
UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA MOLECULAR

Estudos moleculares dos genes *XYL1* e *XYL2*
de *Candida tropicalis* visando a produção de xilitol

Luanne Helena Augusto Lima
Orientador: Prof. Dr. Fernando Araripe Gonçalves Torres
Co-orientadora: Maria das Graças de Almeida Felipe

BRASÍLIA - DF - BRASIL
Março, 2006

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA MOLECULAR

Estudos moleculares dos genes *XYL1* e *XYL2*
de *Candida tropicalis* visando a produção de xilitol

Tese desenvolvida no laboratório de
Biologia Molecular e apresentada à
Universidade de Brasília – UnB, como
requisito parcial para obtenção do título
de doutor em Ciências Biológicas –
Biologia Molecular.

Luanne Helena Augusto Lima
Orientador: Prof. Dr. Fernando Araripe Gonçalves Torres
Co-orientadora: Maria das Graças de Almeida Felipe

BRASÍLIA - DF - BRASIL

Março, 2006

As nossas teorias talvez reflitam mais as
nossas próprias limitações na busca da
verdade do que a verdadeira natureza da
realidade.

Stephen Jay Gould

AGRADECIMENTOS

Agradeço inicialmente ao Prof. Fernando Araripe Gonçalves Torres por ter aceito o desafio deste projeto, pelo apoio e orientação; a Profa. Maria Sueli Soares Felipe, a Profa. Lídia Maria Pepe de Moraes e aos demais professores do Laboratório pelas preciosas recomendações e sugestões. Também agradeço a Profa. Maria das Graças de Almeida Felipe pela co-orientação, colaboração e por viabilizar este estudo cedendo a levedura *Candida guilliermondii* FTI 20037 para os experimentos. A Profa. Sonia Maria de Freitas e ao Cristiano Guimarães do Amaral Pinheiro pela colaboração na modelagem da proteína Xyl2.

Agradeço especialmente ao Christian Niel Berlinck pelo incomensurável apoio, pelo esforço em me acalantar durante os momentos de frustração e por compartilhar a euforia dos resultados positivos.

Agradeço aos meus pais, porque sem eles, indiscutivelmente, esta tese não seria defendida, e a todos aqueles que compartilham genes comigo.

Agradeço a coordenadora do Programa de Pesquisa em Biociências Raquel de Andrade Lima Coelho e aos coordenadores do PADCT, Tarciso José de Lima e Paulo Ricardo Dimas Luz Cunha pelo apoio e pela complacência.

Manifesto minha gratidão a todos os companheiros do lab, por compartilhar muito mais que pipetas e soluções, por dividir sentimentos e repartir conhecimentos. Agradeço a Vivis, sempre disposta a colaborar, fornecendo protocolos e soluções, dando dicas, discutindo resultados, analisando géis e etc... Agradeço a querida Paty Vet e ao João Ricardo por me guiar nos primeiros passos; ao Saulo pela mãozinha, preparando géis, aliquotando enzimas e segurando pedras. Agradeço também a Nádia (minha parceira de roubadas, lembre-se se a vida te der um limão...), Camila e Janice pelas árvores e galhos quebrados, tirando digestões, PCRs, placas entre outros, e também à Vera pelas células realmente competentes. Ao Luciano pelo programas culturais, culinários e alternativos. Ao Túlio pela amizade, mesmo a 10.000 km de distancia. A Karen por suportar as minhas manias e pela ajuda em vários momentos periclitantes. Ao Hugo pela consultoria em línguas estrangeiras. A todos os amigos, efêmeros ou não, que comemoraram e festejaram várias vezes durante todo este tempo (Indra, Carine, Bruno Benoliel, Chrisinha, Carmela, Oscar (Popó), Marciano, Henrique, Ceci, Pedro, Lelê, Alê, Rose, Paty Lu, Vanessinha, Didi, Livônios, Patty Girl, André - Médico, Loise, Pollyanna, Marianna, Juju (Recife), Andreisse, Fabrício, Mauro, Alexsandro, Mariana, Fábio, Helga, Daniel, Marília, Larissa, Simoneide, Hernandez, Gina, Flávia, Bárbara, Gaby, Liz, Luana, Rafael Ajuz, Rafael Gaúcho, Thiago, Sérgio, Glória, Isabella, Maria José, Bruno Daher, Tatiane, Mauro MX, Eduardo, Sócrates entre outros).

Agradeço carinhosamente a Fátima, Ivonildes e Conceição, por todo apoio logístico, porque sem elas nosso laboratório entraria em colapso. Agradeço a Marísia e a Margarete por sempre me socorrerem em momentos de emergência.

Eu não poderia deixar de agradecer a todas bactérias e leveduras que se ofereceram em sacrifício para realização deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

INTRODUÇÃO	1
1. Xilitol	1
1.1. Propriedades e Aplicações	1
1.2. Toxicidade e Tolerância	4
2. Obtenção de Xilitol	5
3. Bioconversão de Xilose em Xilitol	8
3.1. Xilose Redutase	10
3.2. Xilitol Desidrogenase	12
3.3. Repressão do Metabolismo de Xilose	14
3.4. Transporte de Xilose	15
4. Leveduras do Gênero <i>Candida</i>	17
4.1. <i>Candida tropicalis</i>	19
5. Engenharia Metabólica	21
JUSTIFICATIVA	27
ESTRATÉGIA	28
OBJETIVOS	31
Objetivo Geral	31
Objetivos Específicos	31
MATERIAIS E MÉTODOS	32
1. Microrganismos	32
2. Extração de DNA de Leveduras	33
3. Purificação de DNA Plasmidial	33
4. Transformação Genética	34
4.1. Bactéria	34
4.2. Leveduras	35
5. PCR	35
5.1. Purificação	37

6. Análise de Ácidos Nucléicos em Gel de Agarose	37
6.1. Purificação de Fragmentos de DNA	37
7. Seqüenciamento e Análise de DNA	38
8. Digestão de DNA com Enzimas de Restrição	39
8.1. Purificação do Sistema de Digestão	39
9. Conversão de Extremidades Protuberantes em Abruptas	39
10. Defosforilação de Vetor Linearizado	40
11. Ligação	40
12. Extração de RNA	40
13. Southern e Northern Blotting	41
13.1. Sistema de Transferência para Membrana	41
13.2. Marcação da Sonda, Pré-Hibridização e Hibridização	41
13.3. Geração e Detecção do Sinal	41
14. Seleção e Análise dos Transformantes	42
15. Medida de Atividades Enzimáticas	42
15.1 Rompimento Celular	42
15.2 Determinação de Proteína Solúvel e Atividade Enzimática	42
16. Análise de Domínios, Alinhamento de Seqüências e Análise e Comparação Estrutural	43
RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
1. Reclassificação da levedura <i>C. guilliermondii</i> FTI 20037	45
2. Clonagem e análise do gene <i>XYL1</i>	47
3. Clonagem e análise do gene <i>XYL2</i>	52
3.1. Clonagem das Regiões 5' e 3' do Gene <i>XYL2</i>	55
3.1.1. Uso de <i>Primers</i> Internos	55
3.1.2. PCR Inverso	56
3.2. Análise da Seqüência de <i>XYL2</i>	58
3.3. Número de cópias do gene <i>XYL2</i>	63
3.4. Padrão de Expressão do gene <i>XYL2</i>	64
3.5. Análise da Proteína Preditada	65
3.5.1 Participação de Zinco na Catálise	68
3.6. Modelagem de Xyl2	69
4. Expressão de <i>XYL1</i> e <i>XYL2</i> em <i>S. cerevisiae</i>	72
5. Transformação de <i>C. tropicalis</i>	76
5.1. Marca de Seleção para o Sistema de Transformação	76
5.2. Construção dos cassetes para transformação	79
5.2.1. Cassete da Marca de Seleção	79
5.2.2. Cassete para Ruptura Gênica de <i>XYL2</i>	84
5.2.2.1. Marca Dominante	84

5.2.2.2. Marca Auxotrófica	86
5.2.3. Cassete para Múltiplas Integrações da Marca de Seleção	87
5.2.4. Cassete para Super Expressão de XYL1	88
6. Transformação Genética de <i>C. tropicalis</i>	93
CONCLUSÕES	95
PERSPECTIVAS	96
REFERÊNCIAS	97
ANEXO 1	117
ANEXO 2	122
ANEXO 3	156
ANEXO 4	161

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fórmula química da molécula de xilitol.....	1
Figura 2. Metabolismo de xilose e regeneração de cofatores. Adaptado de BARBOSA <i>et al.</i> (1988) e DAHIYA (1991)	7
Figura 3. Estratégia para obtenção de transformantes expressando múltiplas cópias de <i>XYL1</i>	29
Figura 4. Esquema para obtenção de transformantes com <i>XYL2</i> rompido.....	30
Figura 5. Estrutura do cluster gênico que codifica o RNA ribossomal, evidenciando os genes correspondentes as subunidades 18S, 5,8S e 28S, além das regiões internas ITS1 e ITS2. Acima estão os níveis taxonômicos que cada região define, abaixo localização da região do rDNA amplificada com os <i>primers</i> ITS1 e ITS4 (ITS) e da região da subunidade maior (5' LSU) amplificada com os <i>primers</i> UNIF e UNIR.	46
Figura 6. Reações de amplificação de regiões do rDNA analisadas em gel de agarose 1%. 1:marcador λ <i>EcoR I/Hind III</i> , 2 e 3: região ITS, 4 e 5: região 5'LSU.	46
Figura 7. Reações de amplificação de <i>XYL1</i> analisadas em gel de agarose 1%. 1: marcador <i>1 kb DNA ladder</i> (New England Biolabs), 2 e 3: amplificação com 5XRORF/3XRORF, DNA molde de <i>C. guilliermondii</i> (UFRJ) e <i>C. guilliermondii</i> FTI 20037, respectivamente.....	48
Figura 8. Esquema mostrando as posições relativas de anelamento dos <i>primers</i> utilizados para amplificação e confirmação de <i>XYL1</i>	48
Figura 9. Reações de amplificação de <i>XYL1</i> e regiões internas do gene, analisadas em gel de agarose 1%. 1: marcador <i>1 kb DNA ladder</i> (New England Biolabs), 2: amplificação com 5xyl1a/3xyl1, 3: 5xyl1a/3xyl1int, 4: 5xyl1int/3xyl1, 5: 5xylint/3xyl1int.	49
Figura 10. Alinhamento da seqüência de <i>XYL1</i> de <i>C. tropicalis</i> e de <i>C. guilliermondii</i> FTI 20037, com as divergências sublinhadas.	50
Figura 11. Alinhamento da seqüência de <i>XYL1</i> com a seqüência do projeto genoma de <i>C. tropicalis</i> . 51	
Figura 12. Alinhamento entre a seqüência da proteína Xyl1 de <i>C. guilliermondii</i> FTI 20037 e <i>C. tenuis</i> (1JEZ). Os aminoácidos dentro do quadrado hachurado representam as assinaturas das aldocetoreduases, os resíduos envolvidos na catálise são indicados por setas, os resíduos envolvidos no sítio de ligação à coenzima são indicados por asteriscos e os resíduos que participam na dimerização estão indicados por quadrados.....	52
Figura 13. Alinhamento das seqüências de <i>XYL2</i> de <i>P. stipitis</i> e <i>G. mastotermitis</i> , evidenciando a localização dos <i>primers</i> desenhados para amplificar a seqüências <i>XYL2</i> de <i>C. tropicalis</i>	53
Figura 14. Reações de amplificação de <i>XYL2</i> analisadas em gel de agarose 1%. 1: marcador <i>100 bp DNA ladder</i> (Invitrogen), 2: 5XDH2, 3: 3XDH3, 4: 5XDH2/3XDH3.....	54
Figura 15. Esquema mostrando as posições relativas de anelamento dos <i>primers</i> utilizados para buscar as porções 5' e 3' de <i>XYL2</i>	56

Figura 16. Reações de amplificação utilizando o <i>primer</i> 221 analisadas em gel de agarose 1%. 1: 221/xy12-F2, 2: 221/xy12-R2, 3: xy12-R2, 4: xy12-F2, 5: 221, 6: marcador 1 kb DNA ladder (New England Biolabs).	56
Figura 17. Esquema da técnica de PCR inverso, onde o DNA genômico total é digerido com uma enzima de restrição (<i>EcoR</i> I), religado formando fitas circulares que são usadas como molde em uma reação de PCR, utilizando <i>primers</i> internos (R e F).	57
Figura 18. Reações do PCR inverso analisadas em gel de agarose 1%. Amplificação com xy12-R2 e xy12-F2, utilizando DNA total digerido e religado como molde, digestão com 1: <i>BamH</i> I, 2: <i>EcoR</i> I, 3: <i>Hind</i> III e 4: TopoXYL2 como controle.	58
Figura 19. Seqüência de nucleotídeos do gene <i>XYL2</i> de <i>C. tropicalis</i> e a estrutura primária predita da proteína. Seqüência de nucleotídeos nas UTR - letras minúsculas, na ORF - letras maiúsculas, TATA Box - cinza na região 5', possível sinal de poliadenilação - sublinhado na região 3', seqüência deduzida de aminoácidos é mostrada sobre a seqüência de nucleotídeos da ORF.	60
Figura 20. Alinhamento da seqüência de <i>XYL2</i> com a seqüência do projeto genoma de <i>C. tropicalis</i>	61
Figura 21. Alinhamento entre a seqüência predita a partir do gene <i>XYL2</i> e as seqüências primárias de xilitol desidrogenases de diferentes organismos.	62
Figura 22. <i>Southern blotting</i> com DNA genômico de <i>C. tropicalis</i> . Digestão com 1: <i>EcoR</i> I, 2: <i>EcoR</i> V, 3: <i>Hind</i> III, utilizando <i>XYL2</i> como sonda.	63
Figura 23. Análise da expressão de <i>XYL2</i> por <i>Northern blotting</i> em diferentes fontes de carbono. 1: xilose, 2: glicose e 3: glicerol utilizando <i>XYL2</i> como sonda, RNA ribossômico 28s como controle da quantidade de RNA total utilizada.	64
Figura 24. Alinhamento entre a seqüência da proteína Xyl2 e membros da família de cadeia média que possui sítio de ligação a zinco. Os aminoácidos dentro do quadrado hachurado representam a assinatura das álcool desidrogenases, os resíduos envolvidos do sítio catalítico ligado a zinco são indicados por setas, O segundo sítio de ligação a zinco da 1E3J está dentro de quadrado e os resíduos que estão envolvidos no sítio de ligação da coenzima são indicados por asteriscos.	66
Figura 25. Elementos estruturais encontrados na seqüência de Xyl2 e sua localização, segundo análise no InterPro.	67
Figura 26. Efeito do EDTA na atividade de Xyl2. A: Acompanhamento da redução de NAD ⁺ (340 nm) na ausência (círculos) ou na presença de EDTA 1mM (triângulos). B: Atividade de XDH em diferentes concentrações de EDTA.	69
Figura 27. Modelo tridimensional de Xyl2 gerado pelo programa Pymol.	70
Figura 28. Estrutura terciária predita dos domínios de ligação a NAD ⁺ e zinco. A: Domínio de ligação ao NAD ⁺ com o sítio de ligação em cinza escuro, composto por motivos α e β em um padrão <i>Rossmann fold</i> ; B: sítio de ligação à coenzima, destacando o resíduos que participam da interação Val ¹⁸⁷ , Asp ²⁰⁷ , Lys ²¹² , Cys ²⁵² Asp ²⁷⁷ e Ser ²⁹⁹ ; C: Domínio de ligação do sítio ativo representado	

pelo resíduos em cinza escuro; D: sítio ativo ligado a zinco destacando os resíduos que participam da interação His ⁶⁶ , Glu ⁶⁷ e Glu ¹⁵⁹	71
Figura 29. Mapa dos vetores YEp351PGK e YEp352PGK.	73
Figura 30. Reações de PCR para confirmação da clonagem de <i>XYL1</i> (1-4) e <i>XYL2</i> (6-9) em vetores de expressão de <i>S. cerevisiae</i> analisadas em gel de agarose 1%. 1 e 6: controle, 2 e 7: YEp352PGK, 3: YPGKxyl1, 4 e 9: YPGKxyl1 + Y2PGKxyl2, 5: marcador <i>1 kb DNA ladder</i> (Invitrogen), 8: Y2PGKxyl2.	73
Figura 31. Clones transformantes de <i>S. cerevisiae</i> expressando os genes <i>XYL1</i> e <i>XYL2</i> . 1: Y2PGKxyl2, 2: YPGKxyl1, 3: YEp352PGK e 4: YPGKxyl1 + Y2PGKxyl2 em A: meio mínimo sem leucina, B: meio mínimo sem uracila, C: meio mínimo sem uracila e leucina).....	74
Figura 32. Seqüência do gene ZeoCan sintetizado <i>de novo</i> , ressaltando os sítios de <i>BamH I</i> e <i>Nco I</i> (em negrito) e a localização dos códons CTG substituídos por TTG (sublinhado).	77
Figura 33. Mapa do plasmídio ClpACT-CYC.	79
Figura 34. Reação de PCR utilizando os <i>primers</i> 5PROACT e 3PROACT analisada em gel de agarose 1%. 1: ClpACT-CYC como molde e 2: <i>1 kb DNA ladder</i> (New England Biolabs).	80
Figura 35. Estratégia para clonagem das regiões promotora (ACT1p) e terminadora (CYC1t) do vetor ClpACT-CYC para a construção de um novo cassete de expressão. Etapa 1: reação de PCR utilizando como molde a banda referente à região promotora obtida pela digestão do plasmídio ClpACT-CYC com as enzimas <i>Xho I</i> e <i>Cla I</i> e os <i>primers</i> 5PROACT e 3PROACT, etapa 2: clonagem do produto de PCR no vetor pGEM [®] -T Easy, etapa 3: reação de PCR utilizando o plasmídio contendo as regiões ACT1p e CYC1t como molde e os <i>primers</i> 5PROACT e 3CYCTT.	81
Figura 36. Esquema da construção do cassete de expressão do gene ZeoCan o qual foi clonado no sítio de <i>Bcl I</i> entre a região promotora ACT1p e terminadora CYC1t.	82
Figura 37. Digestão do plasmídio contendo o cassete da marca de seleção analisada em gel de agarose 1%. 2-8/10-13: plasmídios pPZeo de diferentes clones digeridos com <i>BamH I</i> e 1/9: <i>1 kb DNA ladder</i> (New England Biolabs).	83
Figura 38. Reações de PCR para selecionar os clones com plasmídio pPZeo na orientação correta analisadas em gel de agarose 1%. 1/5: <i>1 kb DNA ladder</i> (New England Biolabs), 2-4: reações com os <i>primers</i> 5PROACT e 5Zeo, 6-8: reações com os <i>primers</i> 5PROACT/3Zeo.	83
Figura 39. Esquema da construção do cassete de ruptura de <i>XYL2</i> (pPZeoXYL2) a partir da obtenção do cassete da marca de seleção pela digestão do plasmídio pPZeo com <i>BamH I</i> e posterior clonagem no sítio interno de <i>Bcl I</i> do gene <i>XYL2</i>	84
Figura 40. Esquema mostrando os sítios de <i>Nco I</i> e a combinação de <i>primers</i> utilizados para confirmar a clonagem e a orientação do cassete da marca de seleção na seqüência de <i>XYL2</i>	85
Figura 41. Análise da digestão e de reações de PCR para confirmar a clonagem correta do plasmídio pPZeoXyl2 em gel de agarose 1%. 1: digestão com <i>Nco I</i> , 2: <i>1 kb DNA ladder</i> (New England	

Biolabs), 3-7: reações com os <i>primers</i> 5Zeo/3xyl2, 5PROACT/3xyl2, 5xyl2/3Zeo, 5xyl2/3CYCTT e 5xyl2/3xyl2, respectivamente.	85
Figura 42. Análise de digestões para confirmar a clonagem do plasmídeo ClpXyl2 em gel de agarose 1%. 1: plasmídeo intacto, 2: digestão com <i>EcoR</i> V, 3: digestão com <i>BamH</i> I, 4: <i>1 kb DNA ladder</i> (Promega).	86
Figura 43. Esquema da construção do cassete de múltiplas integrações da marca de seleção a partir da clonagem do cassete de expressão de ZeoCan dentro da seqüência ITS do rDNA.	87
Figura 44. Análise de digestão e reações de PCR para confirmar a clonagem correta do plasmídeo pITSpZeo em gel de agarose 1%. 1: digestão com <i>BamH</i> I, 2: <i>1 kb DNA ladder</i> (Promega), 3-5: reações com os <i>primers</i> ITS1/ITS4, 5PROACT/3zeo, 5zeo/3CYCTT, respectivamente.	88
Figura 45. Esquema mostrando as posições relativas de anelamento dos <i>primers</i> utilizados para amplificação do gene PGK.	89
Figura 46. Reações de amplificação de regiões do gene <i>PGK1</i> analisadas em gel de agarose 1%. DNA molde de <i>C. maltosa</i> 1: PPGK/TPGK, 2: PPGK/P2PGK e de <i>C. tropicalis</i> 3: PPGK/TPGK, 4: PPGK/P2PGK e 5: marcador λ <i>EcoR</i> I/ <i>Hind</i> III.	89
Figura 47. Reação de PCR confirmando a clonagem do plasmídeo pGEM-T EasyPGK analisadas em gel de agarose 1%. 1: marcador λ <i>EcoR</i> I/ <i>Hind</i> III e 2: amplificação utilizando os <i>primers</i> P2PGK/T2PGK e pGEM-T EasyPGK como molde.	90
Figura 48. Esquema da obtenção do plasmídeo contendo as regiões promotora e terminadora do gene <i>PGK1</i> de <i>C. maltosa</i> . O plasmídeo contendo o gene <i>PGK1</i> foi utilizado como molde em uma reação de PCR com os <i>primers</i> P2PGK e T2PGK, o amplicom obtido foi religado originando o plasmídeo pGEMpPGK.	90
Figura 49. Reações de PCR utilizando os <i>primers</i> PPGK/TPGK analisadas em gel de agarose 1%. 1: pGEMpPGK como molde, 2: <i>1 kb DNA ladder</i> (Promega) e 3: pGEMPGK como molde.	91
Figura 50. Esquema mostrando a clonagem de <i>XYL1</i> entre as regiões promotora e terminadora do gene <i>PGK1</i> para obtenção do plasmídeo pPGKxyl1.	92
Figura 51. Reação de PCR utilizando os <i>primers</i> PPGK/3xyl1 analisada em gel de agarose 1%. 1: <i>1 kb DNA ladder</i> (Promega), 2: pPGKxyl1 como molde.	92

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Produção de xilitol a partir de xilose por diferentes espécies de <i>Candida</i> spp.	8
Tabela 2. Especificidade pelos cofatores das enzimas xilose redutase (XR) e xilitol desidrogenase (XDH) em diferentes leveduras.....	9
Tabela 3. Espécies de <i>Candida</i> spp. com aplicação na indústria de alimentos.....	18
Tabela 4. Linhagens de leveduras utilizadas.....	32
Tabela 5. Linhagens de <i>Escherichia coli</i> utilizadas.	32
Tabela 6. Seqüência dos <i>primers</i> utilizados em reações de PCR, com suas respectivas seqüências, temperaturas de anelamento e sítios de restrição (sublinhados).....	36
Tabela 7. Resultados de homologia para as seqüências ITS e 5'LSU do DNA ribossomal, utilizadas na identificação de espécies.....	47
Tabela 8. Identidade e semelhança estrutural da Xyl2 com outras enzimas desidrogenase.	72
Tabela 9. Atividade específica (UI/mg) de xilose redutase (XR) e xilitol desidrogenase (XDH) para os clones de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> : YEp352PGK (controle); YPGKxyl1, Y2PGKxyl2 e YPGKxyl1 + Y2PGKxyl2.....	75
Tabela 10. Avaliação da concentração letal de zeocina em meio YM (pH 7.5) a 30°C para diferentes leveduras.....	78

RESUMO

O xilitol é um adoçante natural, anticariostático, utilizado principalmente na indústria de alimentos, com consumo anual estimado em 500.000 toneladas. O seu valor econômico, aliado a suas diversas aplicações, impulsionam pesquisas biotecnológicas para aumentar sua produção. A *Candida guilliermondii* FTI 20037 é uma das mais promissoras leveduras para produção de xilitol com rendimento acima de 0,5 g/Lh. Além disso, é capaz de produzir xilitol a partir de hidrolisado hemicelulósico de diversos resíduos agrícolas. A partir do seqüenciamento de regiões do DNA ribossômico de *C. guilliermondii* FTI 20037 foi demonstrado que esta levedura deve ser re-classificada como *Candida tropicalis*. O presente estudo representa uma das primeiras iniciativas para se desenvolver um sistema que permita a transformação genética de *C. tropicalis* com a finalidade de potencializar a produção de xilitol através da manipulação dos genes *XYL1* (xilose redutase) e *XYL2* (xilitol desidrogenase). Estes genes foram clonados e suas seqüências analisadas. O gene *XYL2* por não ter sido ainda caracterizado, foi objeto de estudos mais detalhados. *XYL2* é representado por uma ORF (*open reading frame*) de 1092 pb, que potencialmente codifica um polipeptídeo de 364 resíduos de aminoácidos, com ~40 kDa. *XYL2* não possui íntrons, apresenta-se em única cópia no genoma de *C. tropicalis* e é controlado em nível transcricional pela presença de xilose. A seqüência primária da ORF *XYL2* é idêntica à publicada no projeto genoma de *C. tropicalis*. Estudos de modelagem molecular demonstraram que a proteína Xyl2 pertence à família MDR (*medium chain alcohol dehydrogenase*) contendo sítios para ligação a zinco e NAD⁺. Para demonstrar sua funcionalidade, os genes *XYL1* e *XYL2* foram expressos com sucesso em *S. cerevisiae*. Visando o estabelecimento de um sistema de transformação para espécies de *Candida* um gene sintético (ZeoCan) que confere resistência a zeocina foi desenvolvido com o codon preferencial de *C. tropicalis*. Todavia, os resultados de transformação mostraram que a resistência a zeocina não é indicada como marca de seleção para *C. tropicalis* uma vez que esta levedura deve possuir mecanismos genéticos para anular o efeito do antibiótico.

ABSTRACT

Xylitol is a natural sweetener mainly used in the food industry with an annual estimated consumption of 500.000 tons. The high economic value of xylitol together with its multiple applications have driven many biotechnological studies in order to improve its production. The *Candida guilliermondii* FTI 20037 is one of the most promising yeast of xylitol production with yields over 0.5 g/Lh. In addition, it is capable of producing xylitol from hemicellulosic hydrolysate derived from several raw materials. From the sequencing of ribosomal DNA regions from *C. guilliermondii* FTI 20037 we have shown that this yeast should be re-classified as *Candida tropicalis*. The present work represents one of the first initiatives towards the development of a system which would allow the genetic transformation of *C. tropicalis* with the goal of improving xylitol production through the manipulation of the genes *XYL1* (xylose reductase) and *XYL2* (xylitol dehydrogenase). These genes were cloned and the sequences were analyzed. Since *XYL2* had not yet been characterized it was the focus of more detailed studies. *XYL2* is represented by a 1092 pb open reading frame which potentially codes for a 364 residues polypeptide with ~40 kDa. *XYL2* does not have introns, it is present as a single copy in the *C. tropicalis* genome and is controlled at the transcriptional level by the presence of xylose. The primary sequence of the *XYL2* ORF is identical to the published sequence from the *C. tropicalis* genome project. Molecular modeling studies showed that the Xyl2 protein belongs to the MDR (*medium chain alcohol dehydrogenase*) family containing binding sites for zinc and NAD⁺. In order to functionally analyze the cloned genes, *XYL1* and *XYL2* were successfully expressed in *S. cerevisiae*. In order to establish a transformation system for *Candida* species a synthetic gene (ZeoCan) which confers zeocin resistance was developed with the *C. tropicalis* codon usage. However, the results from transformation experiments showed that the zeocin resistance gene should not be employed as selective marker in *C. tropicalis* since this yeast must display genetic mechanisms to counteract the effects the antibody.

INTRODUÇÃO

1. Xilitol

1.1. Propriedades e Aplicações

O xilitol (Figura 1) é um poliol que ocorre na natureza em diversos vegetais, líquens e algas, aparecendo também como um intermediário no metabolismo de carboidratos em animais e, inclusive, humanos (PEPPER e OLINGER, 1988; HEIKKILA *et al.*, 1992; WINKELHAUSEN *et al.*, 1996). Em alguns organismos os polióis podem ser acumulados até altas concentrações constituindo uma proteção contra estresse ambiental, tais como choque osmótico (YANCEY *et al.*, 1982; KARLGREN *et al.*, 2005), altas ou baixas temperaturas (CZAJKA e LEE, 1990; WOLFE *et al.*, 1999).

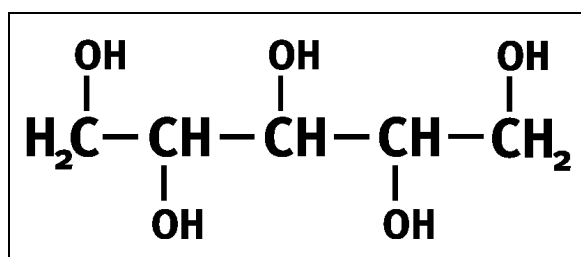


Figura 1. Fórmula química da molécula de xilitol.

Em relação à sacarose, o xilitol é um terço menos calórico (2,4 calorias/g) (BÄR, 1991) e possui poder adoçante equivalente, o que é superior ao de outros polióis como manitol e sorbitol. Devido à doçura e ao baixo valor calórico, o xilitol vem sendo utilizado como edulcorante em diversos produtos desde os anos 60. Aliadas a estas características, outras propriedades apresentadas a seguir, proporcionam aumento no valor econômico deste poliol.

O xilitol é um composto cariostático por não ser metabolizado por microrganismos da microbiota bucal, principalmente *Streptococcus mutans*, o que impossibilita a proliferação de bactérias e, conseqüentemente, impede a produção de

ácidos que atacam o esmalte dos dentes. Além disto, também pode ser classificado como anticariogênico, pois estimula a produção de saliva, que possui capacidade tamponante, o que, juntamente com o aumento na concentração de íons cálcio e fosfato, induz a remineralização, revertendo lesões de cáries recém formadas (BIRKHED, 1994; MAKINEN *et al.*, 1998; MAKINEN, 2000, van LOVEREN, 2004). Outra vantagem do consumo de xilitol é sua ajuda na prevenção da transmissão de *S. mutans* de mãe para filho durante os seis primeiros anos (ISOKANGAS *et al.*, 2000; SODERLING, *et al.*, 2000; SODERLING, *et al.*, 2001).

Diversos estudos já demonstraram que o consumo regular de chicletes contendo xilitol reduz a incidência de cáries (MAKINEN *et al.*, 1998; HUJOEL *et al.*, 1999; ALANEN *et al.*, 2000; AUTIO, 2002). Os efeitos cariostático e anticariogênico impulsionam o uso de xilitol em cremes dentais, pastilhas, gomas de mascar e outros produtos para controle e prevenção às cáries. Estas aplicações já geraram diversas patentes em diferentes países, tais como US4000320 (1976), US5376389 (1994) e JP10165103 (1998) que descrevem o uso de xilitol em chicletes, US3970747 (1976), US5424059 (1995), PI9805385 (1998) e JP2003081795 (2003) uso em creme dental, US5560906 (1996) e PI0206087 (2002) uso em anti-séptico bucal, entre outras.

Em alguns países europeus, o xilitol já vem sendo utilizado como adoçante, tendo a vantagem de não apresentar sensação desagradável após o uso. No Brasil, sua utilização se limita à composição de produtos como creme dental, gomas de mascar e pastilhas.

O xilitol é apropriado para o uso em produtos alimentícios processados em temperaturas elevadas quando reações de Maillard não são desejadas. Estas reações podem ocorrer quando proteínas são aquecidas na presença de açúcares redutores, resultando na glicosilação do resíduo de aminoácido terminal ou de resíduos de lisina, que resultam no escurecimento do produto. O xilitol, devido à ausência de grupos aldeídicos ou cetônicos em sua molécula, não participa destas reações, o que potencializa sua aplicação na indústria alimentícia (MANZ *et al.*, 1973; SIRENIUS *et al.*, 1979; BÄR, 1991).

Outra vantagem do xilitol é não ser fermentado por muitos microrganismos, o que viabiliza o uso em xaropes e refrescos sem a necessidade de pasteurização e da

adição de conservantes quando o produto é estocado por quatro ou cinco meses em frascos fechados (MANZ *et al.*, 1973).

A sensação de vaporização nas cavidades oral e nasal é outra característica importante do xilitol. Esta sensação é proporcionada pelo valor negativo do calor de dissociação e é explorada em produtos farmacêuticos (vitaminas e expectorantes) e confeitos (pastilhas e balas). Nestes produtos, o xilitol é usualmente combinado a manitol, sorbitol ou ácido cítrico (PARAJÓ *et al.*, 1998a).

Clinicamente, o xilitol é indicado para obesos por ser menos calórico e por diminuir o nível de ácidos graxos livres no sangue, além de promover a mobilização e a oxidação de gorduras (MANZ *et al.*, 1973, GEORGIEFF *et al.*, 1985); para diabéticos, em substituição aos açúcares uma vez que seu metabolismo não ocorre por vias dependentes de insulina (PEPPER e OLINGER, 1988). O xilitol também pode ser empregado no tratamento de desordens metabólicas, como em casos de anemia hemolítica presente em indivíduos com deficiência na enzima glicose-6-fosfato desidrogenase, ou em casos de miopatias originadas pela deficiência em mioadenilato desaminase. O xilitol ainda facilita a absorção de certas vitaminas e cátions metálicos como cálcio, cobre e ferro (MAKINEN, 2000).

A utilização de xilitol em nutrição parenteral vem sendo amplamente aceita no Japão e em alguns países da Europa. Estudos mostraram que a administração hipocalórica de xilitol juntamente com aminoácidos preserva as proteínas do paciente mais eficientemente que a infusão apenas de aminoácidos ou em combinação com glicose (WAITZBERG, 1995). Além disto, comparado à glicose, o uso de xilitol reduz a secreção de insulina e a lipogênese hepática, como também garante o fluxo de aminoácidos dos tecidos periféricos para os órgãos, provendo precursores para a síntese de proteínas (MAKINEN, 2000).

Pesquisas estão cada vez mais encontrando novas aplicações para o xilitol, principalmente em uso clínico. O xilitol pode ser utilizado para a prevenção de otite média aguda, pois inibe o crescimento e a adesão de espécies de *Pneumococcus* spp. e a adesão de *Haemophilus influenzae* em células da nasofaringe. Ele foi testado na forma de xarope, goma de mascar e pastilha diminuindo em 40% a ocorrência de otite em crianças (UHARI *et al.*, 1998). Outra aplicação do xilitol é a

proteção contra osteoporose como demonstrado por MATTILA *et al.* (1998) em que ratos submetidos a ovariectomia com uma dieta suplementada com 10% de xilitol, apresentaram maior densidade óssea e volume trabecular, além de manter a constituição mineral dos ossos. Estes efeitos protegem contra o enfraquecimento das propriedades biomecânicas dos ossos, causado pela osteopenia (redução da calcificação ou da densidade óssea) devido à falta de estrógenos, situação similar a que acontece na menopausa em mulheres.

O xilitol em aerossol pode prevenir infecções pulmonares, inclusive em pacientes com fibrose cística, pois reduz a concentração salina do líquido que cobre as células do revestimento interno dos pulmões, aumentando a atividade antibiótica corpórea natural contra as bactérias (ZABNER *et al.*, 2000). Para o controle do balanço da microbiota da pele, MASAKO *et al.* (2005) observaram que o uso da combinação de xilitol com farnesol inibe a formação de biofilme de *Staphylococcus aureus* além de dissolver o biofilme já existente.

Atualmente, o xilitol já é utilizado em produtos alimentícios, farmacêuticos ou de saúde oral em mais de 35 países (CCC, 2006) com produção anual acima de 500.000 toneladas. As principais empresas que produzem este insumo são *Xyrofin Company*, na Finlândia (*Functional Foods from Finland*, 2006), *Danisco A/S*, no Reino Unido e na China (Danisco, 2006), *Towa Chemical Industry Co. Ltd.*, na Indonésia e Tailândia (Mitsubish Corporation, 2006), *Roquette Frères S.A.*, na França (Roquette Frères, 2006) e *Bolak Co. Ltd.*, na Coreia (Bolak, 2006).

1.2. Toxicidade e Tolerância

Em organismos superiores, o metabolismo do xilitol ocorre principalmente no fígado onde pode ser transformado em glicose a uma taxa entre 20 e 80%, dependendo da necessidade. Sua absorção é lenta e, por isso, também pode ser metabolizado indiretamente pela biota intestinal. O xilitol é bem tolerado pelo corpo humano com consumo de até 0,5 g/kg de peso corpóreo por dia. Em alguns casos, o consumo acima desta proporção pode apresentar efeito laxativo devido ao

desbalanço osmótico causado no intestino grosso pela baixa taxa de assimilação (PARAJÓ *et al.*, 1998a; MAKINEN, 2000).

Quanto à segurança do consumo e utilização por humanos, o xilitol é aceito pela Comunidade Econômica Européia - *European Economic Community* desde 1984, enquanto a Agência de Controle de Alimentos e Medicamentos dos EUA - *U.S. Food and Drug Administration* (FDA) o classifica como “geralmente reconhecido como seguro” (*Generally Recognized as Safe* - GRAS) desde 1986 e “seguro para os dentes” (*Safe for Teeth*) desde 1994. O Comitê de aditivos alimentares - *Joint Expert Committee on Food Additives* da Organização Mundial de Saúde, confirmou os estudos de toxicidade e o classificou como aceitável para consumo diário (*Acceptable Daily Intake* - ADI). No Brasil, o xilitol foi aprovado como produto dietético pelo Ministério da Saúde em 1980 (AGUIAR *et al.*, 1999).

2. Obtenção de Xilitol

O xilitol pode ser recuperado de fontes naturais como vegetais, fungos e líquens por extração sólido-líquido, porém como está presente em pequena proporção, menos de 0,9 g/100g, este processo se torna economicamente inviável (PARAJÓ *et al.*, 1998a).

A produção de xilitol em larga escala ocorre pelo processo químico, que consiste na redução de xilose, derivada principalmente de hidrolisados de materiais lignocelulósicos ricos em xilana. O processo convencional inclui quatro passos básicos: i) hidrólise ácida de material vegetal, ii) purificação do hidrolisado até obtenção de xilose pura, iii) hidrogenação catalítica da xilose a xilitol e, iv) purificação e cristalização do produto. Este processo está patenteado desde 1977 por MELAJA e HAMALAINEN.

O rendimento do processo químico, bem como a qualidade do xilitol, são dependentes da pureza da solução inicial de xilose uma vez que a presença de impurezas interfere na redução catalítica. Para a obtenção de uma solução de xilose de elevada pureza, são necessários operações de troca-iônica, descoloração e fracionamento cromatográfico. Além disto, após a remoção do catalisador por

filtração e troca-iônica, a solução de xilitol é concentrada, sofre fracionamento cromatográfico utilizando resinas catiônicas e é cristalizada para obtenção do produto puro (AGUIAR *et al.*, 1999). As diversas etapas de purificação para remoção de resíduos e sub-produtos resultam no aumento de tempo de processamento e encarecimento do produto. O alto custo de produção de xilitol, dez vezes maior ao da sacarose ou sorbitol, limita a sua utilização em larga escala (PARAJÓ *et al.*, 1998a).

Como alternativa a este processo, o xilitol pode ser produzido microbiologicamente a partir da xilose obtida na hidrólise de materiais lignocelulósicos, sem a necessidade de purificação da matéria prima (ONISHI e SUZUKI, 1971; SILVA *et al.*, 1996; FELIPE *et al.*, 1997; PARAJÓ *et al.*, 1998a, b, c). Este processo, que utiliza microrganismos fermentadores de xilose para produção de xilitol foi patenteado na Finlândia em 1992 (HEIKKILA *et al.*, 1992) e é utilizado pela indústria Bolak Co. Ltd. na Coréia (BOLAK, 2006). A presença de compostos orgânicos como xilose, arabinose, arabitol, manose, manitol entre outros, e a baixa concentração de xilitol no final da fermentação dificultam as etapas de separação, purificação e cristalização. Porém, DE FAVERI *et al.* (2002) demonstraram através de estudos de cristalização de xilitol que é possível obter um produto altamente puro (grau de pureza > 90%) utilizando hidrolisado hemicelulósico fermentado por *Debaryomyces hansenii*.

Vários microrganismos já foram identificados como fermentadores de xilose a xilitol. Dentre os fungos filamentosos pode-se citar espécies dos gêneros *Penicillium*, *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Glicocladium*, *Byssochlamys*, *Myrothecium*, *Neurospora*, *Rhodotorula*, *Torulopsis* (CHIANG e KNIGHT, 1960); *Mucor* e *Fusarium* (PARAJÓ *et al.* 1998a); além de *Petromyces albertensis* (DAHIYA, 1991). Poucas bactérias, como *Corynebacterium* sp., *Enterobacter liquefaciens* e *Mycobacterium smegmatis*, formam xilitol (WINKELHAUSEN e KUZMANOVA, 1998) porque, geralmente, convertem xilose diretamente em xilulose sem os passos de oxirredução (Figura 2). Porém, um *screening* realizado por RANGASWAMY e AGBLEVOR (2002) identificou espécies dos gêneros *Serratia*, *Cellulomonas* e *Corynebacterium* que foram capazes de produzir xilitol com rendimento de até 0,57g xilitol/g xilose.

Entre os microrganismos identificados pela maior eficiência de conversão de xilose em xilitol destacam-se as leveduras, especialmente às pertencentes ao gênero *Candida* (Tabela 1). A produção de xilitol por fermentação é regulada por diversos parâmetros como oxigênio disponível, pH, temperatura, nível inicial de xilose, presença de outros açúcares e inóculo inicial. Para cada microrganismo utilizado estes parâmetros devem ser otimizados.

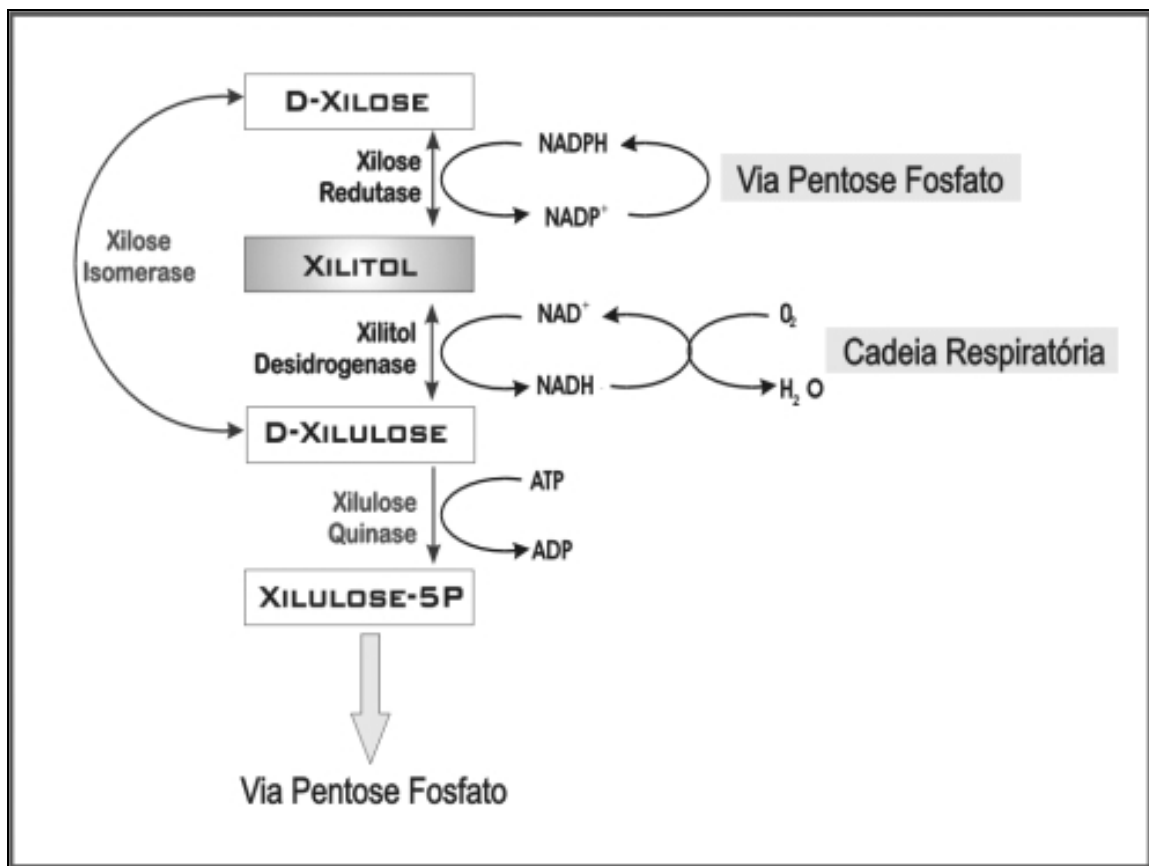


Figura 2. Metabolismo de xilose e regeneração de cofatores. Adaptado de BARBOSA *et al.* (1988) e DAHIYA (1991)

Tabela 1. Produção de xilitol a partir de xilose por diferentes espécies de *Candida* spp.

Levedura	Xilose (g/L)	Xilitol (g/L)	Q _P (g/L.h)	Y _{P/S} (g/g)	t(h)
<i>Candida</i> sp. L-102	114	100	1,53	0,88	66
<i>C. guilliermondii</i>	300	221	0,54	0,74	406
<i>C. parapsilosis</i>	300	210	3,18	0,70	66
<i>C. tropicalis</i> IFO-0618	150	94	2,94	0,63	32
<i>C. tropicalis</i> KFCC-10960	300	246	3,62	0,82	68

Q_P: produtividade, Y_{P/S}: rendimento.
Fonte: OH e KIM (1998)

Existem ainda microorganismos que, por possuírem a enzima arabitol desidrogenase, formam xilitol a partir de arabinose ou arabitol. Dentre eles destaca-se *Aspergillus niger* (WITTEVEEN *et al.*, 1994), *Pichia stipitis* (HALLBORN *et al.*, 1995) e *Gluconobacter oxydans*, que alcançou o rendimento de 0,98 g xilitol/ g arabitol, quando etanol e glicose também estavam presentes no meio de cultura (SUZUKI *et al.*, 2002). Estes microorganismos possivelmente participam do processo fermentativo, ou mesmo fornecem alternativas para engenharia metabólica, porém novos estudos ainda estão sendo conduzidos.

A enzima arabitol desidrogenase de *Candida tropicalis* já foi caracterizada e seu gene foi clonado por MURRAY *et al.* (1995), indicando que esta levedura também pode utilizar arabinose para formar xilitol.

3. Bioconversão de Xilose em Xilitol

Geralmente, em microorganismos, o xilitol é um intermediário do metabolismo da xilose, porém, na maioria das bactérias e em algumas leveduras, a xilose é convertida diretamente em xilulose pela enzima xilose isomerase (EC 5.3.1.5) sem a formação de xilitol (YOKOYAMA *et al.* 1995a). Já a maioria das leveduras metabolizam xilose pela redução a xilitol catalisada pela enzima xilose redutase (EC 1.1.1.21) na presença de cofatores reduzidos: NADPH e/ou NADH.

O xilitol formado durante o metabolismo de xilose pode ser exportado ou oxidado a xilulose, esta reação é catalisada pela enzima xilitol desidrogenase (EC 1.1.1.9) dependente de cofatores oxidados NADP⁺ e/ou NAD⁺ (JEFFRIES, 1983; SLININGER *et al.*, 1987). A xilulose é então fosforilada no carbono 5 pela xilulose quinase e metabolizada pela via pentose fosfato, além de poder sofrer isomerização a xilose e reiniciar a seqüência de reações (DAHIYA, 1991). O esquema do metabolismo inicial de xilose em microrganismos é apresentado na Figura 2.

Tabela 2. Especificidade pelos cofatores das enzimas xilose redutase (XR) e xilitol desidrogenase (XDH) em diferentes leveduras.

Levedura	Cofator		Referência
	XR	XDH	
<i>Candida utilis</i>	NADPH	NAD ⁺	BRUINENBERG <i>et al.</i> (1984)
<i>Pichia stipitis</i>	NADPH* ou NADH	NAD ⁺ ou NADP ⁺	HAHN-HAGERDAL <i>et al.</i> (1994)
<i>Candida shehatae</i>	NADPH* ou NADH	NAD ⁺ ou NADP ⁺	HAHN-HAGERDAL <i>et al.</i> (1994)
<i>Pachysolen tannophilus</i>	NADPH* ou NADH	NAD ⁺ ou NADP ⁺	HAHN-HAGERDAL <i>et al.</i> (1994)
<i>Kluyveromyces lactis</i>	NADPH	n.a.	BILLARD <i>et al.</i> (1995)
<i>Debaryomyces hansenii</i>	n.a.	NAD ⁺	GIRIO <i>et al.</i> , (1996)
<i>Candida tropicalis</i>	NADPH	NAD ⁺ * ou NADP ⁺	YOKOYAMA <i>et al.</i> (1995a) TAKAMIZAWA <i>et al.</i> (2000)
<i>Candida guilliermondii</i>	NADPH	NAD ⁺ ou NADP ⁺	SILVA <i>et al.</i> (1996)
<i>Candida intermedia</i>	NADPH* ou NADH	n.a.	MAYR <i>et al.</i> (2000)
<i>Candida tenuis</i>	NADPH* ou NADH	n.a.	KAVANAGH <i>et al.</i> (2003)
<i>Candida parapsilosis</i>	NADPH ou NADH*	n.a.	LEE <i>et al.</i> (2003)
<i>Cryptococcus flavus</i>	NADPH	n.a.	MAYR <i>et al.</i> (2003)

n.a.: não apresentado, *: preferencialmente

As enzimas xilose redutase (XR) e xilitol desidrogenase (XDH) podem ter diferentes especificidades por cofatores (Tabela 2) e ainda podem se apresentar em mais de uma forma no mesmo organismo. VERDUYN *et al.* (1985a,b) demonstraram que *P. stipitis* possui somente uma forma de XR com especificidade para o cofator fosfatado ou não, enquanto *Pachysolen tannophilus* possui duas formas de XR com diferentes especificidades. Em *Candida intermedia*, foram isoladas duas formas de XR: uma com especificidade apenas por NADPH, e outra que pode usar NADH ou

NADPH como cofator. Neste caso, a razão de NADH/NADPH disponível no citosol deve determinar qual das duas formas será utilizada para conversão de xilose em xilitol (MAYR *et al.*, 2000).

A produção de xilitol por leveduras está intimamente relacionada à regeneração de cofatores reduzidos (BRUINENBERG *et al.*, 1984; BARBOSA *et al.*, 1988). Pela via pentose fosfato, 1 mol de glicose-6-fosfato é completamente oxidado a H₂O e CO₂ gerando 12 moles de NADPH a partir de NADP⁺. A fim de manter o balanço de cofatores, o NADPH produzido é usado para reduzir xilose a xilitol, sendo assim, o xilitol é catabolizado para produzir glicose-6-fosfato e regenerar suficiente NADP⁺ para manter o ciclo (BARBOSA *et al.*, 1988).

A partir da análise das constantes cinéticas K_M e V_{max} das enzimas XR e XDH é possível explicar o acúmulo de xilitol em *C. guilliermondii* FTI 20037. O K_M de XR (0,18 M) é quatro vezes menor que o K_M de XDH (0,75 M), enquanto a V_{max} para XR (243 U/mL) é maior que a V_{max} de XDH (168 U/mL) - isto mostra que a formação de xilitol é mais rápida do que sua conversão em xilulose (SILVA *et al.*, 1996).

3.1. Xilose Redutase

As XR de leveduras pertencem à família das aldoredutases, superfamília aldocetoredutases, e catalisam a redução reversível de aldeído e cetona em seus álcoois correspondentes. Estas enzimas estão presentes no citoplasma de microrganismos capazes de metabolizar xilose como fonte de carbono e, devido ao interesse em aproveitar esta pentose em processos fermentativos, diversas pesquisas vêm sendo desenvolvidas.

As enzimas XR de diferentes leveduras e fungos já foram purificadas e caracterizadas, sendo em sua maioria monoméricas, com massa molecular entre 33 e 40 kDa, porém em *P. stipitis*, *Neurospora crassa*, *C. tropicalis* e *Candida parapsilosis*, a enzima apresenta duas subunidades (LEE, 1998; LEE *et al.*, 2003). Como pode ser observado na Tabela 2, algumas enzimas possuem especificidade unicamente por NADPH - monoespecífica, e outras podem utilizar tanto NADPH como NADH - duplo-específica. Já *C. intermedia* apresenta isoenzimas, onde uma é

mono-específica e a outra é duplo-específica (NIDETZKY *et al.*, 2003). A maioria das leveduras já estudadas apresenta XR duplo-específicas e estas preferem NADPH como cofator, excepcionalmente *C. parapsilosis* apresenta uma enzima que prefere NADH (LEE *et al.*, 2003). YOKOYAMA *et al.* (1995a) sugerem que microrganismos que apresentam XR-NADH dependente são melhor produtores de etanol, ao contrário daqueles que apresentam XR-NADPH dependente que produzem xilitol ao invés de etanol.

