

Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas

Deleção do gene PGI1 da levedura *Pichia*
stiptis para aumentar o rendimento fermentativo
a etanol.

André Ribas de Miranda

Orientador: Prof.Dr.Marcos Antônio de Morais Júnior

Recife

2011

Deleção do gene PGI1 da levedura *Pichia stiptis* para aumentar o rendimento fermentativo a etanol.

André Ribas de Miranda

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas. Área: Biologia Celular e Molecular

Orientador: Prof.Dr.Marcos Antônio de Moraes Júnior

Recife

2011

Miranda, André Ribas de

Deleção do gene PGI1 da levedura *Pichia stiptis* para aumentar o rendimento fermentativo a etanol./ André Ribas de Miranda. – Recife: O Autor, 2011.

48 folhas : il., fig., tab.

Orientador: Marcos Antônio de Moraes Júnior

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências Biológicas. Biologia Celular e Molecular, 2011.

Inclui bibliografia

1. Leveduras 2. Biotecnologia 3. Álcool I. Título.

579.563

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2011-199

André Ribas de Miranda, aluno do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Nível Mestrado, Área de Concentração **Biotecnologia**, realizou a Defesa de Dissertação intitulada: “**Deleção do gene PGI1 da levedura *Pichia stipitis* para aumentar o rendimento fermentativo a etanol**”, em quatro de março de dois mil e onze, tendo recebido a Menção “**Aprovado**” por unanimidade pela Comissão Examinadora.

Comissão Examinadora

ORIENTADOR: _____

Prof.Dr.Marcos Antônio de Moraes Júnior

Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE

EXAMINADORES: _____

Prof.Dra. Ester Ribeiro Gouveia

Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE

Prof.Dra. Norma Buarque de Gusmão

Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE

A humildade é a chave que abre
todas as portas.

Agradecimentos

Ao professor Dr. Marcos Antônio de Moraes Junior pela oportunidade, confiança e orientações durante o desenvolvimento desse trabalho, sendo ele para mim um exemplo de profissional dedicado.

Aos meus amigos e colegas de turma do Mestrado em Ciências Biológicas, pelo convívio e crescimento durante esses dois anos de aprendizado, em especial a Alice, Carlos, Martina, Luis Claudio, Diego, Renata, Monique, Viviane, Mariana e Irailton.

Aos amigos e colegas do laboratório pelo convívio agradável, pelas conversas e até brincadeiras: Rodrigo (pagodinho), Fernanda, Raquel, Carol (UPE), Carol (Argentina), Will, Rute, Esteban, Roxane, Tereza, Brígida, Billy, Giordani, Felipe (UPE) e Luciana.

Aos amigos e colegas do laboratório do professor Antônio, em especial: André (Bala), Luciana, Barbosinha, Eliane, Janaine, Barbara, Jaqueline e Breno.

Aos amigos que estando perto ou longe são especiais na minha vida!

Aos funcionários do Departamento de Bioquímica e Genética pelo auxílio técnico.

Aos meus pais Geraldo e Marilene, pelo amor, carinho e dedicação, me ensinando os verdadeiros valores da vida.

A meu irmão Thiago, minha irmã Milena pelos momentos sinceros de amizade e fraternidade vivenciados.

Aos meus Familiares, pois vocês me dão força para vencer. Vocês são especiais para mim.

Aos meus amigos da Graduação, melhor turma só inventando, vocês são surreal. Enfim a todos que de forma direta e indireta contribuíram para a realização deste trabalho.

Agradeço a Deus pelo seu Amor e por sua presença na minha vida.

Sumário

	Páginas
LISTA DE FIGURAS.....	iii
LISTA DE TABELAS.....	v
LISTA DE ABREVIATURAS.....	viii
RESUMO.....	x
ABSTRACT.....	xi
1.INTRODUÇÃO.....	1
2. JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA DO TRABALHO.....	4
3.OBJETIVOS.....	4
4.REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	5
4.1 Considerações sobre Bioetanol.....	5
4.2 Matérias primas para bioetanol : o caso do bagaço da cana-de-açúcar.....	7
4.3 Produção de bioetanol do bagaço da cana de açúcar.....	8
4.3.1 O pré-tratamento lignocelulósico.....	8
4.3.2 A hidrólise enzimática.....	10
4.3.3 Fermentação de pentoses e hexoses.....	10
4.4 Leveduras.....	11
4.5 A levedura <i>Pichia stipitis</i>	13
4.5.1 Ciclo de vida da <i>Pichia stipitis</i>	14
4.5.2 Metabolismo redox da <i>P.stipitis</i> para o metabolismo de xilose.....	16
4.5.3 Engenharia metabólica em <i>P.stipitis</i>	21
5.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	24
6.ARTIGO CIENTÍFICO.....	29
Deleção do gene PGI1 de <i>Pichia stipitis</i> para otimização do rendimento fermentativo a etanol.....	30

Resumo.....	30
Introdução.....	31
Materiais e Métodos.....	33
Resultados.....	37
Discussão e Conclusão.....	39
Agradecimentos.....	39
Referências Bibliográficas.....	40

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

- Figura 1. Diagrama representativo da demanda energética mundial referente aos anos de 1973 e 2007. *Outros inclui geotérmica, solar, eólica, etc.(Fonte: www.iea.org (Agencia internacional de energia)).....5
- Figura 2. Diagrama da conversão de biomassa em etanol.....9
- Figura 3. Representação esquemática de uma célula de levedura (adaptado de <http://www.rpi.edu/dept/chem-eng/Biotech-Environ/beer/yeast/yeast2.htm>).....12
- Figura 4. Esquema preliminar do ciclo de vida de *P.stipitis* (Melake et al.1996) (YM: meio com glicose,extrato de levedura e peptona; ME: meio com extrato de malte; n: nível de ploidia).....15
- Figura 5. Integração dos metabolismos de glicose e xilose. Genes de levedura são mostrados em letras maiúsculas em itálico, os genes de bactérias em itálico minúsculas.....17
- Figura 6. Via metabólica alternativa em *Pichia stipitis* pela glutamato desidrogenase para manutenção do desequilíbrio redox gerado pela assimilação de xilose.....18
- Figura 7. A indução de transcritos para síntese de lipídeos sob condições limitantes de oxigênio. Abreviações: GA, glicose em aerobiose; XA, xilose em aerobiose; GOL, glicose em condições limitantes de oxigênio; XOL, xilose em condições limitantes de oxigênio.....19
- Figura 8. Representação esquemática do desvio metabólico, da assimilação de glicose, derivado da deleção do gene que codifica a fosfoglicose isomerase (PGI 1) em *Pichia stipitis*. Duas moléculas de NADPH são geradas, servindo de cofator para a enzima xilose redutase XYL1 (seta azul preenchida)21

Figura 9. Estratégia para deleção gênica a partir da amplificação de um cassete de integração. **A.** Construção do cassete de integração com regiões de homologia usando iniciadores com sequências híbridas (setas em amarelo). **B.** Recombinação homóloga e interrupção gênica da linhagem-alvo pela transformação celular com o cassete de integração.....22

ARTIGO- Deleção do gene *PGI1* da levedura *Pichia stipitis* para aumentar o rendimento fermentativo a etanol.

Figura 1. Desenho esquemático da integração do fragmento de interrupção gênica no loco *PGI1* de *P.stipitis*. O produto de integração da marca KanMX no lócus *PGI1* está representado na linha superior, em oposição ao gene íntegro representado na linha inferior. As setas em preto representam os primers utilizados.....34

Figura 2. Análise das colônias NRRL 7124. Os poços 2,3 e 4 são os recombinantes.O poço 5 é a linhagem nativa. As colônias foram analisadas através dos primers *PGI1* 5 for e *PGI1* 3 rev. Onde o fragmento gerado pelos recombinantes é de 2,3 kb e da linhagem nativa de 1,8kb.O poço 1 contém o marcador de 1kb.....37

Figura 3. Gráfico da curva de crescimento da levedura NRRL7124 e da levedura 7124Δ*PGI1*. A curva em azul representa o crescimento da NRRL7124 num período de 26 horas. A curva em verde representa a levedura 7124Δ*PGI1* num período de 26 horas. A curva em rosa representa o pH do meio da levedura nativa num período de 26 horas. A curva em roxo representa o pH do meio da levedura transformante7124Δ*PGI1* no mesmo período.....38

Figura 4. Gráfico da curva de crescimento da levedura NRRL7124 e da levedura 7124Δ*PGI1* em xilose. A curva em azul representa o crescimento da NRRL7124 num período de 26 horas. A curva em verde representa a levedura 7124Δ*PGI1* num período de 26 horas. A curva em rosa representa o pH do meio da levedura nativa num período de 26 horas. A curva em roxo representa o pH do meio da levedura transformante7124Δ*PGI1* no mesmo período.....39

Figura 5.Gráfico da fermentação com YNB completo da levedura parental e transformante. A) Fermentação de 100% de glicose pela NRRL7124 (curva cinza claro) e pela 7124Δ*PGI1* (curva cinza escuro).B) Fermentação de 50% glicose/50% xilose mistura pela NRRL7124 (curva cinza claro) e pela 7124Δ*PGI1* (curva cinza escuro).....40

Figura 6.Gráfico da produção de etanol da levedura parental e transformante A) Produção de etanol (g/l) pela NRRL7124 (curva cinza claro) e pela 7124Δ*PGI1* (curva cinza escuro) do meio com glicose a 58,6 g/l.B) Produção de etanol (g/l) do meio com 50% glicose/50% xilose pela NRRL7124 (curva cinza claro) e pela 7124Δ*PGI1* (curva cinza escuro).....41

Figura 7. Gráfico da fermentação com YNB adicionado de glutamato da levedura parental e transformante. A) Fermentação de 100% de glicose pela NRRL7124 (curva cinza escuro) e pela 7124 Δ PGI1 (curva cinza claro). B) Fermentação de 50% glicose/50% xilose mistura pela NRRL7124 (curva azul e vermelha) e pela 7124 Δ PGI1 (curva verde e roxo).....43

Figura 8. Gráfico da produção de etanol da levedura parental e transformante em meio com YNB adicionado de glutamato. A) Produção de etanol (g/L) pela NRRL7124 (curva cinza escuro) e pela 7124 Δ PGI1 (curva cinza claro) do meio com glicose a 59,6 g/l. B) Produção de etanol (g/L) do meio com 50% glicose/50% xilose pela NRRL7124 (curva cinza escuro) e pela 7124 Δ PGI1 (curva cinza claro).....44

LISTA DE TABELAS

ARTIGO- Deleção do gene PGI1 da levedura *Pichia stiptis* para otimização do rendimento fermentativo a etanol.

Tabela 1. PCRs com diferentes combinações dos primers, tamanho gerado e objetivos de verificação.....35

Tabela 2. Seqüências dos primers de amplificação de *PGI1*, construção dos cassetes de interrupção e verificação.....36

LISTA DE ABREVIATURAS

AKG: 2-ceto-glutarato

Cre: recombinase crê bacteriana

EDTA: ácido etileno diamino tetracético

EUROSCARF: European *Saccharomyces cerevisiae* Archive for Functional analyses

FAS 2: ácido graxo sintase isoforma 2

G-418: Geneticina sulfato

GAD 2: glutamato descaboxilase 2

GDH 2: glutamato desidrogenase NAD- específica

IDH1, IDH2: isocitrato desidrogenase

KanMX: cassete de deleção contndo o gene *kan* que confere resistência bacteriana a kanamicina e resistência de leveduras a geneticina

Kb (ou Kbp): pares de kilobases

KGD 2: 2-cetogluturato desidrogenase

NAD⁺: nicotinamida adenosina dinucleotideo

NADH: nicotinamida adenosina dinucleotideo reduzida

NADP⁺: nicotinamida adenosina dinucleotideo fosfato

NADPH: nicotinamida adenosina dinucleotideo fosfato reduzida

OLE 1: estearoil coenzima A desaturase

PCR: reação em cadeia da polimerase

PGI1: fosfoglicose isomerase

PPP: via da pentose fosfato

SDH1: succinato desidrogenase

SHAM: cadeia de transporte de elétrons sem citocromo, sensível ao ácido hidroxâmico salicílico.

SHF: Hidrólise e Fermentação Separada

SSF: Sacarificação e Fermentação Simultânea

TAE: tampão tris acetato EDTA

TE: tampão de extração

UFC: unidades formadoras de colônias

UGA1.1, UGA1.2 : 4-aminobutirato aminotransferase

UGA 2, UGA2.2: succinato semialdeído desidrogenase

XYL1,Xyl1p: xilose redutase

XYL2,Xyl2p: xilitol desidrogenase

Linhagem de *Pichia stipitis*

NRRL 7124: linhagem nativa

FPL-061: mutante selecionado para meio contendo inibidores respiratórios, resultantes da seleção da linhagem parental CBS 6054 de *P.stipitis*.

FPL-DX26: mutante não reprimido para o metabolismo de xilose, resultante da seleção do FPL-061.

Linhagem de bactéria

DH5 α : linhagem de *Escherichia coli* utilizada em experimentos de clonagem

Meios

LB: meio Luria-Bertani

ME: meio com extrato de malte

YM : meio com glicose,extrato de levedura e peptona

YNB: Yeast Nitrogen base medium

YPD: Yeast-Peptona-Dextrose

RESUMO

Nos últimos 15 anos, um grande esforço tem sido feito para uma maior utilização de resíduos agroindustriais renováveis, podendo a biomassa lignocelulósica ser matéria prima para os bicompostíveis. A composição dessas biomassas varia bastante, mas em geral os substratos lignocelulósicos são constituídos de celulose (homopolímero de glicose), hemicelulose (heteropolímero de hexoses e pentoses) e pela lignina (compostos aromáticos). Considerando que a fermentação de glicose pode ser realizado de forma eficiente, a bioconversão da fração das pentoses (xilose, principal açúcar pentose obtido na hidrólise da hemicelulose), apresenta um desafio. A levedura *Pichia stipitis* pode converter xilose a etanol com rendimentos industrialmente relevantes. Porém necessita de condições limitantes de oxigênio, além do consumo da glicose inibir de modo não competitivo a xilose e sob condições de crescimento similares o consumo de glicose é maior que o de xilose. Com base na análise da via metabólica desta levedura, o presente trabalho teve como objetivo redirecionar o fluxo metabólico da via glicolítica para via das pentose fosfato dentro do que se chama modernamente de Engenharia Metabólica. O gene PGI1 codificador da fosfoglicose isomerase foi completamente removido do genoma da linhagem nativa NRRL 7124 com o uso de fragmentos de PCR que continham seqüências com mais de 350 bp de homologia com as regiões 5' e 3' do gene alvo. Quando este gene foi deletado, a glicose-6-fosfato foi inteiramente rotada para via da pentose fosfato. Este fluxo direciona a produção de NADPH fundamental para a produção de precursores de nucleotídeos, aminoácidos, em reações biossintéticas redutivas e também na conversão de xilose a xilitol. Para seleção do transformante, foi necessária uma concentração de 1200µg/ml de Geneticina. Além disso, a eficiência de transformação foi baixa, em parte devido à utilização do sistema não convencional de códons por esta levedura. O cassete de deleção construído apresenta a marca de seleção resistente a geneticina ladeado por duas regiões denominadas loxp, que permitem a recombinação por sistemas de contra-seleção. Possibilitando a remoção da marca de resistência.

Palavras chaves: Engenharia Metabólica, *Pichia stipitis*, etanol

ABSTRACT

Over the past 15 years, a great effort has been made for greater use of residues are renewable and can be lignocellulosic biomass feedstock for biofuels. The composition of biomass varies widely, but generally the lignocellulosics are composed of cellulose (homopolymer of glucose), hemicellulose (heteropolymer of hexose and pentoses) and lignin (aromatic compounds). Whereas the fermentation of glucose can be done efficiently, the fraction of the bioconversion of pentoses (xylose, the main pentose sugar obtained on hydrolysis of hemicellulose), presents a challenge. The yeast *Pichia stipitis* can convert xylose to ethanol with yields industrially relevant. But need oxygen limiting conditions, and the consumption of glucose in a non-competitive inhibition xylose and under similar growing conditions the glucose consumption is greater than that of xylose. Based on the analysis of this yeast metabolic pathway, this study aimed to redirect the metabolic flux from glycolysis to the pentose phosphate pathway within what is called modern Engineering Metabolic. The gene encoding phosphoglucose isomerase PGI1 was completely removed from the native genome of strain NRRL 7124 using PCR fragments that contained sequences of more than 350 bp of homology to the 5' and 3' of the target gene. When this gene was deleted, glucose-6-phosphate was fully rotated to pentose phosphate pathway. This flow directs the production of NADPH essential for the production of precursors of nucleotides, amino acids, in reductive biosynthetic reactions and also the conversion of xylose to xylitol. The effect of this conversion provides a concomitant assimilation of xylose and glucose (as so disclosed after fermentation). For selection of transformant, required a concentration of geneticin 1200µg/ml. Moreover, the transformation efficiency was low, partly due to the use of unconventional system of codons by this yeast. The deletion cassette has built a checkmark resistant to geneticin flanked by two regions called loxP, which allow the recombination systems counter-selection. Allowing mark removal resistance.

Key words: Metabolic Engineering, *Pichia stipitis*, ethanol

1. INTRODUÇÃO

Os custos de produção mais baixos e os recursos naturais abundantes tornam o Brasil o maior candidato ao papel de supridor mundial de etanol. A entrada em vigor do Protocolo de Kyoto, em fevereiro de 2009, está obrigando os países a começarem a colocar em prática medidas concretas para reduzir o consumo dos combustíveis fósseis, e assim cumprir as metas de redução de emissão de dióxido de carbono previstas no acordo mundial.

