentar muitas limitações fermentativas como as bactérias (SALES, 2010). Entretanto, mesmo o seu genoma contendo todos os genes necessários para a metabolização das pentoses, inclusive aqueles que codificam XR (*gre3*; TRÄFF-BJERRE et al., 2004), XDH (*Scxyl2*; RICHARD; TOIVARI; PENTTILÄ, 1999) e XK (*xks1*; YANG; JEFFRIES, 1997; RICHARD; TOIVARI; PENTTILÄ, 2000), *S. cerevisiae* é incapaz de utilizar xilose; apenas a D-xilulose, isômero da D-xilose, pode ser assimilada por essa levedura (BABEL et al., 2007). As possíveis explicações para tal limitação são: 1) transporte ineficiente de xilose; 2) desbalanço redox gerado nos dois primeiros passos do metabolismo da xilose; 3) baixa atividade endógena da xilulose quinase; 4) via pentose fosfato ineficiente, dentre outros (SALES, 2010; MATSUSHIKA et al., 2009b).

Dessa forma, diferentes abordagens de engenharia metabólica visam introduzir vias de assimilação de xilose de outros micro-organismos em *S. cerevisiae*, principalmente por ser acessível geneticamente, uma das únicas espécies conhecidas com rápido crescimento anaeróbico em hexoses, além da sua robustez que é consequência de uma longa história de aplicação em processos fermentativos industriais (HECTOR et al., 2011; KUYPER et al., 2003). Mas a grande vantagem do desenvolvimento dessa cepa é a possibilidade de integrá-la em plantas de produção de etanol de primeira geração que já a utilizam (HAHN-HÄGERDAL et al., 2007b).

2.5 Cepas recombinantes de *Saccharomyces cerevisiae*

Como *S. cerevisiae* é incapaz de assimilar xilose, mas utiliza e fermenta o seu isômero D-xilulose, o primeiro passo para permitir o metabolismo da xilose é a introdução de uma via heteróloga de conversão de xilose a xilulose. Ao longo dos anos, cepas de *S. cerevisiae* foram engenheiradas para fermentar xilose tanto pela via da redução/oxidação (fungos) como pela via da isomerização (bactérias e fungos filamentosos) de micro-organismos que naturalmente

utilizam pentoses (HAHN-HÄGERDAL et al., 2007b; 2007; HECTOR et al., 2011b), e alguns progressos foram alcançados adotando ambas as estratégias (HECTOR et al., 2011b).

As primeiras cepas de *S. cerevisiae* assimiladoras de xilose foram geradas através da expressão dos genes *xyl1* e *xyl2* de *S. stipitis* que codificam respectivamente, *PsXR* e *PsXDH* (HAHN-HÄGERDAL et al., 2007b). *S. stipitis* foi escolhida como a principal fonte das enzimas expressas heterologicamente, pois é capaz de fermentar xilose e produzir etanol muito próximo ao rendimento teórico em condição microaerófila bem controlada (HAHN-HÄGERDAL et al., 2007b). A primeira abordagem bem sucedida foi realizada por Kötter et al. (1990) através do isolamento dos genes *xyl1* e *xyl2* de *S. stipitis* e expressão simultânea em *S. cerevisiae*, que, no entanto, resultou em uma taxa de consumo de xilose lenta e baixa produção de etanol.

Já a expressão heteróloga de genes que codificam à XI em *S. cerevisiae* demonstrou ser um grande desafio e por muitos anos nenhuma enzima ativamente expressa foi relatada (HAHN-HÄGERDAL et al., 2007b). A expressão heteróloga mal sucedida é provavelmente devido ao dobramento proteico incorreto, modificações pós-traducionais e formação de ponte de dissulfeto (MATSUSHIKA et al., 2009b). A XI da bactéria *Thermus thermophilus* foi a primeira a ser funcionalmente expressa em *S. cerevisiae* (WALFRIDSSON et al. 1996), entretanto proporcionou uma fermentação ineficiente de xilose (ELIASSON et al., 2000). Em seguida, as XIs dos fungos *Piromyces* sp. (HARHANGI et al., 2003) e *Orpinomyces* (MADHAVAN et al., 2009b) foram expressas em *S. cerevisiae* e apesar da atividade enzimática relativamente alta, as cepas apresentaram apenas um crescimento lento em xilose (HAHN-HÄGERDAL et al., 2007b).

Apesar do genoma de *S. cerevisiae* conter o gene *xks1* que codifica à XK, a atividade endógena dessa enzima é muito baixa para suportar a fermentação etanólica de xilose em cepas modificadas geneticamente com genes da via da xilose (HAHN-HÄGERDAL et al., 2007b). Neste sentido, a superexpressão do gene *xks1* endógeno de *S. cerevisiae* (*Scxks1*) ou a introdução do gene heterólogo *xyl3* de *S. stipitis* é necessária para facilitar o metabolismo da xilose através da via pentose fosfato (KIM et al., 2013). Ho; Chen; Brainard (1998) foram os primeiros a gerar uma cepa recombinante de *S. cerevisiae* com o gene *xks1* endógeno superexpresso (*Scxks1*) juntamente com os genes *Psxyl1* e *Psxyl2* em um plasmídio multicópia. Cepas estáveis de *S. cerevisiae* também foram geradas por integração cromossomal dos genes *Psxyl1*, *Psxyl2* e *Scxks1* (ELIASSON et al., 2000). Tais cepas recombinantes foram capazes de fermentar xilose bem

como cofermentar xilose e glicose, mas apresentaram baixo rendimento em etanol e produção de xilitol como principal subproduto (HO; CHEN; BRAINARD, 1998; ELIASSON et al., 2000).

Outras modificações genéticas somadas à introdução da etapa inicial da via de assimilação de xilose vêm sendo realizadas para aumentar a eficiência do metabolismo da xilose. Dentre as estratégias mais importantes encontram-se a modificação do balanço redox intracelular (BENGTTSSON et al., 2009), melhora do transporte de xilose (KATAHIRA et al., 2008) e superexpressão de genes da via não oxidativa da PPP (*rpe1*, *rki1*, *tkl1* e *tal1*) (KUYPER et al., 2005; BENGTTSSON et al. 2009). Métodos de seleção natural e mutação aleatória, chamadas de engenharia evolutiva, são abordagens que também podem ser aplicadas em conjunto com estratégias de modificação genética para a obtenção de uma cepa que assimile melhor xilose (SANCHEZ et al., 2010). Algumas das cepas recombinantes de *S. cerevisiae* já desenvolvidas visando à melhora da assimilação de açúcares de cinco carbonos estão descritas na Tabela 1.

Tabela 1. Cepas recombinantes de *S. cerevisiae* da literatura desenvolvidas visando à melhora da assimilação de açúcares de cinco carbonos.

| Cepa | Genes expressos | Referência |
|-------------------------------|---|---------------------------------------|
| PUA6-9 (pRD1) | <i>Psxyl1</i> , <i>Psxyl2</i> | Kötter; Ciriacy (1993) |
| H158(pBXI) | <i>Thermus thermophilus xylA</i> | Walfridsson et al. (1996) |
| 1400(pLNH32) | <i>Psxyl1</i> , <i>Psxyl2</i> , <i>Scxks1</i> | Ho; Chen; Brainard (1998) |
| TMB3255 | <i>Psxyl1</i> , <i>Psxyl2</i> , <i>Scxks1</i> , <i>Azwf1</i> | Jeppsson et al. (2002) |
| RWB 202 | <i>Piromyces</i> sp. E2 <i>xylA</i> | Kuyper et al. (2003) |
| TMB3001c-p6XFP/p4PTA/p5EHADH2 | <i>Psxyl1</i> , <i>Psxyl2</i> , <i>Scxks1</i> , <i>Bacillus lactis xfp</i> , <i>B. subtilis pta</i> , <i>Entamoeba histolytica EhADH2</i> | Sonderegger; Schümperli; Sauer (2004) |
| RWB 21 | <i>Piromyces</i> sp. E2 <i>xylA</i> , <i>xks</i> , <i>r5p1</i> , <i>r5pe</i> , <i>tkl1</i> , <i>tal1</i> , <i>Agre3</i> | Kuyper et al. (2005) |
| MT8-1XS | <i>Psxyl1</i> , <i>Psxyl2</i> , <i>Scxks1</i> , <i>Pssut1</i> | Katahira et al. (2008) |
| TMB 3323/Y-PsK270R | <i>Agre3</i> , <i>xks1</i> , <i>tal1</i> , <i>tkl1</i> , <i>rki1</i> , <i>rpe1</i> , <i>Psxyl1</i> (K270R), <i>Psxyl2</i> | Bengtsson et al. (2009) |
| TMB3130 | <i>Psxyl1</i> , <i>Psxyl2</i> , <i>Scxks1</i> , <i>B. subtilis AraA</i> , <i>Escherichia coli AraB</i> e <i>AraD</i> | Sanchez et al. (2010) |
| BY4741X/ Δ PHO13 | <i>Psxyl1</i> , <i>Psxyl2</i> , <i>Scxks1</i> , Δ <i>pho13</i> | Fujitomi et al. (2012) |
| MT8-1X/TAL-ADH | <i>tal1</i> , <i>m6Adh1</i> | Hasunuma et al. (2013) |

Dessa forma, ao longo de mais de duas décadas de estudos, inúmeras patentes relacionadas às novas metodologias desenvolvidas e à geração de cepas recombinantes de *S. cerevisiae* capazes assimilar xilose e produzir etanol foram depositadas. Por exemplo, Gorwa-Grauslund; Karhumaa (2006), patentearam uma cepa de *S. cerevisiae* capaz de fermentar xilose a

etanol através da superexpressão dos genes que codificam à XR, à XDH e à XK, dos genes da via não oxidativa da PPP, da deleção do gene *gre3* que codifica à aldose redutase (AR), além da adaptação para o uso da xilose. Já Boles et al. (2006) patentearam cepas de *S. cerevisiae* de aplicação industrial e laboratorial capazes de fermentar tanto xilose como arabinose a etanol através da introdução das vias de assimilação de ambos os açúcares. Seo; Park (2010) patentearam o método de produção de etanol a partir de xilose que utiliza uma cepa recombinante de *S. cerevisiae* a qual expressa XR e XDH que utilizam NADH e NAD⁺ como cofatores, respectivamente, e com a ausência da acetaldéido desidrogenase que media a produção de ácido acético como subproduto. Este método proporciona um aumento do rendimento em etanol e elevada eficiência de produção. E Albers; Olsson; Koppram (2011) patentearam o método de cultivo contínuo em meio contendo exclusivamente xilose para a produção de etanol de uma cepa de *S. cerevisiae* contendo os genes que codificam à XR, à XDH e à XK, gerando melhorias na produção de etanol, conversão de xilose, redução na produção de xilitol e tolerância a inibidores.

2.6 Cepas domésticas e industriais de *S. cerevisiae*

Estratégias de engenharia metabólica e evolutiva vêm sendo aplicadas para aumentar a utilização de xilose em cepas domésticas e industriais. No entanto, acredita-se que cepas industriais teriam um melhor desempenho, em vista da robustez que naturalmente possuem, uma vez que apresentam alta tolerância aos inibidores do processo fermentativo onde ocorrem diversos estresses biótico e abiótico (MATSUSHIKA et al., 2009a; MATSUSHIKA et al., 2009b). Dessa forma, para a conversão de açúcares derivados de biomassa a etanol em escala comercial vê-se como necessário o emprego de cepas industriais (HECTOR et al., 2011b)

Matsushika et al. (2009a) compararam a habilidade de duas cepas domésticas e de três cepas industriais de *S. cerevisiae*, engenheiradas com as enzimas XR/XDH/XK, fermentarem xilose. Todas as cepas industriais tiveram maior taxa de consumo de xilose e produtividade de etanol mais elevada. Recentemente, Hector et al. (2011b) expressaram os genes *xyl1*, *xyl2* e *xks1* em uma cepa doméstica e em seis cepas industriais de *S. cerevisiae*. Fermentando em meio 50 g/L xilose, tanto a cepa doméstica como as cepas industriais apresentaram taxa de consumo de xilose similar. Neste sentido, entende-se que os *backgrounds* individuais das cepas hospedeiras

de *S. cerevisiae* podem afetar diretamente a sua capacidade de fermentar xilose quando engenheiradas com uma via heteróloga de assimilação de xilose (KIM et al., 2013).

No processo de fermentação microbiana realizado no Brasil, o inóculo da levedura é periodicamente reciclado de um tanque de fermentação para outro (WHEALS et al. 1999), impondo, juntamente com outras condições fermentativas, estresses bióticos e abióticos que devem ser superados pela levedura (ARGUESO et al., 2009). Na década de 1980 cepas de leveduras eram melhoradas geneticamente com o intuito de aumentar a eficiência da fermentação do etanol de primeira geração, mas no ambiente industrial elas eram incapazes de competir com as leveduras contaminantes selvagens que eram mais robustas (ARGUESO et al., 2009).

Em 1990 foi adotada uma nova estratégia. Dentre as leveduras contaminantes do processo industrial foram isoladas aquelas que combinavam alta eficiência fermentativa e resistência prolongada no sistema. PE-2, CAT-1 e BG-1 foram as linhagens isoladas de *S. cerevisiae* que apresentaram capacidade notável de competir com leveduras selvagens, de sobreviver e serem dominantes durante fermentações industriais. Hoje estas são as cepas mais utilizadas nas usinas de etanol do Brasil (BASSO et al., 2008). Um dos exemplos de maior sucesso é a *S. cerevisiae* Pedra-2 (PE-2), utilizada em cerca de 30% das destilarias brasileiras gerando aproximadamente 10% de todo o etanol do mundo (ARGUESO et al., 2009). Devido a sua grande importância econômica, Argueso et al. (2009) realizaram uma caracterização genética detalhada de PE-2 diplóide (JAY270) e o sequenciamento do genoma de um haplóide de PE-2 (JAY291). Dessa forma, em vista da robustez, do *background* e das informações genéticas disponíveis de *S. cerevisiae* PE-2, modificações genéticas dessa cepa mostraram-se como uma estratégia de grande potencial para o desenvolvimento de uma levedura competitiva que seja capaz de fermentar pentoses eficientemente.

2.7 Busca por leveduras que naturalmente fermentam xilose

Leveduras que assimilam naturalmente xilose têm sido isoladas a partir de diversos locais como exsudatos de árvores, insetos que se alimentam de madeira, madeira em decomposição, frutas putrefatas e casca de árvores (CADETE et al., 2012). Dentre as fontes de isolamento citadas, os insetos se destacam por serem uns dos organismos mais bem sucedidos da Terra, visto que eles ocorrem em grande diversidade, alta densidade e habitam diferentes nichos. Além disso,

a ecologia dos insetos, incluindo as suas interações com micro-organismos simbióticos, também tem contribuído para o seu sucesso evolutivo (NGUYEN; SUH; BLACKWELL, 2007). Dessa forma, leveduras têm sido frequentemente isoladas do intestino ou da superfície de insetos que se alimentam de diversos tipos de materiais, como corpos de frutificação de basidiomicetos, madeiras, flores efêmeras e exsudatos de néctar (NGUYEN; SUH; BLACKWELL, 2007).

A exploração do potencial existente na relação endossimbiótica entre insetos e micro-organismos, em que a microbiota intestinal afeta as habilidades dos insetos em utilizar recursos nutricionais indigestíveis e ocuparem determinados *habitats*, tem sido uma das grandes apostas para o isolamento de micro-organismos com potencial de uso biotecnológico (SUH et al., 2003). Suh et al. (2003), por exemplo, isolaram diversas leveduras do trato intestinal de besouros que se alimentam de madeira dentre elas, *S. stipitis*, *Pichia segobiensis*, *Candida shehatae* e *C. ergatensis*, conhecidas por fermentarem e assimilarem xilose. Já Schäfer et al. (1996) isolaram bactérias e leveduras capazes de degradar hemiceluloses a partir do intestino de cupins. Neste sentido, um dos objetivos do presente trabalho foi a caracterização dos genes do metabolismo da xilose de leveduras isoladas do trato intestinal de insetos parasitas da cana-de-açúcar. Isto porque a cana-de-açúcar é suscetível ao ataque de cerca de 80 espécies de pragas (ROSETTO; SANTIAGO, 2012) e muitas delas são capazes de penetrar pelo colmo e raiz, o que sugere que a microbiota intestinal desses insetos possa ser capaz de degradar e assimilar açúcares que compõem a parede celular da cana-de-açúcar.

Adicionalmente, como fonte complementar de obtenção de leveduras naturalmente capazes de assimilar pentoses, escolheu-se também estudar o potencial de leveduras previamente isoladas de dornas de fermentação alcoólica. O reciclo sucessivo de toneladas de células e as dificuldade de esterilizar grandes volumes de caldo/melaço de cana-de-açúcar e água permitem que micro-organismos contaminantes entrem no sistema. Por isso, fermentações industriais estão sujeitas a contaminação por bactérias ou leveduras selvagens (*Saccharomyces* e espécies não *Saccharomyces*) e ambos os contaminantes competem com cepas de leveduras selecionadas para sobreviverem nos fermentadores (CABRINI; GALLO, 1999). A principal motivação para o isolamento de leveduras contaminantes de dornas de fermentação alcoólica esta no fato de que possivelmente tais micro-organismos desenvolveram diferentes estratégias de sobrevivência e competição em processos fermentativos alcóolicos e, portanto, são mais robustos que micro-organismos nativos (AMORIM et al., 2011). Com o intuito de criar um método para prevenir e

controlar contaminações indesejadas, Basílio et al. (2008) isolaram e identificaram 24 espécies de leveduras contaminantes em destilarias de etanol brasileiras capazes de utilizar caldo ou melaço de cana-de-açúcar como substrato.

Apesar da existência de micro-organismos que sejam capazes de fermentar xilose a etanol, ainda é um grande desafio alcançar altos rendimentos em larga escala, pois um micro-organismo que seja capaz de realizar essa conversão de forma robusta e que sobreviva a presença de inibidores existentes na fermentação ainda não foi isolado (CADETE et al., 2012). No entanto, através da identificação de novas cepas de leveduras que sejam capazes de fermentar açúcares hemicelulósicos serão criadas novas perspectivas para a produção viável de etanol lignocelulósico (JEFFRIES; KURTZMAN, 1994), visto que os microorganismos isolados podem ser utilizados como fontes gênicas para engenheirar *S. cerevisiae* e torná-la fermentadora de pentoses.

Pelo exposto, tanto o trato intestinal de insetos parasitas da cana-de-açúcar quanto dornas de fermentação alcoólica são ambientes com alto potencial para isolar micro-organismos que utilizem e/ou fermentem açúcares de cinco carbonos, e dessa forma leveduras isoladas de ambos os *habitats* foram escolhidas para realizar a caracterização dos genes *xyl1* e *xyl2* do metabolismo da xilose e posteriormente expressá-los heterologicamente em *S. cerevisiae* PE-2.

2.7.1 AS LEVEDURAS *Rhodotorula mucilaginosa* E *Ogataea (Hansenula) polymorpha*

Em experimentos preliminares (vide Anexo I), foi possível isolar a levedura *Rhodotorula mucilaginosa* a partir do trato intestinal do inseto parasita da cana-de-açúcar *Migdolus fryanus*. Este inseto, mais conhecido como besouro da raiz da cana-de-açúcar, é considerado uma das principais pragas dessa cultura, pois em sua fase larval ataca e destrói o sistema radicular da cana-de-açúcar de qualquer idade, penetrando e alimentando-se das raízes. As perdas causadas por esse inseto podem variar de 25 a 30 toneladas de cana por hectare, até, na maioria dos casos, a destruição total da lavoura (MACHADO; HABIB, 2001).

A levedura isolada *R. mucilaginosa* é um basidiomiceto ubíquo que ocorre em *habitats* terrestres, aquáticos e marinhos, e até mesmo em ambientes extremos (LIBKIND et al., 2008). Em humanos, esta levedura pode causar infecções em pacientes imunocomprometidos, entretanto a sua maior importância esta relacionada ao seu potencial biotecnológico. *R. mucilaginosa* é uma levedura produtora de carotenóides, principalmente β -caroteno, os quais podem ser empregados

industrialmente como corantes de alimentos, precursores de vitamina A em alimentos e ração animal, aditivos para cosméticos, multivitamínicos e antioxidantes (AKSU; EREN, 2005). Além disso, essa levedura é capaz de acumular óleos intracelularmente. Li et al. (2010), por exemplo, isolaram uma cepa de *R. mucilaginosa* (TJY15a) da superfície de um peixe marinho e a utilizaram na produção de *single cell oil* a partir de hidrolisado de amido de mandioca, o que é interessante diante da possibilidade de usar esta matéria-prima para produção de biodiesel (LI et al., 2010). Esta levedura também é capaz de produzir uma enzima carboidrato esterase extracelular ativa contra acetilxilano, que pode ser utilizada para aumentar a atividade de xilanases em materiais hemicelulósicos (LEE et al., 1987).

Com relação ao metabolismo da xilose dessa levedura, Xu; Bura; Doty (2011) descreveram a clonagem e caracterização dos genes *xyl1* (XR) e *xyl2* (XDH) de *R. mucilaginosa* PTD3 isolada de plantas híbridas de álamo (*Populus trichocarpa* X *P. deltoides*), e também verificaram a capacidade dessa cepa utilizar hexoses e pentoses, incluindo a D-xilose. Em seguida, Bura; Vajzovic; Doty (2012) constataram que *R. mucilaginosa* PTD3 é capaz de assimilar e fermentar xilose, glicose, galactose, manose e arabinose, isoladamente e também em mistura. Além disso, viu-se que essa cepa produz xilitol a partir de xilose bem como etanol e arabitól de hexoses e arabinose, respectivamente. Em estudos de Vajzovic et al. (2012), a cepa PTD3 demonstrou ser capaz de fermentar açúcares na presença de produtos da degradação de açúcares e de tolerar e metabolizar furfural, 5-hidroximetilfurfural e ácido acético, nas concentrações de 5, 15, 5 g/L respectivamente, mostrando que esta levedura pode ser utilizada em processos de bioconversão de hidrolisados lignocelulósicos sem a necessidade de uma etapa de detoxificação ou havendo também a possibilidade de ser empregada como agente de detoxificação devido a sua capacidade de metabolizar inibidores.

Dentre as leveduras contaminantes da fermentação alcoólica, *Ogataea* (*Hansenula*) *polymorpha* também foi escolhida para ser estudada neste trabalho, sendo conhecida como uma espécie não patogênica. *O. polymorpha* é uma levedura termotolerante capaz de utilizar metanol como fonte única de carbono e energia (KUNZE; KANG; GELLISEN, 2009) e uma das mais importantes leveduras não convencionais de aplicação industrial, utilizada, por exemplo, na produção de proteínas heterólogas (GELLISEN, 2002). Esta espécie tem sido utilizada como organismo modelo para estudos de mecanismos de biogênese e de degradação peroxissomal, de

regulação do metabolismo do metanol, de assimilação de nitrato e de resposta ao estresse (SUH; ZHOU, 2010).

Apesar da importância dessa espécie, a homogeneidade filogenética entre as cepas aceitas como *O. polymorpha* mostrou ser questionável. *Torulopsis methanothermo*, *Pichia angusta*, *Hansenula angusta*, e *Hansenula polymorpha* são encontrados como sinônimos de *O. polymorpha*. Dessa forma, Suh; Zhou (2010), através de uma análise molecular detalhada baseada na sequência do DNA ribossomal de todas as espécies tipo de cepas aceitas como *O. polymorpha*, constataram que *O. polymorpha* e *H. angusta* (sinônimo *Pichia angusta*) são altamente relacionadas, mas são espécies diferentes. Além disso, entre as espécies que eram conhecidas como *O. polymorpha* encontrou-se duas novas espécies *Ogataea angusta* comb. nov. e *Candida parapolyomorpha* sp. nov., e *O. thermophila* foi considerada sinônimo de *O. polymorpha*. No entanto, até hoje muitos trabalhos ainda citam que *Pichia angusta* é sinônimo de *O. (Hansenula) polymorpha*.

Recentemente, esta espécie tem sido altamente estudada devido a sua habilidade de fermentar glicose, xilose, celobiose, xilano, amido e glicerol a etanol (KIM et al., 2013b), além de parecer ser mais resistente ao efeito tóxico do etanol que *S. stipitis*, entretanto mais sensível que *S. cerevisiae* (DMYTRUK; SIBIRNY, 2013). Mas a sua principal vantagem é a termotolerância que a permite realizar fermentação etanólica em elevadas temperaturas (45-48°C) (KIM et al., 2013b). Tal característica faz com que esta levedura seja um grande candidato para aplicação no processo de Sacarificação e Fermentação Simultânea (SSF), o qual combina hidrólise enzimática do material lignocelulósico e a subsequente fermentação dos açúcares liberados na mesma dorna (DMYTRUK, et al., 2008a). No entanto, a eficiência desse processo utilizando cepas selvagens é muito baixa para aplicação em escala industrial (DMYTRUK; SIBIRNY, 2013).

Dessa forma, esforços foram direcionados para o desenvolvimento de cepas modificadas de *O. polymorpha* visando uma maior eficiência na fermentação de xilose. Dmytruk et al. (2008a) promoveram uma mutagênese sítio dirigida do gene *xyl1* de *O. polymorpha* com o objetivo de diminuir a afinidade da XR pelo cofator NADPH, e com isso desenvolveram uma cepa (K341R N343D) superexpressando a XR modificada juntamente XDH e XK nativos em um *background* de $\Delta xyl1$. Esta cepa demonstrou um aumento significativo na produção de etanol com a diminuição simultânea da produção de xilitol durante a fermentação de xilose a 48°C. Com o

objetivo de eliminar o desbalanço de cofatores gerado pela via da redução oxidação, Dmytruk et al. (2008b) construíram uma cepa recombinante de *O. polymorpha* substituindo XR e XDH nativos por uma XI de *E. coli*. Nesta cepa o gene *xylA* (XI) e o gene endógeno *xyl3* (XK), foram coexpressos, uma modificação que proporcionou aumento na produção de etanol a partir da fermentação de D-xilose. E também através deste trabalho foi descoberta outra característica inusitada de *O. polymorpha*, a existência de dois genes com 64% e 55% de homologia com o gene *xyl2* de *S. stipitis* que codificam à XDH. Tais genes foram nomeados como *xyl2a* e *xyl2b*. Neste sentido, Biswas et al. (2010) realizaram a clonagem e caracterização bioquímica das duas xilitol desidrogenases, XDH1 e XDH2, de *O. polymorpha*. As duas enzimas são distintas em relação às suas sequências primárias, propriedades bioquímicas e estrutura.

Até o momento, os rendimentos em etanol obtidos pelas cepas recombinantes de *O. polymorpha* continuam sendo insuficientes quando comparados com os da cepa que atualmente melhor fermenta xilose, provavelmente devido a abordagens que têm como alvo apenas algumas etapas metabólicas (KIM et al., 2013b).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Identificação e caracterização das leveduras naturalmente capazes de utilizar xilose, *Rhodotorula mucilaginosa* e *Ogataea (Hansenula) polymorpha*, obtidas do trato intestinal de larva de inseto parasitas da cana-de-açúcar e de dorna de fermentação alcoólica, respectivamente, e isolamento dos genes *xyl1* e *xyl2* do metabolismo da xilose de ambas as leveduras visando à superexpressão heteróloga das respectivas enzimas XR e XDH na cepa industrial brasileira *Saccharomyces cerevisiae* PE-2.

3.2 Objetivo específico

- a. Avaliar as leveduras isoladas com relação ao crescimento em xilose, expressão dos genes *xyl1* e *xyl2*, bem como a atividade das enzimas XR e XDH;
- b. Isolamento dos genes *xyl1* e *xyl2* de *Rhodotorula mucilaginosa* UC11 e *Ogataea (Hansenula) polymorpha* FT212L, clonagem e superexpressão heteróloga das enzimas XR e XDH na cepa industrial *S. cerevisiae* PE-2, e avaliação da capacidade das cepas recombinantes obtidas assimilarem xilose;
- c. Construção de uma cepa recombinante PE-2 contendo os genes *xyl1* e *xyl2* de *S. stipitis* e *xks1* de *S. cerevisiae* e avaliá-la quanto às atividades da XR e XDH, capacidade de utilizar xilose para crescimento e de fermentar misturas de xilose e glicose a etanol.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Cepas e plasmídios

As cepas e os plasmídios utilizados neste trabalho estão listados na Tabela 2.