O gene *XYL1*, que codifica XR, de *P. stipitis* foi clonado e expresso na levedura *Saccharomyces cerevisiae*, porém, esta não pôde utilizar xilose como fonte de carbono. Este gene não apresenta íntrons e a proteína de 318 resíduos de aminoácidos (aa), com massa molecular de 35,8 kDa, é codificado por uma ORF de 954 pb. (AMORE *et al.*, 1991). O gene que codifica para XR de *P. tannophilus* foi isolado e caracterizado por BOLEN *et al.* (1996). Em *Kluyveromyces lactis*, o gene *XYL1* foi isolado, apresentando uma ORF de 987 pb, que codifica um polipeptídeo de 329 aa, com 62% de identidade com o homólogo em *P. stipitis*. Este gene está presente em única cópia no cromossomo V e codifica para uma enzima com atividade dependente de NADPH sendo expressa constitutivamente (BILLARD *et al.*, 1995).

O gene *XYL1* de *C. guilliermondii* foi clonado e expresso em *Pichia pastoris* sob controle do promotor induzido *AOX1*, a proteína produzida apresentou tamanho de 318 aa, com massa molecular de 36 kDa, igual à proteína nativa de *P. stipitis*, porém, com 70,4% de identidade (HANDUMRONGKUL *et al.*, 1998). O gene *XYL1* de *C. parapsilosis* foi clonado e expresso em *C. tropicalis*, sob controle do promotor da álcool desidrogenase, o polipeptídeo de 324 aa e 36,6 kDa é produto de uma ORF de 975 pb (LEE *et al.*, 2003).

Em *C. tropicalis*, YOKOYAMA *et al.* (1995b), identificaram dois genes que codificam XR, que apresentam uma ORF de 972 pb, que codifica um polipeptídeo de 324 aa com 73% de identidade com o homólogo em *P. stipitis*. O seqüenciamento destes genes revelaram que as seqüências de aminoácidos preditas diferem em apenas 3 aa. Estes genes foram clonados e expressos em *Escherichia coli*. SUZUKI *et al.* (1999) expressaram o gene de xilose redutase de *C. tropicalis* em *E. coli* e

obtiveram pH ótimo de 6,0, temperatura ótima de 55°C a 60°C e K_M para xilose igual a 38,2 mM para a enzima recombinante e 26,9 mM para nativa, enquanto para NADPH foram observados os valores de K_M de 14,1 μ M e 9,1 μ M para a recombinante e a nativa, respectivamente. Além de xilose, a enzima foi capaz de utilizar como substrato arabinose, gliceraldeído e galactose.

LEE (1998), comparando as seqüências primárias de XR de diferentes leveduras, observou que são conservados em todas elas, os resíduos Asp⁴³, Tyr⁴⁸, Lys⁷⁷, His¹¹⁰, Lys²⁶², que participam diretamente na catálise ou na ligação do cofator.

3.2. Xilitol Desidrogenase

A enzima xilitol desidrogenase (XDH), pertencente à família álcool desidrogenase é encontrada em microrganismos que metabolizam xilose pela formação de xilitol, sendo que a enzima catalisa a oxidação do álcool em cetona utilizando NAD⁺ como cofator, porém já foram isoladas formas de enzimas que são capazes de utilizar as duas formas do cofator: fosforilada ou não (Tabela 2).

TAKAMIZAWA *et al.* (2000) purificaram parcialmente a enzima xilitol desidrogenase de *C. tropicalis* IFO 0618 com a finalidade de desenvolver um biosensor de xilitol. Eles observaram que o pH ótimo (8,0) foi semelhante ao de XDH de *Candida shehatae*, *P. stipitis* e *P. tannophilus*, mas a temperatura ótima (50°C) foi superior. Comparada com enzimas de outras leveduras, o K_M de XDH de *C. tropicalis* para xilitol é maior (49,8 μ M) e portanto como biosensor é menos sensível, porém este pode ser um dos motivos que explicam porque *C. tropicalis* é uma das melhores espécies de levedura para produção de xilitol. Dos álcoois testados, xilitol foi oxidado mais rapidamente, apresentando atividade também por sorbitol e ribitol, a enzima não mostrou atividade em arabitól, glicerol e etanol.

Em *A. niger*, foram caracterizadas duas formas de XDH: uma NAD⁺ dependente já isolada em diferentes leveduras, como xilitol:NAD⁺ 2-oxidoreductase DXDH (EC 1.1.1.9), e outra, NADP⁺ dependente, que atuaria principalmente na redução de xilulose, identificada como xilitol:NADP⁺ 4-oxidoreductase LXDH

(EC 1.1.1.10) permitindo a formação de xilitol a partir de arabinose (WITTEVEEN *et al.*, 1994).

Na levedura *P. stipitis*, também foram encontradas duas formas de XDH: uma pertencente à família das álcool desidrogenases de cadeia média, correlacionada a sorbitol desidrogenase (EC 1.1.1.14) pela presença do sítio de ligação a zinco; e outra, da família das desidrogenases de cadeia curta com dois resíduos característicos no seu sítio ativo, uma tirosina e uma leucina (PERSSON *et al.*, 1993; JORNVALL *et al.*, 1995). Recentes estudos com proteínas da família das desidrogenases de cadeia curta mostraram um padrão de α/β , com uma folha β central correspondente ao domínio *Rossmann-fold*. Além disto, foi proposto um mecanismo de reação com o envolvimento da tétrede Asn-Ser-Tyr-Lys (OPPERMANN *et al.*, 2003).

GIRIO *et al.* (1996) sugerem que os valores de K_M de XDH para o substrato e o cofator podem mostrar qual levedura acumularia maior concentração de xilitol. A enzima de *D. hansenii* apresenta K_M na mesma ordem de magnitude para xilitol e K_M de 2 a 5 vezes maior para NAD^+ , quando comparado ao de outras leveduras. Assim sendo, diminuindo a concentração do cofator, a oxidação de xilitol cessaria havendo acúmulo deste intermediário no meio. PHADTARE *et al.* (1997) consideram a XDH como a enzima chave na fermentação de xilose para formação de etanol já que sua atividade determina a eficiência da conversão do substrato. WALFRIDSSON *et al.* (1997) transformaram *S. cerevisiae*, com genes de xilose redutase (*XYL1*) e xilitol desidrogenase (*XYL2*) de *P. stipitis* e analisaram o produto formado durante a utilização de xilose. Quando a razão entre as atividades específicas das duas enzimas (XR:XDH) foi igual a 17,5, formou-se 0,82 g de xilitol por grama de xilose consumida; quando a razão foi igual a 5,0, formou-se 0,58 g de xilitol e, quando a razão foi igual a 0,06, nenhum xilitol foi formado, porém, observou-se maior produção de etanol.

As enzimas XDH de *C. shehatae*, *P. tannophilus*, *N. crassa* e *Galactocandida mastotermitis* foram purificadas e caracterizadas, apresentando subunidades com massa molecular de cerca de 40 kDa. As enzimas de *C. shehatae* e *N. crassa* se apresentam com duas subunidades, enquanto que, nas de *P. tannophilus* e *G.*

mastotermitis, existem quatro subunidades (PHADTARE *et al.*, 1997, LUNZER *et al.*, 1998).

Até hoje, o gene *XYL2* foi isolado de poucos organismos. Em 1990, KOTTER *et al.* isolaram o gene *XYL2* de *P. stipitis* e o expressaram em *S. cerevisiae*. Para *Trichoderma reesei*, o gene foi isolado de uma biblioteca de cDNA e apresentou 1,3 kb codificando uma proteína de massa molecular de 40 kDa (WANG *et al.*, 1998). O gene de *G. mastotermitis* com cerca de 1,1 kb foi expresso em *E. coli* por HABENICHT *et al.* (1999). Apesar de *S. cerevisiae* não ser capaz de fermentar xilose, RICHARD *et al.*, (1999) identificaram que a ORF YLR070c codifica para uma proteína com atividade de xilitol desidrogenase. A levedura *Arxula adenivorans* possui o gene *XYL2* (1107 pb) codificando uma proteína de 368 resíduos de aminoácidos e 40.3 kDa (BÖER *et al.*, 2005). O gene *XYL2* da bactéria *G. oxidans* apresentou 798 pb, codificando uma proteína de 27 kDa, confirmada com a purificação e caracterização da enzima que pode ser classificada como da família das desidrogenases de cadeia curta (SUGIYAMA *et al.*, 2003).

3.3. Repressão do Metabolismo de Xilose

Glicose é a fonte de carbono preferencial na grande maioria dos organismos e quando está presente no meio de cultura o consumo de outros açúcares, como a xilose, é impedido por repressão catabólica. A expressão das enzimas envolvidas no catabolismo de xilose é geralmente inibida por glicose e induzida por xilose, este padrão foi observado para xilitol desidrogenase de *Hypocrea jecorina* (SEIBOTH *et al.*, 2003), *A. adenivorans* (BÖER *et al.*, 2005) e *C. tropicalis* (LIMA *et al.*, 2006, submetido), e para xilose redutase e xilulose-5P quinase de *A. niger* (HASPER *et al.*, 2000; van PEIJ *et al.*, 1998).

PRATHUMPAI *et al.* (2004), demonstraram em *Aspergillus nidulans* que a repressão por glicose no metabolismo de xilose é mediado pela proteína CreA (proteína responsiva a cAMP). Esta proteína se liga ao promotor de genes, como os das enzimas XR e XDH, e desta forma reprime a transcrição. Na linhagem desreprimida ($\Delta creA$), quando comparada à linhagem selvagem, glicose e xilose

foram consumidas ao mesmo tempo na mesma proporção e as atividades de xilose redutase e xilitol desidrogenase foram maiores na presença de glicose.

Para estudar a influência da repressão catabólica mediada por Mig1 e Mig2 no metabolismo de xilose, foram construídas duas linhagens *mig1Δ* e *mig1Δ mig2Δ* a partir de *S. cerevisiae* TMB3001, que expressa *XYL1* e *XYL2* de *P. stipitis* e superexpressa xiluloquinase. Os melhores resultados foram obtidos para linhagem *Δmig1*, onde se observou um aumento de 25% no consumo de xilose durante fermentação contínua e o aumento da produtividade de etanol de 0,475 g/L.h para 0,6 g/L.h, porém foi concluído que a repressão por glicose não parece ser o maior obstáculo para o eficiente metabolismo de xilose (ROCA *et al.*, 2004).

3.4. Transporte de Xilose

O transporte de xilose através da membrana pode ser uma das etapas limitantes do metabolismo deste açúcar, sendo assim, para viabilizar o processo fermentativo este fator também deve ser considerado. Estudos de transportadores de xilose e glicose foram realizados em diferentes microrganismos: *S. cerevisiae* (LAGUNAS, 1993), *C. shehatae* (LUCAS e van UDEN, 1986), *Schizosaccharomyces pombe* (HÖFER e NASSAR, 1987), *P. stipitis* (KILLIAN e van UDEN, 1988); *K. lactis* (WESOLOWSKI-LOUVEL *et al.*, 1992), *Candida utilis* (KILLIAN *et al.*, 1993), *D. hansenii* (NOBRE *et al.*, 1999) *Candida succiphila* e *Kluyveromyces marxianus* (STAMBUK *et al.*, 2003). Em todos esses modelos são descritos dois tipos de transporte: por difusão facilitada e/ou simporte de prótons H⁺.

Diversos transportadores de hexoses têm sido identificados em *S. cerevisiae*. Eles podem ser de alta (Hxt2, Hxt6 e Hxt7) ou baixa afinidade (Hxt1, Hxt3 e Hxt4) para glicose e a expressão de Hxt1, Hxt2, Hxt4, Hxt6 e Hxt7 é regulada pelos sensores Snf3 e Rgt2 (ÖZCAN *et al.*, 1996; BOLES e HOLLENBERG, 1997). Os mesmos transportadores também transportam xilose, mas com menor afinidade do que para glicose, frutose ou manose, que quando utilizados como co-substratos

saturam o sistema e inibem o transporte de xilose. (MEINANDER e HAHN-HAGERDAL, 1997).

LUCAS e van UDEN (1986) estudaram o transporte de monômeros de hemicelulose em *C. shehatae* e constataram, que tanto glicose, como xilose são transportadas por sistema de difusão facilitada e também por simporte de prótons. Quando crescida sob condições de supressão de fontes de carbono, esta levedura produz um sistema de difusão facilitada que reconhece glicose, D-manose e D-xilose. Glicose e xilose são mutuamente inibidores não competitivos indicando que as duas atividades nos sistemas de afinidade correspondem a dois simportes distintos com K_S e V_{max} próprios (K_S entre 1,0-3,4 mM para glicose e 100-153 mM para xilose; V_{max} entre 2,0-2,6 mmols/g.h para glicose e 20-25 mmols/g.h para xilose). O mesmo comportamento de inibição foi observado em *P. stipitis* (KILIAN *et al.*, 1988) e para *C. intermedia*, para a qual também foram propostos dois sistemas de transporte de xilose: um com alta afinidade, porém com baixa capacidade e fortemente inibido por glicose, provavelmente por difusão facilitada, e outro por simporte de prótons, com baixa afinidade, porém com alta capacidade de transporte (GARDONYI *et al.*, 2003a). STAMBUK *et al.* (2003) analisando a cinética e a regulação da assimilação de xilose por *C. succiphila* e *K. marxianus*, concluíram que, em leveduras, existe uma grande variedade de transportadores de D-xilose com diferentes padrões de expressão regulados tanto pela disponibilidade de açúcares, quanto pelas condições de crescimento.

A enzima XR possui baixa afinidade por xilose ($K_M > 50-100\text{mM}$), sendo necessária alta concentração intracelular para sua eficiente utilização (RIZZI *et al.*, 1988). ELIASSON *et al.* (2000) demonstraram que, em *S. cerevisiae* recombinante contendo as enzimas para o metabolismo de xilose, o transporte desta pentose limita o seu fluxo e seu metabolismo, diminuindo o rendimento da fermentação. GARDONYI *et al.* (2003b) propuseram que *S. cerevisiae*, mesmo expressando os genes do metabolismo de xilose, utiliza menos este açúcar do que outras leveduras, tais como *P. stipitis* ou *C. shehatae*, porque estas possuem transportadores específicos, enquanto *S. cerevisiae* transporta xilose por transportadores de hexose de alta afinidade.

LEE *et al.* (2002) estudando a afinidade dos transportadores, observaram que xilose pode ser internalizada por transportadores de glicose de alta e baixa afinidade e que existe outro sistema de transporte de açúcares além dos transportadores de glicose. Os autores propõem que a expressão do transportador de alta afinidade de glicose e do transportador de xilose pode ser uma estratégia para aumentar a produtividade de xilitol por *S. cerevisiae* recombinante. Uma linhagem de *S. cerevisiae* recombinante capaz de metabolizar xilose, porém deficiente em 18 transportadores de monossacarídeos, não foi capaz de crescer em xilose como única fonte de carbono. Quando alguns genes de transportadores (*HXT4*, *HXT5*, *HXT7* e *GAL2*) foram reintroduzidos, a levedura restabeleceu o metabolismo de xilose (HAMACHER *et al.*, 2002).

Apesar da importância do transporte de xilose para o seu metabolismo, comparando-se recombinantes de *Lactococcus lactis* expressando *XYLT* (transportador simporte xilose-H⁺) de *Lactobacillus brevis*, foi observado que não houve diferença de produtividade entre o que expressava ou não o transportador de xilose (NYYSSOLA *et al.*, 2005). Em *S. cerevisiae* a superexpressão de transportadores de xilose não aumentou o seu crescimento, nem a taxa de fermentação em condições aeróbicas, indicando que o transporte de xilose não determina o seu fluxo (HAMACHER *et al.*, 2002).

4. Leveduras do Gênero *Candida*

Candida é um gênero de ascomicetos que se apresenta, geralmente, na forma unicelular, porém, muitas espécies também se desenvolvem como hifas, como as que podem desenvolver infecções oportunistas. A espécie patogênica ao homem mais conhecida é *C. albicans* que se desenvolve na pele, na mucosa oral ou vaginal. Em indivíduos imunocomprometidos, em adição às lesões superficiais, podem-se desenvolver esofagites ou endocardites e outras espécies podem se desenvolver além de *C. albicans*. A virulência de espécie de *Candida* spp. é atribuída ao dimorfismo, a aderência, secreção de enzimas, diversidade de fenótipos,

variabilidade de antígenos e receptores que se ligam ao sistema do complemento (GILFILLAN *et al.*, 1998).

Além da importância para a saúde pública, o gênero *Candida* apresenta diversos outros interesses. Por exemplo, *C. guilliermondii* pode ser usada em biorremediação por ser capaz de assimilar e metabolizar hidrocarbonetos (ISMAILOV, 1985), e *C. antarctica* e *C. tropicalis* são empregadas na produção de ácidos dicarboxílicos, matéria-prima para produção de perfumes, poliamida, poliéster, adesivos e antibióticos (PICATAGGIO *et al.*, 1991; CRAFT *et al.*, 2003). Contudo, uma das principais áreas de aplicação de leveduras do gênero *Candida* é na indústria alimentícia (Tabela 3). Mesmo podendo ser patogênicas oportunistas, a Agência de Controle de Alimentos e Medicamentos dos EUA - *US Food and Drug Administration* (FDA) tem permitido o uso de *C. guilliermondii* e *C. lipolytica* na produção de ácido cítrico.

Tabela 3. Espécies de *Candida* spp. com aplicação na indústria de alimentos.

Processo	Microrganismo	Referência
Glutamato Monosódico	<i>C. utilis</i> , <i>C. lipolytica</i> e <i>C. krusei</i>	Oki <i>et al.</i> (1971)
Ácido Cítrico	<i>C. lipolytica</i>	Pazouki <i>et al.</i> (2000)
Acido Ascórbico (vitamina C)	<i>C. norvegensis</i> e <i>C. antarctica</i>	Cayle <i>et al.</i> (1986) Yan <i>et al.</i> (1999)
Riboflavina (vitamina B2)	<i>C. guilliermondii</i>	Ghanem <i>et al.</i> (1992)
L-Arabitol	<i>C. entomaea</i>	Saha e Bothast (1996)
Xilitol	<i>C. tropicalis</i> e <i>C. guilliermondii</i>	Meyrial <i>et al.</i> (1991) Yahashi <i>et al.</i> (1996)

As leveduras do gênero *Candida* são conhecidas também como produtoras de xilitol. Dentre as espécies já estudadas, *C. tropicalis* e *C. guilliermondii* são as mais promissoras, apresentando produtividade acima de 0,7 g de xilitol/g de xilose. O processo de produção de xilitol por *C. tropicalis* foi patenteado nos EUA e no Japão por KIM *et al.* (1999a e 2000).

GRANSTRÖM e LEISOLA (2002), estudaram o metabolismo de xilose em *C. tropicalis* e *C. guilliermondii* e demonstraram que a primeira apresentou taxa de produção de xilitol máxima igual a 196 C-mmol/Cmol CDW/h após 6h de fermentação, enquanto a segunda apresentou 92,3 C-mmol/Cmol CDW/h após 10h de fermentação. Analisando os trabalhos publicados nos últimos cinco anos, nota-se que a melhor condição para produção de xilitol por *C. tropicalis* foi estabelecida por SHEU *et al.* (2003) que alcançou rendimento igual a 0,95 g xilitol/ g xilose e produtividade igual 4,68 g/L.h, em fermentação com baixa aeração (0,2 L/min) e com o potencial oxi-redoxi igual a -180 mV, controlado pela alimentação com glicose. Para *C. guilliermondii*, a melhor condição apresentou rendimento igual a 0,76 g xilitol/g xilose e rendimento igual a 1,55 g/L.h, utilizando fermentação em condições de baixa aeração (GIMENES *et al.*, 2002).

Os estudos utilizando *C. guilliermondii* FTI 20037 apresentam parâmetros fermentativos superiores quando comparados aos obtidos por GIMENES *et al.* (2002), porém estes não foram considerados, pois, segundo LIMA *et al.* (2003), esta levedura é, na verdade, uma linhagem de *C. tropicalis* como demonstrado posteriormente nesse trabalho.

4.1. *Candida tropicalis*

C. tropicalis é uma levedura dimórfica, esporogênica, diplóide, que tem sido estudada quanto a sua fisiologia e suas aplicações práticas. Esta levedura possui importantes aplicações industriais por ser capaz de assimilar n-alcenos produzindo ácidos dicarboxílicos de cadeia longa para produção de poliamida, poliéster e perfume (PICATAGGIO *et al.*, 1991), bem como por fermentar xilose formando xilitol. DOI *et al.* (1992), avaliando o tamanho de cromossomos de diversas espécies do gênero *Candida*, confirmaram que *C. tropicalis* é diplóide, estimando o tamanho do genoma em 30 Mb, com número de cromossomos total igual a 12. BLANDIN *et al.* (2000) apresentaram os primeiros resultados do projeto genoma de *C. tropicalis*, as seqüências foram inicialmente depositadas no EMBL *Nucleotide Sequence Database*.

Para transformação de *C. tropicalis*, já foram utilizados diferentes métodos, tais como cloreto de lítio, formação de esferoplastos (HAAS *et al.*, 1990; KANAYAMA *et al.*, 1998), acetato de lítio (LEE *et al.*, 2003) e eletroporação (ROHRER e PICATAGGIO, 1992). Para se estabelecer um sistema de transformação é preponderante encontrar uma marca de seleção adequada, tendo em vista que muitas espécies do gênero *Candida* traduzem CUG, um códon universal de leucina, como serina (SUGITA e NAKASE, 1999), o que inviabiliza o uso de marcas dominantes de outros organismos. HARA *et al.* (2000) construíram um vetor utilizando o gene de resistência a higromicina (HYG), alterando todos os nove códons CTG para CTC por mutagênese sítio-dirigida.

Zeocina é um antibiótico, membro da família de bleomicina/fleomicina, isolado de *Streptomyces verticillus* que apresenta alta toxicidade contra bactérias, fungos, plantas e células de mamíferos (BARON *et al.*, 1992; DROCOURT *et al.*, 1990; MULSANT *et al.*, 1988; PEREZ *et al.*, 1989). Proteínas que conferem resistência a zeocina têm sido isoladas e caracterizadas, como por exemplo, o produto do gene *ble* de *Streptoalloteichus hindustanus* (CALMELS *et al.*, 1991; DROCOURT *et al.*, 1990). Esta proteína apresenta 13,7 kDa e tem a capacidade de se ligar a zeocina, inibindo sua atividade de quebra do DNA. A expressão desta proteína em hospedeiros procarióticos e eucarióticos confere resistência a zeocina. TANG *et al.* (2003) sintetizaram o gene *ble* trocando os códons CUG para códons de leucina a fim de utilizar zeocina como marca de seleção no sistema de transformação de *Candida rugosa*. LEE *et al.* (2003) obtiveram transformantes de *C. tropicalis* utilizando um vetor com resistência a aureobasidina A como marca de seleção. Aureobasidina A é um peptídeo cíclico, produzido por *Aureobasidium pullulans*, que é inibidor do gene da enzima inositol fosfoceramida sintetase (*AUR1*), impedindo a síntese de esfingolípídeos (ZHONG *et al.*, 2000). A construção de um sistema de transformação para leveduras utilizando o gene de resistência a aureobasidina foi primeiramente descrito por HASHIDA-OKADO *et al.* (1998).

Com a finalidade de utilizar a marca auxotrófica *URA3*, o gene que codifica para enzima orotidina 5'-monofosfato descarboxilase, em *C. tropicalis*, HAAS *et al.* (1990) e HARA *et al.* (1999) geraram mutantes *ura3⁻*. Para tanto, utilizaram meio

contendo 5-FOA (ácido 5-fluorótico) uma droga que permite a contra-seleção. Contudo a exposição a este ácido pode gerar rearranjos cromossômicos e outras anormalidades genéticas (WELLINGTON e RUSTCHENKO, 2005) e além disto *C. tropicalis* apresenta dois alelos para este gene (HAAS *et al.*, 1990) e por ser diplóide (DOI *et al.*, 1992) são necessários pelo menos quatro eventos de mutação. Uma linhagem de *C. tropicalis* auxotrófica para uracila está disponível na *American Type Culture Collection* (ATCC), porém o seu uso está patenteado nos EUA (US5254466). HARA *et al.* (1999) construíram um vetor de replicação autônoma para *C. tropicalis* utilizando sua seqüência ARS (*Autonomously Replicating Sequence*), cuja utilização está patenteada no Japão (JP2000078980-A).

5. Engenharia Metabólica

O aumento das atividades celulares pela manipulação de funções enzimáticas, regulatórias e de transporte na célula com o uso da tecnologia do DNA recombinante é referido como engenharia metabólica (BAYLEY, 1991). Esta área multidisciplinar utiliza princípios de engenharia química, ciência computacional, bioquímica e biologia molecular. O objetivo da alteração de vias metabólicas pode ser o aumento de produtividade de um processo ou o aumento da capacidade metabólica com a introdução de atividades extrínsecas (YANG *et al.*, 1998). A engenharia metabólica consiste em duas partes: análise do sistema celular e construção da linhagem recombinante, que interagem e se desdobram em diversos *rounds* até a obtenção da linhagem recombinante ótima (OSTERGAARD *et al.*, 2000) compreendendo as etapas de análise, planejamento e síntese (NIELSEN, 2001),

Por engenharia metabólica pode-se alterar o transporte de açúcares e sua assimilação, a via pentose fosfato, a glicólise, os passos finais da fermentação e o balanço redox intracelular (JEFFRIES e JIN, 2004). Diversas modificações genéticas enfocando o metabolismo de xilose já foram realizadas, porém o principal objetivo destes estudos é, principalmente, a fermentação de xilose para obtenção de etanol. A estratégia mais utilizada para viabilizar o consumo de xilose por *S. cerevisiae*

envolve a introdução de genes de leveduras capazes de utilizar xilose, por exemplo, *C. shehatae*, *P. tannophilus* e *P. stipitis*.

KOTTER *et al.* (1990) isolaram o gene *XYL2* de *P. stipitis* e transformaram *S. cerevisiae* obtendo transformantes capazes de metabolizar xilose e produzir etanol. AMORE *et al.* (1991) clonaram o gene *XYL1* de *P. stipitis* e expressaram em *S. cerevisiae*, porém, os transformantes não foram capazes de utilizar xilose, uma vez que a levedura já possui outra aldose redutase. Em 1998, HO *et al.* transformaram *S. cerevisiae* com os genes *XYL1* e *XYL2* de *P. stipitis* e aumentaram a expressão de xiluloquinase (*XKS1*) homóloga e obtiveram transformantes capazes de co-fermentar xilose e glicose. A superexpressão de *XKS1* em *S. cerevisiae* contendo os genes *XYL1* e *XYL2*, resultou no aumento da produção de etanol a partir de xilose (JOHANSSON *et al.*, 2001). Quando *XYL2* foi superexpresso em *S. cerevisiae*, xilulose foi secretada, indicando que nesta situação, a atividade de xiluloquinase limita o metabolismo de xilose (JIN e JEFFRIES, 2003). WALFRIDSSON *et al.* (1997) expressaram em *S. cerevisiae* diferentes níveis de *XYL1* e *XYL2* de *P. stipitis*, quando a razão entre as atividades específicas das duas enzimas (XR:XDH) foi de 0,06, nenhum xilitol foi formado e observou-se o aumento de 10% na produção de etanol em relação à razão de 5,00. Outra tentativa de melhorar a produtividade de etanol, foi a expressão das enzimas XR e XDH de *P. stipitis* fusionadas, porém apesar do aumento nas atividades destas enzimas, não foi observada alteração na produtividade em etanol (ANDERLUNG *et al.*, 2001). TOIVARI *et al.* (2004) estudando os genes endógenos de *S. cerevisiae* que participam do metabolismo de xilose, superexpressaram *GRE3* e *XYL2* que codificam para uma aldose redutase não específica e XDH, respectivamente. Comparada à linhagem que expressa *XYL1* e *XYL2* de *P. stipitis*, esta cresceu mais lentamente em xilose e acumulou mais xilitol, chegando a 55% de rendimento, porém sem produção de etanol.

Foram realizadas também, modificações utilizando os genes *TKT* (transcetolase) e *TAL* (transaldolase): expressão de *TKT*, *XYL1* e *XYL2* (METZGER e HOLLENBERG, 1994), e expressão de *TKT*, *TAL*, *XYL1* e *XYL2* (WALFRIDSSON *et al.*, 1995), porém, estes trabalhos demonstraram que estas transformações não resultaram em significantes efeitos nas linhagens de *S. cerevisiae* recombinante, o

que indica que a porção não-oxidativa da via da pentose fosfato não é limitante para o metabolismo de xilose nesta levedura.

Tendo em vista que a formação de etanol a partir de xilose por *S. cerevisiae* recombinante é lenta e com baixa produtividade devido ao desbalanço redox gerado no catabolismo, JEPSSON *et al.* (2002) deletaram o gene *ZWF1*, que codifica a enzima glicose-6P desidrogenase a fim de diminuir o fluxo da via das pentoses. Com esta alteração, alcançou-se o rendimento de 0,41 g etanol/ g xilose porém isto prejudicou o consumo de xilose por ser dependente de NADPH. A fim de recuperar o consumo de xilose, JEPSSON *et al.* (2003) superexpressaram o gene *XYL1* sob controle do promotor glicolítico *PGK1* na linhagem de *S. cerevisiae zwf1Δ* que, além de aumentar o consumo de xilose, diminuiu a produção de xilitol, porém, com maior produção de glicerol, o rendimento diminuiu para 0,34 g etanol/ g xilose. VERHO *et al.* (2003) deletaram o gene *ZWF1*, combinando a superexpressão de *GDP1* (gliceraldeído-3P desidrogenase), que aumenta a regeneração de NADPH. Tais modificações estimularam a fermentação de xilose, diminuindo a formação de xilitol e CO₂, não afetando a produtividade de etanol, porém com um melhor rendimento (0,4 g etanol/g xilose).

Na tentativa de se obter melhores parâmetros fermentativos, novas técnicas estão sendo utilizadas associadas à engenharia metabólica. SONDEREGGER e SAUER (2003) usaram a combinação de três modificações genéticas: superexpressão de XR e XDH heterólogas e de xiluloquinase endógena, além de mutagênese química e evolução dirigida para obter uma linhagem de *S. cerevisiae* capaz de crescer em condições anaeróbicas e metabolizar xilose. Estes autores conseguiram alcançar o rendimento de 0,24 g etanol/ g xilose, porém, ainda houve produção de xilitol como subproduto. WAHLBOM *et al.* (2003a) conciliando engenharia metabólica e mutagênese randômica, a partir de uma linhagem de *S. cerevisiae* expressando *XYL1* e *XYL2* de *P. stipitis* e superexpressando xiluloquinase, gerou mutantes por mutagênese química que foram selecionados quanto à utilização de xilose e taxa de crescimento. O mutante selecionado apresentou taxa de crescimento cinco vezes maior e menor produção de xilitol como subproduto, com rendimento igual a 0,25 g etanol/ g xilose. Experimentos de

microarray para esta linhagem mostraram alta expressão de *HXT5* (transportador de hexose), *XKS1* (xiluloquinase), *SOL3*, *GND1*, *TAL1*, e *TKL1*, enzimas da via pentose fosfato, além dos reguladores de transcrição codificados pelos genes YCR020c, YBR083w e YPR199c que foram diferencialmente expressos (WAHLBOM *et al.*, 2003b).

Para viabilizar a fermentação de xilose por *S. cerevisiae*, já foram realizadas diversas tentativas de expressar a enzima xilose isomerase de bactérias, tais como de *Actinoplanes missouriensis*, *Bacillus subtilis* (AMORE *et al.*, 1989), *Clostridium thermosulfurogenes* (MOES *et al.*, 1996) e *E. coli* (HO *et al.*, 1983 e SARTHY *et al.*, 1987), porém, nestes casos as enzimas se mostraram inativas. Todavia, WALFRIDSSON *et al.* (1996) expressaram o gene da xilose isomerase (*XYLA*) da bactéria termófila *T. thermophilus* e a linhagem foi capaz de produzir etanol a partir de xilose, com rendimento igual a 0,12 g etanol/ g xilose, além de xilitol e ácido acético. A partir desta linhagem, LONN *et al.* (2003) expressaram *XYLA* em múltiplas cópias em plasmídio além de uma cópia extra do gene *XKS1* (xiluloquinase) e também foi deletado o gene *GRE3* (aldose redutase). Com estas modificações alcançou-se o valor de rendimento de 0,43 g etanol/ g xilose e concluiu-se que a deleção de *GRE3* foi crucial, uma vez que a redução de xilitol causa menor inibição da atividade de xilose isomerase. KUYPER *et al.* (2004) demonstraram que *S. cerevisiae* expressando xilose isomerase de *Piromyces* sp. em fermentação anaeróbica, produz etanol a partir de xilose, com produtividade igual a 0,42 g etanol/ g xilose (80% do rendimento máximo teórico), também com produção de xilitol pela xilose redutase da própria levedura. Esta estratégia de expressão de xilose isomerase está protegida pela patente registrada por RAJGARHIA *et al.* (2004).

A enzima XR de *P. stipitis* possui especificidade para NADH e NADPH. O mutante de *S. cerevisiae* expressando esta enzima produz glicerol como subproduto, sendo assim, a enzima glicerol 3-fosfato desidrogenase pode estar competindo pelo cofator não fosforilado. LINDEN *et al.* (1996) expressaram *XYL1* em uma linhagem *gdp1Δ gdp2Δ* e verificaram que o rendimento de etanol foi maior (0,38 g/g.h) em comparação a linhagem expressando *XYL1* e os dois genes (0,12 g/g.h), mas traços de glicerol ainda foram obtidos, talvez produto da própria xilose redutase. *P. stipitis*

possui duas formas de álcool desidrogenase codificadas pelos genes *ADH1* e *ADH2*; CHO e JEFFRIES (1998) demonstraram que o rompimento de *ADH1* resultou em acúmulo de xilitol, porém, o rompimento de *ADH2* não gerou efeitos significativos em células cultivadas em xilose sob condições limitantes de oxigênio. Como a enzima álcool desidrogenase oxida NADH durante a fermentação, o rompimento de *ADH1* causou o aumento da concentração intracelular do cofator reduzido e conseqüente acúmulo de xilitol, tendo em vista que a XR de *P. stipitis* utiliza NADH como cofator. JIN *et al.* (2002) romperam o gene *XYL3*, que codifica para a enzima xiluloquinase em *P. stipitis*, e observaram que isto prejudicou o consumo de xilose, porém não o interrompeu, além de se observar acúmulo de arabitol e xilitol sem a produção de etanol.

Uma vez que a hemicelulose é um dos principais componentes da biomassa vegetal e que a xilana é o polímero predominante nesta fração, KATAHIRA *et al.* (2004) viabilizaram a formação de etanol a partir deste carboidrato. Foi construída uma linhagem de *S. cerevisiae* expressando os genes *xynII* (xilanasase II) de *T. reesei*, *xylA* (β -xylosidase) de *Aspergillus oryzae* na superfície celular, além de *XYL1* e *XYL2* de *P. stipitis*, obtendo após 62 horas o rendimento de 0,11 g/L.h, com produtividade de 0,30 g/g, utilizando xilana como única fonte de carbono.

Visando a produção de xilitol a partir de xilose utilizando *S. cerevisiae* algumas estratégias já foram utilizadas. HALLBORN *et al.* (1991) expressou *XYL1* de *P. stipitis* e obteve 95% de rendimento teórico, porém, não foi considerada a produtividade. KIM *et al.* (1999b) introduziram múltiplas cópias deste gene e a produtividade máxima encontrada foi de 0,18 g/L.h após 72 horas. GOVINDEN *et al.* (2001) expressaram o gene *XYL1* de *P. stipitis* e *C. shehatae* sob o controle dos promotor/terminador *ADH2* e *PGK1*, a maior produtividade alcançada foi de 8,24 g/L.h após 70 horas, com o clone expressando *XYL1* de *C. shehatae* sob o controle dos promotor/terminador *PGK1*. A limitação da superexpressão de *XYL1* é a regeneração do cofator NAD(P)H utilizado pela enzima XR, JANG *et al.* (2003) expressando formato desidrogenase concomitante a XR e otimizando as condições do processo alcançaram 99% de conversão de xilose.

HANDUMRONGKUL *et al.* (1998) clonaram o gene de *XYL1* de *C. guilliermondii* e o expressaram em *P. pastoris*, mas a produtividade, após 72 horas de fermentação, foi de apenas 0,11 g/L.h. LEE *et al.* (2003) expressaram em *C. tropicalis*, XR de *C. parapsilosis*, que apresentou aumento de 5% no rendimento de xilitol (0,92 g xilitol/ g xilose) e de 25% na produtividade (5,09 g/L.h), com diminuição da produção de etanol e glicerol.

Outra estratégia já utilizada para aumentar a produtividade de xilitol foi a de criar mutantes para XDH. KIM *et al.* (2001) cresceram mutantes de *P. stipitis xyl2⁻* em meio contendo ácido glucônico como co-substrato e obtiveram 100% de rendimento na formação de xilitol baseado na quantidade de xilose consumida.

NYSSOLA *et al.* (2005) com a preocupação de produzir xilitol por espécies do gênero *Candida* que são patogênicas, desenvolveu recombinantes de *L. lactis* expressando *XYL1* de *P. stipitis* e um transportador simporte xilose-H⁺ (XylIT) de *L. brevis*. Utilizando o processo descontínuo alimentado com glicose e xilose, não houve diferença de produtividade entre o que expressava ou não o transportador de xilose. A produtividade máxima alcançada foi de 2,72 g/L.h após 20 horas, porém 34% da xilose inicial foi consumida.

Como descrito anteriormente, a engenharia metabólica requer o emprego de abordagens de engenharia genética para gerar linhagens modificadas geneticamente de um dado microrganismo. No caso específico da engenharia metabólica para a produção de xilitol, estas abordagens podem ser voltadas para a hiper-expressão e/ou repressão de certos genes, como os que codificam as enzimas XR (*XYL1*) e XDH (*XYL2*), respectivamente. Em ambos os casos, haverá um acúmulo de xilitol na célula, havendo a possibilidade de combinar os dois efeitos em uma única célula para atingir níveis ainda maiores de produtividade. Diante dos avanços obtidos quanto a engenharia metabólica do metabolismo de xilose, HARKKI *et al.* (2004) registraram uma patente (US6723540) nos EUA para a produção de xilitol por fermentação utilizando microrganismos recombinantes.

Para se realizar qualquer destas modificações metabólicas, algumas ferramentas genéticas devem estar disponíveis como existência de cepas mutantes,

sistema de transformação genético e sistema que possibilite a expressão da mensagem genética exógena.

JUSTIFICATIVA

A levedura *C. guilliermondii* FTI 20037 foi identificada como produtora de xilitol em 1988 por BARBOSA *et al.*, época em que se iniciaram os estudos do melhoramento do processo fermentativo para sua produção. A fim de diminuir os custos de produção, diversos substratos têm sido testados destacando-se o hidrolisado de bagaço de cana de açúcar. Apesar da otimização do processo, ainda não é possível viabilizá-lo uma vez que a concentração final de xilitol é limitante para as etapas *downstream*, ou seja, purificação e cristalização. Diante deste cenário a melhor alternativa é a modificação genética da levedura, que por evidências moleculares mostrou-se ser na verdade uma linhagem de *C. tropicalis*.

Como apresentado anteriormente, a genética molecular de *C. tropicalis* foi pouco desenvolvida, o que representa um entrave para o pleno desenvolvimento da engenharia metabólica neste microrganismo. Contudo, a genética das leveduras comumente chamadas de “não-*Saccharomyces*” ou “não-convencionais”, pode ser desenvolvida aplicando-se as técnicas e princípios estabelecidos em *S. cerevisiae*. O presente estudo representa uma das primeiras iniciativas para se desenvolver um sistema que permita a transformação genética de *C. tropicalis* com a finalidade de aumentar a produção de xilitol através da manipulação dos genes *XYL1* e *XYL2* isolados deste mesmo organismo. Estas manipulações podem ser tanto voltadas para a diminuição da atividade XDH quanto para o aumento da atividade XR. Em qualquer um dos casos, pretende-se que haja um incremento nos níveis internos de xilitol. Dentro das etapas previstas no processo de engenharia metabólica: análise, planejamento e síntese (NIELSEN, 2001), este trabalho parte da análise da fisiologia da levedura desenvolvida na Faculdade de Engenharia Química de Lorena, para propor a primeira iniciativa de modificação genética visando aumentar o rendimento de xilitol durante a fermentação.

ESTRATÉGIA

As etapas iniciais do metabolismo de xilose em leveduras podem ser assim resumidas:



Para que haja um maior acúmulo de xilitol no interior célula, pelo menos duas estratégias podem ser propostas: aumento da atividade XR e redução da atividade XDH. A fim de aumentar a atividade de XR, idealizou-se uma levedura superexpressando *XYL1*. Esta estratégia é baseada em múltiplas integrações utilizando do gene usando seqüências de DNA ribossomal (rDNA) para direcionar os cassetes de expressão para os *clusters* de rDNA que estão arranjados em repetições idênticas *in tandem* no genoma. Inicialmente, o gene *XYL1* pode ser clonado num vetor contendo uma marca de seleção dominante, como a do gene que confere resistência a zeocina. A seguir, uma região do rDNA seria clonada neste mesmo vetor. Para transformar levedura, basta linearizar o vetor resultante, com uma enzima que cliva dentro da seqüência do rDNA, desta forma, todo o vetor se integra por recombinação homóloga nos *loci* de rDNA (Figura 3). O transformante seria selecionado em meio contendo zeocina e para estimar o número de cópias seriam plaqueados em concentrações crescentes deste antibiótico.

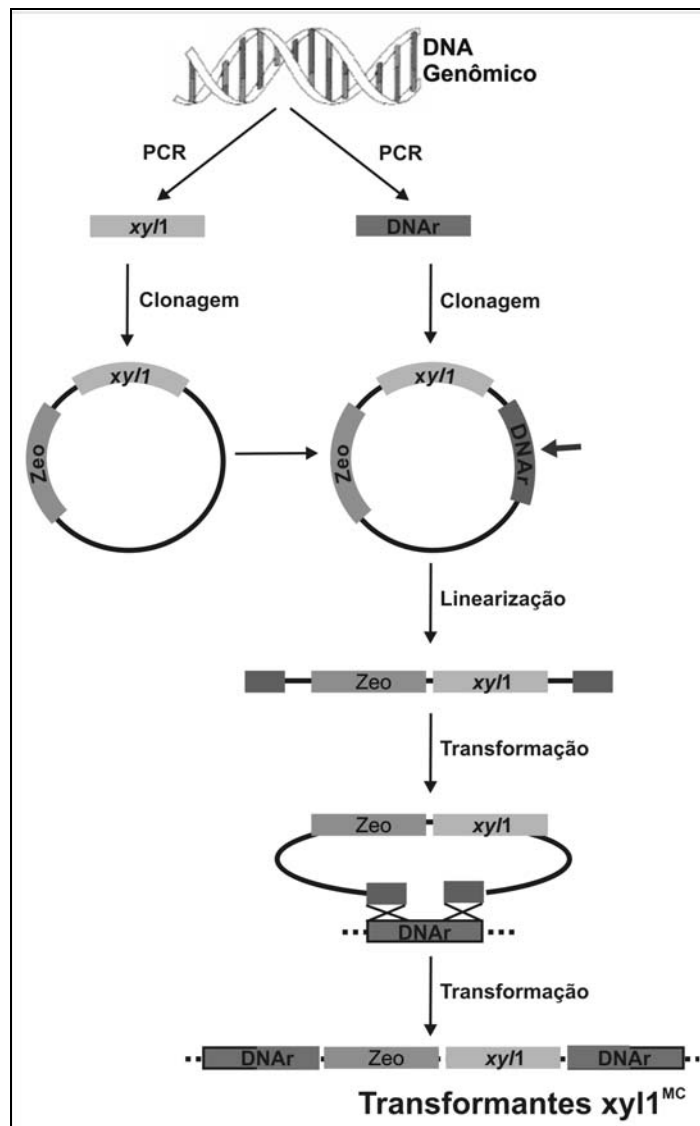


Figura 3. Estratégia para obtenção de transformantes expressando múltiplas cópias de *XYL1*.

Para diminuir a atividade de XDH, pode-se eliminar/reduzir a atividade endógena pela ruptura do gene *XYL2* ou de um de seus alelos. Primeiramente, o gene *XYL2* é clonado em um plasmídeo e linearizado com uma enzima que cliva em regiões internas do gene. Uma marca de seleção é clonada dentro da seqüência do gene interrompendo, dessa forma, a fase de leitura. Utilizando sítios de restrição nas extremidades de *XYL2*, o cassete de ruptura gênica estaria pronto para a transformação da levedura. Por recombinação homóloga o cassete se integraria no *locus XYL2* promovendo a ruptura gênica (Figura 4). Os transformantes seriam

selecionados em meio contendo antibiótico e o rompimento de *XYL2* seria confirmado por *Southern blotting*.

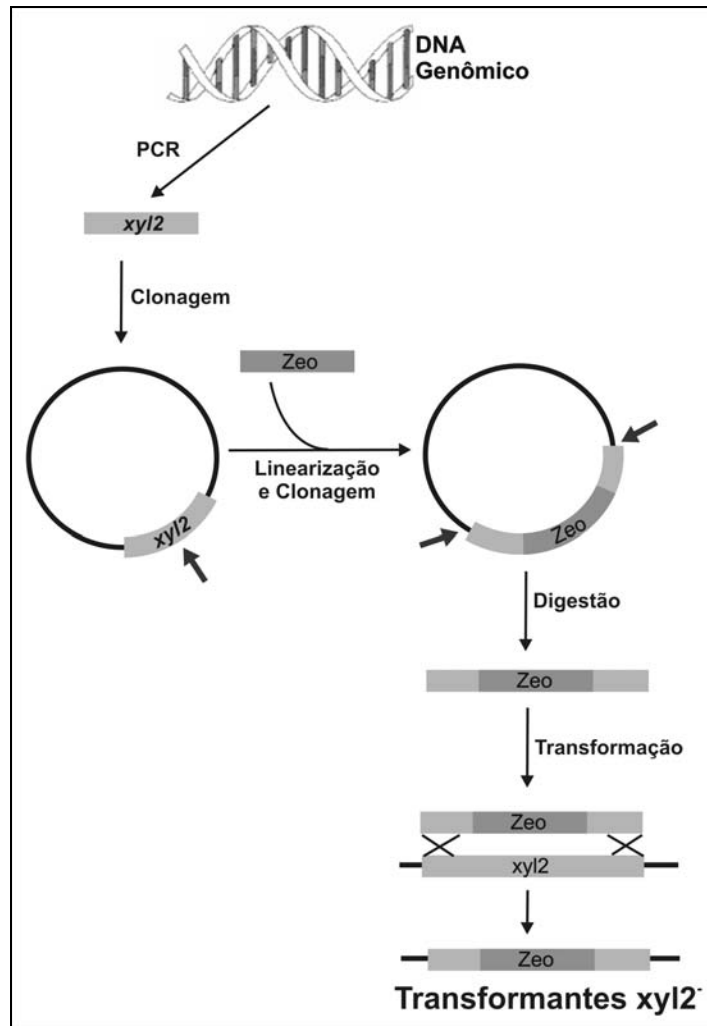


Figura 4. Esquema para obtenção de transformantes com *XYL2* rompido.

OBJETIVOS

Objetivo Geral

Estudar os genes envolvidos no metabolismo de xilose em *C. guilliermondii* FTI 20037 e desenvolver ferramentas genéticas que permitam realizar engenharia metabólica nesta levedura visando o aumento da produtividade e rendimento em xilitol.

Objetivos Específicos

- Clonagem molecular e análise dos genes que codificam xilose redutase (*XYL1*) e xilitol desidrogenase (*XYL2*) de *C. guilliermondii* FTI20037,
- Análise estrutural da proteína Xyl2,
- Expressão heteróloga dos genes *XYL1* e *XYL2* em *S. cerevisiae*,
- Construção de vetores para transformação de leveduras do gênero *Candida*,
- Transformação genética de *C. guilliermondii* FTI 20037,
- Interrupção gênica de *XYL2* e integração em múltiplas cópias de *XYL1*,
- Análise da produção de xilitol nas leveduras transformadas.

MATERIAIS E MÉTODOS

1. Microrganismos

As leveduras utilizadas neste trabalho, listadas na Tabela 4, bem como os transformantes foram estocados a -80°C em glicerol 25% e mantidas em meio YPD (extrato de levedura 1%, peptona de caseína 2%, glicose 2%) imersos em óleo mineral.

Tabela 4. Linhagens de leveduras utilizadas.

Linhagem	Genótipo	Procedência
<i>Candida guilliermondii</i> FTI 20037	Selvagem	Faculdade de Engenharia Química de Lorena
<i>Candida guilliermondii</i>	Selvagem	Universidade Federal do Rio de Janeiro
<i>Candida maltosa</i> ATCC 38042	Selvagem	<i>National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases</i>
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> RE1006	<i>MATa can1-100 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-52</i>	Universidade de Brasília

* Reclassificada por Lima *et al.* (2003).

As linhagens de *E. coli* utilizadas neste trabalho, listadas na Tabela 5 (SAMBROOK *et al.*, 2001), bem como os transformantes, foram cultivados em meio *Luria-Bertani* - LB (extrato de levedura 0,5%, peptona de caseína 1%, cloreto de sódio 1%, pH 7,2) e estocadas a -80°C em glicerol 25%.

Tabela 5. Linhagens de *Escherichia coli* utilizadas.

Linhagem	Genótipo
DH5 α	<i>supE44 ΔlacU169 (ϕ 80lacZΔM15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i>
JM110	<i>dam dcm supE44 hsdR17 thi leu rpsL lacY galK galT ara tonA thr tsxΔ(lac-proAB) F' [traD36 proAB⁺ lac^f lacZ Δm15]</i>

2. Extração de DNA de Leveduras

Para extração do DNA total de leveduras foi utilizado o método descrito por AZEVEDO *et al.* (2003) para fungos filamentosos, que se baseia na quebra mecânica da parede celular por maceração.

3. Purificação de DNA Plasmidial

O protocolo de extração de plasmídios de *E. coli* foi baseado na técnica de lise alcalina descrita por BIRNBOIM e DOLY (1979). As células foram cultivadas durante cerca de 18 horas em 5 mL de meio LB com antibiótico (ampicilina 100 µg/mL) e coletadas por centrifugação (3.000 x *g*/ 2 min), depois o sedimento foi ressuspenso em 200 µL de solução I (Tris-HCl 25 mM, pH 8,0; EDTA 10 mM, pH 8,0; glicose 50 mM), a seguir foi adicionado 360 µL de solução II (hidróxido de sódio 0,2 M; SDS 1% p/v). Depois de inverter o tubo delicadamente algumas vezes, o sistema foi incubado durante 5 min. Posteriormente, 300 µL de solução III (acetato de potássio 3M, pH 5,0) foram adicionados e o tubo foi invertido gentilmente ficando 5 min incubados no gelo. Depois de centrifugado (10.000 x *g*/ 5 min), o sobrenadante foi transferido para um novo tubo, no qual foram adicionados 750 µL de isopropanol, procedendo mais uma centrifugação nas condições anteriores. O sedimento foi ressuspenso em 200 µL de TE (Tris-HCl 25 mM, pH 8,0; EDTA 10 mM, pH 8,0), foi adicionado 110 µL de acetato de amônio 7,5 M e misturado no *vortex*, a seguir foi centrifugado (10.000 x *g*/ 10 min). O sobrenadante foi transferido para um novo tubo onde se adicionou 750 µL de etanol e novamente submetido à centrifugação (10.000 x *g*/ 5 min). O precipitado foi lavado com etanol 70% v/v e centrifugado mais uma vez. Descartou-se o sobrenadante e após a secagem, o precipitado foi ressuspenso em 50 µL de TE e adicionado 0,5 µL de RNase A (4 µg/mL).

Em alguns casos, o protocolo descrito por STEMMER (1991), utilizando brometo de etídio e acetato de amônio, também fora utilizado como mais uma etapa de purificação a fim de melhorar a digestão com enzimas de restrição.

Para o seqüenciamento, a purificação de plasmídios foi realizada utilizando o *kit Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System* (Promega) seguindo as recomendações do fabricante.