A produção mundial de álcool aproxima-se dos 51 bilhões de litros por ano, sendo o Brasil e os EUA os principais produtores. No Brasil este combustível é obtido a partir da fermentação da sacarose proveniente da cana de açúcar; já nos EUA e na Europa a maior parte da produção vem da fermentação de hidrolisado de amido de milho e da sacarose de beterraba, respectivamente. Entretanto, cada vez mais o uso do milho, beterraba e cereais está sendo questionado devido à pressão popular para que menos biomassa que tem uso para alimentação humana seja desviada para a produção de combustíveis. No caso do Brasil, a maior pressão se relaciona à provável expansão das áreas de plantação de cana em detrimento à preservação da natureza. Por outro lado, o aumento da demanda por este combustível induz a busca de substratos alternativos de fermentação (Goldemberg, 2007).

Dentre os principais substratos potenciais se destacam os resíduos lignocelulósicos, como o bagaço de cana e de beterraba, a palha de cereais e os resíduos da indústria de madeira. A composição dessas biomassas varia bastante, mas em geral os substratos lignocelulósicos são constituídos de celulose (homopolímero de glicose), hemicelulose (heteropolímero de hexoses e pentoses) e pela lignina (compostos aromáticos) (van Maris et al 2006). A celulose e hemicelulose representam uma alternativa sustentável para aumentar a produção de biocombustível e para aumentar o balanço energético, com menos contribuição para o efeito estufa (Hahn-Hagerdal et al., 2006). Um hidrolisado deste substrato gera um xarope composto de oligossacarídeos, hexoses e pentoses mais lignina. A fração hexose pode ser diretamente convertida a etanol por células de *S. cerevisiae*, mas não a fração de pentoses. Muitas tentativas têm sido feitas há anos no sentido de modificar geneticamente esta levedura para a fermentação de pentoses, com resultados ainda pouco expressivos. Como a fração

representada pela hemicelulose pode chegar de 15% a 35% do total lignocelulósico, sua conversão a etanol é bastante expressiva (Hahn-Hagerdal et al., 2006; van Maris et al 2006).

Algumas leveduras podem converter xilose a etanol com rendimentos industrialmente relevantes, como é o caso da espécie *Pichia stipitis*. A fermentação de substrato com xilose pura pode apresentar rendimentos de 0,44 g.g⁻¹, mas com a estreita necessidade de oxigenação do sistema (van Maris et al 2006). Esta levedura exhibe sistemas de transporte de baixa e alta afinidade que operam simultaneamente. O sistema transportador de baixa afinidade é partilhado entre a glicose e a xilose para transportar açúcar. A glicose inibe o transporte da xilose por inibição não competitiva no sistema transportador de baixa afinidade (Kilian e Uden, 1988). Além disso, a proporção de consumo da glicose é maior que o de xilose sob similares condições de crescimento. (Agbogbo et al, 2006).

A maior assimilação de xilose e consequente produção de etanol por leveduras são de fundamental importância para o uso de resíduos lignocelulósicos, e de grande interesse para indústria alcooleira. Para tanto, várias estratégias estão sendo propostas na literatura com vistas ao redirecionamento dos fluxos metabólicos para o aumento da produção de etanol, dentro do que se chama modernamente de “Engenharia Metabólica”.

No presente trabalho será implementada uma estratégia de modificação genética da via metabólica da *P. stipitis* pela deleção do gene PGI1 uma linhagem de coleção desta espécie.

O gene PGI1 codifica para enzima fosfoglicose isomerase que catalisa a conversão de glicose-6-fosfato a frutose-6-fosfato na via glicolítica. Quando este gene é deletado do genoma, a glicose-6-fosfato é inteiramente desviado para via das pentoses fosfato. Este fluxo direciona a produção de NADPH fundamental para a produção de precursores de nucleotídeos, aminoácidos, em reações biossintéticas redutivas e também na conversão de xilose a xilitol. Estudos mostraram que células *S.cerevisiae* com deleção para este gene, não foram capazes de crescer em meio com glicose como única fonte de carbono, pois esse açúcar é degradado a ribulose 5 fosfato com a concomitante redução de NADP a NADPH, gerando diminuição no nível do NADP que não pode ser rapidamente regenerado (Bole et al,1993). Na *P.stipitis* esse problema pode ser

superado pelo consumo de xilose, pelo fato desta, possuir a enzima xilose redutase (XR) que converte xilose a xilitol com alta afinidade pelo NADPH. A deleção do PGI1 poderá assim, conduzir a rota metabólica no sentido das pentoses fosfato levando a produção excedente de NADPH, o que poderia proporcionar maior assimilação de xilose pela XR. Se isto acontecer de maneira concomitante à assimilação de glicose, então é de se esperar maior produtividade de etanol a partir de misturas glicose/xilose como é o caso dos hidrolisados.

2. JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA DO TRABALHO

O bioetanol é um combustível renovável produzido a partir de processos biológicos. No Brasil este álcool é obtido a partir da monocultura da cana-de-açúcar, porém apenas 1/3 da biomassa da cana é utilizada como substrato para fermentação por micro-organismos. Os 2/3 restantes são subutilizados para gerar eletricidade nas usinas. Essa biomassa provinda do bagaço é constituída por polímeros de celulose e hemicelulose ricos em açúcar hexose e pentose que podem ser direcionados para produção de combustíveis.

3. OBJETIVOS

Objetivo geral

- Testar a hipótese da reorientação dos fluxos metabólicos na levedura *P.stipitis* para a via das pentoses-fosfato para a produção de etanol.

Objetivos específicos

- Produzir uma linhagem de *P.stipitis* com deleção do gene *PGII*.
- Avaliar o desempenho fermentativo da linhagem geneticamente modificadas de *P.stipitis* frente a substratos com diferentes composições de fontes de carbono.

4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1 Considerações sobre Bioetanol

Atualmente, a biomassa corresponde a aproximadamente 10 por cento da demanda energética primária mundial (fig.1). Num ambiente de alta dos preços do petróleo, escassez de recursos, instabilidade política de países produtores e desafios ambientais, apenas aquela tem o potencial de responder ao suprimento de uma civilização energeticamente dependente. Em termos energéticos, a biomassa representa um recurso derivado de organismos vivos. Logo os vegetais têm grande importância já que seus carboidratos ricos energeticamente podem ser eficientemente convertidos por micro-organismos em bicomustíveis, dentre os quais, apenas o bioetanol é produzido em uma escala industrial. Ainda são requeridos desenvolvimento futuros para produção sustentável de biohidrogênio, biometanol e o biodiesel produzido a partir de processos biotecnológicos (Antoni et al.2007).

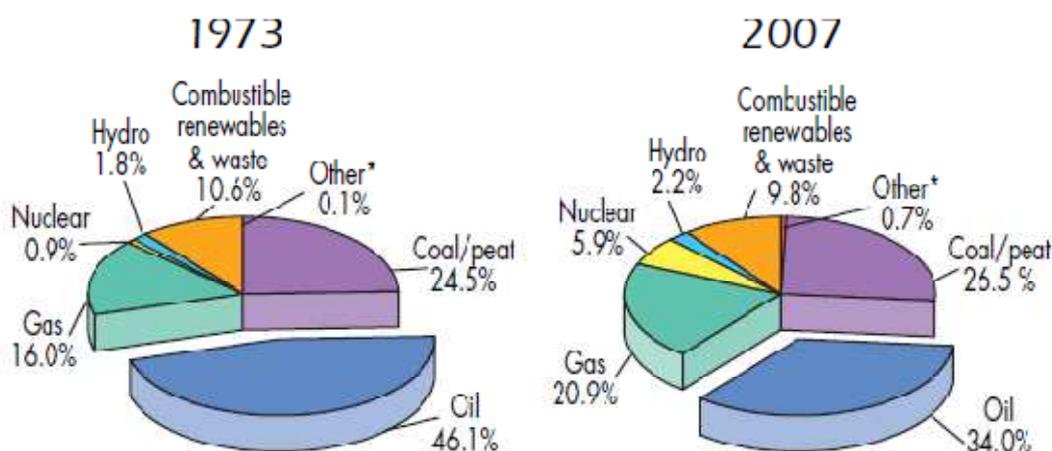


Fig. 1 Diagrama representativo da demanda energética mundial referente aos anos de 1973 e 2007. *Outros inclui geotérmica, solar, eólica, etc.(Fonte: www.iea.org (Agencia internacional de energia)).

Em média 73 por cento do etanol produzido mundialmente corresponde a etanol combustível, 17 por cento a etanol de bebidas e 10 por cento ao etanol industrial usado pela indústria química (Fukuda et al., 2009; Sanchez e Cardona, 2008).

O etanol combustível pode ser obtido diretamente da sacarose ou do amido e da biomassa lignocelulósica. A complexidade do processo depende do tipo de matéria prima empregada. A tecnologia designada varia de uma simples conversão do açúcar pela fermentação, a uma conversão envolvendo alguns estágios da biomassa lignocelulósica a etanol (Fukuda et al., 2009; Sanchez e Cardona, 2008).

A principal matéria prima para produção do etanol é a cana-de-açúcar na forma de mosto de caldo de cana ou melaço, além da biomassa de amido. No Brasil, aproximadamente 79 por cento do etanol é produzido do caldo de cana e o restante do mosto de cana (Fukuda et al., 2009; Wilkie et al., 2000). O país é um grande produtor de cana-de-açúcar com 495 bilhões de toneladas/ano. Apresenta 44% de sua matriz energética na forma renovável, dos quais 13,5 por cento é derivado da cana-de-açúcar. Das terras avaliadas para agricultura (340 milhões de hectares), apenas 0,9% está ocupado pelo cultivo da cana-de-açúcar, mostrando um grande potencial para expansão (Soccol et al., 2010).

Em 1970, o Brasil criou um programa denominado PróAlcool para substituir gasolina por etanol, no intuito de diminuir a dependência do petróleo em períodos variáveis politicamente e economicamente. Este programa direcionou o país a uma posição favorável em termos de segurança energética. Em 2009 a produção de etanol atingiu 27 bilhões de litros, e o Brasil possui uma meta de 104 bilhões de litros ao ano para 2025, ocasionando uma necessidade em reduzir os custos de produção, com um maior avanço tecnológico para ganhar mais produtividade por unidade de área e prover um melhor desempenho ambiental (Soccol et al., 2010).

Atualmente um hectare de cana-de-açúcar pode produzir aproximadamente 6000 L de etanol com custos de produção entre US\$ 0,25 a 0,30/L (Cerqueira Leite et al., 2009; Soccol et al., 2010). Para aumentar a produtividade, deve ser notado que apenas uma parte da biomassa produzida é utilizada para produção de energia; 1/3 da planta é utilizada para produção de energia, 1/3 é bagaço que é queimado para produção de eletricidade e o 1/3 restante é deixado no campo, que é decomposta por micro-organismos (Cortez et al., 2008). Portanto um significativo aumento na produção de

etanol será possível com tecnologias desenvolvidas para converter polissacarídeos de follhas, parênquimas e bagaço da cana-de-açúcar que representam 2/3 da biomassa.

4.2 Matérias primas para bioetanol : o caso do bagaço da cana-de-açúcar

Nos últimos 15 anos, um grande esforço tem sido feito para uma maior utilização de resíduos agroindustriais renováveis, incluindo o bagaço da cana de açúcar. De acordo com Balat et al. (2008), as matérias primas de bioetanol podem ser classificadas em três tipos: (i) a sacarose contida nas matérias primas (ex: açúcares na cana, sorgo doce e beterraba) (ii) materiais com amido (trigo, milho e cereais), e (iii) biomassa lignocelulósica (madeira, palha e gramíneas). A viabilidade da matéria prima para o bioetanol pode variar consideravelmente de estação para estação, e depende ainda de sua localização geográfica. Devido à matéria prima responder a 1/3 dos custos de produção, um alto rendimento em bioetanol é imperativo (Dien et al., 2003).

Cerca de 2/3 da produção mundial de açúcar provem do açúcar da cana e 1/3 do açúcar da beterraba (Linoj et al., 2006). O açúcar da cana é produzido em países tropicais e subtropicais, enquanto o açúcar da beterraba é proveniente de países temperados. Ambos os recursos parecem ser os mais promissores para produção do bioetanol (UNCTAD, 2006).

Outras culturas de resíduos agrícolas como milho, trigo e palha de arroz, resíduos de processamento de citros, biomassa de coco, gramíneas e resíduos de polpa, indústria de papel e da extração de óleo de rícino e girassol bem como resíduos sólidos municipais celulósicos, podem eventualmente ser usados como matéria prima para produzir etanol. Contudo cada recurso de biomassa representa um desafio tecnológico. No caso do Brasil, ainda não existe razão para explorar outros recursos. O atual sistema de bioetanol emprega a cana de açúcar eficientemente, e nos próximos anos, o bagaço da cana de açúcar será usado como material lignocelulósico com grande sucesso (Socol et al., 2010).

O bagaço da cana de açúcar (ou bagaço como é geralmente chamado), é um resíduo poroso de talos de cana, deixados depois de esmagar e extrair o suco da cana (Pandey et al., 2000). Apresenta grande heterogeneidade morfológica e consiste de feixes de fibras e outros elementos estruturais como vasos, parênquima e células

epiteliais (Sanjuan et al., 2001). Este bagaço composto de 19 a 24 % de lignina, 27 a 32 % de hemicelulose, 32 a 44 % de celulose e 4,5 a 9 % de cinzas (Jacobsen e Wyman, 2002). A composição e porcentagem desses polímeros podem variar entre as variedades cultivadas da cana. Além do mais a composição de uma única planta varia com a idade, estágio de crescimento e outras condições (Pérez et al., 2002). A produção anual brasileira do bagaço corresponde a 186 milhões de toneladas (Soccol et al., 2010).

O desenvolvimento de tecnologia para tratamento e aproveitamento do bagaço da cana de açúcar no Brasil é favorável, devido a possibilidade de poder ser anexado as unidades produtoras de açúcar/etanol, o que requer menor investimento, infra-estrutura, logística e suprimento energético em relação às unidades independentes. Isto representa um cenário promissor, já que de cada 10 milhões de toneladas de biomassa seca, 600 milhões de galões de etanol podem ser produzidos, considerando apenas a parte celulósica (Soccol et al., 2010).

4.3 Produção de bioetanol do bagaço da cana de açúcar

A produção de etanol combustível da biomassa lignocelulósica (fig.2) inclui o pré-tratamento da biomassa, hidrólise da celulose, fermentação de hexoses e pentoses, separação, tratamento de efluentes, e dependendo da matéria prima a colheita da cana que pode ter um custo adicional (Ojeda e Kafarov, 2009).

4.3.1 O pré-tratamento lignocelulósico

O pré-tratamento é um processo chave na conversão de materiais lignocelulósicos a etanol. Torna-se necessário, devido a associação que existe entre os três principais componentes da parede celular da planta (celulose, hemicelulose e lignina), esta forte agregação é o fator determinante para a baixa acessibilidade dos carboidratos da planta pelo processo biológico como a hidrólise enzimática e a fermentação (Gamez et al., 2006).

Muitos métodos têm sido utilizados para o pré-tratamento dos materiais lignocelulósicos. Existe explosão a vapor (Hernandez-Salas., 2009; Hendriks e Zeeman, 2009; Balat et al., 2008) lavagem alcalina (Hernandez-Salas., 2009; Hendriks e Zeeman,

2009; Balat et al., 2008), cal, peróxido de hidrogênio alcalino, hidrólise ácida diluída (Hernández-Salas.,2009; Balat et al.,2008; Zhang et al., 2007), explosão da fibra de amônia (Hendriks e Zeeman, 2009; Balat et al., 2008), entre outros. Cada um desses métodos tem suas vantagens e desvantagens e nenhum parece ótimo para todas as aplicações envolvendo diferentes tipos de materiais lignocelulósicos (Soccol et al., 2010).

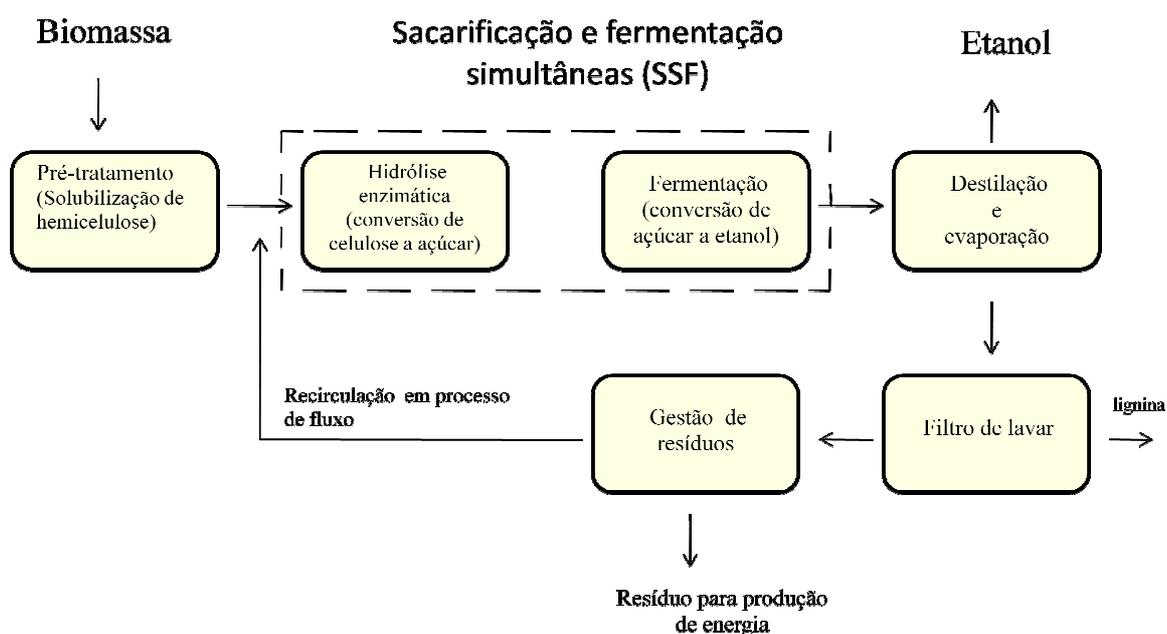


Fig. 2 Diagrama da conversão de biomassa em etanol (Hahn-Hagerdal et al., 2006).