Tabela 2. Cepas e plasmídios utilizados neste trabalho.

| Cepas | Espécie/Genótipo relevante | Referência |
|----------------------|---|----------------------------|
| Y-7124 | <i>Scheffersomyces stipitis</i> | ARS ^a ; 1 |
| <i>S. cerevisiae</i> | | |
| SC9721 | MAT α <i>his3-Δ200 URA3-52 leu 2Δ1 lys2Δ202 tryp 1Δ63</i> | 2 |
| PE-2 | Δ URA3 | 3 |
| PE-2 XK ⁺ | Δ URA3, HXT7 <i>xks1</i> | 2 |
| Plasmídios | Descrição | Referência |
| pRS 416 | pBluescript II SK+, URA3, CEN6, ARSH4 | Christianson et al. (1992) |
| pRS 426 | pBluescript II SK+, URA3, 2 μ origin | Christianson et al. (1992) |
| pRH 218 | pRS426+ P _{HXT7} - <i>Piromyces XI</i> -T _{HXT7} | Hector et al. (2011); 5 |
| pRH 209 | pRS416+(P _{ADH1} - <i>PsXYL2</i> -T _{ADH1})-(P _{PGK1} - <i>PsXYL1</i> -T _{PGK1}) | 5 |
| pRH 274 | pRS416+P _{PGK1} - <i>PsXYL1</i> -T _{PGK1} ;P _{ADH1} - <i>PsXYL2</i> -T _{ADH1} ;P _{HXT7} - <i>xks1</i> -T _{HXT7} | Hector et al. (2011); 5 |
| p416 | pRS416, P _{MET25} -T _{CYC1} | 6 |
| p426 | pRS426, P _{MET25} -T _{CYC1} | 6 |
| pSP-G1 | URA3, 2 μ origin, P _{PGK1} -T _{CYC1} , P _{TEF1} -T _{ADH1} | Partow et al. (2010) |

^a Coleção de culturas ARS do *National Center for Agricultural Utilization Research*, EUA.

Cepas gentilmente cedidas: (1) Pesquisadora Jaciane L. Ienczak (CTBE); (2) Pesquisador Gustavo H. Goldman (USP); (3) Pesquisador Gonalo A. G. Pereira (Unicamp). Plasmídios gentilmente cedidos: (4) Pesquisador Britta Herzog (*Institut Microbiologie and Genetik*, Alemanha); (5) Pesquisador Ronald E. Hector (*United States Department of Agriculture*, EUA).

4.2 Isolamento e caracterização das leveduras *R. mucilaginosa* e *O. polymorpha*

4.2.1 COLETA DAS AMOSTRAS E ISOLAMENTO DAS LEVEDURAS

As larvas dos insetos parasitas da cana-de-açúcar *Migdolus fryanus* (besouro da raiz da cana-de-açúcar), *Diloboderus abderus* (pão-de-galinha), *Conoderus spp.* (larva-arame), besouro crisomelídeo, *Diatrea saccharallis* (broca da cana-de-açúcar) e *Scaptocoris castanea* (percevejo-castanho) foram coletados na Usina São Martinho. A extração dos tratos intestinais das larvas dos insetos e o isolamento dos micro-organismos foram realizados seguindo os métodos descritos no Anexo I.

Leveduras contaminantes de dornas de fermentação alcoólica foram isoladas e gentilmente cedidas pelo Dr. Mauro Lúcio (Fermentec, Piracicaba, Brasil).

A identificação molecular dos micro-organismos obtidos de ambas as fontes foi realizada neste trabalho.

4.2.2 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DOS ISOLADOS

4.2.2.1 Extração de DNA

Os micro-organismos foram inoculados em meio YPD (*Yeast Extract Peptone Dextrose*) líquido (10 g/L extrato de levedura, 20 g/L peptona e 20 g/L glicose) a 30°C, com agitação de 200 rpm *overnight*. Posteriormente, a partir da biomassa crescida, DNAs foram extraídos utilizando-se o Kit *ZR Tissue e insect* (Zymo Research), seguindo o protocolo do fabricante.

4.2.2.2 Amplificação e sequenciamento da região ITS2

Para a identificação dos isolados em nível de gênero ou espécie, primeiramente foi realizada a amplificação por PCR (*polimerase chain reaction*) da região espaçadora interna transcrita 2 (ITS2) do DNA ribossomal. As reações de PCR foram compostas por: oligonucleotídeos – 5 pmol de ITS3 (Tabela 2) e 5 pmol de ITS4 (Tabela 2), 1X *Taq Buffer* com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Fermentas), 50 mM MgCl_2 (Fermentas), 10 mM dNTPs (Life Technologies), 1,25 U *Taq DNA* polimerase *Thermo Scientific*, 1 µl de DNA e água para completar o volume de 25 µL. A reação de amplificação ocorreu em termociclador com a seguinte ciclagem: o DNA molde foi inicialmente desnaturado a 94°C por 3 min, seguido de 30 ciclos de denaturação a 94°C por 30 s, anelamento dos oligonucleotídeos a 56°C por 30 s e extensão das novas moléculas de DNA a 72°C por 1 min. Por fim, um ciclo de extensão final a 72°C por 10 min. Os fragmentos foram analisados em eletroforese em gel de agarose 1% (em Tampão Tris-Acetato-EDTA, TAE 1X), adicionando 25 µL do produto de PCR a 5 µL de 5X *loading buffer* (50% glicerol, 0,125% azul de bromofenol, 0,125% xileno cianol e Tampão Tris-EDTA pH 8,0). A eletroforese foi realizada em tampão TAE 1X a 90 V e 45 min. Após a corrida eletroforética, o gel foi corado em solução de brometo de etídeo (0,1 mg/mL) por 15 min e visualizado sob luz ultravioleta no fotodocumentador *Gel Logic 2200 Pro* (Carestream). A determinação do tamanho dos fragmentos foi feita comparando as bandas obtidas com o *Ladder* de 1 Kb da *Fermentas*.

Os produtos das reações de PCR foram purificados com o kit *GFX PCR DNA and Gel Band Purification* (GE Healthcare), segundo as recomendações do fabricante, e utilizados como molde para sequenciamento com o kit *Big Dye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing* (Applied Biosystems), seguindo o protocolo do fabricante, no sequenciador *Applied Biosystems[®] 3500xL Genetic Analyzers* do Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol (CTBE).

Todas as sequências obtidas foram comparadas com o banco de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI). Através do programa *Blast* (*Basic Local Alignment Search Tool*) disponibilizado pelo NCBI foi possível comparar as sequências da região ITS2 de nossos isolados com as sequências já identificadas e depositadas no banco de dados. Com base na similaridade entre elas e nos parâmetros *E-value* e identidade, foi possível identificar o gênero ou espécie do microrganismo isolado.

4.2.3 CARACTERIZAÇÃO DAS LEVEDURAS

4.2.3.1 *Curvas de crescimento*

As leveduras foram crescidas em meios 6,7 g/L de YNB (*Yeast nitrogen base*) enriquecidos com 5 g/L de xilose, 10 g/L de xilose ou 50 g/L de xilose e YNB enriquecido com 10 g/L de glicose, tamponados com 50 mM hidrogenoftalato de potássio pH 5,5 (*Sigma-Aldrich*). O experimento foi realizado em triplicata biológica em *erlenmeyers* de 250 mL com 10% do respectivo meio de cultura, onde foram inoculadas 10⁶ leveduras por mL de meio (células contadas em câmara de Neubauer). As leveduras cresceram aerobicamente (200 rpm) em *shaker* a 30°C durante 96 h e as amostras foram coletadas a cada 24 h. A densidade ótica (OD) foi medida no espectrofotômetro *Tecan Infinite M200*, no comprimento de onda de 595 nm.

4.2.3.2 *Construção das árvores filogenéticas de Rhodotorula mucilaginosa UC11 e cepas de Ogataea polymorpha*

Para a construção das árvores filogenéticas de *Rhodotorula mucilaginosa* UC11 e das cepas de *Ogataea polymorpha* FT212L, FT1140L, FT1139L e FT209L, foram utilizadas as sequências das seguintes regiões do DNA ribossomal: região ITS, que inclui as regiões ITS1, o gene 5.8S e ITS2, e região a D1/D2 da subunidade ribossomal maior (LSU) (Figura 2). Essas regiões foram amplificadas por PCR (item 4.2.2.2) utilizando-se os oligonucleotídeos

apresentados na Tabela 3. Para a amplificação das regiões ITS de *R. mucilaginosa* foram utilizados os pares de oligonucleotídeos ITS1 e ITS4, e NSI1 e ITS4. Já para a amplificação da mesma região das cepas de *O. polymorpha*, foram utilizados os oligonucleotídeos NSI1 e NLB4. A região D1/D2 de todas as cepas foi amplificada utilizando-se os oligonucleotídeos LR3 e ITS3. Por fim, os produtos de PCR foram purificados e, então, utilizados como molde para sequenciamento (item 4.2.2.2).



Figura 2. Regiões ITS (ITS1, 5.8S e ITS2) e D1/D2 da subunidade ribossomal maior (LSU) do DNA ribossomal, sequenciados para construção das árvores filogenéticas de *R. mucilaginosa* UC11 e cepas de *O. polymorpha*.

Tabela 3. Oligonucleotídeos utilizados para amplificar as regiões ITS e D1/D2 LSU do DNA ribossomal.

| Oligonucleotídeo | Sequência (5'-3') |
|------------------|-----------------------|
| NSI1 | GATTGAATGGCTTAGTGAGG |
| NLB4 | GGATTCTCACCTCTATGAC |
| LR3 | GGTCCGTGTTTCAAGAGCG |
| ITS1 | TCCGTAGGTGAACCTGCGG |
| ITS3 | GCATCGATGAAGAACGCAAGC |
| ITS4 | TCCTCCGCTTATTGATATGC |

As sequências obtidas foram trimadas por qualidade (phred score 20) utilizando phred (EWING et al., 1998). Os *contigs* foram montados utilizando o programa *online* CAP3 (HUANG; MADAN, 1999). A partir dos *contigs*, as sequências de ITS1 e ITS2 foram extraídas utilizando ITSx V 1.0.3 (BENGTSSON-PALME et al., 2013), obtendo-se também o posicionamento da região 5.8S. Para cada região foi realizado um alinhamento múltiplo estruturado, utilizando MXSCARNA V 2 (TABELI et al., 2008). Os alinhamentos múltiplos foram inicialmente separados da estrutura secundária, e concatenados em um único arquivo utilizando FASconCAT (KÜCK; MEUSEMANN, 2010). A inferência das filogenias particionadas foi realizada utilizando RAxML V 7.5.7 (*Randomized Axelerated Maximum Likelihood*) (STAMATAKIS, 2012) com 500 rodadas de repetições de *bootstrap*, e a construção das árvores foi realizada utilizando FigTree V 1.4 (RAMBAUT, 2007). As espécie-tipo utilizadas na composição das árvores filogenéticas foram retiradas do banco de dados do CBS-KNAW *Fungal Biodiversity*

Centre.

4.2.3.3 Filogenia das enzimas XDH1 e XDH2 de *Ogataea (Hansenula) polymorpha*

Para a construção da filogenia das enzimas XDH1 e XDH2 de *O. polymorpha*, foram selecionadas as sequências de todas as álcoois desidrogenases que continham os domínios ADH N (*alcohol dehydrogenase GroES-like domain*) e ADH Zinc N (*Zinc binding dehydrogenase*), dos genomas de *S. stipitis*, *Trichoderma reesei*, *Aspergillus niger*, *S. cerevisiae* e *H. polymorpha*, obtidas no Banco de Genomas do *JGI Fungal Program*. As sequências foram incluídas no *CIPRES Science Gateway* V. 3.1 e a filogenia foi gerada utilizando o programa RAxML (*Randomized Axelerated Maximum Likelihood*), disponível no *CIPRES*, com 300 rodadas de repetições de *bootstrap*, utilizando o critério *MRE-based Bootstopping* e o modelo evolutivo LG+I+Gamma (estimado com ProTest).

4.2.3.4 Ensaios de atividade das enzimas XR e XDH

As atividades das enzimas XR e XDH foram medidas segundo Rizzi et al. (1989) com modificações. As leveduras foram cultivadas em *erlenmeyers* contendo 10% de meio 6,7 g/L de YNB enriquecido com xilose na concentração que proporcionou maior crescimento à levedura, segundo os resultados obtidos nas curvas de crescimento, e coletadas na fase exponencial. *R. mucilaginosa* UC11 foi crescida em YNB enriquecido com 50 g/L de xilose e o meio coletado após 48 h. As cepas de *O. polymorpha* FT212L, FT1140L, FT1139L e FT209L foram crescidas em meio YNB enriquecido com 10 g/L de xilose e os meios foram coletados após 72 h. Como controle positivo dos ensaios de atividade enzimática foi utilizada a levedura *S. stipitis* Y-7124, que foi crescida em meio YNB enriquecido com 50 g/L de xilose e coletada após 24 horas. Os ensaios foram feitos a partir de crescimentos em triplicata biológica. Após o cultivo, o meio de cultura foi centrifugado, o sobrenadante descartado e as células lavadas com 1 mL de água estéril. Para a obtenção dos extratos celulares, as células foram lisadas quimicamente utilizando o reagente Y-PER (*Yeast Protein Extraction Reagent, Thermo Scientific*), adicionando-o na proporção de 1 mL de Y-PER para cada grama de massa celular. A lise ocorreu durante 30 min com agitação leve, em temperatura ambiente. Após este período, o lisado foi centrifugado em velocidade máxima durante 10 minutos e o sobrenadante armazenado (extrato celular) a -20°C.

Para as medições das atividades enzimáticas foram utilizadas as soluções e volumes descritos na Tabela 4, em cubetas de 1 mL. A atividade da XR foi medida através do decréscimo da absorbância durante 3 min de reação em um comprimento de onda de 340 nm (em espectrofotômetro *Evolution 60, Thermo Scientific*), devido à oxidação dos cofatores NADPH ou NADH, utilizando a xilose como substrato limitante. A atividade da XDH foi determinada pelo aumento da absorbância a 340 nm, monitorado em uma reação de 3 min, devido à redução do cofator NAD⁺, utilizando o xilitol como substrato limitante.

As atividades específicas foram calculadas em U.mg proteína⁻¹, sendo que uma unidade (U) de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima que catalisa a redução/oxidação de 1mmol de coenzima por minuto. A quantificação das proteínas totais dos extratos celulares foi realizada pelo método de Bradford (1976), em triplicata técnica, o qual consiste na adição do corante ácido *Protein Assay Dye Reagent Concentrate* (Bio-Rad) à solução protéica, desencadeando uma mudança de cor diferencial em resposta às várias concentrações de proteína. Dessa forma, foram preparadas reações contendo extrato celular, água e corante ácido, diluído na proporção de duas partes de corante para três partes de água, em um volume final de 1 mL. As reações foram realizadas em microplacas e lidas no comprimento de onda de 570 nm no espectrofotômetro *Tecan Infinite M200*. A comparação com uma curva padrão, feita a partir de uma solução de *Bovine serum albumin* 2 mg/mL (BSA, *Sigma-Aldrich*) como fonte padrão de proteína, forneceu a concentração de proteínas dos extratos celulares.

Tabela 4. Componentes da reação para medição das atividades enzimáticas de XR e XDH.

| Reagentes | Atividade XR (µL) | Atividade XDH (µL) |
|-----------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| Trietanolamina 0,5M pH 5,5* | 100 µL | 100 µL |
| NADPH ou NADH 20 mM ** | 10 µL | - |
| NAD ⁺ 30 mM ** | - | 10 µL |
| Xilose 3,5 M * | 100 µL | - |
| Xilitol 3M * | - | 100 µL |
| Extrato celular ** | Variável | Variável |
| Água * | Para completar 1 mL de reação | Para completar 1 mL de reação |

* Mantidos a 30°C; ** Mantidos no gelo antes de iniciar a reação.

4.2.3.5 Análise da expressão gênica de *xyl1* e *xyl2*

4.2.3.5.1 Cultivo das leveduras

Para extração de RNA, *R. mucilaginosa* UC11 e *O. polymorpha* FT212L foram crescidas em meios 6,7 g/L de YNB enriquecidos com 5 g/L de xilose, 10 g/L de xilose ou 50 g/L de xilose e YNB enriquecido com 10 g/L de glicose, tamponados com 50 mM hidrogenoftalato de potássio pH 5,5 (*Sigma-Aldrich*). Os crescimentos foram realizados em *erlenmeyers* de 500 mL contendo 130 mL de meio de cultura a 30°C e 200 rpm. As leveduras foram cultivadas em um período de 96 h e as amostras coletadas a cada 24 h.

4.2.3.5.2 Extração de RNA e síntese de cDNA

Para a extração do RNA total das amostras coletadas foi utilizado o kit *RNeasy Plant* (*Qiagen*). O protocolo inicial do kit foi modificado utilizando-se micro pérolas de vidro para promover a lise mecânica da parede celular das leveduras, e para isso a cada 5 minutos de lise os tubos contendo as células eram colocados no gelo durante 2 minutos totalizando 15 minutos de lise. Após extração, os RNAs foram tratados com DNase com o kit *Ambion Turbo DNA-free* (*Life Technologies*) para eliminar qualquer contaminação com DNA genômico. Posteriormente, foi realizada uma reação de PCR com os oligonucleotídeos ITS3 e ITS4 (Tabela 3) utilizando como molde os RNAs tratados com DNase. A ausência de produto amplificado comprovava a efetividade do tratamento. Por fim, a síntese dos cDNAs foi feita utilizando transcriptase reversa com o kit *Superscript II-RT* (*Life Technologies*), seguindo o protocolo do fabricante.

4.2.3.5.3 qRT-PCR

Para avaliar o perfil da expressão dos genes *xyl1* e *xyl2* de *R. mucilaginosa* UC11 e dos genes *xyl1*, *xyl2a* e *xyl2b* de *O. polymorpha* FT212L, quando crescidos em xilose e em glicose, realizou-se o PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR). O qRT-PCR é uma técnica extremamente sensível que permite a detecção em tempo real da amplificação e medição precisa (GACHON; MINGAM; CHARRIER, 2004). Foi utilizado o *Sybr[®] Green* (*Life Technologies*) que consiste em um corante fluorescente intercalar que se liga a dupla fita de DNA. O acúmulo do produto de PCR ao longo dos ciclos de amplificação resulta no aumento da intensidade da fluorescência através da qual é possível quantificar a geração dos *amplicons*. No PCR quantitativo em tempo real utilizando o corante *Sybr[®] Green*, a especificidade do produto da

reação de PCR pode ser verificada plotando o sinal da fluorescência em função da temperatura para gerar uma curva de *melting* do *amplicon*. Um pico característico da temperatura de *melting* (T_m) do DNA amplificado irá distingui-lo dos artefatos de amplificação que se formam geralmente em temperaturas mais baixas (HUGGETT; BUSTIN 2011).

As sequências dos genes foram obtidas no banco de dados do NCBI e utilizadas para o desenho dos oligonucleotídeos (Tabela 5) utilizando o *software* Primer Express (*Life Technologies*). O gene fator de alongação 1 (*tef1*) foi utilizado como gene de referência (NARDI et al., 2010). O gene de referência é o controle interno da reação de qRT-PCR e deve apresentar um nível de expressão que não seja afetada pelos fatores experimentais, com variação mínima na sua expressão em diferentes estados fisiológicos do organismo. O gene de referência deve, por sua vez, corrigir a variabilidade resultante das imperfeições da tecnologia utilizada e também dos procedimentos preparatórios, garantindo que qualquer variação na quantidade cDNA seja normalizada entre os experimentos (KOZERA; RAPACZ, 2013).

Tabela 5. Sequências dos oligonucleotídeos utilizados para a qPCR.

| Oligonucleotídeo | Sequência (5' - 3') |
|--------------------------------|---------------------------|
| <i>R. mucilaginosa xyl1_Fw</i> | AGCCGCTTGTC AACCAGATC |
| <i>R. mucilaginosa xyl1_Rv</i> | AATGTTCTTCTCCTTGTGGTGCTT |
| <i>R. mucilaginosa xyl2_Fw</i> | TTGCCGGACGCTACGTTCTT |
| <i>R. mucilaginosa xyl2_Rv</i> | ACCAAACACCACCACGTTCTGA |
| <i>R. mucilaginosa tef1_Fw</i> | ATGGCACGGCGACAACAT |
| <i>R. mucilaginosa tef1_Rv</i> | GAGGGTCTTGCCGGTAACCT |
| <i>O. polymorpha xyl1_Fw</i> | GTTCCGCTTGCCGTGACTT |
| <i>O. polymorpha xyl1_Rv</i> | CCTGGATCAAAGCACCTGAGA |
| <i>O. polymorpha xyl2a_Fw</i> | AATCGCCTCCTCGAAAGTGA |
| <i>O. polymorpha xyl2a_Rv</i> | GGACTTTCCTTCCTTGCTGAAG |
| <i>O. polymorpha xyl2b_Fw</i> | GTGTCGTGACGGGCTTTACAA |
| <i>O. polymorpha xyl2b_Rv</i> | GTCGTAGGCCACTGTGTAGTACTTG |
| <i>O. polymorpha tef1_Fw</i> | GGTGGTACCGGTGAGTTCTGA |
| <i>O. polymorpha tef1_Rv</i> | CAACAATCAGTTGTCTGACACCAA |

Com relação à análise dos resultados obtidos, optou-se por realizar quantificações relativas. Para isso, foram necessárias curvas padrão para calcular a eficiência da reação e o resultado da expressão de cada gene foi plotado em relação à expressão do gene de referência

(KOZERA; RAPACZ, 2013). Dessa forma, juntamente com o qRT-PCR das amostras experimentais foram construídas curvas padrão para cada gene. Para a obtenção destas curvas, previamente foram feitas reações de PCR (item 4.2.2.2) utilizando como molde o cDNA da condição 50 g/L xilose/48 h e os oligonucleotídeos desenhados para o qRT-PCR descritos na Tabela 5. A partir dos produtos das reações de PCR purificados foram feitas diluições seriadas de 10^{-4} a 10^{-8} que foram utilizadas como molde para a construção da curva padrão. Já para o qRT-PCR das amostras experimentais, os cDNAs obtidos foram diluídos 10 vezes ou foram utilizados sem diluição. Cada reação foi composta de 1X *Sybr Green PCR Master Mix* (Life Technologies), 1 pmol do oligonucleotídeo *forward* e 1 pmol do oligonucleotídeo *reverse*, 1 μ L do cDNA e água para completar a reação para um volume de 10 μ L. A curva padrão foi feita em triplicata e as amostras experimentais em duplicata técnica.

As reações de qRT-PCR foram realizadas no equipamento de PCR em tempo real *Applied Biosystems ViiA™ 7*, e as condições de amplificação foram de 95°C por 10 min seguidos por 40 ciclos de 95°C por 15 s e 60°C por 1 min.

4.3 Construção de cepas recombinantes de *S. cerevisiae*

A cepa de *S. cerevisiae* industrial brasileira Pedra-2 diploide (PE-2) foi utilizada para a construção das cepas recombinantes, e como controle foi utilizada a cepa doméstica haploide SC9721. A obtenção das cepas recombinantes ocorreu de duas formas: 1) pelo isolamento e clonagem dos genes de *R. mucilaginosa* UC11 e de *O. polymorpha* FT212L no vetor bidirecional pSP-G1 (PARTOW et al., 2010), seguido da transformação em PE-2 e; 2) pela transformação em PE-2 e em SC9721 de plasmídios cedidos contendo genes do metabolismo da xilose de *S. stipitis* (pRH 209 e pRH 274) e de *Piromyces* sp (pRH 218). As cepas de *S. cerevisiae* e plasmídios utilizados estão descritos na Tabela 2.

4.3.1 CLONAGEM DOS GENES *xyl1* E *xyl2* DAS LEVEDURAS *R. mucilaginosa* UC11 E *O. polymorpha* FT212L NO VETOR BIDIRECIONAL PSP-G1

4.3.1.1 Desenho dos oligonucleotídeos e amplificação dos genes *xyl1* e *xyl2*

Para a clonagem dos genes *xyl1* e *xyl2* de *R. mucilaginosa* UC11 e dos genes *xyl1*, *xyl2a* e *xyl2b* de *O. polymorpha* FT212L foram adotadas duas estratégias: a) clonagem por digestão e b) clonagem por recombinação homóloga *in vivo*. Para isso, as sequências dos genes foram obtidas no banco de dados do NCBI e com base nessas sequências foram desenhados oligonucleotídeos adequados para cada uma dessas abordagens. Para a estratégia de clonagem por digestão foram utilizados pares de oligonucleotídeos *forward* e *reverse* (Tabela 6) complementares às extremidades 3' e 5' de cada gene. Sítios de restrição foram adicionados na extremidade 5' de cada oligonucleotídeo.

Tabela 6. Sequência dos oligonucleotídeos utilizados nas reações de PCR para clonagem por digestão.

| Oligonucleotídeo | Sequência (5' - 3') | Sítio | Gene | Levedura |
|------------------|--|---------|--------------|------------------------|
| RM_XDH_Fw | TA <u>ACTAGTTAT</u> TGGCTCCGACCAACACC | Spe I | <i>xyl2</i> | <i>R. mucilaginosa</i> |
| RM_XDH_Rv | ACCTTAATTAATCATGCCGTGTCAGACTC | Pac I | <i>xyl2</i> | <i>R. mucilaginosa</i> |
| OP_XR_Fw | CCCAAGCTTATGCACACGCAGATTAGCAAA | HindIII | <i>xyl1</i> | <i>O. polymorpha</i> |
| OP_XR_Rv | CGCGCTAGCTTAGATAAAGGTTGGAATTTTCGT | NheI | <i>xyl1</i> | <i>O. polymorpha</i> |
| OP_XDH1_Fw | GACTAGTCATGAACAATCCTTCTGCTGT | SpeI | <i>xyl2a</i> | <i>O. polymorpha</i> |
| OP_XDH1_Rv | GCCTTAATTAATTATTCAGGGCCTGAAATC | PacI | <i>xyl2a</i> | <i>O. polymorpha</i> |
| OP_XDH2_Fw | C <u>ACTAGTGAT</u> TGGTGGACCAACGTACAA | SpeI | <i>xyl2b</i> | <i>O. polymorpha</i> |
| OP_XDH2_Rv | CGGTTAATTA <u>ACTATTGCACACCCTGGATA</u> | PacI | <i>xyl2b</i> | <i>O. polymorpha</i> |

ATG destacado em negrito. Sítios de restrição sublinhados.

Já para a estratégia de clonagem por recombinação homóloga *in vivo*, foram desenhados oligonucleotídeos (Tabela 7) com 20 pares de base de homologia com o vetor pSP-G1 (as regiões de homologia escolhidas estavam entre 1 a 100 pares de bases de distância dos sítios de restrição das enzimas designadas para digerir o vetor), e 20 pares de base de homologia com o gene (o oligonucleotídeo *forward* com homologia ao início da sequência do gene e o oligonucleotídeo *reverse* com homologia ao final da sequência do gene).

Tabela 7. Sequência dos oligonucleotídeos utilizados nas reações de PCR para clonagem por recombinação homóloga.

| Nome | Sequência (5' - 3') | Gene | Levedura |
|-------------|--|-------------|------------------------|
| RH_RM_XR_Fw | CAAGGAAGTAATTATCTACATGTCGCAGCAGATCCCCTC | <i>xyl1</i> | <i>R. mucilaginosa</i> |
| RH_RM_XR_Rv | CGGTTAGAGCGGATCTTATTACTGGATCTTGACCTGGT | <i>xyl1</i> | <i>R. mucilaginosa</i> |

Região de homologia com pSP-G1 destacado em negrito.

Para a amplificação dos genes de interesse, foram realizadas reações de PCR utilizando como molde cDNA (4.2.3.5.2) de *R. mucilaginosa* UC11 e de *O. polymorpha* FT212L, crescidos aerobicamente em meio YPD, visando a obtenção apenas da região codificante do gene. Nas reações de PCR foi utilizada a *Phusion® DNA Polymerase (New England Biolabs)*, uma enzima *high-fidelity* (alta fidelidade) que assegura que a sequência de cDNA seja amplificada corretamente. As reações de PCR foram compostas por 10 pmol do oligonucleotídeo *forward* e 10 pmol do oligonucleotídeo *reverse* (Tabelas 5 e 6); 1X Tampão *Phusion® HF (New England Biolabs)*, 10 mM dNTPs (*Life Technologies*), 1U *Phusion® DNA Polymerase*, 2 µL de cDNA e água para completar o volume para 50 µL. A reação de amplificação ocorreu em termociclador com a seguinte ciclagem: o DNA molde foi denaturado a 98°C por 30 segundos, seguido de 35 ciclos de denaturação a 98°C por 10 segundos, anelamento dos oligonucleotídeos na temperatura específica para cada par de oligonucleotídeo por 30 segundos e extensão das novas cadeias de DNA a 72°C por 1 minuto. Por fim, uma extensão final a 72°C por 10 minutos. Os fragmentos foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1% (em 1X TAE) corado com GelRed™ (Biotium) e visualizado em luz UV no fotodocumentador *Gel Logic 2200 Pro (Carestream)*. A determinação do tamanho dos fragmentos foi feita comparando as bandas obtidas com o *ladder* de 1 Kb (*Fermentas*).

4.3.1.2 Ligação, clonagem e sequenciamento

A região do gel que continha o fragmento com o tamanho esperado foi excisada e submetida à purificação utilizando o kit *GFX PCR DNA and Gel Band Purification (GE Healthcare)*. Para a clonagem por recombinação homóloga *in vivo* do gene *xyl1* de *R. mucilaginosa* foi utilizado diretamente o produto da PCR purificado. Para os outros genes, os produtos foram clonados no vetor pGEM®-T Easy (*Promega*), seguindo protocolo sugerido pelo fornecedor e transformados por eletroporação (Multiporador® system, *Eppendorf*) em células de *Escherichia coli* DH5α. As células transformadas foram plaqueadas e incubadas a 37°C *overnight*

em meio LB (10 g/L NaCl, 10 g/L triptona, 5 g/L extrato de levedura e 12 g/L ágar) com ampicilina (100 µg/mL), onde foi previamente adicionado à sua superfície, após solidificação, 10 µL de IPTG (1 M), 20 µL de X-GAL (20 mg/ml). Para confirmar a eficácia da transformação, colônias brancas foram selecionadas e colocadas em 10 µL de água estéril, dos quais 1 µL foi utilizado para reação de PCR (item 4.2.2.2) de colônia utilizando os oligonucleotídeos universais M13 *forward* (5'-GACCGGCAGCAAAATG-3') e M13 *reverse* (5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'). A partir dos clones positivos, foram extraídos os DNAs plasmidiais utilizando-se o *QIAprep Spin Miniprep Kit* (Qiagen), seguindo instruções do fabricante, e os insertos foram sequenciados com os oligonucleotídeos universais M13 no sequenciador *Applied Biosystems*® 3500xL Genetic Analyzers.