4. Transformação Genética

4.1. Bactéria

Para transformação de *E. coli* por choque térmico foi adaptado o método de indução do estado de competência por tratamento com RbCl descrito por HANAHAN (1983). Primeiramente, foi preparado um pré-inóculo a partir de uma colônia, inoculada em 30 mL de meio SOB (triptona 20 g/L, extrato de levedura 5 g/L, NaCl 0,6 g/L, KCl 0,5 g/L MgCl₂ 10 mM, MgSO₄ 10 mM) durante a noite a 37°C em incubadora tipo *shaker* a 250 rpm. Foram adicionados 2 mL do pré-inóculo em 50 mL de meio SOB e depois incubados a 37°C, sob agitação 250 rpm até densidade óptica, a 600 nm, igual a 0,3. A cultura foi transferida para um tubo de centrifuga e mantida em gelo por 15 min. Depois da centrifugação a 3000 xg por 5 min a 4°C, o sobrenadante foi descartado e as células ressuspendidas em 16 mL de tampão de transformação I (RbCl 12 g/L, MnCl₂·4H₂O 9,9 g/L, CaCl₂·2H₂O 1,5 g/L, glicerol 150 mL, acetato de potássio 30 mL de solução 1 M, pH 7,5) pH 5,8 ajustado com ácido acético 0,2 M e esterilizado por filtração (membrana 0,22 µm). Depois de 15 min no gelo, as células foram coletadas por centrifugação, nas condições acima. Foram utilizados 4 mL de tampão de transformação II (RbCl 1,2 g/L, CaCl₂·2H₂O 11 g/L, glicerol 150 mL, MOPS 20 mL de solução 1 M, pH 6,8) esterilizado por filtração (membrana 0,22 µm) para ressuspender as células. Alíquotas de 100 µL foram estocadas a -80°C. Para cada alíquota de células competentes foram adicionados até 10 µL de DNA, mantidos no gelo por 30 minutos. Após este período, as células foram submetidas a um choque térmico de 37°C por 5 min ou 42°C por 90s, depois foram adicionados 500 µL de meio LB ou SOB e incubadas a 37°C por 1 h. Foram plaqueados 100 µL em placas de petri com meio LB-ágar contendo antibiótico (ampicilina 100 µg/mL) e X-Gal (30 µg/mL) quando necessário.

4.2. Leveduras

A transformação de *S. cerevisiae* foi baseada em um protocolo rápido utilizando acetato de lítio e polietilenoglicol - PEG descrito por ELBLE (1992), Já *C. tropicalis* e *C. guilliermondii* foram transformadas por eletroporação e por formação de esferoplastos. Para a eletroporação foi utilizada a metodologia descrita por TANG *et al.* (2003) para *C. rugosa* e para formação de esferoplastos a descrita por HAAS *et al.* (1990).

5. PCR

Os *primers* utilizados, apresentados na Tabela 6, foram ressuspensos em água MilliQ ou tampão Tris-HCl pH 8,0, 4 mM. As reações de PCR contendo DNA template 10 a 100 ng, dNTPs 0,2 mM, tampão da *Taq* DNA polimerase, cloreto de magnésio 2 a 3 mM, *Taq* DNA polimerase 1U, *primers* 5' e 3' 10 a 30 pmol, foram realizadas nas seguintes condições: desnaturação inicial (94°C – 1min), desnaturação (94°C – 30s a 1 min), anelamento (50 a 60°C – 30s a 1 min), extensão (72°C – 30s a 2min), extensão final (72°C – 5min), sendo que o número de ciclos de desnaturação/anelamento/extensão variou de 30 a 45 ciclos. As reações de PCR com *Platinum*[®] *Taq* DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen), *Elongase*[®] *Amplification System* (Invitrogen) e *Vent*_R[®] DNA Polimerase (New England Biolabs) foram realizadas de acordo com as recomendações do fabricante. Para o PCR de colônia, substituindo o DNA template, foi utilizando sobrenadante de uma colônia fervida em água por 5 min.

Tabela 6. Seqüência dos *primers* utilizados em reações de PCR, com suas respectivas seqüências, temperaturas de anelamento e sítios de restrição (sublinhados).

<i>Primer</i>	Seqüência (5' → 3')	T _m	sítio
5XR	TCGTSGGTTTCGGCTGTTGG	64°C	-
3XR	AATSTTGTCCCAGTCCCAWGG	64°C	-
5XRORF	<u>CAGATCT</u> GCTATGTCTATCAAGTTAAACTCTG	68°C	<i>Bgl</i> II
3XRORF	<u>CAGATCT</u> TAGATGAAAGTTGGAATCTTGTC	56°C	<i>Bgl</i> II
5xyl1A	<u>CAGATCT</u> ACCATGTCTACTACTCCTACT	60°C	<i>Bgl</i> II
3xyl1	<u>CAGATCT</u> TTAAACAAAGATTGGAATGTTG	56°C	<i>Bgl</i> II
5xyl1int	TACAGATTATTTGATGGTGCTG	60°C	-
3xyl1int	GGTTGTTGCAAGTATGGGTG	56°C	-
ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	58°C	-
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	58°C	-
ITS1Bam	<u>GGATCC</u> GTAGGTGAACCTGCGG	58°C	<i>Bam</i> H I
ITS4Bam	<u>GGATCC</u> TCCGCTTATTGATATGC	58°C	<i>Bam</i> H I
UNIF (CTB6)	GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG	68°C	-
UNIR (TW13)	GGTCCGTGTTTCAAGACG	56°C	-
5XDH1	CAACTTGTGTCCTCACATGGC	64°C	-
3XDH1	TTACTCAGGGCCGTYAATGA	58°C	-
5XDH2	CAATGGTCYTKGGTCACGAATC	64°C	-
3XDH2	CSWTACCRACCTGAACG(W)AA	58°C	-
5XDH3	GTCAAGAARACYGGTATCTGTGGT	68°C	-
3XDH3	GWAWCRTATCTGAAAGAWCC	58°C	-
5XDH4	CCWGAAGACTTCTKKGTCAAGTT	70°C	-
3XDH4	TTACTCAGGGCCGTYAATGAKRCACTTGA	82°C	-
5xyl2	<u>CGGATCC</u> GTCATGACTGCAAACCCATC	60°C	<i>Bam</i> H I
3xyl2	<u>CGGATCC</u> CTATTCTGGACCATCAATTAAC	62°C	<i>Bam</i> H I
PPGK	<u>GGATCC</u> GTTACATACGACATTTG	50°C	<i>Bam</i> H I
TPGK	<u>GGATCC</u> AAATACCAAGAATTGACGGCTG	62°C	<i>Bam</i> H I
P2PGK	<u>AGATCT</u> TGGATAATGACATTCTAGTTAAGGCAATTG	56°C	<i>Bgl</i> II
T2PGK	<u>AGATCT</u> CTAACAAGCCTAAAATTGATTTTTTATGA	52°C	<i>Bgl</i> II
Universal Forward	GTTTTCCCAGTCACGAC	52°C	-
Universal Reverse	CAGGAAACAGCTATGACC	54°C	-
5PROACT	<u>GGATCCA</u> AGCTTCTATTAAGATCACCAGCCTC	58°C	<i>Bam</i> H I <i>Hind</i> III
3PROACT	<u>GGATCCA</u> AGCTTAATTTGAAATATAAATAACGTTCTTAATACTAAC ATAACTATAAAAAATAAATAGGGACTGATCATTGAATGATTATAT TTTTTAATATTAATATCGA	76°C	<i>Bam</i> HI <i>Hind</i> III <i>Bcl</i> I
3CYCTT	<u>CGGATCC</u> AAGCTTAATTTGAAATATAAATAACGTTCT	96°C	<i>Bam</i> H I
5Zeo	CCAAGCTTATAATGGCTAAGTTGACCTCC	60°C	<i>Hind</i> III
3Zeo	<u>CGTCG</u> ACTCAGTCTTGTTCTTCAGCAACG	62°C	<i>Sal</i> I
221	AATCGGGCTG	32°C	-

5.1. Purificação

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

6. Análise de Ácidos Nucléicos em Gel de Agarose

A eletroforese em gel de agarose foi utilizada para análise e avaliação do tamanho de DNA ou fragmentos de DNA, conforme descrito em AZEVEDO *et al.* (2003). A agarose foi preparada em solução tampão TEB (Tris-Borato 45 mM, EDTA 1 mM pH 8,2) ou TAE (Tris-Acetato 40 mM, EDTA 1mM pH 8,5) em concentração de 0,8 ou 1,0% p/v. Como marcadores moleculares para DNA foram utilizados *1 kb ladder* (Invitrogen, New England Biolabs ou Promega), *100 bp DNA ladder* (Promega) ou DNA de fago λ digerido com *EcoR I* e *Hind III*.

6.1. Purificação de Fragmentos de DNA

A região do gel que continha o fragmento de interesse foi excisada e submetida à purificação utilizando os *kits QIAEX II* (Qiagen), *Concert[™] Rapid Gel Extraction System* (Gibco) ou *Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega) ou ainda pelo protocolo *GeneClean* modificado: a porção retirada do gel foi pesada, posteriormente foi adicionado solução de iodeto de sódio 6M, na proporção de 300 μ L por 100 mg de gel, e incubou-se a 55°C agitando-se freqüentemente até a completa dissolução da agarose. Adicionou-se posteriormente 5 μ L de solução *glassmilk* (sílica em água na proporção 1:1 v/v), agitado no *vortex*, incubado no gelo 5 min e centrifugado a 10.000 x *g* por 30 s. O precipitado foi ressuspendido em 500 μ L de solução de iodeto de sódio e novamente centrifugado (30 s/10.000 x *g*), a seguir o precipitado foi outra vez ressuspendido em 250 μ L de solução de iodeto de sódio e centrifugado (30 s/10.000 x *g*). Em seguida o precipitado foi lavado três vezes, em cada vez o *pellet* foi ressuspendido com 300 μ L de solução *New Wash* (Etanol 50%; NaCl 0,1M; Tris 10 mM, pH 7,5; EDTA 1 mM),

agitado no *vortex* e centrifugado (30 s/10.000 xg). Após a última lavagem, o precipitado foi ressuspenso em 10 µL de TE (Tris-HCl 25 mM, pH 8,0; EDTA 10 mM, pH 8,0) e incubado a 55 °C por 3 min, após foi submetido à centrifugação (30 s/10.000 xg), o sobrenadante foi reservado e o precipitado foi novamente ressuspenso em 10 µL de TE, incubado a 55 °C por 3 min e depois centrifugado. O sobrenadante foi adicionado ao anterior e outra vez centrifugado para assegurar a inexistência sílica e estocado a -20°C.

7. Seqüenciamento e Análise de DNA

As reações de seqüenciamento foram realizadas com 80 a 100 ng de plasmídios, quantificados por espectrofotometria utilizando o GeneQuant RNA/DNA Calculator *pro* (Biochrom, UK) e analisados no seqüenciador automático MegaBACE 1000 (Amersham Biosciences®). A qualidade do seqüenciamento foi analisada pelo programa PHRED (EWING *et al.*, 1998) e a análise das seqüências foi realizada pela comparação com as de bancos de dados pelo BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) (ALTSCHUL *et al.*, 1990).

Para análise da seqüência do gene *XYL2*, foram preditos os putativos elementos TATA utilizando o programa HCtata - Hamming-Clustering Method for TATA Signal Prediction in Eukaryotic Genes (http://l25.itba.mi.cnr.it/~webgene/wwwHC_tata.html); os sinais de poliadenilação pelo programa HCpolya - Hamming Clustering poly-A prediction in Eukaryotic Genes - (http://l25.itba.mi.cnr.it/~webgene/wwwHC_polya.html) e os possíveis fatores de transcrição foram identificados pelo TFSEARCH (<http://www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html>) ou pelo MatInspector (<http://www.genomatix.de/shop/index.html>).

8. Digestão de DNA com Enzimas de Restrição

As digestões de moléculas de DNA com enzimas de restrição foram realizadas em sistemas de 10 a 100 μL , durante 1 a 16h, de acordo com as condições indicadas pelos fabricantes (tampão, BSA e temperatura) utilizando-se 10 a 20 U de enzima para cada 1 μg de DNA.

8.1. Purificação do Sistema de Digestão

O volume do sistema de digestão foi ajustado para 100 μL , adicionado um volume de clorofane (fenol:clorofórmio, 1:1, pH 6,0), agitado vigorosamente no *vortex* durante 3 min e centrifugado (30 s/10.000 xg). A fase aquosa foi coletada em um novo tubo e o procedimento foi repetido. Novamente, a fase aquosa foi coletada e adicionou-se um volume de clorofil (clorofórmio:isoamil álcool, 24:1, pH 6,0) agitado vigorosamente no *vortex* durante 3 min e centrifugado (30 s/10.000 xg). Depois de coletar a fase aquosa adicionamos-se 5 μL de glicogênio 20 mg/mL, 0,1 volume de NaCl 3M e 2,5 volumes de etanol 100%, agitado no *vortex* e mantido a -20°C por pelo menos 30 min. O sistema foi centrifugado (15 min/10.000 $xg/ 4^{\circ}\text{C}$), descartado o sobrenadante e ao precipitado foi adicionado 500 μL de etanol 70% v/v e outra vez centrifugado (15 min/10.000 $xg/ 4^{\circ}\text{C}$). Este precipitado depois de seco foi ressuscitado em 10 μL de água MilliQ.

9. Conversão de Extremidades Protuberantes em Abruptas

Quando foram utilizadas enzimas que deixam extremidades coesivas 3' ou 5' protuberantes incompatíveis, utilizou-se tratamento com T4 DNA Polimerase (New England Biolabs) para gerar extremidades abruptas de acordo com as recomendações do fabricante.

10. Defosforilação de Vetor Linearizado

Os vetores linearizados utilizando-se apenas uma enzima foram defosforilados com a enzima fosfatase alcalina de camarão (SAP) da *Boehringer Mannheim*. O sistema de defosforilação contendo vetor 50 ng, enzima 1U e tampão, foi incubado a 37°C por 10 min e a seguir, para inativação da enzima, a 65°C por 15 min.

11. Ligação

Nos sistemas de ligação, as concentrações de DNA (razão molar vetor:inserto) variaram entre 1:3, no caso de ligações de extremidades coesivas, e 1:5 em ligações com extremidades abruptas, contendo também tampão e T4 DNA ligase 1U (Promega). O sistema foi incubado a 16°C por pelo menos 14 h ou no caso de sistemas comerciais, de acordo com as recomendações do fabricante.

12. Extração de RNA

Uma colônia de *C. guilliermondii* FTI 20037 foi inoculada em meio YPD e cultivada em incubadora tipo *shaker* durante a noite (30°C/200 rpm). A cultura foi transferida para meio YP (extrato de levedura 1%, peptona de caseína 2%), suplementado com glicerol, glicose ou xilose (2%) até a fase exponencial (OD₆₀₀ ~0,9). As células foram recolhidas por centrifugação, lavadas com água estéril (4°C) e congeladas em nitrogênio líquido. O RNA total foi extraído usando *RNeasy mini kit* (Qiagen) e ~10 µg foi analisado em gel de agarose-formaldeído (1% p/v).

13. Southern e Northern Blotting

13.1. Sistema de Transferência para Membrana

A transferência das amostras de DNA digerido para o *Southern Blot* ou do RNA total para o *Northern Blot*, do gel de agarose para membrana de nitrocelulose (*Hybond-N*) foi utilizado o sistema de transferência por capilaridade descrito em AZEVEDO *et al.* (2003). Os ácidos nucleicos foram fixados à membrana por meio de exposição à luz ultravioleta utilizando a condição de ajuste ótimo para fixação no *UV Crosslinker* (Fisher Biotech).

13.2. Marcação da Sonda, Pré-Hibridização e Hibridização

A marcação da sonda e as fases da pré-hibridização, a hibridização, a lavagem e a detecção foram realizadas segundo o protocolo do *kit AlkPhos Direct* (Amersham Biosciences[®]) baseado na marcação com fosfatase alcalina, conforme recomendações do fabricante.

13.3. Geração e Detecção do Sinal

Para a geração do sinal quimioluminescente, foi utilizado o reagente *CDP-Star* (Amersham Biosciences[®]), colocado sobre a membrana por aproximadamente 5 minutos. Após a reação, a membrana foi envolta em plástico (*Saran Wrap*) e exposta a filme auto-radiográfico (*Hyperfilm ECL* – Amersham Biosciences[®]). O filme foi revelado em câmara escura com solução reveladora *Dektol-76* (Kodak), interrupção em água destilada, fixação em solução fixadora (Kodak) por 5 min e lavagem exaustiva em água corrente.

14. Seleção e Análise dos Transformantes

Os clones transformantes foram selecionados em meio contendo o antibiótico apropriado em concentração letal, testada previamente com a linhagem selvagem. Os transformantes foram analisados por PCR utilizando-se os *primers* 5Zeo e 3Zeo e para os clones *xyl2⁻* os *primers* 5*xyl2* e 3*xyl2*.

15. Medida de Atividades Enzimáticas

15.1 Rompimento Celular

A fim de obter as enzimas intracelulares xilose redutase e xilitol desidrogenase, foi realizado o rompimento celular utilizando pérolas de vidro conforme ELIASSON *et al.* (2000).

Uma colônia foi inoculada em 5 mL de meio e cultivada em incubadora tipo *shaker* durante a noite (30°C/200 rpm). A cultura foi transferida para 500 mL de meio até a fase exponencial ($OD_{600} \sim 0,9$). Para os clones de *S. cerevisiae* foi utilizado meio mínimo (glicose 2%, Yeast Nitrogen Base-YNB e aminoácidos) e para *C. tropicalis* meio YP suplementado com xilose 2%. As células foram recolhidas por centrifugação, lavadas com tampão fosfato de potássio 0,1 M pH 7,2 (4°C) e ressuspendidas no mesmo tampão para submeter ao rompimento celular. Os restos celulares foram separados por centrifugação (12.000 *xg* por 20 min a 4°C) recolhendo-se o sobrenadante para determinação de atividade de xilose redutase e xilitol desidrogenase e proteína solúvel.

15.2 Determinação de Proteína Solúvel e Atividade Enzimática

A determinação de concentração de proteína no extrato livre de células foi feita conforme método BRADFORD (1976), empregando-se albumina sérica bovina (BSA) como padrão e reagente de Bradford (Azul-Brilhante de Coomassie G-250) como cromóforo.

As atividades enzimáticas foram determinadas em extratos celulares preparados a partir de suspensão de células, realizadas segundo método utilizado por LIMA *et al.* (2004), com modificações. O meio padrão para reação para xilose redutase foi composto por β -mercaptoetanol 10 mM, tampão fosfato de potássio 8 mM pH 7,2, NADPH 100 μ M, e xilose 100 mM, no volume total de 1,0 mL. Para xilitol desidrogenase, o meio padrão para reação foi constituído de β -mercaptoetanol 10 mM, tampão TRIS 100 mM pH 8,6, NAD^+ 150 μ M e xilitol 75 mM em 1,0 mL.

As reações foram iniciadas com a adição de xilose ou xilitol e a variação da absorbância a 340 nm, decorrente da oxidação do NADPH ou da redução do NAD^+ , foi acompanhada por espectrofotômetro durante 2 minutos. Uma unidade internacional de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima que catalisa a formação de um micromol por minuto de NADP^+ no caso de xilose redutase ou NADH para xilitol desidrogenase, à temperatura ambiente, utilizando-se o coeficiente de extinção para os cofatores a 340 nm de $6220 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Os ensaios foram realizados em triplicata com coeficiente de variação menor que 5%.

16. Análise de Domínios, Alinhamento de Seqüências e Análise e Comparação Estrutural

A organização dos domínios estruturais de Xyl2 foi determinada pela utilização dos sites PFAM (<http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam>), CATH (<http://cathwww.biochem.ucl.ac.uk/latest>) e INTERPRO (<http://www.ebi.ac.uk/interpro>). A classificação da família foi confirmada utilizando-se o servidor PROSITE (<http://www.expasy.ch>). A estrutura secundária foi predita pelo algoritmo do programa NPS@ (<http://pbil.ibcp.fr>). Alinhamentos de seqüências foram realizados utilizando-se a ferramenta Blastp (<http://www.expasy.org/tools/blast/>), considerando-se proteínas com estruturas depositadas no PDB – Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org/pdb>). Para se obter o modelo estrutural, alinhamentos múltiplos

de seqüência foram gerados pelo ClustalW (EMBL-EBI, <http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>). Os modelos estruturais foram obtidos a partir de modelagem molecular por homologia, realizada pelo servidor EsyPred-3D (<http://www.fundp.ac.be/urbm/bioinfo/esypred/>) (LAMBERT *et al.*, 2002). As características estruturais desses modelos foram analisadas pelos visualizadores moleculares Pymol (<http://pymol.sourceforge.net>) e VMD (<http://www.ks.uiuc.edu/Research/vmd/>).

O complexo Xyl2/NAD⁺/zinco foi modelado pela sobreposição da estrutura tridimensional de hSDH complexado com NAD⁺ e íon de zinco. O refinamento energético do modelo foi realizado utilizando ferramentas de mecânica molecular disponíveis no SPDBV, que utiliza o pacote de minimização de energia do Gromos96 (GUEx e PEITSCH, 1997). Este procedimento é necessário para minimizar os efeitos de choques esteroquímicos e para acomodação energética das cadeias laterais, principalmente daqueles aminoácidos na interface do complexo com o NAD⁺ e com o zinco.

Estruturas tridimensionais conservadas e semelhantes à estrutura da Xyl2 foram selecionadas por meio do programa VAST - Vector Alignment Search Tool - (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/VAST/vast.shtml>) (GIBRAT *et al.*, 1996). As estruturas tridimensionais selecionadas do PDB (1PL8, 1PL6, 1E3J, 1RJW, e 1LLU) foram utilizadas para a sobreposição das cadeias principais e dos domínios de ligação ao NAD⁺ e de ligação ao zinco. Esta etapa foi realizada utilizando-se o servidor MultiProt (<http://bioinfo3d.cs.tau.ac.il/MultiProt>). As saídas dos programas de alinhamento estrutural mostram as estruturas sobrepostas e calcula os valores dos deslocamentos estruturais na cadeia principal, conhecidos como r.m.s.d. (root mean square deviation). Adicionalmente, para analisar as mudanças estruturais dos domínios envolvidos no complexo com NAD⁺ e zinco, tais domínios foram sobrepostos considerando os resíduos de Xyl2 com 5 Å de distância da coenzima e do íon. Para este fim foi utilizado o pacote de programas CCP4 (<http://www.ccp4.ac.uk/main.html>) (Collaborative computational project, 1994).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. Reclassificação da levedura *C. guilliermondii* FTI 20037

No início deste trabalho, foram realizadas várias tentativas, sem sucesso, para se amplificar toda a região codante do gene *XYL1* de *C. guilliermondii*, apesar dos *primers* 5XRORF e 3XRORF terem sido desenhados baseados na seqüência deste gene publicada por HANDUMRONGKUL *et al.* (1998). Utilizando-se outros pares de *primers* degenerados 5XR e 3XR, desenhados a partir das seqüências de xilose redutase dos organismos *P. stipitis*, *C. tropicalis*, *C. guilliermondii*, *P. tannophilus* e *K. lactis*, foi possível clonar uma parte do gene. A análise pelo BLASTx (seqüência traduzida versus banco de dados de seqüência de proteínas) revelou que a seqüência guardava mais identidade com o homólogo de *C. tropicalis* do que com o de *C. guilliermondii*, indicando que a linhagem de *C. guilliermondii* originada da FAENQUIL poderia ter sido erroneamente classificada.

Para confirmar esta suspeita, decidiu-se investigar as seqüências intergênicas do DNA ribossomal (rDNA), que são regiões transcritas porém perdidas durante o processamento do RNA. Por serem regiões conservadas durante a evolução entre os organismos, estas são comumente utilizadas para identificação de microrganismos em nível de gênero, espécie ou variedade (GUARRO *et al.*, 1999; FUNGARO, 2000).

Para atingir esse fim, foram utilizados dois pares de *primers*, que amplificam duas regiões do rDNA. A primeira região é chamada ITS (*Internal Transcribed Spacers*), amplificada com os *primers* ITS1 e ITS4 que compreende uma região do 18S, os espaçadores internos ITS1 e ITS2, o gene da subunidade 5.8S e uma região da 28S, como ilustrado na Figura 5. A segunda região - 5' LSU (*Large Subunit*) – é amplificada com os *primers* UNIF e UNIR, e compreende uma porção do gene da subunidade rDNA 28S (Figura 5).

Os amplicons, com tamanho de ~540 pb para região ITS e ~650 pb para região 5' LSU (Figura 6), foram clonados no vetor pCR[®] 2.1 TOPO[®] (Invitrogen). Após a transformação de *E. coli* DH5 α , transformantes foram selecionados para extração de plasmídios. Posteriormente, procedeu-se a análise da presença de

inserto a partir da digestão com *EcoR* I. Um clone positivo foi escolhido para ser submetido a minipreparação com *kit* e posterior sequenciamento do plasmídeo.

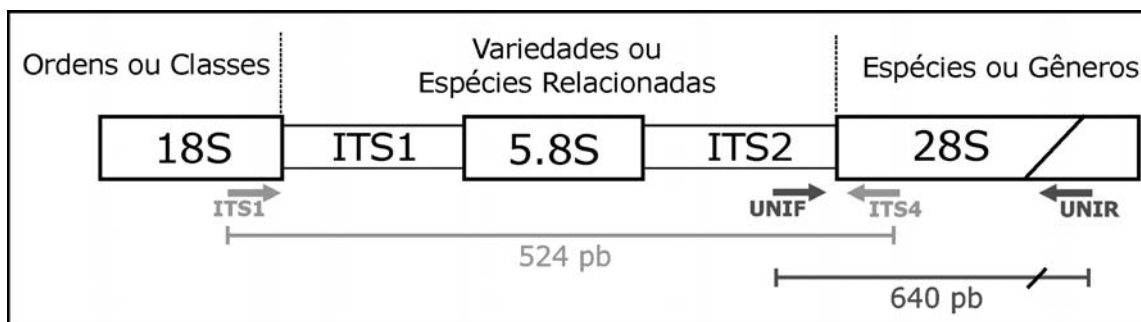


Figura 5. Estrutura do cluster gênico que codifica o RNA ribossomal, evidenciando os genes correspondentes as subunidades 18S, 5,8S e 28S, além das regiões internas ITS1 e ITS2. Acima estão os níveis taxonômicos que cada região define, abaixo localização da região do rDNA amplificada com os *primers* ITS1 e ITS4 (ITS) e da região da subunidade maior (5' LSU) amplificada com os *primers* UNIF e UNIR.

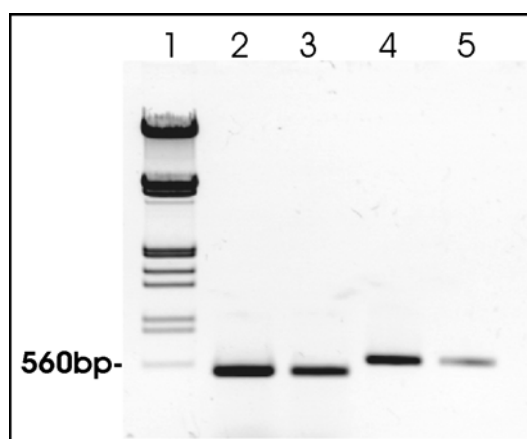


Figura 6. Reações de amplificação de regiões do rDNA analisadas em gel de agarose 1%. 1: marcador λ *EcoR* I/*Hind* III, 2 e 3: região ITS, 4 e 5: região 5'LSU.

Os resultados da análise das seqüências obtidas usando o BLASTn estão apresentados na Tabela 7. O valor de “E” foi igual a zero para as duas regiões estudadas quando comparadas com a região homóloga em *C. tropicalis*, enquanto o valor foi maior que zero para *C. guilliermondii*, demonstrando assim que estas seqüências teriam maior identidade com a de *C. tropicalis* e que a levedura utilizada havia sido classificada erroneamente. Baseados nestes resultados e nos dados da

clonagem de *XYL1*, foi publicado o artigo intitulado “*Reclassification of Candida guilliermondii FTI 20037 as Candida tropicalis based on molecular phylogenetic analysis*”, na revista *Brazilian Journal of Microbiology*, em novembro de 2003 (Anexo 1). Estes resultados também foram divulgados em apresentação oral no XXII Congresso Brasileiro de Microbiologia, Florianópolis - SC em novembro de 2003.

Tabela 7. Resultados de homologia para as seqüências ITS e 5'LSU do DNA ribossomal, utilizadas na identificação de espécies.

Seqüência	BLAST	Identidade	E-value
ITS	<i>C. tropicalis</i> (acession # 12698685)	99%	0.0
	<i>C. guilliermondii</i> (acession # 21666929)	96%	1e-89
5' LSU	<i>C. tropicalis</i> (acession # 2062274)	100%	0.0
	<i>C. guilliermondii</i> (acession # 14150789)	94%	e-166

2. Clonagem e análise do gene *XYL1*

Como a levedura foi inicialmente identificada como *C. guilliermondii*, foram desenhados os *primers* 5XRORF e 3XRORF baseados na seqüência do gene *XYL1* desta levedura publicada por HANDUMRONGKUL *et al.* (1998). Porém, não foram obtidas ampliações nas reações de PCR com DNA de *C. guilliermondii* FTI 20037, apenas com o controle positivo, uma linhagem de *C. guilliermondii* cedida pela UFRJ (Figura 7). O fato de o PCR ter funcionado somente com a linhagem da UFRJ classificada como *C. guilliermondii*, fortalece as evidências de que a linhagem da FAENQUIL fora erroneamente classificada.

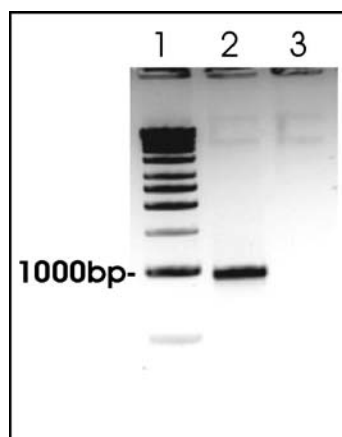


Figura 7. Reações de amplificação de *XYL1* analisadas em gel de agarose 1%. 1: marcador *1 kb DNA ladder* (New England Biolabs), 2 e 3: amplificação com 5XRORF/3XRORF, DNA molde de *C. guilliermondii* (UFRJ) e *C. guilliermondii* FTI 20037, respectivamente.

Com a reclassificação da levedura, foram desenhados *primers* baseados na seqüência do gene que codifica a enzima xilose redutase I,II de *C. tropicalis* disponível no GenBank (banco de dados do NCBI - *National Center for Biotechnology Information*), descrita por YOKOYAMA *et al.* (1995b), onde 5xyl1A e 3xyl1 se localizam nas extremidades amplificando todo o gene e dois outros 5xyl1int e 3xyl1int que amplificam uma região interna para confirmação. A posição dos *primers* na seqüência está representado na Figura 8. O resultado da reação de PCR com a combinação destes *primers* está apresentado na Figura 9, e os produtos obtidos apresentaram exatamente os tamanhos esperados, a saber: 5xyl1a/3xyl1: 978 pb, 5xyl1a/3xyl1int: 611 pb, 5xyl1int/3xyl1: 843 pb e 5xylint/3xyl1int: 476 pb.

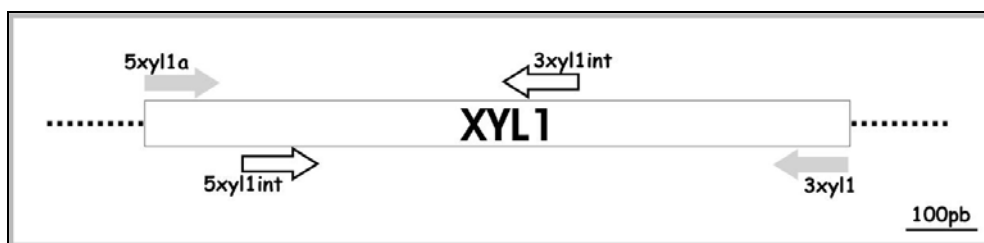


Figura 8. Esquema mostrando as posições relativas de anelamento dos *primers* utilizados para amplificação e confirmação de *XYL1*.

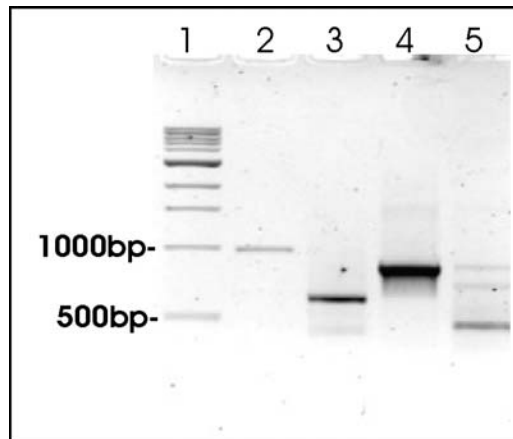


Figura 9. Reações de amplificação de *XYL1* e regiões internas do gene, analisadas em gel de agarose 1%. 1: marcador 1 kb DNA ladder (New England Biolabs), 2: amplificação com 5xyl1a/3xyl1, 3: 5xyl1a/3xyl1int, 4: 5xyl1int/3xyl1, 5: 5xylint/3xyl1int.

O produto obtido da reação de PCR com *Platinum® Taq DNA Polymerase High Fidelity*, usando os *primers* 5xyl1a/3xyl1 foi ligado ao vetor pCR® 2.1 TOPO® (INVITROGEN). Após a transformação de *E. coli* DH5 α com o sistema de ligação, analisou-se a presença de inserto a partir da digestão com *EcoR* I. O clone escolhido (Topoxyl1) foi amplificado e o inserto seqüenciado. A seqüência de cerca de ~950 pb obtida foi analisada pelo BLASTx e apresentou 98% de identidade com a seqüência de xilose redutase I,II de *C. tropicalis* com $E = e^{-180}$ e 77% com a de *C. guilliermondii*, com $E = 3e^{-11}$. No alinhamento da seqüência de *XYL1* de *C. tropicalis* e de *C. guilliermondii* FTI 20037, apresentado na Figura 10, foram encontradas 11 divergências entre as seqüências, porém a maioria delas no terceiro nucleotídeo do códon. Dos nove códons divergentes, apenas dois ocasionaram mudança no aminoácido correspondente, a saber: na posição 76 (AAT \rightarrow ACC) Asn para Thr, porém ambos são aminoácidos polares neutros e na posição 82 (GAA \rightarrow GCC) Glu para Ala, essa é uma modificação importante porque envolve a substituição de um aminoácido carregado negativamente por um apolar. Diante destas modificações pode-se interpretar que estas variações se tratam de polimorfismo entre as linhagens de *C. tropicalis* ou ainda algum erro induzido pela reação de PCR.

A partir da ferramenta BLAST disponível no site do projeto genoma de *C. tropicalis* - Broad Institute of Harvard and MIT

(http://www.broad.mit.edu/annotation/fungi/candida_tropicalis/) foi encontrada uma sequência (supercont3.11 of *C. tropicalis* T1) com 98% de identidade (Figura 11).

<i>C. tropicalis</i>	ATG TCT ACT ACT CCT ACT ATT AAA TTA AAC TCT GGT TAT GAA ATG CCA TTA GTT GGT TTC	60
FTI20037	ATG TCT ACT ACT CCT ACT ATT AAA TTA AAC TCC GGT TAT GAA ATG CCA TTA GTT GGT TTC	60
<i>C. tropicalis</i>	GGA TGT TGG AAA GTC AAT AAT GAA ACT GCT GCT GAC CAA ATC TAC AAT GCT ATC AAA ACT	120
FTI20037	GGA TGT TGG AAA GTC ACC AAT GGC ACT GCG GCT GAC CAA ATC TAC AAT GCG ATT AAA ACT	120
<i>C. tropicalis</i>	GGT TAC AGA TTA TTT GAT GGT GCT GAA GAT TAC GGT AAT GAA AAA GAA GTT GGT GAA GGT	180
FTI20037	GGT TAC AGA TTA TTT GAT GGT GCT GAA GAT TAC GGT AAC GAA AAA GAA GTT GGT GAA GGT	180
<i>C. tropicalis</i>	ATT AAC AGA GCC ATT AAA GAA GGA TTA GTT AAA AGA GAA GAA TTA TTC ATC ACT TCT AAA	240
FTI20037	ATC AAC AGA GCC ATT AAA GAA GGA TTA GTT AAA AGA GAA GAA TTA TTC ATC ACT TCT AAA	240
<i>C. tropicalis</i>	TTA TGG AAC AAT TTC CAT GAT CCA AAG AAT GTT GAA ACT GCT TTA AAC AAA ACT TTA AGT	300
FTI20037	TTA TGG AAC AAT TTC CAT GAT CCA AAG AAT GTT GAA ACT GCT TTA AAC AAA ACT TTA AGT	300
<i>C. tropicalis</i>	GAC TTG AAC TTG GAC TAT GTT GAT TTA TTC TTG ATT CAT TTT CCA ATT GCT TTT AAA TTT	360
FTI20037	GAC TTG AAC TTG GAC TAT GTT GAT TTA TTC TTG ATT CAT TTT CCA ATT GCT TTT AAA TTT	360
<i>C. tropicalis</i>	GTT CCA ATT GAA GAA AAA TAC CCA CCT GGT TTC TAC TGT GGT GAT GGT GAT AAC TTC CAC	420
FTI20037	GTT CCA ATT GAA GAA AAA TAC CCA CCT GGT TTC TAC TGT GGT GAT GGT GAT AAC TTC CAC	420
<i>C. tropicalis</i>	TAT GAA GAT GTT CCA TTA TTA GAT ACT TGG AAA GCT TTG GAA AAA TTG GTT GAA GCT GGT	480
FTI20037	TAT GAA GAT GTT CCA TTA TTA GAT ACT TGG AAA GCT TTG GAA AAA TTG GTT GAA GCT GGT	480
<i>C. tropicalis</i>	AAG ATC AAA TCT ATT GGT ATT TCC AAT TTT ACT GGT GCT TTG ATT TAC GAT TTG ATC AGA	540
FTI20037	AAG ATC AAA TCT ATT GGT ATT TCC AAT TTT ACT GGT GCT TTG ATT TAC GAT TTG ATC AGA	540
<i>C. tropicalis</i>	GGT GCT ACT ATC AAA CCA GCT GTT TTA CAA ATT GAA CAT CAC CCA TAC TTG CAA CAA CCA	600
FTI20037	GGT GCT ACT ATC AAA CCA GCT GTT TTA CAA ATT GAA CAT CAC CCA TAC TTG CAA CAA CCA	600
<i>C. tropicalis</i>	AAA TTG ATT GAA TAT GTT CAA AAA GCT GGT ATT GCC ATT ACT GGT TAC TCT TCA TTT GGT	660
FTI20037	AAA TTG ATT GAA TAT GTT CAA AAA GCT GGT ATT GCC ATT ACT GGT TAC TCT TCA TTT GGT	660
<i>C. tropicalis</i>	CCA CAA TCA TTC TTG GAA TTG GAA TCC AAG AGA GCT TTG AAC ACC CCA ACT TTA TTT GAA	720
FTI20037	CCA CAA TCA TTC TTG GAA TTA GAA TCC AAG AGA GCT TTG AAT ACC CCA ACT TTA TTT GAA	720
<i>C. tropicalis</i>	CAT GAA ACT ATT AAA TCA ATT GCT GAT AAA CAT GGT AAA TCC CCA GCT CAA GTT TTA TTA	780
FTI20037	CAT GAA ACT ATT AAA TCA ATT GCT GAT AAA CAT GGT AAA TCC CCA GCT CAA GTT TTA TTA	780
<i>C. tropicalis</i>	AGA TGG GCT ACT CAA AGA AAT ATT GCT GTT ATT CCA AAA TCA AAC AAT CCA GAA AGA TTA	840
FTI20037	AGA TGG GCT ACT CAA AGA AAT ATT GCT GTT ATT CCA AAA TCA AAC AAT CCA GAA AGA TTA	840
<i>C. tropicalis</i>	GCT CAA AAC TTG TCT GTT GTT GAC TTT GAC TTG ACT AAG GAT GAT TTG GAC AAT ATT GCT	900
FTI20037	GCT CAA AAC TTG TCT GTT GTT GAC TTT GAC TTG ACT AAG GAT GAT TTG GAC AAT ATT GCT	900
<i>C. tropicalis</i>	AAA TTG GAC ATT GGT TTG AGA TTC AAT GAT CCA TGG GAC TGG GAC AAC ATT CCA ATC TTT	960
FTI20037	AAA TTG GAC ATT GGT TTG AGA TTC AAT GAT CCA TGG GAC TGG GAC AAC ATT CCA ATC TTT	960
<i>C. tropicalis</i>	GTT TAA	966
FTI20037	GTT TAA	966

Figura 10. Alinhamento da sequência de *XYL1* de *C. tropicalis* e de *C. guilliermondii* FTI 20037, com as divergências sublinhadas.


```

Query: 5      ctactactcctactattaaattaaactccggttatgaaatgccattagttggtttcggat 64
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct: 67852  ctactattcctaccattaaattaaactctggttatgaaatgccattagttggtttcggat 67911

Query: 65      gttgaaagtccaatgccactgccgctgaccaaactcaaatgccattaaaactggtt 124
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct: 67912  gttgaaagtcaataatgaaactgctgctgaccaaactcaaatgctatcaaaactggtt 67971

Query: 125     acagattattgatggtgctgaagattacggtaacgaaaaagaagttggtgaaggtatca 184
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct: 67972  acagattattgatggtgctgaagattacggtaaatgaaaaagaagttggtgaaggtatta 68031

Query: 185     acagagccattaaagaaggattagttaaaagagaagaattatcatcacttctaaattat 244
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct: 68032  acagagccattaaagaaggattagttaaaagagaagaattatcatcacttctaaattat 68091

Query: 245     ggaacaatttccatgatccaagaatggtgaaactgctttaacaaaaactttaagtgact 304
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct: 68092  ggaacaatttccatgatccaagaatggtgaaactgctttaacaaaaactttaagtgact 68151

Query: 305     tgaacttgactatggtgatttattcttgattcattttccaattgcttttaaatgttc 364
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct: 68152  tgaacttgactatggtgatttattcttgattcattttccaattgcttttaaatgttc 68211

Query: 365     caattgaagaaaaatacccacctggtttctactgtggtgatggtgataactccactatg 424
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct: 68212  caattgaagaaaaatacccacctggtttctactgtggtgatggtgataactccactatg 68271

Query: 425     aagatgttcattattagatacttgaaagccttgaaaaattggttgaagctggttaaga 484
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct: 68272  aagatgttcattattagatacttgaaagccttgaaaaattggttgaagctggttaaga 68331

Query: 485     tcaaatctattggtatttccaattttactggtgcttttgatttacgattgatcagaggtg 544
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct: 68332  tcaaatctattggtatttccaattttactggtgcttttgatttacgattgatcagaggtg 68391

Query: 545     ctactatcaaaacagctggtttacaattgaacatcacccatacttgcaacaacaaaaat 604
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct: 68392  ctactatcaaaacagctggtttacaattgaacatcacccatacttgcaacaacaaaaat 68451

Query: 605     tgattgaatatgttcaaaaagctggtattgceattactggttactcttcatttgggtccac 664
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct: 68452  tgattgaatatgttcaaaaagctggtattgceattactggttactcttcatttgggtccac 68511

Query: 665     aatcattcttgaattagaatccaagagagccttgaataccccaacttatttgaacatg 724
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct: 68512  aatcattcttgaattagaatccaagagagccttgaataccccaacttatttgaacatg 68571

Query: 725     aaactattaatcaattgctgataaacatggtaaatccccagctcaagttttattaagat 784
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct: 68572  aaactattaatcaattgctgataaacatggtaaatccccagctcaagttttattaagat 68631

Query: 785     gggctactcaaagaaatattgctgttattccaaaatcaaaacatccagaaagattagctc 844
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct: 68632  gggctactcaaagaaatattgctgttattccaaaatcaaaacatccagaaagattagctc 68691

Query: 845     aaaacttgtctgttggactttgacttgactaaggatgatttgacaatattgctaaat 904
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct: 68692  aaaacttgtctgttggactttgacttgactaaggatgatttgacaatattgctaaat 68751

Query: 905     tggacattggtttgagattcaatgatccatgggactgggacaacattccaatctttggtt 964
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct: 68752  tggacattggtttgagattcaatgatccatgggactgggacaacattccaatctttggtt 68811

```

Figura 11. Alinhamento da seqüência de *XYL1* com a seqüência do projeto genoma de *C. tropicalis*.

Usando Blastp, a seqüência predita de Xyl1 mostrou maior identidade com a xilose redutase I,II de *C. tropicalis* (98%), porém a Figura 12 mostra o alinhamento com a xilose redutase de *Candida tenuis* (79% de identidade) pois esta proteína possui estrutura terciária determinada e depositada no PDB. A partir deste alinhamento, foi possível identificar os resíduos envolvidos no sítio catalítico, no sítio de ligação à NADH e os que participam da formação de dímero (KAVANAGH *et al.*, 2002) (Figura 12). O sítio catalítico envolve os aminoácidos Asp⁴³, Tyr⁴⁸, Lys⁷⁷

conforme sugerido por Lee (1998). A seqüência apresentou ainda três assinaturas da família de aldocetoredutases. A enzima XR de *C. tropicalis* possui especificidade por NADPH, sendo assim, esta levedura é considerada como uma boa produtora de xilitol (YOKOYAMA *et al*, 1995a).

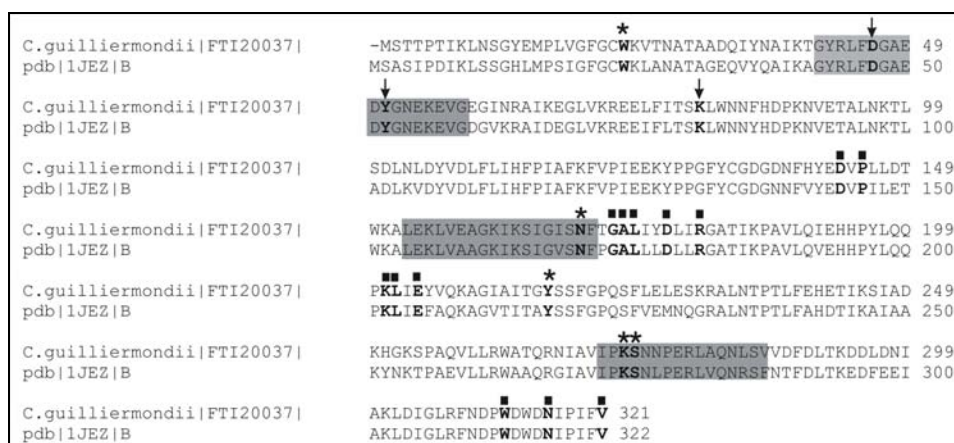


Figura 12. Alinhamento entre a seqüência da proteína Xyl1 de *C. guilliermondii* FTI 20037 e *C. tenuis* (1JEZ). Os aminoácidos dentro do quadrado hachurado representam as assinaturas das aldocetoredutases, os resíduos envolvidos na catálise são indicados por setas, os resíduos envolvidos no sítio de ligação à coenzima são indicados por asteriscos e os resíduos que participam na dimerização estão indicados por quadrados.

3. Clonagem e análise do gene *XYL2*

Um vez que o gene *XYL2* de *C. tropicalis* ainda não havia sido caracterizado antes deste trabalho, decidiu-se cloná-lo por PCR a partir do alinhamento de genes homólogos de *P. stipitis* e *G. mastotermis* (Figura 13) disponíveis no *GenBank*. Para tanto, foram desenhados quatro *primers* para a região 5' (5XDH1, 5XDH2, 5XDH3, 5XDH4) e quatro para região 3' (3XDH1, 3XDH2, 3XDH3, 3XDH4), a partir do alinhamento das seqüências de *XYL2* de *P. stipitis* e *G. mastotermis* (Figura 13) disponíveis no *GenBank*.

<i>P. stipitis</i>	-----ATGACTGTAACCCCTCCTTGGTGTGAACAAGATCGACGACATTTTCGTTCGAA	54
<i>G. mastotermitis</i>	ATGCTACTCCTGAAACTTATCTTTTGTATACAAAAGCCTTTGACGTCGAAGTCGAG	60
	* * * * *	
<i>P. stipitis</i>	ACTTACGATGCCCCGAAATCTCTGAACCTACCGATGTCCTCGTCCAGTCAAGAAAAC	114
<i>G. mastotermitis</i>	GATAGACCCATCCCCAAGTTGTCTGATCCTTACTCTGTCAAGATCCAAGTCAAGAGACT	120
	* * * * *	
<i>P. stipitis</i>	GGTATCTGTGGTTCCGACATCCACTTCTACGCCATGGTAGAATCGGTAACCTTCGTTTTG	174
<i>G. mastotermitis</i>	GGTATCTGTGGTAGTGATGTTTACTTACTTACCATTGGAGCTATTTGGTACTTTGCTGTC	180
	* * * * *	
<i>P. stipitis</i>	ACCAAGCCAAATGGTCTTGGGTCACGAAATCGCCGGTACTGTTGTCCAGGTTGGTAAGGGT	234
<i>G. mastotermitis</i>	AAGGCCCAATGGTCTTGGTACGAAATCAGTGGTGTGTTCTTGAAGTCGGTAGCGAG	240
	* * * * *	
<i>P. stipitis</i>	GTCACCTCTCTAAGGTTGGTGAACGTCGCTATCGAACCGATTCCATCCAGATC	294
<i>G. mastotermitis</i>	GTCAGTCACTCAAGTTGGTGAACGTCGCTATGGACCTGGTTCACGACGACGAC	300
	* * * * *	
<i>P. stipitis</i>	TCCGACGAATACAAGAGCGGTCACTACAACCTGTGCTCCACATGGCCTTCGCCGCTACT	354
<i>G. mastotermitis</i>	TCTGATGAATACAAGTCGGTAGATACAACCTGTGCTCCACATGGCCTTCGCTGCTACT	360
	* * * * *	
<i>P. stipitis</i>	CCTAACTCCAAGGAAGCGAACCACCAACCCAGGTACCTTATGTAAGTACTTCAAGTCG	414
<i>G. mastotermitis</i>	CCTCCTTATGATG-----GTACTCTTTGTAATACTATATTTCTT	399
	* * * * *	
<i>P. stipitis</i>	CCAGAGACTTCTTGGTCAAGTTGCCAGACCAGTTCAGCTTGGAACTCGGTGCTCTTGT	474
<i>G. mastotermitis</i>	CCTGAAGACTTCTGCTCAAGTTACCTGAGCAGTTCTTTGGAAGGGTGCCTTAGTT	459
	* * * * *	
<i>P. stipitis</i>	GAGCCATTTGCTGTGGTGTCCAGCCTCCAAGTTGGGTTCCGTTGCTTTCGGCGACTAC	534
<i>G. mastotermitis</i>	GAACCTTAAAGTGTTCGGTTCACCTCCTAAGTTGGTAACTAAGCCCGTAGCCAT	519
	* * * * *	
<i>P. stipitis</i>	GTTGCCCTTTGCTGCTGGTCCCTGTTGGTCTTTTGGCTGCTGCTCGCCAAAGCCTTC	594
<i>G. mastotermitis</i>	GTTGCCATTTACGGTGCAGGACCTGTTGGTGTGTTAGTTGCCGAGTGCAGTGCCTT	579
	* * * * *	
<i>P. stipitis</i>	GGTCTAAGGTTGTCATCGTTCGTTGACATTTTCGACAACAAGTTGAAGATGGCCAAGGAC	654
<i>G. mastotermitis</i>	GGTCTGAATCTGTACTATATGATCTTGTGAATCTAGACTTAACCTTGCCAAGGAG	639
	* * * * *	
<i>P. stipitis</i>	ATTGGTGTGCTACTCACACCT--TCAACTCCAAGACCGGTGGTCTGAAGAATTGATC	711
<i>G. mastotermitis</i>	TTAGGTGCTACTGCCACTGTTCAAGTTGATTTCAAG--GATACTCTTAGGAGTCTGCT	696
	* * * * *	
<i>P. stipitis</i>	---AAGGCTTTCGGTGGTAAC-----GTGCCAAACGTCGTTTTGGAATGACTGGT	759
<i>G. mastotermitis</i>	GCTAAGGTTGTTGCCGCTAACACGGAATGGCCCTGATGTTGTGATGATGCTCTGCT	756
	* * * * *	
<i>P. stipitis</i>	GCTGAACCTTGATCAAGTTGGTGTGACGCCATTGCCCCAGGTGGTCTTTCGTTCAA	819
<i>G. mastotermitis</i>	GCTGAGGCTTCCATTAATAGTCTATCAATGCCATCAGACCTGGTGGCATTACGTTCAA	816
	* * * * *	
<i>P. stipitis</i>	GTGGTAAAGCTGCTGGTCCAGTCAGCTTCCCAATCACCGTTTTCCGCCATGAAGGAATG	879
<i>G. mastotermitis</i>	GTGGTAAAGCTGCTGGTCCAGTCAGCTTCCCAATCACCGTTTTCCGCCATGAAGGAGCT	876
	* * * * *	
<i>P. stipitis</i>	ACTTTGTTCTGTTCTTTCAGATACGGATTCAACGACTACAAGACTGCTGTGGAATCTTT	939
<i>G. mastotermitis</i>	ACTGTTAAGGATCTTTCAGATATGGTTACGGTACTACCTCTTTCGCTGTCAGCTTCTG	936
	* * * * *	
<i>P. stipitis</i>	GACACTAACTACCAAAACGGTAGAGAAAATGCTCCAATTGACTTTGAACAATTGATCACC	999
<i>G. mastotermitis</i>	GCTA-----GTGAAAAG-----TCAATGTTAAAAAGTTGATTACC	972
	* * * * *	
<i>P. stipitis</i>	CACAGATACAAGTTCAAGGACGCTATTGAAGCCTACGACTTGGTCAGAGCCGGTAAGGGT	1059
<i>G. mastotermitis</i>	CATGAAGTCAAGTTGAGGATGCTGCTGAAGCTTTCCAATTGGTTAGAGATGGAAGG--	1030
	* * * * *	
<i>P. stipitis</i>	GCTGCAAGTGTCTCATTGACGGCCCTGAGTAA	1092
<i>G. mastotermitis</i>	-CTATCAAGTGCATCATTACGGCCCTGAGTAA	1062
	* * * * *	

Figura 13. Alinhamento das seqüências de *XYL2* de *P. stipitis* e *G. mastotermitis*, evidenciando a localização dos *primers* desenhados para amplificar a seqüências *XYL2* de *C. tropicalis*.