Desde que o programa do bioetanol brasileiro focou em técnicas para cana-de-açúcar, o pré-tratamento tem sido extensivamente estudado. Com a explosão a vapor sendo um dos métodos mais usados para fracionar os três principais componentes da biomassa em processos com fluxos diferentes (Martín et al.,2008 Balat et al.,2008) A explosão a vapor resulta em uma substancial quebra da estrutura lignocelulósica, levando a hidrólise da fração hemicelulósica e despolimerização da celulose e lignina. Como resultado, a suscetibilidade dos polissacarídeos da planta a hidrólise ácida ou enzimática é aumentada (Ramos et al., 1992; Excoffier et al., 1991; Balat et al., 2008; Martín et al., 2008; Hernandez-Salas., 2009).

4.3.2 A hidrólise enzimática

Embora o pré-tratamento seja requerido para tornar a biomassa acessível à ação enzimática, é desejável usar condições amenas que minimizem a degradação dos açúcares e lignina em produtos inibitórios (Almeida et al., 2007). Entre os produtos inibitórios destacam-se o 5-hidroximetil-2-furaldeído (HMF) e 2-furaldeído (furfural), há ainda os ácidos fracos e os compostos fenólicos. Além disso, para aumentar o processo de hidrólise enzimática e confirmar a baixa severidade do pré-tratamento, a tendência é usar uma mistura de enzimas contendo xilanases e outras enzimas como as celulases (Meyer et al., 2009).

A hidrólise enzimática pode ser conduzida separadamente da fermentação alcoólica, um processo conhecido como Fermentação e Hidrólise Separada (SHF) ou ambos os processos podem ser conduzidos ao mesmo tempo como a Fermentação e Sacarificação Simultâneas (SSF). No processo SHF, a hidrólise pode ser conduzida em temperaturas em torno dos 50 °C, uma temperatura adequada para estabilidade das enzimas e para minimizar a contaminação bacteriana. No entanto, SHF leva a um acúmulo de glicose derivado da hidrólise da celulose que pode inibir as atividades das endo- e exo-glucanases e β -glicosidases (celulases) afetando o rendimento e a proporção da reação (Soccol et al., 2010)..

No processo SSF a produção de etanol ocorre simultaneamente à liberação, da glicose. Além disso, o risco de contaminação é menor devido à presença de etanol. O processo também apresenta um menor custo, pois apenas um reator é necessário. Neste contexto é interessante notar que o etanol que acumula no meio, não afeta significativamente a atividade enzimática. A dificuldade do processo está relacionada às diferentes temperaturas ótimas para hidrólise enzimática (40-50 °C) que é diferente daquela para a fermentação alcoólica (28-35 °C) (Soccol et al., 2010).

4.3.3 Fermentação de pentoses e hexoses

As matérias primas lignocelulósicas, em particular as agrícolas e as madeiras de lei podem conter de 5-20% (ou mais) de açúcares pentose como xilose e arabinose, que não são fermentadas pelo micro-organismo mais comum a *S.cerevisiae*, a qual é utilizada para fermentação do suco ou mosto da cana de açúcar, devido a sua habilidade potencial em hidrolisar a sacarose da cana em açúcares fermentáveis (Hahn-Hagerdal et

al., 2006). Teoricamente 100 g de glicose produzem 51.4 g de etanol e 48.8 g de CO₂, o que representa o rendimento máximo teórico de 0,511 g etanol/g glicose (Badger, 2002). Os rendimentos alcançados por diferentes linhagens industriais de *S.cerevisiae* estão próximos do valor teórico. Porém, tratando-se do aproveitamento da biomassa da cana-de-açúcar este organismo possui certas limitações como a incapacidade de fermentação das pentoses. Mas existem outras espécies de leveduras que naturalmente fermentam as pentoses, tais como *Pichia stipitis* e a *Candida shehatae*

Os pesquisadores têm basicamente tomado duas abordagens para aumentar o rendimento da fermentação de etanol derivado da biomassa a partir de açúcares. A primeira abordagem tem sido transferir para as leveduras e outros organismos formadores de etanol, genes das vias metabólicas da pentose por técnicas de engenharia genética. A segunda abordagem é melhorar os rendimentos em etanol por engenharia genética de micro-organismos que têm a capacidade de fermentar ambas hexoses e pentoses (Gray et al.,2006; Dien et al., 2003; Jeffries e Jin, 2004).

Em acordo com a segunda abordagem o presente trabalho visou modificar geneticamente a levedura *P.stipitis* para melhorar o rendimento em etanol, a partir de xilose ou de misturas glicose/xilose, as quais são encontradas em hidrolisados de hemicelulose. Em seguida foram investigadas as características da linhagem modificada.

4.4 Leveduras

As leveduras constituem um grupo de microrganismos eucarióticos (Fig.3) integrado no Reino *Fungi*, domínio *Eukarya*, caracterizado por um crescimento vegetativo predominantemente unicelular e pela possibilidade de formação de estruturas sexuadas não encerradas em corpos frutíferos (Phaff *et al.*, 1978; Kurtzman, 1994). Evoluíram de uma forma ancestral unicelular (Bandoni, 1987; Oberwinkler, 1987), compreendendo atualmente representantes dos Filos *Ascomycota* e *Basidiomycota* (Swann & Taylor, 1995; Eriksson & Winka, 1997).

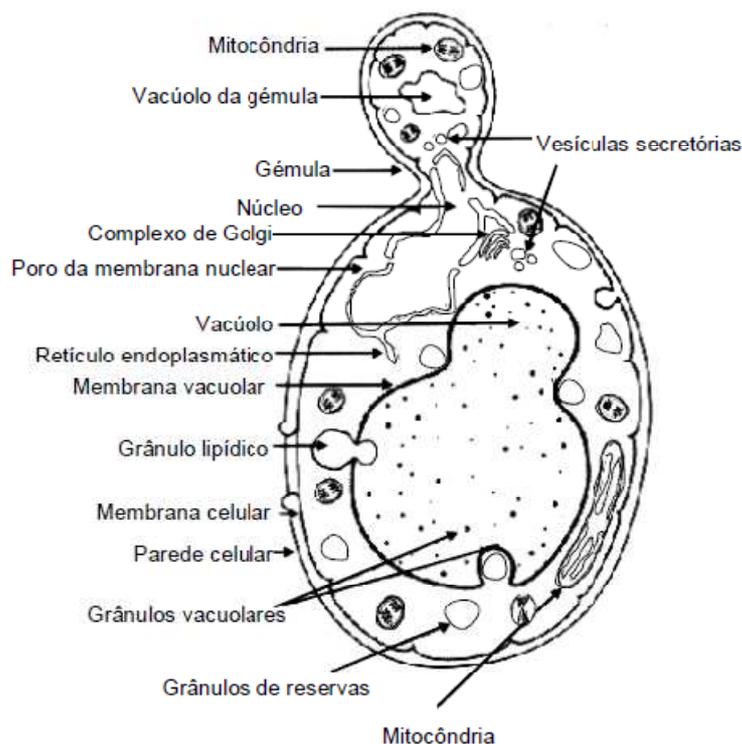


Figura 3. Representação esquemática de uma célula de levedura (Fernandes, 2008)

As leveduras, como microrganismos quimio-organo-heterotróficos, são capazes de utilizar diferentes fontes de carbono e de energia tais como D-glucose, D-galactose, D-xilose, glicerol, D-glucitol, entre muitos outros. A seleção por determinado nutriente poderá determinar a diversidade de espécies em diferentes nichos, e.x., as leveduras podem ser altamente especializadas por habitat (Phaff et al., 1978). Por exemplo, uma característica fisiológica presente em muitas leveduras ascomicetas é a capacidade de fermentar açúcares, o que possibilita a colonização de substratos com elevadas concentrações destes compostos, como é o caso de frutos e flores (Fernandes, 2008).

O tipo de substratos colonizados pelas leveduras reflete os parâmetros que permitem o seu crescimento e sobrevivência, nomeadamente a gama de pH (geralmente entre pH 3 e 8), temperatura (geralmente são mesófilas, com uma temperatura ótima entre 25-30 °C), oxigênio (são aeróbios obrigatórios ou anaeróbios facultativos) e atividade de água (há vários exemplos de leveduras osmo-/ou halotolerantes capazes de se manterem ativas na presença de concentrações saturantes de NaCl (Fernandes, 2008).

As leveduras têm sido isoladas de ambientes muito diversos: terrestres, aquáticos e aéreos. As plantas parecem constituir os nichos mais comuns, especialmente na interface entre os nutrientes solúveis e o ambiente asséptico (por ex., a superfície das uvas). Por outro lado, no filoplano predominam as leveduras de afinidade basidiomiceta, em particular do gênero *Erythrobasidium* e *Rhodotorula* (Inácio *et al.*, 2002). Águas doces e salgadas são ambientes onde se encontram frequentemente leveduras do gênero *Candida*, *Cryptococcus*, *Rhodotorula* e *Debaryomyces*. Foram encontradas leveduras marinhas (essencialmente do Gênero *Rhodotorula* e *Sporobolomyces*) em sedimento recolhido de profundidades entre 6.400 e 11.000 m (Nagahama *et al.*, 2001). A concentração de leveduras em águas do mar pode passar de um número típico de 10-100 UFC (unidades formadoras de colônias) por litro para valores pelo menos duas ordens de grandeza mais elevadas nas regiões de estuário (Walker, 1998). Para muitas leveduras, tais como as dos gêneros *Lipomyces* e *Schwanniomyces*, o solo é o único reservatório conhecido. Os solos pobres poderão acolher relativamente poucas leveduras, mas os solos ricos usados para agricultura poderão atingir cerca de 4×10^4 UFC por grama (Walker, 1998).

As populações mais densas de leveduras em ambientes naturais estão normalmente associadas a substratos que contêm açúcares e outras fontes de carbono rapidamente assimiláveis (flores, frutos, exsudados de árvores, etc.). Frequentemente isoladas a partir de flores e frutos são as espécies *Hanseniaspora uvarum*, o seu estado anamórfico *Kloeckera apiculata* e *Metshnikowia* spp., dentre outras. Por vezes, as leveduras colonizadoras de flores e frutos ocorrem também em insetos (por ex. *Drosophila* spp.), que poderão constituir vetores para a sua propagação. São exemplos *Ambrosiozyma* spp., *Candida entomophila* e *Candida insectarum* (Fernandes, 2008).

4.5 A levedura *Pichia stipitis*

A levedura *P.stiptis* pertence ao Reino Fungi, Filo Ascomycota, Classe Saccharomycetes, Ordem Saccharomicetales, Família Saccharomicetaceae e Gênero Pichia. Pertencem a um grupo de leveduras isoladas a partir de madeira em decomposição e de larvas de insetos que habitam a madeira. O nicho ecológico dessa levedura está relacionado à capacidade de utilizar a maior parte dos açúcares presentes na madeira, por meio da secreção de várias celulasas e hemicelulasas, que quebram os resíduos em monômeros de açúcar (Jeffries *et al.*, 2007). Essa espécie foi apresentada

como a de maior capacidade fermentativa de xilose (presente na hemicelulose) em relação a outros micro-organismos conhecido. E também é capaz de fermentar glicose, manose, galactose e celobiose. Isto faz dessa levedura um potente organismo que simultaneamente sacarifica e fermenta. Contudo, a *P.stipitis* tem um baixo consumo de açúcar comparado a *S. cerevisiae*, e requer condições microaerófilas para produção de etanol (Agbogbo e Coward Kelly, 2008).

Em leveduras como a *S. cerevisiae*, o etanol pode ser produzido sob uma concentração de açúcar relativamente baixa, até em condições aeróbicas. Esse fenômeno é conhecido como efeito Crabtree. Ao contrário de *S. cerevisiae*, a *P. stipitis* é uma levedura de metabolismo respiratório, que produz pouco etanol sob condições aeróbicas, mesmo em excesso de açúcar (Klinner et al. 2005). A escolha para produzir etanol ou massa celular em *P. stipitis* depende do suprimento de O₂ para as células. Em uma proporção de aeração alta apenas massa celular é produzida, e a uma baixa proporção de aeração etanol é produzido (du Preez. 1994). Porém esta levedura não apresenta crescimento quando esta submetida a condições de anaerobiose (Jeffries., 2007).

A capacidade desta levedura de converter xilose a etanol, a torna fundamental em processos de conversão de resíduos lignocelulosicos a etanol. Porém o sistema de transporte é uma fase limitante no consumo de xilose por *P. stipitis* (Legthelm et al.1988). Esta levedura possui um sistema do tipo simporte de prótons de alta e baixa afinidade que operam simultaneamente. O sistema de baixa afinidade é partilhado entre xilose e glicose. A glicose inibe de modo não competitivo a assimilação de xilose e sob condições de crescimento similares o consumo de glicose é maior que o de xilose. Neste contexto inúmeros trabalhos visam à modificação de *S. cerevisiae* para metabolizar xilose através dos recursos de genes da *P. stipitis*. Porém muito menos esforços têm sido feitos na engenharia de *P. stipitis* para aumentar o metabolismo de xilose (Jeffries 2008). O desenvolvimento de uma linhagem para aumentar a proporção de fermentação e tolerância a etanol é ainda necessária.

4.5.1 Ciclo de vida da *Pichia stipitis*

A ascoesporulação em *P. stipitis* é geralmente precedida por conjugação entre células independentes ou entre células parentais e seus brotos de germinação. Na maturidade, os ascos contêm geralmente dois ascósporos em forma de chapéu. A

espécie é homotática. A reprodução vegetativa é por brotamento multilateral. Ocasionalmente, pseudohifas pobremente diferenciadas são formadas (Jeffries et al,1994). A ploidia tem sido difícil de ser estabelecida, mas em geral as linhagens naturais são normalmente haplóides (Gupthar, 1994; ; Melake et al, 1996).

A mudança de um meio rico para um pobre induz à fusão celular, a cariogamia e a meiose. Contudo quando os zigotos são transferidos de volta às condições ricas antes de a meiose ter sido iniciada, eles podem existir como diplóides estáveis vegetativamente (fig.4).

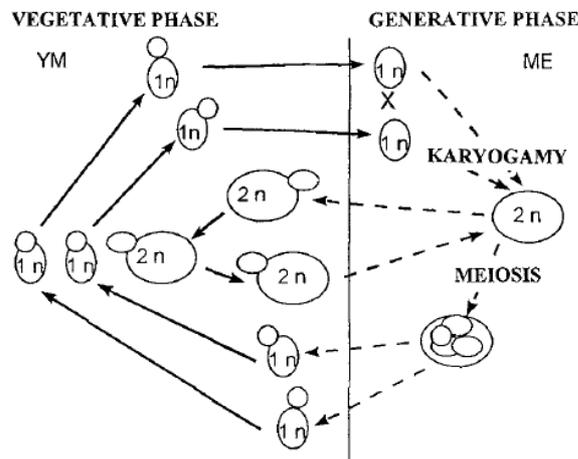


Fig.4 Esquema preliminar do ciclo de vida de *P.stipitis* (Melake et al.1996) (YM: meio com glicose,extrato de levedura e peptona; ME: meio com extrato de malte; n: nível de ploidia).

A estabilidade de diplóides em *P.stipitis* foi confirmada a partir da hibridização parassexual. Foi realizada a fusão de protoplastos entre pares de mutantes auxotróficos. Os resultantes prototróficos produzidos foram estáveis e mostraram apenas uma rara segregação mitótica de aproximadamente 10^{-3} . O caráter híbrido foi confirmado pelos resultados da isolamento dos esporos, que demonstraram heteroziguidade dos prototróficos formados (Melake et al. 1996).