Conferidas as sequências dos genes amplificados, iniciou-se a clonagem por digestão no vetor de expressão bidirecional pSP-G1 (Figura 3) (PARTOW et al., 2010).

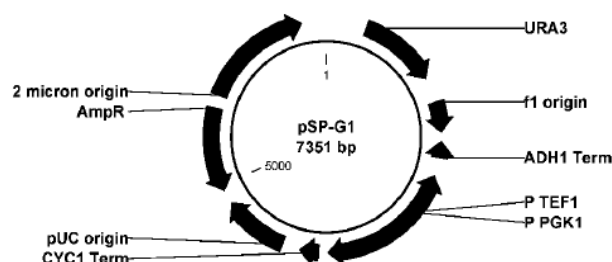


Figura 3. Vetor pSP-G1(PARTOW et al., 2010).

Inicialmente, foi realizada a digestão do gene de interesse clonado em pGEM®-T e também do vetor pSP-G1 com as duas enzimas de restrição escolhidas (Tabela 6). A reação de digestão foi constituída de 2 µg do inserto clonado em pGEM®-T ou do vetor pSP-G1, 1X do respectivo tampão (*New England Biolabs*), 5 µg BSA (*New England Biolabs*), 0,4 U de cada enzima de restrição (*New England Biolabs*) e água ultrapura para completar o volume para 50 µL. A reação foi incubada a 37° C durante 1 hora seguida de 15 minutos a 65° C para a inativação das enzimas. Os produtos da digestão foram analisados por eletroforese (90 V, 45 minutos) em gel de agarose 1% (em 1X TAE), corado com GelRed™ (Biotium) e visualizados em luz UV.

As regiões do gel com os fragmentos de interesse foram excisadas e purificadas com o kit *GFX PCR DNA and Gel Band Purification* (GE Healthcare). Para promover a ligação entre as

extremidades coesivas do inserto com às do vetor pSP-G1, a ligação foi feita com a enzima T4 DNA ligase (5U) (*Promega*) na razão molar de DNA 1:1 (vetor: inserto). A reação foi incubada a temperatura ambiente por 3 horas. Em seguida a ligação foi transformada por eletroporação (Multiporador[®] system, *Eppendorf*) em células de *E. coli* DH5α e plaqueadas em meio LB com ampicilina (100 µg/mL). Reações de PCR de colônia de alguns candidatos foram realizadas com os oligonucleotídeos utilizados para a amplificação dos genes (Tabela 6) para verificar o tamanho dos insertos. Dos clones positivos foram extraídos os DNAs plasmidiais (*QIAprep Spin Miniprep Kit*, *Qiagen*), que foram sequenciados (*Applied Biosystems[®] 3500xL Genetic Analyzers*).

Dessa forma, pela estratégia de clonagem por digestão, foram construídos três vetores de expressão com os genes de *R. mucilaginosa* UC11 e de *O. polymorpha* FT212L: pSP-G1 com o gene *xyl2* de *R. mucilaginosa*, pSP-G1 com os genes *xyl1* e *xyl2a* de *O. polymorpha* e pSP-G1 com os genes *xyl1* e *xyl2b* de *O. polymorpha*.

Para clonar o gene *xyl1* de *R. mucilaginosa* por recombinação homóloga, 2 µg do vetor pSP-G1 contendo o gene *xyl2* de *R. mucilaginosa* UC11 foi digerido com 0,4 U de cada uma das enzimas Hind III e Nhe I. Em seguida, o vetor linearizado foi utilizado na transformação em *S. cerevisiae* PE-2 (item 4.3.2).

4.3.2 TRANSFORMAÇÃO DE DNA NAS CEPAS DE *S. cerevisiae* PE-2 E SC9721

Transformações nas cepas de *S. cerevisiae* foram realizadas utilizando o método do acetato de lítio modificado de Gietz et al. (1992). Os plasmídios obtidos no item 4.3.1, plasmídio pSP-G1 sem genes e a recombinação homóloga do gene *xyl1* de *R. mucilaginosa* no plasmídio pSP-G1 já contendo o gene *xyl2*, foram transformados em *S. cerevisiae* PE-2. Já os plasmídios gentilmente cedidos, pRH 209, pRH 274 e pRH 218, e os vetores sem genes p416 e p426 (Tabela 2), foram transformados nas cepas de *S. cerevisiae* PE-2 e SC9721.

Inicialmente foi preparado um pré-inóculo de PE-2 e SC9721 em 5 mL de meio YPD crescidos a 30°C e 200 rpm *overnight*. No dia seguinte ao preparo do inóculo, foi adicionado o volume necessário de pré-inóculo em 200 mL de YPD (*erlenmeyer* de 500 mL), para que a OD do inóculo partisse de 0,1. Posteriormente, as cepas cresceram aerobicamente a 30°C até atingirem a OD de 0,4. Em seguida, o meio foi centrifugado a 5.000 g por 5 minutos, o sobrenadante foi descartado e as células de PE-2 e SC9721 foram resuspendidas em 1 mL de 1X TE/LiAc (10X Tris-HCl/EDTA; 10X acetato de lítio). Para a recombinação homóloga, em um

tubo de 1,5 mL foram adicionados 100 ng do fragmento purificado do gene *xyl1* de *R. mucilaginosa* UC11 (obtido em 4.3.1), o vetor pSP-G1 linearizado contendo o gene *xyl2* de *R. mucilaginosa* UC11 na razão molar de DNA 2:1 (inserto: vetor) e 100 µg de DNA de esperma de salmão (*Sigma-Aldrich*) previamente desnaturado (10 min a 100°C). Para a transformação dos plasmídios, foi feita uma mistura com 1 µg de vetor com 100 µg de DNA de esperma de salmão. À mistura de DNA foram adicionados 100 µL das células de PE-2 ou de SC9721 e 600 µL de 40% PEG/1X LiAc (50% Polietilenoglicol 3350; 10X acetato de lítio). Após homogeneização, a solução foi incubada a 30°C por 30 min e 200 rpm. Posteriormente, 70 µL de dimetil sulfoxido (*Merck*) foram adicionados à mistura, seguido de um choque térmico a 42°C por 15 min e transferência para o gelo durante 2 min. Após este período foram adicionados 700 µL de água e as células foram centrifugadas a 1.3000 rpm por 30 s (este passo de lavagem foi realizado duas vezes). Por fim, o sobrenadante foi descartado, e as células transformantes de PE-2 foram plaqueadas em meio YNB ura⁻ sólido (sem a adição de uracila e uridina) enriquecido com 20 g/L de glicose, enquanto que as células transformantes de SC9721 plaqueadas em meio YNB ura⁻ sólido enriquecido com 20 g/L de glicose, com a adição dos aminoácidos histidina, leucina, triptofano e lisina, e, então, incubadas a 30°C por 2 dias.

Uma colônia isolada resultante da transformação foi crescida em meio YNB ura⁻ enriquecido com 20 g/L de glicose líquido a 30°C, 200 rpm *overnight*. O DNA total foi extraído com o kit *DNAeasy Plant Mini* (*Qiagen*), sendo que o protocolo inicial foi modificado utilizando-se micro pérolas de vidro para promover a lise mecânica da parede celular das leveduras. Com o intuito de isolar o DNA plasmidial, o DNA total foi transformado em *E. coli* DH5α por eletroporação (item 4.3.1.2). Para verificar o sucesso das transformações, reações de PCR de colônia (item 4.3.1.2) de alguns candidatos foram realizadas com os oligonucleotídeos utilizados para a amplificação dos genes (Tabela 5 e 6) e dos clones positivos foram extraídos os DNAs plasmidiais (*QIAprep Spin Miniprep Kit* - *Qiagen*), que foram então sequenciados (*Applied Biosystems*[®] 3500xL Genetic Analyzers).

Dessa forma, foram construídos os plasmídios e as cepas recombinantes descritos na Tabela 8.

Tabela 8. Plasmídios e cepas recombinantes obtidos neste trabalho.

| Plasmídio | Descrição |
|--------------------|---|
| pSP-G1 Rm | pSP-G1+ (P _{PGK} - <i>RmXYL1</i> -T _{CYC1})-(P _{TEF1} - <i>RmXYL2</i> -T _{ADH1}) |
| pSP-G1 Op 1 | pSP-G1+ (P _{PGK} - <i>OpXYL1</i> -T _{CYC1})-(P _{TEF1} - <i>OpXYL2a</i> -T _{ADH1}) |
| pSP-G1 Op 2 | pSP-G1+ (P _{PGK} - <i>OpXYL1</i> -T _{CYC1})-(P _{TEF1} - <i>OpXYL2b</i> -T _{ADH1}) |
| Cepas | Descrição |
| PE-2 Rm | PE-2 + pSP-G1 Rm |
| PE-2 Op 1 | PE-2 + pSP-G1 Op1 |
| PE-2 Op 2 | PE-2 + pSP-G1 Op2 |
| PE-2 209 | PE-2 + pRH 209 |
| PE-2 274 | PE-2 + pRH 274 |
| PE-2 218 | PE-2 pRH 218 |
| PE-2 416 | PE-2 + p416 |
| PE-2 426 | PE-2 + p426 |
| PE-2 pSP-G1 | PE-2 + pSP-G1 |
| SC 209 | SC9721 + pRH 209 |
| SC 274 | SC9721 + pRH 274 |
| SC 218 | SC9721 pRH 218 |
| SC 416 | SC9721+ p416 |
| SC 426 | SC9721+ p426 |

4.3.3 CARACTERIZAÇÃO DAS CEPAS RECOMBINANTES DE *S. cerevisiae*

Para a caracterização das cepas recombinantes, as atividades das enzimas XR e XDH (descrito em 4.2.3.4) foram determinadas com as leveduras crescidas em meio 6,7 g/L YNB enriquecido com 20 g/L de glicose e células coletadas após 6 h de cultivo. Ensaios de curva de crescimento em xilose e glicose (descrito em 4.2.3.1) também foram realizados.

4.3.4 TRANSFORMAÇÃO DOS PLASMÍDIOS EM *S. cerevisiae* PE-2 XK⁺

Os três plasmídios pSP-G1 contendo os genes de *R. mucilaginosa* UC11 (pSP-G1 Rm, Tabela 8) e de *O. polymorpha* FT212L (pSP-G1 Op 1 e pSP-G1 Op 2, Tabela 8) foram transformados na cepa de *S. cerevisiae* PE-2 com o gene endógeno *xks1* superexpresso (PE-2 XK⁺; Tabela 1), cepa desenvolvida e gentilmente cedida pelo Laboratório do Prof. Dr. Gustavo H. Goldman (USP campus Ribeirão Preto). A superexpressão foi realizada apenas em um dos alelos do gene de PE-2 diplóide, através da deleção do promotor endógeno e substituição pelo promotor

HXT7 (promotor forte de gene transportador de hexose) (LAI; LIU; HSEU, 2007). As transformações dos plasmídios foram realizadas pelo método do acetato de lítio descrito no item 4.3.2, obtendo-se as cepas recombinantes descritas na Tabela 9. Para a caracterização dos novos transformantes foi realizado um ensaio de curva de crescimento em xilose e em glicose (item 4.2.3.1).

Tabela 9. Cepas recombinantes PE-2 XK⁺ com os genes de *R. mucilaginosa* UC11 e *O. polymorpha* FT212L.

| Cepas | Descrição |
|---------------------|-----------------------------------|
| PE-XK Rm | PE-2 XK ⁺ + pSP-G1 Rm |
| PE-XK Op 1 | PE-2 XK ⁺ + pSP-G1 Op1 |
| PE-XK Op 2 | PE-2 XK ⁺ + pSP-G1 Op2 |
| PE-XK pSP-G1 | PE-2 XK ⁺ + pSP-G1 |

4.4 Co-fermentação de xilose e glicose utilizando PE-2 274 em Biorreator na condição de microaerofilia

Quatro fermentações em biorreator na condição de microaerofilia utilizando a cepa PE-2 274, foram realizadas em triplicata biológica em meio YNB enriquecido com diferentes concentrações de xilose, glicose e sacarose (*Sigma-Aldrich*). Os meios utilizados nas fermentações estão descritos na Tabela 10.

Tabela 10. Concentrações das fontes de carbono dos meios das fermentações utilizando PE-2 274.

| Fermentações | Fonte de Carbono | Concentração (g/L) |
|--------------|-------------------------|--------------------|
| 1 | Glicose | 70 |
| 2 | Xilose | 70 |
| 3 | Xilose:Glicose | 30:70 |
| 4 | Xilose:Glicose:Sacarose | 33:33:33 |

Primeiramente um pré-inóculo de PE-2 274 foi cultivado, e para isso foram inoculadas 10⁷ células de levedura/mL em 112,5 mL de meio 6,7 g/L de YNB enriquecido com 50 g/L de glicose e 50 g/L de xilose tamponado com 50 mM hidrogenoftalato de potássio pH 5 (*Sigma-Aldrich*), em *erlenmeyer* de 500 mL. O pré-inóculo foi incubado em *shaker* por 24 h a 200 rpm e

30 °C. Após este período, as células foram coletadas por centrifugação, lavadas três vezes com água estéril e resuspendidas em 8 mL de água para inoculação no biorreator.

As fermentações foram realizadas no biorreator BIOSTAT® Qplus (*Sartorius*) de 500 mL contendo 450 mL de meio de cultura, a 30 °C e pH 5 (controlado com 10% NaOH ou 0,4 M H₂SO₄). Os parâmetros de aeração foram ajustados da seguinte forma: o coeficiente volumétrico de transferência de O₂ (k_La) foi mantido em 4,9 h⁻¹ durante todo experimento (SILVA et al., 2012), a agitação em 150 rpm e a vazão específica de oxigênio em 0,1 vvm (volume de ar/volume de meio/minuto), caracterizando a condição de microaerofilia.

As fermentações foram realizadas durante 72 h e nas amostragens realizadas em 0 h, 3 h, 6 h, 12 h, 24 h, 48 h e 72 h foram coletados 1,5 mL de meio dos fermentadores. Todas as amostras foram centrifugadas (12.000 rpm, 3 minutos a 4°C), a massa celular foi armazenada para a determinação da massa seca e os sobrenadantes armazenados a -20°C para análises em HPLC.

4.4.1 ANÁLISES DOS PRODUTOS DAS FERMENTAÇÕES

As concentrações de glicose, xilose, etanol, glicerol, xilitol e ácido acético foram determinados no sobrenadante por Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) (*DIONEX Ultimate 3000*) e realizados na Central Analítica do CTBE. Como fase móvel foi empregada a solução de H₂SO₄ 5mM, preparada com água ultra-pura e vazão de 0,6 mL/min. Os componentes foram separados utilizando a pré-coluna Bio-Rad P/N 125-0129 e a coluna Aminex HPX87H–300 x 7,8 mm x 9 mm (Bio-Rad 125-0140), mantidas em temperatura controlada a 35°C. Um detector de índice de refração a 35°C ligado a um *software* foi utilizado para integração e quantificação dos dados obtidos. O ácido acético foi detectado por UV ligado em série ao índice de refração, em comprimento de onda fixo em 205 nm.

4.4.2 DETERMINAÇÃO DA MASSA SECA CELULAR

O monitoramento do crescimento da biomassa ao longo das 144 horas de fermentação foi realizado por meio da pesagem da massa seca celular. Previamente, tubos de 1,5 mL foram deixados por 3 horas na estufa a 80°C e em seguida pesados. As amostras das fermentações foram

coletadas nos tubos anteriormente pesados, em seguida as amostras passaram por dois passos de centrifugação (1.2000 rpm, 3 minutos a 4°C), um para a separação da massa celular do sobrenadante e outro para a lavagem da massa celular com água. Posteriormente, os tubos foram deixados durante 24 horas na estufa a 80°C. Após esse período, os tubos foram pesados e, para a obtenção da massa seca, subtraiu-se o valor do peso do tubo do valor obtido na pesagem do tubo com a massa seca e dividiu-se pelo valor do volume coletado de amostra.

4.4.3 AVALIAÇÃO ESTATÍSTICA

As fermentações foram realizadas em triplicata biológica, empregando a média e desvio padrão para a análise dos resultados. Quando necessária à comparação entre os valores, foi aplicado o teste de Tukey com a significância de 95%.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Isolamento e caracterização das leveduras *R. mucilaginosa* e *O. polymorpha*

5.1.1 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DAS LEVEDURAS

O ponto de partida deste trabalho foi a busca por leveduras selvagens que fossem capazes de utilizar xilose eficientemente. Procuramos especificamente por leveduras em razão de seus genes, *xyl1* (XR) e *xyl2* (XDH), terem maior proximidade e similaridade genéticas e metabólicas com *S. cerevisiae*, o que poderia favorecer o funcionamento dos genes heterólogos neste sistema. Além disso, apesar de bactérias, leveduras e fungos filamentosos serem capazes de converter xilose a etanol, as leveduras são conhecidas por possuírem maior produtividade na realização dessa conversão (CHU; LEE, 2007).

Dessa forma, nós exploramos o potencial da microbiota intestinal das larvas de seis insetos parasitas da cana-de-açúcar, pois acreditamos que estes micro-organismos colaboram com a capacidade dessas larvas utilizarem recursos indigestíveis (SUH et al., 2003), visto a habilidade das mesmas de penetrarem no colmo e raízes da cana-de-açúcar. Os microrganismos foram isolados em meio rico YPD sem diluição, YPD com o inóculo diluído 10 vezes (YPD 10⁻¹) e em meio mínimo YNB enriquecido com as diferentes fontes exclusivas de carbono, avicel®, carboximetilcelulose (CMC), xilose e xilano. O meio YPD é ideal para a multiplicação celular de leveduras por ser um meio rico. Com relação às fontes exclusivas de carbono, xilose e xilano (polissacarídeo formado por monômeros de xilose), que são pentoses, foram adotadas com o objetivo de selecionar leveduras selvagens capazes de assimilar açúcares de cinco carbonos. Avicel® e CMC, celulose microcristalina e celulose não solúvel, respectivamente, foram utilizadas como fontes complementares de isolamento visando selecionar os mais diversos micro-organismos até mesmo aqueles capazes de hidrolisar celulose e utilizar glicose para crescimento.

Para a identificação dos isolados em nível de gênero ou espécie, optou-se pelo sequenciamento da região espaçadora interna transcrita 2 (ITS2) do DNA ribossomal, uma região altamente conservada e com maior probabilidade de identificação bem sucedida para uma ampla gama de fungos (SCHOCH et al. 2012). Dessa forma, foram identificados molecularmente 44 micro-organismos (Tabela 11), dos quais apenas um era uma levedura, a *Rhodotorula*

mucilaginosa, e o restante fungos filamentosos. O número de leveduras encontrado foi abaixo do esperado, visto que no trabalho de Suh et al. (2003) foram isoladas leveduras do intestino e da superfície externa de 22 besouros (Coleoptera: Passalidae) adultos. Possíveis explicações para o baixo número de leveduras pode ser o fato de as leveduras presentes no trato intestinal não serem cultiváveis nas condições que empregamos, ou que estas estariam presentes em baixo número na microbiota. Além disso, o número excessivo de fungos filamentosos pode ter ocorrido devido à ingestão “acidental” de esporos do meio ambiente, e na realidade estes fungos podem não fazer parte da microbiota do trato intestinal das larvas dos insetos. Com isso, para a cepa de *R. mucilaginosa*, isolada do trato intestinal da larva de *Migdolus fryanus* em meio YPD, foi atribuído o nome *R. mucilaginosa* UC11 e esta foi selecionada para caracterização quanto a sua capacidade de utilizar xilose.

Tabela 11. Identificação dos micro-organismos isolados do trato intestinal das larvas de insetos parasitas da cana-de-açúcar. Os parâmetros *E-value* e identidade fornecem o grau de confiabilidade da identificação.

| Larva do inseto | Meio de isolamento | Isolado | <i>E-value</i> | Identidade |
|-----------------------------|----------------------|---------------------------------|----------------|------------|
| <i>Conoderus spp.</i> | YNB + Xilose 1 | <i>Aspergillus fumigatus</i> | 1E-162 | 99% |
| | YNB + Xilose 2 | <i>Aspergillus fumigatus</i> | 1E-162 | 98% |
| | YNB + Xilano | <i>Aspergillus fumigatus</i> | 1E-162 | 99% |
| Crisomelídeo | YNB + CMC | <i>Aspergillus fumigatus</i> | 2E-160 | 98% |
| | YPD | <i>Periconia sp</i> | 1E-157 | 99% |
| <i>Diatrea saccharallis</i> | YPD 10 ⁻¹ | <i>Aspergillus fumigatus</i> | 7E-161 | 99% |
| <i>Scaptocoris castanea</i> | YPD 10 ⁻¹ | <i>Aspergillus fumigatus</i> | 2E-161 | 98% |
| <i>Migdolus fryanus</i> | YPD | <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> | 0.0 | 100% |
| | YNB + CMC | <i>Myrothecium roridum</i> | 0.0 | 100% |
| | YNB + Avicel | <i>Pleosporales sp.</i> | 5E-163 | 99% |
| | YNB + Xilose | <i>Periconia sp.</i> | 0.0 | 100% |
| | YPD 10 ⁻¹ | <i>Penicillium sp.</i> | 4E-173 | 100% |

Continuação Tabela 11.

| Larva do inseto | Meio de isolamento | Isolado | E-value | Identidade |
|----------------------------|--------------------|---|---------|------------|
| <i>Diloboderus abderus</i> | YNB + Avicel 1 | <i>Penicillium brasilianum</i> | 1E-158 | 97% |
| | YNB + Avicel 2 | <i>Purpureocillium lilacinum</i> | 3E-134 | 98% |
| | YNB + Avicel 3 | <i>Trichosporiella sp.</i> | 9E-94 | 95% |
| | YNB + Avicel 4 | <i>Cladosporium sphaerospermum</i> | 5E-152 | 98% |
| | YNB + Avicel 5 | <i>Fusarium solani</i> | 3E-159 | 98% |
| | YNB + Avicel 6 | <i>Fusarium solani</i> | 2E-165 | 98% |
| | YNB + Avicel 7 | <i>Penicillium sp.</i> | 2E-157 | 97% |
| | YNB + Avicel 8 | <i>Plectosphaerella cucumerina</i> | 3E-124 | 93% |
| | YNB + Avicel 9 | <i>Fusarium sp.</i> | 7E-166 | 99% |
| | YNB + Xilose 1 | <i>Aspergillus fumigatus</i> | 3E-159 | 98% |
| | YNB + Xilose 2 | <i>Aspergillus fumigatus</i> | 3E-164 | 99% |
| | YNB + Xilose 3 | <i>Humicola fuscoatra</i> | 1E-112 | 98% |
| | YNB + Xilose 4 | <i>Fusicolla acetilerea</i> | 4E-158 | 99% |
| | YNB + Xilose 7 | <i>Penicillium brasilianum</i> | 2E-121 | 98% |
| | YNB + Xilose 9 | <i>Penicillium raistrickii</i> | 2E-85 | 97% |
| | YNB + Xilano 1 | <i>Fusarium solani</i> | 4E-153 | 97% |
| | YNB + Xilano 2 | <i>Fusarium oxysporum f. sp. Gladioli</i> | 7E-156 | 99% |
| | YNB + Xilano 3 | <i>Fusarium solani</i> | 5E-162 | 98% |
| | YNB + Xilano 4 | <i>Aspergillus nidulans</i> | 5E-162 | 98% |
| | YNB + Xilano 6 | <i>Fusarium solani</i> | 2E-161 | 99% |
| | YNB + Xilano 7 | <i>Chaetomium sp.</i> | 2E-145 | 97% |
| | YNB + CMC 1 | <i>Fusarium oxysporum f. sp. Gladioli</i> | 4E-153 | 99% |
| | YNB + CMC 2 | <i>Kazachstania aquatica</i> | 2E-28 | 95% |
| | YNB + CMC 3 | <i>Purpureocillium lilacinum</i> | 2E-156 | 98% |
| | YNB + CMC 5 | <i>Fusarium oxysporum</i> | 2E-150 | 99% |
| | YNB + CMC 6 | <i>Aspergillus fumigatus</i> | 9E-160 | 98% |
| | YNB + CMC 8 | <i>Plectosphaerella cucumerina</i> | 7E-151 | 96% |
| | YNB + CMC 9 | <i>Aspergillus fumigatus</i> | 7E-161 | 98% |
| | YNB + CMC 11 | <i>Penicillium ochrochloron</i> | 1E-158 | 99% |
| | YNB + CMC 14 | <i>Aspergillus fumigatus</i> | 7E-151 | 95% |
| | YNB + CMC 15 | <i>Aspergillus fumigatus</i> | 2E-155 | 98% |

Como outra fonte de obtenção de leveduras de interesse, buscamos por contaminantes do processo de fermentação alcoólica. Este ambiente é particularmente interessante tendo em vista, principalmente, a capacidade dos micro-organismos contaminantes sobreviverem aos estresses

impostos pelo processo fermentativo (AMORIM et al., 2011) e às diversas peculiaridades do ambiente industrial, podendo ser, portanto, um ambiente interessante para a obtenção de leveduras com diferentes características que possam ser potenciais fontes gênicas. Dos contaminantes das dornas de fermentação alcoólica foi realizada a identificação de oito leveduras (Tabela 12), dos quais quatro delas eram provavelmente da espécie *Ogataea polymorpha*. Obtidas essas oito leveduras, resolvemos caracterizá-las quanto à capacidade de crescer em xilose a fim de escolher as mais eficientes para estudos mais detalhados.

Tabela 12. Identificação das leveduras isoladas de dornas de fermentação alcoólica. Os parâmetros *E-value* e identidade fornecem o grau de confiabilidade da identificação.

| Cepa | Isolado | <i>E-value</i> | Identidade |
|---------|----------------------------------|----------------|------------|
| FT212L | <i>Ogataea polymorpha</i> | 6E-147 | 100% |
| FT1140L | <i>Ogataea polymorpha</i> | 4E-154 | 99% |
| FT1360L | <i>Torulaspora</i> sp. | 0.0 | 99% |
| FT1139L | <i>Ogataea polymorpha</i> | 2,E-162 | 99% |
| FT155L | <i>Schizosaccharomyces pombe</i> | 3E-176 | 93% |
| FT209L | <i>Ogataea polymorpha</i> | 3E-150 | 97% |
| FT282L | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 0.0 | 99% |
| FT1909L | <i>Meyerozyma guilliermondii</i> | 4E-164 | 100% |

5.1.2 A CARACTERIZAÇÃO DAS LEVEDURAS

5.1.2.1 *Curvas de crescimento*

Com o objetivo de avaliar a capacidade das leveduras isoladas utilizarem xilose para a formação de biomassa, foi realizado um ensaio de crescimento em meio líquido enriquecido apenas com xilose como fonte de carbono nas concentrações de 5 g/L, 10 g/L e 50 g/L de xilose. Os crescimentos também foram realizados em meio enriquecido com 10 g/L de glicose, carboidrato naturalmente utilizado pelas leveduras. Como controle positivo de crescimento em xilose foi utilizado *S. stipitis* Y-7124 e como controle negativo *S. cerevisiae* SC9721.

Com relação ao ensaio de crescimento de *R. mucilaginosa* UC11 (Figura 4), como o esperado por ser a fonte preferencial de energia, todas as leveduras cresceram em meio 10 g/L de glicose. No entanto, em todos os meios contendo xilose, a cepa SC9721 não apresentou crescimento, comprovando que de fato *S. cerevisiae* não é capaz de assimilar xilose. Já *S. stipitis*

apresentou elevado crescimento em todas as concentrações de xilose, além disso, essa levedura exibiu crescimento relativamente maior em meio 10 g/L de xilose do que em meio 10 g/L de glicose, uma prova de que *S. stipitis* utiliza a xilose eficientemente para crescimento. No caso de *R. mucilaginosa* UC11, esta levedura apresentou crescimento comparável ao de *S. stipitis* em todas as concentrações de xilose, atingindo máxima densidade ótica em 96 horas. Nos meios enriquecidos com 5 g/L e 50 g/L de xilose, *R. mucilaginosa* apresentou perfil de crescimento semelhante ao da levedura controle positivo, um resultado muito promissor, pois mostra que *R. mucilaginosa* é capaz de utilizar a xilose para crescimento tão bem quanto *S. stipitis*.