Nas reações de PCR utilizou-se como molde o DNA total de *C. tropicalis*; dentre as combinações de *primers* que resultaram em amplificação positiva,

destacamos as que apresentaram produto com tamanho próximo ao esperado calculado a partir da seqüência de *P. stipitis*, a saber: 5XDH1/3XDH2 - 511 pb, 5XDH2/3XDH3 - 728 pb, 5XDH2/3XDH1 - 911 pb, 5XDH3/3XDH1 - 989 pb (dados não mostrados). Porém, estas duas últimas foram produtos de apenas um dos *primers*, ou seja, o produto de 5XDH2/3XDH1 era resultado da amplificação de apenas 5XDH2, enquanto o de 5XDH3/3XDH1 era produto de apenas 3XDH1. Dentre as duas combinações possíveis, foi utilizada a que gerava o maior produto, ou seja 5XDH2/3XDH3. O resultado da reação de PCR está apresentado na Figura 14.

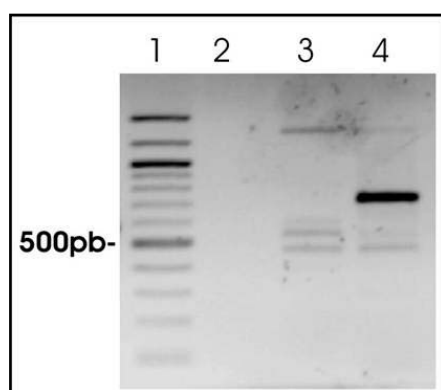


Figura 14. Reações de amplificação de *XYL2* analisadas em gel de agarose 1%. 1: marcador 100 bp DNA ladder (Invitrogen), 2: 5XDH2, 3: 3XDH3, 4: 5XDH2/3XDH3.

O fragmento de ~750 pb amplificado usando os *primers* 5XDH2 e 3XDH3 foi ligado ao vetor pCR[®] 2.1 TOPO[®] (Invitrogen). Após a transformação de *E. coli* DH5 α com o sistema de ligação, selecionou-se transformantes para extração de plasmídios. Foi analisada a presença de inserto com digestão com *EcoR* I, o clone escolhido (Topoxyl2) foi submetido a uma minipreparação de plasmídios com *kit* e seqüenciado.

O plasmídio foi seqüenciado com os *primers* universal e reverso e a seqüência obtida apresentou 732 pb que quando analisada pelo BLASTx, apresentou 67% de identidade com o homólogo *XYL2* de *P. stipitis* e 48% com o de *G. mastotermitis*.

Os resultados referentes à clonagem do gene *XYL2* de *C. tropicalis* e a análise destes resultados foram divulgados em apresentação oral no 6º Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática, Rio de Janeiro – RJ em abril de 2004.

3.1. Clonagem das Regiões 5' e 3' do Gene *XYL2*

3.1.1. Uso de *Primers* Internos

A primeira estratégia para obter as porções 5' e 3' do gene a partir de seqüências conhecidas de *XYL2* foi baseada no trabalho de LORITO *et al.* (1996) no qual foi isolado o promotor do gene *ech-42* de *Trichoderma harzianum*. Foram desenhados *primers*, *xyl2-R2* e *xyl2-F2* (Figura 15), que se anelam dentro da seqüência obtida, Outro *primer* sintetizado foi 221 (Tabela 6) utilizado por LORITO *et al.* (1996). Nesta estratégia, os *primers* específicos se anelam em regiões internas do gene enquanto que o *primer* 221, por ser pequeno, se anela randomicamente nas regiões 5' e 3'. Desta forma, é possível obter, sob condições especiais de estrigência, produtos de PCR a partir do *primer* 221 e os *primers* específicos.

Dos produtos da reação de PCR, foram selecionados o amplicon de ~400 pb da amplificação com os *primers* 221 e *xyl2-R2*, e o de cerca de 900 pb para a amplificação com os *primers* 221 e *xyl2-F2*, por se apresentarem como produtos específicos em comparação com as amplificações utilizando cada um dos *primers* sozinhos (Figura 16). Estes produtos foram utilizados em uma reação de PCR para confirmação da amplificação da região de *XYL2*: produto 221/*xyl2-R2* confirmado com 3XDH3/*xyl2-R2* e produto 221/*xyl2-F2* confirmado com 5XDH2/*xyl2-F2*, porém, só foi confirmado o amplicon obtido do PCR usando 221/*xyl2-R2* (dados não mostrados).

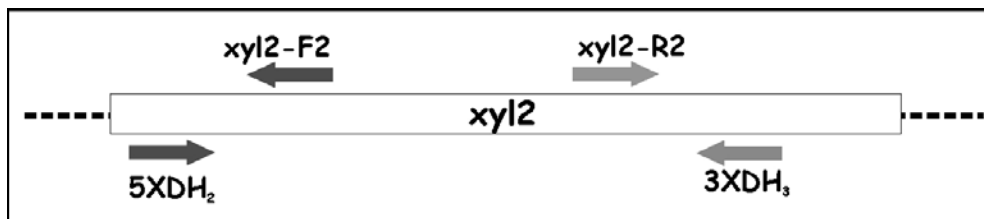


Figura 15. Esquema mostrando as posições relativas de anelamento dos *primers* utilizados para buscar as porções 5' e 3' de *XYL2*.

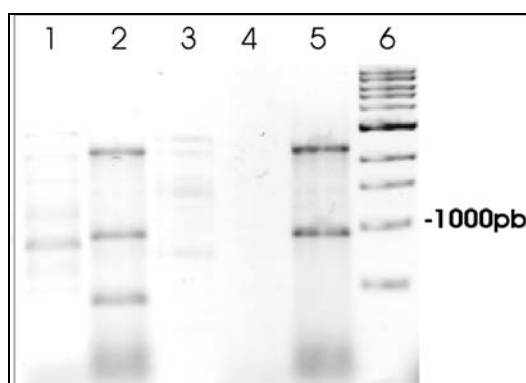


Figura 16. Reações de amplificação utilizando o *primer* 221 analisadas em gel de agarose 1%. 1: 221/xyl2-F2, 2: 221/xyl2-R2, 3: xyl2-R2, 4: xyl2-F2, 5: 221, 6: marcador 1 kb DNA ladder (New England Biolabs).

O produto amplificado com os *primers* 221 e xyl2-R2 foi clonado no vetor pCR[®] 2.1 TOPO[®] (Invitrogen) e posteriormente seqüenciado. Porém, a seqüência de nucleotídeos obtida não continha a porção coincidente entre 3XDH3 e xyl2-R2, portanto, a região amplificada não correspondia ao gene *XYL2* e, assim, decidiu-se utilizar a estratégia de PCR inverso.

3.1.2. PCR Inverso

A estratégia de PCR inverso, inicialmente descrito por TRIGLIA *et al.* (1988) e esquematizada na Figura 17, foi utilizada para encontrar as regiões 5' e 3' que não foram amplificadas com os *primers* 5XDH2 e 3XDH3.

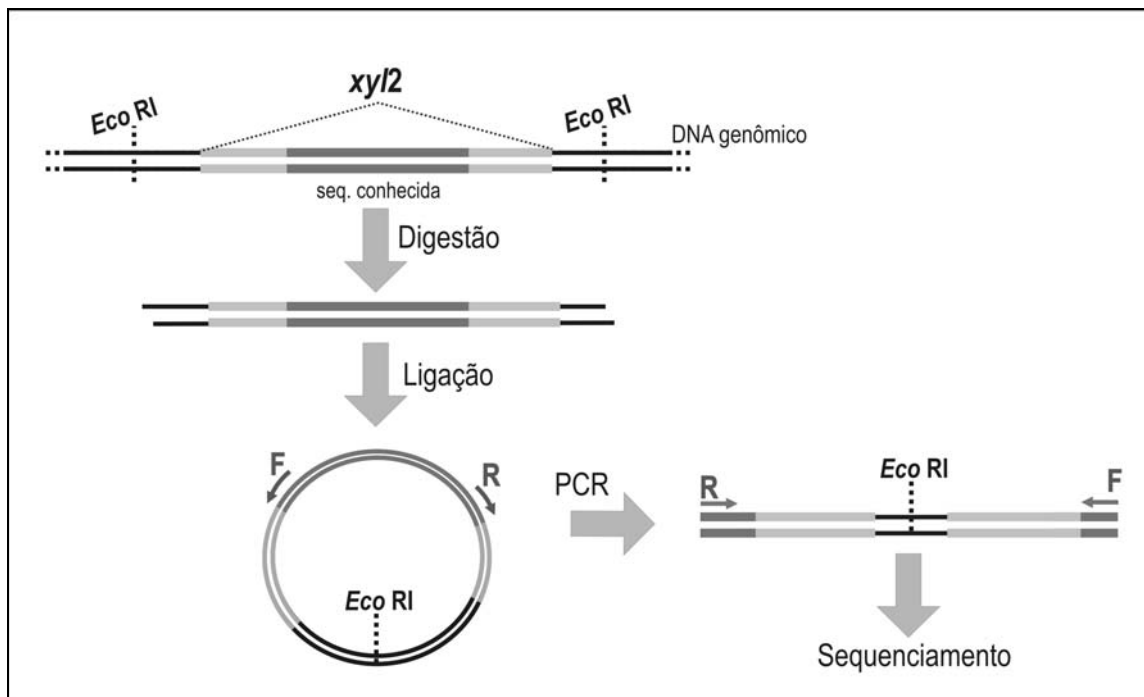


Figura 17. Esquema da técnica de PCR inverso, onde o DNA genômico total é digerido com uma enzima de restrição (*EcoR I*), religado formando fitas circulares que são usadas como molde em uma reação de PCR, utilizando *primers* internos (*R* e *F*).

Primeiramente, o DNA total de *C. tropicalis* foi digerido com as enzimas de restrição *BamH I*, *EcoR I* e *Hind III*, cujos sítios não estão presentes na região clonada do gene *XYL2* obtida. Depois da extração da enzima com clorofane/clorofil seguido de precipitação de DNA, o sistema de digestão foi ressuspendido em 25 μ L de água MilliQ para ser quantificado. Após a ligação do sistema montado com 100 ng de DNA digerido; precipitou-se com NaCl/etanol e ressuspendeu-se em 20 μ L de água MilliQ. Posteriormente, foram utilizados 2 μ L (~10ng) como *template* numa reação de PCR utilizando *Elongase[®] Amplification System*, e como controle, foi utilizado o plasmídeo Topoxyl2. O único produto de amplificação obtido foi o do sistema contendo DNA digerido com *EcoR I* (Figura 18). O produto amplificado foi clonado no vetor pGEM[®]-T Easy (Promega) e após a transformação de *E. coli* DH5 α com o plasmídeo, a presença de inserto foi analisada a partir de digestão com *EcoR I*. O clone escolhido foi submetido a uma minipreparação de plasmídios com *kit* para ser seqüenciado.

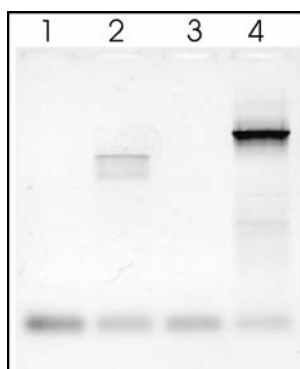


Figura 18. Reações do PCR inverso analisadas em gel de agarose 1%. Amplificação com xyl2-R2 e xyl2-F2, utilizando DNA total digerido e religado como molde, digestão com 1: *Bam*H I, 2: *Eco*R I, 3: *Hind* III e 4: TopoXYL2 como controle.

Com a técnica de PCR inverso foram obtidas 357 pb da porção 3' e 623 pb da porção 5' que, quando analisadas pelo BLASTx, apresentaram maior identidade com uma proteína hipotética de *C. albicans*, 90% e 73% respectivamente, que, provavelmente, trata-se da enzima xilitol desidrogenase, e 66% e 64% de identidade com a enzima xilitol desidrogenase de *P. stipitis*.

A partir desta seqüência foram desenhados os *primers* 5xyl2 e 3xyl2 que se anelam nas extremidades e amplificam toda a região codante. O produto da amplificação por PCR foi clonado no vetor pGEM®-T Easy (Promega) e o vetor resultante (pGEMXyl2) foi seqüenciado para confirmação dos resultados. A seqüência completa foi depositada no *GenBank* com o número de acesso DQ220745 (Anexo 4).

3.2. Análise da Seqüência de XYL2

Analisando a seqüência completa do gene *XYL2* de *C. tropicalis* (Figura 19), unindo o produto obtido da amplificação com 5XDH2/3XDH3 com as seqüências obtidas pelo PCR inverso, observa-se que foi isolado um fragmento de DNA com aproximadamente 1,5 kb, que compreende a fase aberta de leitura de 1092 pb, sem íntrons, que potencialmente codifica um polipeptídeo de 364 resíduos

de aminoácidos. A partir da ferramenta BLAST disponível no site do projeto genoma de *C. tropicalis* - *Broad Institute of Harvard and MIT* (http://www.broad.mit.edu/annotation/fungi/candida_tropicalis/) foi encontrada uma seqüência (supercont3.10 of *C. tropicalis* T1) com 99% de identidade, sendo que a região da ORF e a região 3' são idênticas, com divergência na região 5' em uma região de timinas (Figura 20).

A massa molecular (40 kDa) e o ponto isoelétrico (6,81), calculados a partir da seqüência de aminoácidos predita, coincidem com as subunidades das enzimas xilitol desidrogenase isoladas de *C. shehatae*, *P. tannophilus*, *N. crassa*, *G. mastotermitis* e *A. adenivorans* (PHADTARE *et al.*, 1997; LUNZER *et al.*, 1998; BÖER *et al.*, 2005). A seqüência de aminoácidos predita possui homologia com XDHs de *P. stipitis* (84%), *G. mastotermitis* (68%), *A. adenivorans* (65%), *A. oryzae*, *fumigatus* e *niger* (64%), *S. cerevisiae* (62%) e *H. jecorina* (61%), o alinhamento destas seqüências está apresentado na Figura 21.

A seqüência consenso, TATAAA, responsável pela correta iniciação da transcrição (RATHJEN e MELLOR, 1990), está presente na posição -100 em relação ao códon de iniciação ATG. Na região 5' UTR foram localizados quatro possíveis seqüências para Mig1 (GGGG). Mig1 é uma proteína Cys2-His2 *zinc finger* que media a repressão por glicose de diversos genes pela ligação aos seus promotores, recrutando um complexo de repressão (DE VIT *et al.*, 1997). Outros relevantes motivos encontrados foram sítios de ligação pra Gcr1 (ACCTTCCT) e Rap1(ACCCA), essas seqüências são essenciais para ativação de genes glicolíticos e de proteínas ribossomais em *S. cerevisiae* (TORNOW *et al.*, 1993; SASAKI *et al.*, 2005). São observadas na região 3' UTR após o códon de finalização (UAG), seqüências similares ao sinal típico de poliadenilação (GAAAAGAAT) encontrado em genes de leveduras (GUO e SHERMAN, 1995).

```

-342 accttcctattgtttgaaaccggaaaaaaataatattttgtatggagatcctcaaattt
-282 cggggaaattgtagatttaccttcctcttgcattacgcattgctactatattttgtttttt
-222 agtttgggttttcttttgtattgcttcacgtatggtgattatactttgtgtacactgttt
-162 catttactcccccaagtttctctccccctccatttataatgtatgaattaattatata
-102 aatactgccgcaaatccccaggtgaaatttttttgttacttctaagtttcttatt
                                     M T A N P S
-42  tcttttcattcaataactttcaattctacaatacaaaaagtcATGACTGCAAACCCATCA
7    L V L N K V D D I S F E E Y E A P K L E
19  TTAGTTCTTAACAAAGTTGACGATATTTTCCTTTGAAGAATACGAAGCTCCAAAACCGAA
27  S P R D V I V E V K K T G I C G S D I H
79  TCACCAAGAGATGTCATTGTTGAAGTTAAGAAAACGGTATCTGTGGATCAGATATCCAT
47  Y Y A H G S I G P F I L R K P M V L G H
159 TACTATGCCCATGGTTCAATTGGTCCATTTATTTTAAGAAAACCAATGGTTTTAGGTCCAC
67  E S A G V V S A V G S E V T N L K V G D
219 GAATCAGCAGGTGTTGTTCTGCTGTCGGAAGTGAAGTTACCAACTTGAAGGTTGGTGAT
87  R V A I E P G V P S R F S D E T K S G H
279 AGAGTTGCCATTGAACCTGGGTACCTTCAAGATTTAGTGATGAGACCAAACTGGTTCAT
107 Y H L C P H M S F A A T P P V N P D E P
339 TATCATTGTGCCACATATGTCTTTTGC CGCCACCCACCAGTTAACCCAGATGAACCA
127 N P Q G T L C K Y Y R V P C D F L F K L
399 AATCCTCAAGGTACTTTATGTAAATACTACAGAGTCCCATGTGACTTTTTATTCAAATTA
147 P D H V S L E L G A M V E P L T V G V H
459 CCAGATCATGTTCTTTGGAGTTGGGTGCTATGGTTGAACCACTAACTGTTGGTGTCCAC
167 G C K L A D L K F G E D V V V F G A G P
519 GGTGTAAATTGGCTGATTTGAAATTTGGTGAAGACGTTGTTGTTTTGGTGCCGGTCCA
187 V G L L T A A V A R T I G A K R V M V V
579 GTTGGTTTTGTGACCGTGGCTGCTAGAACAATTGGTGTAAAAGAGTCATGGTTGTT
207 D I F D N K L K M A K D M G A A T H I F
639 GATATTTTTGACAACAAATTGAAGATGGCAAAGATATGGGTGCTGCCACTCATATTTTC
227 N S K T G G D Y Q D L I K S F D G V Q P
699 AACTCAAAAACCGGTGGTGTATCAAGATTTGATCAAGAGTTTTGATGGTGTCAACCT
247 S V V L E C S G A Q P C I Y M G V K I L
759 TCAGTTGTTTTGGAATGTAGTGGTGTCAACCATGTATCTATATGGGTGTTAAAATCTTG
267 K A G G R F V Q I G N A G G D V N F P I
819 AAAGCTGGTGGTAGATTTGTTCAAATTGGTAATGCCGGTGGTGTCAATTTCCCAATT
287 A D F S T R E L A L Y G S F R Y G Y G D
879 GCTGATTTCTCAACCAGAGAATTGGCATTATATGGTTCTTTTCAGATATGGTTACGGTGAC
307 Y Q T S I D I L D R N Y V N G K D K A P
939 TACCAAACTTCAATTGATATTTTAGACAGAACTACGTCAATGGTAAAGACAAAGCACCA
327 I N F E L L I T H R F K F K D A I K A Y
999 ATTAATTTCGAATTGTTGATTACTCACAGATTCAAGTTTAAAGATGCCATCAAAGCCTAT
347 D L V R A G N G A V K C L I D G P E -
1059 GATTTGGTCAGAGCAGGAAATGGTGTGTCAAATGTTTAAATTGATGGTCCAGAATAGagg
1109 tatatagtattagaaaaagaatatacagtatatatatatatatatgtgaataattcatgc
1169 ttaagtttaatatcagtaaagcatctactataaatcca

```

Figura 19. Seqüência de nucleotídeos do gene *XYL2* de *C. tropicalis* e a estrutura primária predita da proteína. Seqüência de nucleotídeos nas UTR - letras minúsculas, na ORF - letras maiúsculas, TATA Box - cinza na região 5', possível sinal de poliadenilação - sublinhado na região 3', a seqüência deduzida de aminoácidos é mostrada sobre a seqüência de nucleotídeos da ORF.

```

Query: 140  gtattgettcaogtatgggtgattactttgtgtacactgttctattactcccccaagt 199
          |||
Sbjct: 43667 gtattgettcaogtatgggtgattactttgtgtacactgttctattactcccccaagt 43608

Query: 200  ttctctccccctccatttataatgatgaattaataataaaactgcgcgcaattt 259
          |||
Sbjct: 43607 ttctctccccctccatttataatgatgaattaataataaaactgcgcgcaattt 43548

Query: 260  cccaggtgaaannnnnnn-gttacttctaagttcttattcttttcttcaataa 318
          |||
Sbjct: 43547 cccaggtgaaatTTTTTTTgttacttctaagttcttattcttttcttcaataa 43488

Query: 319  cttcaattctacaaatacaaaagcatgactgcaaacccatcattagttcttaacaag 378
          |||
Sbjct: 43487 cttcaattctacaaatacaaaagcatgactgcaaacccatcattagttcttaacaag 43428

Query: 379  ttgacgatattcctttgaagaatacgaagctccaaaactcgaatcaccaagagatgca 438
          |||
Sbjct: 43427 ttgacgatattcctttgaagaatacgaagctccaaaactcgaatcaccaagagatgca 43368

Query: 439  ttgtgaagtaagaaaactggatctgtggatcagatattcattactatgcccaggtt 498
          |||
Sbjct: 43367 ttgtgaagtaagaaaactggatctgtggatcagatattcattactatgcccaggtt 43308

Query: 499  caattggtccattatTTTaaagaaaccaatggttttagtcaagatcagcaggtgtg 558
          |||
Sbjct: 43307 caattggtccattatTTTaaagaaaccaatggttttagtcaagatcagcaggtgtg 43248

Query: 559  ttctgctgctggaagtgaagtaccaaactgaaggtgggtgtagagttgccattgaa 618
          |||
Sbjct: 43247 ttctgctgctggaagtgaagtaccaaactgaaggtgggtgtagagttgccattgaa 43188

Query: 619  ctggtgtacctcaagatttagtgatgagaccaaactggtcattatcattgtgcccac 678
          |||
Sbjct: 43187 ctggtgtacctcaagatttagtgatgagaccaaactggtcattatcattgtgcccac 43128

Query: 679  atagtcttttgcgcgccaccaccaggttaaccagatgaaccaaactcctcaaggtact 738
          |||
Sbjct: 43127 atagtcttttgcgcgccaccaccaggttaaccagatgaaccaaactcctcaaggtact 43068

Query: 739  tatgtaatactacagagtcctcatgtgactttttatcaaataccagatcatgtttctt 798
          |||
Sbjct: 43067 tatgtaatactacagagtcctcatgtgactttttatcaaataccagatcatgtttctt 43008

Query: 799  tggagttgggtgctatgggtgaaccataactgtgggtgccaggtgtgaaattggctg 858
          |||
Sbjct: 43007 tggagttgggtgctatgggtgaaccataactgtgggtgccaggtgtgaaattggctg 42948

Query: 859  attgaaattggtgaagcgttgttttttgggtgccaggtccagttggtttgtgaccg 918
          |||
Sbjct: 42947 attgaaattggtgaagcgttgttttttgggtgccaggtccagttggtttgtgaccg 42888

Query: 919  ctgcccgtgctagaacaattggtgctaaaagagtcaggttggatattttgacaaca 978
          |||
Sbjct: 42887 ctgcccgtgctagaacaattggtgctaaaagagtcaggttggatattttgacaaca 42828

Query: 979  aattgaagatggcaaaagatatgggtgctgccactcattttcaactcaaaaaccggtg 1038
          |||
Sbjct: 42827 aattgaagatggcaaaagatatgggtgctgccactcattttcaactcaaaaaccggtg 42768

Query: 1039  gtgattacaagatttgatcaagagtttgatgggttcaacctcagttggtttggaat 1098
          |||
Sbjct: 42767 gtgattacaagatttgatcaagagtttgatgggttcaacctcagttggtttggaat 42708

Query: 1099  gtagtgggtctcaacctgtatctatatgggtgttaaaactctgaaagctgggtgtagat 1158
          |||
Sbjct: 42707 gtagtgggtctcaacctgtatctatatgggtgttaaaactctgaaagctgggtgtagat 42648

Query: 1159  ttgtcaaatggtaatgccggtggtgatgtcaatttccaattgctgatttctcaacca 1218
          |||
Sbjct: 42647 ttgtcaaatggtaatgccggtggtgatgtcaatttccaattgctgatttctcaacca 42588

Query: 1219  gagaattggcattataggttcttccagataggttacggtgactaccaaaactcaattg 1278
          |||
Sbjct: 42587 gagaattggcattataggttcttccagataggttacggtgactaccaaaactcaattg 42528

Query: 1279  atattttagacagaaactacgtcaatggttaagacaagcacaatttaattcgaattgt 1338
          |||
Sbjct: 42527 atattttagacagaaactacgtcaatggttaagacaagcacaatttaattcgaattgt 42468

Query: 1339  tgattactcacagattcaagtttaagatgccatcaagcctatgattgggtcagagcag 1398
          |||
Sbjct: 42467 tgattactcacagattcaagtttaagatgccatcaagcctatgattgggtcagagcag 42408

Query: 1399  gaaatgggtgctgcaaatgtttaaattgatgggtccagaatagaggtatagattagaaa 1458
          |||
Sbjct: 42407 gaaatgggtgctgcaaatgtttaaattgatgggtccagaatagaggtatagattagaaa 42348

Query: 1459  aagaatacacag 1470
          |||
Sbjct: 42347 aagaatacacag 42336

```

Figura 20. Alinhamento da seqüência de XYL2 com a seqüência do projeto genoma de *C. tropicalis*.

```

C.tropicalis -----MTANPSLVLNKVVDDISFEEYEAPKLESPRDIVEVK
P.stipitis -----MTANPSLVLNKIDDISFETYDAPEISEPTDVLVQVK
G.mastotermitis -----MSTPENLSFVLQKPFVDFKEDRPIPKLSDPYSVKIQVK
A.adenovirans -----MAAQVEEQVLNLRQAADHNSFVLLKPELGFEEPRVPIVITDPRDVKIQVK
A.fumigatus MAFTETLVRPKSVPVNELPDQTSFQNVNHAFLILSPGGTFCYKERPTPKIESERDVIVRVV
A.oryzae -----MGAPPKT---AQNLSEFVLEGIHKVKFEDRPIQLRDAHDVLDVDR
A.niger -----MSTQNTN---AQNLSEFVLEGIHKVKFEDRPIPEINPHDVLNVVR
S.cerevisiae -----MTDLTTQEAIVLERPGKITLTVNSIPKISDPNEVIQIK
H.jecorina -----MATQTINKDAISNLSFVLNKPQGVDFEERPKPITIDPNDVLAVN
          : : : * . . * : . * : .
C.tropicalis KTGICGSDIHYAHGSI GPFILRKPMLVGHESAGVVS AVGSEVTNLKVGDRVAIEPGVPS
P.stipitis KTGICGSDIHYAHGRIGNFVLT KPMVLGHESAGTVVQVKGVTSLKVGDNVAIEPGI PS
G.mastotermitis KTGICGSDVHYFTHGAIGDFVVKAPMVLGHESG VVLEVGSEVSKLVGDRVAMEPGVPS
A.adenovirans KTGICGSDVHFQHGRI GDYVVEKPMVLGHESG VVVEVGSEVTSKLVGDRVAMEPGVPD
A.fumigatus ATGLCGSDVHYWQHGRIGRYAVNRPIV LGHESGVI VACGSNVDGLKVGDRVALEPGI SC
A.oryzae FTGICGSDVHYWEHSGI GQFVVKDPMVLGHESG VISKVGSVAVTTLKVGDRVAMEPGI PC
A.niger FTGICGSDVHYWEHSGI GQFVVKDPMVLGHESG VISKVGSVAVTSLKVGDRVAMEPGI PC
S.cerevisiae ATGICGSDIHYHTHGRITANYVVE SPMVLGHESG IVALIGENVKTLKVGDRVALEPGI PD
H.jecorina YTGICGSDVHYVWHGAI GHFVVKDPMVLGHESAGTVVVEGPAVKS LKVGDRVALEPGYPC
          ** : *** : * : : * * . : : * : * * * * * : * * * * * .
C.tropicalis RFSDETKSGHYHLCPHMSFAATPPVNPDEPNPQGT LCKYRVPDPLFKLPDHVLSLELGA
P.stipitis RFSDEYKSGRYNLCPHMAFAATPNSKEGEPNPPGT LCKYFKSPEDFLVKLPDHVLSLELGA
G.mastotermitis RFSDEYKSGRYNLCPHMAFAATPPYD -----GTLCKYITLPEDFCVKLPENHVSLEEGA
A.adenovirans RRSKEYKMGRYHLCPHVRFAACPPD -----GTLCKYITLPEDFCVKLPENHVSLEEGA
A.fumigatus NTCKYCRSGHYNLCCKMFAATPPYD -----GTLSTFYKVPACCCYKLPVHISLRDGA
A.oryzae RRCEPCKEGKYNLCCKMFAATPPYD -----GTLAKYVLPEDFCYKLPENINLQEA
A.niger RRCEPCKAGKYNLCCKMFAATPPYD -----GTLAKYVLPEDFCYKLPESITLQEA
S.cerevisiae RFSPEMKEGRYNLDPNLKAATPPFD -----GTLTKYKTMKDFVYKLPDDVLEFEEGA
H.jecorina RRCSCFRAGKYNLCDFMFAATPPYH -----GTLTGLWAAPADFCYKLPDGVSLQEA
          . . : * : * * : * * * . : * * * * * : * * * * * : * * * * *
C.tropicalis MVEPLTVGVHGCKLADLKFGE DVVVFGAGPVGLLTA AVARTIGAKRVMVVDIFDNKLM
P.stipitis LVEPLSVGVHASKLGSVAFGDYVAVFGAGPVGLLAA AVAKTFGAKGVIIVDIFDNKLM
G.mastotermitis LVEPLSVAVHSSKLGKNGKPGSHVAIY GAGPVGLLAAVASAFGAESVTIIDLVESRLNLA
A.adenovirans LVEPLSVAVHTARLLGIYPGSKV VVFGAGPIGQLCIGVCKAFGAS IIGAVDLFEQKLETA
A.fumigatus LVEPLSVAVHACRLAGDMQNKSVV VFGAGPVGLLCCSVASAFGAARVAVDVVKTRLATA
A.oryzae VMEPLSVAVHIVKQANVAPGQSVV VFGAGPVGLLCCAVARAFGSPKVI AVDIQKGRLEFA
A.niger IMEPLSVAVHIVKQAGINPGQSVV VFGAGPVGLLCCAVAKAYGASKVI AVDIQKGRLEFA
S.cerevisiae LIEPLSAVHANKLAKIKFGARCVV VFGAGPIGLLAGKVASVFGAADVVFVLDLENLETA
H.jecorina LIEPLAVAVHIVKQARVPGQSVV VVGAGPVGLLCAAVAKAYGASTIVSVDIVQSKLDEFA
          : * * * : * * : . : * * * * * : * * * * * : * * * * *
C.tropicalis KDMGAATHIFNS ---KTGGDYQDLIK -SPDGVQPSV VLECSGAQPC IYMGVILKAGGRF
P.stipitis KDIGAATHIFNS ---KTGGS -EELIK -AFGNGVNPV VLECTGAEPCKILGVDAIAPGGRF
G.mastotermitis KELGATATVQVDFKDPKESAAKVVAAN -NGIAPD VVVDASGAEASINSAINAI RPPGTY
A.adenovirans KEFGASHTYVVPQKGDSDHDETAHKILELLPNKQAPD VVIDASGAEQSINAGIELLERGTF
A.fumigatus TKYGATHRYEMD ---AEKKNABEELSA TAALEDGADIIL DATGAEPCLNCGLDILRSGETF
A.oryzae KKYAATAI FEPS -KVSALENAERIVNENDLGRGAD IVIDASGAEPSVHTGIHVLRRPGETY
A.niger KKYAATAI FEPA -KAAALENAQR IITENDLGSADVA IVDASGAEPSVHTGIHVLRRAGTY
S.cerevisiae RQFG -ATHIVNSGDLPHGVTVD SVIKKAI GKKGADVV FFCGAEPCVRAGIEVCAGGTI
H.jecorina RGFCSTHTYVSQ -RISAEDNAKAIKELAGLPGGAD VVIDASGAEPSIQTSIHVVRRMGTY
          : : : : * * * : * * * : * * * : * * * : * * * : * * *
C.tropicalis VQIGNAGGD -VNFPIADFSTRELALYGSFRYGYD YQTSIDILDRNYVNGKDKAPINFEL
P.stipitis VQVGNAA GP -VSFPIITVFAMKEL TLFSGFRYGFNDYKTAVGIFDTNYQNGRENAPIDFEQ
G.mastotermitis VQVGMGKPD -VSFPIATLIGKELTVKGSFRYGYD YPLAVSLLAS -----GKVNPKK
A.adenovirans GQVAMGRD TYIQFVAVSRMAMKEIRFQGVFRYTYGDYELATQLIGD -----GKIPVKK
A.fumigatus VQVGLGNPT -LMFPVGVQCDKEVVF KGSFRYGPDYALAI GILES -----RRVQLDG
A.oryzae VQGGMGRNE -ITFPIMAACTKELNV RGSFRYSGDYKLAVNLVAS -----GKVSVKE
A.niger VQGGMGRSE -ITFPIMAACTKELNV RGSFRYSGDYKLAVLSVA -----GKVNPKK
S.cerevisiae VQVGMGQEE -IQFPIS IIPTELTFQGC FRYQCDYSDSIELVSS -----RKLKLP
H.jecorina VQGGMGKSD -ITFPIMAMCLKEVTVRGSFRY GAGDYELAVELVRT -----GRVDVKK
          * . . : * : : * : * * * * * : * : . . . . . : . .
C.tropicalis LITHRFKFKDAIKAYDLVRAG -NGAVKCLIDGPE -----
P.stipitis LITHRYKFKDAIEAYDLVRAG -KGAVKCLIDGPE -----
G.mastotermitis LITHEVKFEDAAEAFQLVRDQ -KAIKCIIDGPE -----
A.adenovirans LVTHRRPFKAEAEAYELVKSG -VAVKCIIDGPE -----
A.fumigatus MVTHEFSFEDAQAFQNVVHR -QGIKCIYGP GIDEEWARIAD
A.oryzae LITGVVSEFEDAQAFHEVVKAG -KGIKTLIAGVDV -----
A.niger LITGVVSEFEDAQAFHEVVRAG -KGIKTLIAGVDS -----
S.cerevisiae FITHRYSEKDAVEAFETSHHPLNNIKTIIEGPE -----
H.jecorina LITGVVSEFQAEAEAFQKVKSG -EAIKIL IAGPNEKV -----
          : : * * * * * : * * * * * : * * * * *

```

Figura 21. Alinhamento entre a seqüência predita a partir do gene *XYL2* e as seqüências primárias de xilitol desidrogenases de diferentes organismos.

3.3. Número de cópias do gene *XYL2*

Para determinar o número de cópias do gene *XYL2* no genoma de *C. tropicalis*, realizou-se um experimento de *Southern blotting*. O DNA total da levedura foi digerido com as enzimas de restrição *EcoR* I, *EcoR* V e *Hind* III. A sonda homóloga foi amplificada por PCR utilizando os *primers* 5xyl2 e 3xyl2 correspondendo a toda região codante do gene *XYL2* (1092 pb), e depois marcada com fosfatase alcalina.

De acordo com a Figura 22 a sonda hibridizou uma única vez com o DNA genômico de *C. tropicalis* digerido com *EcoR* I, *EcoR* V e *Hind* III, revelando fragmentos com tamanhos aproximados de 2,5 kb, 3,0 kb e 5,0 kb, respectivamente. Na digestão com *EcoR* V, a sonda deveria hibridizar em duas bandas porque há um sítio desta enzima (GATATC) na seqüência do gene *XYL2* na posição 150 pb, porém como a intensidade da banda está maior que as obtidas com a digestão com outras enzimas, pode-se sugerir que o tempo de corrida da eletroforese não tenha sido suficiente para resolver as duas bandas. Esses resultados sugerem fortemente que, assim como em *A. adenivorans* (BOËR *et al.*, 2005), em *C. tropicalis* o gene *XYL2* é representado por uma única cópia no genoma.

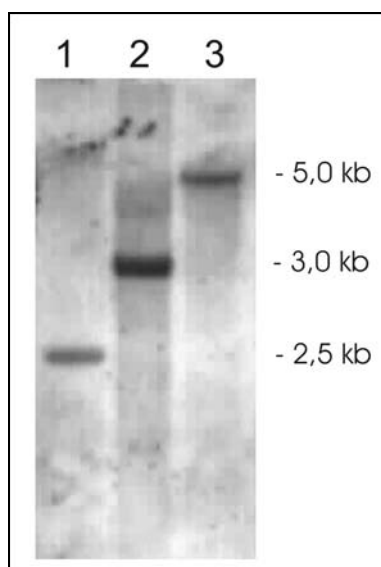


Figura 22. *Southern blotting* com DNA genômico de *C. tropicalis*. Digestão com 1: *EcoR* I, 2: *EcoR* V, 3: *Hind* III, utilizando *XYL2* como sonda.

3.4. Padrão de Expressão do gene *XYL2*

O experimento de *Northern blotting* foi realizado com a finalidade de analisar a regulação da expressão do gene *XYL2* em nível transcricional com diferentes fontes de carbono. Para o experimento, utilizou-se RNA total de *C. tropicalis* extraído de células crescidas em xilose, glicose e glicerol. O gene *XYL2*, produto da reação de PCR com os *primers* 5xyl2 e 3xyl2, foi utilizado como sonda para detecção do mRNA durante a hibridação.

Como mostrado na Figura 23, foram detectados transcritos em células crescidas em glicerol e xilose, sendo que em xilose houve maior intensidade e em glicose não houve detecção, mesmo contendo maior quantidade de RNA total. Esses resultados sugerem que a expressão de *XYL2* é adaptativa uma vez que xilose é capaz de induzir a expressão em comparação a glicerol, já a falta de transcritos em glicose pode ser um indicativo da repressão mediada por Mig1p, encontrada na região promotora.

O mesmo padrão de expressão foi observado para *XYL2* de *H. jecorina* (SEIBOTH *et al.*, 2003) e de *A. adenivorans* (BÖER *et al.*, 2005) além de outros dois genes, xilose redutase e xilulose 5-fosfato quinase, envolvidos no metabolismo de xilose em *A. niger* (HASPER *et al.*, 2000 e van PEIJ *et al.*, 1998).

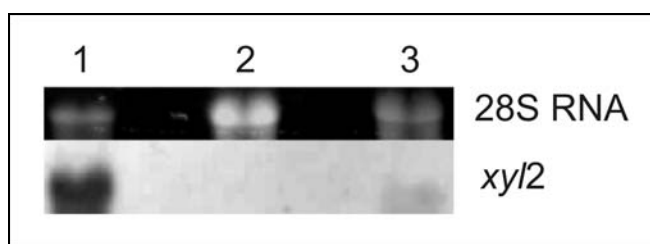


Figura 23. Análise da expressão de *XYL2* por *Northern blotting* em diferentes fontes de carbono. 1: xilose, 2: glicose e 3: glicerol utilizando *XYL2* como sonda, RNA ribossômico 28s como controle da quantidade de RNA total utilizada.

Os resultados obtidos relacionados ao gene *XYL2*, como a seqüência completa obtida através da estratégia de PCR inverso, o número de cópias no genoma, o padrão de expressão e alguns dados gerados a partir da seqüência

primária predita foram apresentados no XXIII Congresso Brasileiro de Microbiologia, Santos – SP em novembro de 2005.

3.5. Análise da Proteína Predita

A partir da seqüência de nucleotídeos foi predita a seqüência primária da proteína (

Figura 19), chamada de Xyl2, que permitiu diversas análises que corroboraram sua atividade como xilitol desidrogenase. Estes resultados foram gerados no Laboratório de Biofísica, sob orientação da Profa. Sonia Maria de Freitas e com a participação do seu aluno Cristiano Guimarães do Amaral Pinheiro.

Inicialmente a seqüência foi alinhada com a seqüência de outras desidrogenases, conforme apresentado na Figura 24. A proteína que apresentou maior homologia foi a sorbitol desidrogenase humana - hSDH (EC 1.1.1.14) com 55% de homologia. A estrutura tridimensional desta enzima foi resolvida por cristalografia de raios-X e o arquivo de coordenadas atômicas está depositado no banco de dados do PDB com as seguintes denominações, PDB ID: 1PL6, 1PL7 e 1PL8. Esta enzima catalisa a oxidação do sorbitol a frutose usando NAD^+ como coenzima (PAULY *et al.*, 2003), semelhante a xilitol desidrogenase que catalisa a oxidação do xilitol formando xilulose, utilizando a mesma coenzima. Nas desidrogenases, como na proteína Xyl2, são encontrados aminoácidos conservados que se ligam aos complexos NAD^+/NADH ou $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ e outros que se ligam a sítios de ligação a zinco. A enzima cetona redutase - KR (EC 1.1.1.184), uma álcool desidrogenase de cadeia média – família MDR, que utiliza o NADP^+ , apresenta dois sítios de ligação para o zinco (BANFIELD *et al.*, 2001). Estes sítios estão apresentados na Figura 24.

A maioria dos aminoácidos envolvidos no sítio de ligação da coenzima, mostrados na Figura 24 com um asterisco, são conservados. Um destes resíduos é fundamental para determinar a especificidade da enzima por NAD^+ (Asp) ou por NADP^+ (Ala). O resíduo Asp²⁰⁷ em Xyl2, equivalente ao Asp²⁰³ na hSDH (Figura 24), é conservado entre os membros da família MDR, faz uma ligação de

hidrogênio com o anel ribosídico do NAD⁺ (Figura 28B). A cadeia lateral deste aminoácido ocupa o espaço correspondente ao grupo fosfato que está ligado à região 2'hidroxila do NAPDH⁺ (Figura 28B). A presença deste aminoácido nesta região estrutural é responsável por um potencial eletrostático negativo no sítio de ligação ao NAD⁺ (PAULY et al., 2003).

XYL2	---MTANPSLVLNKVVDDISFEEYEAPKLESPRDVIVEVKKTGICGSDIHYYAHGSGIGPF	56
pdb 1PL8 D	AAAAKPNLNSLVVHGPGLRLENYPIPEP-GPNEVLLRMHSVVICGSDVHYWEYGRIGNF	55
pdb 1PL6 D	AAAAKPNLNSLVVHGPGLRLENYPIPEP-GPNEVLLRXHSVVICGSDVHYWEYGRIGNF	55
pdb 1E3J A	---MASDNL SAVLYKQNDLRLEQRPIPEP-KEDEVLLQ MAYVICGSDVHYEHGR IADF	56
pdb 1RJW D	-----MKA AVVEQFKEPLKI KEVEKPTI-SYGEVLVRIKACGVCHTDLHAAHG--DWPV	51
pdb 1LLU H	MTLPQTMKAAVVHAYGAPLRIEEVKVP LP-GPGQVLVKIEASGVCHTDLHAAEG--DWPV	57
XYL2	ILRKP MVLGHEASGVSAVGSSEVNLKVGDRVAIEPG-VPSRFSDETKSGHYHLCPHMSF	115
pdb 1PL8 D	IVKKPMVLGHEASGTVEKVGSSVKHLKPGDRVAIEPG-APRENDEFCKMGRYNLSPSIF	118
pdb 1PL6 D	IVKKPXVLGHEASGTVEKVGSSVKHLKPGDRVAIEPG-APRENDEFCKXGRYNLSPSIF	118
pdb 1E3J A	IVKDP MVLGHEASGT VVKVGNV KHLKKGDRVAIEPG-VGRRGQFQKKEGKYNLCPDLTF	115
pdb 1RJW D	KPKLPLIPGHEGVGIVEEVGPGVTHLKVGDVRGIPWLYSACGHCDYCLSGGETLCEHQKN	111
pdb 1LLU H	KPPLPFI PGHEGVGVAAVGSVTRVKEGDRVGI PWLYTACGCCHECLTGWETLCEQQN	117
XYL2	AATPPVNPDEPNPQGTLCCKYRVPDCLFLKLPDHVSL ELGAMVEPLTVGVH-GCKLADLK	174
pdb 1PL8 D	CATP---PDD---GNLCRFYKHNAAFICYKLPDNVTFEEGALIEPLSVGIH-ACRRGGVT	17C
pdb 1PL6 D	CATP---PDD---GNLCRFYKHNAAFICYKLPDNVTFEEGALIEPLSVGIH-ACRRGGVT	17C
pdb 1E3J A	CATP---PDD---GNLARYVHAADFCHKLPDNVSL EEGALLEPLSVGVH-ACRRAGVQ	167
pdb 1RJW D	AGYS-----VDGGYAEYCRAADYVVKIPDNLSFEEAAPIFCAGVTTYKALKVTGAK	163
pdb 1LLU H	TGYS-----VNGGYAEYVLADPNYVGI LPKNVEFAEIAPI LCAGVTVYKGLKQTNAR	165
XYL2	FGEDVVVFGAGPVGLLTAAVARTIGAKRVMVVDIFDNKLMKMAKMGAAATHIFNS---KTG	231
pdb 1PL8 D	LGHKVLVCGAGPIGMVTL LVAKAMGAAQVVVTDLSATRLSKAKEIGADLVLQIS--KESP	228
pdb 1PL6 D	LGHKVLVCGAGPIGXVTL LVAKAXGAAQVVVTDLSATRLSKAKEIGADLVLQIS--KESP	228
pdb 1E3J A	LGTTVLVIGAGPIGLVSVLAAKAYG-AFVVCTARS PRRLEVAKNCGADVTLVVDPAKEEE	226
pdb 1RJW D	PGEWVAIYIGGLGHVAVQYAKAMG-LNVVAVDIGDEKLELAKELGADLVVNP L----K	217
pdb 1LLU H	PGQWVAISGIGGLGHVAVQYARAMG-LHVA AIDIDDAKLELARKLGASLTVNAR----Q	223
XYL2	GDYQDLIKSFDGVQPSVVL ECGAQPC IYMGVKILKAGGRFVQIGNAGGDVNFP IADFST	291
pdb 1PL8 D	QEIARKVEGQLGCKPEVTIECTGAEASIQAGIYATRSGGTLVLVGLGSEMTTVP LLHAAI	288
pdb 1PL6 D	QEIARKVEGQLGCKPEVTIECTGAEASIQAGIYATRSGGTLVLVGLGSEXTTVP LLHAAI	288
pdb 1E3J A	SSI IERISAI GDLPNVTIDCSGNEK CITIGINI TRTGGTLMVLGMSQMVTVP LVNACA	286
pdb 1RJW D	EDAAKFMKEKVGVAHVAVTAVS-KPAFQSAYNSIRGGACVLVGLPPEEMPIPIFDTVL	276
pdb 1LLU H	EDPVEAIQRDIGGAGHVLVTAVS-NSAFGQAI GMARRGGTIALVGLPPGFPTPIFDVVL	282
XYL2	RELALYGSFRYGYGDYQTSIDILDRNVYNGKDKAPINFELLITHRFKFKDAIKAYDLVRA	351
pdb 1PL8 D	REVDIKGVFRYCN-TWPVAISMLASKSVN-----VKPLVTHRFPLEKALEAFETFKK	339
pdb 1PL6 D	REVDIKGVFRYCN-TWPVAISXLASKSVN-----VKPLVTHRFPLEKALEAFETFKK	339
pdb 1E3J A	REIDIKSVFRYCN-DYPIALEMVASGRCN-----VKQLVTHSFKLEQTVDAFEAARK	337
pdb 1RJW D	NGIKIIGSIVGTRKDLQEQALQFAAEGKVK-----TIEVQPLEKINEVDFRMLK	325
pdb 1LLU H	KGLHIAGSIVGTRADLQEQALDFAGEGLVK-----ATIHPGKLDIDINQILDQMRA	331
XYL2	GNG-AVKCLIDGPE----- 364	
pdb 1PL8 D	GLG--LKIMLKCDPSDQNP 356	
pdb 1PL6 D	GLG--LKIXLKCDPSDQNP 356	
pdb 1E3J A	KADNTIKVMISCRQG---- 352	
pdb 1RJW D	GQINGRVVLTLEDK---- 339	
pdb 1LLU H	GQIEGRIVLEM----- 342	

Figura 24. Alinhamento entre a seqüência da proteína Xyl2 e membros da família de cadeia média que possui sítio de ligação a zinco. Os aminoácidos dentro do quadrado hachurado representam a assinatura das álcool desidrogenases, os resíduos envolvidos do sítio catalítico ligado a zinco são indicados por setas, O segundo sítio de ligação a zinco da 1E3J está dentro de quadrado e os resíduos que estão envolvidos no sítio de ligação da coenzima são indicados por asteriscos.

A seqüência da Xyl2, conforme apresentado na Figura 24, apresenta a assinatura [GHE]xx[G]xxxxx[G]xx[V] das álcool desidrogenase, o sítio de ligação para o zinco (Cys⁴¹, His⁶⁶, Glu⁶⁷, e Glu¹⁵⁹) e o sítio de ligação para o NAD⁺ (Val¹⁸⁷, Asp²⁰⁷, Lys²¹², Cys²⁵², Asn²⁷⁷ e Ser²⁹⁹). Estas características estruturais foram consideradas para a classificação da Xyl2 como um membro da família MDR.












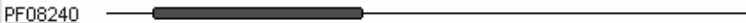



SEQUENCE: Sequence 1 CRC64: 8780671461AFD5DD LENGTH: 364 aa	
InterPro IPR000205 Binding_site 	IIAD-binding site PS50205  NAD_BINDING
InterPro IPR002085 Family 	Alcohol dehydrogenase superfamily, zinc-containing PTHR11695  ALCOHOL DEHYDROGENASE-RELATED
InterPro IPR002328 Family 	Alcohol dehydrogenase, zinc-containing PS00059  ADH_ZINC
InterPro IPR011032 Domain 	GroES-like SSF50129  GroES-like
InterPro IPR013149 Domain 	Alcohol dehydrogenase, zinc-binding PF00107  ADH_zinc_N
InterPro IPR013154 Domain 	Alcohol dehydrogenase GroES-like PF08240  ADH_N
no IPR unintegrated	unintegrated G3D.3.90.180.10  no description PTHR11695:SF91  SORBITOL DEHYDROGENASE SSF51735  NAD(P)-binding Rossmann-fold domains

Figura 25. Elementos estruturais encontrados na seqüência de Xyl2 e sua localização, segundo análise no InterPro.

Pela análise no InterPro (InterPro - Integrated Resource Of Protein Domains And Functional Sites - Copyright (C) 2001 The InterPro Consortium), utilizando a seqüência de aminoácidos predita, foram identificadas as seguintes características estruturais (Figura 25): sítio de ligação ao NAD com o padrão de dobramento do tipo Rossmann fold, domínio de ligação ao zinco da família das álcool desidrogenase e o domínio GroES-like. A presença destes domínios reforça os resultados obtidos pela análise da seqüência a partir do alinhamento. A Xyl2 utiliza preferencialmente NAD⁺ como cofator (TAKAMIZAWA et al., 2000) e é membro da família das enzimas do tipo álcool desidrogenases. O domínio GroES-like é comumente encontrado na porção N-terminal das proteínas desta família, que também apresentam um domínio com padrão de dobramento do tipo Rossmann-fold no C-terminal.