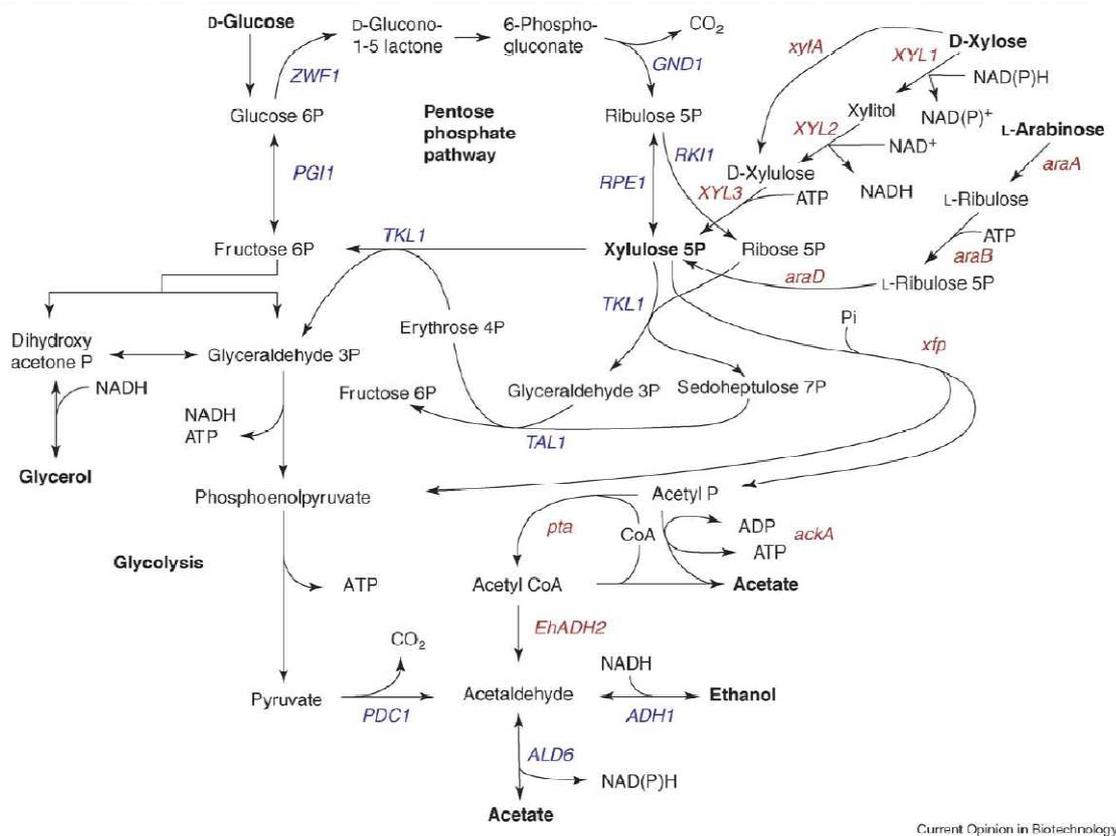
Se ocorrer a meiose, o número esperado de esporos é quatro por asco, e todos os núcleos resultantes da meiose são envelopados por uma parede de esporo. Em algumas leveduras, a ocorrência de dois esporos é explicada por um processo chamado apomixia. Esse processo reprodutivo é caracterizado pela produção de estruturas sexuais e, por outro lado pela falta de meiose e cariogamia (Bilinski et al. 1989) ambos processos ocorrem em *P.stipitis*. Embora em linhagens selvagens somente dois esporos por asco é observado, existem híbridos com uma alta freqüência de esporulação e algumas vezes desenvolvem de três a quatro esporos por asco. Portanto, a produção de ascos com dois esporos parece não ser determinado geneticamente em *P.stipitis* (Melake et al.1996).

4.5.2 Metabolismo redox da *P.stipitis* para o metabolismo de xilose

A via da pentose fosfato (PPP) que é a rota bioquímica para o metabolismo de xilose que é encontrada em praticamente todos os organismos, provendo D-ribose para biossíntese de ácidos nucléicos, D-eritrose 4-fosfato para síntese de aminoácidos aromáticos e NADPH para reações anabólicas. A PPP é considerada como tendo duas fases. A fase oxidativa converte a hexose, D-glicose-6P, na pentose, D-ribulose 5P, além de CO₂ e NADPH. A fase não oxidativa converte D-ribulose 5P em D- ribose 5P, D-sedohepitulose 7P, D-eritrose 4P, D-frutose 6P e D-gliceraldeído 3P. A D-xilose e a L-arabinose entram na PPP através da D-xilulose (fig.5). Em bactérias a conversão de xilose a xilulose ocorre pela via da xilose isomerase. Em leveduras, fungos filamentosos e outros eucariontes isto procede por duas fases a redução e a oxidação, que são mediadas pelas enzimas xilose redutase (XYL1,Xyl1p) e xilitol desidrogenase (XYL2,Xyl2p), respectivamente. A necessidade de co-fatores dessas reações afeta a demanda celular por oxigênio (Jeffries, 2006).

A xilose redutase, utiliza tanto NADPH como NADH como cofatores na reação de redução da xilose a xilitol. Já a xilitol desidrogenase, somente utiliza o NAD na reação de xilitol a xilulose.. O acoplamento das atividades da XYL1 e XYL2, portanto, tende a resultar no consumo de NADPH e acúmulo de NADH. Ao mesmo tempo, a produção de NADH em excesso surge durante o crescimento sob condições limitantes de oxigênio. Assim, quando as células são cultivadas em meio com xilose em condições

limitantes de oxigênio, o excesso de NADH, e conseqüente depleção de NAD⁺, tende a paralisar o metabolismo dessas células (Jeffries., 2008).



Current Opinion in Biotechnology

Fig.5 Integração dos metabolismos de glicose e xilose. Os genes de levedura são mostrados em letras maiúsculas em *itálico*, os genes de bactérias minúsculas em *itálico* (Jeffries, 2006).

Na espécie *P. stiptis* esse desequilíbrio redox pode ser resolvido de várias maneiras. Em cultivos em xilose sob condições limitantes de oxigênio ocorre a indução da expressão do gene *GDH2* que codifica a enzima glutamato desidrogenase dependente de NAD⁺ (fig.6) (Jeffries et al., 2007). Esta enzima consome NADH para converter 2-ceto-glutarato (AKG) em glutamato, que pode então ser descarboxilado pela glutamato descaboxilase 2 (GAD 2) para formar 4- aminobutirato (4-AB). A desaminação de 4-AB pela 4-aminibutirato aminotransferase (codificada pelo gene *UGA1.1* ou *UGA1.2*) produz succinato semialdeído, que é finalmente oxidado para succinato pela succinato semialdeído desidrogenase dependente de NADP⁺ (codificado pelo gene *UGA2*). O succinato gerado é incorporado no ciclo de Krebs (fig. 6).Entretanto, AKG é

normalmente convertido a succinato no próprio ciclo de Krebs pela ação da 2-ceto-glutarato desidrogenase (KGD) com a geração de NADH. Durante o crescimento em xilose sob limitação de oxigênio, a enzima KGD sofre, inibição alostérica pelo excesso de NADH, além da própria repressão sofrida pelo gene KGD2 (fig.6). Como o gene GDH2 é induzido nessa condição, a produção da proteína Gdh2 atua na resolução do desequilíbrio redox. Além disso, os níveis de transcrição do gene IDH1, que codifica a isocitrato desidrogenase e do gene SDH1, que codifica a succinato desidrogenase são maiores quando as células estão crescendo em xilose em condições limitadas de oxigênio, contribuindo para aquele desvio metabólico pela enzima Gdh2 (Jeffries., 2008) Este desvio foi induzido em *S. cerevisiae*, onde tem alguns dos mesmos efeitos (Grotkjaer, 2005), mas parece existir naturalmente em *P. stipitis* (Jeffries., 2008).

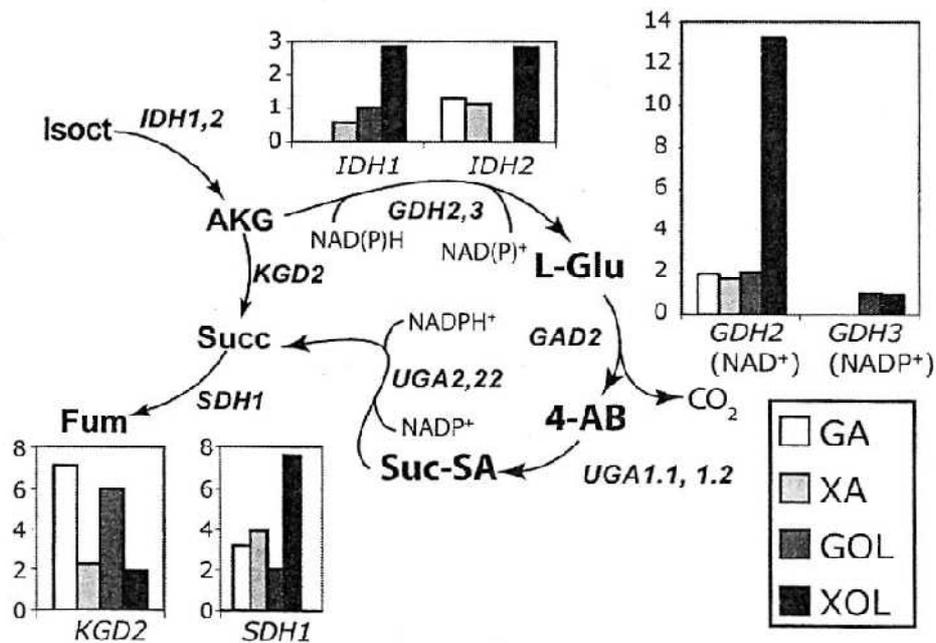


Fig.6 Via metabólica alternativa em *Pichia stipitis* pela glutamato desidrogenase para manutenção do desequilíbrio redox gerado pela assimilação de xilose . GA, glicose em aeróbiose; XA, xilose em aeróbiose; XOL, xilose em oxigênio limitado (Jeffries et al., 2007).

Além disso, a *P.stipitis* possui um complexo sistema respiratório oxidativo que contém uma cadeia de transporte de elétrons com e sem citocromo na mitocôndria. A cadeia de transporte de elétrons sem citocromo é a via sensível ao ácido hidroxâmico

salicílico (SHAM). Esta via, permite o controle sobre o metabolismo redox, diminuindo a formação de xilitol, gerado pelo desbalanço de NADH/NAD⁺ durante a assimilação de xilose (Jeppson et al,1995). A deleção do gene que codifica o citocromo c de *P.stiptis* resultou em um mutante que utiliza a via respiratória sensível a SHAM para produção de energia aeróbica. O mutante produzido apresenta taxa de crescimento 50% menor do que a linhagem parental em presença de açúcar fermentável, e tem um rendimento de etanol 21% maior que a linhagem parental (Shi et al,1999). Num outro trabalho foi mostrado que uma enzima NADPH desidrogenase que não transloca prótons esta ligada a enzima terminal oxidase sensível a SHAM em células que metabolizam xilose, e serve como um regulador funcional no complexo redox de *P.stiptis* (Shi et al,2002).

Outra via pela qual *P. stiptis* parece usar redutores em excesso quando cresce em xilose é através da indução de genes para a síntese de lipídios. Os dados preliminares baseados em etiquetas de seqüências expressas indicam que a transcrição dos genes FAS2, que codifica a ácido graxo sintase, e *OLE1* que codifica a enzima estearoil coenzima A desaturase são induzidas sob condições limitantes de oxigênio (fig. 7) (Jeffries, 2008).

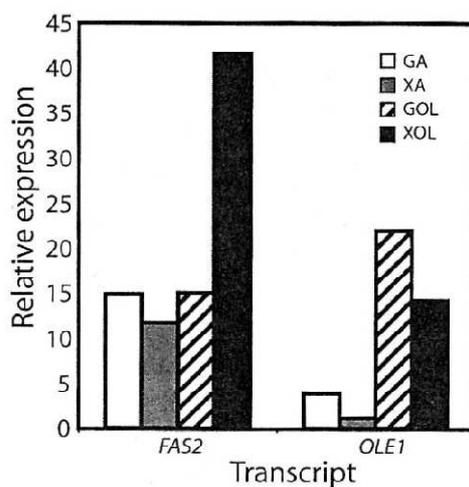


Fig.7 A indução de transcritos para síntese de lipídeos sob condições limitantes de oxigênio. Abreviações: GA, glicose em aerobiose; XA, xilose em aerobiose; GOL, glicose em condições limitantes de oxigênio; XOL, xilose em condições limitantes de oxigênio (Jeffries et al, 2008).

4.5.3 Engenharia metabólica em *P.stipitis*

A modificação de reações bioquímicas específicas ou introdução de novas vias com o uso da tecnologia do DNA recombinante constituem o que hoje é denominado de engenharia metabólica. Esta tecnologia se divide em uma etapa analítica, na qual são analisados parâmetros bioquímicos e fisiológicos para identificar o alvo mais promissor para manipulação genética e em uma etapa de engenharia genética das células, na qual as modificações genéticas são geradas (Olsson e Nielsen, 2000; Ostergaard et al, 2000).

O aumento da produção de NADPH citosólico em *P.stipitis* poderia propiciar maior assimilação de xilose através da xilose redutase. Esta estratégia pode ser testada pela deleção do gene *PGI1* que codifica a enzima fosfoglucose isomerase que isomeriza a glicose-6-fosfato em frutose-6-fosfato. Quando este gene é deletado, a dissimilação da glicose-6-fosfato (6 glu) é feita quase que inteiramente pela via das pentoses fosfato (PP). A primeira reação da via PP envolve a oxidação de 6-glu à lactona correspondente pela ação da enzima 6-glicose desidrogenase dependente de NADP, codificada pelo gene *ZWF1* (fig.5). Estudos prévios mostraram que o mutante $\Delta pgi1$ de *S.cerevisiae*, não foi capaz de crescer em presença de glicose, pois esta levedura não possui uma via eficiente de regeneração deste NADPH em excesso (Bole et al,1993). Já em *P.stipitis* esse problema pode ser superado pelo consumo de xilose, devido a esta levedura possuir uma xilose redutase, com alta afinidade pelo NADPH. Portanto, a deleção do *PGI1* poderia conduzir a rota metabólica de assimilação da glicose pela via PP e isto poderia induzir a maior assimilação de xilose pela necessidade de regeneração de NADPH pela atividade da xilose redutase (Figura 8).

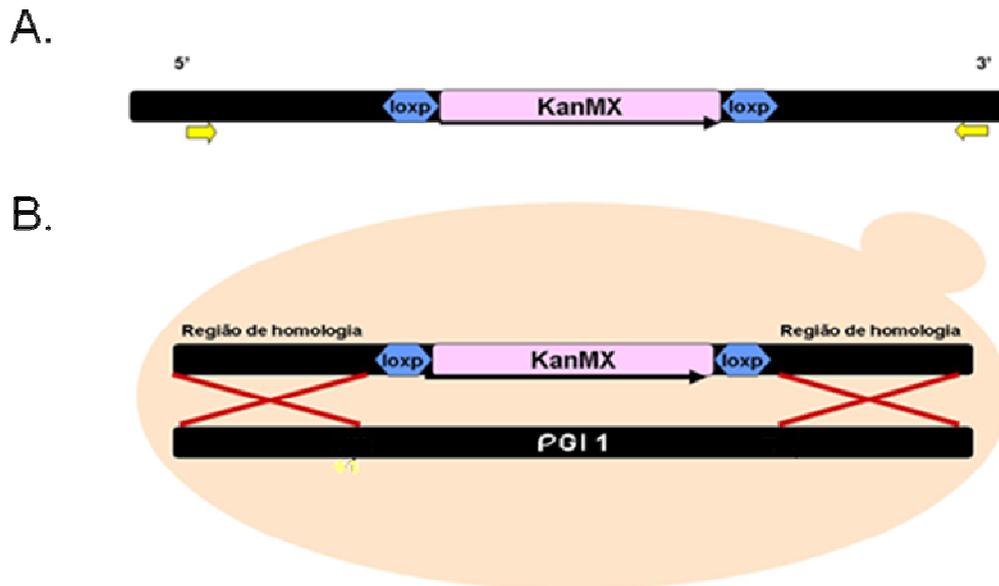


Figura.9. Estratégia para deleção gênica a partir da amplificação de um cassete de integração. **A.** Construção do cassete de integração com regiões de homologia usando iniciadores com sequências híbridas (setas em amarelo). **B.** Recombinação homóloga e interrupção gênica da linhagem-alvo pela transformação celular com o cassete de integração.

5. Referências Bibliográficas

Agbogbo, F.K.; Coward-Kelly G. (2008). Cellulosic ethanol production using the naturally occurring xylose-fermenting yeast, *Pichia stipitis*. **Biotechnol Lett** 30:1515-1524.

Agbogbo, F.K.; Coward-Kelly, G.; Torry-Smith, M.; Wenger, K.S. (2006). Fermentation of glucose/xylose mixtures using *Pichia stipitis* **Process Biochemistry** 41: 2333–2336.

Almeida, J.R.; Modig, T.; Petersson, A.; Hahn-Hägerdal, B.; Liden, G.; Gorwa-Grauslund, M.-F. (2007). Increased tolerance and conversion of inhibitors in lignocellulosic hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Chem. Technol. Biotechnol.** 82, 340–349.

Antoni, D.; Zverlov, V.V.; Schwarz, W.H. (2007). Biofuel from microbes. **Appl Microbiol Biotechnol** 77, 23-35.

- Badger, P.C. (2002). Ethanol From Cellulose: A General Review. Trends in new crops and new uses. **ASHS Press**, Alexandria, VA.
- Balat, M.; Balat, H.; Cahide, O.Z. (2008). Progress in bioethanol processing. **Prog. Energ. Combust.** 34, 551–573.
- Bandoni, R. J. (1987). Taxonomic overview of the Tremellales. **Stud. Mycol.** 30: 87-110.
- Bilinski, C.A.; Marmioli, N.; Miller, J.J. (1989) Apomixis in *Saccharomyces cerevisiae* and other eukaryotic micro-organisms. **Adv Microb Physiol** 30:23-52.
- Boles, E.; Lehnert, W. & Zimmermann, F. K. (1993). The role of the NAD-dependent glutamate dehydrogenase in restoring growth on glucose of a *Saccharomyces cerevisiae* phosphoglucose isomerase mutant. **Etlr J Biochem** 217, 469477.
- Cerqueira Leite, R.C.; Leal, M.R.L.V.L.; Cortez, L.A.B.; Griffin, W.M.; Scandiffio, M.I.G., (2009). Can Brazil replace 5% of the 2025 gasoline world demand with ethanol? **Energy** 34, 655–661.
- Cortez, L.A.B.; Lora, E.E.S.; Gómez, E.O. (2008). **Biomassa para Bioenergia**. UNICAMP, Campinas.
- du Preez, J.C. (1994). Process parameters and environmental factors affecting D-xylose fermentation by yeasts. **Enzyme Microb Technol** 16:944–956.
- Eriksson, O. E.; Winka, K. (1997). Supraordinal taxa of Ascomycota. **Myconet** 1: 1-16.
- Excoffier, G.; Toussaint, B.; Vignon, M.R. (1991). Saccharification of steam-exploded poplar wood. **Biotechnol. Bioeng.** 38, 1308–1317.
- Fernandes, A.P.F.V. Leveduras isoladas de produtos frutícolas:Capacidade fermentativa e estudos sobre a H⁺-ATPase da membrana plasmática. **Tese de Doutorado**.Faculdade de Ciência e Tecnologia. Universidade Nova de Lisboa, 2008.
- Fukuda, H.; Kondo, A.;Tamalampadi, J. (2009). Bioenergy: Sustainable fuels from biomass by yeast and fungal whole-cell biocatalysts. **Biochemical Engineering Journal** 44, 2-12.
- Gámez, S.; González-Cabriales, J.J.; Ramírez, J.A.; Garrote, G. (2006). Study of the hydrolysis of sugar cane bagasse using phosphoric acid. **J. Food Eng.** 74, 78–88.
- Goldemberg, J. (2007). Ethanol for a sustainable energy future. **Science** 315, 808-810.
- Gray, K.A.;Zhao, L.; Emptage, M. (2006).Bioethanol. **Current Opinion in Chemical Biology** . 10, 141–146.