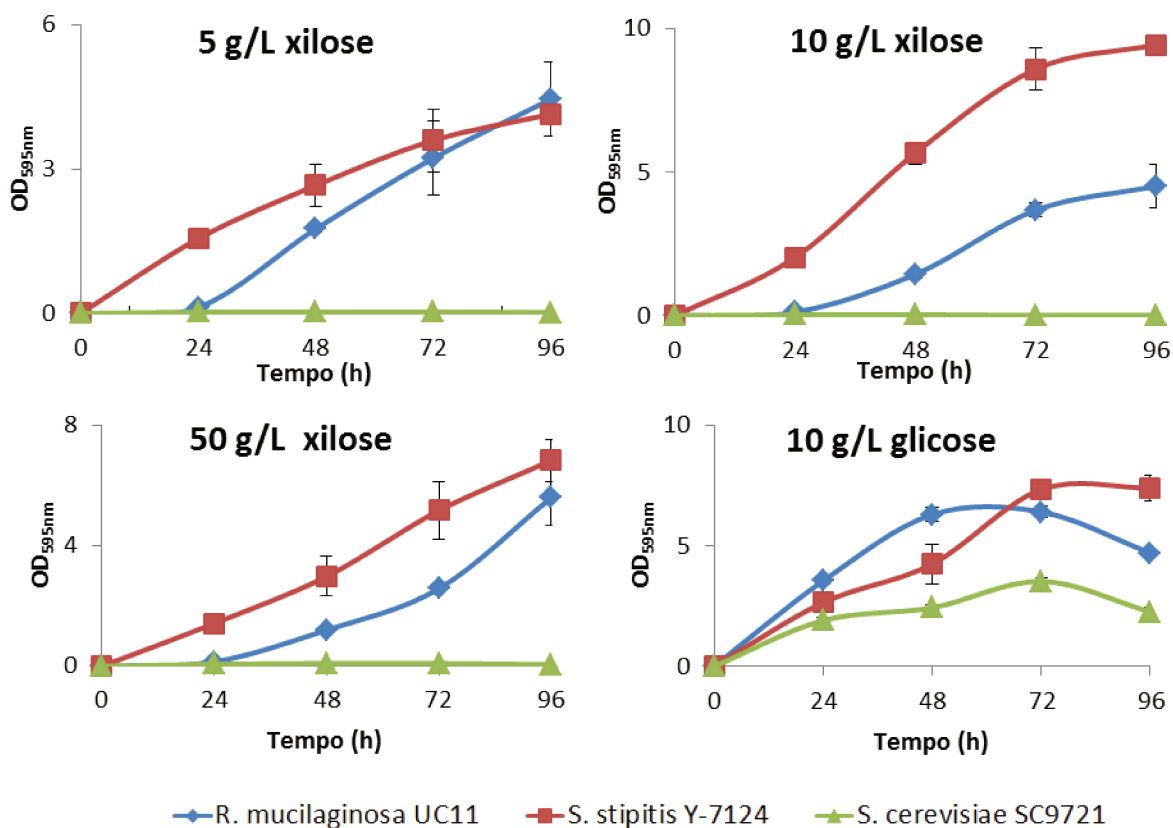


Figura 4. Curvas de crescimento de *R. mucilaginosa* UC11, *S. stipitis* Y-7124 e *S. cerevisiae* SC9721 em diferentes fontes de carbono.

Com relação às oito leveduras contaminantes de dornas de fermentação alcoólica, realizou-se o crescimento com as oito cepas identificadas, *Meyerozyma guilliermondii* FT1909L, *Torulaspora* sp. FT1360L, *Schizosaccharomyces pombe* FT155L, *S. cerevisiae* FT282L e quatro cepas de *Ogataea polymorpha* (FT212L, FT1140L, FT1139L e FT209L) (Figura 5). Como o

esperado, todas as leveduras cresceram em meio 10 g/L de glicose, e *S. cerevisiae* não cresceu nos meios contendo xilose. Nas concentrações de 5 g/L e 10 g/L xilose, o crescimento de *M. guilliermondii* e de todas as cepas de *O. polymorpha* foram superiores ao de *S. stipitis*, além disso, essas leveduras cresceram mais em meio 10 g/L de xilose do que em 10 g/L de glicose, evidenciando que elas são ótimas assimiladoras de xilose. Em 50 g/L de xilose, *M. guilliermondii* e *O. polymorpha* FT209L cresceram de forma pareada a *S. stipitis*. Em razão da alta capacidade de crescimento em xilose, visto nas curvas de crescimento, e do potencial descrito na literatura, como já apresentado na introdução, as quatro cepas de *O. polymorpha* foram escolhidas para estudos mais detalhados.

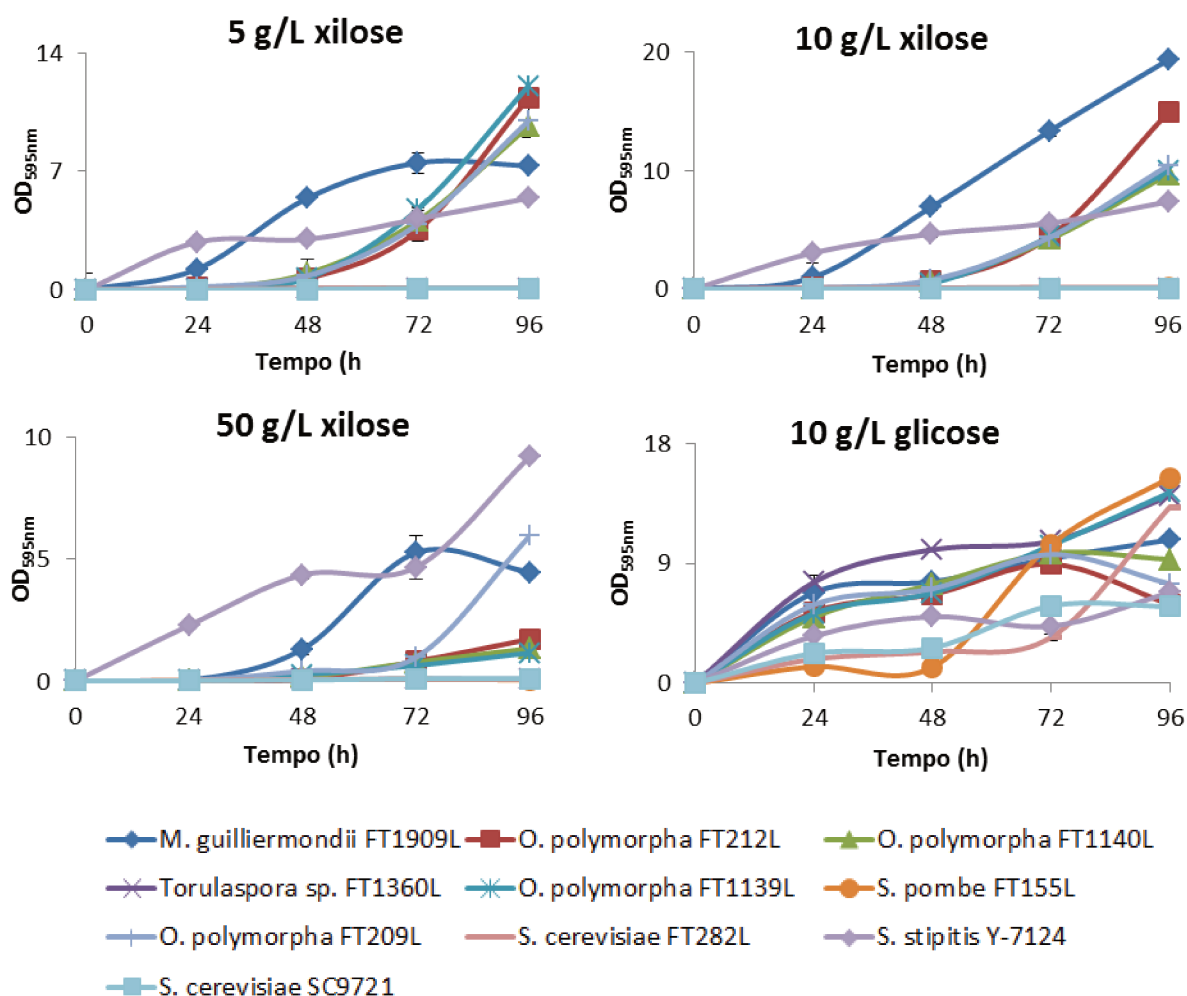


Figura 5. Curvas de crescimento das leveduras isoladas como contaminantes de dornas de fermentação alcóolica.

5.1.2.2 Árvores filogenéticas de *R. mucilaginosa* UC11 e cepas de *O. polymorpha*

Uma vez que foi verificada a capacidade de crescer em xilose de *R. mucilaginosa* UC11 e das quatro cepas de *O. polymorpha*, optou-se por confirmar a identificação de suas espécies, que no período de prospecção de novas leveduras foi realizada apenas utilizando as sequências da região ITS2. Para isso, foram construídas árvores filogenéticas empregando tanto as sequências da região ITS, que inclui região ITS1, gene 5.8S e região ITS2, como as sequências da região D1/D2 da subunidade maior (26S) do DNA ribossomal. O sequenciamento da região ITS fornece a maior probabilidade de identificação bem sucedida para a mais ampla gama de fungos, por ser o *barcode* mais claramente definido de *gaps* em variações inter- e intraespecíficas (SCHOCH et al., 2012). Já o sequenciamento dos domínios 1 e 2 (D1/D2) tem sido utilizado por muitos pesquisadores para a determinação de espécies de levedura, por ser uma abordagem rápida e efetiva e por haver um grande número de sequências disponíveis para comparação em bancos de dados (FELL et al., 2000).

Para a construção das árvores filogenéticas de *R. mucilaginosa* UC11 (Figura 6) e das cepas de *O. polymorpha* (Figura 7) foram incluídas as espécie-tipo de espécies relacionadas às cepas deste trabalho. As espécie-tipo foram adotadas pelo fato de o nome científico de uma espécie estar formalmente relacionado a elas, pois, em geral, são uma das primeiras cepas a serem estudadas e bem caracterizadas, e apenas as cepas muito semelhantes à espécie-tipo são incluídas como sendo da espécie. O método estatístico utilizado de inferência filogenética foi o *Maximum likelihood*, que busca pela árvore com a maior probabilidade ou verossimilhança (CHO, 2012). Os números exibidos nos ramos são as frequências com a qual cada ramo apareceu em 500 replicações de *bootstrap*. A análise do *bootstrap* é uma maneira de se avaliar a força de apoio aos clados da árvore filogenética, ou seja, quanto maior o valor do *bootstrap* mais confiável é o clado gerado (EFRON; HALLORAN; HOLMES, 1996). Além disso, a dimensão dos ramos é um reflexo da quantidade de modificações genéticas e representam linhagens evolutivas mudando ao longo do tempo. Quanto maior for o ramo, maior é a quantidade de modificações. A barra abaixo da árvore fornece a escala de modificações por posição nucleotídica (RAMBAUT, 2013).

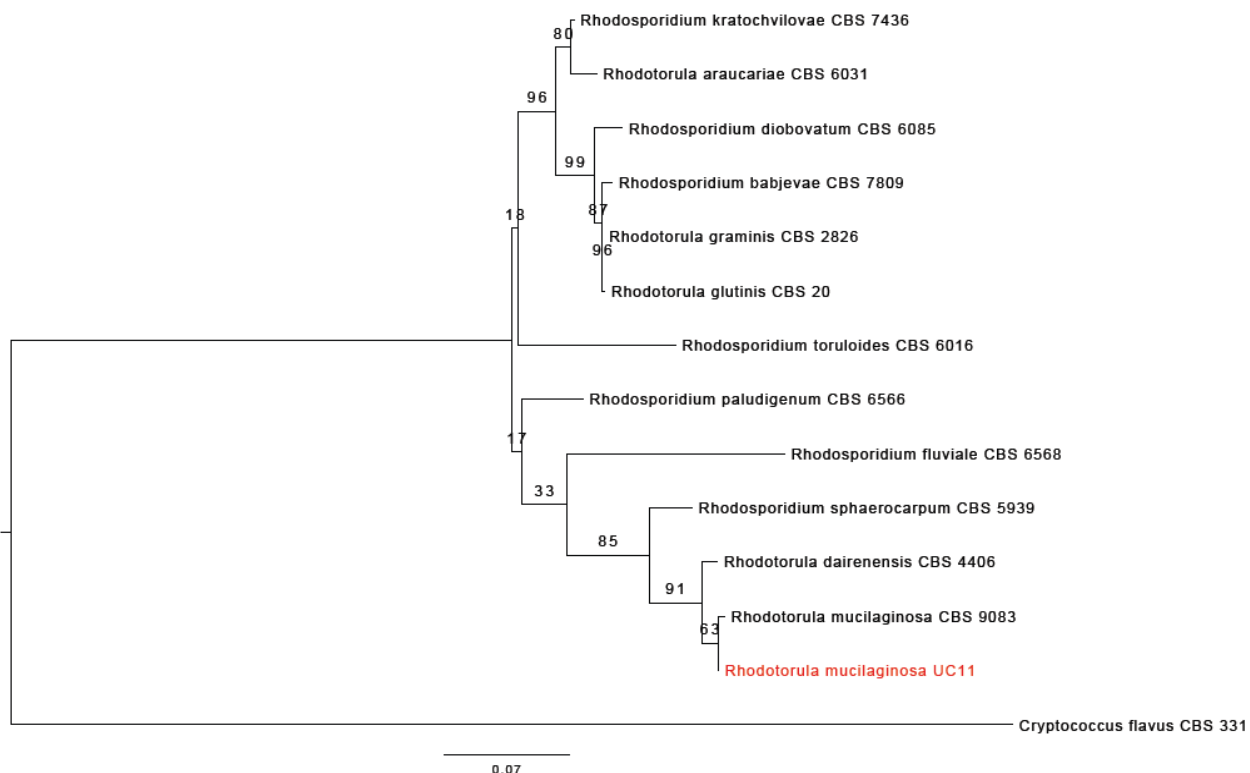


Figura 6. Árvore filogenética que descreve a relação de *R. mucilaginosa* UC11 (destacada em vermelho) com espécies estreitamente relacionadas, baseada na sequências da região ITS1-5.8S-ITS2 rDNA e do domínio D1/D2 do LSU rDNA. Os valores de *bootstrap* estão indicados nos nós

Dessa forma, com o objetivo de estabelecer uma posição taxonômica apropriada para *R. mucilaginosa* UC11, foi gerada uma árvore filogenética dessa cepa juntamente com as espécies estritamente relacionadas pertencentes aos gêneros *Rhodospiridium* e *Rhodotorula*, baseando-se na similaridade das sequencias da região ITS e do domínio D1/D2 de todas as espécies. A levedura *Cryptococcus flavus*, foi adotada como o grupo externo. *Rhodotorula mucilaginosa* UC11, destacada em vermelho, foi agrupada com a espécie-tipo de *R. mucilaginosa* CBS 9083 com o valor de *bootstrap* de 63, que apesar de ser um valor considerado mediano de confiabilidade do ramo, juntamente com o curto comprimento dos ramos de *R. mucilaginosa* UC11 e de *R. mucilaginosa* CSB 9083, é possível comprovar que de fato *R. mucilaginosa* UC11 foi classificada de maneira correta. Neste sentido, comparando-se as sequências de *R. mucilaginosa* UC11 com as de *R. mucilaginosa* CBS 9083, foi observado que há apenas um *gap* na região D1/D2 e um *gap* e uma substituição na região ITS2 de *R. mucilaginosa* UC11, o que não é suficiente para considerá-las de outra espécie, pois apenas cepas com dois ou mais nucleotídeos

de diferença na região D1/D2 LSU e pelo menos 15 nucleotídeos de diferença na região ITS podem representar uma nova espécie (informação verbal)¹.

Com relação à árvore filogenética das cepas de *O. polymorpha*, nesta foram avaliadas as semelhanças das sequências da região ITS e do domínio D1/D2 das cepas deste trabalho com as espécies estritamente relacionadas dos gêneros *Ogataea*, *Pichia* e *Candida*. O grupo externo adotado foi a levedura *S. cerevisiae*. As cepas de *O. polymorpha*, destacadas em vermelho, foram agrupadas com a espécie-tipo de *O. polymorpha* CBS 4732, e o alto valor de *bootstrap* de 98 demonstra a alta confiabilidade do clado gerado, e além disso, o curto comprimento dos ramos evidenciam que existem poucas modificações genéticas entre as cepas deste trabalho e a espécie-tipo. Comparando as sequências das cepas de *O. polymorpha* com as de *O. polymorpha* CBS 4732, foram observados apenas um *gap* na região D1/D2 da cepa FT1139L, dois *gaps* na região ITS1 da cepa FT209L e dois *gaps* na região ITS2 da cepa FT1140L.

Com isso, foi possível confirmar que os isolados antes identificadas apenas pelo sequenciamento da região ITS2 (item 5.1.1), são de fato pertencentes às espécies *R. mucilaginosa* e *O. polymorpha*.

¹ Informação fornecida pelo Prof. Dr. Carlos Augusto Rosa da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

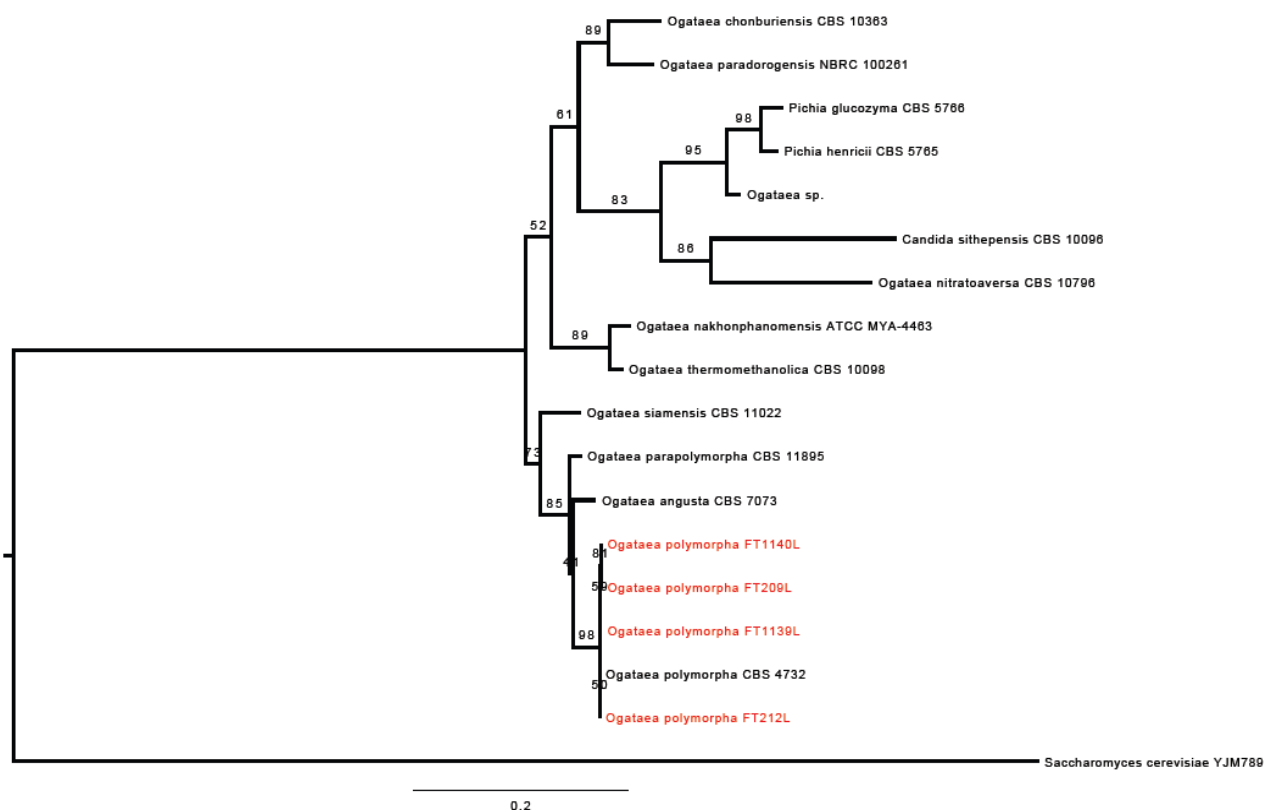


Figura 7. Árvore filogenética que descreve a relação das cepas de *O. polymorpha* (FT1140L, FT209L, FT1139L e FT212L, destacados em vermelho) com espécies estreitamente relacionadas, baseada na sequências da região ITS1-5.8S-ITS2 rDNA e do domínio D1/D2 do LSU rDNA. Os valores de *bootstrap* estão indicados nos nós.

5.1.2.3 Filogenia das enzimas *XDH1* e *XDH2* de *Ogataea (Hansenula) polymorpha*

A enzima xilitol desidrogenase (XDH) é membro da família das desidrogenases de cadeia média (MDR) e da subfamília das poliol desidrogenases (LIMA et al., 2006). A XDH possui em sua estrutura os domínios típicos, ADH N (*alcohol dehydrogenase GroES-like domain*) e ADH Zinc N (*Zinc binding dehydrogenase*). O ADH N é o domínio catalítico das álcoois desidrogenases de estrutura *GroES-like* e muitos ADH N contem um domínio ADH Zinc N nele inserido (BATEMAN et al., 2004).

Curiosamente, Dmytruk et al. (2008b) verificaram que *H. polymorpha* possui dois genes diferentes que codificam XDH e ambas as enzimas contribuem significativamente para a atividade intracelular total da XDH. Por esse motivo, Biswas et al. (2010) caracterizaram as enzimas XDH1 e XDH2 de *Pichia angusta* MTCC225, considerada por eles sinônimo de *H. polymorpha*, e observaram que elas são distintas quanto as suas sequências primárias, propriedades

bioquímicas e estrutura. E apesar de ambas contribuírem significativamente para a atividade da XDH intracelular total, a enzima XDH1, codificada pelo gene *xyl2a*, exibiu K_m , que mede a concentração de substrato necessária para catálise eficaz, muito menor e K_{cat} (coeficiente de eficiência catalítica), que mede a quantidade de substrato convertida em produto por unidade de tempo, maior, demonstrando ser muito mais eficiente que a enzima XDH2, codificada pelo gene *xyl2b*, na utilização de xilitol. Além disso, XDH1 e XDH2 demonstraram ser termotolerantes, pois não só exibiram atividade ótima em temperaturas mais altas (XDH1 a 55°C e XDH2 a 50°C), mas também apresentaram maior estabilidade térmica, uma característica coerente com a fisiologia do organismo hospedeiro. Os benefícios fisiológicos para *O. polymorpha* da presença de duas xilitol desidrogenases redundantes com eficiências catalíticas tão distintas ainda não estão claros.

Visto as grandes diferenças entre duas enzimas que realizam a mesma função, visamos construir a filogenia dessas enzimas (Figura 8) com o objetivo de melhor entender as suas origens e a possível razão para as diferenças entre elas. Para isso, na filogenia, além das sequências de *O. polymorpha*, indicadas na filogenia como “Hanpo”, foram incluídas as sequências das álcoois desidrogenases dos fungos filamentosos *Aspergillus niger* e *Trichoderme resei* (na filogenia Aspni e Tresei, respectivamente) e das leveduras *S. stipitis* e *S. cerevisiae* (na filogenia Picsti e Sacce, respectivamente), que continham os domínios ADH N e ADH Zinc N, típicos da XDH.

Na filogenia foi possível observar que XDH1 (Hanpo2_23093) e XDH2 (Hanpo2_103565) foram separadas em dois clados. XDH1 é típica de Saccharomycotina, clado onde se encontram as álcoois desidrogenases de *S. stipitis* e *S. cerevisiae*. O outro clado é típico de fungos filamentosos, exceto pela presença da XDH2 de *O. polymorpha*. Dessa forma, de acordo com as sequências de aminoácidos, podemos verificar que *O. polymorpha* possui duas xilitol desidrogenases, uma, XDH1, semelhante as álcoois desidrogenases de leveduras e a outra, XDH2, semelhante às enzimas de fungos filamentosos. Uma hipótese para a origem distinta dessas duas enzimas é a possível ocorrência de um evento de transferência horizontal no passado evolutivo dessa espécie, no qual *O. polymorpha* pode ter recebido uma cópia do gene que codifica XDH2 de um fungo filamentoso. No entanto são necessários estudos filogenéticos mais apurados para entender a origem dessas duas enzimas.

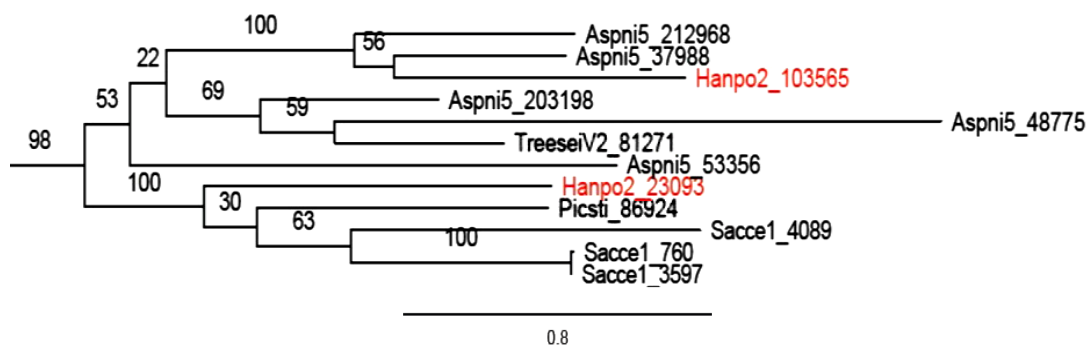


Figura 8. Filogenia das álcoois desidrogenases relacionadas à XDH1 (Hanpo2_23093) e XDH2 (Hanpo2_103565) de *Ogataea (Hansenula) polymorpha* (Hanpo), de *Aspergillus niger* (Aspini), *Trichoderma reesei* (Treesei), *Scheffersomyces stipitis* (Picsti) e *Saccharomyces cerevisiae* (Sacce).

5.1.2.4 Atividade das enzimas XR e XDH

A habilidade das leveduras utilizarem xilose depende da existência dos genes que codificam as enzimas xilose redutase (XR) e xilitol desidrogenase (XDH) em seu genoma, pois elas são responsáveis pela etapa inicial de conversão da D-xilose a D-xilulose (YABLOCHKOVA et al., 2004). Por essa razão, foram medidas as atividades das enzimas XR e XDH de *R. mucilaginosa* UC11 e das quatro cepas de *O. polymorpha*. O controle positivo para esse ensaio foi novamente *S. stipitis* Y-7124, pois esta é uma das melhores leveduras naturalmente capazes de utilizar xilose que em condições limitadas de O₂ produz etanol. Esta levedura pertence ao grupo de leveduras isoladas de madeira em decomposição e de larvas de insetos que vivem em madeira (TOIVIO et al., 1984). O nicho ecológico dessa levedura está relacionado à sua habilidade de utilizar a maioria dos açúcares presentes na madeira, visto pela sua capacidade de produzir celulasas e hemicelulasas. *Scheffersomyces stipitis* é uma das poucas leveduras capazes de em anaerobiose fermentar xilose a etanol. Isto é possível devido à habilidade de sua XR utilizar NADPH e NADH como cofatores, e a vantagem disso está no fato de que há um balanço total de cofatores quanto o NADH é utilizado, e com isso não há a produção de xilitol (AGBOGBO et al., 2006). Dessa forma, devido ao interesse de se obter uma XR com habilidade de utilizar tanto NADPH como NADH, visando à expressão heteróloga em *S. cerevisiae*, a medição da atividade dessa enzima foi realizada utilizando ambos os cofatores separadamente. A atividade da XDH foi realizada utilizando o NAD⁺ como cofator. As atividades de *R. mucilaginosa* UC11 (Tabela 13) e das cepas de *O. polymorpha* (Tabela 14) foram medidas em ensaios separados.

Tabela 13. Atividade das enzimas XR e XDH de *R. mucilaginosa* UC11. Controle positivo *S. stipitis* Y-7124.

| Levedura | Atividade enzimática (U/mg proteína) | | |
|-----------------------------|--------------------------------------|--------------|--------------|
| | XR (NADPH) | XR (NADH) | XDH |
| <i>R. mucilaginosa</i> UC11 | 0,75 ± 0,04 | 0,03 ± 0,002 | 0,02 ± 0,002 |
| <i>S. stipitis</i> Y-7124 | 1,91 ± 0,03 | 1,69 ± 0,004 | 0,11 ± 0,002 |

As atividades da XR de *S. stipitis* Y-7124, tanto no ensaio de *R. mucilaginosa* (NADPH: 1,9 U/mg; NADH 1,69 U/mg) quanto no de *O. polymorpha* (NADPH: 1,41 U/mg; NADH: 1,72 U/mg), demonstraram que de fato a XR de *S. stipitis* tem afinidade por ambos os cofatores. Já as atividades da XDH dessa levedura foram de 0,11 U/mg e de 0,08 U/mg, no ensaio de *R. mucilaginosa* e de *O. polymorpha*, respectivamente. Wahlbom et al. (2003) obtiveram para *S. stipitis* CBS 6054 as atividades da XR, utilizando NADPH, e da XDH, nos valores de, 2,4 U/mg e 0,4 U/mg, respectivamente. Levando-se em conta as diferenças genotípicas entre as cepas e possíveis disparidades experimentais, observou-se que os valores obtidos para o nosso controle positivo estão de acordo com o reportado na literatura.