3.5.1 Participação de Zinco na Catálise

Geralmente, o meio de reação para medir a atividade de XDH não possui zinco (TAKAMIZAWA, *et al.* 2000; ELIASSON *et al.* 2000; LIMA *et al.*, 2004), provavelmente porque este íon se complexa com a enzima mantendo-se ligado após a extração. Diante deste fato, para comprovar a participação de zinco na reação de catálise, realizou-se o ensaio enzimático com EDTA, um quelante de íons divalentes. O efeito do EDTA foi acompanhado pela absorbância a 340nm que correspondente à redução do NAD⁺ (Figura 26A). Observa-se na Figura 26B que 1 mM de EDTA é capaz de reduzir a atividade em ~90%, indicando sua competição pelo zinco complexado com a enzima. O mesmo comportamento foi observado para XDH de *G. mastotermitis*, uma enzima zinco dependente (LUNZER *et al.*, 1998).

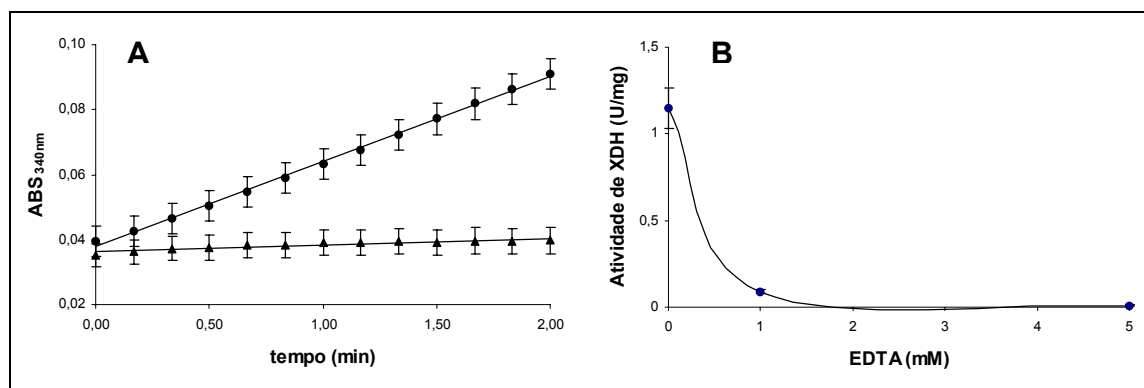


Figura 26. Efeito do EDTA na atividade de Xyl2. A: Acompanhamento da redução de NAD⁺ (340 nm) na ausência (círculos) ou na presença de EDTA 1mM (triângulos). B: Atividade de XDH em diferentes concentrações de EDTA.

3.6. Modelagem de Xyl2

O modelo tridimensional de Xyl2, apresentado na Figura 27, foi obtido pelo método de modelagem molecular por homologia, realizado pelo servidor EsyPred 3D. A estrutura de Xyl2 possui 364 resíduos de aminoácidos organizados em um padrão de dobramento do tipo α/β *Rossmann fold*, comumente encontrado em proteínas da família MDR. Todas as enzimas desta família se ligam a NAD⁺ ou NADP⁺, no mesmo sítio e a maioria contém um íon de zinco ligado, o que é essencial para catálise. Na Xyl2, o domínio de ligação à coenzima apresenta as características deste padrão α/β *Rossmann fold*. O modelo consiste de dois motivos β -barril que correspondem aos domínios catalítico (resíduos 1-162, 301-364) e ao domínio de ligação à coenzima (resíduos 163-300), separados por uma fenda (Figura 27).

Os modelos de Xyl2 ligada a NAD⁺ e ao íon zinco foram obtidos por sobreposição de estruturas apresentando o NAD⁺ ligado e estão apresentados na Figura 28. Estes domínios apresentaram padrão estrutural bastante similar aos das álcool desidrogenases relacionadas a família MDR. A análise dos alinhamentos estruturais desses domínios, obtidos pelo VAST, confirmou a similaridade estrutural dos modelos devido aos baixos valores de r.m.s.d (desvios de mínimos quadrados) de 0.5-1.2 Å (NAD⁺) e 0.3-2.0 Å (zinco).

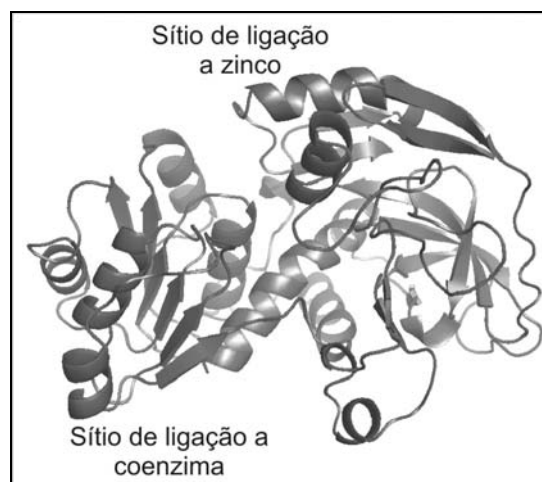


Figura 27. Modelo tridimensional de Xyl2 gerado pelo programa Pymol.

A interação com NAD^+ em Xyl2 ocorre na superfície da fenda formada pelas alças que saem do alto das seis folhas β , um domínio formado pelos resíduos 180 a 310 (Figura 28A e B). Os resíduos que fazem parte desta ligação são Val¹⁸⁷, Asp²⁰⁷, Lys²¹², Cys²⁵², Asn²⁷⁷ e Ser²⁹⁹. Entre as desidrogenases existem poucas diferenças nos aminoácidos que formam o sítio de ligação à coenzima. O resíduo de ácido aspártico, que determina a especificidade por NAD^+ nos membros da família MDR, é conservado na Xyl2 na posição 207 (Fig. 3 e 5B). A especificidade de Xyl2 por NAD^+ foi anteriormente determinada por ensaios enzimáticos por SILVA et al. (1996) e TAKAMIZAWA *et al.* (2000).

O domínio catalítico de Xyl2 apresenta um único sítio de ligação para o zinco e apresenta um dobramento α/β semelhante ao das proteínas da família MDR. A ligação ao íon de zinco ocorre na região próxima à fenda entre os dois domínios. Os resíduos conservados que participam desta interação em hSDH são Cys⁴⁴, His⁶⁹, Glu⁷⁰, Glu¹⁵⁵ e uma molécula de água (PAULY et al., 2003). Na Xyl2 o íon de zinco apresenta uma coordenação com os resíduos His⁶⁶, Glu⁶⁷, e Glu¹⁵⁹. A molécula de água que participa desta interação não foi evidenciada neste modelo, uma vez que este modelo foi obtido após a minimização de energia sem a presença da água (Figura 28C e D). Neste caso, a ponte de hidrogênio entre Glu¹⁵⁹ e o átomo de zinco ocorre diretamente sem a participação da cisteína.

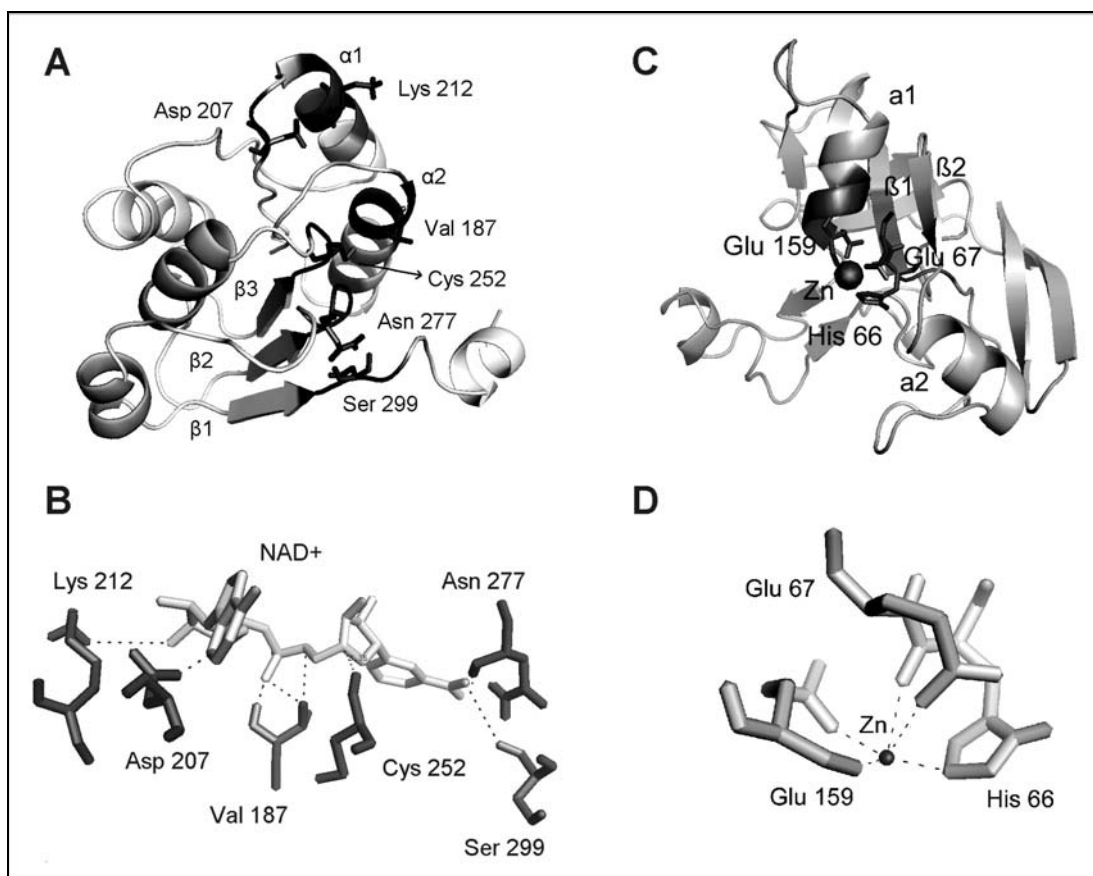


Figura 28. Estrutura terciária predita dos domínios de ligação a NAD^+ e zinco. A: Domínio de ligação ao NAD^+ com o sítio de ligação em cinza escuro, composto por motivos α e β em um padrão *Rossmann fold*; B: sítio de ligação à coenzima, destacando os resíduos que participam da interação Val¹⁸⁷, Asp²⁰⁷, Lys²¹², Cys²⁵², Asp²⁷⁷ e Ser²⁹⁹; C: Domínio de ligação do sítio ativo representado pelo resíduos em cinza escuro; D: sítio ativo ligado a zinco destacando os resíduos que participam da interação His⁶⁶, Glu⁶⁷ e Glu¹⁵⁹.

As similaridades estruturais entre as proteínas da mesma família da Xyl2 e entre os domínios que formam estas estruturas foram calculados pelo programa VAST (GIBRAT *et al.*, 1996). As principais semelhanças estruturais evidenciadas pela sobreposição de modelos do C_α e dos valores de r.m.s.d. estão apresentadas na Tabela 8. A maior similaridade estrutural foi observada com a hSDH/ NAD^+ , com o complexo hSDH/ NADH /inibidor e com a KR, indicada pelos valores do r.m.s.d. de 0.6-0.8 Å. A menor similaridade foi observada para a ADH de *Bacillus stearothermophilus* e para a ADH NAD^+ /substrato de *Pseudomonas aeruginosa*, com r.m.s.d. of 1.7 Å.

Estes resultados também sugerem que o sítio de ligação a NAD⁺ e o sítio de ligação ao zinco mantém o arranjo tridimensional e as distâncias requeridas para interação destes componentes. Baseado na similaridade estrutural destes modelos, foi proposto que a Xyl2 é um membro da família MDR e, portanto, pode apresentar a mesma função catalítica dos membros desta família.

Tabela 8. Identidade e semelhança estrutural da Xyl2 com outras enzimas desidrogenase.

Código PDB	Proteínas	Identidade (%)	Resíduos Conservados (%)	RMSD
1PL8-D	hSDH/NAD ⁺ (PAULY et al., 2003)	36	55	0.6
1PL6-D	hSDH/NADH/Inhibitor complex (PAULY et al., 2003)	36	54	0.6
1E3J-A	KR (Bemisia Argentifolli) (BANFIELD et al., 2001)	36	55	0.8
1RJW-B	ADH (Bacillus stearothermophilus) (CECCARELLI et al., 2004)	27	43	1.7
1LLU-H	NAD ⁺ /substrate ADH (Pseudomonas aeruginosa) (LEVIN et al., 2004)	24	39	1.7

4. Expressão de *XYL1* e *XYL2* em *S. cerevisiae*

Com a finalidade de verificar a funcionalidade dos genes *XYL1* e *XYL2* de *C. tropicalis*, os mesmos foram clonados nos vetores de expressão YEp351PGK (MORAES *et al.*, 1995) e YEp352PGK (Figura 29) sob a regulação do promotor PGK1. Os vetores YEp351PGK e YEp352PGK são derivados dos vetores episomais YEp351 e YEp352 (HILL *et al.*, 1986) e possuem o cassete de expressão PGK do vetor pMA99. A principal vantagem de vetores episomais em relação ao integrativo é o alto número de cópias (UGOLINI *et al.*, 2002) e, no caso dos vetores YEp351PGK e YEp352PGK, a presença do promotor PGK1 favorece a expressão forte e constitutiva de genes heterólogos.

Os genes *XYL1* e *XYL2* foram obtidos da digestão de Topoxyl1 com *Bgl* II e pGEMXyl2 com *Bam*H I, respectivamente, e clonados nos plasmídios YEp351PGK e

YEp352PGK linearizados com *Bgl* II, gerando os plasmídios YPGKxyl1 e Y2PGKxyl2. A orientação correta no vetor YPGKxyl1 foi verificada por digestão com *Bam*H I e *Nco* I, enquanto no vetor Y2PGKxyl2 a orientação foi verificada por digestão com *Eco*R V (dados não mostrados). A *S. cerevisiae* linhagem RE1006 foi transformada com o vetor sem inserto (YEp352PGK), como controle, YPGKxyl1, Y2PGKxyl2 e com ambos (YPGKxyl1 + Y2PGKxyl2). Após a transformação, a presença do inserto foi confirmada com reações de PCR utilizando os *primers* 5xyl1A e 3xyl1 para amplificar *XYL1* e os *primers* 5xyl2 e 3xyl2 para *xyl2*, os resultados estão apresentados na Figura 30.

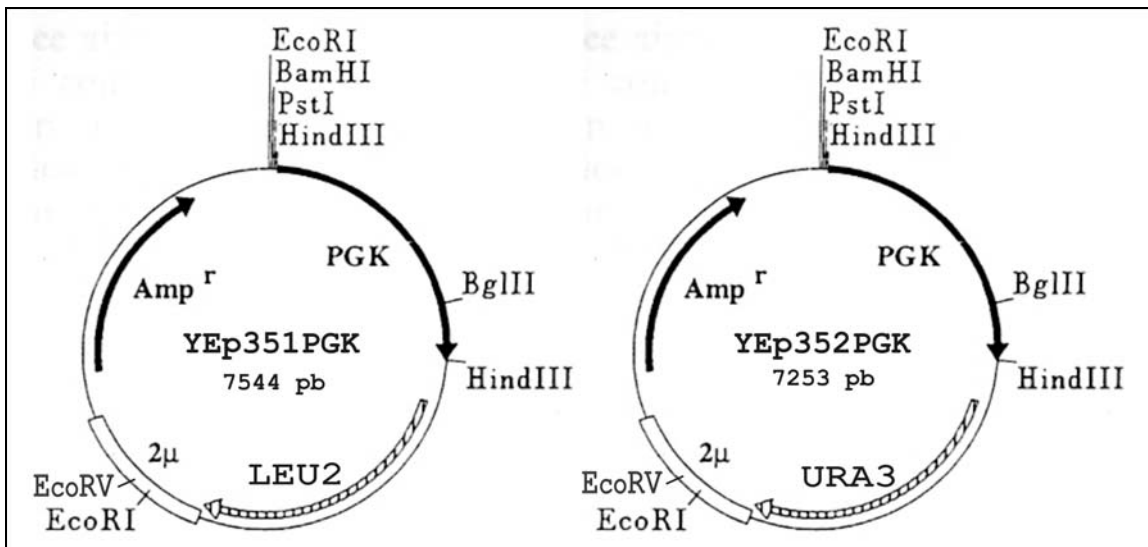


Figura 29. Mapa dos vetores YEp351PGK e YEp352PGK.

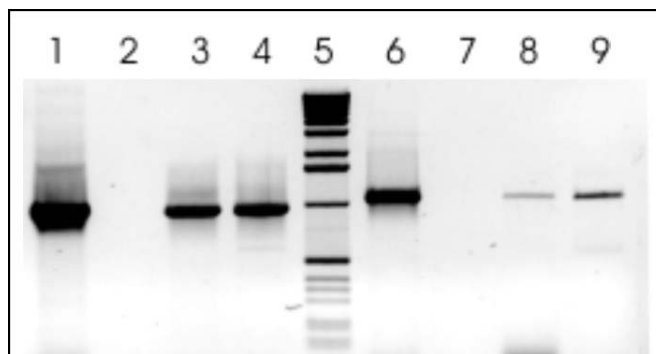


Figura 30. Reações de PCR para confirmação da clonagem de *XYL1* (1-4) e *XYL2* (6-9) em vetores de expressão de *S. cerevisiae* analisadas em gel de agarose 1%. 1 e 6: controle, 2 e 7: YEp352PGK, 3: YPGKxyl1, 4 e 9: YPGKxyl1 + Y2PGKxyl2, 5: marcador 1 kb DNA ladder (Invitrogen), 8: Y2PGKxyl2.

Os clones selecionados, um de cada transformação, foram semeados em placas com os seguintes meios seletivos: meio mínimo contendo xilose como fonte de carbono e todos os aminoácidos requeridos pela linhagem, onde todos os clones cresceram (dado não mostrado); meio mínimo sem uracila, onde cresceram os clones contendo os vetores YEp352PGK, Y2PGKxyl2 e YPGKxyl1 + Y2PGKxyl2; meio mínimo sem leucina, onde cresceram os clones YPGKxyl1 e YPGKxyl1 + Y2PGKxyl2; e meio mínimo sem uracila e sem leucina onde cresceu apenas o clone YPGKxyl1 + Y2PGKxyl2 (Figura 31). Todos os transformantes de *S. cerevisiae* foram capazes de metabolizar xilose porque esta levedura, apesar de ser classificada como organismo que não utiliza xilose, possui enzimas que possibilitam metabolizar este açúcar (TOIVARI *et al.*, 2004).

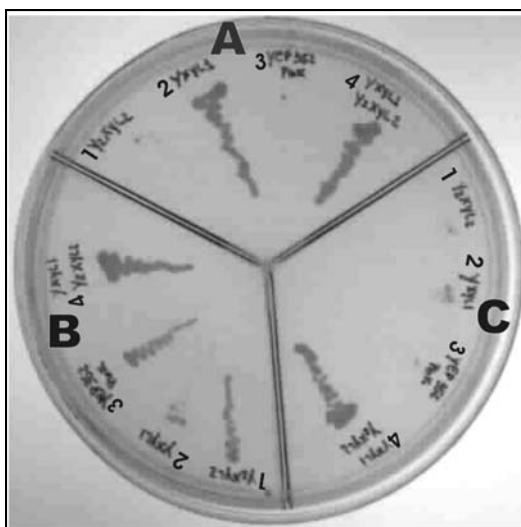


Figura 31. Clones transformantes de *S. cerevisiae* expressando os genes *XYL1* e *XYL2*. 1: Y2PGKxyl2, 2: YPGKxyl1, 3: YEp352PGK e 4: YPGKxyl1 + Y2PGKxyl2 em A: meio mínimo sem leucina, B: meio mínimo sem uracila, C: meio mínimo sem uracila e leucina).

As atividades de XR e XDH medidas para os clones contendo os vetores YEp352PGK (controle), YPGKxyl1, Y2PGKxyl2 e YPGKxyl1 + Y2PGKxyl2 estão apresentadas na Tabela 9. Observou-se que como houve aumento da atividade enzimática em relação ao controle, tanto de XR como de XDH, ocorreu a expressão dos genes *XYL1* e *XYL2*, apresentando valores de atividade para XR superior ao encontrado para a própria *C. tropicalis* (0,173 U/mg), porém inferior para XDH (0,237

U/mg) (LIMA *et al.*, 2004). A atividade de XDH pode ser comparada à atividade encontrada em extrato bruto de *P. tannophilus* (0,140 U/mg) obtida por BOLEN *et al.* (1986).

ELIASSON *et al.* (2000) expressando *XYL1* e *XYL2* de *P. stipitis* em *S. cerevisiae* obteve 0,52 U/mg para XR e 3,37 U/mg para XDH, porém o vetor utilizado foi integrativo e *XYL1* estava sob controle do promotor/terminador ADH1, enquanto *XYL2* estava sob o controle do promotor/terminador PGK1. Outra distinção foi a fermentação, o meio de cultura continha glicose (10 g/L) e xilose (10 g/L) em condições anaeróbicas e além disto o meio de reação para o cálculo de atividade era diferente do utilizado neste trabalho. JEPPSON *et al.* (2003) utilizando esta mesma linhagem de *S. cerevisiae* (TMB3001) obteve 0,32 U/mg para XR e superexpressando *XYL1*, a partir de uma construção que emprega o sistema *Cre/loxP* de recombinação, alcançou 6,07 U/mg. Comparativamente, a atividade obtida para o clone expressando *XYL1* é cerca de 5 vezes maior, indicando que esta construção poderia ser utilizada para produção de etanol sem a necessidade de superexpressão, pois os vetores episomais podem chegar a mais de 70 cópias por célula (UGOLINI *et al.*, 2002). Porém a construção de uma linhagem mais estável com um vetor integrativo talvez fosse recomendável para estabelecer comparações.

Tabela 9. Atividade específica de xilose redutase (XR) e xilitol desidrogenase (XDH) para os clones de *Saccharomyces cerevisiae*: YEp352PGK (controle); YPGKxyl1, Y2PGKxyl2 e YPGKxyl1 + Y2PGKxyl2.

Vetor usado na transformação	Atividade Específica (U/mg de proteínas totais)	
	XR	XDH
YEp352PGK	0,009	0,018
YPGKxyl1	1,519	n.d.
Y2PGKxyl2	n.d.	0,159
YPGKxyl1 + Y2PGKxyl2	0,772	0,068

n.d.: não determinado

5. Transformação de *C. tropicalis*

5.1. Marca de Seleção para o Sistema de Transformação

Inicialmente propôs-se utilizar o gene que confere resistência a higromicina B (higromicina fosfotransferase) como marca de seleção para o sistema de transformação, porém, com a constatação de que a levedura *C. tropicalis* traduz um códon universal de leucina (CTG) como serina, esta possibilidade foi descartada, pois este gene possui 8 códons CTG e 1026 pb.

Outra possibilidade seria a utilização de uma marca auxotrófica. Tentou-se gerar mutantes *ura3⁻* seguido de seleção em 5-FOA, como utilizado por HAAS *et al.* (1990). Porém nem tratamento com agente mutagênico EMS (etil-metano sulfonato), nem exposição à radiação UV geraram mutantes *ura3⁻*, possivelmente pelo fato desta levedura apresentar dois alelos do gene *ura3* (HAAS *et al.*, 1990), além de ser diplóide (DOI *et al.*, 1992), necessitando assim de pelo menos quatro eventos de mutação.

Contudo, com a publicação de um trabalho descrevendo a transformação de *C. tropicalis* utilizando um vetor com a marca de resistência a aureobasidina A (LEE *et al.*, 2003) decidiu-se optar por esta abordagem. Para atingir esse fim, foi obtido o vetor PYC070 descrito por HANSEN *et al.* (2003) a partir do qual o gene AUR1-C seria isolado por digestão com enzima de restrição para depois ser clonado internamente na seqüência do gene *XYL2*, porém devido à indisponibilidade de aureobasidina A esta estratégia também foi abandonada.

Assim sendo, considerou-se utilizar o gene de resistência a zeocina, gene *ble* de *S. hindustanus*, que possui apenas cinco códons CTG e 374 pb. Estes códons poderiam ser corrigidos por mutação sítio-dirigida em conjunto com estratégias de recombinação e reparo em *S. cerevisiae*, porém optou-se por sintetizar todo o gene substituindo os códons CTG por TTG, que é o preferencial para leucina em *C. tropicalis*. Esta abordagem já foi utilizada por WANG *et al.* (2006) para estabelecer um sistema de integração para a levedura *Pichia farinosa*.

O gene sintético, ZeoCan, teve seu códon preferencial adequado a *C. tropicalis* e o conteúdo de CG foi otimizado para 48%. Antes do códon de iniciação ATG, foi adicionado um contexto Kozac (ATAA) de levedura para assegurar a eficiente iniciação de tradução. Além disto, foram inseridos no início e no final da seqüência sítios de *BamH* I, para facilitar a clonagem em vetores de expressão. Um sítio para *Nco* I foi introduzido na porção 5' do gene a fim de permitir a seleção de clones com a orientação desejada no vetor de expressão. O gene ZeoCan foi sintetizado *de novo* pela empresa *Epoch Biolabs* (Texas, EUA) e enviado clonado no vetor pBlueScript SK (Stratagene). A seqüência do gene ZeoCan está apresentada na Figura 32 e suas características são:

- Códon preferencial de *C. tropicalis*
- Identidade de 75,2% com a região codante original
- Modificação de 5 codons de leucina para TTG
- Remoção de um sítio de *Sma* I original
- Introdução de um sítio de *Nco* I na posição 103 que permite verificar a orientação da clonagem
- Sítios de *BamH* I nas extremidades 5' e 3'
- Redução do conteúdo de G+C de 70% para 48%
- Introdução de um contexto Kozak de levedura perto do ATG

```

M A K L T S A V P V L T A R D V A G A V E F W T D R L
CGGATCCATAATGGCTAAGTTGACCTCCGCTGTTCCAGTTTTGACCGCTAGAGACGTTGCTGGTGTGTAATTTGGACCGACAGATTG 91
BamHI
G F S R D F V E D D F A G V V R D D V T L F I S A V Q D Q V
GGTTTCTCCAGAGACTTCGTTGAAGACGACTTCGCTGGTGTGTTAGAGACGACGTTACCTTGTTCATTTCCGCTGTTCAAGACCAAGTT 181
V P D N T L A W V W V R G L D E L Y A E W S E V V S T N F R
GTCCAGACAACACCTTGGCTTGGGTTTGGGTTAGAGGTTTGGACGAATTGTACGCTGAATGGTCCGAAGTGTTCACCAACTCAGA 271
D A S G P A M T E I G E Q P W G R E F A L R D P A G N C V H
GACGTTCCGGTCCAGCTATGACCGAAATTGGTGAACAACCATGGGGTAGAGAATTTGCTTTGAGAGACCCAGCTGGTAAGTGTGTTTCC 361
NcoI
F V A E E Q D -
TTCGTTGCTGAAGAACAAGACTGAGGATCCG 392
BamHI

```

Figura 32. Seqüência do gene ZeoCan sintetizado *de novo*, ressaltando os sítios de *BamH* I e *Nco* I (em negrito) e a localização dos códons CTG substituídos por TTG (sublinhado).

Para o estabelecimento da concentração ideal de antibiótico para a seleção de transformantes, as leveduras *C. tropicalis*, *C. guilliermondii*, *Candida maltosa* e *P. stipitis* foram plaqueadas em meio YM (pH 7,5) contendo zeocina em diferentes concentrações de 100, 200, 300, 400 e 500 µg/mL. Foi observado que este antibiótico é letal para *C. tropicalis* em concentrações acima de 300 µg/mL e para *C. guilliermondii* acima de 200 µg/mL (Tabela 10). Porém como observado por TANG *et al.* (2003) para *C. rugosa* e MOORE (1982) para *S. cerevisiae*, a densidade celular interfere na efetividade deste antibiótico. Variando a quantidade de células inoculadas, observou-se que tanto para *C. guilliermondii*, como para *C. tropicalis* a densidade celular ideal é de $1,0 \cdot 10^6$ células/mL, uma vez que nenhuma colônia foi obtida após 72 h de incubação a 30°C, nas concentrações de zeocina mencionadas anteriormente.

Tabela 10. Avaliação da concentração letal de zeocina em meio YM (pH 7.5) a 30°C para diferentes leveduras.

Levedura	[zeocina] (µg/mL)	Tempo (h)		
		24	48	72
<i>C. tropicalis</i>	100	+	++	++
	200	-	+	+
	300	-	-	-
	400	-	-	-
	500	-	-	-
<i>C. guilliermondii</i>	100	-	-	+
	200	-	-	-
	300	-	-	-
<i>C. maltosa</i>	100	+	+	++
	200	+	+	++
	300	-	+	+
<i>P. stipitis</i>	100	-	+	+
	200	-	+	+
	300	-	-	+

Crescimento celular: - nenhuma colônia, +: menos de 20 colônias, ++: mais de 20 colônias observadas.

5.2. Construção dos cassetes para transformação

5.2.1. Cassete da Marca de Seleção

A fim de possibilitar a identificação de eventos de integração de múltiplas cópias em meio de cultura contendo concentrações crescentes de zeocina, escolheu-se um promotor fraco para regular a expressão do gene ZeoCan. A região promotora escolhida foi a do gene *ACT1* (actina) de *Candida albicans*, um promotor fraco e constitutivo, e a região terminadora de transcrição do gene *CYC1* (Citocromo C) de *S. cerevisiae*, constantes no plasmídeo ClpACT-CYC (BLACKWELL *et al.*, 2003) cedido pelo Dr. Jeremy D. Brown (*University of Newcastle*) (Figura 33).

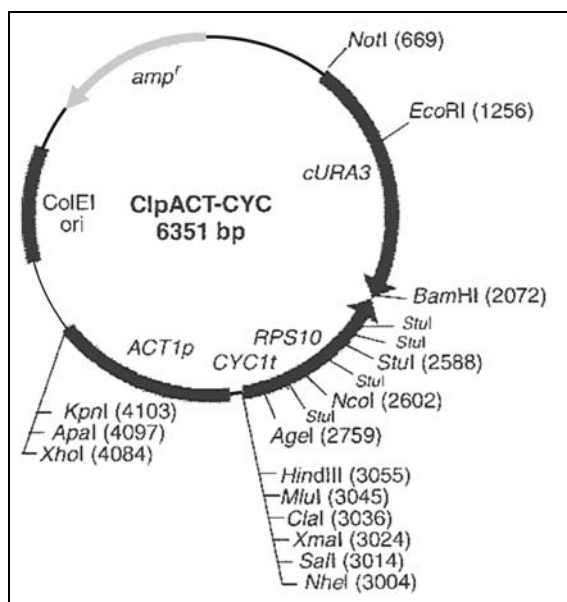


Figura 33. Mapa do plasmídeo ClpACT-CYC.

Para a amplificação das regiões promotora e terminadora de transcrição e para facilitar a construção de um novo cassete de expressão foram utilizados os primers 5PROACT e 3PROACT, contendo sítios de *BamH* I e *Hind* III nas extremidades e de *Bcl* I entre a região promotora e terminadora. O amplicom obtido da reação de PCR utilizando Vent_R[®] DNA Polimerase apresentou o tamanho

esperado conforme apresentado na Figura 34 e foi clonado no vetor pGEM[®]-T Easy (Promega).

Após a transformação em *E. coli* DH5 α , os clones positivos foram selecionados por digestão com a enzima *EcoR* I. Observou-se que quando o plasmídeo fora digerido com as enzimas que possuíam sítio dentro da seqüência dos *primers*, *BamH* I e *Hind* III não houve a liberação do inserto. Mesmo quando o plasmídeo com o inserto foi utilizado para transformar *E. coli* JM110, os padrões de digestão com *BamH* I e *Hind* III correspondiam a linearização, enquanto a digestão utilizando *Bcl* I liberava um fragmento mesmo não havendo sítios no vetor. O seqüenciamento revelou que o fragmento amplificado e clonado tratava-se do gene *URA3* de *C. albicans*, possivelmente pelo anelamento de um dos *primers* nesta região do plasmídeo ClpACT-CYC.

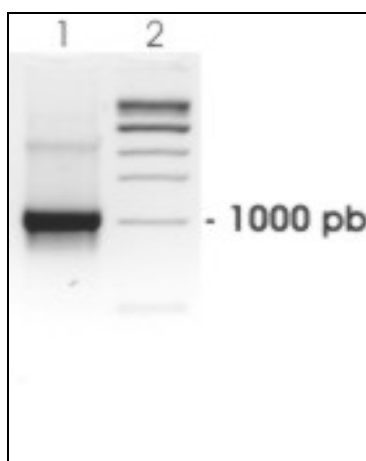


Figura 34. Reação de PCR utilizando os *primers* 5PROACT e 3PROACT analisada em gel de agarose 1%. 1: ClpACT-CYC como molde e 2: 1 kb DNA ladder (New England Biolabs).

Diante deste fato, optou-se por utilizar como molde para reação de PCR apenas a região promotora (ACT1p), obtida da digestão do plasmídeo ClpACT-CYC com as enzimas *Xho* I e *Cla* I. O produto amplificado utilizando os *primers* 5PROACT e 3PROACT foi clonado no vetor pGEM[®]-T Easy (Promega), confirmada a clonagem com a digestão com *EcoR* I, porém a liberação do fragmento com *BamH* I não foi

obtida, apenas a linearização. Supondo que o problema no sítio de *BamH I* estava no primer 3PROACT por ser muito grande (112 mer) e possivelmente por ter havido algum problema durante sua síntese, foi utilizado o primer 3CYCTT junto com o 5PROACT para reamplificar a região promotora e terminadora em uma reação de PCR com o plasmídio como molde. O amplicom obtido foi clonado no vetor pGEM[®]-T Easy (Promega). Confirmada a clonagem com *EcoR I*, o fragmento foi obtido pela digestão com *BamH I*. Depois de passar pela linhagem de *E. coli* JM 110, o plasmídio foi linearizado com *Bcl I*. A cepa JM110 tem a mutação *dam* e, portanto, não metila o sítio de restrição para *Bcl I*. Esta etapa foi necessária uma vez que a enzima *Bcl I* é sensível a metilação em seu sítio (metilação *dam*). O resultado do seqüenciamento do plasmídio PGEMPROACT demonstrou que se tratava da região promotora do gene da actina de *C. albicans* e a região terminadora do gene do citocromo c de *S. cerevisiae*. Esta estratégia está apresentada na Figura 35.

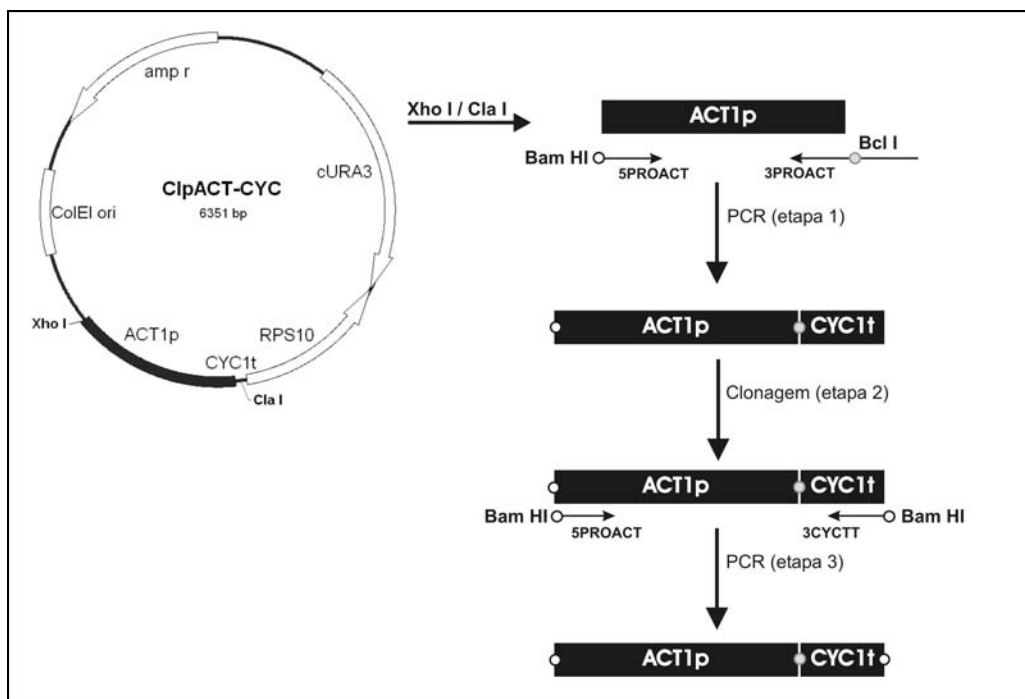


Figura 35. Estratégia para clonagem das regiões promotora (ACT1p) e terminadora (CYC1t) do vetor ClpACT-CYC para a construção de um novo cassete de expressão. Etapa 1: reação de PCR utilizando como molde a banda referente à região promotora obtida pela digestão do plasmídio ClpACT-CYC com as enzimas *Xho I* e *Cla I* e os primers 5PROACT e 3PROACT, etapa 2: clonagem do produto de PCR no vetor pGEM[®]-T Easy, etapa 3: reação de PCR utilizando o plasmídio contendo as regiões ACT1p e CYC1t como molde e os primers 5PROACT e 3CYCTT.

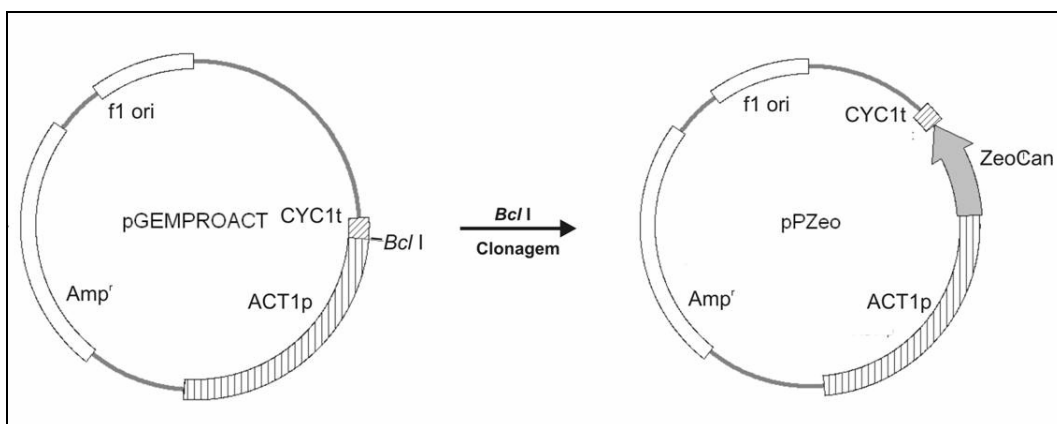


Figura 36. Esquema da construção do cassete de expressão do gene ZeoCan o qual foi clonado no sítio de *Bcl* I entre a região promotora ACT1p e terminadora CYC1t.

Na construção do cassete da marca de seleção, o gene ZeoCan obtido da digestão do plasmídeo com *Bam*H I foi clonado no sítio de *Bcl* I do plasmídeo contendo as regiões promotora e terminadora da transcrição, gerando o plasmídeo pZeo (Figura 36). Para seleção dos clones utilizou-se digestão com *Bam*H I que deveria liberar um fragmento de ~1500 pb (região promotora: 1024 pb, ZeoCan: 392 pb, região terminadora: 80 pb), conforme a Figura 37.

Para selecionar os clones com o gene ZeoCan clonado na orientação correta entre as regiões promotora e terminadora da transcrição, realizou-se uma reação de PCR com a combinação de *primers* 5PROACT/3Zeo que deveria amplificar, caso a orientação estivesse correta e a combinação 5PROACT/5Zeo que amplificaria se o gene estivesse na orientação invertida (Figura 38). O clone selecionado foi digerido com a enzima *Nco* I que por apresentar sítios na seqüência de ZeoCan e no vetor liberou um fragmento de ~190 pb (dados não mostrados).

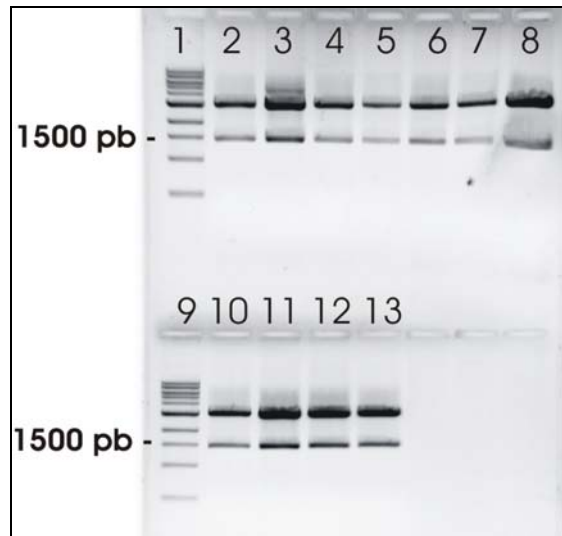


Figura 37. Digestão do plasmídio contendo o cassete da marca de seleção analisada em gel de agarose 1%. 2-8/10-13: plasmídios pPZeo de diferentes clones digeridos com *BamH* I e 1/9: 1 kb DNA ladder (New England Biolabs).

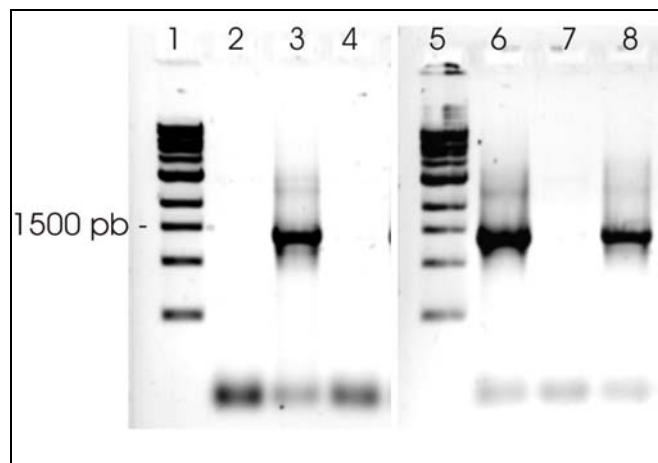


Figura 38. Reações de PCR para selecionar os clones com plasmídio pPZeo na orientação correta analisadas em gel de agarose 1%. 1/5: 1 kb DNA ladder (New England Biolabs), 2-4: reações com os *primers* 5PROACT e 5Zeo, 6-8: reações com os *primers* 5PROACT/3Zeo.

5.2.2. Cassete para Ruptura Gênica de XYL2

5.2.2.1. Marca Dominante

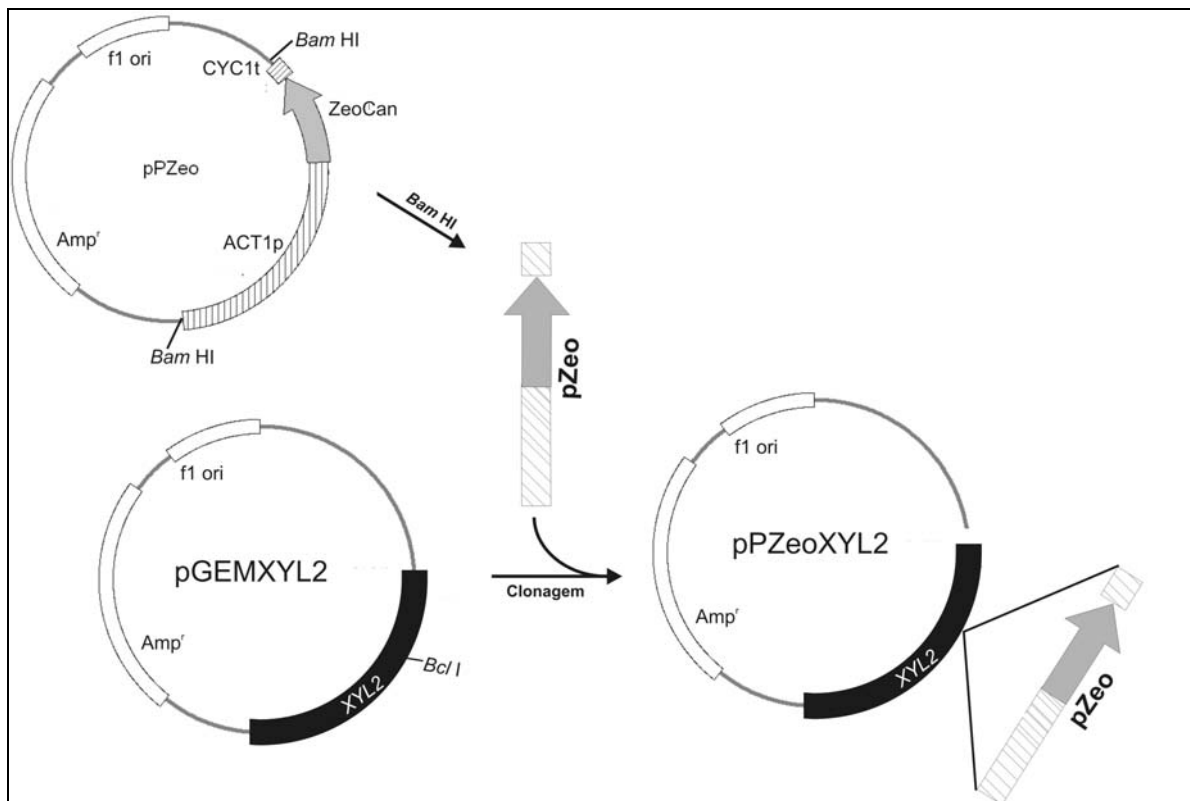


Figura 39. Esquema da construção do cassete de ruptura de *XYL2* (pPZeoxYL2) a partir da obtenção do cassete da marca de seleção pela digestão do plasmídeo pPZeox com *Bam*H I e posterior clonagem no sítio interno de *Bcl* I do gene *XYL2*.

A fim de construir o cassete de ruptura gênica para o gene *XYL2*, o plasmídeo pGEMxYL2, que contém o gene *XYL2* clonado, foi linearizado com *Bcl* I. O cassete da marca de seleção foi retirado com *Bam*H I e então clonado dentro da seqüência de *XYL2* originando o plasmídeo pPZeoxYL2 (Figura 39). Selecionou-se os clones que continham a seqüência pela digestão com *Bam*H I, liberando o fragmento de ~2600 bp (dados não mostrados). O clone selecionado foi confirmado com digestão com *Nco* I, que por possuir sítios na seqüência de *XYL2*, de ZeoCan e no vetor deveria liberar fragmentos de 1990 pb e 550 pb, conforme esquema apresentado na

Figura 40 e resultados na Figura 41. Além disto para confirmar a clonagem e a orientação correta foram utilizadas 5 combinações de *primers* que se anelavam em diferentes regiões do cassete (Figura 40). Conforme a Figura 41, todas as combinações amplificaram produtos nos tamanhos esperados, a saber: 5xyl2/3xyl2 - 2594 pb, 5xyl2/3CYCTT - 2202 pb, 5xyl2/3Zeo - 2130 pb, 5PROACT/3xyl2 - 1874 pb, 5Zeo/3xyl2 - 854pb.

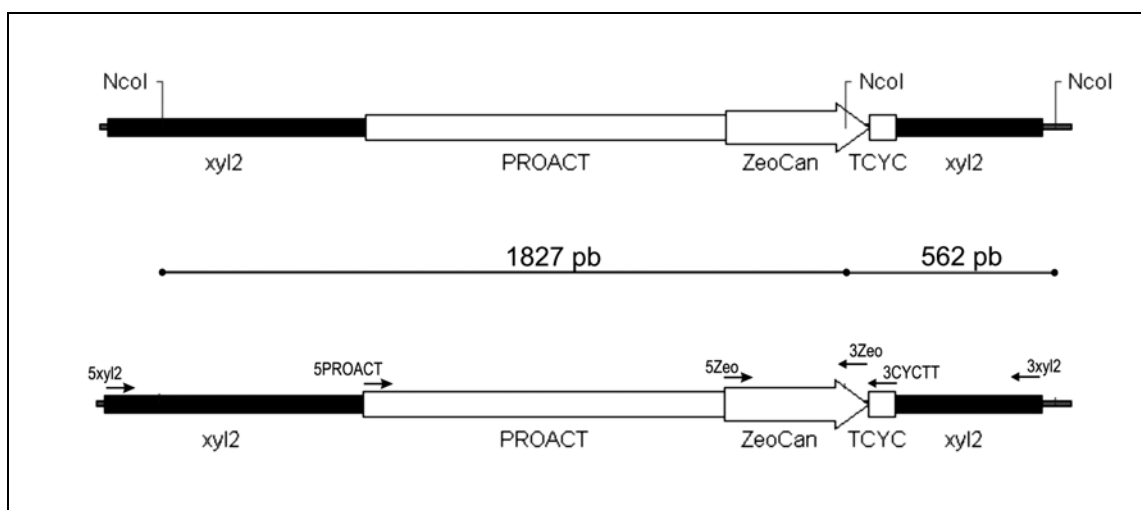


Figura 40. Esquema mostrando os sítios de *Nco* I e a combinação de *primers* utilizados para confirmar a clonagem e a orientação do cassete da marca de seleção na seqüência de *XYL2*.

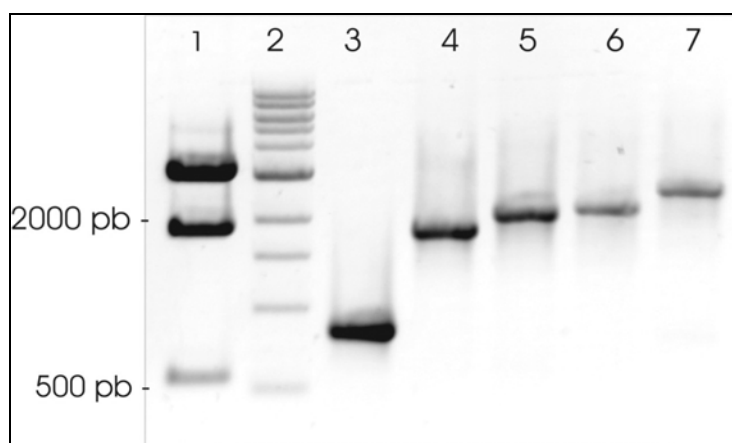


Figura 41. Análise da digestão e de reações de PCR para confirmar a clonagem correta do plasmídeo pZeoXyl2 em gel de agarose 1%. 1: digestão com *Nco* I, 2: 1 kb DNA ladder (New England Biolabs), 3-7: reações com os *primers* 5Zeo/3xyl2, 5PROACT/3xyl2, 5xyl2/3Zeo, 5xyl2/3CYCTT e 5xyl2/3xyl2, respectivamente.

5.2.2.2. Marca Auxotrófica

Na tentativa de transformar *C. tropicalis* utilizando a marca auxotrófica URA3, foi construído o vetor ClpXyl2, clonando-se no sítio de *BamH* I do vetor ClpACT-CYC (Figura 33) o gene *XYL2* obtido da digestão com *BamH* I do vetor pGEMXyl2. A clonagem foi confirmada a partir da digestão *BamH* I liberando-se um fragmento ~1100pb (Figura 42). O plasmídio foi linearizado (Figura 42) com *EcoR* V, sítio presente na seqüência de *XYL2*, estando assim o cassete pronto para transformação de *C. tropicalis* e rompimento de *XYL2*.

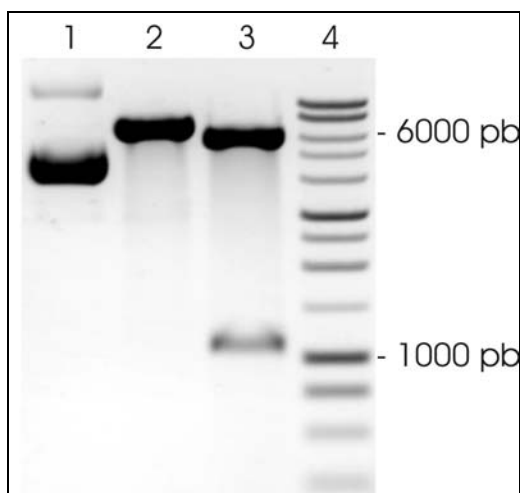


Figura 42. Análise de digestões para confirmar a clonagem do plasmídio ClpXyl2 em gel de agarose 1%. 1: plasmídio intacto, 2: digestão com *EcoR* V, 3: digestão com *BamH* I, 4: 1 kb DNA ladder (Promega).