Grotkjaer, T.; Christakopoulos P, Nielsen, J.; Olsson, L. (2005) Comparative metabolic network analysis of two xylose fermenting recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strains. **Metab Eng.** 7, 437-444.

Gueiros, R.S. (2006). Otimização das técnicas de manipulação genética de leveduras industriais para aplicação na produção de álcool combustível. **Dissertação de Mestrado**. Departamento de Ciências Biológicas. UFPE. Recife-PE.

Guldener, U.; Heck, S.; Fieldler, T.; Beinhauer, J.; Hegemann, J.H. (1996). A new efficient gene disruption cassette for repeated use in budding yeast. **Nucleic Acids Research.** 24, 2519-2524.

Gupthar, A.S. (1994). Theoretical and practical aspects of ploidy estimation in *Pichia stipitis*. **Mycol Res** 98:716-718.

Hahn-Hägerdal, B.; Galbe, M.; Gorwa-Grauslund, M-F.; Liden, G.; Zacchi, G. (2006). Bio ethanol—the fuel of tomorrow from the residues of today. **Trends Biotechnol** 24(12):549–556

Hendriks, A.T.W.M.; Zeeman, G., (2009). Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. **Biores. Technol.** 100, 10–18.

Hernández-Salas, J.M.; Villa-Ramírez, M.S.; Veloz-Rendón, J.S.; Rivera-Hernández, K.N.; González-César, R.A.; Plascencia-Espinosa, M.A.; Trejo-Estrada, S.R. (2009). Comparative hydrolysis and fermentation of sugarcane and agave bagasse. **Bioresour. Technol.** 100, 1238–1245.

IEA-Agência Internacional de Energia. Disponível em: [http:// www.iea.org](http://www.iea.org) Acesso em : setembro de 2010.

Inácio, J.; Pereira, P.; de Carvalho, M.; Fonseca, Á.; Amaral-Collaco, M. T.; Spencer-Martins, I. (2002). Estimation and diversity of phylloplane mycobiota on selected plants in a Mediterranean-type ecosystem in Portugal. **Microbiol. Ecol.** 44: 244-353.

Jacobsen, S.E.; Wyman, C.E. (2002). Xylose monomer and oligomer yields for uncatalyzed hydrolysis of sugarcane bagasse hemicellulose at varying solids concentration. **Ind. Eng. Chem. Res.** 41, 1454–1461.

Jeffries, T.W. (2006). Engineering yeasts for xylose metabolism. **Current Opinion in Biotechnology.** 17, 320–326.

Jeffries, T.W. (2008). Engineering the *Pichia stipitis* genome for fermentation of hemicellulose hydrolysates. Bioenergy (Wall JD, Harwood CS & Demain A, eds), pp. 37–47. **ASM Press**, Washington, DC.

Jeffries, T.W.; Grigoriev, I.V.; Grimwood, J.; Laplaza, J.M.; Aerts, A.; Salamov, A.; Schmutz, J.; Lindquist, E.; Dehal, P.; Shapiro, H.; Jin, Y-S.; Passoth, V.; Richardson,

P.M. (2007). Genome sequence of the lignocellulose-bioconverting and xylose fermenting yeast *Pichia stipitis*. **Nat Biotechnol** 25(3): 319–326.

Jeffries T.W. & Kurtzman C.P. (1994). Strain selection, taxonomy, and genetics of xylose-fermenting yeasts. **Enzyme Microb. Technol.** vol.16.

Jeppsson, H.; Alexander, N.J.; Hahn-Hagerdahl, B. (1995) Existence of cyanide-insensitive respiration in the yeast *P.stipitis* and its possible influence on product formation during xylose utilization. **Appl Environ Microbiol** 61(7):2596–2600

Kilian, S.G.; van Uden, N. (1988). Transport of xylose and glucose in the xylose fermenting yeast *Pichia stipitis*. **Appl Microb Biotechnol** 27, 545–548.

Klinner U.; Fluthgraf S.; Freese S.; Passoth V. (2005). Aerobic induction of respire fermentative growth by decreasing oxygen tensions in the respiratory yeast *Pichia stipitis*. **Appl Microbial Cell Physiol** 67:247–253.

Kurtzman, C. P. (1994). Molecular taxonomy of the yeasts. **Yeast** 10: 1727-1740.

Legthelm, M.E.; Prior, J.C.; du Preez, J.C.; Brandt, V. (1988). Na investigation of D-xylose metabolism in *Pichia stipitis* under aerobic and anaerobic conditions. **Appl Microb Biotechnol** 28:293–296

Linoj, K.N.V., Dhavala, P., Goswami, A., Maithel, S., (2006). Liquid biofuels in South Asia: resources and technologies. **Asian Biotechnol. Develop. Rev.** 8, 31–49.

Martín, C.; Klinke, H.B.; Thomsen, A.B. (2008). Wet oxidation as a pretreatment method for enhancing the enzymatic convertibility of sugarcane bagasse. **Enzyme Microb. Technol.** 40, 426–432.

Melake, T.; Passoth, V.; Klinner, U. (1996). Characterization of the genetic system of the xylose fermenting yeast *Pichia stipitis*. **Current Microbiology** vol.33:237–242.

Meyer, A.S.; Rosgaard, L.; Sørensen, H.R. (2009). The minimal enzyme cocktail concept for biomass processing. **J. Cereal Sci.** 50, 337–344.

Nagahama, T.; Hamamoto, M.; Nakase, T.; Takami, H.; Horikoshi, K. (2001). Distribution and identification of red yeasts in deep-sea environments around the northwest Pacific Ocean. **Antonie Leeuwenhoek** 80: 101–110.

Oberwinkler, F. (1987). Heterobasidiomycetes with ontogenic yeast-stages. Systematic and phylogenetic aspects. **Stud. Mycol.** 30: 61-74.

Ojeda, K., Kafarov, V. (2009). Energy analysis of enzymatic hydrolysis reactors for transformation of lignocellulosic biomass to bioethanol. **Chem. Eng. J.** doi:10.1016/j.cej.2009.05.032.

Olsson, L.; Nielsen, J.(2000). The role of metabolic engineering in the improvement of *Saccharomyces cerevisiae*: utilization of industrial media. **Enzyme and Microbial Technology**, 26:785-792.

Ostergaard, S.; Olsson, L.;Nielsen,J.(2000) Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, 64(1),34-50, 2000.

Pandey, A.; Soccol, C.R.; Nigam, P.; Soccol, V.T. (2000). Biotechnological potential of agro-industrial residues. Part I. Sugarcane bagasse. **Bioresour. Technol.** 74, 69– 80.

Perez,J.; Muñoz-Dourado, J.; de la Rubia, T.; Martinez, J. (2002). Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. **Int Microbiol**, 5, 53-63.

Phaff, H. J.; Miller, M. W.; Mrak, E. M.(1978). The Life of Yeasts. 2nd edition, **Harvard University Press**, Cambridge (USA) and London.

Ramos, L.P.; Breuil, C.; Kushner, D.J.; Saddler, J.N. (1992). Steam pretreatment conditions for effective enzymatic hydrolysis and recovery yields of *Eucalyptus viminalis* wood chips. **Holzforschung** 46, 149–154.

Regenberg,B.; Hansen,J.(2000) GAP1, a novel selection and counter-selection marker for a multiple gene disruptions in *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, 16,1111-1119.

Sanchez, O.J.; Cardona, C.A. (2008). Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks, **Bioresour. Technol.** 99, 5270–5295.

Sanjuan, R.; Anzaldo, J.; Vargas, J.; Turrado, J., Patt, R. (2001). Morphological and chemical composition of pith and fibres from Mexican sugarcane bagasse. **Holz als Roh-und Werkstoff** 59, 447–450.

Shi, N-Q.; Cruz, J.; Sherman, F.; Jeffries, T.W. (2002). SHAM-sensitive alternative respiration in the xylose-metabolizing yeast *Pichia stipitis*. **Yeast** 19:1203–1220

Shi, N-Q.; Davis, B.; Sherman, F.; Cruz, J.; Jeffries, T.W. (1999). Disruption of the cytochrome c gene in xylose-utilizing yeast *Pichia stipitis* leads to higher ethanol production. **Yeast** 15:1021–1030

Soccol,C.R.;Vandembergue,L.P.S.;Medeiros,A.B.P.;Karp,S.G.;Buckeridge,M.;Ramos,L .P.;Pitarelo, A.P.; Ferreira-Leitão, V.; Gottschalk, L.M.F.; Ferrara, M.A.; Bom, E.P.S.; Moraes, L.M.P.; Araújo,J.A.;Torres, F.A.G.(2010). Bioethanol from lignocelluloses: Status and perspectives in Brazil. **Bioresource Technology** 101, 4820-4825.

Steensma, H.Y. and Ter Lind, J.J.M. (2001). Plasmids with the Cre-recombinase and the dominant *nat* marker, suitable for use in prototrophic strains of *Saccharomyces cerevisiae* and *Kluyveromyces lactis*. **Yeast**, 18, 469-472.

Swann, E. C.; Taylor, J. W. (1995). Toward a phylogenetic systematics of the basidiomycota: Integrating yeasts and filamentous basidiomycetes using 18S rRNA gene sequences. **Stud. Mycol.** 38: 147-161

United Nations Conference on Trade and Development (UNCTAD), (2006). Challenges and opportunities for developing countries in producing biofuels. **UNCTAD publication**, UNCTAD/DITC/COM/2006/15, Geneva, November 27.

van Maris, A. J. A. D. A.; Abbott, E.; Bellissimi, J.; van den Brink, M.; Kuyper, M. A. H.; Luttik, H. W.; Wisselink, W. A.; Scheffers, J. P.; van Dijken, J. T.; Pronk. (2006). Alcoholic fermentation of carbon sources in biomass hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*: current status. **Antonie van Leeuwenhoek** 90, 391-418

Walker, G. M. (1998). Introduction to yeasts. **In Yeast Physiology and Biotechnology**. pp 1-10. John Wiley & Sons Ltd, Chichester, UK.

Wilkie, A.C.; Riedesel, K.J.; Owend, J.M. (2000) Stilage characterization and anaerobic treatment of ethanol stillage from conventional and cellulosic feed stocks, **Biomass Bioenergy** 19, 63–102.

Zhang, Y.P.; Ding, S.; Mielenz, J.R.; Cui, J., (2007). Fractionating recalcitrant lignocellulose at modest reaction conditions. **Biotechnol. Bioeng.** 97, 214–223.

6.Artigo Científico

Deleção do gene *PGI1* de *Pichia stipitis* para aumentar o rendimento fermentativo a etanol.

André Ribas de Miranda¹, Diogo Ardaillon Simões^{1,2} Marcos Antonio de Moraes Junior^{1,3}

¹Núcleo de Engenharia Metabólica, ²Departamento de Bioquímica e ³Departamento de Genética. Universidade Federal de Pernambuco. Recife, PE, Brasil.

RESUMO

A demanda por novas fontes de energia tem conduzido as pesquisas para um maior aproveitamento das biomassas residuais como matéria prima para os biocombustíveis. Entre os resíduos lignocelulósicos, destacam-se, o bagaço de cana e de beterraba, a palha de cereais e os resíduos da indústria de madeira. A composição dessas biomassas varia bastante, mas em geral os substratos lignocelulósicos são constituídos de celulose (homopolímero de glicose), hemicelulose (heteropolímero de hexoses e pentoses) e pela lignina (compostos aromáticos). A levedura *Pichia stipitis* pode converter xilose a etanol com rendimentos industrialmente relevantes. Porém necessita de condições limitantes de oxigênio, além do consumo da glicose inibir de modo não competitivo a xilose e sob condições de crescimento similares o consumo de glicose é maior que o de xilose. Com base na análise da via metabólica desta levedura, o presente trabalho teve como objetivo redirecionar o fluxo metabólico da via glicolítica para via das pentose fosfato dentro do que se chama modernamente de Engenharia Metabólica. O gene *PGII* codificador da fosfoglicose isomerase foi completamente removido do genoma da linhagem NRRL 7124 com o uso de fragmentos de PCR que continham seqüências com mais de 350 bp de homologia com as regiões 5' e 3' do gene alvo. Quando este gene foi deletado, a assimilação da glicose-6-fosfato foi desviado para via da pentose fosfato como atestado pela queda da velocidade de crescimento do mutante em glicose. O rendimento em etanol a partir de glicose foi calculado em 0,42 g/g, a transformante apresentou um rendimento de 0,33 g/g. No meio com glicose e xilose (1:1) o rendimento foi de 0,40 g/g para ambas as linhagens quando a fonte de nitrogênio foi o amônio. Na fermentação com glutamato foi observada a assimilação de glicose concomitante com xilose na transformante, além de uma maior produtividade em etanol.

Palavras chaves: engenharia metabólica, fermentação alcoólica, metabolismo redox, modificação genética, *Pichia stipitis*

1. Introdução

A busca por novas fontes de energia renováveis tem contribuído para pesquisas em torno de resíduos agroindustriais. Contudo a utilização da biomassa lignocelulósica ainda permanece em escala laboratorial. Em geral os substratos lignocelulósicos são constituídos de celulose (homopolímero de glicose), hemicelulose (heteropolímero de hexoses e pentoses) e pela lignina (compostos aromáticos) (van Maris et al 2006). A celulose e hemicelulose representam uma alternativa sustentável para aumentar a produção de biocombustível e para aumentar o balanço energético, com menos contribuição para o efeito estufa (Hahn-Hagerdal et al., 2006). A bioconversão de materiais lignocelulósicos a etanol deve ocorrer em taxas elevadas, com bom rendimento fermentativo. Embora facilmente alcançado com a sacarose e amido presentes nas matérias primas esses objetivos são muito mais difíceis com a celulose e hemicelulose. Um dos desafios é que a levedura *Sacharomyces cerevisiae* utilizada em usinas destiladoras de álcool, por possuir um bom rendimento fermentativo da fração de hexoses, não seria totalmente aproveitada na fermentação dos compostos lignocelulósicos, por não fermentar as pentoses presentes na hemicelulose, que representam de 15% a 35% do total lignocelulósico e sua conversão a etanol é bastante expressiva (Hahn-Hagerdal et al., 2006; van Maris et al 2006).

Algumas leveduras podem converter xilose (pentose), o segundo açúcar mais abundante da lignocelulose a etanol com rendimentos industrialmente relevantes, como é o caso de *Pichia stipitis*. Ao contrário de *S. cerevisiae*, esta é uma levedura respiratória, que não produz etanol sob condições aeróbicas, mesmo em excesso de açúcar (Klinner et al.2005). A escolha para produzir etanol ou massa celular em *P.stipitis* depende do suprimento de O₂ para as células. Em uma proporção de aeração alta apenas massa celular é produzida, e a uma baixa proporção de aeração etanol é produzido (du Preez.1994). Porém ela para de crescer em uma geração quando esta submetida a condições de anaerobiose (Jeffries., 2007).

Esta levedura possui um sistema simporte de prótons de alta e baixa afinidade que operam simultaneamente. O sistema de baixa afinidade é partilhado entre xilose e glicose. A glicose inibe de modo não competitivo a xilose e sob condições de crescimento similares o consumo de glicose é maior que o de xilose (Jeffries,2008).

Aumentando o fluxo de NADPH citosólico a *P.stipitis* poderia utilizá-lo para uma maior assimilação de xilose através da xilose redutase. Esta estratégia pode ser analisada deletando o gene fosfoglicose isomerase (PGI1), que isomeriza a glicose-6-fosfato em frutose-6-fosfato. Quando este gene é deletado, a glicose-6-fosfato é inteiramente rotada para via da pentose fosfato. Estudos prévios com o mutante de *S.cerevisiae* deletado para o gene PGI1, mostraram que esta não foi capaz de crescer em presença de glicose, pois esse açúcar é degradado a ribulose-5-fosfato com a concomitante redução de NADP a NADPH, isto gera uma rápida diminuição no nível do NADP que não pode ser regenerado do NADPH rápido suficiente (Bole et al,1993). Na *P.stipitis* esse problema pode ser superado pelo consumo de xilose, devido a esta levedura possuir uma xilose redutase (converte xilose a xilitol) com alta afinidade pelo NADPH.

Hassan K. Sreenath e Thomas Jeffries (1999) analisaram mutantes de *P.stipitis* não reprimidos para o metabolismo das pentoses. Os mutantes FPL-061 derivados da parental CBS 6054, por inibidores respiratórios, foram escolhidos como parentais para crescerem em D-xilose na presença de 2-deoxiglicose. A linhagem mutante FPL-DX26 resultante da seleção do FPL-061, usou a xilose provinda da mistura de glicose:xilose (1:1) mais rapidamente que seus parentes.