Tabela 14. Atividade das enzimas XR e XDH das cepas de *O. polymorpha*. Controle positivo *S. stipitis* Y-7124.

| Levedura | Atividade enzimática (U/mg proteína) | | |
|------------------------------|--------------------------------------|---------------|----------------|
| | XR (NADPH) | XR (NADH) | XDH |
| <i>O. polymorpha</i> FT212L | 0,73 ± 0,02 | 0,06 ± 0,005 | 0,03 ± 0,0008 |
| <i>O. polymorpha</i> FT1140L | 0,4 ± 0,004 | 0,01 ± 0,0002 | 0,003 ± 0,0001 |
| <i>O. polymorpha</i> FT1139L | 0,41 ± 0,03 | 0,02 ± 0,0002 | 0,003 ± 0,0003 |
| <i>O. polymorpha</i> FT209L | 0,71 ± 0,04 | 0,15 ± 0,006 | 0,02 ± 0,003 |
| <i>S. stipitis</i> Y-7124 | 1,41 ± 0,02 | 1,72 ± 0,16 | 0,08 ± 0,006 |

Com relação às cepas de *O. polymorpha*, foi possível observar que as atividades da XR e da XDH variaram dentro da mesma espécie, onde FT212L e FT209L apresentaram os maiores valores tanto de XR como de XDH, enquanto que FT1140L e FT1139L exibiram resultados bem inferiores e semelhantes entre si. Por essa razão apenas FT212L e FT209L tiveram os seus resultados aqui discutidos.

As atividades da XR de *R. mucilaginosa* (0,752 mg/U) e das cepas de *O. polymorpha* FT212L (0,727 U/mg) e FT209L (0,711 U/mg), utilizando NADPH como cofator, foram consideradas válidas, pois apesar de terem sido inferiores a atividade do controle positivo *S. stipitis*

(ensaio *R. mucilaginosa*: 1,91 U/mg; ensaio *O. polymorpha*: 1,41 U/mg), foram maiores que a atividade endógena da XR da levedura *Rhodospodium toruloides* Y-2502 (teleomorfo de *Rhodotorula glutinis*) (0,034 U/mg) (FREER; SKORY; BOTHAST, 1997) e também da XR de *Hansenula polymorpha* CBS4732 (0,091 U/mg) (DMYTRUK et al., 2009a). Entretanto, diferente de *S. stipitis*, que apresentou atividade da XR utilizando NADH tão alta quanto utilizando NADPH, as atividades das XRs de *R. mucilaginosa* (0,03 mg/U) e de *O. polymorpha* FT212L (0,06 U/mg) e FT209L (0,15 U/mg) foram baixas, porém superiores a de *H. polymorpha* CBS4732 (0,016 U/mg).

Com relação às atividades da XDH de *R. mucilaginosa* (0,016 U/mg) e das cepas de *O. polymorpha* FT212L (0,033 U/mg) e FT209L (0,021 U/mg), elas foram inferiores às atividades endógenas da XDH de *S. stipitis* (ensaio *R. mucilaginosa*: 0,11 U/mg; ensaio *O. polymorpha*: 0,08 U/mg), de *R. toruloides* Y-2502 (0,108 U/mg) e também de *H. polymorpha* CBS4732 (0,55 U/mg). Dessa forma, devido a baixa atividade da XDH, é possível que as leveduras *R. mucilaginosa* e *O. polymorpha* estejam acumulando xilitol no meio durante o crescimento em xilose, como foi visto para *R. mucilaginosa* PDT3 no trabalho de Bura; Vajzovic; Doty (2012).

Com base nos valores obtidos das atividades da XR e, principalmente, da XDH, que apresentou maior valor do que FT209L, *O. polymorpha* FT212L foi escolhida para caracterização e clonagem de seus genes em *S. cerevisiae*, assim como *R. mucilaginosa* UC11.

5.1.2.5 Análise da expressão de *xyl1* e *xyl2* por qRT-PCR

Com o objetivo de entender temporalmente as respostas moleculares causadas pelo crescimento das leveduras em diferentes concentrações de xilose, e também em glicose, foi medida a expressão dos genes *xyl1* (XR) e *xyl2* (XDH) de *R. mucilaginosa* UC11 e dos genes *xyl1* (XR), *xyl2a* (XDH1) e *xyl2b* (XDH2) de *O. polymorpha* FT212L, que comprovado experimentalmente possui dois genes que codificam XDH (BISWAS et al., 2010).

Com relação a *R. mucilaginosa* UC11, os genes da via da redução/oxidação (Figura 9 e 10), normalizados pela expressão do gene *tefl*, não foram expressos em glicose, assim como foi observado por Jeffries et al. (2007) para a expressão dos genes *xyl1* e *xyl2* de *S. stipitis* CBS 6054. Possivelmente esse fenômeno tem sua origem na repressão causada pela glicose de enzimas envolvidas no metabolismo da xilose. D-glicose, D-manose e 2-deoxiglicose são capazes de reprimir a indução das atividades de XR e de XDH de *Pichia tannophilus* e de *S. stipitis*

(BICHO et al., 1988). Essa repressão por glicose, ou de fontes de carbonos relacionadas, da síntese de enzimas induzíveis é uma característica do Efeito Glicose, também conhecido como Repressão Catabólica (BICHO et al., 1988; GANCEDO; GANCEDO, 1986). Com relação aos cultivos em meio contendo exclusivamente xilose, foi possível observar que a expressão de *xyl1* e *xyl2* é de fato induzida pela xilose, resultado que corrobora com os resultados de RT-PCR (*Reverse transcription* PCR) obtidos por Xu; Bura; Doty (2011), nos quais os genes *xyl1* e *xyl2* de *R. mucilaginosa* PTD3 foram de fato transcritos em mRNA e induzidos em xilose. Além disso, foi observado que os níveis de expressão de ambos os genes foram maiores nas primeiras 48 horas de cultivo em todas as concentrações de xilose, com exceção apenas da expressão de *xyl1* em meio 10 g/L de xilose, que em 72 horas de cultivo apresentou o seu maior nível de expressão. Uma possível explicação para esse fenômeno é o fato de que no início do crescimento a levedura ativa as suas vias metabólicas para produzir quantidades suficientes de nutrientes essenciais e dar suporte ao rápido crescimento (fase exponencial), quando então o metabolismo fica mais lento e as células cessam a rápida divisão celular como consequência da mudança no ambiente causada tipicamente, dentre outros fatores, pela alta densidade celular (ASADUZZAMAN, 2007). Neste sentido acreditamos que no início do cultivo em xilose, *R. mucilaginosa* expressou em altos níveis *xyl1* e *xyl2* para metabolizar a xilose rapidamente e gerar energia para a célula. Por fim, também foi observado que a expressão do *xyl1* foi superior a *xyl2*, corroborando com os resultados obtidos na medição da atividade de XR e XDH (item 5.1.2.4) onde a atividade da XR também foi superior à atividade da XDH.

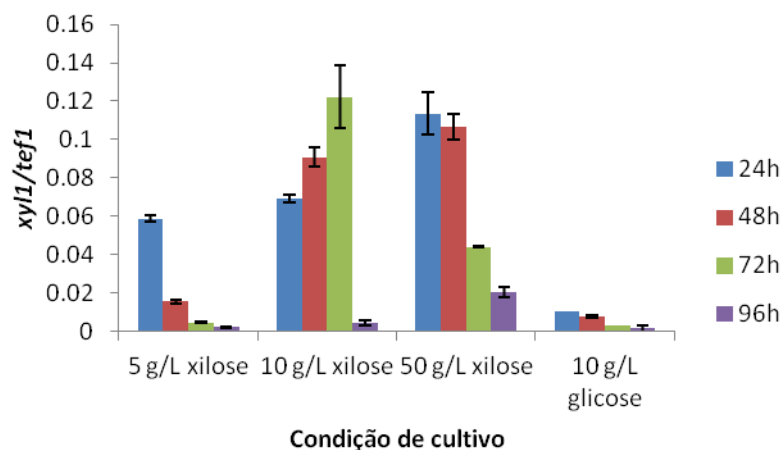


Figura 9. Expressão do gene *xyl1* de *R. mucilaginosa* UC11 relativa a expressão de *tef1*, em diferentes concentrações de xilose (5, 10 e 50 g/L) e em glicose (10 g/L) em 24, 48, 72 e 96 horas de crescimento.

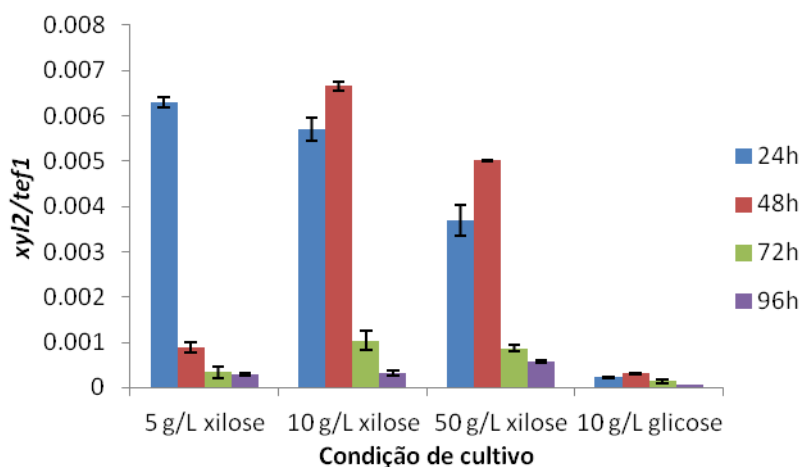


Figura 10. Expressão do gene *xyl2* de *R. mucilaginosa* UC11 relativa a expressão de *tef1*, em diferentes concentrações de xilose (5, 10 e 50 g/L) e em glicose (10 g/L) em 24, 48, 72 e 96 horas de crescimento.

Quanto à expressão dos genes *xyl1*, *xyl2a* e *xyl2b* de *O. polymorpha* FT212L (Figuras 11, 12 e 13, respectivamente), foi notado um comportamento diferente do mostrado por *R. mucilaginosa*, onde em 24 horas de crescimento em glicose, inesperadamente, os três genes do metabolismo da xilose também foram induzidos por esse açúcar, não sendo observado, portanto, o Efeito Glicose. No entanto, este comportamento também foi diferente do obtido por Kim et al. (2013b) para *H. polymorpha* DL1-L, coletada no início de sua fase exponencial de crescimento, que também por qRT-PCR que *xyl1* e *xyl2* dessa levedura foram induzidos 7,73 e 3,41 vezes mais

em xilose do que em glicose, respectivamente, indicando que a expressão desses genes desempenha um importante papel no metabolismo da xilose. Possivelmente a indução pela glicose dos genes *xyl1* e *xyl2a* de *O. polymorpha* FT212L em 24 horas, tenha ocorrido como uma primeira resposta do metabolismo dessa levedura à presença desse açúcar através da ativação de diversos genes do metabolismo de açúcares para o seu rápido consumo, mas que como essa via não é utilizada para a metabolização de hexoses os genes são rapidamente desligados. Entretanto, inesperadamente, o gene *xyl2b* continuou sendo induzido pela glicose até 96 horas.

A expressão do gene *xyl2a* foi semelhante à expressão do gene *xyl1*, o que não vai de encontro com o que foi obtido na medição das atividades de XR e XDH de *O. polymorpha* (item 5.1.2.4), onde a atividade da XR foi bem superior à atividade de XDH, mesmo que a atividade desta enzima seja a soma das atividades da XDH1 e da XDH2, codificadas, respectivamente, por *xyl2a* e *xyl2b*. Uma explicação para isso pode ser o fato de a expressão dos genes não implicar diretamente na atividade das enzimas, podendo haver outros fatores que também influenciem nessa relação, como mecanismos regulatórios de modificações traducionais e pós-traducionais. Além disso, foi verificada uma expressão reduzida do gene *xyl2b*. Segundo Biswas et al. (2010), tanto XDH1 como XDH2 contribuem significativamente para a atividade intracelular total da XDH de *O. polymorpha*, no entanto a enzima XDH1 (*xyl2a*), além de apresentar atividade superior ela é muito mais eficiente que a enzima XDH2 (*xyl2b*) na utilização de xilitol e possui maior afinidade pelo substrato, podendo essa ser uma das explicações para a baixa expressão do gene *xyl2a* em xilose. Além disso, existe a questão que envolve a origem dessas duas enzimas (item 5.1.2.3), no qual associamos a maior eficiência da XDH1 à sua semelhança às álcoois desidrogenases de leveduras, e a menor eficiência da XDH2 à sua semelhança às álcoois desidrogenases de fungos filamentosos. Neste sentido, era esperado que a expressão do *xyl2b* fosse inferior a do *xyl2a*.

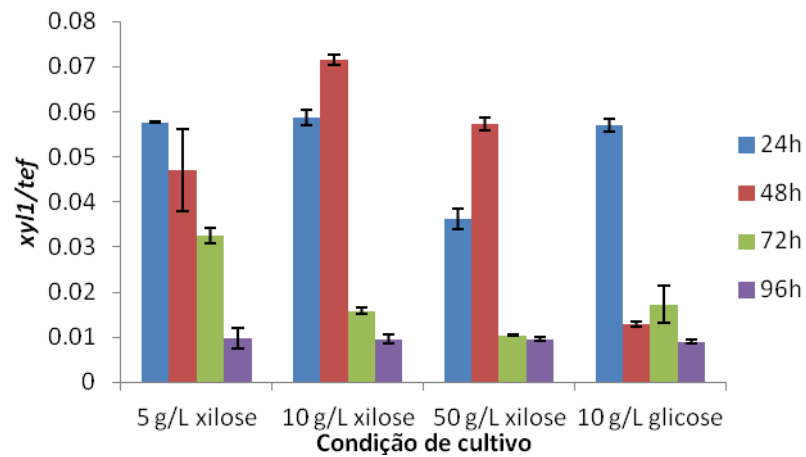


Figura 11. Expressão do gene *xyl1* de *O. polymorpha* FT212L relativa a expressão de *tef1*, em diferentes concentrações de xilose (5, 10 e 50 g/L) e em glicose (10 g/L) em 24, 48, 72 e 96 horas de crescimento.

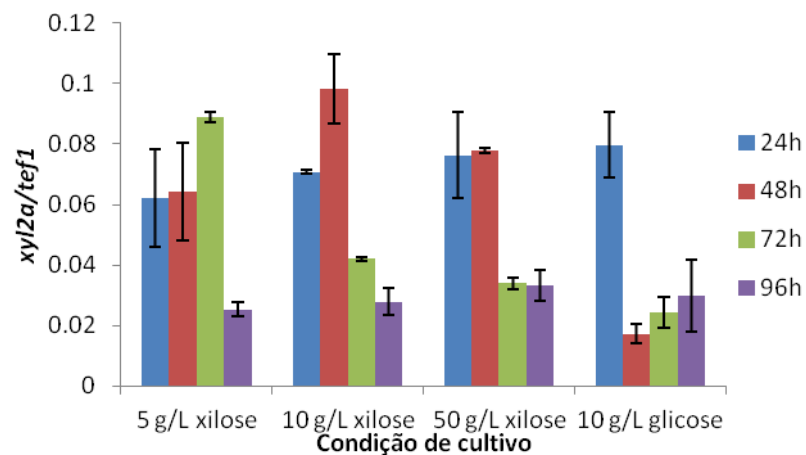


Figura 12. Expressão do gene *xyl2a* de *O. polymorpha* FT212L relativa a expressão de *tef1*, em diferentes concentrações de xilose (5, 10 e 50 g/L) e em glicose (10 g/L) em 24, 48, 72 e 96 horas de crescimento.

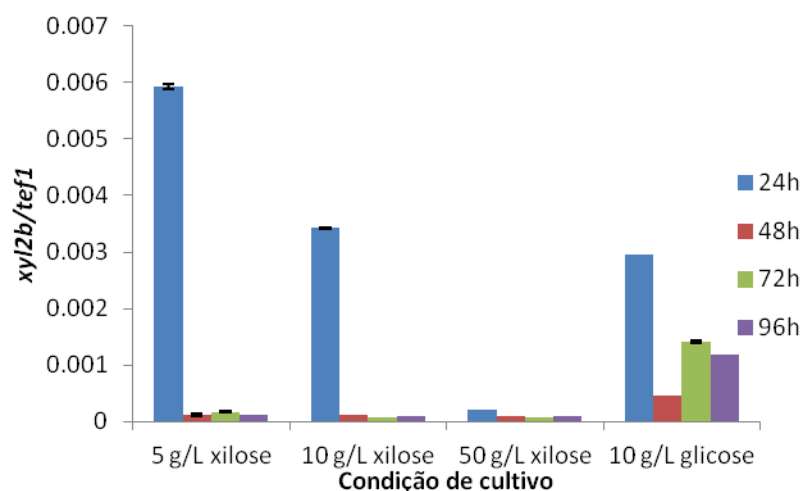


Figura 13. Expressão do gene *xy12b* de *O. polymorpha* FT212L relativa a expressão de *tef1*, em diferentes concentrações de xilose (5, 10 e 50 g/L) e em glicose (10 g/L) em 24, 48, 72 e 96 horas de crescimento.

5.2 As cepas recombinantes de *S. cerevisiae* expressando heterologicamente XR e XDH

Um dos objetivos desse trabalho foi expressar heterologicamente as enzimas XR e XDH na cepa industrial *S. cerevisiae* PE-2. Assim, após verificar que as leveduras *R. mucilaginosa* UC11 e *O. polymorpha* FT212L são capazes de utilizar xilose para crescimento, que seus genes *xy11* e *xy12* são expressos e induzidos por este açúcar e que as respectivas enzimas XR e XDH possuem atividades satisfatórias, realizou-se a clonagem dos genes de interesse no vetor de expressão de levedura pSP-G1 (PARTOW et al., 2010). O pSP-G1 é um vetor bidirecional e possibilita a expressão em altos níveis de dois genes diferentes simultaneamente, e, portanto, considerado apropriado para abordagens de engenharia genética de vias metabólicas que envolvem vários genes. Os dois promotores desse plasmídio, localizados em direções opostas, são *pTEF1*, um dos promotores constitutivos mais fortes de *S. cerevisiae* (GATIGNOL; DASSAIN; TIRABY, 1990), e que controla o gene que codifica à um fator de alongação transcripcional (EF-1 α), e *pPGK1*, promotor do gene que codifica à fosfoglicerato quinase, enzima chave da via glicolítica, também constitutivo e qualificado como forte (PARTOW et al. 2010). Utilizando este plasmídio, os genes de *R. mucilaginosa* UC11 e de *O. polymorpha* FT212L foram superexpressos através da clonagem do *xy11* (XR) no sítio múltiplo de clonagem 2 (*pPGK1*) e do *xy12* no sítio múltiplo de clonagem 1 (*pTEF1*). Os plasmídios construídos neste trabalho com os genes das leveduras isoladas estão descritos na Tabela 8.

Para a superexpressão gênica controlada é fundamental a presença de genes como marcas de seleção nos vetores utilizados, permitindo assim uma detecção eficiente e seleção das células transformadas. Alguns dos genes marcadores normalmente utilizados são alelos selvagens de genes de levedura que codificam enzimas-chave de vias metabólicas essenciais relacionadas à processos de biossíntese, sendo as chamadas de marcas auxotróficas. Neste sentido, todos os plasmídios utilizados neste trabalho possuem o gene *URA3*, que codifica a oritodina-5-fosfato descarboxilase (enzima essencial na síntese de pirimidina) em suas construções. No que diz respeito às cepas *S. cerevisiae* hospedeiras (vide Tabela 2), utilizamos PE-2 que possui o gene *URA3* deletado, e SC9721 na qual estão deletados os genes *HIS3*, *LEU2*, *TRP1* e *LIS2*, que codificam enzimas essenciais para a síntese de aminoácidos (histidina, leucina, triptofano e lisina), assim como o gene *URA3* (PRONK, 2002).

Além dos plasmídios construídos neste trabalho também optamos por utilizar outros plasmídios (vide Tabela 2), gentilmente cedidos, com o intuito de avaliar a inserção de outras fontes gênicas no *background* nas cepas utilizadas. Nesse caso foram aferidas as superexpressões dos genes dos seguintes micro-organismos: *xylA* de *Piromyces* sp. (pRH 218), *xyl1* e *xyl2* de *S. stipitis* (pRH 209) e *xyl1* e *xyl2* de *S. stipitis* e *xks1* de *S. cerevisiae* (pRH 274). Neste sentido, todos os plasmídios aqui utilizados foram transformados em *S. cerevisiae* diploide PE-2 com o objetivo gerar cepas recombinantes de *S. cerevisiae* com potencial industrial. Além disso, para efeito comparativo com a cepa industrial, apenas os plasmídios cedidos também foram transformados na cepa doméstica de *S. cerevisiae* SC9721. E como controles negativos para os ensaios de caracterização de *S. cerevisiae* recombinantes, também foram obtidas cepas com plasmídios sem genes (p416, p426 e pSP-G1) transformados. As cepas recombinantes geradas neste trabalho estão descritas na Tabela 8.

5.2.1 A CARACTERIZAÇÃO DAS CEPAS RECOMBINANTES DE *S. cerevisiae*

5.2.1.1 Atividades das enzimas XR e XDH

Para nos certificar sobre a correta construção das cepas recombinantes de *S. cerevisiae* PE-2 foi avaliada se a superexpressão dos genes estava implicando no aumento da atividade das respectivas enzimas, XR e XDH. Primeiro foram analisadas as atividades de PE-2 Rm, e para

efeito de comparação, foram medidas juntamente com as atividades de PE-2 209 e PE-2 274. O controle positivo do ensaio foi *S. stipitis* Y-7124 e o controle negativo PE-2 pSP-G1 (plasmídio sem genes) (Tabela 15). Já em outro experimento, foi realizada a medição das atividades das cepas PE-2 Op1 e PE-2 Op 2, novamente junto de PE-2 209 e PE-2 274, e os controles positivo e negativo continuaram sendo os mesmos (Tabela 16).

Tabela 15. Atividades de XR (NADPH e NADH) e de XDH das cepas de *S. cerevisiae* PE-2 Rm, PE-2 209, PE-2 274 e PE-2 pSP-G1 e de *S. stipitis* NRRL-Y7124.

| Cepa | Atividade enzimática (U/mg total de proteína) | | |
|----------------------------------|---|--------------|---------------|
| | XR (NADPH) | XR (NADH) | XDH |
| PE-2 Rm | 0,61 ± 0,05 | 0,16 ± 0,002 | 0,04 ± 0,004 |
| PE-2 209 | 0,49 ± 0,002 | 0,37 ± 0,01 | 0,06 ± 0,001 |
| PE-2 274 | 0,53 ± 0,05 | 0,4 ± 0,02 | 0,05 ± 0,002 |
| <i>S. stipitis</i> Y-7124 | 1,42 ± 0,01 | 1,54 ± 0,05 | 0,03 ± 0,003 |
| PE-2 pSP-G1 | 0,21 ± 0,03 | 0,04 ± 0,02 | 0,003 ± 0,001 |

Tabela 16. Atividades de XR (NADPH e NADH) e de XDH das cepas de *S. cerevisiae* PE-2 Op 1, PE-2 Op 2, PE-2 209, PE-2 274 e PE-2 pSP-G1 e de *S. stipitis* NRRL-Y7124.

| Cepa | Atividade enzimática (U/mg total de proteína) | | |
|----------------------------------|---|--------------|---------------|
| | XR (NADPH) | XR (NADH) | XDH |
| PE-2 Op1 | 1,24 ± 0,06 | 0,02 ± 0,003 | 0,04 ± 0,004 |
| PE-2 Op 2 | 1,07 ± 0,004 | 0,02 ± 0,004 | 0,02 ± 0,001 |
| PE-2 209 | 0,99 ± 0,09 | 0,34 ± 0,03 | 0,12 ± 0,04 |
| PE-2 274 | 1,34 ± 0,08 | 0,45 ± 0,002 | 0,13 ± 0,01 |
| <i>S. stipitis</i> Y-7124 | 3,7 ± 0,43 | 1,63 ± 0,25 | 0,09 ± 0,004 |
| PE-2 pSP-G1 | 0,21 ± 0,001 | 0,02 ± 0,04 | 0,002 ± 0,001 |

Com relação aos resultados obtidos para *S. stipitis*, foi possível observar que atividades da XR utilizando tanto NADPH como NADH de todas as cepas recombinantes, apesar da superexpressão do gene *xyl1*, foram inferiores a atividade endógena da levedura usada como controle positivo. A mesma resposta ocorreu com Wahlbom et al. (2003) que construíram a cepa recombinante TMB 3399, através da integração cromossomal dos genes *xyl1* e *xyl2* de *S. stipitis* e *xks1* de *S. cerevisiae* na cepa industrial diploide de *S. cerevisiae* USM21, onde a atividade da XR (NADPH) de *S. stipitis* CBS 6054 (2,1 U/mg) foi superior a de TMB 3399 (0,03 U/mg). Segundo

Amore et al. (1991), o promotor endógeno do gene de *S. stipitis* contém elementos também encontrados em promotores de *S. cerevisiae*, como em *PGK* e *TRPI*. No entanto, a quantidade da XR e a atividade por cópia de gene em *S. cerevisiae* recombinantes foi visto como 20 vezes menor do que em *S. stipitis*. Como o gene *xyl1* de cepas recombinantes de *S. cerevisiae* é expresso constitutivamente enquanto que em *S. stipitis* o gene é induzido pela xilose, uma possível explicação para a baixa expressão heteróloga é a ausência de proteínas ativadoras específicas de xilose em *S. cerevisiae* que provavelmente podem existir em *S. stipitis* (KÖTTER et al., 1990).

Também foi possível verificar que as atividades da XR utilizando NADPH como cofator, de PE-2 Rm (0,61 U/mg), PE-2 209 (0,49 U/mg) e PE-2 274 (0,53 U/mg) e das leveduras do outro ensaio, PE-2 Op 1 (1,24 U/mg), PE-2 Op 2 (1,07 U/mg), PE-2 209 (0,99 U/mg) e PE-2 274 (1,34 U/mg), tiveram valores muito semelhantes entre si dentro dos respectivos ensaios. No entanto, quando comparamos a atividade endógena da XR (NADPH) (Tabela 13) de *R. mucilaginosa* UC11 de 0,75 U/mg (controle *S. stipitis* 1,91 U/mg), com a atividade de sua respectiva cepa recombinante PE-2 Rm de 0,61 U/mg (controle *S. stipitis* 1,42 U/mg), verificamos que não houve aumento da atividade da enzima com a superexpressão do gene. O mesmo aconteceu para *O. polymorpha* FT212L, que endogenamente (Tabela 14) a atividade foi de 0,73 U/mg (controle *S. stipitis* 1,41 U/mg), quando comparada às atividades das cepas recombinantes, 1,24 U/mg de PE-2 Op 1 e 1,07 U/mg de PE-2 Op 2 (controle *S. stipitis* 3,7 U/mg). Esse fenômeno pode ser explicado pelo fato de a manipulação da força dos promotores ser extensivamente utilizada para ajustar os níveis de transcrição, mas que mudanças no nível de expressão gênica nem sempre resultam em mudanças correspondentes das atividades das enzimas, devido a modificações traducionais, pós-traducionais, *feedback*, e outros mecanismos regulatórios (LU; JEFFRIES, 2007).

Com relação ao ensaio da XR das cepas PE-2 Op 1, PE-2 Op2 e de seus controles, utilizando NADH como cofator, é importante destacar que os valores obtidos não foram os esperados, principalmente em razão da atividade de *S. stipitis* utilizando o NADH (1,63 U/mg) ter sido praticamente a metade da atividade utilizando o NADPH como cofator (3,7 U/mg). Amore et al. (1991), verificaram que a razão entre as atividades da XR utilizando NADH e NADPH variaram em diferentes extratos celulares de *S. stipitis*, com valores entre 0.96 e 0.65, e a explicação para essa variação não é conhecida. Provavelmente, variações experimentais devam

implicar nessas diferenças. Neste sentido, comparando os resultados do ensaio de PE-2 Op 1 e PE-2 Op 2 (Tabela 16) com os resultados das cepas do ensaio de PE-2 Rm (Tabela 15), consideramos que possivelmente os resultados da XR utilizando o NADH de todas as cepas do ensaio de PE-2 Op1 e PE-2 Op2 possam estar subestimados.

Dessa forma, com relação à atividade da XR utilizando NADH como cofator, verificou-se um valor inferior de PE-2 Rm (0,16 U/mg) quando comparada com PE-2 209 (0,37 U/mg) e PE-2 274 (0,4 U/mg), e uma diferença ainda maior para PE-2 Op 1 (0,04 U/mg) e PE-2 Op 2 (0,02 U/mg) em relação à PE-2 209 (0,34 U/mg) e PE-2 274 (0,45 U/mg). No entanto, este comportamento já era esperado para PE-2 Rm, já que a XR endógena de *R. mucilaginosa* UC11 (Tabela 13) possui uma afinidade muito baixa pelo cofator NADH, enquanto que *S. stipitis*, fonte do gene *xyl1* de PE-2 209 e PE-2 274, utiliza NADH tão bem quanto NADPH. No entanto, as baixíssimas atividades de PE-2 Op1 e PE-2 Op 2 não eram esperadas, pois segundo Dmytruk et al. (2008a) a atividade da XR de *O. polymorpha* utilizando NADH como cofator é cerca de 10 vezes menor que quando o cofator NADPH é utilizado, e neste ensaio esta proporção foi bem menor (50-60 vezes), também quando comparado com a atividade endógena de *O. polymorpha* FT212L (Tabela 12) que apresentou 12 vezes mais afinidade pelo NADPH do que pelo NADH.