5.2.3. Cassete para Múltiplas Integrações da Marca de Seleção

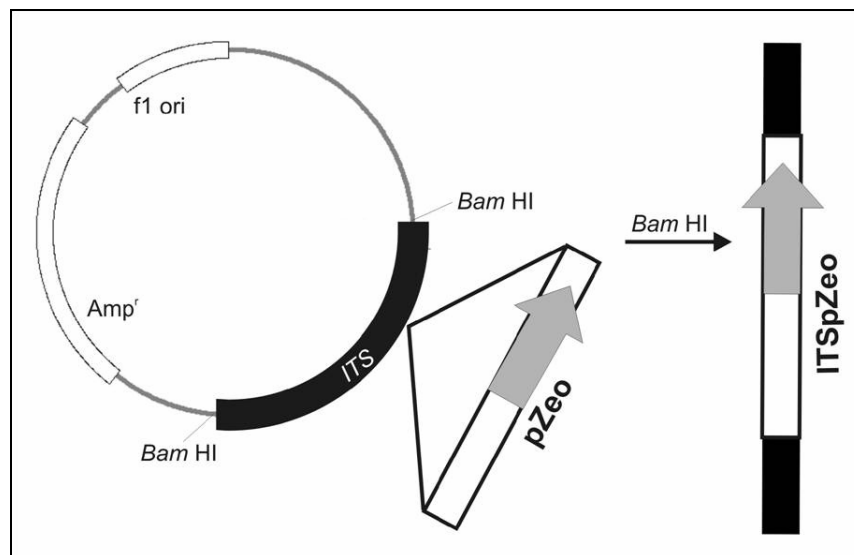


Figura 43. Esquema da construção do cassete de múltiplas integrações da marca de seleção a partir da clonagem do cassete de expressão de ZeoCan dentro da sequência ITS do rDNA.

A construção do cassete de múltiplas integrações baseou-se na estratégia de utilização do cluster de rDNA que compreende os genes que codificam os rRNAs. Estes clusters são arranjados repetidamente *in tandem* de idênticas unidades. O número e o tamanho destes rDNA repetidos podem variar de acordo com a espécie (MALESKA e CLARK-WALKER, 1993), *C. tropicalis* apresenta 80 cópias de 10,7 kb (BLANDIN *et al.*, 2000). Esta estratégia já foi utilizada para transformação de diferentes leveduras, como *S. cerevisiae* (LOPES *et al.*, 1989), *C. utilis* (KONDO *et al.*, 1995), *Pichia ciferrii* (BAE *et al.*, 2003) e *Hansenula polymorpha* (LIU *et al.*, 2005).

Para a transformação de *C. tropicalis* foi utilizada a sequência ITS do rDNA (Figura 5), amplificada por PCR utilizando os *primers* ITS1Bam e ITS4Bam. Estes *primers* possuem na suas extremidades sítios de *BamH* I utilizados para liberar o cassete de integração. O produto de ~540 pb foi clonado no vetor pGEM®-T (Promega) e a clonagem foi confirmada pela digestão com *BamH* I. O plasmídeo resultante foi linearizado com digestão com *Sma* I (posição 341), e a ele foi adicionado um linker de *Bgl* II. Este sítio foi utilizado para clonar o cassete da marca de seleção, obtido pela digestão do plasmídeo pZeo com *BamH* I, gerando o

plasmídeo pITSpZeo (Figura 43). Confirmou-se a clonagem pela digestão com *Bam*H I e por reações de PCR com os *primers* ITS1/ITS4, 5PROACT/3zeo, 5zeo/3CYCTT, gerando os fragmentos de tamanhos esperados: 2028 pb (ITS: 532 pb, pZeo: 1496 pb), 1416 pb e 472 pb (Figura 44).

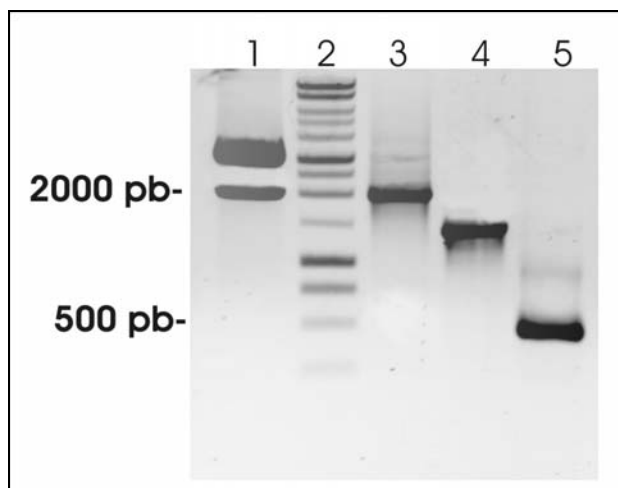


Figura 44. Análise de digestão e reações de PCR para confirmar a clonagem correta do plasmídeo pITSpZeo em gel de agarose 1%. 1: digestão com *Bam*H I, 2: 1 kb DNA ladder (Promega), 3-5: reações com os *primers* ITS1/ITS4, 5PROACT/3zeo, 5zeo/3CYCTT, respectivamente.

5.2.4. Cassete para Super Expressão de *XYL1*

Com a intenção de expressar o gene *XYL1* em múltiplas-cópias em *C. tropicalis*, construiu-se um cassete de expressão com as regiões promotoras e terminadoras de transcrição do gene *PGK1* a fim de garantir altos níveis de expressão. O gene *PGK1* codifica para a enzima 3-fosfoglicerato quinase da via glicolítica que é expressa constitutivamente em altos níveis. A seqüência promotora deste gene é largamente empregada em construções genéticas para diversos microrganismos, inclusive para *C. maltosa* (MASUDA *et al.*, 1994).

A fim de amplificar as regiões promotora e terminadora de transcrição foram desenhados *primers* a partir da seqüência do gene *PGK1* de *C. maltosa*, conforme esquema apresentado na Figura 45. Os *primers* PPGK e TPGK amplificam a região promotora, a porção codante e a região terminadora. Após a clonagem do produto de

PPGK e TPGK em um vetor, a amplificação com P2PGK e T2PGK retira a porção codante.

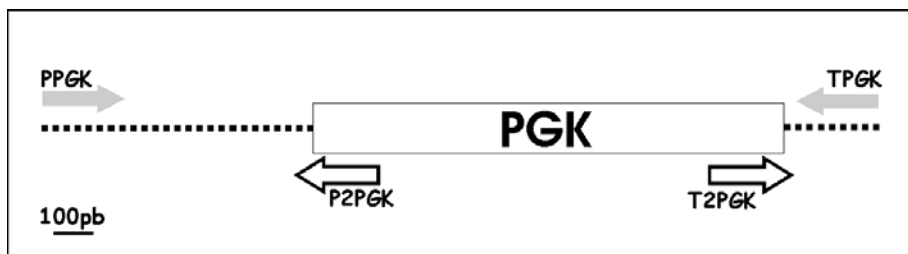


Figura 45. Esquema mostrando as posições relativas de anelamento dos *primers* utilizados para amplificação do gene PGK.

As reações de PCR utilizando como molde DNA de *C. maltosa* apresentaram produtos com o tamanho aproximado, a saber: PPGK/TPGK – 2265 pb, PPGK/P2PGK – 740 pb, conforme Figura 46. O amplicon obtido com o conjunto de *primers* PPGK/TPGK a partir do DNA de *C. maltosa* foi clonado no vetor pGEM®-T Easy (Promega), o clone positivo (pGEMPGK) foi escolhido digerindo-se com *EcoR* I. Para a clonagem do gene *XYL1* entre as regiões promotora e terminadora de transcrição realizou-se uma amplificação com *Vent_R*® DNA Polimerase utilizando os *primers* P2PGK/T2PGK, com a finalidade de eliminar a região codante do gene *PGK1*, o que resultou em um amplicom com cerca de 4 kb (Figura 47).

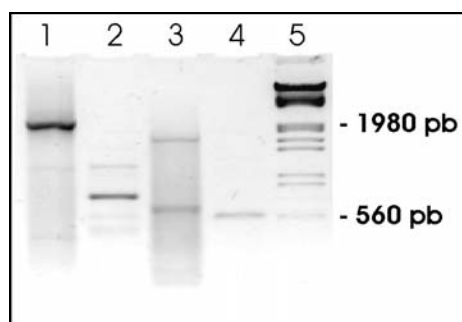


Figura 46. Reações de amplificação de regiões do gene *PGK1* analisadas em gel de agarose 1%. DNA molde de *C. maltosa* 1: PPGK/TPGK, 2: PPGK/P2PGK e de *C. tropicalis* 3: PPGK/TPGK, 4: PPGK/P2PGK e 5: marcador λ *EcoR* I/*Hind* III.

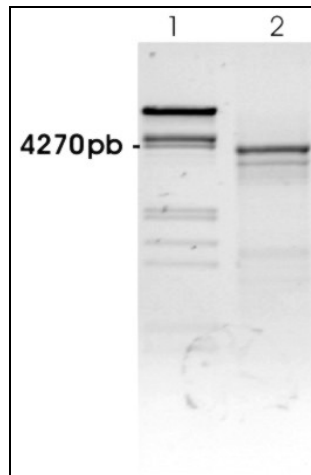


Figura 47. Reação de PCR confirmando a clonagem do plasmídio pGEM-T EasyPGK analisadas em gel de agarose 1%. 1: marcador λ *EcoR I/Hind III* e 2: amplificação utilizando os *primers* P2PGK/T2PGK e pGEM-T EasyPGK como molde.

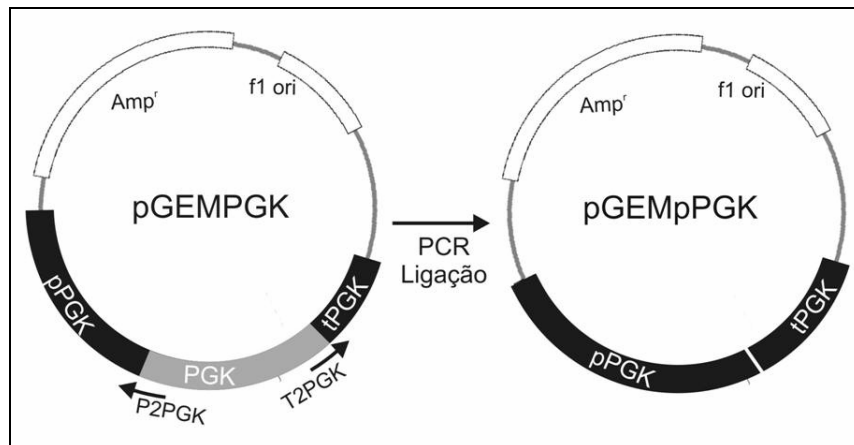


Figura 48. Esquema da obtenção do plasmídio contendo as regiões promotora e terminadora do gene *PGK1* de *C. maltosa*. O plasmídio contendo o gene *PGK1* foi utilizado como molde em uma reação de PCR com os *primers* P2PGK e T2PGK, o amplicom obtido foi religado originando o plasmídio pGEMpPGK.

O produto de PCR utilizando pGEM-T EasyPGK como molde foi religado e utilizado na transformação de *E. coli* DH5 α , conforme mostrado na Figura 48. Os plasmídios (pGEMpPGK) foram analisados digerindo-os com *EcoR I* liberando o inserto e com *Bgl II*, sítio presente nos *primers* P2PGK e T2PGK, além de reações de PCR utilizando os *primers* PPGK e TPGK e os plasmídios pGEMPGK – com o gene PGK e pGEMpPGK – sem a região codante do gene PGK. O resultado da

amplificação (Figura 49) confirma que o gene PGK foi excluído do plasmídio, pois a amplificação utilizando pGEMPGK como molde apresenta um produto de cerca de 2300 pb, que corresponde a 744 pb da região promotora, 293 da região terminadora e 1227 da região codante, enquanto com pGEMpPGK foi obtido um produto de ~1000 pb, que corresponde as regiões promotora e terminadora.

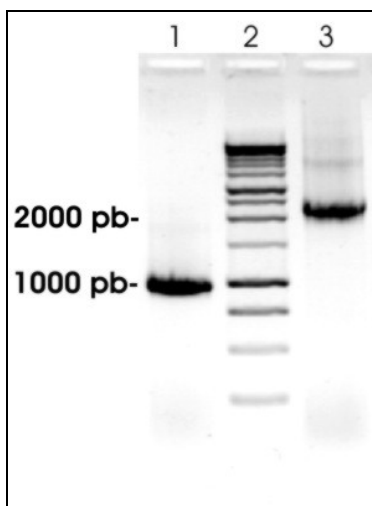


Figura 49. Reações de PCR utilizando os *primers* PPGK/TPGK analisadas em gel de agarose 1%. 1: pGEMpPGK como molde, 2: 1 kb DNA ladder (Promega) e 3: pGEMPGK como molde.

Para clonagem do gene *XYL1* entre as regiões promotora e terminadora de transcrição os plasmídios pGEMpPGK e Topoxyl1 foram digeridos com *Bgl* II para linearização do vetor e liberação do gene *XYL1* com extremidades coesivas. Após a ligação, realizou-se a transformação de *E. coli* DH5 α e os clones foram selecionados por PCR de colônia utilizando os *primers* 5xyl1A e 3xyl1. Após a seleção fez-se minipreparações dos plasmídios (pPGKxyl1) que apresentavam inserto. O esquema da clonagem está apresentado na Figura 50. Para confirmar a orientação correta realizaram-se digestões com a enzima *Nco* I, onde foi obtido um fragmento de cerca de 1700 pb e reações de PCR com os *primers* PPGK e 3xyl1 utilizando os plasmídios selecionados pela digestão anterior. Como pode ser observado na Figura 51, obteve-se um produto de cerca de 1700 pb, que corresponde a 744 pb da região promotora e 978pb da região codante, confirmando que a clonagem foi realizada no sentido correto.

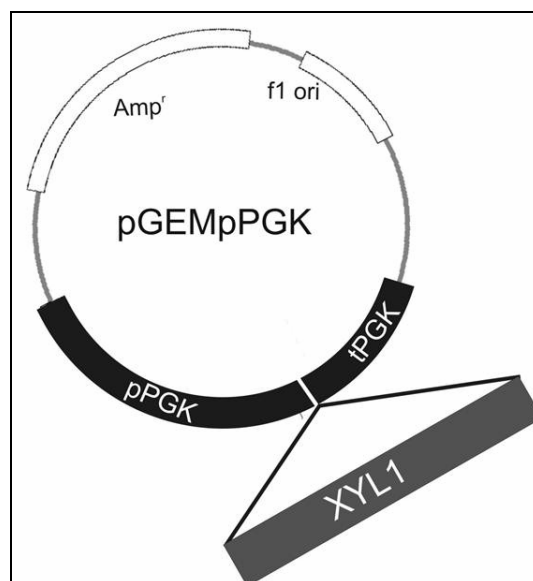


Figura 50. Esquema mostrando a clonagem de *XYL1* entre as regiões promotora e terminadora do gene *PGK1* para obtenção do plasmídeo pPGKxyl1.

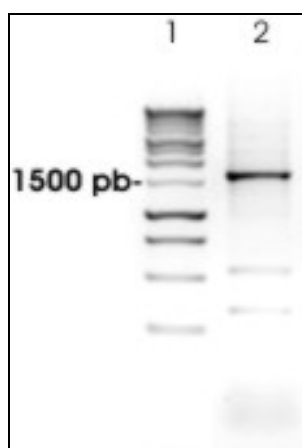


Figura 51. Reação de PCR utilizando os primers PPGK/3xyl1 analisada em gel de agarose 1%. 1: 1 kb DNA ladder (Promega), 2: pPGKxyl1 como molde.

O vetor de expressão contaria ainda com seqüências de rDNA já clonadas a fim de propiciar múltiplos eventos de integração no genoma de *C. tropicalis*, além da marca de seleção ZeoCan, porém como o antibiótico zeocina havia se mostrado ineficaz na seleção, a construção foi interrompida.

6. Transformação Genética de *C. tropicalis*

Os protocolos de transformação empregados para a transformação de *C. tropicalis* foram o de eletroporação e por formação de esferoplastos. Para a eletroporação foi utilizada a metodologia descrita por TANG *et al.* (2003) para *C. rugosa* e para formação de esferoplastos o descrito por HAAS *et al.* (1990). Os cassetes utilizados foram o de ruptura de *XYL2* e o de múltiplas integrações da marca de seleção ZeoCan.

Após a transformação, foram obtidos diversos clones que, quando analisados por PCR de colônia, não mostraram ser transformantes autênticos, mas possivelmente, mutantes gerados pela presença de zeocina que é genotóxica. A reação de PCR mostrou que nem houve integração no *locus* de *XYL2* (utilizando os *primers* 5xyl2 e 3xyl3) nem na região ITS (utilizando os *primers* ITS1 e ITS4). Também não foi detectada a presença do gene ZeoCan utilizando os *primers* 5Zeo e 3Zeo. Estes resultados indicam que, possivelmente, as leveduras do gênero *Candida* possuem mecanismos para anular os efeitos da zeocina.

Zeocina ou bleomicina é um antibiótico que apresenta propriedades genotóxicas, uma vez que a molécula de zeocina, quando ligada a ferro (Fe II) na forma reduzida e na presença de oxigênio, forma um complexo reativo como radical livre que pode atacar diversas macromoléculas na célula, incluindo DNA e RNA. No DNA as lesões incluem oxidação de sítiosapurínico/apirimidínico e quebras em fita simples, onde a extremidade 3' forma 3'-fosfoglicolato que efetivamente bloqueia a síntese de DNA (AOUIDA *et al.*, 2004). Além destes efeitos, a zeocina também aumenta a fragilidade da parede celular, facilitando a formação de esferoplastos e aumentando a susceptibilidade da célula a peróxidos e radiação ionizante (GRAYBILL *et al.*, 1996).

GRAYBILL *et al.* (1996) estudando a efetividade da terapia de zeocina em ratos com candidíase, verificou que mesmo a *C. albicans* mostrando-se susceptível *in vitro* a este antibiótico, *in vivo* não mostrou a mesma efetividade. Em *S. cerevisiae* foram caracterizados diversos mecanismos de proteção a zeocina: AOUIDA *et al.*, (2004) propôs uma via de transporte e detoxificação, onde o antibiótico é

internalizado por um transportador de membrana e seqüestrado no interior do vacúolo; MASSON e RAMOTAR (1996) propuseram que o gene IMP2 previne danos oxidativos pela regulação da expressão de genes que são requeridos para o reparo de DNA; XU e JOHNSTON (1994) e ZHENG e JOHNSTON (1998) identificaram e caracterizaram a enzima bleomicina hidrolase capaz de inativar este antibiótico.

Podem-se citar como formas de proteção à zeocina: alteração do seu transporte, aumento do reparo das lesões induzidas no DNA e inativação do antibiótico (RAMOTAR e WANG, 2003), desta forma para utilização da marca de resistência a zeocina em um sistema de transformação para *C. tropicalis*, deve-se estudar detalhadamente a efetividade deste antibiótico para esta levedura.

Uma opção de marca dominante que poderá ser utilizada para estabelecimento do sistema de transformação é o gene de resistência a higromicina B, como já utilizado para transformação de *C. tropicalis* por HARA *et al.* (2000). Outras marcas alternativas à zeocina podem ser resistência a MPA (ácido micofenólico) dada pela mutação do gene IMH3 que codifica a enzima inosina-monofosfato desidrogenase (BECKERMAN *et al.*, 2001) ou resistência a *nourseothricin* utilizando o gene *nat1* de *Streptomyces noursei* que codifica *nourseothricin* acetiltransferase, porém com os códons CUG modificados (SHEN *et al.*, 2005).

CONCLUSÕES

- A levedura *C. guilliermondii* FTI 20037 apresenta maior identidade das regiões ITS e 5'LSU do DNA ribossomal e do gene *XYL1* com as de *C. tropicalis* em comparação a *C. guilliermondii*, o que permite sua reclassificação como *C. tropicalis*.
- O gene *XYL1* foi clonado e apresentou 98% de identidade com a seqüência de xilose redutase I,II de *C. tropicalis*, com apenas 11 divergências entre as seqüências. A partir do alinhamento da seqüência de aminoácidos predita com a de XR de *Candida tenuis*, foram identificados os resíduos envolvidos no sítio catalítico, no sítio de ligação à NADPH e os que participam da formação de dímero.
- O gene *XYL2* foi isolado, apresentando uma fase aberta de leitura de 1092 pb, que potencialmente codifica um polipeptídeo de 364 resíduos de aminoácidos, com aproximadamente 40 Kda. Este gene não possui íntrons, se apresenta em única cópia no genoma de *C. tropicalis* e é controlado em nível transcricional pela presença de xilose. A seqüência primária da ORF *XYL2* é idêntica à publicada no projeto genoma de *C. tropicalis*
- A proteína Xyl2 pertence à família MDR contendo sítios para ligação a zinco e NAD⁺.
- Os genes *XYL1* e *XYL2* foram expressos com sucesso em *S. cerevisiae*.
- Foi construído o gene ZeoCan que potencialmente confere resistência a zeocina e possui codon preferencial de *C. tropicalis*.
- A resistência ao antibiótico zeocina não é indicada como marca de seleção em vetores de transformação para *C. tropicalis*, uma vez que esta levedura deve possuir mecanismos para anular o efeito do antibiótico.

PERSPECTIVAS

- Testar possíveis marcas de seleção a fim de estabelecer um sistema de transformação para *C. tropicalis*.
- Expressão de *XYL2* em *E. coli* para purificação e cristalização da proteína com a finalidade de determinar sua estrutura por cristalografia de raios-X (trabalho em andamento).

REFERÊNCIAS

Aguiar CL, Oetterer M, Menezes TJB. 1999. Caracterização e aplicações do xilitol na indústria alimentícia. *Boletim SBCTA* 33(2): 184-193

Alanen P, Isokangas P, Gutmann K. 2000. Xylitol candies in caries prevention: results of a field study in Estonian children. *Community Dentistry and Oral Epidemiology* 28(3): 218-224

Amore R, Wilhelm M, Hollenberg CP. 1989. The fermentation of xylose - an analysis of the expression of *Bacillus* and *Actinoplanes* xylose isomerase genes in yeast. *Applied Microbiology and Biotechnology* 30:351-357

Amore R, Kötter P, Küster C, Ciriacy M, Cornelis PH. 1991. Cloning and expression in *Saccharomyces Cerevisiae* of NAD(P)H-dependent Xylose Reductase encoding gene (*xyl1*) from the xylose-assimilating yeast *Pichia stipitis*. *Gene* 109: 89-87

Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215(3):403-10

Anderlund M, Radström P, Hahn-Hägerdal B. 2001. Expression of bifunctional enzymes with xylose reductase and xylitol dehydrogenase activity in *Saccharomyces cerevisiae* alters product formation during xylose fermentation. *Metabolic Engineering* 3: 226-235

Aouida M, Leduc A, Wang H, Ramotar D. 2004. Characterization of a transport and detoxification pathway for the antitumour drug bleomycin in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Biochemical Journal* 384: 47-58

Autio JT. 2002. Effect of xylitol chewing gum on salivary *Streptococcus mutans* in preschool children. *ASDC Journal of Dentistry for Children* 69(1): 81-86

Azevedo MO, Felipe MSS, Brigido MM, Maranhão AQ, Souza MT. 2003. Técnicas Básicas em Biologia Molecular. Brasília: Editora Universidade de Brasília.

Bae JH, Sohn JH, Park CS, Rhee JS, Choi ES. 2003. Integrative transformation system for the metabolic engineering of the sphingoid base-producing yeast *Pichia ciferrii*. *Applied and Environmental Microbiology* 69(2): 812-9

Bailey JE. 1991. Toward a science of metabolic engineering. *Science* 252(5013): 1668-75

Blandin G, Ozier-Kalogeropoulos O, Wincker P, Artiguenave F, Dujon B. 2000. Genomic exploration of the hemiascomycetous yeasts: 16. *Candida tropicalis*. *FEBS Letters* 487(1):91-4

Banfield MJ, Salvucci ME, Baker EN. 2001. Crystal structure of the NADP(H) dependent ketose reductase from *Bemisia argentifolii* at 2.3 Å resolution. *Journal of Molecular Biology* 306: 239-250.

Bär A. 1991. Xylitol in: Nabors LB, Gelardi, RC *Alternative Sweeteners*. 2 Ed. New York: Marcel Dekker, ISBN: 0824704371

Barbosa MFS, Medeiros MB, Mancilha IM, Schneider H, Lee H. 1988. Screening of yeasts for production of xylitol from D-xylose and some factors which affect xylitol yield in *Candida guilliermondii*. *Journal of Industrial Microbiology* 3: 241-251

Baron M, Reynes JP, Stassi D, Tiraby G. 1992. A selectable bifunctional β -galactosidase: phleomycinresistance fusion protein as a potential marker for eukaryotic cells. *Gene* 114: 239-243

Beckerman J, Chibana H, Turner J, Magee PT. 2001. Single-copy IMH3 allele is sufficient to confer resistance to mycophenolic acid in *Candida albicans* and to mediate transformation of clinical *Candida* species. *Infectio and Immunity* 69(1): 108-14

Billard P, Menart S, Fleer R, Fukuhara MB. 1995. Isolation and characterization of the gene encoding xylose reductase from *Kluyveromyces lactis*. *Gene* 162: 93-97

Birnboim HC, Doly J. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research* 7: 1513-1523

Birkhed D. 1994. Cariologic aspects of xylitol and its use in chewing gum: A Review. *Acta Odontologica Scandinavica* 52(2): 116-127

Blackwell C, Russell CL, Argimon S, Brown AJ, Brown JD. 2003. Protein A-tagging for purification of native macromolecular complexes from *Candida albicans*. *Yeast* 20(15): 1235-1241

Blandin G, Ozier-Kalogeropoulos O, Wincker P, Artiguenave F, Dujon B. 2000. Genomic exploration of the hemiascomycetous yeasts: 16. *Candida tropicalis*. *FEBS Letters* 487(1): 91-4

Böer E, Wartmann T, Schmidt S., Bode R., Gellissen G, Kunze G. 2005. Characterization of the AXDH gene and the encoded xylitol dehydrogenase from the dimorphic yeast *Arxula adenivorans*. *Antonie van Leeuwenhoek* 87:233-243

Bolak Co. Ltd. [Online] Disponível na Internet via WWW. Url: http://www.bolak.co.kr/english/ps_xilitol_e.htm. Arquivo capturado em 06 de fevereiro de 2006

Bolen PL, Hayman GT, Shepherd HS. 1996. Sequence and analysis of an aldose (xylose) reductase gene from the xylose-fermenting yeast *Pachysolen tannophilus*. *Yeast* 12(13): 1367-75

Bolen PL, Roth KA, Freer SN. 1986. Affinity Purifications of Aldose Reductase and Xylitol Dehydrogenase from the Xylose-Fermenting Yeast *Pachysolen tannophilus*. *Applied and Environmental Microbiology* 52(4): 660-664

Boles E, Hollenberg CP. 1997. The molecular genetics of hexose transport in yeasts. *FEMS Microbiology Review* 21: 85-111

Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle for protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72:248-254

Bruinenberg PM, de Bot PH, van Dijken JP, Scheffers SA. 1984. NADH-linked aldose reductase: the key to anaerobic alcoholic fermentation of xylose by yeasts. *Applied Microbiology and Biotechnology* 19(4): 256-260

Calmels T, Parriche M, Burand H, Tiraby G. 1991. High efficiency transformation of *Tolyposcladium geodes* conidiospores to phleomycin resistance. *Current Genetic* 20: 309-314

Cayle T, Roland J, Mehnert D, Dinwoodie R, Larson R, Mathers J, Raines M, Alm W, Ma'ayeh S, Kiang S, Saunders R. 1986. Production of L-ascorbic acid from whey, In: Harlander SK, Labuza TP *Biotechnology in Food Processing*, New Jersey: Noyes Publication, 157 – 169

CCC - Calorie Control Council. Reduced-Calorie Sweeteners: Xylitol. [Online] Disponível na Internet via WWW. Url: <http://www.caloriecontrol.org/xylitol.html>. Arquivo capturado em 05 de fevereiro de 2006

Ceccarelli C, Liang ZX, Strickler M, Prehna G, Goldstein BM, Klinman JP, Bahnson BJ. 2004. Crystal structure and amide H/D exchange of binary complexes of alcohol dehydrogenase from *Bacillus stearothermophilus*: insight into thermostability and cofactor binding. *Biochemistry* 11:5266-5277

Chiang C, Knight SS. 1960. Metabolism of D-Xylose by moulds. *Nature* 188(4744): 78-81

Cho JY, Jeffries TW. 1998. *Pichia stipitis* genes for alcohol dehydrogenase with fermentative and respiratory functions. *Applied and Environmental Microbiology* 64: 1350-1358

Collaborative computational project, number 4. 1994. The CCP4 Suite: Programs of Protein Crystallography. *Acta Crystallographica D*50: 760-763.

Craft DL, Madduri KM, Eshoo M, Wilson CR. 2003. Identification and characterization of the CYP52 family of *Candida tropicalis* ATCC 20336, important for the conversion of fatty acids and alkanes to alpha, omega-dicarboxylic acids. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 5983-5891

Czajka MC, Lee RE Jr. 1990. A rapid cold-hardening response protecting against cold shock injury in *Drosophila melanogaster*. *The Journal of Experimental Biology* 148, 245-254

Dahiya JS. 1991. Xylitol production by *Petromyces albertensis* grown medium containing d-xylose. *Canadian Journal of Microbiology* 37: 14-18

Danisco A/S [Online] Disponível na Internet via WWW. Url: http://www.danisco.com/cms/connect/corporate/home/index_en.htm. Arquivo capturado em 06 de fevereiro de 2006

De Faveri D, Perego P, Converti A, Del Borghi M. 2002. Xylitol recovery by crystallization from synthetic solutions and fermented hemicellulose hydrolyzates. *Chemical Engineering Journal* 90: 291-298

De Vit MJ, Waddle JA, Johnston M. 1997. Regulated nuclear translocation of the Mig1 glucose repressor. *Molecular Biology of the Cell* 8: 1603-1618

Doi M, Homma M, Chindamporn A, Tanaka K. 1992. Estimation of chromosome number and size by pulse-field gel electrophoresis (PFGE) in medically important *Candida* species. *Journal of General Microbiology* 138: 2243-2251

Drocourt D, Calmels TPG, Reynes JP, Baron M, Tiraby G. 1990. Cassettes of the *Streptoalloteichus hindustanus* *Ble* gene for transformation of lower and higher eukaryotes to phleomycin resistance. *Nucleic Acids Research* 18: 4009

Elble R. 1992. A simple and efficient procedure for transformation of yeasts. *Biotechniques* 13: 18-20

Eliasson A, Christensson C, Wahlbom CF, Hahn-Hägerdal B. 2000. Anaerobic Xylose fermentation by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* carrying XYL1, XYL2, and XKS1 in mineral medium chemostat cultures. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 3381-3386

Ewing B, Hillier L, Wendl MC, Green P. 1998. Base-calling of automated sequencer traces using Phred. I. Accuracy assessment. *Genome Research* 8:175-185

Felipe MGA, Vitolo M, Mancilha IM, Silva SS. 1997. Fermentation of sugar cane bagasse hemicellulosic hydrolysate for xylitol production: effect of pH. *Biomass and Bioenergy* 13(1-2): 11-14

Functional Foods from Finland [Online] Disponível na Internet via WWW. Url: <http://virtual.finland.fi/finfo/english/funcfood.html>. Arquivo capturado em 06 de fevereiro de 2006

Fungaro MHP. 2000. PCR na micologia. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento* 14: 12-16

Gardonyi M, Osterberg M, Rodrigues C, Spencer-Martins I, Hahn-Hägerdal B. 2003a. High capacity xylose transport in *Candida intermedia* PYCC 4715. *FEMS Yeast Research* 3: 45-52

Gardonyi M, Jeppsson M, Liden G, Gorwa-Grauslund MF, Hahn-Hägerdal B. 2003b. Control of xylose consumption by xylose transport in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology and Bioengineering*. 82(7): 818-24

Georgieff M, Moldawer LL, Bistrain BR, Blackburn GL. 1985. Xylitol, an energy source for intravenous nutrition after trauma. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*. 9: 199-209

Ghanem KM, Sabry SA, Gamati SY. 1992. Physiological study on riboflavin production by hydrocarbon-utilizing *Candida guilliermondii*. *Zentralblatt Fuer Mikrobiologie* 147(3-4): 283-287

Gibrat JF, Madej T, Bryant SH. 1996. Surprising similarities in structure comparison. *Current Opinion in Structural Biology* 6: 377-385

Gilfillan GD, Sullivan DJ, Haynes K, Parkinson T, Coleman DC, Gow NAR. 1998. *Candida dubliniensis*: phylogeny and putative virulence factors. *Microbiology*, 144: 829-838

Gimenes MA, Carlos LC, Faria LF, Pereira N Jr. 2002. Oxygen uptake rate in production of xylitol by *Candida guilliermondii* with different aeration rates and initial xylose concentrations. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 98-100: 1049-1059

Girio MF, Pelica F, Amaral-Collaco MT. 1996. Characterization of xylitol dehydrogenase from *Debaryomyces hansenii*. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 56: 79-88

Govinden R, Pillay B, van Zyl WH, Pillay D. 2001. Xylitol production by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* expressing the *Pichia stipitis* and *Candida shehatae xyl1* genes. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 55: 76-80.

Granström T, Leisola M. 2002. Controlled transient changes reveal differences in metabolite production in two *Candida* yeasts. *Applied Microbiology and Biotechnology* 58(4): 511-516

Graybill JR, Bocanegra R, Fothergill A, Rinaldi MG. 1996. Bleomycin therapy of experimental disseminated candidiasis in mice. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 40(3): 816-8.

Guarro J, Gené J, Stchigel A. M. 1999. Developments in Fungal Taxonomy Clinical. *Microbiology Reviews* 12(3): 454–500

Guex N, Peitsch MC. 1997. Swiss-Model and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis* 18: 2714-2723

Guo Z, Sherman F. 1995. 3'-end-forming signals of yeast mRNA. *Molecular and Cellular Biology*, 15: 5983–5990

Haas LOC, Cregg JM, Gleeson MAG. 1990. Development of an integrative DNA transformation system for the yeast *Candida tropicalis*. *Journal of Bacteriology* 172(8): 4571-4577

Habenicht A, Motejadded H, Kiess M, Wegerer A, Mattes R. 1999. Xylose utilisation: cloning and characterisation of the xylitol dehydrogenase from *Galactocandida mastotermitis*. *Biological Chemistry* 380(12): 1405-1411

Hahn-Hägerdal B, Jeppsson H, Skoog K, Prior BA. 1994. Biochemistry and physiology of xylose fermentation by yeasts. *Enzyme Microbial Technology* 16: 933-943

Hallborn J, Walfridsson M, Airaksinen U, Ojamo H, Hahn-Hägerdal B, Penttilä M, Keränen S. 1991. Xylitol production by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology*, 9(11): 1090-5

Hallborn J, Walfridsson M, Penttilä M, Keränen S, Hahn-Hägerdal B. 1995. A short-chain dehydrogenase gene from *Pichia stipitis* having D-arabinitol dehydrogenase activity. *Yeast* 11: 839-847

Hamacher T, Becker J, Gardonyi M, Hahn-Hägerdal B, Boles E. 2002. Characterization of the xylose-transporting properties of yeast hexose transporters and their influence on xylose utilization. *Microbiology* 148(9): 2783-2788

Hanahan D. 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology* 66: 557-580

Handumrongkul C, Ma D-P, Silva JL. 1998. Cloning and expression of *Candida guilliermondii* xylose reductase gene (xyl1) in *Pichia pastoris*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 49: 399-404

Hansen J, Felding T, Johannesen PF, Piskur J, Christensen CL, Olesen K. 2003. Further development of the cassette-based pyc plasmid system by incorporation of

the dominant *hph*, *nat* and *aur1-C* gene markers and the lacZ reporter system. FEMS Yeast Research 4: 323-327

Hara A, Ueda M, Matsui T, Furuhashi K, Kanayama N, Tanaka A. 1999. Construction of an autonomously replicating plasmid in *n*-alkane-assimilating yeast *Candida tropicalis*. Journal of Bioscience and Bioengineering 87: 717–720

Hara A, Ueda M, Misawa S, Matsui T, Furuhashi K, Tanaka A. 2000. Mutated hygromycin b resistance gene is functional for the *n*-alkane-assimilating yeast *Candida tropicalis*. Archives of Microbiology 173: 187–192

Harkki AM, Myasnikov AN, Apajalahti JHA, Pastinen OA. 2004. Manufacture of xylitol using recombinant microbial hosts. US N. 6723540

Hashida-Okado T, Ogawa A, Kato I, Takesako K. 1998. Transformation system for prototrophic industrial yeasts using the *aur1* gene as a dominant selection marker. FEBS Letters 425: 117-122

Hasper, A. A., J. Visser, and L. H. de Graaff. (2000) The *Aspergillus niger* transcriptional activator XlnR, which is involved in the degradation of the polysaccharides xylan and cellulose, also regulates D-xylose reductase gene expression. Molecular Microbiology 36: 193–200

Heikkila H, Nurmi J, Rahkila L, Toyryla M. 1992. Method for the production of xylitol. US N. 5081026

Hill JE, Myers AM, Koerner TJ, Tzagoloff A. 1986. Yeast/E. coli shuttle vectors with multiple unique restriction sites. Yeast 2(3): 163-7

Ho NWY, Stevis P, Rosenfeld S, Huang JJ, Tsao GT. 1983. Expression of the *Escherichia coli* isomerase gene by a yeast promoter. Biotechnology and Bioengineering Symposium 13:245–250

Ho NWY, Zhengdao C, Brainard AP. 1998. Genetically engineered *Saccharomyces* yeast capable of effective cofermentation of glucose and xylose. Applied and Environmental Microbiology 64(5): 1852-1859

Höfer M, Nassar FR. 1987. Aerobic and anaerobic uptake of sugars in *Schizosaccharomyces pombe*. Journal General Microbiology 133: 2163-2172

Hujoel PP, Makinen KK, Bennett CA, Isotupa KP, Isokangas PJ, Allen P, Makinen PL. 1999. The optimum time to initiate habitual xylitol gum-chewing for obtaining long-term caries prevention. Journal of Dental Research 78(3): 797-803

Ismailov NM. 1985. Biodegradation of petroleum hydrocarbons in soil inoculated with yeast. Mikrobiologia 54: 835-841

Isokangas P, Soderling E, Pienihakkinen K, Alanen P. 2000. Occurrence of dental decay in children after maternal consumption of xylitol chewing gum, a follow-up from 0 to 5 years of age. *Journal of Dental Research* 79(11): 1885-1889

Jang SH, Kang HY, Kim GJ, Seo JH, Ryu YW. 2003. Complete in vitro conversion of D-xylose to xylitol by coupling xylose reductase and formate dehydrogenase. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 13(4): 501-508

Jeffries TW. 1983. Utilization of xylose by bacteria, yeasts and fungi. *Advances in Biochemical Engineering* 27: 1-32

Jeffries TW, Jin YS. 2004. Metabolic engineering for improved fermentation of pentoses by yeasts. *Applied Microbiology and Biotechnology* 63: 495-509

Jeppsson M, Johansson B, Hahn-Hagerdal B, Gorwa-Grauslund MF. 2002. Reduced oxidative pentose phosphate pathway flux in recombinant xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae* strains improves the ethanol yield from xylose. *Applied and Environmental Microbiology* 68(4):1604-1609

Jeppsson M, Traff K, Johansson B, Hahn-Hagerdal B, Gorwa-Grauslund MF. 2003. Effect of enhanced xylose reductase activity on xylose consumption and product distribution in xylose-fermenting recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Research* 3(2):167-75

Jin YS, Jones S, Shi NQ, Jeffries TW. 2002. Molecular cloning of *xy13* (D-xylulokinase) from *Pichia stipitis* and characterization of its physiological function. *Applied and Environmental Microbiology* 68(3): 232-1239

Jin YS, Jeffries TW. 2003. Changing flux of xylose metabolites by altering expression of xylose reductase and xylitol dehydrogenase in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Biochemistry and Microbiology* 105-108: 277-285

Johansson B, Christensson C, Hobbey T, Hahn-Hägerdal B. 2001. Xylulokinase overexpression in two strains of *Saccharomyces cerevisiae* also expressing xylose reductase and xylitol dehydrogenase and its effect on fermentation of xylose and lignocellulosic hydrolysate. *Applied and Environmental Microbiology* 67(9): 4249-4255

Jornvall H, Persson B, Krook M, Atrian S, Gonzalez-Duarte R, Jeary J, Ghosh D. 1995. Short-chain dehydrogenases/reductases (SDR). *Biochemistry* 34(18): 6003-6013

Kanayama N, Atomi H, Ueda M, Tanaka A. 1998. Genetic evaluation of physiological functions of thiolase isozymes in *n*-alkane-assimilating yeast *Candida tropicalis*. *Journal of Bacteriology* 180: 690-698

Karlgren S, Pettersson N, Nordlander B, Mathai JC, Brodsky JL, Zeidel ML, Bill RM, Hohmann S. 2005. Conditional osmotic stress in yeast: a system to study transport through aquaglyceroporins and osmostress signaling. *The Journal of Biological Chemistry* 280(8): 7186-7193

Katahira S, Fujita Y, Mizuike A, Fukuda H, Kondo A. 2004. Construction of a xylan-fermenting yeast strain through codisplay of xylanolytic enzymes on the surface of xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Applied and Environmental Microbiology* 70(9): 5407-5414

Kavanagh KL, Klimacek M, Nidetzky B, Wilson DK. 2002. The structure of apo and holo forms of xylose reductase, a dimeric aldo-keto reductase from *Candida tenuis*. *Biochemistry* 41(28): 8785-8795

Kavanagh KL, Klimacek M, Nidetzky B, Wilson DK. 2003. Structure of xylose reductase bound to NAD⁺ and the basis for single and dual co-substrate specificity in family 2 aldo-keto reductases. *The Biochemical Journal* 373: 319–326

Kilian SG, van Uden N. 1988. Transport of xylose and glucose in the xylose-fermenting yeast *Pichia stipitis*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 27: 545-548

Kilian SG, Prior BA, Dupreez JC, 1993 The kinetics and regulation of D-xylose transport in *Candida utilis*. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 9(3): 357-360

Kim SY, Oh DK, Jung SR. 1999a. Fermentation process for preparing xylitol using *Candida tropicalis*. US N. 5.998.181

Kim YS, Kim SY, Kim JH, Kim SC. 1999b. Xylitol production using recombinant *Saccharomyces cerevisiae* containing multiple xylose reductase genes at chromosomal δ -sequences. *Journal of Biotechnology* 67: 159-171

Kim SY, Oh DK, Jung SR. 2000. Fermentation for production of xylitol using *Candida tropicalis*. Japão N. 2000-093188-A.

Kim MS, Chung YS, Seo JH, Jo DH, Park YH, Ryu YW. 2001. High-yield production of xylitol from xylose by a xylitol dehydrogenase defective mutant of *Pichia stipitis*. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 11(4): 564-569

Kondo K, Saito T, Kajiwara S, Takagi M, Misawa NA. 1995. Transformation system for the yeast *Candida utilis*: use of a modified endogenous ribosomal protein gene as a drug-resistant marker and ribosomal DNA as an integration target for vector DNA. *Journal of Bacteriology* 177(24): 7171-7177

Kotter P, Amore R, Hollenberg CP, Ciriacy M. 1990. Isolation and characterization of the *Pichia stipitis* xylitol dehydrogenase gene *xyl2* and construction of a xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae* transformant. *Current Genetic* 18: 493-500

Kuyper M, Winkler AA, van Dijken JP, Pronk JT. 2004. Minimal metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for anaerobic xylose fermentation: a proof of principle. *FEMS Yeast Research* 4: 655–664

Lagunas R. 1993. Sugar transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Review* 104: 229–242

Lambert C, Leonard N, De Bolle X, Depiereux E. 2002. ESyPred3D: Prediction of proteins 3D structure. *Bioinformatics* 18: 1250-1256

Lee H. 1998. The structure and function of yeast xylose (aldose) reductases. *Yeast* 14(11): 977-984

Lee W-J, Kim M-D, Ryu Y-W, Bisson LF, Seo J-H. 2002. Kinetic studies on glucose and xylose transport in *Saccharomyces Cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 60: 186–191

Lee W-J, Koo B, Kim M-D. 2003. Cloning and characterization of the *xyl1* gene encoding an NADH-preferring xylose reductase from *Candida parapsilosis*, and its functional expression in *Candida tropicalis*. *Applied and Environmental Microbiology* 69 (10): 6179–6188

Levin I, Meiri G, Peretz M, Burstein Y, Frolow F. 2004. The ternary complex of *Pseudomonas aeruginosa* alcohol dehydrogenase with NADH and ethylene glycol. *Protein Science* 13:1547-1556

Liden G, Walfridsson M, Ansell R, Anderlund M, Adler L, Hahn-Hagerdal B. 1996. A glycerol-3-phosphate dehydrogenase-deficient mutant of *Saccharomyces cerevisiae* expressing the heterologous *xyl1* gene. *Applied and Environmental Microbiology* 62(10): 3894–3896

Lima LHA, Felipe MGA, Torres FAG. 2003. Reclassification of *Candida guilliermondii* FTI 20037 as *Candida tropicalis* based on molecular phylogenetic analysis. *Brazilian Journal of Microbiology* 34(1): 96-98

Lima LHA, Felipe MGA, Vitolo M, Torres FAG. 2004 Effect of acetic acid present in bagasse hydrolysate on the activities of xylose reductase and xylitol dehydrogenase in *Candida guilliermondii*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 65(6): 734-738

Lima LHA, Pinheiro CGA, Moraes LMP, Freitas SM, Torres FAG. 2006. Molecular cloning of the xylitol dehydrogenase gene (XYL2) from the yeast *Candida tropicalis*. *Archives of Microbiology* (submetido)

Liu Y, Li Y, Liu L, Hu X, Qiu B. 2005. Design of Vectors for Efficient Integration and Transformation in *Hansenula polymorpha*. *Biotechnology Letters* 27(19): 1529-34

Lonn A, Traff-Bjerre KL, Otero RRC, van Zyl WH, Hahn-Hagerdal B. 2003. Xylose isomerase activity influences xylose fermentation with recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strains expressing mutated xylA from *Thermus thermophilus*. *Enzyme and Microbial Technology* 32(5): 567-573.

Lopes TS, Klootwijk J, Veenstra AE, van der Aar PC, van Heerikhuizen H, Raue HA, Planta RJ 1989. High-copy-number integration into the ribosomal DNA of *Saccharomyces cerevisiae*: a new vector for high-level expression. *Gene* 79: 199-206

Lorito M, Mach RL, Sposato P, Strauss J, Peterbauer CK, Kubicek CP. 1996. Mycoparasitic interaction relieves binding of the Cre1 carbon catabolite repressor protein to promoter sequences of the ech42 (endochitinase-encoding) gene in *Trichoderma harzianum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93(25): 14868-14872

Lucas C, van Uden N. 1986. Transport of hemicellulose monomers in the xylose-fermenting yeast *Candida shehatae*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 23: 491-495

Lunzer R, Mamnun Y, Haltrich D, Kulbe KD, Nidetzky B. 1998. Structural and functional properties of a yeast xylitol dehydrogenase, a Zn²⁺-containing metalloenzyme similar to medium-chain sorbitol dehydrogenases. *Biochemical Journal* 1: 91-99

Makinen KK, Chiego DJ, Allen P, Bennett C, Isotupa KP, Tiekso J, Makinen PL. 1998. Physical, chemical and histologic changes in dentin caries lesions of primary teeth induced by regular use of polyol chewing gums. *Acta Odontologica Scandinavica* 56(3): 148-156

Makinen KK. 2000. Can the pentitol-hexitol theory explain the clinical observations made with xylitol? *Medical Hypotheses* 54(4): 603–613

Maleszka R. and Clark-Walker GD. 1993. Yeasts have a four-fold variation in ribosomal DNA copy number. *Yeast* 9: 53-58

Manz U, Vanninen E, Voirol F. 1973. Xylitol – its properties and use as a sugar substitute in foods. In: Food R.A. Symp. Sugar and Sugar Replacements.

Masako K, Yusuke K, Hideyuki I, Atsuko M, Yoshiki M, Kayoko M, Makoto K. 2005. A novel method to control the balance of skin microflora: Part 2. A study to assess the effect of a cream containing farnesol and xylitol on atopic dry skin. *Journal of Dermatological Science*, 38(3): 207-213

Masson JY, Ramotar D. 1996. The *Saccharomyces cerevisiae* IMP2 gene encodes a transcriptional activator that mediates protection against DNA damage caused by bleomycin and other oxidants. *Molecular and Cellular Biology* 16(5): 2091-2100

Masuda Y, Park SM, Ohkuma M, Ohta A, Takagi M. 1994. Expression of an endogenous and a heterologous gene in *Candida maltosa* by using a promoter of a newly-isolated phosphoglycerate kinase (PGK) gene. *Current Genetics* 25(5): 412-417

Mattila P, Svanberg J, Pökkä P, Knuutila M. 1998. Dietary xylitol protects against weakening of bone biomechanical properties in ovariectomized rats. *The Journal of Nutrition* 128 (10): 1811-1816

Mayr P, Bruggler K, Kulbe KD, Nidetzky B. 2000. D-Xylose metabolism by *Candida intermedia*: isolation and characterisation of two forms of aldose reductase with different coenzyme specificities. *Journal of Chromatography* 737: 195-202

Mayr P, Petschacher B, Nidetzky B. 2003. Xylose reductase from the basidiomycete fungus *Cryptococcus flavus*: purification, steady-state kinetic characterization, and detailed analysis of the substrate binding pocket using structure-activity relationships. *Journal of Biochemistry* 133(4): 553-62

Meinander N, Hahn-Hägerdal B. 1997. Influence of cosubstrate concentration on xylose conversion by recombinant XYL1-expression in *Saccharomyces cerevisiae*: a comparison of different sugars and ethanol as cosubstrates. *Applied Environmental Microbiology* 63: 1959-1964

Melaja AJ, Hamalainen L. 1977. Process for making xylitol. US N.4.008.285

Metzger MH, Hollenberg CP. 1994. Isolation and characterization of the *Pichia stipitis* transketolase gene and expression in a xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae* transformant. *Applied Microbiology and Biotechnology* 42: 319-325

Meyrial V, Delgenes JP, Moletta R, Navarro JM. 1991. Xylitol production from D-Xylose by *Candida guilliermondii*: fermentation behaviour. *Biotechnology Letters* 13: 281 – 286

Mitsubishi Corporation [Online] Disponível na Internet via WWW. Url: <http://www.mitsubishicorp.com/en/bg/chemicals/investments.html>. Arquivo capturado em 06 de fevereiro de 2006

Moes CJ, Pretorius IS, van Zyl WH. 1996. Cloning and expression of the *Clostridium thermosulfurogenes* D-xylose isomerase gene (xylA) in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology Letters* 18:269–274

Moore CW. 1982. Modulation of bleomycin cytotoxicity. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 21(4): 595–600

Moraes LM, Astolfi-Filho S, Oliver SG. 1995. Development of yeast strains for the efficient utilisation of starch: evaluation of constructs that express alpha-amylase and glucoamylase separately or as bifunctional fusion proteins. *Applied Microbiology and Biotechnology* 43: 1067-1076

Mulsant P, Tiraby G, Kallerhoff J, Perret J. 1988. Phleomycin resistance as a dominant selectable marker in CHO cells. *Somatic Cell and Molecular Genetics* 14: 243-252

Murray J, Wong ML, Miyada CG, Switchenko AC, Goodman TC, Wong B. 1995. Isolation, characterization and expression of the gene that encodes D-arabinitol dehydrogenase in *Candida tropicalis*. *Gene* 155: 123-128

Nidetzky B, Bruggler K, Kratzer R, Mayr P. 2003. Multiple forms of xylose reductase in *Candida intermedia*: comparison of their functional properties using quantitative structure-activity relationships, steady-state kinetic analysis, and pH studies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51: 7930-7935

Nielsen J. 2001. Metabolic engineering. *Applied Microbiology and Biotechnology* 55(3): 263-83

Nobre A, Lucas C, Leao C. 1999. Transport and utilization of hexoses and pentoses in the halotolerant yeast *Debaryomyces hansenii*. *Applied and Environmental Microbiology* 65 (8): 3594-3598

Nyysola A, Pihlajaniemi A, Palva A, von Weymarn N, Leisola M. 2005. Production of xylitol from d-xylose by recombinant *Lactococcus lactis*. *Journal of Biotechnology* 118(1): 55-66

Oh DK, Kim SY. 1998. Increase of xylitol yield by feeding xylose and glucose in *Candida tropicalis*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 50(4): 419-25

Oki T, Fujisawa-Shi, Nishimura Y, Yashiroshi, Sayama Y, Takemi H. 1971. Process for production L-glutamic acid by fermentation. US N. 3563857

Onishi H, Suzuki T. 1971. Process for producing xylitol by fermentation. US N. 3619369

Oppermann U, Filling C, Hult M, Shafqat N, Wua X, Lindh M, Shafqat J, Nordling E, Kallberg Y, Persson B, Jornvall H. 2003. Short-chain dehydrogenases/ reductases (SDR): the 2002 update. *Chemico-Biological Interactions* 143-144: 247-253

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

Özcan S, Dover J, Rosenwald AG, Wöl flS, Johnston M. 1996. Two glucose transporters in *Saccharomyces cerevisiae* are glucose sensors that generate a signal for induction of gene expression. *Proceedings of The National Academy of Sciences (USA)* 93: 12428-12432

Parajó JC, Dominguez H, Dominguez JM. 1998a. Biotechnological production of xylitol. Part 1: Interest of xylitol and fundamentals of its biosynthesis. *Bioresource Technology* 65: 191-201

Parajó JC, Dominguez H, Dominguez JM. 1998b. Biotechnological production of xylitol. Part 2: Operation in culture media made with commercial sugars. *Bioresource Technology* 65: 203-212

Parajó JC, Dominguez H, Dominguez JM. 1998c. Biotechnological production of xylitol. Part 3: Operation in culture media made from lignocellulose hydrolysates. *Bioresource Technology* 66: 25-40

Pauly TA, Ekstrom JL, Beebe DA, Chrnyk B, Cunningham D, Griffor M, Kamath A, Lee SE, Madura R, Mcguire D, Subashi T, Wasilko D, Watts P, Mylari BL, Oates PJ, Adams PD, Rath VL. 2003. X-Ray Crystallographic and kinetic studies of human sorbitol dehydrogenase. *Structure* 11: 1071-1085

Pazouki M, Felse PA, Sinha J, Panda T. 2000. Comparative Studies on citric acid production by *Aspergillus niger* and *Candida lipolytica* using molasses and glucose. *Bioprocess Engineering* 22(4): 353-361

Pepper T, Olinger PM. 1988. Xylitol in sugar – free confections. *Food Technology* 42: 10

Perez P, Tiraby G, Kallerhoff J, Perret J. 1989. Phleomycin resistance as a dominant selectable marker for plant cell transformation. *Plant Molecular Biology* 13: 365-373

Persson B, Hallborn J, Walfridsson M, Hahn-Hägerdal B, Keranen S, Penttila M, Jorvall H. 1993. Dual relationships of xylitol and alcohol dehydrogenases in families of two protein types. *Febs Letters* 324(1): 9-14

Phadtare SU, Rawat UB, Rao MB. 1997. Purification and characterization of xylitol dehydrogenase from *Neurospora crassa*. *FEMS Microbiology Letters* 146: 79-83

Picataggio S, Deanda K, Mielenz J. 1991. Determination of *Candida tropicalis* acyl coenzyme a oxidase isozyme function by sequential gene disruption. *Molecular and Cellular Biochemistry* 11(9): 4333-4339

Prathumpai W, McIntyre M, Nielsen J. 2004. The effect of CreA in glucose and xylose catabolism in *Aspergillus nidulans*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 63: 748–753

Rajgarhia V, Koivuranta K, Penttilä M, Ilmen M, Suominen P, Aristidou A, Miller C, Olson S, Ruohonen L. 2004. Novel genetically modified yeast cell e.g., *Kluyveromyces* or *Candida* cell, having xylose isomerase gene linked to promoter and terminator sequences, integrated into its genome, useful for producing ethanol. WO2004099381-A2

Ramotar D, Wang H. 2003 Protective mechanisms against the antitumor agent bleomycin: lessons from *Saccharomyces cerevisiae*. *Current Genetics* 43(4): 213-224

Rangaswamy S, Agblevor FA. 2002. Screening of facultative anaerobic bacteria utilizing D-xylose for xylitol production. *Applied Microbiology and Biotechnology* 60: 88–93

Rathjen J, Mellor J. 1990. Characterisation of Sequences required for RNA initiation from the PGK promoter of *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Research* 18: 3219-3225

Richard P, Toivari MH, Penttilä M. 1999. Evidence that the gene YLR070c of *Saccharomyces cerevisiae* encodes a xylitol dehydrogenase. *FEBS Letters* 457(1): 135-8

Rizzi M, Erlemann P, Bui-Thanh NA, Dellweg H. 1988. Xylose fermentation by yeasts. 4. Purification and kinetic studies of xylose reductase From *Pichia stipitis*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 29(2-3): 148-154

Roca C, Haack MB, Olsson L. 2004. Engineering of carbon catabolite repression in recombinant xylose fermenting *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 63: 578–583

Rohrer TL, Picataggio SK. 1992. Targeted integrative transformation of *Candida tropicalis* by electroporation. *Applied Microbiology and Biotechnology* 36(5): 50-54

Roquette Frères S.A. [Online] Disponível na Internet via WWW. Url: <http://www.roquette.com/eng/sites.htm>. Arquivo capturado em 06 de fevereiro de 2006

Saha BC, Bothast RJ. 1996. Production of xylitol by *Candida peltata*. *Journal of Industrial Microbiology* 22: 633 – 636

Sambrook J, Russell DW, Sambrook J. 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. New York, NY, USA., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 999 p. ISBN: 0879695773

Sarthy AV, McConaughy BL, Lobo Z, Sundstrom JA, Furlong CL, Hall BD. 1987. Expression of the *Escherichia coli* xylose isomerase gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Environmental Microbiology* 53:1996–2000

Sasaki H, Kishimoto T, Mizuno T, Shinzato T, Uemura H. 2005. Expression of GCR1, the transcriptional activator of glycolytic enzyme genes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, is positively autoregulated by Gcr1p. *Yeast* 22: 305-319

Seiboth B, Hartl L, Pail M, Kubicek CP. 2003. D-Xylose metabolism in *Hypocrea jecorina*: loss of the xylitol dehydrogenase step can be partially compensated for by lad1-encoded l-arabinitol-4-dehydrogenase. *Eukaryotic Cell* 2, 867–875.