Com base nos experimento de Hassan K. Sreenath e Thomas Jeffries (1999) do ponto de vista metabólico, o presente trabalho teve como objetivo o aumento do fluxo de xilose concomitantemente a glicose através da deleção do gene PGI1 na linhagem nativa NRRL7124. Esta modificação tem como alvo a modificação do metabolismo redox de forma a aumentar o rendimento a etanol.

2. Materiais e métodos

2.1. Linhagens e meios de cultura

A linhagem NRRL 7124 de *Pichia stipitis* foi utilizada pela capacidade de produzir etanol a partir de xilose em alto rendimento. As células de levedura foram cultivadas em meio YPD (1% de extrato de levedura, 2% peptona e 2% de glicose), com adição de Agar para 2% para preparação de meio sólido. Para a seleção das células recombinantes o meio YPD sólido foi suplementado com o antibiótico Geneticina G-480 (Invitrogen) para concentração final de 1,2 mg/mL.

A linhagem DH5 α da bactéria *Escherichia coli* foi utilizada para os procedimentos de manipulação genética. As células bacterianas foram cultivadas em meio LB (1% tripton, 0,5% extrato de levedura, 0,5% NaCl e 0,1% NaOH 1N) acrescido de ampicilina 100 μ g/mL para seleção e manutenção das células transformadas. Para meios sólidos foi acrescido de Agar para 2%.

2.2 Extração e Quantificação de DNA

A extração de DNA de levedura foi realizado segundo o protocolo descrito por Silva-Filho et al (2005) como a seguir. Em cada microtubo foi adicionado 1 mL de cultura, e as células foram coletadas por centrifugação a 10000 rpm por 3 minutos a 24°C. O sobrenadante foi descartado e o sedimento celular ressuspenso em 600 μ L de solução tampão de extração (Tris HCl 0,2M pH8,0; EDTA 25mM pH8,0; SDS 1%; NaCl 25mM) e as amostras foram homogeneizadas em vortex e incubadas em banho-maria a 65°C por 30 minutos com agitação por inversão manual a cada 10 minutos. O lisado celular foi extraído com 600 μ L de clorofane (fenol:clorofórmio:álcool isoamílico nas proporções 25:24:1) por agitação vigorosa em vórtex e centrifugados a 13000 rpm por 15 minutos. A fase aquosa (400 μ L) foi transferida para novo tubo e submetida à nova extração com 500 μ L de clorofil (clorofórmio: álcool isoamílico 24:1) como descrito acima. A fase aquosa (superior) foi transferida para novo tubo e o DNA total foi precipitado por adição de 800 mL de etanol absoluto gelado, seguido de incubação por 2 horas a -20°C. O DNA foi coletado por centrifugação a 13000rpm por 15 minutos e o sedimento lavado com 300 μ L de etanol 70%, seco em estufa a 37°C por até 90' e suspenso em 100 μ L de tampão TE (Tris 10 mM e EDTA 1 mM). O DNA total foi quantificado a partir de uma diluição de 1:200 (ex. 3 μ L da solução estoque e 597 μ L

água destilada). Por espectrofotometria em comprimento de onda de $\lambda = 260\text{nm}$. A absorvância da solução foi utilizada para determinar a concentração de DNA, levando em consideração que $1\text{D.O.}260\text{nm} = 50\mu\text{g DNA/mL}$ (SAMBROOK *et al.*, 1989).

2.3 Construção do cassete de interrupção com regiões longas de homologia

O protocolo de transformação de bactérias por cloreto de cálcio descrito por Ausubel *et al.* (1989) foi utilizado para amplificar os plasmídeos em *E. coli* e estes foram extraídos pelo método de lise alcalina (Sambrook *et al.*, 1989).

Para a construção dos cassetes de deleção foram utilizados os pares de primers PGI1 5 for x PGI1 5 rev para amplificar para amplificar 350 pb da região 5' do gene *PGI1* e os pares de primers PGI1-3for e PGI1-3rev 350 pb da região 3' do gene *PGI1* (tabela 1). A reação de amplificação foi preparada para o volume final de 25 μL contendo: 2,5 μL de tampão para PCR 10x; 2,5 mM de MgCl_2 ; 2,5 pmol de cada primer; 0,2mM de dNTPs e 2,5U de *Taq* DNA polimerase. . O DNA foi submetido a amplificação nas seguintes condições: 1 ciclo de 94° por 2 minutos, seguido de 30 ciclos de 94°C por 30 segundos, 50°C por 1 minuto e 30 segundos e 72°C por 3 minutos, com extensão final a 72°C por 7 minutos.

Os fragmentos de PCR gerados foram purificados com kit de purificação PureLink Promega. Estes fragmentos foram ligados em um vetor de passagem pGEM T Easy (Promega) em seguida digeridos com enzimas AatII, NdeI, SpeI e SacII, e ligados no vetor pUG6 ladeando a marca de seleção KanMX. A partir desta construção é gerado um fragmento de DNA de aproximadamente 2,3 Kb contendo cerca de 350 pb da região 5' do gene *PGI1*, a marca genética de seleção e cerca de 350 pb da região 3' do gene *PGI1* (Figura 1).

Tabela 1. Sequências dos primers de amplificação de *PGI1*, construção dos cassetes de interrupção e verificação.

Primer	Sequência	TM (°C)
PGI1 5 for	5'-TCACAAATACACGAAATACATTAACCATAAC-3'	54.5

PGII 5 rev	5'-ACTTGACATTTGTTGAAGGTGCCATCT-3'	59.1
PGII 3 for	5'-GGCTCTGTCTTCGGTCTCATT-3'	57.6
PGII 3 rev	5'-AACTTACAACCATTGCATCACGTATA-3'	56.0

2.5 Análise do gene *PGII* nas células recombinantes

O plasmídeo pUG6 foi digerido com as enzimas AatII e SacII seguindo a instrução do fabricante para liberação do cassete de deleção que foi utilizado para transformar células da levedura pelo método do acetato de lítio (Gietz e Woods, 2002) com a seguinte modificação: etapa de choque térmico por incubação de 42°C por 5 minutos. Após o procedimento de transformação as células foram semeadas em placas de Petri com meio YPD contendo Geneticina G-418 a 1,2 mg/mL. As placas foram incubadas a 30°C e as colônias formadas foram avaliadas para a deleção do gene.

O DNA dos transformantes extraído como descrito acima e testado para verificação da integridade ou ausência do gene *PGII* cromossômico pelo uso de diferentes primers. A posição de hibridização de cada um dos primers no locus *PGII* íntegro e no alelo interrompido deste locus está mostrada na Figura 1.

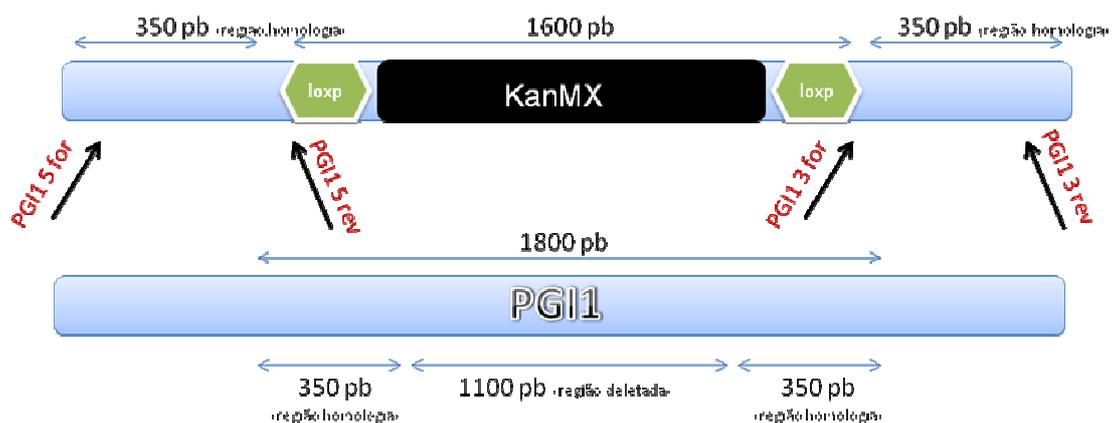


Figura 1. Desenho esquemático da deleção do gene *PGII* de *P.stipitis*. (Superior) Representação do fragmento de integração com a marca *KanMX* entre as porções 5' e 3' do gene *PGII*. (Inferior) Representação da região codificadora do gene *PGII*. As setas em preto representam os locais de reconhecimento dos primers utilizados.

2.6 Análises fermentativas

Preparação do inóculo

Células de colônias de levedura que cresceram após 48h de incubação em YPD sólido foram coletadas e utilizadas para inocular em 10 mL de meio sintético (YNB a 6,7 g/L) contendo glicose ou xilose 2 g/L. As culturas foram incubadas por 24 horas a 30°C a 120 rpm para produção do inóculo.

Determinação da velocidade de crescimento em biorreator

Os cultivos foram realizados em reator de bancada BioFlo 110 (New Brunswick) em dorna de 1 litro. As condições empregadas para curva de crescimento foram às seguintes: temperatura de 28⁰C, agitação de 150 rpm e vazão volumétrica de ar (vvm) a 0,5. O volume de meio de sintético contendo glicose ou xilose foi de 700mL que foi semeado com um volume do inóculo suficiente para a densidade celular de 0,1 O.D. a 600 nm. Amostras foram tomadas em intervalos definidos para determinação da densidade óptica. A D.O. inicial foi de 0,1. Para determinação da taxa específica de crescimento utilizou-se a equação: $X = X_0 e^{\mu t}$, onde X representa a densidade populacional final, X₀ a densidade populacional inicial, o μ é a taxa específica de crescimento e t é o tempo. O valor de μ corresponde ao declive da reta que representa o logaritmo natural da concentração de biomassa em função do tempo durante a fase exponencial de crescimento.

Fermentação no erlenmeyer

As fermentações foram realizadas em erlenmeyers (125mL) em duplicatas, contendo 50 mL de meio fermentativo a uma concentração de 60 g/L de glicose e xilose (1:1) ou apenas glicose, suplementadas com YNB completo ou com YNB sem sulfato de amônia acrescentado de glutamato. A D.O. inicial foi de 0,3. A temperatura foi de 30⁰C e a agitação de 120 rpm. A fermentação foi monitorada por 3 dias com retirada de alíquotas de 2 mL da amostra para análise do açúcar e etanol. Foi calculado o rendimento de etanol com base no consumo de substrato, ou seja, grama de etanol produzida por grama de substrato assimilada (g etanol/g substrato).

Determinação do Teor Alcoólico e Açúcares:

O conteúdo de álcool, glicose e xilose nas amostras foram determinados pelo Sistema de Alta Performance de Cromatografia Líquida (HPLC) com uma coluna analítica BIO-RAD Aminex HPX-87H.

3. Resultados

3.1 Deleção do gene PGI1 da linhagem NRRL 7124

Para a construção dos cassetes de interrupção foram utilizados os pares de primers PGI1 5 for x PGI1 3 rev, para amplificar o DNA de NRRL 7124. A partir destas ampliações é construído o cassete de deleção (PGI1-loxP-KanMX-loxP-PGI1), contendo extremidades com cerca de 350 bp de homologia às regiões 5´ (+1 a +350) e 3´ (+1450 a +1800) do gene PGI1. A linhagem nativa NRRL 7124 foi submetida a transformação com o cassete de deleção cujo DNA estava linear, gerando células transformadas resistentes a geneticina (Figura1).

Foram obtidas apenas três transformantes, os quais foram analisados por PCR com os primers que verificam a integridade do gene PGI1 (PGI1 5 for x PGI1 3 rev). As ampliações de todos os transformantes com os primers PGI1 5 for e PGI1 3 rev confirmaram a integração do cassete de deleção na região de homologia do gene PGI1. Onde apresentaram um fragmento de 2,3kb (Figura 2).

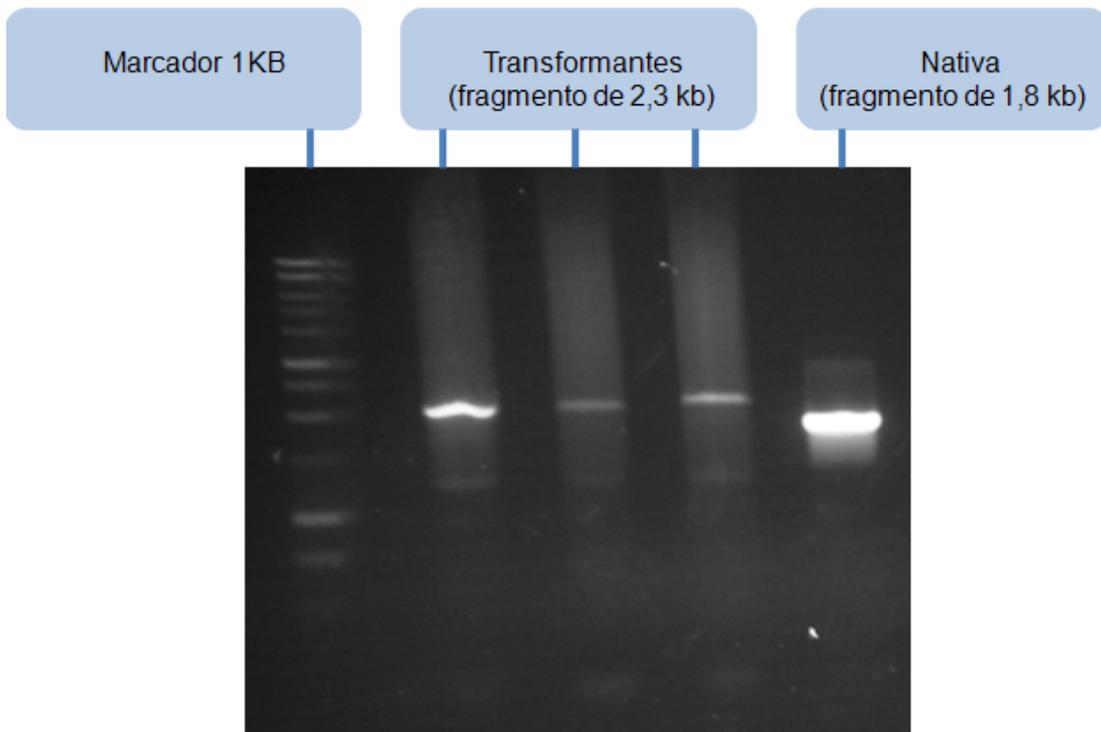


Figura 2. Análise das colônias NRRL 7124. Os poços 2,3 e 4 são os recombinantes. O poço 5 é a cepa nativa. As colônias foram analisadas através dos primers PGI1 5 for e PGI1 3 rev. Onde a banda gerada pelos recombinantes é de 2,3 kb e da cepa nativa de 1,8kb.O poço 1 contem o marcador de 1kb.

3.2 Características do crescimento da levedura *Pichia stipitis* NRRL 7124 e da transformante 7124 Δ PGI1

A taxa específica de crescimento da levedura nativa NRRL7124 em glicose com YNB (YNG) foi de 0,39, já a taxa específica de crescimento para a levedura transformante no mesmo meio foi de 0,23. O pH inicial do meio foi de 4,24 e após 24 horas o pH final foi de 2,20 para levedura nativa. Para a levedura transformante o pH inicial do meio foi de 4,10 e o final após 26 horas foi de 2,20 como mostra a figura 3. A D.O após 26 horas de crescimento foi de 9,9 para a levedura NRRL7124 e de 9,1 após 26 horas para o transformante 7124 Δ PGI1 (fig.3).

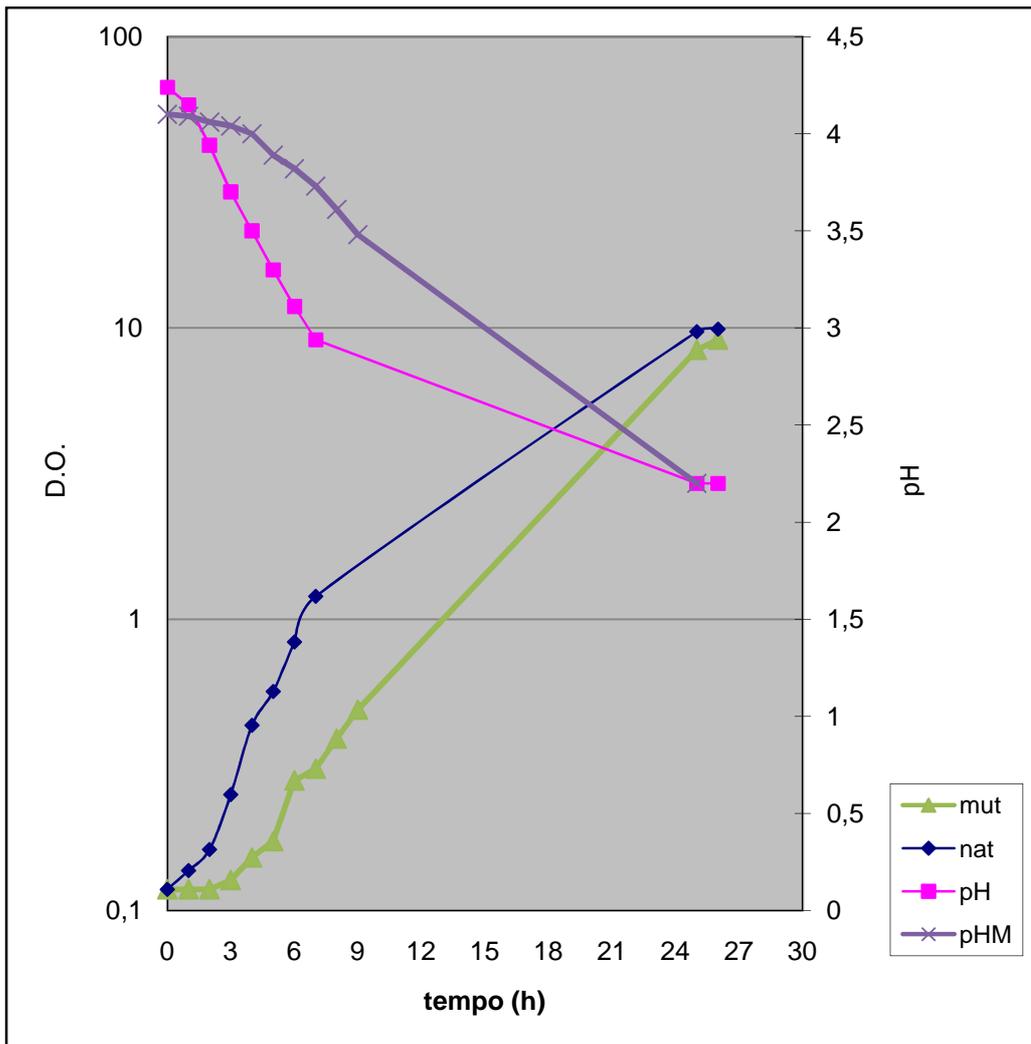


Figura 3. Gráfico da curva de crescimento da levedura NRRL7124 e da levedura 7124 Δ PGI1 em glicose. A curva em azul representa o crescimento da NRRL7124 num período de 26 horas. A curva em verde representa a levedura 7124 Δ PGI1 num período de 26 horas. A curva em rosa representa o pH do meio da levedura nativa num período de 24 horas. A curva em roxo representa o pH do meio da levedura transformante 7124 Δ PGI1 no mesmo período.