Já as atividades da XDH de PE-2 Rm (0,04 U/mg), PE-2 209 (0,06 U/mg) e PE-2 274 (0,05 U/mg) foram consideradas superiores ou pareadas com a atividade de *S. stipitis* (0,03 U/mg), evidenciando que a superexpressão do *xyl2* funcionou para essas cepas. No que diz respeito ao outro ensaio, em que foram medidas as atividades da XDH de PE-2 Op 1 (0,04 U/mg), PE-2 Op 2 (0,02 U/mg), e novamente PE-2 209 (0,12 U/mg) e PE-2 274 (0,13 U/mg), verificou-se que as atividades das cepas com os genes de *O. polymorpha* FT212L foram inferiores a de *S. stipitis* (0,09 U/mg), especialmente PE-2 Op 2. O resultado de PE-2 Op 2 pode ser justificado pelo fato de essa cepa carregar o gene *xyl2b* que codifica a enzima XDH2, o qual sabe-se que tem menor atividade endógena e eficiência na utilização de xilitol que a enzima XDH1 (gene *xyl2a*) (BISWAS et al., 2010) e assemelha-se, em composição de aminoácidos, às álcoois desidrogenases de fungos filamentosos (5.1.2.3). Semelhante ao resultado do ensaio de PE-2 Rm, as atividades das XDHs de PE-2 209 (0,12 U/mg) e PE-2 274 (0,13 U/mg), de maneira positiva, se mostraram superiores a atividade endógena de *S. stipitis* (0,09 U/mg).

5.2.1.2 Curvas de crescimento

Como forma de avaliar a eficácia da superexpressão dos genes de assimilação de xilose e a capacidade de utilização desse açúcar pelas cepas recombinantes, realizou-se o crescimento das mesmas em meio mínimo contendo apenas xilose como fonte de carbono (5 g/L, 10 g/L e 50 g/L de xilose) e também em 10 g/L de glicose.

Primeiramente foram analisadas as cepas contendo os plasmídios pRH 218, pRH 209 e pRH 274. Como controles negativos de crescimento em xilose foram utilizados as cepas contendo os plasmídios sem genes, p416 e p426. Com relação às cepas recombinantes de *S. cerevisiae* doméstica SC9721 (Figura 14), a SC 274, que contem o plasmídio com os genes *xyl1* e *xyl2* de *S. stipitis* e *xks1* de *S. cerevisiae*, foi a cepa que melhor cresceu em xilose, principalmente na concentração de 10 g/L, mas com baixa densidade ótica. No entanto quando os mesmos plasmídios foram transformados na cepa industrial *S. cerevisiae* PE-2, o crescimento foi muito mais expressivo (Figura 15). Novamente, a cepa com o plasmídio pRH 274, a PE-2 274, foi a que mais cresceu em xilose especialmente nas maiores concentrações, 10 g/L e 50 g/L. A transformação do mesmo plasmídio (pRH 274) apresentou uma resposta muito mais contundente em PE-2 do que em SC9721, sendo assim podemos supor que a cepa industrial possui um *background* genético mais favorável para lidar com o estresse oxidativo ocasionado pelo uso de xilose do que a cepa doméstica. Cepas laboratoriais são de fato adequadas para estudos genéticos e moleculares, mas cepas industriais apresentam melhor desempenho no processo fermentativo em larga escala (MATSUSHIKA et al., 2009a). Tal robustez de PE-2 vista nos ambientes industriais também já foi comprovada molecularmente. Em uma análise genética e molecular da cepa PE-2 diploide e de seu derivado haploide, foram verificadas extensivas diferenças estruturais e um alto nível de polimorfismos de nucleotídeo único (aproximadamente 2 SNPs/Kb), principalmente nas regiões teloméricas, em comparação com outras *S. cerevisiae* já sequenciadas. Além disso, também foi demonstrado que rearranjos cromossomais amplificam genes envolvidos em respostas à estresses ambientais (ESRs) (ARGUESO et al., 2009). Brown et al. (2013) verificaram que a parede celular e a tolerância ao estresse oxidativo são aumentados em PE-2, e que a alta tolerância ao etanol esta correlacionada ao aumento da resposta a proteínas mal enoveladas (*Unfolded Protein Response*) e ao aumento do *splicing* do fator de transcrição HAC1. Estas e outras características podem justificar a maior robustez de PE-2.

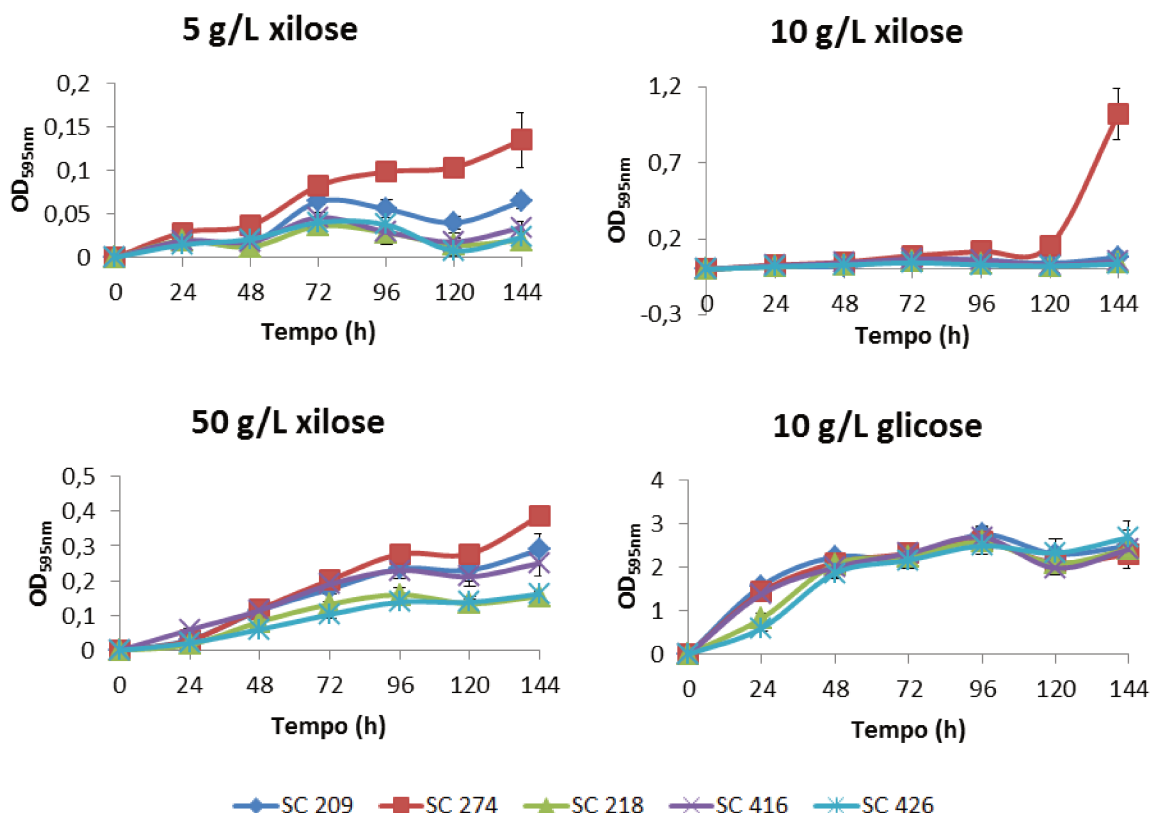


Figura 14. Crescimento das cepas recombinantes de *S. cerevisiae* SC9721 em diferentes fontes de carbono.

Outro aspecto que deve ser ressaltado é a importância do papel da XK na assimilação da xilose, visto que a cepa PE-2 209, que difere de PE-2 274 apenas com relação à ausência do *xks1*, apresentou um crescimento em xilose muito inferior a PE-2 274. Esse comportamento é apoiado pelo fato de que a superexpressão do *xks1* endógeno ou a introdução heteróloga do gene que codifica XK (por exemplo, *xyl3* de *S. stipitis*) ser imprescindível para facilitar o metabolismo da xilose na via pentose fosfato (KIM et al., 2013). A superexpressão da XK possibilita o aumento da taxa de consumo da xilose e também da taxa de produção de etanol. Acredita-se que a maior eficiência na conversão da xilulose a XP5 tem como consequência o aumento da oxidação do xilitol e do fluxo da conversão da xilose a etanol. Além disso, acredita-se que o aumento da fosforilação da xilulose modifica a concentração intracelular do metabólito levando ao aumento do fluxo do metabolismo da xilose (TOIVARI et al., 2001). Sabe-se, por exemplo, que apenas quando cópias adicionais desse gene são expressas em *S. cerevisiae* recombinante, é que ocorre produção de etanol a partir de xilose (HAHN-HÄGERDAL et al., 2007a). Assim, concluímos que a cepa brasileira PE-2 também necessita da superexpressão deste gene para assimilar xilose.

Curiosamente, no meio com 5 g/L de xilose, PE-2 218, que contém a xilose isomerase de *Piromyces* sp. superexpressa (*xylA*), foi a cepa que teve o melhor crescimento, sugerindo que ela possui uma melhor capacidade de captar e metabolizar xilose quando ela se encontra em baixas concentrações.

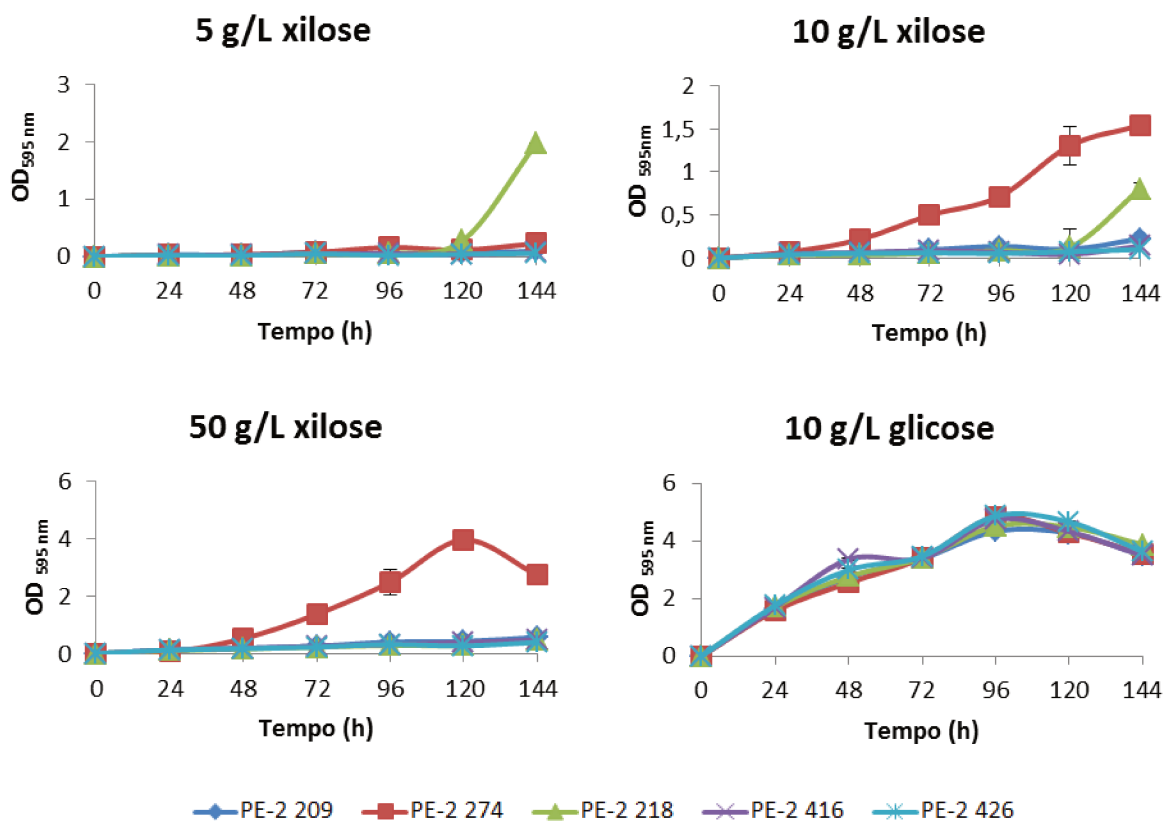


Figura 15. Crescimento das cepas recombinantes de *S. cerevisiae* PE-2 em diferentes fontes de carbono.

Com relação ao crescimento das cepas recombinantes de PE-2 obtidas com os genes de *R. mucilaginosa* UC11, PE-2 Rm (Figura 16), e com os genes de *O. polymorpha* FT212L, PE-2 Op 1 e PE-2 Op 2 (Figura 17), foi adotado como controle positivo PE-2 274, cepa recombinante que apresentou melhor crescimento em xilose, e como controle negativo utilizou-se PE-2 pSP-G1 (plasmídio sem genes). Além disso, os crescimentos também foram comparados com PE-2 209, que possui os mesmos genes das cepas agora avaliadas, no entanto, de *S. stiptis*. Foi possível observar que PE-2 Rm, PE-2 Op 1 e PE-2 Op 2 cresceram em xilose de maneira extremamente limitada em comparação com PE-2 274. Além disso, nota-se que PE-2 209 também cresceu

muito pouco em xilose, uma evidência de que a falta da superexpressão do *xks1* dificulta a utilização desse açúcar pela levedura.

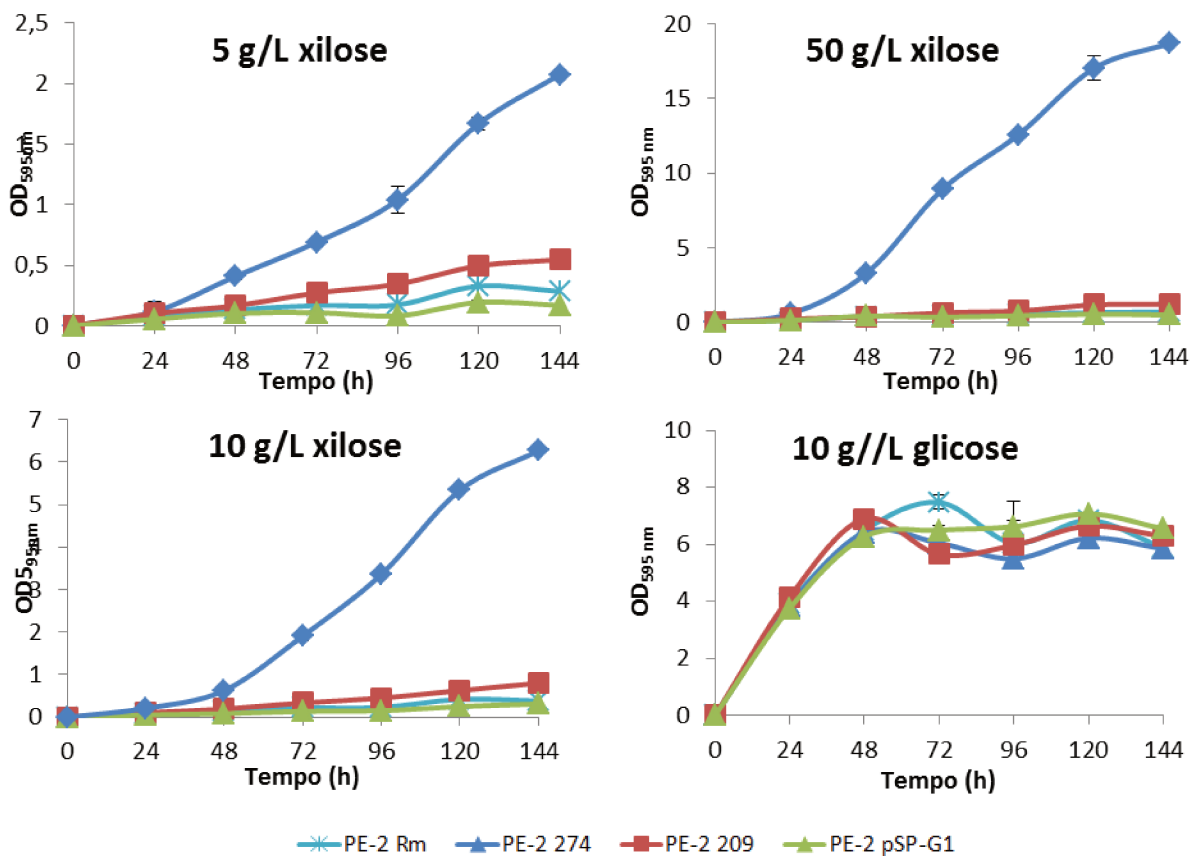


Figura 16. Crescimento das cepas recombinantes de *S. cerevisiae* PE-2 em diferentes fontes de carbono.

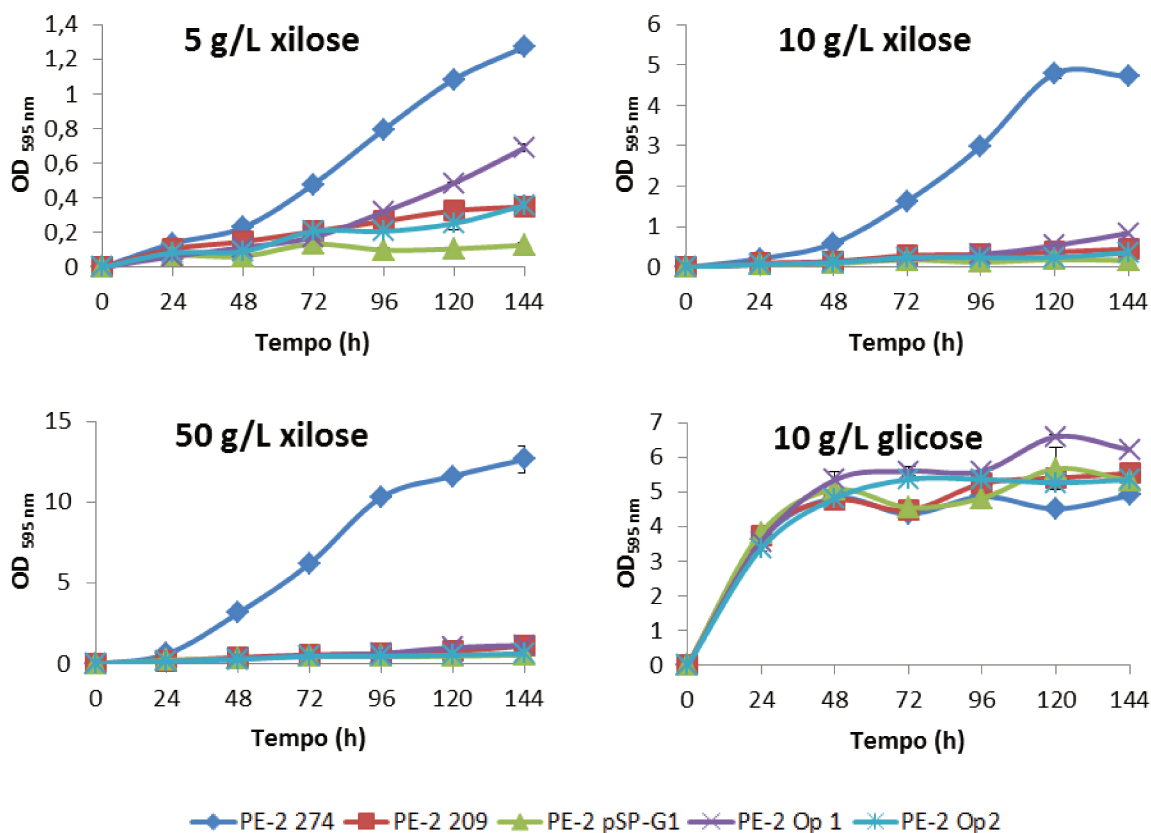


Figura 17. Crescimento das cepas recombinantes de *S. cerevisiae* PE-2 em diferentes fontes de carbono.

Nesse sentido, com o intuito de verificar se de fato a ausência da superexpressão do *xksI* estaria prejudicando o uso da xilose por essas cepas recombinantes e, sobretudo, como tentativa de torná-las mais eficientes na assimilação de xilose, resolveu-se transformar os plasmídios pSP-G1 Rm, pSP-G1 Op 1, pSP-G1 Op2 e pSP-G1 na cepa PE-2 com um dos alelos do gene *xksI* endógeno superexpresso (cerca de 40%), cepa denominada como PE-2 XK⁺ (Tabela 1). As cepas obtidas mediante essa estratégia estão descritas na Tabela 8.

Apesar da superexpressão de um dos alelos do gene *xksI* endógeno, as cepas recombinantes de *S. cerevisiae*, PE-XK Rm, PE-XK Op 1 e PE-XK Op 2 (Figura 18), continuaram apresentando baixo crescimento em xilose em comparação com PE-2 274. Uma das possíveis explicações para esse comportamento pode estar relacionada às baixas atividades das enzimas XR e XDH que as leveduras PE-2 Op 1 e PE-2 Op 2 apresentaram quando comparadas com as cepas recombinantes PE-2 209 e PE-2 274, enquanto que a enzima de PE-2 Rm apresentou atividade satisfatória (item 5.2.1.1). Segundo Karhumaa et al. (2007b) altas

atividades das enzimas XR e XDH levam ao aumento do rendimento em etanol e diminuição significativa do rendimento em xilitol, dentre as cepas recombinantes de *S. cerevisiae* avaliadas a cepa TMB 3057 apresentou o melhor desempenho fermentativo, apresentando atividades de XR e XDH de 0,35 U.mg de proteína⁻¹ e 2,16 U.mg de proteína⁻¹, respectivamente. Neste sentido, outras estratégias, como a engenharia de proteínas, podem ser utilizadas para melhorar o desempenho das enzimas XR e XDH das leveduras deste trabalho. Alteração da especificidade/seletividade pelo substrato, aumento da atividade catalítica e redução da inibição pelo substrato/produto, são algumas das modificações que podem ser realizadas. No campo da engenharia de proteínas, a evolução dirigida tem se tornado uma das ferramentas mais poderosas para a geração de diversidade genética através de métodos como *error-prone PCR*, *DNA shuffling* e mutagênese química, com a vantagem de não ser necessário o conhecimento prévio da estrutura e mecanismos da proteína. Além disso, são necessários estudos adicionais para verificar a especificidade das enzimas de *R. mucilaginosa* UC11 e *O. polymorpha* FT212L pelos seus respectivos substratos (XR: xilose e XDH: xilitol), e também determinar os parâmetros cinéticos das enzimas, como K_m e K_{cat} , com a finalidade de avaliar a eficiência das enzimas quanto ao uso da xilose e do xilitol e melhor entender as limitações das cepas recombinantes geradas (ERIKSEN,; LIAN, ZHAO, 2014). Por fim, outro possível problema que justifique o baixo crescimento das cepas recombinantes PE-XK Rm, PE-XK Op 1 e PE-XK Op 2 é a superexpressão insuficiente do gene *xks1* endógeno na cepa PE-2. Como esse procedimento foi realizado em apenas um dos alelos da PE-2 diploide, pode-se hipotetizar que sua superexpressão não esteja sendo suficiente para facilitar o metabolismo da xilose na via pentose fosfato.

Desse modo, como conclusões para esta primeira parte do trabalho, devemos ressaltar que a prospecção no trato intestinal de larvas de insetos parasitas da cana-de-açúcar e em dornas de fermentação alcoólica foi uma estratégia muito promissora, tendo em vista o objetivo central deste trabalho que foi a busca por novas leveduras assimiladoras de xilose. Como resultado desse isolamento foram obtidas cepas de altíssimo potencial biotecnológico e que são capazes de utilizar xilose. Mas pelos motivos já expostos, infelizmente as *S. cerevisiae* recombinantes com os genes de *R. mucilaginosa* UC11 e *O. polymorpha* FT212L, não corresponderam ao resultado esperado. No entanto, dentre as leveduras recombinantes construídas neste trabalho, PE-2 274 se mostrou como uma cepa de grande potencial visto pelas atividades das enzimas XR e XDH

satisfatórias e pelo ótimo crescimento em xilose. Dessa forma, seguimos os estudos com PE-2 274 para a avaliação de sua capacidade de produzir etanol a partir de xilose.

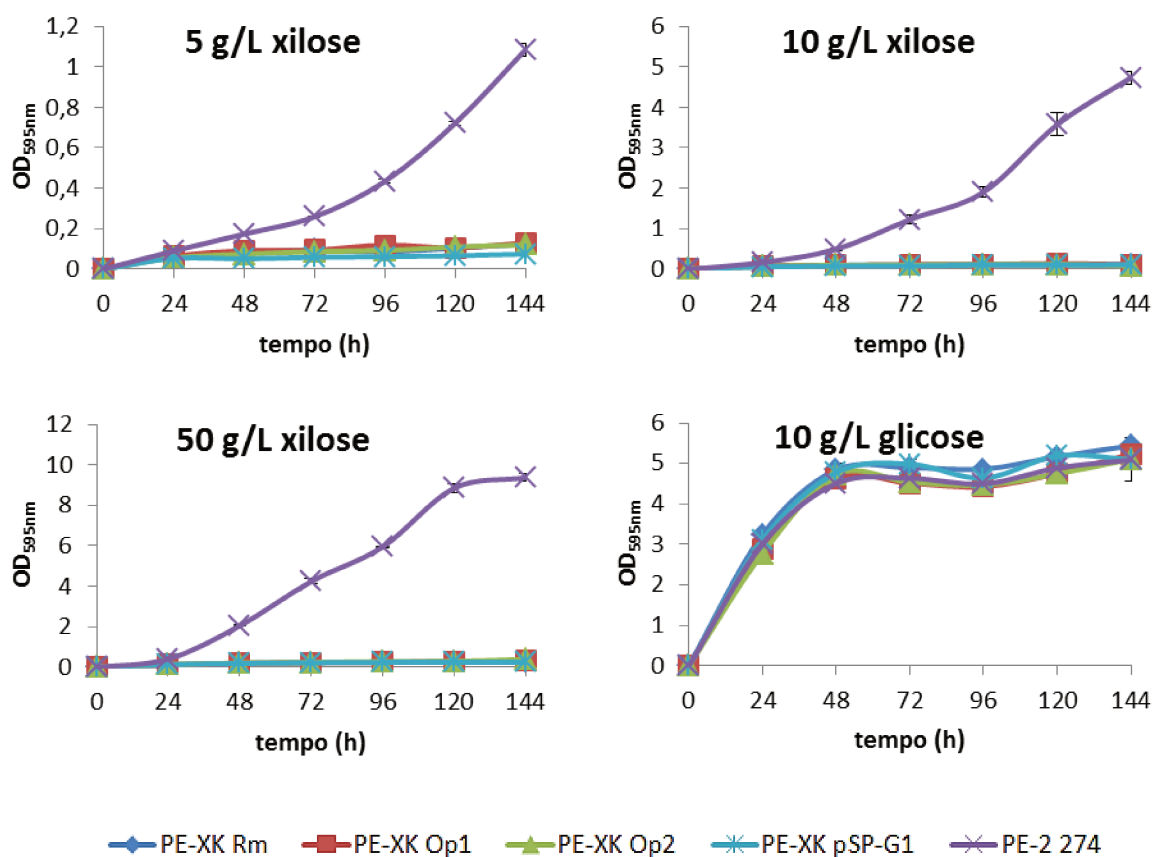


Figura 18. Crescimento das cepas recombinantes de *S. cerevisiae* PE-XK em diferentes fontes de carbono.

5.2.2 CO-FERMENTAÇÃO DE XILOSE E GLICOSE UTILIZANDO PE-2 274 EM BIORREATOR NA CONDIÇÃO DE MICROAEROFILIA

A fermentação de misturas de açúcares resultantes da hidrólise da biomassa é um gargalo significativo no processo global para a geração do etanol lignocelulósico. Dessa forma, para avaliar o potencial de PE-2 274 produzir etanol foram realizadas quatro fermentações, em triplicata biológica, utilizando meio YNB enriquecido com fontes de carbono (xilose, glicose e sacarose) em diferentes concentrações.

Com relação ao controle de oxigênio dissolvido nos ensaios de fermentação alcoólica, segundo Okuda et al. (2007) e Eliasson et al. (2000), o oxigênio é fundamental para o reciclo do

cofator NAD^+ e por isso a aeração controlada é um dos principais parâmetros na produção de etanol a partir de xilose. Para leveduras que naturalmente utilizam xilose, como *S. stipitis*, o nível de aeração está relacionado à energia intracelular, balanço redox e funcionamento da mitocôndria, afetando diretamente o consumo de xilose (SKOOG; HAHN-HAGERDAL, 1990; VISSER et al., 1990). Por essas razões, em todas as fermentações realizadas com PE-2 274 optou-se pela condição de microaerofilia.

A fermentação em meio 70 g/L de glicose (Figura 19) com PE-2 274 foi iniciada com 0,47 g/L (massa seca) de levedura, e a máxima produção de etanol ocorreu em 24 h resultando em 29,36 g/L de etanol, 2,94 g/L de glicerol, 0,34 g/L de ácido acético e 5,11 g/L de biomassa. O rendimento de açúcar total a etanol foi de 59,44%, a produtividade volumétrica de 0,74 $\text{g.L}^{-1}.\text{h}$ e a produtividade específica de 0,31 g etanol.g célula⁻¹.h.