Shen J, Guo W, Kohler JR. 2005. *CaNAT1*, a heterologous dominant selectable marker for transformation of *Candida albicans* and other pathogenic *Candida* species. *Infection and Immunity* 73(2): 1239-1242

Sheu DC, Duan KJ, Jou SR, Chen YC, Chen CW. 2003. Production of xylitol from *Candida tropicalis* by using an oxidation-reduction potential-stat controlled fermentation. *Biotechnology Letters* 26(4): 2065-2069

Silva SS, Vitolo M, Pessoa Junior A, Felipe MGA. 1996. Xylose reductase and xylitol dehydrogenase activities by xylose fermenting *Candida guilliermondii*. *Journal Basic Microbiology* 363: 187-191

Sirenus I, Krogerus VE, Leppanen T. 1979. Dissolution rate of p-aminobenzoates from solid xylitol dispersions. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 1979 68(6): 791-792

Slininger PJ, Bolen OL, Kurtzman CP. 1987. *Pachysolen tannophilus*: properties and process consideration for ethanol production from D-xylose. *Enzyme and Microbial Technology* 9: 5-15

Soderling E, Isokangas P, Pienihakkinen K, Tenovuo J. 2000. Influence of maternal xylitol consumption on acquisition of mutans *Streptococci* by infants. *Journal of Dental Research* 79(3): 882-887

Soderling E, Isokangas P, Pienihakkinen K, Tenovuo J, Alanen P. 2001. Influence of maternal xylitol consumption on mother-child transmission of mutans *Streptococci*: 6-year follow-up. *Caries Research* 35(3): 173-177

Sonderegger M, Sauer U. 2003. Evolutionary engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for anaerobic growth on xylose. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 1990–1998

Stambuk BU, Franden MA, Singh A, Zhang M. 2003. D-xylose transport by *Candida succiphila* and *Kluyveromyces marxianus*. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 105–108: 255-263

Stemmer WP. 1991. A 20-minute ethidium bromide/high-salt extraction protocol for plasmid DNA. *Biotechniques* 10(6): 726

Sugiyama M, Suzuki S, Tonouchi N, Yokozeki K. 2003. Cloning of the xylitol dehydrogenase gene from *Gluconobacter oxydans* and improved production of xylitol from D-arabitol. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 67(3):584-91

Sugita T, Nakase T. 1999. Nonuniversal usage of the leucine CUG codon in yeasts: Investigation of basidiomycetous yeast. *The Journal of General and Applied Microbiology* 45(4): 193-197

Suzuki T, Yokoyama S, Kinoshita Y, Yamada H, Hatsu M, Takamizawa K, Kawai K. 1999. Expression of *xyrA* Gene Encoding for D-Xylose Reductase of *Candida tropicalis* and Production of Xylitol in *Escherichia coli*. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 87(3): 280-284

Suzuki S, Sugiyama M, Mihara Y, Hashiguchi K, Yokozeki K. 2002. Novel enzymatic method for the production of xylitol from D-arabitol by *Gluconobacter oxydans*. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 66(12): 2614–2620

Tang SJ, Sun KH, Sun GH, Chang TY, Wu WL, Lee GC. 2003. A transformation system for the nonuniversal CUG (SER) codon usage species *Candida rugosa*. *Journal of Microbiological Methods* 52(2): 231-238

Takamizawa K, Uchida S, Hatsu M, Suzuki T, Kawai K. 2000. Development of a xylitol biosensor composed of xylitol dehydrogenase and diaphorase. *Canadian Journal of Microbiology* 46: 350–357

Triglia T, Peterson MG, Kemp DJ. 1988. A procedure for in vitro amplification of DNA segments that lie outside the boundaries of known sequences. *Nucleic Acids Research* 16(16): 8186

Toivari MH, Salusjärvi L, Ruohonen L, Penttilä M. 2004. Endogenous xylose pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology* 70(6): 3681–3686

Tornow J, Zeng X, Gao W, Santangelo GM. 1993. GCR1, a transcriptional activator in *Saccharomyces cerevisiae*, complexes with RAP1 and can function without its DNA binding domain. *EMBO Journal* 12: 2431-2437

Ugolini S, Tosato V, Bruschi CV. 2002. Selective fitness of four episomal shuttle-vectors carrying HIS3, LEU2, TRP1, and URA3 selectable markers in *Saccharomyces cerevisiae*. *Plasmid* 47(2): 94-107

Uhari M, Kontiokari T, Niemela M. 1998. A novel use of xylitol sugar in preventing acute otitis media. *Pediatrics* 102(4): 879-884

van Loveren C. 2004. Sugar alcohols: what is the evidence for caries-preventive and caries-therapeutic effects? *Caries Research* 38: 286–293

van Peij, N. N., Gielkens M. M, de Vries R. P., Visser J., de Graaff L. H. 1998. The transcriptional activator XlnR regulates both xylanolytic and endoglucanase gene expression in *Aspergillus niger*. *Applied Environmental Microbiology* 64: 3615–3619.

Verduyn C, Frank J, van Dijken JP, Scheffers. 1985a. A multiple forms of xylose reductase in *Pachysolen tannophilus* CBS4044. *FEMS Microbiology* 30: 313-317

Verduyn C, van Kleef R, Frank J, Schereuder H, van Dijken JP, Scheffers WA. 1985b. Properties of the NAD(P)H-dependent xylose reductase from the xylose-fermenting yeast *Pichia stipitis*. *The Biochemical Journal* 226: 667-669

Verho R, Londesborough J, Penttila M, Richard P. 2003. Engineering redox cofactor regeneration for improved pentose fermentation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology* 69(10): 5892–5897

Wahlbom FC, Otero RRC, van Zyl WH, Hahn-Hägerdal B, Jonsson LJ. 2003a. Molecular analysis of a *Saccharomyces cerevisiae* mutant with improved ability to utilize xylose shows enhanced expression of proteins involved in transport, initial xylose metabolism, and the pentose phosphate pathway. *Applied and Environmental Microbiology* 69(2): 740–746

Wahlbom FC, van Zyl WH, Jonsson LJ, Hahn-Hägerdal B, Otero RRC. 2003b. Generation of the improved recombinant xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae* TMB 3400 by random mutagenesis and physiological comparison with *Pichia stipitis* CBS 6054. *FEMS Yeast Research* 3: 319-326

Waitzberg DL. 1995. *Nutrição Enteral e Parenteral na Prática Clínica*. 2ed. São Paulo: Atheneu, 434 p. ISBN: 8573792558

Walfridsson M, Hallborn J, Penttila M, Keranen S, Hahn-Hägerdal B. 1995. Xylose-metabolizing *Saccharomyces Cerevisiae* strains overexpressing the *TKL1* and *TAL1* genes encoding the pentose phosphate pathway enzymes transketolase and transaldolase. *Applied and Environmental Microbiology* 61(12):4184-4190

Walfridsson M, Bao X, Anderlund M, Lilius G, Bulow L, Hahn-Hagerdal B. 1996. Ethanol fermentation of xylose with *Saccharomyces cerevisiae* harboring the *Thermus thermophilus xylA* gene, which expresses an active xylose (glucose) isomerase. *Applied and Environmental Microbiology* 62(12): 4648-51

Walfridsson M, Anderlund M, Bao X, Hahn-Hägerdal B. 1997. Expression of different levels of enzymes from the *Pichia stipitis xyl1* and *xyl2* genes in *Saccharomyces cerevisiae* and its effects on product formation during xylose utilisation. *Applied Microbiology Biotechnology* 48: 218-224

Wang T, Penttila M, Gao P, Wang C, Zhong L. 1998. Isolation and identification of xylitol dehydrogenase gene from *Trichoderma reesei*. Chinese Journal Biotechnology 14(3): 179-185

Wang X, Li G, Deng Y, Yu X, Chen F. 2006. A site-directed integration system for the nonuniversal CUG(Ser) codon usage species *Pichia farinosa* by electroporation. Archives of Microbiology 184(6): 419-24

Wellington M, Rustchenko E. 2005. 5-Fluoro-orotic acid induces chromosome alterations in *Candida albicans*. Yeast 22: 57-70

Winkelhausen E, Pittman P, Kuzmanova S, Jeffries TW. 1996. Xylitol formation by *Candida boidinii* in oxygen limited chemostat culture. Biotechnology Letters 18(7): 753-758

Winkelhausen E, Kuzmanova S. 1998. Microbial conversion of D-xylose to xylitol. Journal of Fermentation and Bioengineering 86(1): 1-14

Witteveen CFB, Weber F, Busink R, Visser J. 1994. Isolation and characterization of two xylitol dehydrogenases from *Aspergillus niger*. Microbiology, 140 (7) 1679-1685

Wesolowski-Louvel M, Goffrini P, Ferrero I, Fukuhara H. 1992. Glucose transport in the yeast *Kluyveromyces lactis*. I. Properties of an inducible low-affinity glucose transporter gene. Molecular and General Genetics 233(1-2): 89-96

Wolfe GR, Smith CA, Hendrix DL, Salvucci ME. 1999. Molecular basis for thermoprotection in Bemisia: structural differences between whitefly ketose reductase and other mediumchain dehydrogenases/reductases. Insect Biochemistry Molecular Biology 29, 113–120

Xu HE, Johnston SA. 1994. Yeast bleomycin hydrolase is a DNA-binding cysteine protease. Identification, purification, biochemical characterization. The Journal of Biological Chemistry 269: 21177–21183

Yahashi Y, Horitsu H, Kawai K, Suzuki T, Takamizawa K. 1996. Production of xylitol from D-xylose by *Candida tropicalis*: the effect of D-glucose feeding. Journal of Fermentation and Bioengineering 81: 148-152

Yan Y, Bornschreuer UT, Schmidt RD. 1999. Lipase-catalysed synthesis of vitamin C fatty acid esters. Biotechnology Letters 21: 1051 – 1054

Yancey, P.H., Clark, M.E., Hand, S.C., Bowlus, R.D., Somero, G.N. 1982. Living with water stress: evolution of osmolyte systems. Science 217, 1214–1222

Yang Y-T, Bennett GN, San K-Y. 1998. Genetic and metabolic engineering. Electronic Journal of Biotechnology 1(3): 1-8

Yokoyama S, Suzuki T, Kawai K, Horitsu H, Takamizawa K. 1995a. Purification, characterization and structure analysis of NADPH-dependent D-xylose reductases from *Candida tropicalis*. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 79: 217-223

Yokoyama S, Kinoshita Y, Suzuki T, Kawai K, Horitsu H, Takamizawa R. 1995b. Cloning and sequencing of two D-xylose reductase genes (xyra and xyrb) from *Candida tropicalis*. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 80(6) 603-605

Zabner J, Seiler MP, Launspach JL, Karp PH, Kearney WR, Look DC, Smith JJ, Welsh MJ. 2000. The osmolyte xylitol reduces the salt concentration of airway surface liquid and may enhance bacterial killing. *Proceedings of The National Academy of Sciences (USA)* 97(21): 11614-11619

Zheng W, Johnston SA. 1998 The nucleic acid binding activity of bleomycin hydrolase is involved in bleomycin detoxification. *Molecular and Cellular Biology* 18(6): 3580-3585

Zhong W, Jeffries MW, Georgopapadakou NH. 2000. Inhibition of inositol phosphorylceramide synthase by aureobasidin A in *Candida* and *Aspergillus* species. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 44(3): 651–653

ANEXO 1
Artigo Científico Publicado

RECLASSIFICATION OF *CANDIDA GUILLIERMONDII* FTI 20037 AS *CANDIDA TROPICALIS* BASED ON MOLECULAR PHYLOGENETIC ANALYSIS

Luanne Helena Augusto Lima^{1*}; Maria das Graças de Almeida Felipe²;
Fernando Araripe Gonçalves Torres¹

¹Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília, Brasília, DF, Brasil. ²Departamento de Biotecnologia, FAENQUIL, Lorena, SP, Brasil.

This paper corresponds to an "extended abstract" selected for oral presentation in the 22nd Brazilian Congress of Microbiology, held in Florianópolis, SC, Brasil, in November 17-20, 2003

ABSTRACT

Yeasts of the genus *Candida* are of clinical importance and also have many industrial applications, mainly in the food industry. The yeast *Candida guilliermondii* FTI 20037 has been extensively studied in order to establish a biotechnological process for the production of xylitol. The goal of this study was to verify the taxonomic classification of this strain based on the analysis of rDNA sequences and the *xyl1* gene. DNA fragments from these sequences were amplified by PCR and BLAST analysis revealed strong identity with the corresponding sequences from *Candida tropicalis*. Based on these results, we propose that *C. guilliermondii* FTI 20037 must be reclassified as *C. tropicalis*.

Key words: *Candida guilliermondii*, *Candida tropicalis*, ribosomal DNA, xylitol.

INTRODUCTION

Yeasts of the genus *Candida* are ascomycetes generally found in the unicellular form but many species may exhibit hyphal growth. Some yeasts of this genus are involved in important human opportunistic infections. In addition to their clinical importance, these yeasts have many industrial applications, mainly in food industry. Some species are known to produce xylitol, a product of great economic interest due to its anticariogenicity and sweetening properties which have been exploited in the production of foodstuffs, odontological products and pharmaceuticals. Among the xylitol-producing yeasts of this genus, *Candida tropicalis* and *Candida guilliermondii* are the most important, with yields above 0.7g xylitol/g xylose. Although many *Candida* species are pathogenic opportunists, the Food and Drug Administration (FDA) has permitted

C. guilliermondii (ATCC 20474) and *Candida lipolytica* to be used in food for human consumption as Secondary Direct Food Additives in the production of citric acid (5).

The aim of this study was to use a molecular biology approach to verify the classification of xylitol-producing yeast which was originally assigned as *C. guilliermondii* FTI 20037 (1). This approach involved the analysis of two ribosomal DNA sequences commonly used in molecular phylogenetic studies: internal transcribed spacer region (ITS) (6) and the 5' end of the 28S large-subunit ribosomal DNA gene (5'LSU) (4). In order to expand our phylogenetic analysis we have cloned and sequenced the *xyl1* gene which codes for xylose reductase (EC 1.1.1.21), the enzyme that converts xylose to xylitol.

MATERIALS AND METHODS

Strains and media

The yeast *C. guilliermondii* FTI 20037 has been described elsewhere (1). As a control in PCR experiments, we used DNA purified from an isolate of *C. guilliermondii* which was a kind gift of Mônica Damasceno (UFRJ). Yeasts were routinely cultivated on YPD medium (yeast extract 10 g/L, peptone 20 g/L, dextrose 20 g/L).

*Corresponding author. Mailing address: Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília. 70910-900, Brasília, DF, Brasil. E-mail: llima@unb.br

Escherichia coli DH5a was used as host for molecular cloning procedures. *E. coli* was cultivated on LB medium (tryptone 10 g/L, yeast extract 5 g/L, NaCl 10 g/L) containing ampicillin (100 mg/mL).

PCR Amplification

Yeast genomic DNA was prepared by the method described by Burke *et al.* (2). ITS region was amplified using primers ITS1 and ITS4 according to previously described protocols (6). The 5'LSU region was amplified with primers CTB6 and TW13 according to Haynes *et al.* (4). Primers used for amplification of xylose reductase gene sequences are listed in Table 1. PCR was carried out in a 25 mL volume with: 0.25 mM dNTP, 3.5 MgCl₂, 3 mM each primer, 1X *Taq* polymerase buffer, 2 U *Taq* polymerase and 0.5 mg of yeast DNA as template. Reaction mixtures were subjected to 45 amplification cycles, each cycle being: 95°C/1min; 55°C/90s; 72°C/90s. Amplicons were resolved by electrophoresis on 1% agarose gel.

DNA sequencing and analysis

PCR products were cloned into the commercial vector TOPO (Invitrogen); plasmid DNA was prepared with the Wizard Plus SV Minipreps kit (Promega). Cycle sequencing was performed using the MegaBACE Dye Terminator procedure (Amersham Biosciences) and reactions were analysed in a MegaBACE 1000 automatic sequencer (Amersham Biosciences). Sequences were analysed against GenBank using the BLAST algorithm.

RESULTS AND DISCUSSION

Amplification of rDNA and xylose reductase DNA sequences

The ITS and 5'LSU regions from *C. guilliermondii* FTI 20037 were amplified by PCR yielding fragments with the expected sizes of 524 bp and 640 bp, respectively (Fig. 1A). These fragments were cloned, sequenced and BLAST analysis revealed high identity with the corresponding sequences from *C. tropicalis* (Table 2). In order to further confirm this result we analysed the sequence of the xylose reductase gene which has been previously described for both *C. guilliermondii* and *C. tropicalis*. Primers designed to specifically amplify the *C.*

Table 1. Primers used for amplification of xylose reductase gene sequences.

Primer	Sequence (5'→3')
5XRORF	CAGATCTGCTATGTCTATCAAGTAAA
3XRORF	CAGATCTTAGATGAAAGTTGGAATCTT
5Xyl1a	CAGATCTACCATGTCTACTACTCCTAC
3Xyl1	CAGATCTTTAAACAAAGATTGGAATGT
5XylInt	TACAGATTATTTGATGGTGCTG
3XylInt	GGTTGTTGCAAGTATGGGTG

guilliermondii *xyl1* gene (5XRORF/3XRORF) were unable to yield any products when genomic DNA of *C. guilliermondii* FTI 20037 was used as template (Fig. 1B). A new set of primers were then designed based on the *xyl1* sequence described for *C. tropicalis* (Fig. 2) and PCR analysis yielded fragments of the expected sizes (Fig. 1C). The product of primers 5xyl1a/3xyl1 was sequenced and BLAST analysis revealed that it was more related to the *xyl1* gene from *C. tropicalis* (99%) than to *C. guilliermondii* (77%) (Table 2).

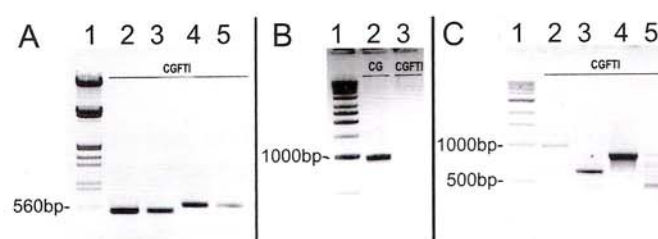


Figure 1. PCR amplification of ITS/5'LSU fragments (A) and *xyl1* (B and C). **A** - Lane 1: *Eco*RI/*Hind*III; Lanes 2 and 3: amplification with ITS1 and ITS4; Lanes 4 and 5: amplification with CTB6 and TW13. **B** - Lane 1: 1 kb ladder; Lanes 2 and 3: amplification with 5XRORF/3XRORF. **C** - Lane 1: 1 kb ladder; Lanes 2 to 5: amplification with 5xyl1a/3xyl1, 5xyl1a/3xyl1 int, 5xyl1 int/3xyl1 and 5xyl1 int/3xyl1 int, respectively. DNA templates: CG (*C. guilliermondii* – control), CGFTI (*C. guilliermondii* FTI 20037)

Table 2. Summary of the results from BLAST analysis with sequences amplified from *C. guilliermondii* FTI 20037.

Sequence	BLAST result	Identity	E-value
ITS	<i>Candida tropicalis</i> (accession # AF321539)	96%	0.0
	<i>Candida guilliermondii</i> (accession # AY168784.1)	96%	2e-85
5'LSU	<i>Candida tropicalis</i> (accession # AF267497)	86%	4e-59
	<i>Candida tropicalis</i> (accession # AB002105.1)	99%	0.0
<i>xyl1</i>	<i>Candida guilliermondii</i> (accession # AF020040.1)	77%	3e-11
	<i>Candida tropicalis</i> (accession # AF321539)	96%	0.0

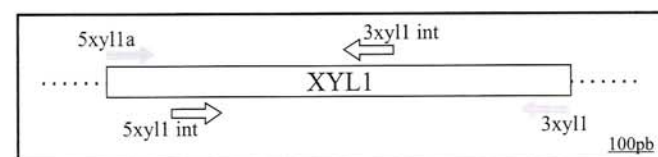


Figure 2. Relative annealing positions of the primers designed for PCR amplification of the xylose reductase (*xyl1*) gene sequences.

C. guilliermondii FTI 20037 has been extensively studied since 1988 in order to establish a biotechnological process for the production of xylitol. Based on the results presented in this work we propose that

C. guilliermondii FTI 20037 must be classified hereafter as *C. tropicalis*, an yeast that is closely related to *C. guilliermondii* and which is also known to produce xylitol.

RESUMO

• **Reclassificação de *Candida guilliermondii* FTI 20037 como *Candida tropicalis* baseada na análise filogenética molecular**

As leveduras do gênero *Candida* possuem tanto importância clínica como diversas aplicações industriais, principalmente na indústria de alimentos. A levedura *Candida guilliermondii* FTI 20037 tem sido exaustivamente estudada pois pretende-se utilizá-la no estabelecimento de um processo biotecnológico para a produção de xilitol. O objetivo deste trabalho foi verificar a classificação taxonômica desta levedura por análise de sequências do rDNA e do gene *xyl1*. Fragmentos correspondentes a estas regiões foram amplificados por PCR e a análise destas sequências por BLAST revelou alta identidade com sequências correspondentes de *Candida tropicalis*. Estes

resultados nos levam a propor que *C. guilliermondii* FTI 20037 deva ser reclassificada como *C. tropicalis*.

Palavras-chave: *Candida guilliermondii*, *Candida tropicalis*, DNA ribossômico, xilitol.

REFERENCES

1. Barbosa, M.F.S.; Medeiros, M.B.; Mancilha, I.M.; Schneider, H.; Lee, H. Screening of yeasts for production of xylitol from D-xylose and some factors which affect xylitol yield in *Candida guilliermondii*. *J. Ind. Microbiol.*, 3:241-251, 1988.
2. Burke, D.; Dawson D.; Stearns, T. *Methods in Yeast Genetics: A Cold Spring Harbor Laboratory Course Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Peter Sudbery, 2000, 205p.
3. Granström, T. *Biotechnological production of xylitol with Candida yeasts*. Espoo, 2002, 72p. (Ph.D. Thesis. Department of Chemical Technology. Helsinki University of Technology)
4. Haynes, K.A.; Westermeng, T.J.; Fell, J.W.; Moens, W. Rapid detection and identification of pathogenic fungi by polymerase chain reaction amplification of large subunit ribosomal DNA. *J. Med. Vet. Mycol.*, 33(5):319-325, 1995.
5. Kreger-Van Rij, N.J.W. *The yeasts: a taxonomic study*, 3rd Edition. Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, 1984, p. 1082.
6. White, T.J.; Bruns, T.; Lee, S.; Taylor, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In M. Innis, D. Elfand, J. Sninsky, and T. White (eds.) *PCR protocols: a guide to methods and application*. Academic Press, San Diego, 1990, p. 315-322.

ERRATUM

RECLASSIFICATION OF *CANDIDA GUILLERMONDII* FTI 20037 AS *CANDIDA TROPICALIS*
BASED ON MOLECULAR PHYLOGENETIC ANALYSIS

Luanne Helena Augusto Lima^{1*}; Maria das Graças de Almeida Felipe²;
Fernando Araripe Gonçalves Torres¹

¹Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília, Brasília, DF, Brasil. ²Departamento de Biotecnologia, FAENQUIL, Lorena, SP, Brasil.

34 (Suppl.1): 97, Table 2.

Sequence	BLAST	Identity	E-value
ITS	<i>Candida tropicalis</i> (accession # 12698685)	99%	0.0
	<i>Candida guilliermondii</i> (accession # 21666929)	96%	1e-89
5'LSU	<i>Candida tropicalis</i> (accession # 2062274)	100%	0.0
	<i>Candida guilliermondii</i> (accession # 14150789)	94%	e-166
<i>xy11</i>	<i>Candida tropicalis</i> (accession # 19120491)	98%	e-180
	<i>Candida guilliermondii</i> (accession # 4103055)	77%	3e-11

ANEXO 2
Artigo Científico Submetido



Manuscript for review

Xylitol dehydrogenase from *Candida tropicalis*: molecular cloning of the gene and structural analysis of the protein

Journal:	<i>Applied Microbiology and Biotechnology</i>
Manuscript ID:	AMB-06-13260
Manuscript Category:	Original Paper
Date Submitted by the Author:	07-Mar-2006
Complete List of Authors:	Lima, Luanne Helena Pinheiro, Cristiano Moraes, Lídia Maria Freitas, Sonia Maria Torres, Fernando
Keyword:	xylitol dehydrogenase, <i>Candida tropicalis</i> , molecular modeling, protein structure, medium chain dehydrogenase family

1
2
3
4 Xylitol dehydrogenase from *Candida tropicalis*: molecular cloning
5
6
7 of the gene and structural analysis of the protein
8
9
10

11
12 Luanne Helena Augusto Lima, Cristiano Guimarães do Amaral Pinheiro, Lídia Maria Pepe
13
14 de Moraes, Sonia Maria de Freitas, Fernando Araripe Gonçalves Torres*

15
16
17
18
19 Universidade de Brasília, Departamento de Biologia Celular, Brasília, DF, 70910-900,
20
21 Brazil.
22

23
24
25
26 *Corresponding author

27
28 e-mail: ftorres@unb.br, phone: +55-061-33072423, fax: +55-061-33498411
29
30
31
32
33
34
35

36 **Abstract**
37
38
39

40
41 Yeasts can metabolize xylose by the action of two key enzymes: xylose reductase and
42
43 xylitol dehydrogenase. In this work we present data concerning the cloning of the *XYL2*
44
45 gene encoding xylitol dehydrogenase from the yeast *Candida tropicalis*. The gene is
46
47 present as a single copy in the genome and is controlled at the transcriptional level by the
48
49 presence of the inducer xylose. *XYL2* was functionally tested by heterologous expression in
50
51 *Saccharomyces cerevisiae* in order to develop a yeast strain capable of producing ethanol
52
53 from xylose. Structural analysis of *C. tropicalis* xylitol dehydrogenase, Xyl2, suggests that
54
55 it is a member of the medium chain dehydrogenase (MDR) family. This is supported by the
56
57
58
59
60

1
2
3 presence of the amino acid signature [GHE]xx[G]xxxxx[G]xx[V] in its primary sequence
4
5 and a typical alcohol dehydrogenase Rossmann fold pattern composed by NAD⁺ and zinc
6
7 ion binding domains.
8
9

10
11
12 **Keywords:** xylitol dehydrogenase; *Candida tropicalis*; molecular modeling; protein
13
14 structure; medium chain dehydrogenase family.
15
16

17
18
19 **Abbreviation:** ORF (open reading frame)
20
21
22

23 24 25 **Introduction**

26
27
28
29 Yeasts of the genus *Candida* have been considered of great biotechnological value for more
30
31 than 30 years (Wolf, 1996). *Candida tropicalis* has gained much interest due to its ability to
32
33 convert *n*-alkanes or fatty acids into dicarboxylic acids which can be used for the
34
35 preparation of perfumes, polymers, adhesives, and macrolide antibiotics (Craft et al., 2003).
36
37 In addition, *C. tropicalis* has also been considered for the production of xylitol (Kim et al.,
38
39 2004) a pentahydroxy sugar alcohol intermediate of xylose catabolism which is used in
40
41 food and confectionery industries as a natural sweetener (Makinen, 2000).
42
43
44

45
46 The pathway of D-xylose metabolism in yeast comprises the action of three cytosolic
47
48 enzymes. First, xylose is reduced to xylitol by xylose reductase (XR) and then xylitol is
49
50 oxidized to xylulose by xylitol dehydrogenase (XDH). Xylulose is then phosphorylated by
51
52 xylulokinase (XK) to xylulose 5-phosphate which can be channeled through the pentose
53
54 phosphate pathway (Webb and Lee, 1990). Unlike yeasts, the anaerobic fungus *Piromyces*
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4 sp. metabolizes xylose via xylose isomerase (XI) which converts D-xylose to xylulose, a
5
6 pathway that resembles xylose catabolism in bacteria. (Harhangi et al., 2003).

7
8 Since D-xylose is one of the most abundant sugars present in the plant biomass, there is
9
10 great interest in improving its utilization through metabolic engineering of yeasts. This may
11
12 be accomplished by the heterologous expression of genes involved in D-xylose metabolism.
13
14 For example, it has been shown that recombinant *Saccharomyces cerevisiae* transformed
15
16 with heterologous genes for XR, XDH and XK is capable of fermenting xylose to ethanol
17
18 (Hahn-Hägerdal et al., 2001). Likewise, XI has also been expressed in *S. cerevisiae* for the
19
20 same purpose (Kuyper et al., 2005). The genes encoding the enzymes involved in fungal D-
21
22 xylose catabolism have been isolated from different yeasts (Jeffries and Shi, 1999). In *C.*
23
24 *tropicalis*, only the gene for XR has been cloned so far (Yokoyama et al., 1995). The gene
25
26 encoding XDH has been cloned from other yeasts: *Galactocandida mastotermitis*
27
28 (Habenicht, et al., 1999), *Pichia stipitis* (Shi et al., 2000), *Arxula adeninivorans* (Böer et
29
30 al., 2005) and *S. cerevisiae* (Richard et al., 1999).

31
32
33
34
35
36 XDH (xylitol:NAD⁺-2-oxidoreductase; EC 1.1.1.9) is a member of the medium chain
37
38 dehydrogenase (MDR) family and the polyol dehydrogenase (PDH) subfamily. Most PDHs
39
40 catalyze strict NAD⁺(H)-dependent interconversion between alcohols and their corresponding
41
42 ketones or aldehydes (Watanabe et al., 2005). XDHs from some filamentous fungi and yeasts
43
44 have already been studied (Persson et al., 1993; Phadtare et al., 1997; Richard et al., 1999;
45
46 Yablochkova et al., 2003; Seiboth et al. 2003) however the structural and functional
47
48 properties of yeast XDH have not yet been investigated in detail.

49
50
51
52 Here we present the results on the cloning and characterization of the *C. tropicalis*
53
54 *XYL2* gene encoding XDH, hereafter named Xyl2. Furthermore, we provide the structural
55
56 analysis of Xyl2 based on the three-dimensional model obtained by molecular modeling.
57
58
59
60

Materials and Methods

Strains and media

The yeast *C. tropicalis* FTI 20037, previously *Candida guilliermondii* FTI 20037 (Lima et al., 2003), was used as a source of genomic DNA. *C. tropicalis* was routinely cultivated on YP medium (yeast extract 1 %, peptone 2 %) supplemented with the appropriate carbon source at the concentration of 2 %. The *S. cerevisiae* strain used as a host to express *XYL2* was RE1006 (MATa *can1-100 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-52*). *S. cerevisiae* was cultivated on YPD (YP plus dextrose 2 %) or minimum medium (yeast nitrogen base without amino acids 0.67 %, dextrose 2 % supplemented with the required amino acids) media. *Escherichia coli* DH5 α was used as host for molecular cloning procedures. *E. coli* transformed with plasmids was cultivated on LB medium (tryptone 1 %, yeast extract 0.5 %, NaCl 1 %) containing ampicillin (100 μ g/mL).

PCR

Primers used for amplification of *C. tropicalis* *XYL2* gene sequences are listed in Table 1. PCR was carried out in a 25 μ L volume with: 0.2 mM dNTP, 3.5 mM MgCl₂, 3 μ M each primer, *Taq* polymerase buffer 1X, 2U *Taq* polymerase (Cenbiot, Brazil) and 0.5 μ g yeast genomic DNA as template. Reaction mixtures were subjected to 30 amplification cycles,

1
2
3
4 each cycle being: 95 °C/1 min; 55 °C/90 s; 72 °C/90 s. Amplicons were visualized by
5
6 electrophoresis on agarose gel (1 % w/v). Inverse PCR was used for the amplification of the
7
8 5' and 3' regions of *XYL2*. Briefly, total genomic DNA was digested with EcoRI (Promega)
9
10 followed by phenol/chloroform extraction and ethanol precipitation. Digested DNA was self-
11
12 ligated at a concentration of 0.5 µg/mL with 0.01 Weiss unit of T4 DNA ligase (Promega)
13
14 for 16 hours at 16 °C. The ligation mixture was extracted with phenol/chloroform,
15
16 precipitated with ethanol, and resuspended in sterile distilled water to the concentration of 20
17
18 ng/µL. Inverse PCR was carried out with primers xyl2F2 and xyl2R2 (Table 1).
19
20
21
22
23
24

25 Southern and Northern blotting

26
27
28
29 Southern and Northern blotting were carried out as described previously (Sambrook et al.,
30
31 1989). A single colony of *C. tropicalis* was inoculated in 5 mL YPD and grown for 16 hr at
32
33 30 °C and subsequently shifted to 50 mL YP supplemented with glycerol, glucose or xylose
34
35 and grown until exponential phase ($OD_{600} \sim 0.9$). Cells were harvested, washed in sterile
36
37 water, frozen, and ground in liquid nitrogen. Total RNA was purified using RNeasy mini kit
38
39 (Qiagen Inc.) and ~10 µg were analyzed by electrophoresis in an agarose-formaldehyde gel
40
41 (1 % w/v). Genomic DNA for Southern blotting was extracted as described previously
42
43 (Burke et al., 2000). Briefly, 10 µg of genomic DNA were digested with different restriction
44
45 enzymes and separated in an agarose gel (1 % w/v). Both digested DNA and total RNA were
46
47 transferred to a nitrocellulose membrane (Hybond-N) and hybridization was carried out at 55
48
49 °C. For both Southern and Northern blotting a ~1.1 kb DNA fragment containing the entire
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

XYL2 ORF was used as a probe. DNA probe labeling was performed using the AlkPhos Direct kit (GE Healthcare) and detection was done using CDP-Star (GE Healthcare).

DNA sequencing and gene analysis

PCR products were cloned into the commercial vector pCR[®]2.1-TOPO[®] (Invitrogen).

Plasmid DNA was prepared with the Wizard Plus SV Minipreps kit (Promega). Cycle sequencing was performed using the MegaBACE Dye Terminator procedure (GE

Healthcare) and reactions were analyzed in a MegaBACE 1000 automatic DNA sequencer (GE Healthcare). The web interfaces at the National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) and Broad Institute

(http://www.broad.mit.edu/annotation/fungi/candida_tropicalis/) were used to conduct the search for database similarity using BLAST search tools (Altschul et al., 1990). TATA-like elements prediction was made using the HCtata program - Hamming-Clustering Method for TATA Signal Prediction in Eukaryotic Genes

(http://l25.itba.mi.cnr.it/~webgene/wwwHC_tata.html). Poly(A) signal prediction was made using the program HCpolya - Hamming Clustering poly-A prediction in Eukaryotic Genes - (http://l25.itba.mi.cnr.it/~webgene/wwwHC_polya.html). Putative transcription factor motifs

were identified using TFSEARCH (<http://www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html>) and MatInspector (<http://www.genomatix.de/shop/index.html>) tools.

Heterologous expression of *XYL2* and enzymatic assays

1
2
3
4 In order to express *XYL2*, the entire ORF was amplified by PCR from the *C. tropicalis*
5
6 genome using primers 5xyl2 and 3xyl2 which contain BamHI sites at their ends (Table 1 and
7
8 Fig.1). The resulting amplicon was also used as probe in the Northern and Southern blotting
9
10 experiments. The *XYL2* ORF amplicon was cloned into pCR[®]2.1-TOPO[®] (Invitrogen)
11
12 resulting in plasmid pCRXYL2. This vector was cut with BamHI and the ~1.1 kb *XYL2* ORF
13
14 was gel-purified and cloned into the yeast expression vector YEp352PGK (Xavier, 2003)
15
16 linearized with BglIII. YEp352PGK is YEp352 with the *PGK1* expression cassette from
17
18 pMA91 cloned into the HindIII site. *S. cerevisiae* RE1006 was transformed as previously
19
20 reported (Elble, 1992). Transformed cells were selected on minimum medium plates lacking
21
22 uracil and supplemented with the appropriate amino acids. Transformed cells were grown to
23
24 exponential phase in 50 mL SD medium and crude extracts for enzyme measurements were
25
26 made according to Eliasson et al. (2000). *C. tropicalis* extracts were derived from cells
27
28 grown in 50 mL YP-xylose until exponential phase. Protein concentration was measured
29
30 according to Bradford (1976). XDH activity was measured as described by Lima et al.
31
32 (2004). Enzyme units were defined as μmol of NAD^+ reduced per minute at room
33
34 temperature.
35
36
37
38
39
40
41
42
43

44 Domain analysis and sequence alignment

45
46
47
48 Domain organization and protein classification of Xyl2 were checked using the tools
49
50 available at the PFAM (<http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/>) and PROSITE
51
52 (<http://www.expasy.ch>) websites, respectively. The secondary structure predictions used as
53
54 additional information to check the sequence alignments were obtained from NPS
55
56 (<http://pbil.ibcp.fr>). Homologous proteins were found from an extensive sequence
57
58
59
60

1
2
3 alignment against the protein data bank (PDB) (<http://www.rcsb.org/pdb>) using Blastp
4 software (<http://www.expasy.org/tools/blast>). Multiple sequence alignment was performed
5 using ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw>) with selected homologous proteins and
6 analyzed according to features of medium-chain and short-chain alcohol dehydrogenases.
7
8 The structural model for Xyl2 was obtained by homology modeling using the EsyPred-3D
9 server (<http://www.fundp.ac.be/urbm/bioinfo/esypred/>) (Lambert et al., 2002). All
10 structural features were analyzed using the Pymol (<http://pymol.sourceforge.net>) and VMD
11 (<http://www.ks.uiuc.edu/Research/vmd/>) programs. The Xyl2/NAD⁺/zinc complex was
12 modeled by superimposing the three-dimensional structure of human sorbitol
13 dehydrogenase (hSDH) in complex with NAD⁺ and a zinc ion. The energy refinement of
14 the Xyl2/NAD⁺/zinc complex model was performed using molecular mechanics tools
15 available on SPDBV (Swiss PDB Viewer) with Gromos96 package (Guex and Peitsch,
16 1997). Steepest descent (SD) and conjugate gradients (CG) algorithms were used
17 successively in eight minimization steps with 10,000 iterations each: three steps of SD
18 followed by five steps of CG, using the maximum derivative of 0.050 kJ/mol.
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40

41 Structural comparisons and analyses

42
43
44
45 Xyl2 structural neighbors search was performed with the Vector Alignment Search Tool
46 (VAST [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/VAST/vast.shtml>] - Gibrat et al., 1996).
47
48 The selected three-dimensional structures of alcohol dehydrogenases from PDB (1PL8,
49 1PL6, 1E3J, 1RJW, and 1LLU [Pauly et al., 2003; Banfield et al., 2001; Ceccarelli et al.,
50 2004; Levin et al., 2004]) were superimposed to Xyl2 according to the backbone of the
51 entire chain, and the NAD⁺ and zinc binding domains using MultiProt server
52
53
54
55
56
57
58
59
60

(<http://bioinfo3d.cs.tau.ac.il/MultiProt>) and the r.m.s.d. family of overall was generated.

Additionally, in order to analyze the structural changes of the domains involved in the complex with NAD⁺ and zinc, the three-dimensional structures were superimposed considering the assembly of Xyl2 residues with a cut-off of approximately 5 Å around the coenzyme and ion. For this purpose we used the CCP4 (Collaborative Computational Project, 1994) program package (<http://www.ccp4.ac.uk/main.html>).

Results

Isolation of the *C. tropicalis* XYL2 gene

In order to obtain a fragment of the XYL2 gene from *C. tropicalis* genomic DNA, degenerated primers 5XDH and 3XDH (Table 1) were designed based on the sequence alignment of homologous genes from the yeasts *G. mastotermitis* and *P. stipitis*. A ~700 bp amplicon was cloned and the identity of the XYL2 gene was confirmed by DNA sequencing. The sequence obtained showed identities of 67 % and 48 % to the XYL2 genes from *P. stipitis* and *G. mastotermitis*, respectively. Based on the obtained sequence, a pair of primers (xyl2F2 and xyl2R2; Table 1) specific to the XYL2 gene was synthesized. These primers were used to clone the 5' and 3' sequences of XYL2 by the inverse PCR procedure using ligated *Eco*RI-fragments derived from *C. tropicalis* genomic DNA as template. An amplification product of 980 bp was obtained and DNA sequencing analysis showed that it contained the remaining flanking sequences of XYL2. The *C. tropicalis* XYL2 gene consists of a 1092-pb intronless ORF which codes for a 364 residues polypeptide (Fig. 1) with a predicted molecular mass of 40 kDa and isoelectric point of 6.8. The complete XYL2 ORF

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

sequence is identical to a sequence not yet annotated from the *C. tropicalis* genome database (Broad Institute). The predicted primary sequence of the protein exhibits high identity to the XDHs from *P. stipitis* (84 %); *G. mastotermitis* (68 %); *A. adenivorans* (65 %); *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger* (64 %); *S. cerevisiae* (62 %) and *Hypocrea jecorina* (61 %).

The *XYL2* flanking regions presented several motifs frequently found in other yeast genes (Fig. 1). The consensus sequence TATAAA responsible for correct transcription initiation in *S. cerevisiae* (Rathjen and Mellor, 1990) is present at position -100 relative to the initiation codon. Four putative target sequences for Mig1 (GGGG) were observed in the *XYL2* 5' upstream sequence. Other relevant motifs detected were the binding sites for Gcr1 (ACCTTCCT) and Rap1 (ACCCA). A sequence similar to the typical polyadenylation signal TCAGTAAAGC found in yeast genes (Guo and Sherman, 1995) was observed in the 3' UTR region. A Southern blotting analysis using genomic DNA digested with different restriction enzymes and probed with *XYL2* showed that the resulting band pattern is consistent with *XYL2* being a single-copy gene (Fig. 2a).

XYL2 regulation and heterologous expression

Transcriptional regulation of *XYL2* by the carbon source was investigated in *C. tropicalis* by Northern blotting analysis. The data shows that the expression of *XYL2* is adaptive with xylose as the prime inducer of *XYL2* expression. Glycerol promoted basal levels of expression and whereas glucose repressed *XYL2* expression (Fig. 2b). The *in vivo* functional analysis of *XYL2* was performed in *S. cerevisiae*. The *XYL2* ORF was cloned into YEppGK resulting in plasmid YEppXYL2 (Fig. 3). The gene was placed under the

1
2
3 control of the strong constitutive *PGK1* promoter from *S. cerevisiae* and XDH activity was
4 determined in crude yeast extracts. The XDH activity for a control *S. cerevisiae* strain
5 transformed with YEpPGK was 0.018 U/mg whereas a recombinant strain expressing *XYL2*
6 showed activity of 0.159 U/mg.
7
8
9
10
11
12
13
14

15 Structural and functional analysis of Xyl2

16
17
18
19
20 Using the VAST search tool, an amino acid sequence alignment with selected structural
21 templates related to Xyl2 was obtained (Fig. 4 and Table 2). According to this alignment,
22 hSDH (1PL6 and 1PL8) and KR (1E3J-A) show more sequence identity with Xyl2 (Table
23 2). In addition, PROSITE sequence analysis indicated that Xyl2 presents the zinc-
24 containing alcohol dehydrogenases signature [GHE]xx[G]xxxxx[G]xx[V], the active site
25 for one zinc ion (residues Cys⁴¹, His⁶⁶, Glu⁶⁷, and Glu¹⁵⁹) and the active site for NAD⁺
26 binding (residues Val¹⁸⁷, Asp²⁰⁷, Lys²¹², Cys²⁵², Lys²⁶⁷, Asn²⁷⁷ and Ser²⁹⁹) (Fig. 4). The
27 structural model of Xyl2 obtained by molecular homology modeling in the EsyPred 3D
28 server is presented in Fig. 5 with both NAD⁺ and zinc domains presented separately. This
29 model consists of one polypeptide chain with 364 residues structurally organized in a
30 classical α/β Rossmann fold pattern - commonly found in the MDR family (Pauly et al.,
31 2003) - organized in two β -barrel domains: the coenzyme binding (residues 163-300) and
32 catalytic (residues 1-162, 301-364) domains (Fig. 5a and 5c). The close three-dimensional
33 structural relationship between Xyl2 and all analyzed structures calculated by VAST
34 algorithm was evidenced by the C _{α} superimposed models (data not shown) and the r.m.s.d.
35 values presented in Table 2.
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

The NAD⁺ and zinc ion bound to Xyl2 model obtained by docking and minimization procedures (Fig. 5b and 5d) is similar to ADHs related to the MDR family as judging by the low r.m.s.d. values of 0.5-1.2 Å (NAD⁺) and 0.3-2.0 Å (zinc), respectively. All MDR selected by VAST search bind NAD⁺ or NADP⁺ in the same structural region and most contain a bound zinc ion that is essential for catalysis. The highest structural similarity is observed for hSDH/NAD⁺, hSDH/NADH/Inhibitor complex and KR, with r.m.s.d. of 0.6-0.8 Å, whereas the ADH from *Bacillus stearothermophilus* and the NAD⁺/substrate ADH from *Pseudomonas aeruginosa* shared the lowest structural similarity, with r.m.s.d. of 1.7 Å (Table 2). NAD⁺ interaction in Xyl2 could occur mainly with the side chains of the Val¹⁸⁷, Asp²⁰⁷, Lys²¹², Cys²⁵², Asn²⁷⁷ and Ser²⁹⁹ into a surface crevice formed by loops protruded from the top of six β-strands, a domain formed by parallel β-strand sheets (residue 180 to 310) (Fig. 5a). As proposed by the Xyl2 structural model, the interface between NAD⁺ and Xyl2 (Fig. 5b) is characterized by the following interaction: the critical conserved Asp²⁰⁷ residue, which determines the specificity for NAD⁺ in all members of the MDR family, makes hydrogen bonds to the nitrogen AN3 of the adenine ribose; the amino group of Lys²¹² binds to the 3' oxygen of the ribose ring; the NH group and carbon CG2 of Val¹⁸⁷ neutralize two of the phosphate oxygens in NAD⁺; the Cys²⁵² interacts with the NC4 of the ribose ring and the oxygen group of Ser²⁹⁹ as well the nitrogen group of Ans²⁷⁷ bind to the NN7 of nicotinamide amine group of the coenzyme.

As shown in the sequence alignment (Fig. 4) and in the structural model (Fig. 5), the catalytic domain of Xyl2 contains a single zinc ion binding site located at the bottom of the cleft between the NAD⁺ binding and catalytic domains. The conserved residues participating in this interaction in hSDH are Cys⁴⁴, His⁶⁹, Glu⁷⁰, Glu¹⁵⁵, and a water molecule (Pauly et al., 2003). In Xyl2, the zinc ion presents coordination with His⁶⁶, Glu⁶⁷,

1
2
3 and Glu¹⁵⁹ without the water molecule since the minimized model was obtained in a
4
5 vacuum system (Fig. 5c). In this case, the hydrogen bond between Glu¹⁵⁹ and the zinc atom
6
7 occurs directly without the participation of related Cys found in hSDH. The
8
9
10 superimposition of Xyl2 to these structural neighbors indicates that the active binding site
11
12 for NAD⁺ and zinc ion in both coenzyme binding and catalytic domains retains identical
13
14 three-dimensional arrangement and fulfils the distance requirements for interaction of both
15
16 components.
17

18
19
20 The structural features proposed above were corroborated by experimental data
21
22 obtained from enzymatic assays in which it was demonstrated the requirements of NAD⁺
23
24 (Silva et al., 1996) and zinc (Fig. 6a and 6b) for Xyl2 activity in *C. tropicalis*. The XDH
25
26 assay is normally carried out without zinc since it is assumed that the enzyme is already
27
28 complexed with this ion in crude extracts. The effect of EDTA, a divalent chelating agent,
29
30 was followed by measuring the reduction of NAD⁺ at 340 nm (Fig. 6a). EDTA 1 mM had a
31
32 strong effect on Xyl2 decreasing its activity by ~90 % (Fig. 6b).
33
34
35
36
37
38

39 Discussion

40
41
42
43 In this work we have presented data concerning the cloning of the *C. tropicalis* *XYL2* gene
44
45 which codes for a key enzyme in xylose metabolism in yeasts. The gene showed several
46
47 features in common with other fungal XDHs. The protein coded by *XYL2* is closely related
48
49 to its functional homologue from *P. stipitis* (84 % similarity) molecular mass and
50
51 isoelectric point quite similar to those of other fungal XDHs (Shi et al., 2000; Seiboth et al.,
52
53 2003). The *XYL2* gene is present as a single copy in the *C. tropicalis* genome, an
54
55 observation also reported for the homologous genes from *A. adenivorans* (Böer et al.,
56
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

2005) and *H. jecorina* (Seiboth et al., 2003). Several regulatory protein binding sites were identified in the *XYL2* promoter region including those for Gcr1 and Rap1 - which are essential to achieve high-level activation of glycolytic genes in *S. cerevisiae* (Sasaki et al., 2005) - and Mig1, a Cys2-His2 zinc finger protein that mediates glucose repression of several genes by binding to their promoters and recruiting the general repression complex (De Vit et al., 1997).