A taxa de crescimento específico para nativa em xilose com YNB (YNX) foi de 0,40, para a transformante foi de 0,21. O pH inicial do meio foi de 4,12 e 4,03 e o pH final de 2,20 e 2,80 para nativa e transformante respectivamente. . A D.O após 26 horas de crescimento foi de 9,6 para a levedura NRRL7124 e de 2,7 após 26 horas para o transformante 7124 Δ PGI1 (fig.4).

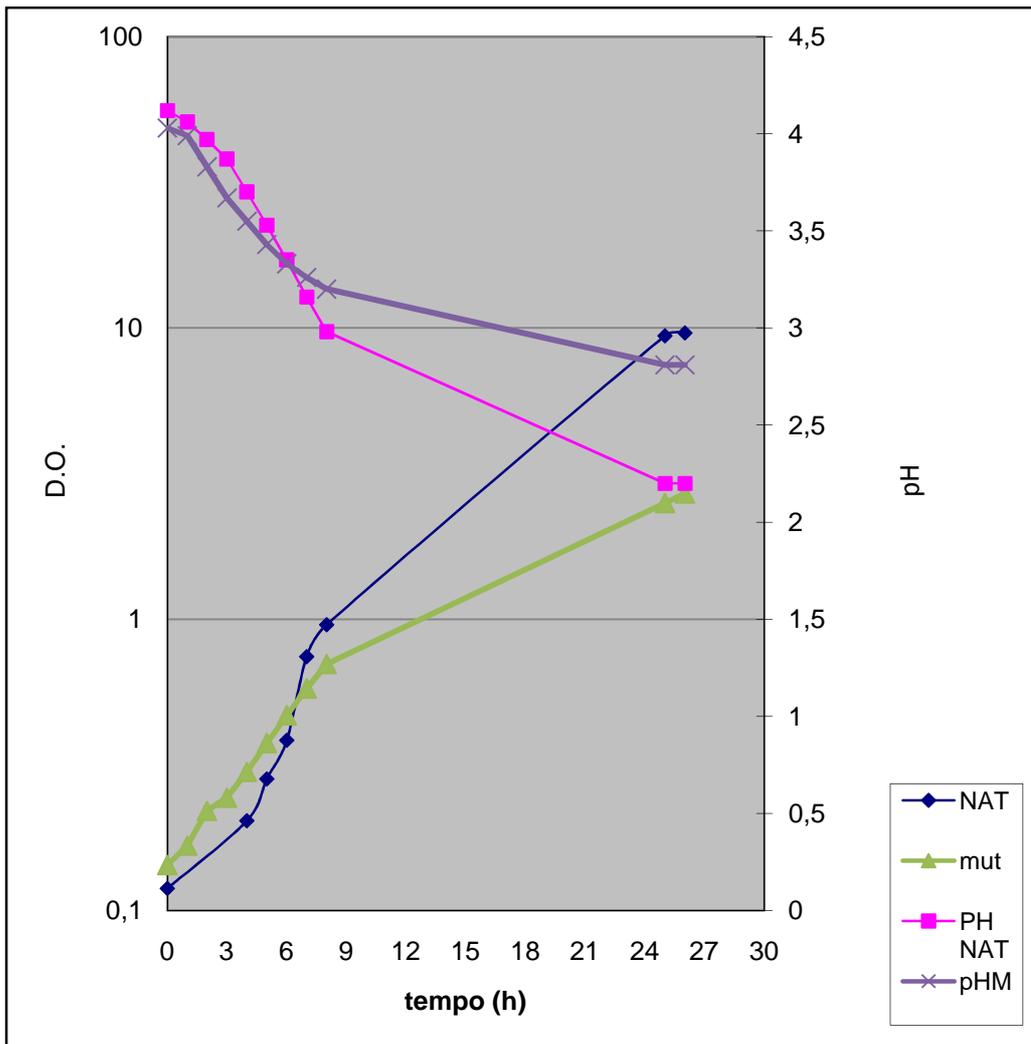


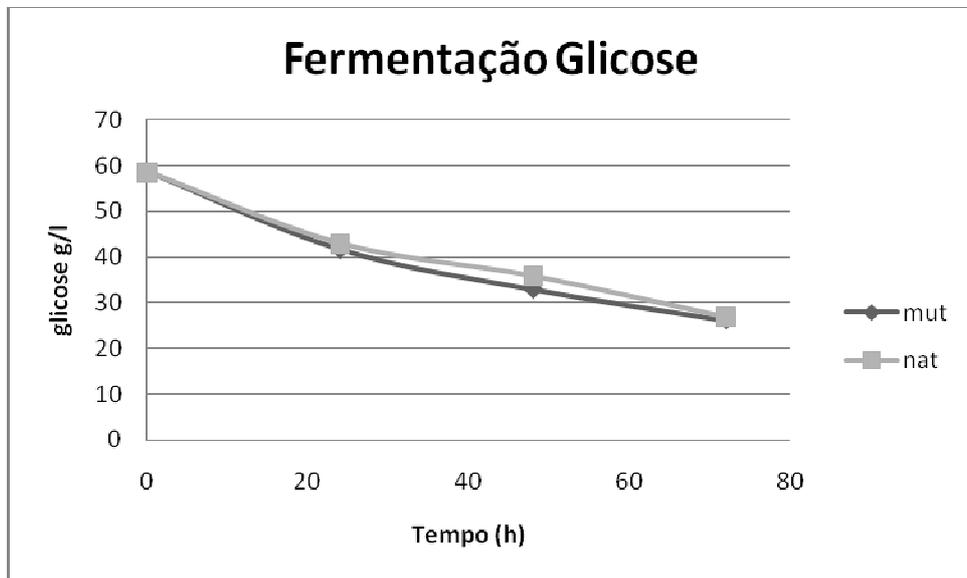
Figura 4. Gráfico da curva de crescimento da levedura NRRL7124 e da levedura 7124 Δ PGI1 em xilose. A curva em azul representa o crescimento da NRRL7124 num período de 26 horas. A curva em verde representa a levedura 7124 Δ PGI1 num período de 26 horas. A curva em rosa representa o pH do meio da levedura nativa num período de 26 horas. A curva em roxo representa o pH do meio da levedura transformante 7124 Δ PGI1 no mesmo período.

3.3 Análise da fermentação em erlenmeyer da NRRL7124 e 7124 Δ PGI1 em YNB completo

Na fermentação em erlenmeyer contendo apenas glicose como substrato, a uma concentração de 58,6 g/l, a levedura NRRL7124 apresentou um menor consumo desse açúcar nas primeiras 48 horas de fermentação comparado a levedura transformante 7124 Δ PGI1 (fig.5 A). O açúcar consumido após 72 horas de fermentação da nativa foi de 31,83 gramas de glicose, enquanto que na transformante foi de 33,85 gramas de glicose. Em relação ao meio contendo glicose e xilose numa proporção de 1:1 a uma concentração de 58,6 g/l a levedura transformante consumiu mais açúcar que a nativa NRRL 7124. Em 72 horas de fermentação a transformante consumiu um total de 22,72

gramas de glicose, a nativa consumiu 19,77 gramas de glicose, não houve consumo de xilose nas 72 horas de fermentação (fig.5 B).

A)



B)

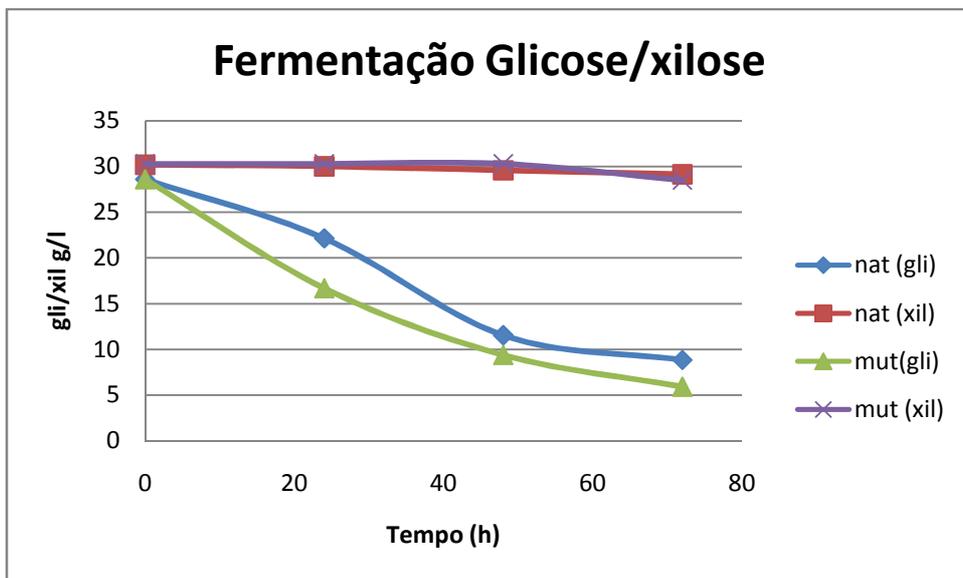
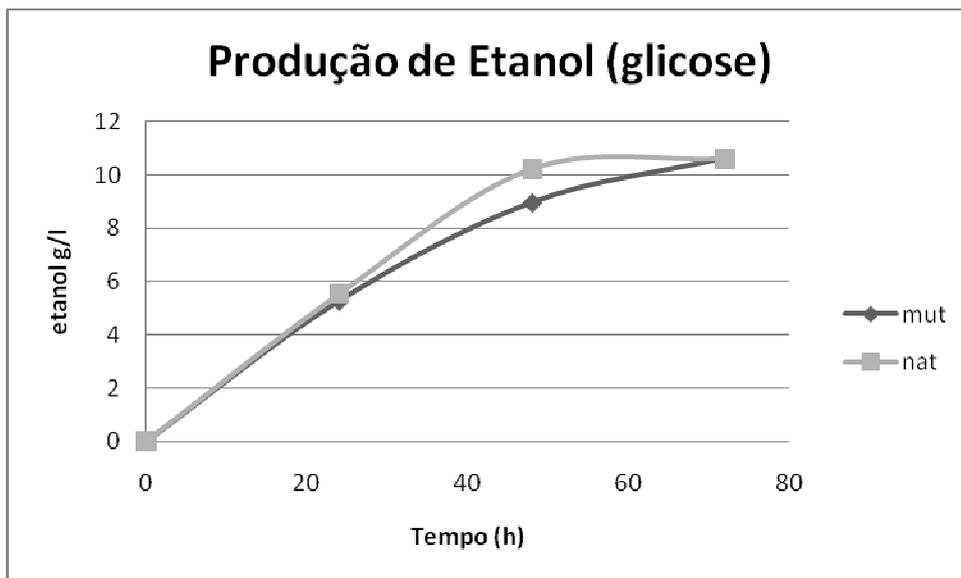


Figura 5. Gráfico da fermentação com YNB completo da levedura parental e transformante. A) Fermentação de 100% de glicose pela NRRL7124 (curva cinza claro) e pela 7124 Δ PGII (curva cinza escuro). B) Fermentação de 50% glicose/50% xilose mistura pela NRRL7124 (curva azul e vermelha) e pela 7124 Δ PGII (curva verde e roxo).

A glicose não foi completamente consumida durante a fermentação mesmo na mistura de glicose e xilose (1:1), o pH do meio não foi controlado. A levedura nativa

produziu 10,59 g/l de etanol em 72 horas no meio apenas com 58,6 g/l de glicose, entre 48h e 72 horas foi observado uma queda na produção de etanol da mesma. A transformante produziu 10,62 g/l de etanol no mesmo meio (Fig 6A). Na mistura de glicose e xilose a nativa produziu 6,88 g/l de etanol durante as 48 horas de fermentação após esse período houve um consumo de etanol pela *P.stipitis*, este consumo foi observado na transformante 7124 Δ PGI1 no mesmo período, a qual produziu 7,63 g/l de etanol (fig 6B).

A)



B)

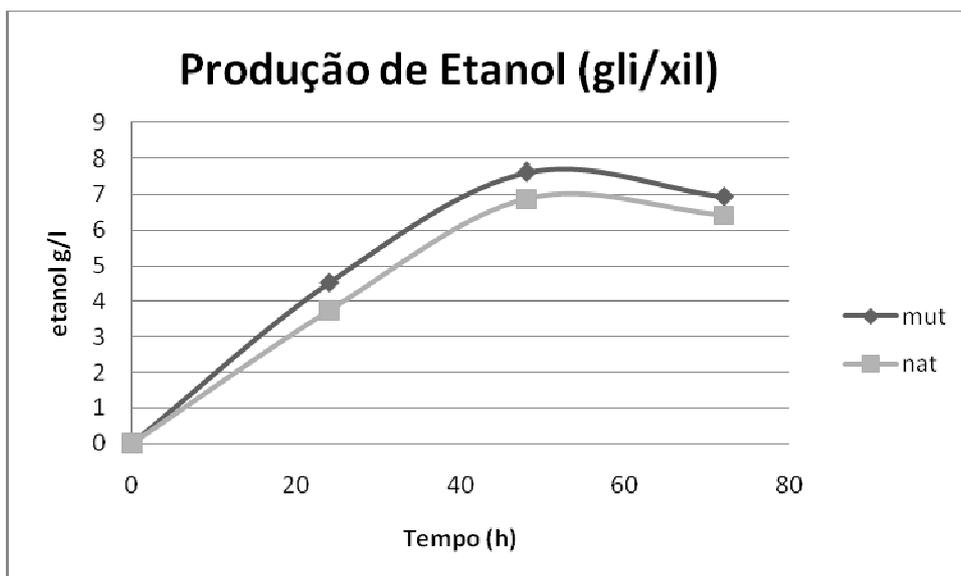


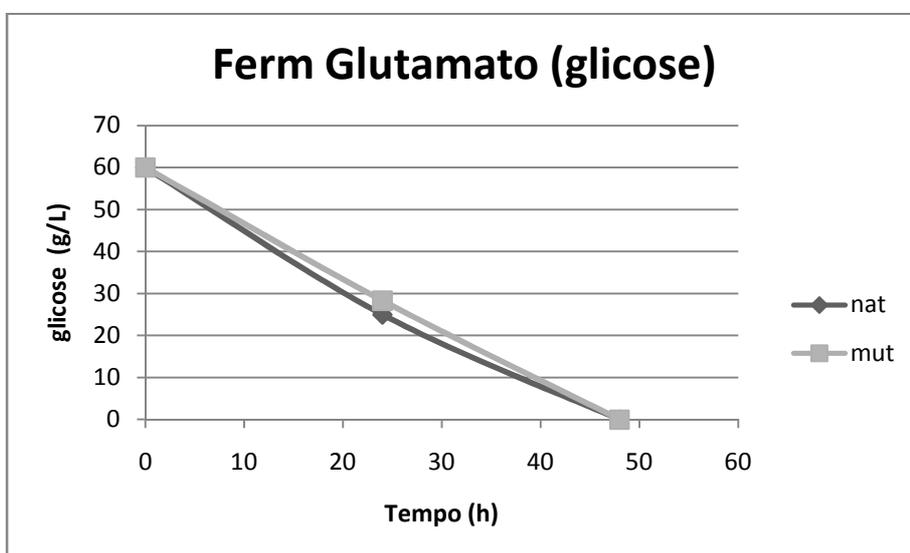
Figura 6. Gráfico da produção de etanol da levedura parental e transformante A) Produção de etanol (g/l) pela NRRL7124 (curva cinza claro) e pela 7124 Δ PGI1 (curva cinza escuro) do meio com glicose a 58,6 g/l. B) Produção de etanol (g/l) do meio com

50% glicose/50% xilose pela NRRL7124 (curva cinza claro) e pela 7124 Δ PGI1 (curva cinza escuro).