Os valores obtidos para essa fermentação foram consideravelmente diferentes dos normalmente alcançados nas fermentações do caldo da cana-de-açúcar em escala industrial empregando-se o processo *Melle-Boinot*, onde a fermentação é iniciada com elevadas concentrações celulares (8-17% v/v), produzindo altas concentrações de etanol (8-11% v/v) com rendimento de até 92% (WHEALS et al., 1999). No entanto, é fundamental destacar que leveduras com marcas auxotróficas devem ser propagadas apenas no meio que contem os fatores de crescimento apropriados (PRONK, 2002), e por esse motivo não é possível realizar a fermentação em meio de composição complexa, como caldo de cana-de-açúcar e hidrolisados lignocelulósicos, muito menos promover a suplementação nutricional (fontes de fosforo, nitrogênio, elementos traço e vitaminas) que normalmente é feita industrialmente e que tem papel fundamental na obtenção de uma fermentação rápida e com alta produção de etanol (SILVA et al., 2012). Neste sentido, as concentrações de etanol e rendimentos obtidos nessa fermentação em meio mínimo enriquecido com 70 g/L de glicose, não podem ser comparadas às aquelas realizadas em larga escala. Além disso, como produtividade volumétrica é relacionada à quantidade de células adicionada no início da fermentação, ou seja, quanto mais alta for a densidade celular maior será a produtividade volumétrica (HAHN-HAGERDAL et al., 2007b), e como esta fermentação não foi iniciada com altas concentrações celulares assim como as do processo industrial, não é possível comparar as produtividades obtidas neste trabalho com as obtidas industrialmente. Por esse motivo, para efeito de comparação com o resultado das outras fermentações, a fermentação em meio 70 g/L de glicose foi adotada como o controle positivo, já que esse carboidrato é a fonte preferencial de energia de *S.*

cerevisiae, e, portanto, provavelmente seriam alcançados os maiores valores de rendimento e produtividade de PE-2 274 em meio contendo apenas glicose.

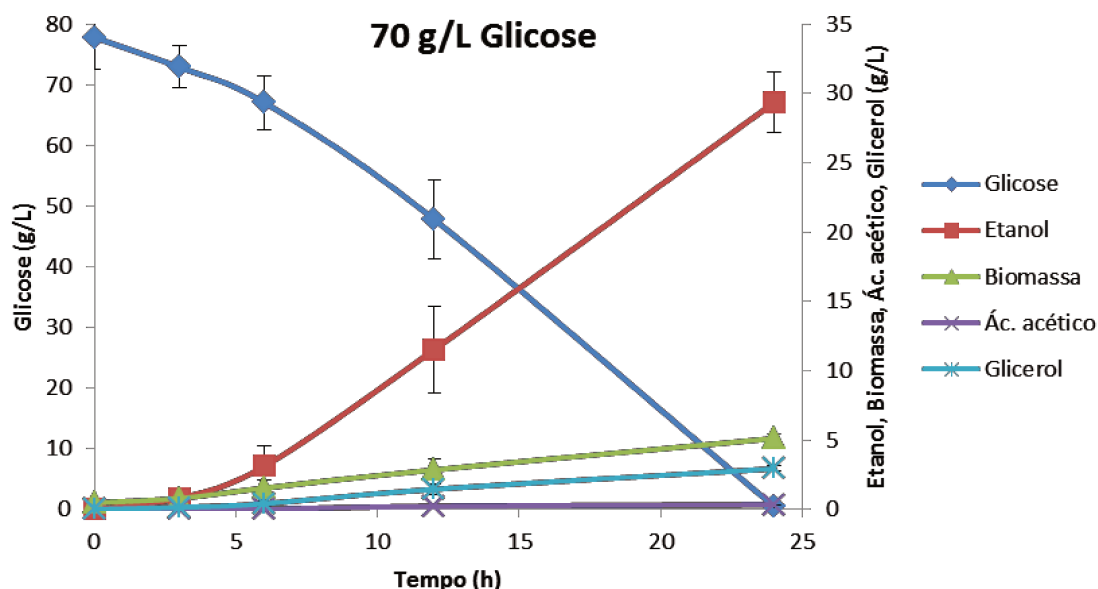


Figura 19. Médias e desvios padrão das concentrações de glicose, etanol, biomassa, glicerol e ácido acético ao longo de 24 h das fermentações em triplicata biológica de PE-2 274 em meio 70 g/L de glicose.

Na fermentação em meio 70 g/L de xilose (Figura 20), PE-2 274 mostrou-se consumir esse açúcar muito lentamente quando comparado com o consumo da glicose (Figura 19). Ao final das 72 h de fermentação, iniciada com 0,38 g/L de células (massa seca), foram consumidos apenas 16,04 g/L de xilose e produzidos 1,13 g/L de etanol, 0,51 g/L de xilitol, 2,08 g/L de glicerol e 3,21 g/L de biomassa. Com relação aos parâmetros calculados, o rendimento de xilose a etanol foi de 20,03%, a produtividade volumétrica de 0,09 g.L⁻¹.h, e a produtividade específica de 0,02 g etanol.g célula⁻¹.h. Analisando esses resultados, foi verificado que quando a xilose é a fonte exclusiva de energia da levedura a velocidade de consumo desse carboidrato é muito lenta. Provavelmente isto esteja ocorrendo devido ao transporte ineficiente de xilose observado em *S. cerevisiae* (MATSUSHIKA et al., 2009b) que impacta em uma baixa produtividade em etanol, ou seja, em meio contendo apenas xilose a fermentação utilizando PE-2 274 mostrou ser bastante ineficiente.

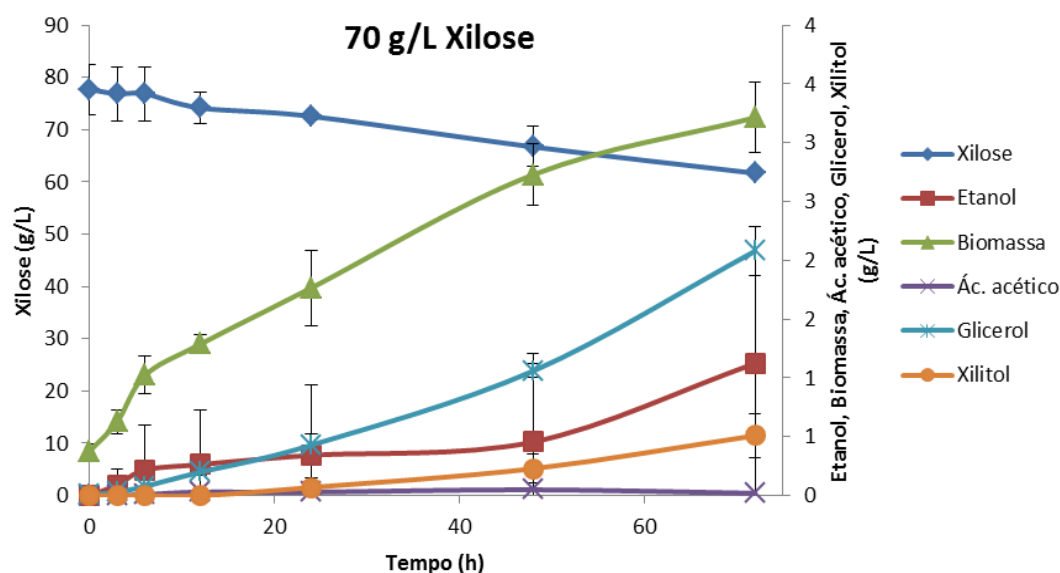


Figura 20. Médias e desvios padrão das concentrações de xilose, etanol, biomassa, glicerol e ácido acético ao longo de 72 h das fermentações em triplicata biológica de PE-2 274 em meio 70 g/L de xilose.

No entanto, quando a fermentação ocorre em meio que além de conter xilose também é adicionada glicose, 30 g/L xilose e 70 g/L glicose (Figura 21), nota-se uma melhora considerável dos parâmetros globais. A escolha de se realizar a fermentação em meio contendo 30 g/L xilose e 70 g/L glicose surgiu pelo fato da hidrólise da biomassa lignocelulósica resultar em diferentes razões de glicose/xilose dependendo do tipo de substrato, do pré-tratamento e se as correntes do processo são separadas após o pré-tratamento (AGBOGBO et al., 2006). Como o bagaço é composto por cerca de 40% de celulose e 30% de hemicelulose, provavelmente no hidrolisado desse material irá conter mais glicose do que xilose, com isso, a fermentação 30 g/L xilose e 70 g/L glicose foi feita com o intuito de tentar simular a fermentação do hidrolisado lignocelulósico proveniente de bagaço de cana-de-açúcar.

Dessa forma, a fermentação em meio 30 g/L xilose e 70 g/L glicose foi iniciada com 0,59 g/L (massa seca) de levedura e a produção máxima de etanol ocorreu em 48 horas, gerando 30,63 g/L de etanol, 3,16 g/L de xilitol, 3,69 g/L de glicerol, 1,10 g/L de ácido acético e 6,81 g/L de massa seca. Quanto aos parâmetros, foram obtidos 67,69% de rendimento de açúcar total a etanol, produtividade volumétrica de 0,84 g.L⁻¹.h e produtividade específica de 0,28 g etanol.g célula⁻¹.h.

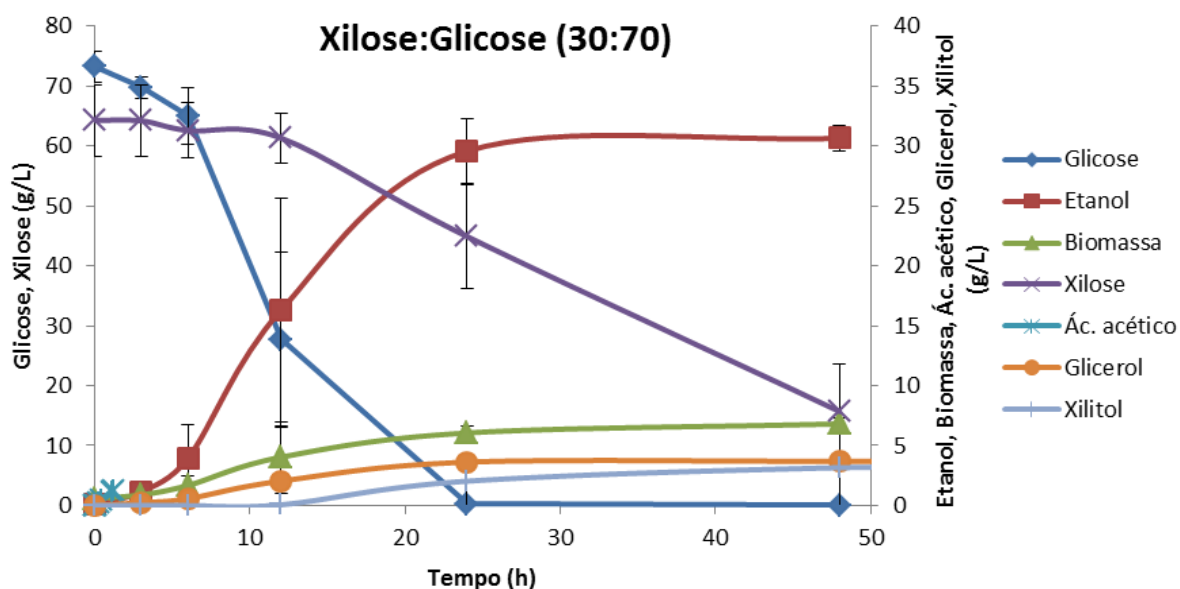


Figura 21. Médias e desvios padrão das concentrações de glicose, xilose, biomassa, etanol, glicerol, ácido acético e xilitol ao longo de 48 h das fermentações em triplicata biológica de PE-2 274 em meio 30 g/L xilose e 70 g/L glicose.

Nesta fermentação foi possível observar que a xilose foi consumida muito lentamente pela levedura enquanto a glicose estava sendo consumida. Somente a partir de 12 h de fermentação a xilose passou a ser consumida mais rapidamente praticamente de forma linear. Provavelmente, esse comportamento ocorreu em decorrência do fenômeno da “repressão por glicose” que impede a entrada ou o catabolismo de açúcares não-glicose enquanto a glicose esta presente no meio de cultura (BICHO et al., 1988; GANCEDO; GANCEDO, 1986). Uma das hipóteses para esse fenômeno é que possivelmente a glicose esteja competindo com a xilose durante o transporte de açúcares, já que a xilose é conduzida para dentro da célula por transportadores que tem maior afinidade por glicose (KIM et al., 2012). Como a utilização preferencial da glicose sobre outros açúcares reflete no aumento do tempo da fermentação, têm-se como consequência baixos valores de rendimento e, principalmente, de produtividade volumétrica, sendo este um dos principais gargalos da produção economicamente viável do etanol de segunda geração (KIM et al., 2012).

Apesar disso, foi observado que a produção de etanol, o rendimento de açúcar total em etanol, produtividade volumétrica e produtividade específica foram muito semelhantes ao da fermentação contendo exclusivamente 70 g/L glicose. E como evidência de que a conversão de xilose a etanol de fato ocorreu, observou-se que como na fermentação em 70 g/L de glicose o etanol foi totalmente consumido em 24 h e após este período o etanol passou a ser oxidado para

gerar energia para levedura, visto que a concentração de etanol passou de 29,36 g/L em 24 h para 23,83 g/L em 48 horas, ou seja, foram oxidados 5,53 g/L de etanol. Já na fermentação 30 g/L xilose e 70 g/L de glicose, após a glicose ser exaurida do meio em 24 h, a produção de etanol continuou ocorrendo a partir da xilose, pois a concentração de etanol passou de 29,57 g/L, em 24 h, para 30,63 g/L em 48 h. Aplicando o teste de Tukey, foi verificado que a diferença entre as concentrações de etanol das fermentações 70 g/L de glicose e 30 g/L xilose e 70 g/L de glicose produzido em 48 horas é estatisticamente significativa (Tabela 17).

Tabela 17. Médias do etanol produzido em 24 horas e em 48 horas de fermentação, rendimentos de açúcar total em etanol (η_E), produtividades volumétricas em etanol (P_V) e seus respectivos desvios padrão, das fermentações de PE-2 274. A análise estatística foi realizada aplicando o teste de Tukey.

| Fermentações | Etanol 24 h (g/L) | Etanol 48 h (g/L) | η_E (%) | P_V (g.L ⁻¹ .h) |
|--------------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|------------------------------|
| 70 g/L glicose | 29,36 ± 2,153 ^a | 23,83 ± 1,440 ^b | 59,44 ± 9,909 ^a | 0,74 ± 0,1242 ^a |
| 30 g/L xilose e 70 g/L glicose | 29,57 ± 2,667 ^a | 30,63 ± 1,112 ^a | 67,69 ± 4,668 ^a | 0,84 ± 0,2417 ^a |

^{a, b} Médias com letras diferentes apresentaram diferença significativa com $p > 0,05$.

Já a fermentação contendo xilose, glicose e também sacarose (Figura 22), esta foi realizada com o intuito de simular a produção integrada de etanol de primeira e segunda geração, que seria a junção dos açúcares provenientes da tecnologia de primeira geração, no caso a sacarose do caldo da cana-de-açúcar, com a vertente de açúcares do hidrolisado lignocelulósico que contem majoritariamente glicose e xilose. Esta fermentação foi iniciada com 0,83 g/L de células (massa seca) e gerados 31,52 g/L de etanol, 1,80 g/L de xilitol, 0,27 g/L de glicerol, 0,34 g/L de ácido acético e 6,13 g/L de biomassa, com rendimento de 54,46%, produtividade volumétrica de 0,81 g.L⁻¹.h e produtividade específica de 0,23 g etanol.g célula⁻¹.h (Tabela 18). Nesta fermentação também foi observado o fenômeno do “efeito glicose”, no qual durante as primeiras 12 h de fermentação a xilose praticamente não foi consumida provavelmente devido à preferência dos transportadores de membrana pela glicose. Apesar disso, o aumento da concentração da glicose no meio devido à adição da sacarose que rapidamente se desdobra em glicose e frutose, foram obtidos parâmetros com valores bastante satisfatórios quando comparados com os obtidos na fermentação controle positivo (70 g/L glicose).

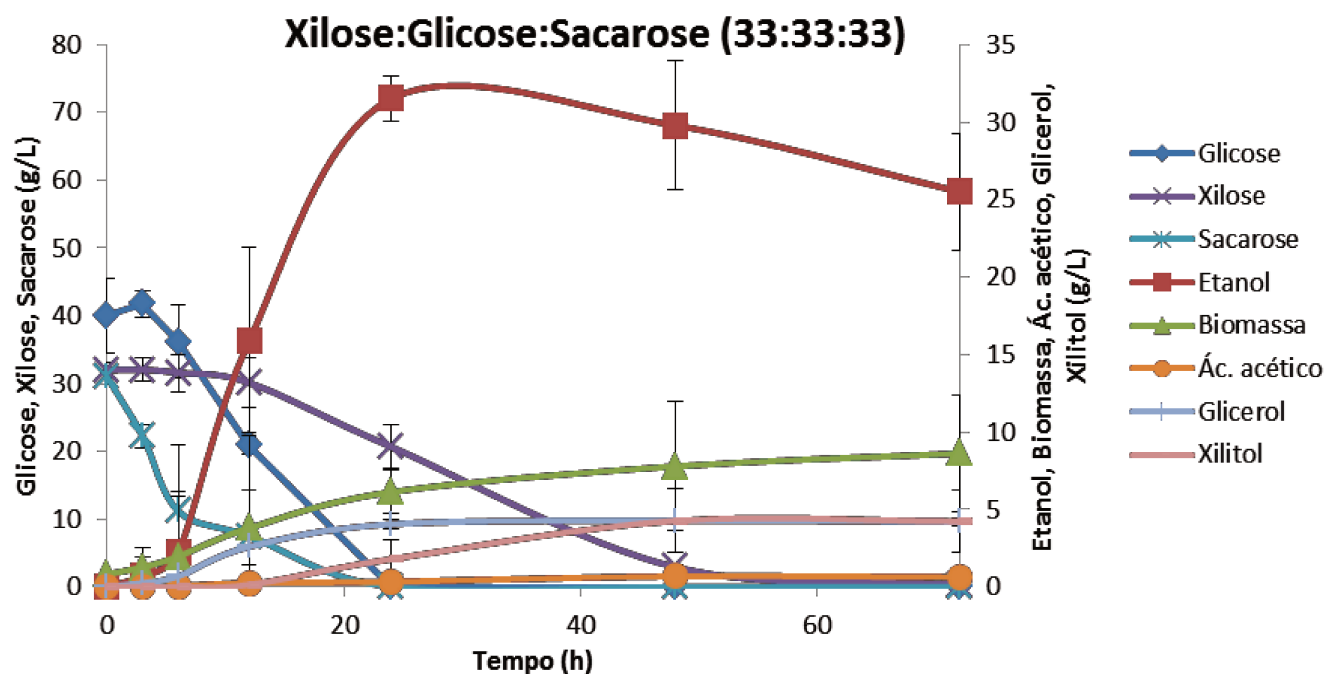


Figura 22. Médias e desvios padrão das concentrações de glicose, xilose, sacarose, biomassa, etanol, glicerol, ácido acético e xilitol ao longo de 48 h das fermentações em triplicata biológica de PE-2 274 em meio 33 g/L xilose, 33 g/L glicose e 33 g/L sacarose.

Dessa forma, devido ao resultado satisfatório da fermentação em meio 30 g/L xilose e 70 g/L glicose, resolvemos avaliar o potencial de PE-2 274 através da comparação com os resultados obtidos por Zhang et al. (2010) e por Matsushika et al. (2009a) (Tabela 18). Zhang et al. (2010) desenvolveram a cepa NAN-127, através da integração dos genes que codificam *PsXR*, *PsXDH* e *ScXK* em uma cepa industrial diploide e prototrofa. A fermentação com NAN-127 foi realizada em meio 80 g/L glicose e 20 g/L xilose enriquecido com 10 g/L de extrato de levedura e peptona, em biorreator de 5 L contendo 3 L de meio. NAN-127 produziu 30,97 g/L de etanol com um rendimento de 72,62%. Já a cepa MA-R4, desenvolvida por Matsushika et al. (2009a), foi obtida através da transformação do plasmídio pAUR-XKXDHXR na cepa industrial flocculante com a marca auxotrófica de deleção do gene *AURI*. A fermentação com esta cepa foi realizada em *erlenmeyers* de 50 mL contendo 20 mL de meio 45 g/L xilose e 45 g/L glicose enriquecido com 10 g/L de extrato de levedura e 20 g/L de peptona, sob a agitação de 100 rpm. A fermentação foi iniciada com 2,8 g/L (massa seca) e foram produzidos 37,1 g/L de etanol com 82,4% de rendimento.

Tabela 18. Etanol produzido, rendimento (η_E), fator de conversão de xilose a xilitol ($Y_{\text{xilitol/xilose}}$) e fatores de conversão de ART em etanol ($Y_{E/ART}$), glicerol ($Y_{\text{glicerol/ART}}$) e ácido acético ($Y_{\text{ác. acético/ART}}$) das fermentações de PE-2 274, NAN-127 e MA-R4.

| | Etanol (g/L) | $Y_{E/ART}$ | η_E (%) | $Y_{\text{xilitol/xilose}}$ | $Y_{\text{glicerol/ART}}$ | $Y_{\text{ác. acético/ART}}$ | Referência |
|-----------------|-------------------------|-------------------------------|--------------------------------|---|---|--|------------------------------|
| PE-2 274 | 30,63 | 0,346 | 67,69 | 0,13 | 0,011 | 0,038 | Este trabalho |
| NAN-127 | 30,97 | 0,366 | 72,62 | 0,48 | 0,044 | 0,009 | Zhang et al.(2010) |
| MA-R4 | 37,1 | 0,42 | 82,4 | 0,08 | - | - | Matsushika et al. (2009a) |

Apesar das diferenças experimentais, observamos que embora PE-2 274 tenha sido cultivada em meio com menos nutrientes que os de NAN-127 e de MA-R4, PE-2 274 apresentou parâmetros muito semelhantes à NAN-127, no entanto inferiores aos obtidos para MA-R4. Entretanto, visto que simples modificações genéticas realizadas em *S. cerevisiae* PE-2 possibilitaram a obtenção de uma cepa que, em meio 30 g/L xilose e 70 g/L glicose, exibiu 67,69% de rendimento de açúcares totais à etanol em comparação com o fator de conversão teórico e também com parâmetros semelhantes ao de uma cepa industrial recombinante retratada na literatura, consideramos PE-2 274 uma cepa bastante promissora. Dessa forma, muitos avanços podem ser alcançados com esta cepa principalmente com a integração do plasmídeo pRH 274 no genoma de *S. cerevisiae* PE-2 selvagem e também com outras modificações em seu genótipo, como por exemplo, estratégias relacionadas à melhora do transporte de xilose e modificação do balanço redox intracelular, para então realizar fermentações em meios complexos, como o hidrolisado lignocelulósico, com a finalidade de desenvolver uma levedura competitiva industrialmente.

6 CONCLUSÃO

O presente trabalho realizou a identificação de micro-organismos isolados a partir do trato intestinal das larvas de insetos parasitas da cana-de-açúcar e também de dornas de fermentação alcoólica, fontes as quais se revelaram como nichos de extremo potencial para a obtenção de leveduras capazes de assimilar naturalmente xilose. Dentre os micro-organismo identificados duas leveduras de vasto potencial biotecnológico, *R. mucilaginosa* UC11 e *O. polymorpha* FT212L, foram escolhidas para estudos mais aprofundados. Através de ensaios de curvas de crescimento em xilose foi possível verificar que elas são capazes de utilizar esse açúcar para a formação de biomassa, comportamento que não ocorre em *S. cerevisiae*. Estas leveduras também foram caracterizadas quanto à atividade das enzimas da via da redução/oxidação do metabolismo da xilose, XR e XDH, e também quanto à expressão dos genes *xyl1* e *xyl2* que codificam essas enzimas, respectivamente. No entanto após a expressão heteróloga das enzimas de *R. mucilaginosa* UC11 e *O. polymorpha* FT212L na cepa industrial *S. cerevisiae* PE-2 diploide com um dos alelos do gene *xks1* (que codifica a enzima XK) superexpresso, verificou-se que, inesperadamente, as cepas recombinantes, PE-2 Rm, PE-2 Op 1 e PE-2 Op 2, não foram capazes de utilizar xilose para crescimento. Algumas razões podem explicar tal comportamento, uma delas é a baixa atividade das enzimas XR e XDH quando comparado com as atividades das mesmas de *S. stipitis*, e também a superexpressão parcial do *xks1* que pode não ter sido suficiente para promover o metabolismo da xilulose na via pentose fosfato. No entanto, a cepa recombinante PE-2 274 obtida neste trabalho através da transformação do plasmídio pRH 274, que contém os genes *xyl1* e *xyl2* de *S. stipitis* e *xks1* de *S. cerevisiae* em PE-2, uma cepa industrial, foi capaz de crescer em xilose e apresentou atividades de XR satisfatória e de XDH superior a atividade endógena de *S. stipitis*. Após fermentações realizadas em biorreator com controle de oxigênio dissolvido, verificou-se que essa cepa é capaz de co-fermentar xilose e glicose a etanol quando a glicose é adicionada em maiores concentrações no meio, condição na qual essa levedura mostrou ser competitiva com cepas recombinantes reportadas na literatura. Dessa forma, as perspectivas para PE-2 274 são a integração do plasmídio pRH 274 no genoma de *S. cerevisiae* PE-2 selvagem, novas modificações genéticas relacionadas ao metabolismo da xilose, e a realização de fermentações em meios complexos, como o hidrolisado lignocelulósico, com o

intuito de avaliar o seu potencial em ambiente industrial visando a produção do etanol de segunda geração.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADSUL, M. G. et al. Development of biocatalysts for production of commodity chemicals from lignocellulosic biomass. **Bioresource technology**, v. 102, n. 6, p. 4304-4312, 2011.
- AGARWAL, A. K. Biofuels (alcohols and biodiesel) applications as fuels for internal combustion engines. **Progress in energy and combustion science**, v.33, n. 3, p. 233-271, 2007.
- AGBOGBO, F. K. et al. Fermentation of glucose/xylose mixtures using *Pichia stipitis*. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 11, p. 2333-2336, 2006.
- AKSU, Z.; EREN, A. T. Carotenoids production by the yeast *Rhodotorula mucilaginosa*: Use of agricultural wastes as a carbon source. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 9, p. 2985-2991, 2005.
- ALBERTS E.; OLSSON L.; KOPPRAM R. **New *saccharomyces cerevisiae* strains**. EP Patent Application 20110841824, 15 nov. 2011.
- ALVES, D. M. G. **Fatores que afetam a formação de ácidos orgânicos bem como outros parâmetros da fermentação alcoólica**. 1994. 251 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1994.
- ALVIRA, P. et al. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: a review. **Bioresource Technology**, v.101, n.13, p.4851-4861, 2010.
- AMORE, R. et al. Cloning and expression in *Saccharomyces cerevisiae* of the NAD (P) H-dependent xylose reductase-encoding gene *XYL1* from the xylose-assimilating yeast *Pichia stipitis*. **Gene**, v. 109, n. 1, p. 89-97, 1991.
- AMORIM, H.V. et al. Scientific challenges of bioethanol production in Brazil. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 91, n. 5, p. 1267-1275, 2011.
- ARGUESO, J. L. et al. Genome structure of a *Saccharomyces cerevisiae* strain widely used in bioethanol production. **Genome research**, v. 19, n. 12, p. 2258-2270, 2009.
- ASADUZZAMAN, Md. **Standardization of Yeast Growth Curves from Several Curves with Different Initial Sizes**. 2007. 57 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciência, Chalmers University Of Technology e Goteborg University, Suíça, 2007.
- BABEL, W. et al. Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology. **Tissue Engineering**, v. 104, 2007.
- BASÍLIO, A. C. M. et al. Detection and identification of wild yeast contaminants of the industrial fuel ethanol fermentation process. **Current microbiology**, v. 56, n. 4, p. 322-326, 2008.

BASSO, Luiz C. et al. Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil. **FEMS yeast research**, v.8, n.7, p.1155-1163, 2008.

BASSO, T. O. et al. Insufficient uracil supply in fully aerobic chemostat cultures of *Saccharomyces cerevisiae* leads to respiro-fermentative metabolism and double nutrient-limitation. **Biotechnology letters**, v. 32, n. 7, p. 973-977, 2010.

BASSO, L. C.; BASSO, T. O.; ROCHA, S. N. Ethanol production in Brazil: the industrial process and its impact on yeast fermentation. **Biofuel production—recent developments and prospects. InTech, Rijeka**, p. 85-100, 2011.

BATEMAN, A. et al. The Pfam protein families database. **Nucleic acids research**, v. 32, n. suppl 1, p. D138-D141, 2004.

BETTIGA, M. et al. Comparing the xylose reductase/xylitol dehydrogenase and xylose isomerase pathways in arabinose and xylose fermenting *Saccharomyces cerevisiae* strains. **Biotechnology for biofuels**, v. 1, n. 1, p. 16, 2008.

BENGTSSON, O. et al. Xylose reductase from *Pichia stipitis* with altered coenzyme preference improves ethanolic xylose fermentation by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnol Biofuels**, v. 2, n. 9, p. 122, 2009.