3.4 Análise da fermentação em erlenmeyer da NRRL7124 e 7124 Δ PGI1 em YNB sem aminoácido adicionado com glutamato

Na fermentação apenas com glicose tanto a nativa como a transformante consumiram todo açúcar em 48 h de fermentação (figura 7 A). Na mistura de glicose e xilose (1:1) foi observado que a nativa consumiu toda glicose (28,9g) em 24 h de fermentação, já a transformante apenas consumiu cerca de 22,96 g no mesmo período (figura 7 B). Além disso, foi observado assimilação de xilose de 4,18g na nativa e 3,75 na transformante em 24h. Toda xilose foi consumida em 72 h pela nativa. No mesmo período a transformante consumiu 19,83 g, sobrando 8,77g de xilose.

A)



B)

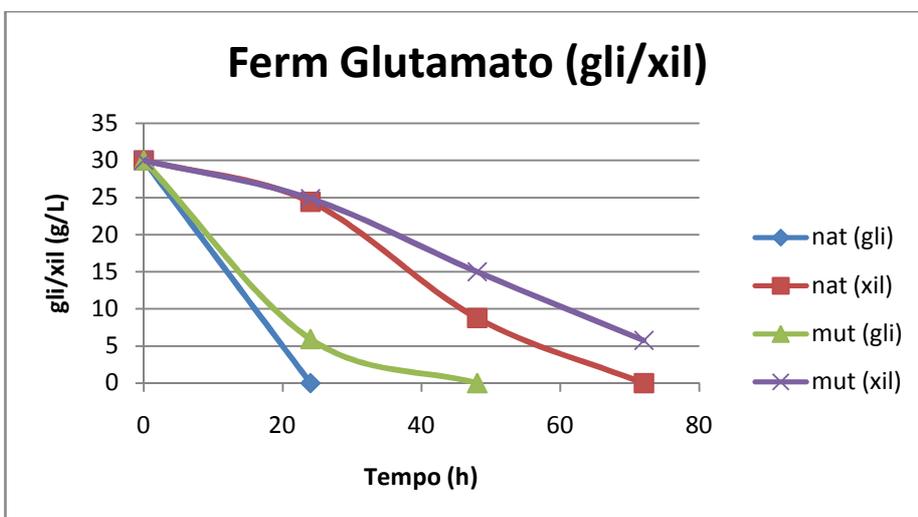
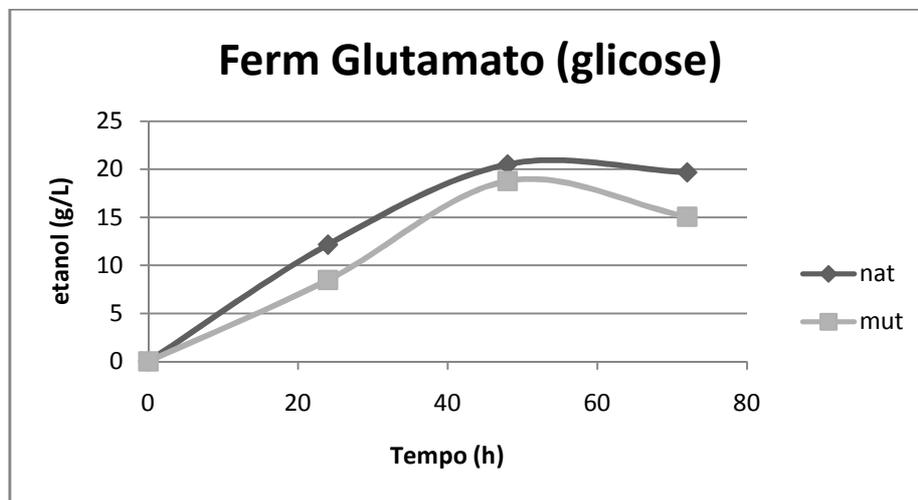


Figura 7. Gráfico da fermentação com YNB adicionado de glutamato da levedura parental e transformante. A) Fermentação de 100% de glicose pela NRRL7124 (curva cinza escuro) e pela 7124 Δ PGII (curva cinza claro). B) Fermentação de 50% glicose/50% xilose mistura pela NRRL7124 (curva azul e vermelha) e pela 7124 Δ PGII (curva verde e roxo).

A produção de etanol foi de 20,5 g/L em 48h de fermentação para nativa no meio com 59,6 g/L de glicose. A transformante no mesmo período produziu cerca de 18,77 g/L de etanol no mesmo meio, em ambas as leveduras foi observado um consumo de etanol após 48h de fermentação em meio com glicose (figura 8 A). Na mistura de glicose e xilose não houve consumo de etanol nas 72 h de fermentação, porém a produtividade foi menor aliada ao consumo de açúcar. Em 72h a nativa produziu 16,62 g/L de etanol, enquanto a transformante produziu 14,37 g/L (figura 8 B).

A)



B)

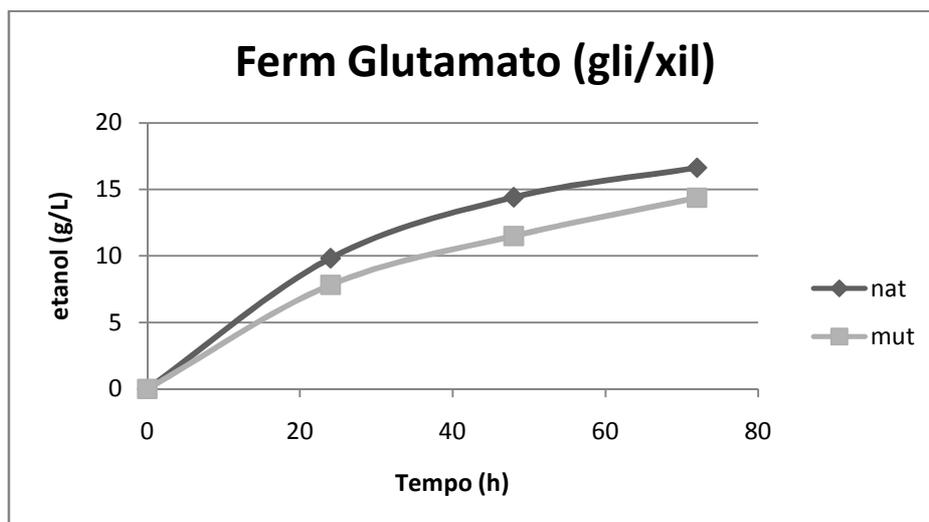


Figura 8. Gráfico da produção de etanol da levedura parental e transformante em meio com YNB adicionado de glutamato. A) Produção de etanol (g/L) pela NRRL7124 (curva cinza escuro) e pela 7124 Δ PGI1 (curva cinza claro) do meio com glicose a 59,6 g/l. B) Produção de etanol (g/L) do meio com 50% glicose/50% xilose pela NRRL7124 (curva cinza escuro) e pela 7124 Δ PGI1 (curva cinza claro).

Discussão e Conclusão

Embora o marcador de seleção para resistência a geneticina não seja ideal para selecionar cepas resistentes NRRL 7124 de *Pichia stipitis*, visto a necessidade de utilizar uma concentração a 1200 μ g/mL, ele permite a seleção de verdadeiros transformantes. A cepa nativa NRRL 7124 apresentou uma alta resistência a geneticina, mesmo em concentrações a 1000 μ g/mL. Foi observado, após 4 dias da transformação, três cepas de *P.stipitis* que apresentavam o cassete de deleção e não houve a presença de cepas nativas, ou seja, a frequência de transformação foi muito baixa. Isto em parte é devido ao uso de sistemas de códons não convencionais, com o códon CUG codificando para serina ao invés de leucina em *P.stipitis* (Sugita e Nakase, 1999). Enquanto o CUG não é comumente usado por *P.stipitis*, ele é bastante usado por genes bacterianos que compreende muitos marcadores de resistência a drogas. Além disso, uma alta concentração da droga diminui a eficiência da transformação. Laplaza e colaboradores (2006) demonstraram que modificações no códon CUG do marcador seletivo *Sh ble* e em outros códons que codificam leucina, permite o uso de Zeocina como antibiótico na seleção para transformação de cepas *P.stipitis* não auxotróficas.

Os marcadores de resistência a droga são indispensáveis para manipulação genética, mas podem interferir com o processo de fermentação em alguns casos. É preferível que esses genes não desejados sejam eliminados de leveduras recombinantes. A seleção por eliminação de genes é chamada contra-seleção (Sikorski & Boeke, 1991). Sistemas como Cre-loxp e FLP-FRT são tipos de contra-seleção em que as recombinases induzem uma alta frequência de recombinação em uma sequência alvo, desse modo permitem remover a marca de seleção (Creeg & Madden, 1989; Storici et al 1999). O cassete de deleção construído, é constituído por duas regiões denominadas loxp que ladeiam a marca de resistência a geneticina, havendo possibilidade de remover a marca de resistência através dessas regiões por recombinação com o sistema Cre-loxp.

A curva de crescimento em 100% de glicose, demonstrou uma maior proporção de crescimento da parental em relação à transformante, assim como pode ser observado que apenas após três horas do início da curva de crescimento, a transformante começou a aumentar de D.O.. Na curva de crescimento em 100% de xilose a nativa apresentou uma D.O. abaixo de 0,1 nas três primeiras horas, sendo observado uma aglomeração das células. Esta aglomeração celular foi diminuindo gradativamente no decorrer da curva. A transformante não apresentou aglomeração de células ao longo das 26 horas da curva. Entretanto a mesma obteve uma menor taxa de crescimento específico e uma D.O. final de apenas 2,7. Esse fato está ligado a deleção do gene *PGII* que não permite a formação da frutose-6-fosfato em glicose-6-fosfato e conseqüentemente a não condução da glicose-6-fosfato para a via das pentoses-fosfato e a não produção de 2 NADPH⁺ necessários para a assimilação de xilose. Não foi observada, uma fase lag mais extensa na transformante crescendo em xilose comparado a mesma crescendo em glicose nas três primeiras horas, apesar de a taxa de crescimento específico ser aproximado nos meios com glicose e xilose (0,23 e 0,21). A transformante apresentou uma proporção de crescimento maior em glicose do que em xilose, assim como a nativa.

As análises fermentativas, em meio com YNB completo, demonstraram que a levedura transformante 7124 Δ PGII assimila uma proporção ligeiramente maior de glicose nas primeiras 48 horas mais do que a nativa, contudo o rendimento de etanol da parental é maior em 48 h de fermentação, ficando entre 0.40 e 0.45 g/g similares aos dados da literatura (Agbogbo et al.,2006). A transformante apresentou 0,33 de rendimento etanólico, além de menor taxa específica de crescimento durante as primeiras horas de crescimento em meio com glicose. A nativa e a transformante apresentaram o mesmo rendimento etanólico na mistura glicose e xilose onde obtiveram 0,40 g/g. Ainda assim a transformante produziu ligeiramente uma maior quantidade de etanol de cerca de 7,63 g/l em 48 horas de fermentação. Na fermentação não houve assimilação de xilose em 72 horas de fermentação concomitante a assimilação de glicose em meio com YNB completo. Contudo o meio com YNB sem aminoácidos com glutamato como fonte de nitrogênio, com mesmo equivalente grama do nitrogênio do sulfato de amônio presente no YNB completo, proporcionou uma assimilação de glicose concomitante com xilose na transformante. Além de uma maior produtividade em etanol, foi observado maior consumo de glicose e xilose no mesmo intervalo de tempo de fermentação comparado com o meio de YNB completo. A deleção do gene *PGII*

proporcionou a formação de dois NADPH durante a conversão de glicose-6-fosfato até ribulose 5-fosfato, esse aumento citosólico aliado a necessidade da célula repor o NADP⁺ em depleção rapidamente, pode ter proporcionado a assimilação de glicose concomitante com xilose. Em condições limitantes de oxigênio a piruvato descarboxilase está mais ativa, o fluxo do ciclo de Krebs está mais comprometido e conseqüentemente a conversão de α -cetoglutarato em glutamato associado ao amônio (provindo do sulfato de amônio). A utilização de glutamato com seu esqueleto de carbono, atuou na formação de metabólitos secundários na célula contribuindo para um maior fluxo da via glicolítica, já que a *P.stipitis* é uma levedura respiratória. Sreenath e Jeffries (1999) obtiveram um mutante FPL DX26 o qual consumiu toda xilose em presença de glicose. Todavia só foi observado consumo de xilose após assimilação de 30 gramas de glicose, e o meio fermentativo continha uréia e peptona, além desses mutantes serem derivados de uma cepa selecionada a inibidores respiratórios como antimicina A e ácido hidroxâmico salicílico (SHAM), os quais agem na cadeia transportadora de elétrons alternativa prejudicando o balanceamento redox. Nossos dados mostraram que a transformante consumiu xilose em presença de glicose no meio com glutamato, porém a proporção de consumo de xilose foi menor em 48 h de fermentação comparando com a FPL DX26, além de que nem toda xilose foi consumida em 72 h de fermentação. Esses resultados obtidos com 7124 Δ PGI1 indicam a importância da cadeia transportadora de elétrons alternativa na regulação metabólica de *P.stipitis*, assim como da fonte de nitrogênio utilizada para assimilação concomitante de glicose e xilose. Comparando a transformante com a nativa a última apresentou uma maior produtividade em etanol tanto no meio apenas com glicose, quanto na mistura quando glutamato foi utilizado como fonte de nitrogênio. No entanto não foi observado se houve assimilação de glicose concomitante com xilose na nativa. Apesar de a mesma consumir toda xilose em 72 h de fermentação.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao CNPq e a Facepe pelo suporte financeiro ao trabalho.

Referências Bibliográficas

Agbogbo, F.K., Coward-Kelly, G., Torry-Smith, M., Wenger, K.S. (2006). Fermentation of glucose/xylose mixtures using *Pichia stipitis* *Process Biochemistry* 41: 2333–2336.

Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., Struhl, K. (1989). *Current protocols in molecular biology*, Vol 1 & 2. John Wiley & Sons, Inc. New York, USA.

Boles, E., Lehnert, W. & Zimmermann, F. K. (1993). The role of the NAD-dependent glutamate dehydrogenase in restoring growth on glucose of a *Saccharomyces cerevisiae* phosphoglucose isomerase mutant. *Eur J Biochem* 217, 469-477.

Cregg, J. M. and Madden, K. R. (1989). Use of site-specific recombination to regenerate selectable markers. *Mol. Gen. Genet.*, 219, 320-323.

du Preez, J.C. (1994). Process parameters and environmental factors affecting D-xylose fermentation by yeasts. *Enzyme Microb Technol* 16:944–956.

Gietz, R.D. and WOODS, R.A. (2002) Transformation of yeast by the LiAc/SS Carrier DNA/PEG method. *Methods in Enzymology* 350: 87-96.

Hahn-Hägerdal, B., Galbe, M., Gorwa-Grauslund, M-F, Liden, G., Zacchi, G. (2006). Bio ethanol—the fuel of tomorrow from the residues of today. *Trends Biotechnol* 24(12):549–556.

Laplaza, J. M., B. R. Torres, Y. S. Jin, and T. W. Jeffries. (2006). Sh ble and Cre adapted for functional genomics and metabolic engineering of *Pichia stipitis*. *Enzyme Microb. Technol.* 38,741-747.

Jeffries, T.W. (2008). Engineering the *Pichia stipitis* genome for fermentation of hemicellulose hydrolysates. *Bioenergy* (Wall JD, Harwood CS & Demain A, eds), pp. 37–47. ASM Press, Washington, DC.

Jeffries, T.W., Grigoriev, I.V., Grimwood, J., Laplaza, J.M., Aerts, A., Salamov, A., Schmutz, J., Lindquist, E., Dehal, P., Shapiro, H., Jin, Y-S; Passoth, V., Richardson, P.M. (2007). Genome sequence of the lignocellulose-bioconverting and xylose fermenting yeast *Pichia stipitis*. *Nat Biotechnol* 25(3): 319–326.

Klinner, U.; Fluthgraf S.; Freese S.; Passoth, V. (2005). Aerobic induction of respiratory fermentative growth by decreasing oxygen tensions in the respiratory yeast *Pichia stipitis*. *Appl Microbial Cell Physiol* 67:247–253.

Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning*, Vol 1, 2 & 3, 20 ed. CSH. New York, USA.

Silva Filho, E.A., Dos Santos S.K.B., Resende A.M., De Morais J.O.F., De Morais JR MA, Simões D.A.(2005) Yeast population dynamics of industrial fuel ethanol fermentation process assessed by PCR fingerprinting. *Antonie van Leeuwenhoek* 88,13–23.

Silva-Filho, E.A. Caracterização genética de populações de leveduras em destilarias de álcool combustível com vistas à seleção de linhagens promissoras para a expressão heteróloga de genes de interesse industrial. Tese de Doutorado, UFPE, Recife, 2003.

Sikorski, R. S. and Boeke, J. D.(1991). In *vitro* mutagenesis and plasmid shuffling: from cloned gene to mutant yeast. *Methods Enzymol.*, 194,302-318 .

Sreenath, H.K., Jeffries, T.W. (1999).2-Deoxyglucose as a Selective Agent for Derepressed Mutants of *Pichia stipitis*† *Applied Biochemistry and Biotechnology*. Vol. 77-79.

Storici, F., Coglievina, M., and Bruschi, C.V.(1999). A 2-pm DNA-based marker recycling system for multiple gene disruption in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 15, 271-283 .

Sugita, T., and T. Nakase. (1999). Non-universal usage of the leucine CUG codon and the molecular phylogeny of the genus *Candida*. *Syst. Appl. Microbiol.* **22**:79-86.

van Maris, A. J. A., D. A. Abbott, E. Bellissimi, J. van den Brink, M. Kuyper, M. A. H. Luttik, H. W. Wisselink, W. A. Scheffers, J. P. van Dijken, J. T. Pronk (2006). Alcoholic fermentation of carbon sources in biomass hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*: current status. *Antonie van Leeuwenhoek*. 90, 391-418