BENGTSSON-PALME, J. et al. Improved software detection and extraction of ITS1 and ITS2 from ribosomal ITS sequences of fungi and other eukaryotes for analysis of environmental sequencing data. **Methods in Ecology and Evolution**, v. 4, n. 10, p. 914-919, 2013.

BICHO, P. A. et al. Induction of xylose reductase and xylitol dehydrogenase activities in *Pachysolen tannophilus* and *Pichia stipitis* on mixed sugars. **Applied and environmental microbiology**, v. 54, n. 1, p. 50-54, 1988.

BISWAS, D. et al. Cloning and characterization of thermotolerant xylitol dehydrogenases from yeast *Pichia angusta*. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 88, n. 6, p. 1311-1320, 2010.

BOLES E. et al. **Arabinose- and xylose-fermenting *saccharomyces cerevisiae* strains**. WO Patent Application PCT/SE2006/000325, 13 mar. 2006.

BRADFORD, M. Photometric methods for protein determination. Procedures and materials. **Anal. Biochem**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BROWN, N. A. et al. Transcriptional profiling of Brazilian *Saccharomyces cerevisiae* strains selected for semi-continuous fermentation of sugarcane must. **FEMS yeast research**, v. 13, n. 3, p. 277-290, 2013.

BRUINENBERG, P. M. et al. NADH-linked aldose reductase: the key to anaerobic alcoholic fermentation of xylose by yeasts. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 19, n. 4, p. 256-260, 1984.

BUCKERIDGE, M. S. et al. Ethanol from sugarcane in Brazil: a 'midway' strategy for increasing ethanol production while maximizing environmental benefits. **GCB Bioenergy**, v. 4, n. 2, p. 119-126, 2012.

BURA, R.; VAJZOVIC, A.; DOTY, S. L. Novel endophytic yeast *Rhodotorula mucilaginosa* strain PTD3 I: production of xylitol and ethanol. **Journal of industrial microbiology & biotechnology**, v. 39, n. 7, p. 1003-1011, 2012.

CABRINI, K. T.; GALLO, C. R. Identificação de leveduras no processo de fermentação alcoólica em usina do estado de São Paulo, Brasil. **Sci. agric.**, v. 56, n. 1, 1999.

CADETE, R. M. et al. Diversity and physiological characterization of D-xylose-fermenting yeasts isolated from the Brazilian amazonian forest. **PloS one**, v. 7, n. 8, p. e43135, 2012.

CHANDEL, A. K.; DA SILVA, S. S.; SINGH, O. V. Detoxification of lignocellulose hydrolysates: biochemical and metabolic engineering toward white biotechnology. **BioEnergy Research**, v. 6, n. 1, p. 388-401, 2013.

CHO, A. Constructing Phylogenetic Trees Using Maximum Likelihood. 2012.

CHRISTIANSON, T. W. et al. Multifunctional yeast high-copy-number shuttle vectors. **Gene**, v. 110, n. 1, p. 119-122, 1992.

CHU, B. C. H.; LEE, H. Genetic improvement of *Saccharomyces cerevisiae* for xylose fermentation. **Biotechnology advances**, v. 25, n. 5, p. 425-441, 2007.

CHUM, H. L. et al. A comparison of commercial ethanol production systems from Brazilian sugarcane and US corn. **Biofuels**, Bioproducts and Biorefining, 2013.

DIAS, M. O. S. et al. Second generation ethanol in Brazil: Can it compete with electricity production?. **Bioresource technology**, v.102, n.19, p.8964-8971, 2011.

DIAS, M. O. S et al. Integrated versus stand-alone second generation ethanol production from sugarcane bagasse and trash. **Bioresource technology**, v. 103, n. 1, p. 152-161, 2012.

DHENIN, M. P. P.. O conceito de segurança energética e o Brasil do Pré-sal: interpretações a partir das análises de Barry Buzan e Ole Waever. In: II SIMPÓSIO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RELAÇÕES INTERNACIONAIS DOPROGRAMA "SAN TIAGO DANTAS" (UNESP, UNICAMP E PUC/SP), 2., 2009, São Paulo. **Anais**. São Paulo: 2009. p. 1 - 15. Disponível em: <http://www.academia.edu/923215/O_conceito_de_seguranca_energetica_e_o_Brasil_do_Pre-sal_interpretacoes_a_partir_das_analises_de_Barry_Buzan_e_Ole_Waever>. Acesso em: 31 jan. 2014.

DMYTRUK, O. et al. Engineering of xylose reductase and overexpression of xylitol dehydrogenase and xylulokinase improves xylose alcoholic fermentation in the thermotolerant yeast *Hansenula polymorpha*. **Microbial Cell Factories**, v. 7, n. 1, p. 21, 2008a.

DMYTRUK, O. V. et al. Overexpression of bacterial xylose isomerase and yeast host xylulokinase improves xylose alcoholic fermentation in the thermotolerant yeast *Hansenula polymorpha*. **FEMS yeast research**, v. 8, n. 1, p. 165-173, 2008b.

DMYTRUK, K. V.; SIBIRNY, A. A. Metabolic engineering of the yeast *Hansenula polymorpha* for the construction of efficient ethanol producers. **Cytology and Genetics**, v. 47, n. 6, p. 329-342, 2013.

DORTA, C. et al. Synergism among lactic acid, sulfite, pH and ethanol in alcoholic fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* (PE-2 and M-26). **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.22, n.2, p.177-182, 2006.

DUKES, J. S. Burning buried sunshine: human consumption of ancient solar energy. **Climatic Change**, v.61, n. 1-2, p. 31-44, 2003.

EFRON, B.; HALLORAN, E.; HOLMES, S. Bootstrap confidence levels for phylogenetic trees. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 93, n. 23, p. 13429-13429, 1996.

ELIASSON, A. et al. Anaerobic Xylose Fermentation by Recombinant *Saccharomyces cerevisiae* Carrying *XYL1*, *XYL2*, and *XKS1* in Mineral Medium Chemostat Cultures. **Applied and environmental microbiology**, v. 66, n. 8, p. 3381-3386, 2000.

ERIKSEN, D. T.; LIAN, J.; ZHAO, H. Protein design for pathway engineering. **Journal of structural biology**, v. 185, n. 2, p. 234-242, 2014.

EWING, B. et al. Base-calling of automated sequencer traces using Phred. I. Accuracy assessment. **Genome research**, v. 8, n. 3, p. 175-185, 1998.

FELL, J. W. et al. Biodiversity and systematics of basidiomycetous yeasts as determined by large-subunit rDNA D1/D2 domain sequence analysis. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 50, n. 3, p. 1351-1371, 2000.

FREER, S. N.; SKORY, C. D.; BOTHAST, R. J. D-Xylose metabolism in *Rhodospiridium toruloides*. **Biotechnology letters**, v. 19, n. 11, p. 1119-1122, 1997.

FUJITOMI, K. et al. Deletion of the PHO13 gene in *Saccharomyces cerevisiae* improves ethanol production from lignocellulosic hydrolysate in the presence of acetic and formic acids, and furfural. **Bioresource technology**, v. 111, p. 161-166, 2012.

FURLAN, F. F. et al. Bioelectricity versus bioethanol from sugarcane bagasse: is it worth being flexible?. **Biotechnology for biofuels**, v. 6, n. 1, p. 142, 2013.

GACHON, C.; MINGAM, A.; CHARRIER, B.. Real-time PCR: what relevance to plant studies?. **Journal of Experimental Botany**, v. 55, n. 402, p. 1445-1454, 2004.

GATIGNOL, A.; DASSAIN, M.; TIRABY, G.. Cloning of *Saccharomyces cerevisiae* promoters using a probe vector based on phleomycin resistance. **Gene**, v. 91, n. 1, p. 35-41, 1990.

GANCEDO, J. M.; GANCEDO, C. Catabolite repression mutants of yeast 1. **FEMS microbiology letters**, v. 32, n. 3-4, p. 179-187, 1986.

GELLISSEN, G. (Ed.). *Hansenula polymorpha*. Wiley VCH, 2002.

GIETZ, D. et al. Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells. **Nucleic acids research**, v. 20, n. 6, p. 1425, 1992.

GNANSOUNOU, E.; DAURIAT, A. Techno-economic analysis of lignocellulosic ethanol: A review. **Bioresource technology**, v.101, n.13, p.4980-4991, 2010.

GOLDEMBERG, J.; COELHO, S. T.; GUARDABASSI, P. The sustainability of ethanol production from sugarcane. **Energy Policy**, v. 36, n. 6, p. 2086-2097, 2008.

GOLDEMBERG, J.; GUARDABASSI, P. The potential for first generation ethanol production from sugarcane. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v.4, n.1, p.17-24, 2010.

GORWA-GRAUSLUND, M. F.; KARHUMAA, K. **Mutant *saccharomyces cerevisiae* strain utilizing xylose for ethanol production**. U.S. Patent Application 11/557,363, 7 nov. 2006.

GHOSH, A.; ZHAO, H.; PRICE, N. D. Genome-scale consequences of cofactor balancing in engineered pentose utilization pathways in *Saccharomyces cerevisiae*. **PLoS One**, v. 6, n. 11, p. e27316, 2011.

HAHN-HÄGERDAL, B.; PAMMENT, N.. Special Session A Microbial pentose metabolism. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 116, n. 1, p. 1207-1209, 2004.

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

HAHN-HÄGERDAL, B. et al. Metabolic engineering for pentose utilization in *Saccharomyces cerevisiae*. In: **Biofuels**. Springer Berlin Heidelberg, p. 147-177. 2007a

HAHN-HÄGERDAL, B. et al. Towards industrial pentose-fermenting yeast strains. **Applied microbiology and biotechnology**, v.74, n.5, p.937-953, 2007b.

HARHANGI, H. R. et al. Xylose metabolism in the anaerobic fungus *Piromyces* sp. strain E2 follows the bacterial pathway. **Archives of microbiology**, v. 180, n. 2, p. 134-141, 2003.

HASUNUMA, T. et al. Co-expression of *TAL1* and *ADH1* in recombinant xylose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae* improves ethanol production from lignocellulosic hydrolysates in the presence of furfural. *Journal of bioscience and bioengineering*, v. 117, n. 2, p. 165-169, 2014.

HECTOR, R. E. et al. *Saccharomyces cerevisiae* engineered for xylose metabolism requires gluconeogenesis and the oxidative branch of the pentose phosphate pathway for aerobic xylose assimilation. *Yeast*, v. 28, n. 9, p. 645-660, 2011.

HECTOR, R. E. et al. Engineering industrial *Saccharomyces cerevisiae* strains for xylose fermentation and comparison for switchgrass conversion. **Journal of industrial microbiology & biotechnology**, v. 38, n. 9, p. 1193-1202, 2011b.

HO, N.W.Y.; CHEN, Z.; BRAINARD, A. P. Genetically engineered *Saccharomyces* Yeast capable of effective cofermentation of Glucose and Xylose. **Applied and environmental microbiology**, v.64, n.5, p.1852-1859, 1998.

HUGGETT, J.; BUSTIN, S. A. Standardisation and reporting for nucleic acid quantification. **Accreditation and quality assurance**, v. 16, n. 8-9, p. 399-405, 2011.

JAGGER, A. The fluctuating fortunes of Brazilian ethanol. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v.7, n.2, p.103-105, 2013.

JEFFRIES, T. W.; KURTZMAN, C. P. Strain selection, taxonomy, and genetics of xylose-fermenting yeasts. **Enzyme and microbial technology**, v. 16, n. 11, p. 922-932, 1994.

JEFFRIES, T. W. et al. Genome sequence of the lignocellulose-bioconverting and xylose-fermenting yeast *Pichia stipitis*. **Nature biotechnology**, v. 25, n. 3, p. 319-326, 2007.

JEPPSSON, M. et al. Reduced oxidative pentose phosphate pathway flux in recombinant xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae* strains improves the ethanol yield from xylose. *Applied and environmental microbiology*, v. 68, n. 4, p. 1604-1609, 2002.

JÖNSSON, L. J. et al. Bioconversion of lignocellulose: inhibitors and detoxification. **Biotechnol Biofuels**, v. 6, p. 16, 2013.

KARHUMAA, K. et al. Comparison of the xylose reductase-xylitol dehydrogenase and the xylose isomerase pathways for xylose fermentation by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbial Cell Factories**, v. 6, n. 1, p. 5, 2007.

KARHUMAA, K. et al. High activity of xylose reductase and xylitol dehydrogenase improves xylose fermentation by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 73, n. 5, p. 1039-1046, 2007.

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

KIM, S. R. et al. Simultaneous co-fermentation of mixed sugars: a promising strategy for producing cellulosic ethanol. **Trends in biotechnology**, v. 30, n. 5, p. 274-282, 2012.

KIM, S. R. et al. Strain engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for enhanced xylose metabolism. **Biotechnology Advances**, v.31, n.6, p. 851-861, 2013a.

KIM, O. C. et al. Transcriptome analysis of xylose metabolism in the thermotolerant methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha*. **Bioprocess and biosystems engineering**, p. 1-10, 2013b.

KÖTTER, P. et al. Isolation and characterization of the *Pichia stipitis* xylitol dehydrogenase gene, XYL2, and construction of a xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae* transformant. **Current genetics**, v. 18, n. 6, p. 493-500, 1990.

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

KOZERA, B.; RAPACZ, M. Reference genes in real-time PCR. **Journal of applied genetics**, v. 54, n. 4, p. 391-406, 2013.

KRAHULEC, S. et al. Fermentation of mixed glucose-xylose substrates by engineered strains of *Saccharomyces cerevisiae*: role of the coenzyme specificity of xylose reductase, and effect of glucose on xylose utilization. **Microbial cell factories**, v. 9, n. 1, p. 16, 2010.

KÜCK, P.; MEUSEMANN, K. FASconCAT: Convenient handling of data matrices. **Molecular phylogenetics and evolution**, v. 56, n. 3, p. 1115-1118, 2010.

KUNZE, G.; KANG, H. A.; GELLISSEN, G. *Hansenula polymorpha* (*Pichia angusta*): biology and applications. In: **Yeast Biotechnology: Diversity and Applications**. Springer Netherlands, 2009. p. 47-64.

KUYPER, M. et al. High-level functional expression of a fungal xylose isomerase: the key to efficient ethanolic fermentation of xylose by *Saccharomyces cerevisiae*?. **FEMS yeast research**, v. 4, n. 1, p. 69-78, 2003.

KUYPER, M. et al. Metabolic engineering of a xylose isomerase expressing *Saccharomyces cerevisiae* strain for rapid anaerobic xylose fermentation. **FEMS yeast research**, v. 5, n. 4 - 5, p. 399-409, 2005.

LAI, M. T.; LIU, D. Y. T.; HSEU, T. H. Cell growth restoration and high level protein expression by the promoter of hexose transporter, HXT7, from *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology letters**, v. 29, n. 8, p. 1287-1292, 2007.

LARSON, E. D. A review of life-cycle analysis studies on liquid biofuel systems for the transport sector. **Energy for Sustainable Development**, v. 10, n. 2, p. 109-126, 2006.

LEE, H. et al. Some properties of extracellular acetylxyloxyesterase produced by the yeast *Rhodotorula mucilaginosa*. **Applied and environmental microbiology**, v. 53, n. 12, p. 2831-2834, 1987.

LEE, T. Y. et al. A parametric study on ethanol production from xylose by *Pichia stipitis*. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 5, n. 1, p. 27-31, 2000.

LI, M. et al. Single cell oil production from hydrolysate of cassava starch by marine-derived yeast *Rhodotorula mucilaginosa* TJY15a. **Biomass and Bioenergy**, v. 34, n. 1, p. 101-107, 2010.

LIBKIND, D. et al. Studies on the heterogeneity of the carotenogenic yeast *Rhodotorula mucilaginosa* from Patagonia, Argentina. **Journal of basic microbiology**, v. 48, n. 2, p. 93-98, 2008.

LIMA, L. H. A. et al. Xylitol dehydrogenase from *Candida tropicalis*: molecular cloning of the gene and structural analysis of the protein. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 73, n. 3, p. 631-639, 2006.

LIMA, A. M. Estudos recentes e perspectivas da viabilidade técnico-econômica da produção de etanol lignocelulósico 1. ed. Brasília: Embrapa Agroenergia 2011. Disponível em: < <http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/890268/1/CITE05.pdf> >. Acesso em: 19 jan 2014.

LIMAYEM, A.; RICKE, S. C. Lignocellulosic biomass for bioethanol production: current perspectives, potential issues and future prospects. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 38, n. 4, p. 449-467, 2012.

LU, C.; JEFFRIES, T. Shuffling of promoters for multiple genes to optimize xylose fermentation in an engineered *Saccharomyces cerevisiae* strain. **Applied and environmental microbiology**, v. 73, n. 19, p. 6072-6077, 2007.

MACHADO, L.A.; HABIB, M.; *Migdolus fryanus* em cana-de-açúcar: Manejo e Desafios. In: REUNIÃO ITINERANTE DE FITOSSANIDADE DO INSTITUTO BIOLÓGICO, 5., 2001, Sertãozinho. Anais. Sertãozinho, 2001. p.48-57.

MACRELLI, Stefano et al. Techno-economic evaluation of 2nd generation bioethanol production from sugar cane bagasse and leaves integrated with the sugar-based ethanol process. **Biotechnol Biofuels**, v. 5, p. 22, 2012.

MADHAVAN, A. et al. Alcoholic fermentation of xylose and mixed sugars using recombinant *Saccharomyces cerevisiae* engineered for xylose utilization. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 82, n. 6, p. 1037-1047, 2009.

MADHAVAN, A. et al. Xylose isomerase from polycentric fungus *Orpinomyces*: gene sequencing, cloning, and expression in *Saccharomyces cerevisiae* for bioconversion of xylose to ethanol. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 82, n. 6, p. 1067-1078, 2009b.

MATSUSHIKA, Akinori et al. Bioethanol production performance of five recombinant strains of laboratory and industrial xylose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae*. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 8, p. 2392-2398, 2009a.

MATSUSHIKA, A. et al. Ethanol production from xylose in engineered *Saccharomyces cerevisiae* strains: current state and perspectives. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 84, n. 1, p. 37-53, 2009b.

MCMILLAN, J. D. **Xylose fermentation to ethanol**. National Renewable Energy Lab., Golden, CO (United States), 1993.

NAIK, S. N. et al. Production of first and second generation biofuels: a comprehensive review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v.14, n.2, p. 578-597, 2010.

NARDI, T. et al. A sulphite-inducible form of the sulphite efflux gene SSU1 in a *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast. **Microbiology**, v. 156, n. 6, p. 1686-1696, 2010.

NGUYEN, N. H.; SUH, S. O.; BLACKWELL, M.. Five novel *Candida* species in insect-associated yeast clades isolated from Neuroptera and other insects. **Mycologia**, v. 99, n. 6, p. 842-858, 2007.

OKUDA, N. et al. Microaeration enhances productivity of bioethanol from hydrolysate of waste house wood using ethanologenic *Escherichia coli* KO11. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 103, n. 4, p. 350-357, 2007.

PALMQVIST, E.; HAHN-HÄGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition. **Bioresource technology**, v. 74, n. 1, p. 25-33, 2000.

PANDEY, A. et al. Biotechnological potential of agro-industrial residues. I: sugarcane bagasse. **Bioresource technology**, v. 74, n. 1, p. 69-80, 2000.

PARTOW, S. et al. Characterization of different promoters for designing a new expression vector in *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, v. 27, n. 11, p. 955-964, 2010.

PERALTA-YAHYA, P. P. et al. Microbial engineering for the production of advanced biofuels. **Nature**, v.488, n.7411, p.320-328, 2012.

PIPPO, W. A. et al. Energy recovery from sugarcane-trash in the light of 2nd generation biofuels. Part 1: Current situation and environmental aspects. **Waste and Biomass Valorization**, v. 2, n. 1, p. 1-16, 2011.

PRONK, J. T. Auxotrophic yeast strains in fundamental and applied research. **Applied and environmental microbiology**, v. 68, n. 5, p. 2095-2100, 2002.

RAMBAUT, A. FigTree, a graphical viewer of phylogenetic trees. Disponível em: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree>, 2007.

RAMBAUT, A. **How to read a phylogenetic tree**. 2013. Institute of Evolutionary Biology, University of Edinburgh. Disponível em: <http://epidemic.bio.ed.ac.uk/how_to_read_a_phylogeny>. Acesso em: 03 mar. 2014.

RENEWABLE FUELS ASSOCIATION (Washington). Statistics: Historic U.S. fuel Ethanol Production. 2013. Disponível em: <<http://www.ethanolrfa.org/pages/statistics>>. Acesso em: 8 dez. 2013.

RICHARD, P.; TOIVARI, M. H.; PENTTILÄ, M. Evidence that the gene *YLR070c* of *Saccharomyces cerevisiae* encodes a xylitol dehydrogenase. **FEBS letters**, v. 457, n. 1, p. 135-138, 1999.

RICHARD, P.; TOIVARI, M. H.; PENTTILÄ, M. The role of xylulokinase in *Saccharomyces cerevisiae* xylulose catabolism. **FEMS microbiology letters**, v. 190, n. 1, p. 39-43, 2000.

RIZZI, M. et al. Purification and properties of the NAD⁺-xylitol-dehydrogenase from the yeast *Pichia stipitis*. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 67, n. 1, p. 20-24, 1989.

ROSETTO R.; SANTIAGO A. D. Pragas. Embrapa. Disponível em: http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/cana-de-acucar/arvore/CONTAG01_53_711200516718.html. Acesso em: 15 Jul. 2012.

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

SALDIVA, P. et al. Etanol e Saúde Humana: uma abordagem a partir das emissões atmosféricas. 2009.

SALES, B. B. **Construção de linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* recombinantes superexpressoras de transportadores de pentoses**. 2010. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/42/42132/tde-06012011-162924/>>. Acesso em: 11 fev. 2014.

SEO J. H; PARK Y. C. **Method for producing ethanol from xylose**. U.S. Patent Application 12/815,837, 15 jun. 2010.

RAMASWAMY, H. S.; MARCOTTE, M. **Food processing: principles and applications**. CRC Press, 2004.

SANCHEZ, O. J.; CARDONA, C. A. Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. **Bioresource technology**, v. 99, n. 13, p. 5270-5295, 2008.

SANCHEZ, R. G. et al. Research Improved xylose and arabinose utilization by an industrial recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strain using evolutionary engineering. 2010.

SCHÄFER, A. et al. Hemicellulose-degrading bacteria and yeasts from the termite gut. **Journal of Applied Microbiology**, v. 80, n. 5, p. 471-478, 1996.

SCHOCH, C. L. et al. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 16, p. 6241-6246, 2012.

SILVA, J. P. A. et al. Fermentation medium and oxygen transfer conditions that maximize the xylose conversion to ethanol by *Pichia stipitis*. **Renewable Energy**, v. 37, n. 1, p. 259-265, 2012.

SKOOG, K.; HAHN-HÄGERDAL, B. Effect of oxygenation on xylose fermentation by *Pichia stipitis*. **Applied and environmental microbiology**, v. 56, n. 11, p. 3389-3394, 1990.

SONDEREGGER, M.; SCHÜMPERLI, M.; SAUER, U. Metabolic engineering of a phosphoketolase pathway for pentose catabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied and environmental microbiology**, v. 70, n. 5, p. 2892-2897, 2004.

SOUZA, Z. J. Bioeletricidade: 26 anos contribuindo para a sustentabilidade. **Revista Opiniões**, Ribeirão Preto, p.53-54, 01 jan. 2013. Disponível em: <<http://www.revistaopinioes.com.br/aa/materia.php?id=1153>>. Acesso em: 20 abr. 2013.

STAMATAKIS, A. et al. RAxML-Light: a tool for computing terabyte phylogenies. **Bioinformatics**, v. 28, n. 15, p. 2064-2066, 2012.

STEPHEN, J. D.; MABEE, W. E.; SADDLER, J. N. Will second generation ethanol be able to compete with first generation ethanol? Opportunities for cost reduction. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v.6, n.2, p.159-176, 2012.

SUH, S. O. et al. Wood ingestion by passalid beetles in the presence of xylose-fermenting gut yeasts. **Molecular Ecology**, v. 12, n. 11, p. 3137-3145, 2003.

SUH, S. O.; ZHOU, J. J. Methylophilic yeasts near *Ogataea (Hansenula) polymorpha*: a proposal of *Ogataea angusta* comb. nov. and *Candida parapolyomorpha* sp. nov. **FEMS yeast research**, v. 10, n. 5, p. 631-638, 2010.

TABEI, Y. et al. A fast structural multiple alignment method for long RNA sequences. **BMC bioinformatics**, v. 9, n. 1, p. 33, 2008.

TRÄFF-BJERRE, K. L. et al. Endogenous NADPH-dependent aldose reductase activity influences product formation during xylose consumption in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, v. 21, n. 2, p. 141-150, 2004.

TOIVARI, M. H. et al. Conversion of Xylose to Ethanol by Recombinant *Saccharomyces cerevisiae*: Importance of Xylulokinase *XKS1* and Oxygen Availability. **Metabolic engineering**, v. 3, n. 3, p. 236-249, 2001.

TOIVOLA, A. et al. Alcoholic fermentation of D-xylose by yeasts. **Applied and environmental microbiology**, v. 47, n. 6, p. 1221-1223, 1984.

UNIÃO DOS PRODUTORES DE BIOENERGIA (Araçatuba). **Produção Brasileira: Cana-de-Açúcar, Açúcar e Etanol**. 2012. Disponível em: <<http://www.udop.com.br/index.php?item=safra>>. Acesso em: 8 dez. 2013.

VAJZOVIC, A. et al. Novel endophytic yeast *Rhodotorula mucilaginosa* strain PTD3 II: production of xylitol and ethanol in the presence of inhibitors. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 39, n. 10, p. 1453-1463, 2012.

VAN MARIS, A. J. A. et al. Development of efficient xylose fermentation in *Saccharomyces cerevisiae*: xylose isomerase as a key component. In: **Biofuels**. Springer Berlin Heidelberg, p. 179-204, 2007.

VAN VLEET, J. H.; JEFFRIES, T. W. Yeast metabolic engineering for hemicellulosic ethanol production. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 20, n. 3, p. 300-306, 2009.

VISSER, W. et al. Oxygen requirements of yeasts. **Applied and environmental microbiology**, v. 56, n. 12, p. 3785-3792, 1990.

WAHLBOM, C. F. et al. Generation of the improved recombinant xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae* TMB 3400 by random mutagenesis and physiological comparison with *Pichia stipitis* CBS 6054. **FEMS yeast research**, v. 3, n. 3, p. 319-326, 2003.

WALFRIDSSON, M. et al. Ethanolic fermentation of xylose with *Saccharomyces cerevisiae* harboring the *Thermus thermophilus xylA* gene, which expresses an active xylose (glucose) isomerase. **Applied and environmental microbiology**, v. 62, n. 12, p. 4648-4651, 1996.

WHEALS, A. E. et al. Fuel ethanol after 25 years. **Trends in biotechnology**, v.17, n.12, p.482-487, 1999.

YABLOCHKOVA, E. N. et al. The activity of key enzymes in xylose-assimilating yeasts at different rates of oxygen transfer to the fermentation medium. **Microbiology**, v. 73, n. 2, p. 129-133, 2004.

YANG, V. W.; JEFFRIES, T. W. Regulation of phosphotransferases in glucose-and xylose-fermenting yeasts. In: **Biotechnology for Fuels and Chemicals**. Humana Press, 1997. p. 97-108.

XU, P.; BURA, R.; DOTY, S. L. Genetic analysis of D-xylose metabolism by endophytic yeast strains of *Rhodotorula graminis* and *Rhodotorula mucilaginosa*. **Genetics Mol Biol**, v. 34, n. 3, p. 471-478, 2011.

ZHANG, X. et al. Ethanolic cofermentation with glucose and xylose by the recombinant industrial strain *Saccharomyces cerevisiae* NAN-127 and the effect of furfural on xylitol production. **Bioresource technology**, v. 101, n. 18, p. 7093-7099, 2010.

ZHOU, H. et al. 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**, 2012.

ANEXOS

Anexo I – Método para obtenção do trato intestinal das larvas de insetos parasitas da cana-de-açúcar e isolamento dos micro-organismos

Para a obtenção do trato intestinal, as larvas foram colocadas em tubos de polipropileno de 15 ml e “anestesiadas” a 4° C por um período mínimo de 10 minutos. Em seguida, com auxílio de alfinetes entomológicos, os insetos foram imobilizados em duas regiões: na região cefálica e na extremidade da região posterior. Os intestinos dos insetos tiveram os seus conteúdos depositados sobre uma solução de 1 ml de água estéril a 4°C na proporção de 1 conteúdo intestinal por 1 ml água.

Para isolamento dos micro-organismos foram feitos plaqueamentos do conteúdo intestinal diluído em água, em meio YPD (*Yeast Extract Peptone Dextrose Agar*) (não diluído e diluído 10⁻¹) e em meio mínimo *Yeast Nitrogen Base* (YNB) (*Sigma-Aldrich*) enriquecido com as diferentes fontes únicas de carbono: celulose microcristalina (avicel[®]), carboximetilcelulose (CMC), xilose e xilano. Os isolamentos foram realizados no laboratório do Prof. Dr. Gustavo H. Goldman (USP-Ribeirão Preto).