It has previously been shown that XR and XDH activities are induced by xylose and inhibited by hexoses (Skoog and Hahn-Hägerdal, 1988; Webb and Lee, 1992). In *C. tropicalis*, *XYL2* was induced by xylose and repressed by glucose (Fig 2b), an expression pattern also described for the XDH genes from *H. jecorina* and *A. adenivorans* (Seiboth et al., 2003; Böer et al., 2005) and for two other genes of the xylose catabolic pathway from *A. niger*: XR and xylulose-5-phosphate kinase (Hasper et al., 2000; van Peij et al., 1998). The lack of *XYL2* expression on glucose is an evidence of glucose repression, which is supported by the presence of Mig1 binding sites in the 5' region of *XYL2*.

The cloning and successful heterologous expression of *XYL2* represent the first steps towards metabolic engineering in *S. cerevisiae* using genes derived from *C. tropicalis*. Walfridsson et al. (1997) have expressed in *S. cerevisiae* the genes for XR and XDH from *P. stipitis* and the resulting strain was able to produce ethanol from xylose. The gene coding XR from *C. tropicalis* FTI 20037 has recently been cloned in our lab (data not shown) and the construction of a *S. cerevisiae* strain expressing both XR and XDH is currently underway. Furthermore, the production of xylitol in *C. tropicalis* FTI 20037 - which is recognized as one of the most promising systems for the production of xylitol (Silva et al., 1996; Oh and Kim, 1998) - could be further improved by manipulating the expression of XR and XDH in this organism.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Structural neighbors search revealed that Xyl2 is structurally related to dehydrogenases which catalyze the oxidation of sorbitol to fructose using NAD^+ as a coenzyme. Sequence alignment also showed that Xyl2 has the typical signature of alcohol dehydrogenases belonging to the MDR family and the binding sites for NAD^+ and one zinc ion. In general, dehydrogenases have different but conserved amino acids that bind NAD^+/NADH or $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ coenzyme complexes, and differ in the number of zinc-binding sites. In KR (Banfield et al., 2001), which binds NADP^+ , there are two zinc-binding sites instead of one as identified in Xyl2 and in all members of the MDR family (Fig. 4). Moreover, Asp²⁰⁷, in Xyl2, and Ala¹⁹⁹, in KR, are crucial to determine the coenzyme specificity for NAD^+ and NADP^+ , respectively (Fig. 4).

The predicted specificity for NAD^+ proposed in this model is in agreement with the biochemical characterization of Xyl2 which showed that it has higher affinity for NAD^+ over NADP^+ (Silva et al., 1996; Takamizawa et al., 2000). The requirement for zinc was demonstrated by enzymatic assays in the presence of EDTA which showed strong inhibition on Xyl2 activity. The same feature was observed with XDH from *G. mastotermitis*, a zinc-dependent tetrameric polyol dehydrogenase (Lunzer et al., 1998). Based on the high structural similarities of the models presented on Table 2 and the previously and current experimental data which showed that Xyl2 is a NAD^+ /zinc-binding protein (Fig. 6a and 6b), we propose that Xyl2 from *C. tropicalis* belongs to the MDR family.

Acknowledgments

1
2
3 The authors thank PIBIC/CNPq for partial support of this work and Hugo Costa Paes for
4 text draft revision.
5
6
7
8
9

10 **References**

11
12
13
14
15 Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990) Basic local alignment
16 search tool. *J Mol Biol* 215:403-410
17

18
19
20
21
22 Banfield MJ, Salvucci ME, Baker EN (2001) Crystal structure of the NADP(H) dependent
23 ketose reductase from *Bemisia argentifolii* at 2.3 Å resolution. *J Mol Bio* 306: 239-250
24
25

26
27
28
29 Böer E, Wartmann T, Schmidt S, Bode R, Gellissen G, Kunze G (2005) Characterization of
30 the AXDH gene and the encoded xylitol dehydrogenase from the dimorphic yeast
31 *Arxula adenivorans*. *Antonie van Leeuwenhoek* 87:233-243
32
33
34
35

36
37
38
39 Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram
40 quantities of protein utilizing the principle for protein-dye binding. *Anal Biochem*
41
42 72:248-254
43
44
45

46
47
48 Burke D, Dawson D, Stearns T (2000) *Methods in Yeast Genetics: A Cold Spring Harbor*
49
50 *Laboratory Course Manual*, 205 pp Cold Spring Harbor Laboratory Press. Peter
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
Sudbery, New York

1
2
3 Ceccarelli C, Liang ZX, Strickler M, Prehna G, Goldstein BM, Klinman JP, Bahnson BJ

4
5 (2004) Crystal structure and amide H/D exchange of binary complexes of alcohol
6
7 dehydrogenase from *Bacillus stearothermophilus*: insight into thermostability and
8
9 cofactor binding. *Biochem* 11:5266-5277
10
11

12
13
14
15 Collaborative computational project, number 4 (1994) The CCP4 Suite: Programs of
16
17 Protein Crystallography. *Acta Cryst* D50:760-763
18
19

20
21
22 Craft DL, Madduri KM, Eshoo M, Wilson CR (2003) Identification and characterization of
23
24 the CYP52 family of *Candida tropicalis* ATCC 20336, important for the conversion of
25
26 fatty acids and alkanes to alpha,omega-dicarboxylic acids. *Appl Environ Microbiol*
27
28 69:5983-5891
29
30

31
32
33
34 De Vit MJ, Waddle JA, Johnston M (1997) Regulated nuclear translocation of the Mig1
35
36 glucose repressor. *Mol Biol Cell* 8:1603-1618
37
38

39
40
41 Eliasson A, Christensson C, Wahlbom CF, Hahn-Hägerdal B (2000) Anaerobic Xylose
42
43 fermentation by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* carrying *XYL1*, *XYL2*, and
44
45 *XKSI* in mineral medium chemostat cultures. *Appl Environ Microbiol* 66:3381-3386
46
47
48

49
50 Elble R (1992) A simple and efficient procedure for transformation of yeasts.

51
52
53 *Biotechniques* 13:18-20
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Gibrat JF, Madej T, Bryant SH (1996) Surprising similarities in structure comparison. *Curr Opin Struct Biol* 6:377-385

Guo Z, Sherman F (1995) 3'-end-forming signals of yeast mRNA. *Mol Cell Biol* 15:5983-5990

Guex N, Peitsch MC (1997) Swiss-Model and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis* 18:2714-2723

Habenicht A, Motejadded H, Kiess M, Wegerer A, Mattes R (1999) Xylose utilization: cloning and characterization of the xylitol dehydrogenase from *Galactocandida mastotermitis*. *Biol Chem* 380:1405-1411

Hahn-Hägerdal B, Wahlbom CF, Gardonyi M, van Zyl WH, Cordero Otero RR, Jonson LJ (2001) Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for xylose utilization. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 73:53-84

Harhangi HR, Akhmanova AS, Emmens R, van der Drift C, de Laat WT, van Dijken JP, Jetten MS, Pronk JT, Op den Camp HJ. (2003) Xylose metabolism in the anaerobic fungus *Piromyces* sp. strain E2 follows the bacterial pathway. *Arch Microbiol* 180:134-141

- 1
2
3
4 Hasper AA, Visser J, de Graaff LH (2000) The *Aspergillus niger* transcriptional activator
5
6 XlnR, which is involved in the degradation of the polysaccharides xylan and cellulose,
7
8 also regulates D-xylose reductase gene expression. Mol Microbiol 36:193-200
9
10
11
12
13 Jeffries TW, Shi NQ (1999) Genetic engineering for improved xylose fermentation by
14
15 yeasts. Adv Biochem Eng Biotechnol 65:117-161
16
17
18
19
20 Kim TB, Lee YJ, Kim P, Kim CS, Oh DK. (2004) Increased xylitol production rate during
21
22 long-term cell recycle fermentation of *Candida tropicalis*. Biotechnol Lett 26:623-627
23
24
25
26
27 Kuyper M, Hartog MM, Toirkens MJ, Almering MJ, Winkler AA, van Dijken JP, Pronk JT
28
29 (2005) Metabolic engineering of a xylose-isomerase-expressing *Saccharomyces*
30
31 *cerevisiae* strain for rapid anaerobic xylose fermentation. FEMS Yeast Res 5:399-409
32
33
34
35
36 Lambert C, Leonard N, De Bolle X, Depiereux E (2002) ESyPred3D: Prediction of proteins
37
38 3D structure. Bioinformatics 18:1250-1256
39
40
41
42
43
44 Levin I, Meiri G, Peretz M, Burstein Y, Frolow F (2004) The ternary complex of
45
46 *Pseudomonas aeruginosa* alcohol dehydrogenase with NADH and ethylene glycol.
47
48 Protein Sci 13:1547-1556
49
50
51
52
53 Lima LHA, Felipe MGA, Torres FAG (2003) Reclassification of *Candida guilliermondii*
54
55 FTI 20037 as *Candida tropicalis* based on molecular phylogenetic analysis. Braz J
56
57 Microbiol 34:96-98
58
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Lima LHA, Felipe MGA, Vitolo M, Torres FAG (2004) Effect of acetic acid present in bagasse hydrolysate on the activities of xylose reductase and xylitol dehydrogenase in *Candida guilliermondii*. Appl Microbiol Biotechnol 65:734-738

Lunzer R, Mamnun Y, Haltrich D, Kulbe KD, Nidetzky B (1998) Structural and functional properties of a yeast xylitol dehydrogenase, a Zn²⁺-containing metalloenzyme similar to medium-chain sorbitol dehydrogenases. Biochem J 336:91-99

Makinen KK (2000) Can the pentitol-hexitol theory explain the clinical observations made with xylitol? Med Hypotheses 54:603-613

Oh DK, Kim SY (1998) Increase of xylitol yield by feeding xylose and glucose in *Candida tropicalis*. Appl Microbiol Biotechnol 50:419-25

Pauly TA, Ekstrom JL, Beebe DA, Chrnyk B, Cunningham D, Griffor M, Kamath A, Lee SE, Madura R, Mcguire D, Subashi T, Wasilko D, Watts P, Mylari BL, Oates PJ, Adams PD, Rath VL (2003) X-Ray crystallographic and kinetic studies of human sorbitol dehydrogenase. Structure 11:1071-1085

Persson B, Hallborn J, Walfridsson M, Hahn-Hägerdal B, Keranen S, Penttila M, Jornvall H (1993) Dual relationships of xylitol and alcohol dehydrogenases in families of two protein types. FEBS Lett 324:9-14

- 1
2
3 Phadtare, S.U., Rawat, U.B., Rao, M.B. (1997) Purification and characterization of xylitol
4 dehydrogenase from *Neurospora crassa*. FEMS Microbiol Lett 146, 79-83.
5
6
7
8
9
10 Rathjen J, Mellor J (1990) Characterization of sequences required for RNA initiation from
11 the PGK promoter of *Saccharomyces cerevisiae*. Nucleic Acids Res 18:3219-3225
12
13
14
15
16
17 Richard P, Toivari MH, Penttila M (1999) Evidence that the gene YLR070c of
18 *Saccharomyces cerevisiae* encodes a xylitol dehydrogenase. FEBS Lett 457:135-138
19
20
21
22
23
24 Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed.
25 Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, New York
26
27
28
29
30
31 Sasaki H, Kishimoto T, Mizuno T, Shinzato T, Uemura H (2005) Expression of GCR1, the
32 transcriptional activator of glycolytic enzyme genes in the yeast *Saccharomyces*
33 *cerevisiae*, is positively autoregulated by Gcr1p. Yeast 22:305-319
34
35
36
37
38
39
40
41 Seiboth, B, Hartl, L, Pail, M, Kubicek CP (2003) D-Xylose metabolism in *Hypocrea*
42 *jecorina*: loss of the xylitol dehydrogenase step can be partially compensated for by
43 lad1-encoded l-arabinitol-4-dehydrogenase. Eukaryot Cell 2:867-875
44
45
46
47
48
49
50 Shi NQ, Prahl K, Hendrick J, Cruz J, Lu P, Cho JY, Jones S, Jeffries T (2000)
51 Characterization and complementation of a *Pichia stipitis* mutant unable to grow on D-
52 xylose or L-arabinose. Appl Biochem Biotechnol 84-86:201-216
53
54
55
56
57
58
59
60

- 1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
- Silva SS, Vitolo M, Pessoa-Junior A, Felipe MGA (1996) Xylose reductase and xylitol dehydrogenase activities by xylose-fermenting *Candida guilliermondii*. J Basic Microbiol 36:187-191
- Skoog K, Hahn-Hägerdal B (1988) Xylose fermentation. Enzyme Microb Technol 10:66-80
- Takamizawa K, Uchida S, Hatsu M, Suzuki T, Kawai K (2000) Development of a xylitol biosensor composed of xylitol dehydrogenase and diaphorase. Can J Microbiol 46:350-357
- van Peij NN, Gielkens MM, de Vries RP, Visser J, de Graaff LH (1998) The transcriptional activator XlnR regulates both xylanolytic and endoglucanase gene expression in *Aspergillus niger*. Appl Environ Microbiol 64:3615-3619
- Walfridsson M, Anderlund M, Bao X, Hahn-Hägerdal B (1997) Expression of different levels of enzymes from the *Pichia stipitis* *xyl1* and *xyl2* genes in *Saccharomyces cerevisiae* and its effects on product formation during xylose utilisation. Appl Microbiol Biotechnol 48:218-224
- Watanabe S, Kodaki T, Makino K (2005) Complete reversal of coenzyme specificity of xylitol dehydrogenase and increase of thermostability by the introduction of structural zinc. J Biol Chem 280:10340-10349

- 1
2
3
4 Webb SR, Lee H (1990) Regulation of D-xylose utilization by hexoses in pentose-
5 fermenting yeasts. *Biotechnol Adv* 8:685-697
6
7
8
9
10 Webb SR, Lee H (1992) Characterization of xylose reductase from the yeast *Pichia stipitis*:
11 evidence for functional thiol and histidyl groups. *J Gen Microbiol* 138:1857-1863
12
13
14
15
16
17 Wolf K (ed) (1996) Nonconventional yeasts in biotechnology. A handbook. Springer-
18 Verlag. Berlin and Heidelberg
19
20
21
22
23
24 Xavier MAS (2003) Desenvolvimento de tecnologia para produção de calcitonina humana
25 por engenharia genética. PhD thesis. Universidade de Brasília. Brazil
26
27
28
29
30
31 Yablochkova EN, Bolotnikova OI, Mikhailova NP, Nemova NN, Ginak A (2003) The
32 activity of xylose reductase and xylitol dehydrogenase in yeasts. *Microbiology* 72:414-
33 417
34
35
36
37
38
39
40
41 Yokoyama S, Kinoshita Y, Suzuki T, Kawai K, Horitsu H, Takamizawa R (1995) Cloning
42 and sequencing of two D-xylose reductase genes (xyra and xyrb) from *Candida*
43 *tropicalis*. *J Ferment Bioeng* 80:603-605
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Figure Legends

Fig. 1 Nucleotide sequence of the *XYL2* gene from *C. tropicalis* and its deduced amino acid sequence. The 5′/3′ untranslated and coding regions are represented by small letters and capital letters, respectively, and the asterisk indicates the stop codon. Arrows indicate the annealing position and direction of extension of the primers used in this work. Nucleotides in the filled box represent the proposed TATA box in the 5′ region, and the polyadenylation site in the 3′ region. The putative zinc-ADH signature (positions 65-79) and the NAD⁺-binding site (positions 179-208) are in bold. Binding sites for transcriptional regulators are indicated by the underlines. The sequence was deposited on GenBank under the Accession No. DQ220745.

Fig. 2 Copy number and expression analysis of *XYL2*. **a** Southern blotting of *C. tropicalis* DNA digested with EcoRI (lane 1), EcoRV (lane 2), HindIII (lane 3). **b** Northern blotting analysis of *XYL2* expression in different carbon sources. 28S ribosomal RNA was used as a loading control.

Fig. 3 Physical map of plasmid YE_pXYL2 used to express *XYL2* in *S. cerevisiae* RE1006. Only relevant restriction sites are shown. p^{PGK} and TT represent the promoter and transcription terminator sequences of the yeast *PGK1* gene, respectively.

1
2
3 **Fig. 4** Sequence alignment of Xyl2 and members of the medium-chain zinc-binding family.

4
5 Amino acids within the gray box represent the signature of alcohol dehydrogenases
6
7 belonging to the MDR family. The residues involved in binding the catalytic zinc are
8
9 indicated by arrows. The second structural zinc binding residues of KR (1E3J) are shown
10
11 within squares and those residues involved in the coenzyme binding, for all MDR
12
13 members, are indicated by asterisks. 1PL8-D: hSDH/NAD⁺; 1PL6-D:
14
15 hSDH/NADH/Inhibitor complex; 1E3J-A: Ketone Reductase (KR); 1RJW-D: Alcohol
16
17 Dehydrogenase (ADH); 1LLU-H: ADH/NAD⁺/Substrate complex.
18
19
20
21
22
23
24

25
26 **Fig. 5** Three-dimensional model for Xyl2 obtained by molecular modeling. **a** NAD⁺
27
28 domain, represented in cartoon diagram, constituted by motifs α and β in a typical Rossmann
29
30 fold pattern. **b** Detail of the NAD⁺ binding site in which residues participating in the
31
32 interaction are Val¹⁸⁷, Asp²⁰⁷, Lys²¹², Cys²⁵², Asp²⁷⁷ and Ser²⁹⁹. **c** Zinc binding domain with
33
34 residues interacting with the zinc represented in dark gray. **d** Detail of the zinc binding-site
35
36 showing the coordination of zinc with Glu⁶⁷, His⁶⁶ and Glu¹⁵⁹ residues.
37
38
39
40
41
42

43 **Fig 6** Effect of EDTA on the activity of Xyl2. **a** Measurement of NAD⁺ reduction ($A_{340\text{nm}}$)
44
45 in the presence (closed triangles) or absence (closed circles) of EDTA 1mM. **b** XDH
46
47 activity in different concentrations of EDTA.
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

```

-342 accttccctattgtttgaaaccggaaaaataatattttgtatggagatcctcaattt
      Ger1
-282 cgggaaattgtagattaccttccctctgcaattacgcattgctactattttgttttt
      Mig1 Rap1
-222 agtttgggttttctttgtattgcttcacgtatgggtattatactttgtgtacactgtt
-162 catttactcccccaagttttcctctccccctccatttataatgtatgaattaattatata
      Mig1 Mig1
-102 aatactgccgcaaatttccccaggttgaaattttttgttacttctaagttttcttatt
      Mig1 M T A N P S
-42 tcttttcattcaataactttcaattctcaaaatacaaaagtcATGACTGCAAAACCCATCA
      5xy12
7 L V L N K V D D I S F E E Y E A P K L E
19 TTAGTCTTAAACAAAGTTGACGATATTCCCTTGAAGAATACGAAGCTCCAAACTCGAA
27 S P R D V I V E V K K T G I C G S D I H
79 TCACCAAGAGATGTCATTGTTGAAGTTAAGAAAACCTGGTATCTGTGGATCAGATATCCAT
47 Y Y A H G S I G P F I L R K P M V L G H
159 TACTATGCCCATGGTCAATTGGTCCATTTATTTAAGAAAACCAATGGTTTAGGTCAC
      5XDH
67 E S A G V V S A V G S E V T N L K V G D
219 GAATCAGCAGGTGTTGTTCTGCTGCGGAAGTGAAGTTACCAACTGAAGTTGGTGAT
87 R V A I E P G V P S R F S D E T K S G H
279 AGAGTGGCATTGAACCTGGTGTACCTCAAGATTTAGTGATGAGACCAAACTCTGGTCAT
107 Y H L C P H M S F A A T P P V N P D E P
339 TATCATTGTGCCACATATGTCTTTTGCCGCCACCCCACCAGTTAACCCAGATGAACCA
      xy12R2
127 N P Q G T L C K Y Y R V P C D F L F K L
399 AATCCTCAAGTACTTTATGTAATACTACAGAGTCCCATGTGACTTTTATTCAAATTA
147 P D H V S L E L G A M V E P L T V G V H
459 CCAGATCATGTTCTTTGGAGTTGGGTGCTATGGTTGAACCATAACTGTTGGTGTCCAC
167 G C K L A D L K F G E D V V V F G A G P
519 GGTGTAAATTGGCTGATTGAAATTTGGTGAAGACGTTGTTGTTTGGTGCCGGTCCA
187 V G L L T A A V A R T I G A K R V M V V
579 GTTGGTTTGTGACCGCTGCCGTTGCTAGAACAATTGGTGTAAAAGAGTCATGGTTGTT
207 D I F D N K L K M A K D M G A A T H I F
639 GATATTTTGACAACAATGAAGATGGCAAAAGATATGGGTGCTGCCACTCATATTTTC
227 N S K T G G D Y Q D L I K S F D G V Q P
699 AACTCAAAAACCGTGGTGATATCAAGATTTGATCAAGAGTTTGGTGGTTCACCT
247 S V V L E C S G A Q P C I Y M G V K I L
759 TCAGTGTTTTGAATGTAGTGCTCAACCATGTATCTATATGGGTGTTAAAATCTTG
      xy12F2
267 K A G G R F V Q I G N A G G D V N F P I
819 AAAGCTGGTGGTAGATTTGTTCAAATTTGTAATGCCGGTGGTATGTCATTTCCCAATT
287 A D F S T R E L A L Y G S F R Y G Y G D
879 GCTGATTTCTCAACCAGAGAATTGGCATTATATGGTCTTTCAGATATGGTTACGGTGC
      3XDH
307 Y Q T S I D I L D R N Y V N G K D K A P
939 TACCAACTCAATTGATATTTAGACAGAACTACGTCAATGGTAAAGACAAGCACCA
327 I N F E L L I T H R F K F K D A I K A Y
999 ATTAATTCGAATTGTTGATTACTCACAGATTCAAGTTTAAAGATGCCATCAAAGCCTAT
347 D L V R A G N G A V K C L I D G P E *
1059 GATTTGGTCAGAGCAGGAATGGTGTCAATGTTAATTGATGGTCCAGAAATAGagg
      3xy12
1109 tatatagtattagaaaagaatatacagtatatatatatatatgtgaataattcatgc
1169 ttaagtttaatatcagtaagcatctactataaatcca

```

Fig. 1 Nucleotide sequence of the *XYL2* gene from *C. tropicalis* and its deduced amino acid sequence. The 5′/3′ untranslated and coding regions are represented by small letters and capital letters, respectively, and the asterisk indicates the stop codon. Arrows indicate the annealing position and direction of extension of the primers used in this work. Nucleotides in the filled box represent the proposed TATA box in the 5′ region, and the polyadenylation site in the 3′ region. The putative zinc-ADH signature (positions 65–79) and the NAD⁺-binding site (positions 179–208) are in bold. Binding sites for transcriptional regulators are indicated by the underlines. The sequence was deposited on GenBank under the Accession No. DQ220745.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

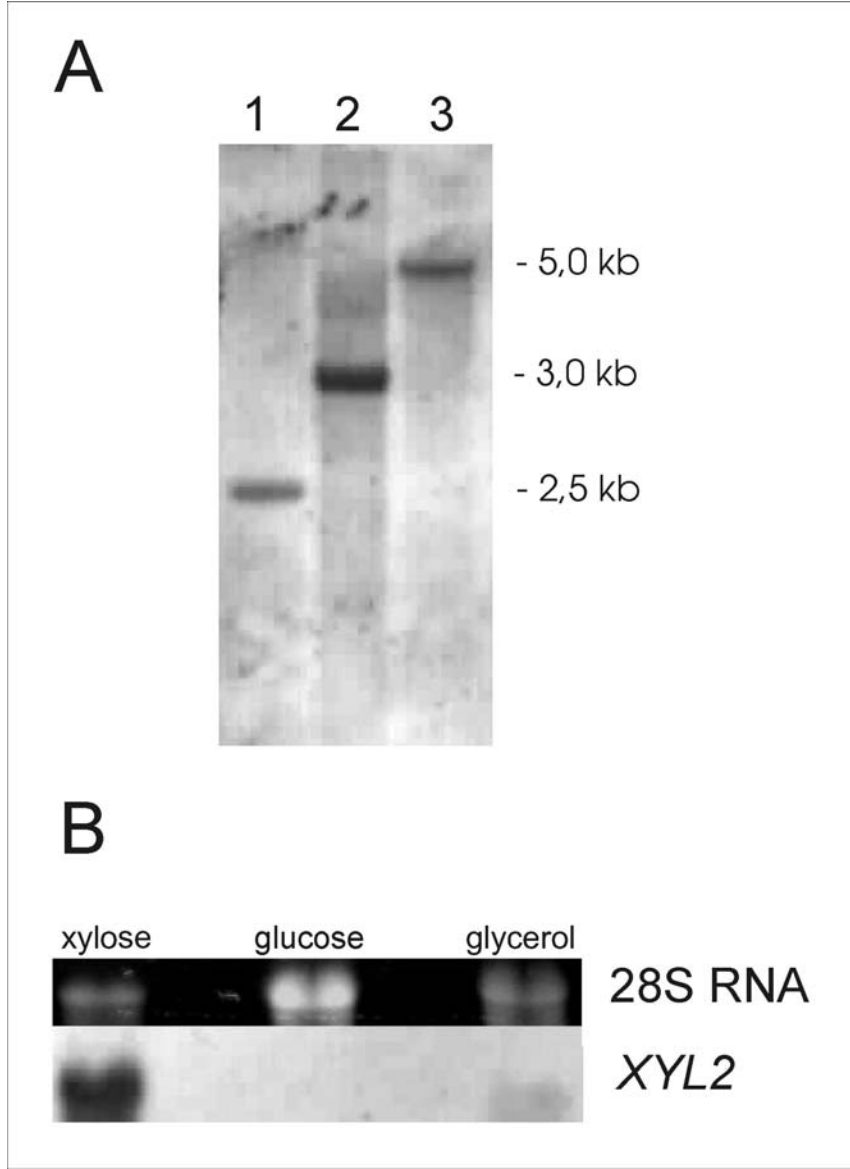


Fig. 2 Copy number and expression analysis of *XYL2*. a Southern blotting of *C. tropicalis* DNA digested with EcoRI (lane 1), EcoRV (lane 2), HindIII (lane 3). b Northern blotting analysis of *XYL2* expression in different carbon sources. 28S ribosomal RNA was used as a loading control.

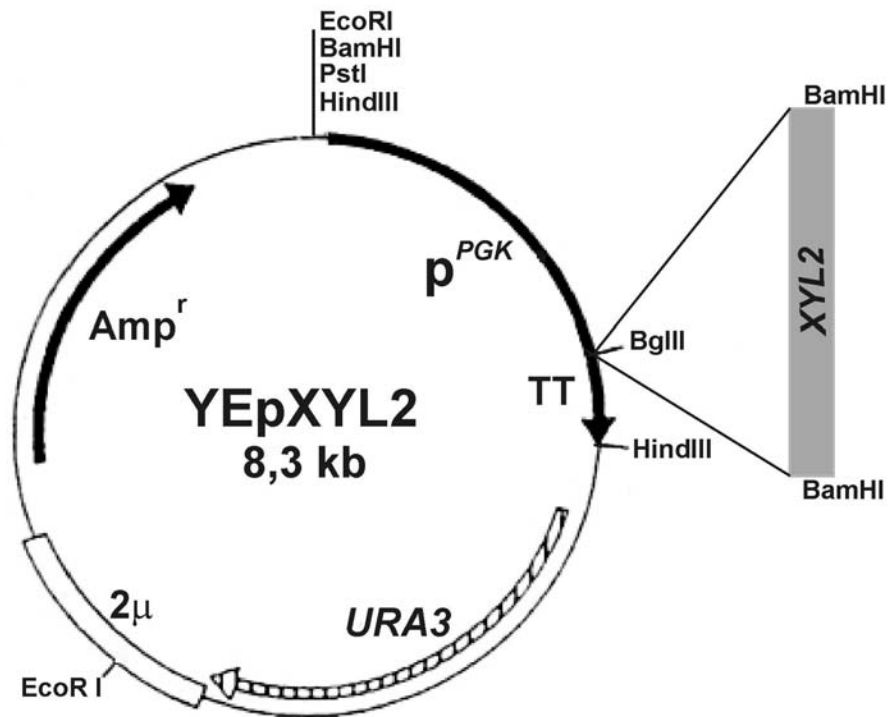


Fig. 3 Physical map of plasmid YEpXYL2 used to express *XYL2* in *S. cerevisiae* RE1006. Only relevant restriction sites are shown. p^{PGK} and TT represent the promoter and transcription terminator sequences of the yeast *PGK1* gene, respectively.

1			
2			
3			
4			
5			
6			
7			
8			
9			
10			
11	Xyl2	----MTANPSLVLNKVVDDISFEEYEAPKLES PRDVI VE VKKTGI CGSDIHYAHGSIGFF 56	↓
12	pdb 1PL8 D	AAAAKPNLNSLVVHGPGLRLENYPIPEP-GPNEVLLRMHHSVGI CGSDVHYWEYGRIGNF 59	
13	pdb 1PL6 D	AAAAKPNLNSLVVHGPGLRLENYPIPEP-GPNEVLLRXHSVGI CGSDVHYWEYGRIGNF 59	
14	pdb 1E3J A	---MASDNL SAVLYKQNDLRLEQRPIPEP-KEDEVLLQMAVVGI CGSDVHYEHGRIADF 56	
15	pdb 1RJW D	-----MKAAVVEQFKPEPLKI KEVEKPTI-SYGEVLVRIKACGVCHTDLHAAHG--DWPV 51	
16	pdb 1LLU H	MTLPQTMKAAVVHAYGAPLRIEEVKVPPLP-GPGQVLVKIEASGVCHTDLHAAEG--DWPV 57	
17		↓↓	
18	Xyl2	ILRKPMVL GHEASGVVSAVGS EVTNLKVGDRAVAIEPG-VPSRFSDETKSGHYHLCPHMSF 115	
19	pdb 1PL8 D	IVKKPMVL GHEASGTVEKVGSSV KHLKPGDRVAIEPG-APRENDEFCKMGRYNLSPSIF 118	
20	pdb 1PL6 D	IVKKPXVL GHEASGTVEKVGSSV KHLKPGDRVAIEPG-APRENDEFCKXGRYNLSPSIF 118	
21	pdb 1E3J A	IVKDPMVI GHEASGT VVVKV GKNV KHLKKGDRVAIEPG-V GRGQ FG KEGKYN IG PD LTF 115	
22	pdb 1RJW D	KPKLPLIP GHEGVG IVVEV GP V TH LKVGD RVGI PWLYSACGHCDYCLSGQETLCEHQKN 111	
23	pdb 1LLU H	KPPLPFIP GHEGVG YVAAV GS GVTRVKEGDRVGI PWLYTACGCCHECHLTGWETLCESSQN 117	
24		↓	
25	Xyl2	AATPPVNPDEPNPQGTLCYKYPVPCDFLFLKLPDHVSLLELGAMV E PLTVGVH-GCKLADLK 174	
26	pdb 1PL8 D	CATP---PDD---GNLCRFYKHNAAFCYKLPDNVTFEEGALIE P LSVGIH-ACRRGGVT 170	
27	pdb 1PL6 D	CATP---PDD---GNLCRFYKHNAAFCYKLPDNVTFEEGALIE P LSVGIH-ACRRGGVT 170	
28	pdb 1E3J A	CATP---PDD---GNLARYYVHAADFCHKLPDNVSLLEEGALIE P LSVGVH-ACRRAGVQ 167	
29	pdb 1RJW D	AGYS-----VDGGYAEYCRAAADYVVKIPDNLSFEEAAPIFCAGVTTYKALKVTGAK 163	
30	pdb 1LLU H	TGYS-----VNGGYAEYVLADPNYVGLPKNVFAEIAPILCAGVTVYKGLKQTNAR 169	
31		* * * * *	
32	Xyl2	FGEDVVVFAGAPV G LLTAAVARTIGAKRVMV D IFDNKLMKAKMDGAATHIFNS---KTG 231	
33	pdb 1PL8 D	LGHKVLVCGAGPI I GMVTLVAKAMGAAQVVVTDLSATRLSKAKEIGADLVLQIS--KESP 228	
34	pdb 1PL6 D	LGHKVLVCGAGPI I GXVTLVAKAXGAAQVVVTDLSATRLSKAKEIGADLVLQIS--KESP 228	
35	pdb 1E3J A	LGTTVLVIGAGPI I GLVSVLAAKAYG-AFVVCTARSRRLEVAKNCGADVTLVVDPAKEEE 226	
36	pdb 1RJW D	PGEWVAIYIGIGGLGHVAVQYAKAMG-LNVVAV D IGDEKLELAKELGADLVVNPL-----K 217	
37	pdb 1LLU H	PGQWVAISIGIGGLGHVAVQYARAMG-LHVAAIDIDDAKLELARKLGASLTVNAR-----Q 223	
38		* * * * *	
39	Xyl2	GDYQDLIKSFDGVQPSVVL E CSGAQPCIMYGVKIL K AGGRFVQI G NAGGDVNFPIADFST 291	
40	pdb 1PL8 D	QEIARKVEGQLGCKPEVTIECTGAEASIQAGIYATRSGGTLVLV L GSSEMTVPVLLHAAI 288	
41	pdb 1PL6 D	QEIARKVEGQLGCKPEVTIECTGAEASIQAGIYATRSGGTLVLV L GSSEMTVPVLLHAAI 288	
42	pdb 1E3J A	SSIIERISAIAGDLNVTIDCSGNEKCITIGINITRTGGTLM L VMGSMQMVTVPLVNACA 286	
43	pdb 1RJW D	EDAAKFMKEKVGVAHVAVT A VS-KPAFQSAYSNIRGGACVLV L PPPEMPIPIFDTVL 276	
44	pdb 1LLU H	EDPVEAIQRDIDGGAHGVLV T AVS-NSAFGQAI G MARRGGTIALV L PPGDFPTPIFDVVV 282	
45		* * * * *	
46	Xyl2	RELALYGS F RYGYDYQTSIDILDRNYVNGKDKAPINFELLI T HRFKFKDAIKAYDLVRA 351	
47	pdb 1PL8 D	REVDIKGVFRYCN-TWPVAISMLASKSVN-----VKPLV T HRFPLEKALEAFETPKK 339	
48	pdb 1PL6 D	REVDIKGVFRYCN-TWPVAISMLASKSVN-----VKPLV T HRFPLEKALEAFETPKK 339	
49	pdb 1E3J A	REIDIKSVFRYCN-DYPIALEMVASGRCN-----VKQLV T HSFKLEQTVDAFEAARK 337	
50	pdb 1RJW D	NGIKI I GSIVGTRKDLQEALQFAAEGKVK-----TII E VQPLEKINEVFDRLMK 325	
51	pdb 1LLU H	KGLHIAGSIVGTRADLQEALDFAGEGLVK-----ATI H PGKLDLDINQILDQMR 331	
52			
53	Xyl2	GNG-AVKCLIDGPE----- 364	
54	pdb 1PL8 D	GLG--LKIMLKCDPSDQNP 356	
55	pdb 1PL6 D	GLG--LKIXLKCDPSDQNP 356	
56	pdb 1E3J A	KADNTIKVMISCRQG---- 352	
57	pdb 1RJW D	GQINGRVVLTLEDK----- 339	
58	pdb 1LLU H	GQIEGRIVLEM----- 342	

Fig. 4 Sequence alignment of Xyl2 and members of the medium-chain zinc-binding family. Amino acids within the gray box represent the signature of alcohol dehydrogenases belonging to the MDR family. The residues involved in binding the catalytic zinc are indicated by arrows. The second structural zinc binding residues of KR (1E3J) are shown within squares and those residues involved in the coenzyme binding, for all MDR members, are indicated by asterisks. 1PL8-D: hSDH/NAD⁺; 1PL6-D: hSDH/NADH/Inhibitor complex; 1E3J-A: Ketone Reductase (KR); 1RJW-D: Alcohol Dehydrogenase (ADH); 1LLU-H: ADH/NAD⁺/Substrate complex

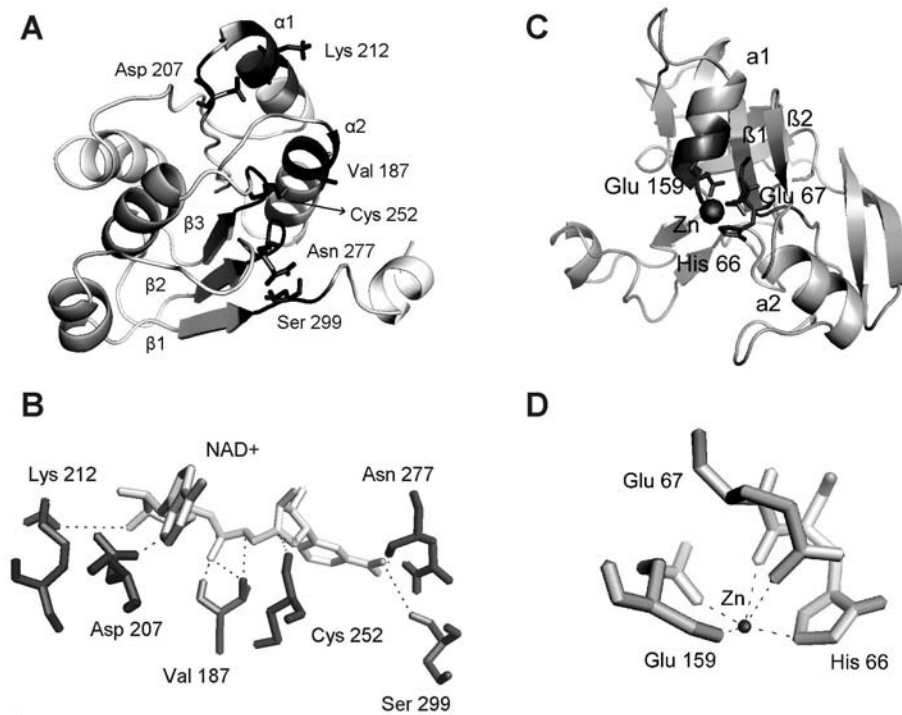


Fig. 5 Three-dimensional model for Xyl2 obtained by molecular modeling. **a** NAD⁺ domain, represented in cartoon diagram, constituted by motifs α and β in a typical Rossmann fold pattern. **b** Detail of the NAD⁺ binding site in which residues participating in the interaction are Val¹⁸⁷, Asp²⁰⁷, Lys²¹², Cys²⁵², Asp²⁷⁷ and Ser²⁹⁹. **c** Zinc binding domain with residues interacting with the zinc represented in dark gray. **d** Detail of the zinc binding-site showing the coordination of zinc with Glu⁶⁷, His⁶⁶ and Glu¹⁵⁹ residues.

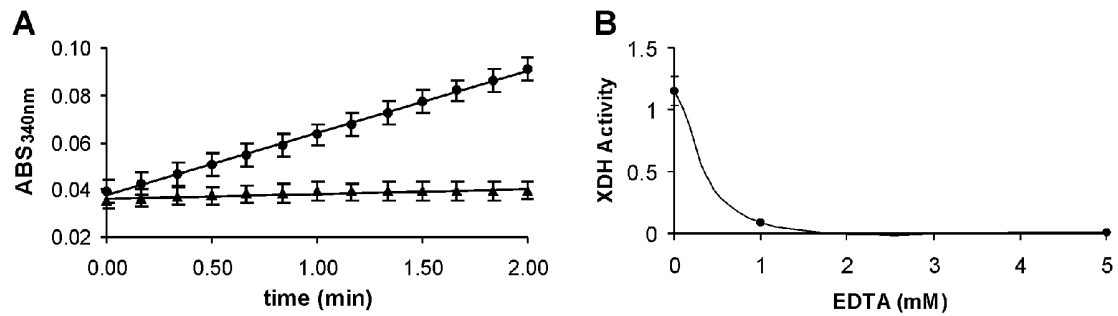


Fig 6 Effect of EDTA on the activity of Xyl2. **a** Measurement of NAD⁺ reduction (A_{340nm}) in the presence (closed triangles) or absence (closed circles) of EDTA 1mM. **b** XDH activity in different concentrations of EDTA.

Table 1 Primers used for *XYL2* amplification

Primer	Sequence (5'→3')
5XDH	CAATGGTCYTKGGTCACGAATC
3XDH	GWAWCCRTATCTGAAAGAWCC
xy12F2	CAGTTGTTTTGGAATGTAGTGG
xy12R2	TGGGGTGGCGGCAAAAGACA
5xy12	<u>CGGATCC</u> GTCATGACTGCAAACCCATC
3xy12	<u>CGGATCC</u> CTATTCTGGACCATCAATTAAAC

BamHI restriction sites are underlined

For Peer Review

Table 2 Structural neighbors of Xyl2 from Vector Alignment Search Tool (VAST)

PDB CODE		Identity (%)	Conserved residues (%)	RMSD
1PL8-D	hSDH/NAD ⁺ (Pauly et al., 2003)	36	55	0.6
1PL6-D	hSDH/NADH/Inhibitor complex (Pauly et al., 2003)	36	54	0.6
1E3J-A	KR (<i>Bemisia argentifolli</i>) (Banfield et al., 2001)	36	55	0.8
1RJW-B	ADH (<i>Bacillus stearothermophilus</i>) (Ceccarelli et al., 2004)	27	43	1.7
1LLU-H	NAD ⁺ /substrate ADH (<i>Pseudomonas aeruginosa</i>) (Levin et al., 2004)	24	39	1.7

Peer Review

ANEXO 3
Artigo de Divulgação

NUTRIÇÃO Substituto do açúcar apresenta muitas vantagens para consumidores

Xilitol, o adoçante do futuro

Os problemas de saúde associados ao açúcar comum vêm provocando há décadas a busca por substitutos.

Um dos mais pesquisados atualmente é o xilitol, um álcool com o mesmo poder adoçante da sacarose e sem os seus aspectos inconvenientes. Além disso, diversos estudos têm mostrado que esse composto é

capaz de evitar e até reverter cáries e apresenta outras propriedades benéficas. Por **Luanne Helena A.**

Lima (llima@unb.br), do *Departamento de Biologia Molecular* (doutoranda), e **Christian N. Berlinck**

(berlinck@unb.br), do *Departamento de Ecologia* (mestrando), ambos da *Universidade de Brasília*.

O aumento do consumo de açúcares, em especial na forma de sacarose (extraída basicamente da cana-de-açúcar e da beterraba), foi uma das principais mudanças nos hábitos alimentares da espécie humana nos últimos séculos. Antes que esse novo item entrasse na dieta cotidiana, a humanidade consumia açúcares presentes em frutas e outros alimentos, mas em quantidade muito menor que a atual. O excessivo volume de açúcar consumido atualmente vem provocando vários problemas de saúde, entre os quais se destacam as cáries dentárias e a obesidade.

Em função desses problemas, muitos estudos vêm sendo realizados, nos últimos 50 anos, para encontrar substitutos que evitem os efeitos indesejáveis dos açúcares, principalmente da sacarose. Hoje,

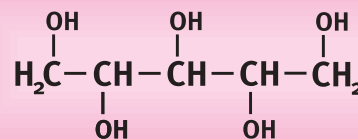


Figura 1. Esquema da molécula de xilitol (C₅H₁₂O₅)

muitos adoçantes alternativos, naturais ou artificiais, já são empregados em variados tipos de alimentos. Um desses compostos é o xilitol, apontado por muitos pesquisadores como uma opção adequada para substituir a sacarose, pois apresenta doçura equivalente, tem 33% a menos de calorias e, principalmente, não produz cáries e pode ainda reverter lesões iniciais nos dentes.

Adoçante com muitas vantagens

O xilitol é um composto do grupo dos polióis, ou seja, é um álcool que apresenta, ligado a cada átomo de carbono (C) de sua molécula, um grupo hidroxila, formado por um átomo de oxigênio (O) e um de hidrogênio (H). Esse álcool tem a fórmula química C₅H₁₂O₅ (figura 1) e pode ser encontrado em líquens, fungos, algas e vegetais, e também como um intermediário do metabolismo de carboidratos em animais, inclusive no homem.

O xilitol foi descoberto em 1891 pelos químicos Emil Fischer (alemão, 1852-1919) e Gabriel Bertrand (francês, 1867-1962), que o prepararam, na forma de xarope, a partir da reação da xilose (açúcar obtido da madeira) com amálgama sódica (liga de mercúrio e sódio). Esse álcool apresenta-se como



um pó cristalino e branco, sem odor. Suas características químicas proporcionam sensação de frescor quando dissolvido na saliva, efeito explorado em pastilhas, chicletes e balas. Sua doçura relativa é igual à da sacarose e superior à de outros polióis, como sorbitol e manitol, também usados como adoçantes.

Devido à doçura e ao baixo valor calórico (apenas 2,4 calorias por grama), o xilitol vem sendo usado como adoçante desde os anos 60 no Japão e em alguns países da Europa. Uma vantagem desse composto, em relação a outros adoçantes, é o fato de não apresentar sensação desagradável após o uso.

Seu emprego também oferece importantes vantagens para a indústria alimentícia. Quando proteínas são aquecidas na presença de açúcares redutores, em altas temperaturas, ocorrem reações de Maillard (caramelização), que provocam o escurecimento do produto. O xilitol, por não apresentar grupos redutores em sua molécula, não participa dessas reações, evitando assim o efeito do escurecimento. Além disso, ele não é fermentado por diversos microrganismos, possibilitando seu uso em produtos, como refrescos, sem a necessidade de pasteurização e de adição de conservantes, quando este é estocado por até cinco meses em frascos fechados, representando uma redução nos custos do processo. Ainda em relação à indústria alimentícia, esse composto pode substituir a lactose em alimentos infantis, permitindo seu consumo por crianças intolerantes a esse açúcar.

A propriedade cariostática (prevenção de cáries) desse álcool deve-se ao fato de não ser metabolizado por microrganismos da biota bucal, principalmente a bactéria *Streptococcus mutans* (figura 2), o que impossibilita a proliferação das bactérias e, em consequência, impede a produção de ácidos que atacam o esmalte dos dentes. Além disso, também pode ser classificado como anticariogênico, por estimular a produção de saliva, que possui capacidade tamponante (manutenção do pH), o que, juntamente com o aumento na concentração de íons cálcio e fosfato, induz a remineralização (figura 3), revertendo lesões de cáries recém-formadas.

Pesquisas revelam benefícios

Estudos do finlandês Pentti Alanen e colaboradores, em 2000, constataram que o consumo diário de chicletes contendo xilitol por crianças de 10 anos reduziu em 53,5% a incidência de cáries (figura 4). Os efeitos cariostático e anticariogênico vêm impulsionando o uso do composto em cremes dentais, anti-sépticos bucais, pastilhas, gomas de mascar e outros produtos para controle e prevenção de cáries. Outra pesquisa, realizada por Eva Soderling e colaboradores em 2001, descobriu que o consumo de

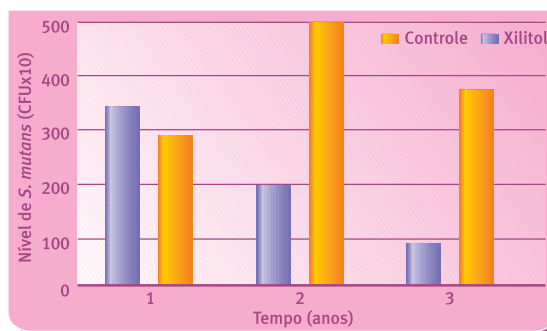


Figura 2. Efeito do xilitol na inibição do crescimento de *Streptococcus mutans* na placa bacteriana

xilitol pelas mães, durante os últimos meses de gravidez e amamentação, ajuda a prevenir a transmissão de *S. mutans* para a criança nos seus primeiros seis anos de vida.

O xilitol tem ainda várias aplicações clínicas. É indicado para substituir os açúcares na dieta de diabéticos, já que seu metabolismo não ocorre por vias dependentes de insulina. Também é recomendado para obesos, por ser menos calórico e diminuir o nível de ácidos graxos livres no sangue. Pode ser usado no tratamento de distúrbios metabólicos, como a anemia hemolítica (causada por deficiência da enzima glicose-6-fosfato-desidrogenase). Sua utilização em nutrição parenteral (intravenosa) já é aceita em muitos países: estudos mostraram que a administração de xilitol associado a aminoácidos preserva as proteínas do paciente de modo mais eficiente que o uso apenas de aminoácidos ou destes combinados com glicose.

Outras pesquisas vêm descobrindo novas aplicações para o xilitol. Foi demonstrado que esse álcool pode ser usado para a prevenção de otite média aguda (infecção aguda do ouvido médio) por inibir o crescimento e a adesão de espécies de *Pneumococcus* e a adesão de *Haemophilus influenzae* em células da nasofaringe. Testado na forma tanto de xarope ▶

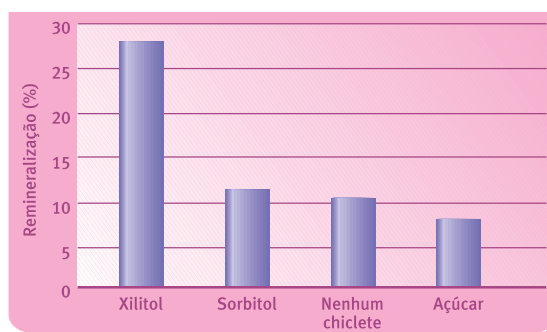


Figura 3. Capacidade de remineralização de lesões nos dentes pelo uso de chicletes com diferentes adoçantes



Figura 4. Efeitos do xilitol na prevenção das cáries, inibindo o crescimento da bactéria *S. mutans* e aumentando a remineralização dos dentes

quanto de goma de mascar e pastilhas, o composto reduziu em 40% a ocorrência de otite em crianças.

Estudos realizados por Pauli Mattila e colaboradores em 1998 demonstraram que, graças a uma dieta suplementada com 10% de xilitol, os ossos de ratas que tiveram os ovários retirados mantiveram sua constituição mineral e mostraram densidade e volume trabecular maiores que animais sem o suplemento. O resultado evidenciou que o composto protege contra a osteoporose (fragilidade dos ossos, causada pela redução de sua calcificação ou de sua densidade) decorrente da ausência dos estrógenos (hormônios produzidos nos ovários), situação similar à que acontece na menopausa, em mulheres.

A aplicação de xilitol em forma de aerosol também pode ajudar a prevenir infecções pulmonares, inclusive em pacientes com fibrose cística (como a maioria dos fumantes). Ele reduz o teor de sais no líquido que recobre as células do revestimento interno dos pulmões, aumentando a atividade antibiótica natural do corpo contra as bactérias.

Em organismos superiores o metabolismo do xilitol ocorre principalmente no fígado, onde, dependendo da necessidade, de 20% a 80% do total consumido podem ser transformados em glicose. Como sua absorção é lenta, também pode ser metabolizado indiretamente pelos microrganismos presentes no intestino grosso. Geralmente é bem tolerado pelo organismo humano em doses elevadas (acima de 200 g por dia), embora em alguns casos tenha efeito laxativo.

Quanto à segurança do consumo e utilização por humanos, o xilitol já é aceito pela Comunidade Econômica Européia desde 1984, enquanto a agência que regula alimentos e medicamentos nos Estados Unidos (*Food and Drug Administration*) o classifica como “geralmente reconhecido como seguro” (*status GRAS*) desde 1986 e “seguro para os dentes” desde 1994. O Comitê de Especialistas em Aditivos Alimentares da Organização Mundial da Saúde confirmou os estudos de toxicidade de xilitol e o classificou como “aceitável para consumo diário”. No Brasil, o Ministério da Saúde aprovou o composto, como produto dietético, em 1980.

Os métodos de produção do xilitol

Utilizado atualmente em produtos alimentícios, farmacêuticos ou de saúde oral em mais de 35 países, o xilitol pode ser recuperado de fontes naturais como vegetais (banana, alface, morango, cenoura, espinafre e berinjela, entre outros), fungos ou líquens por extração sólido-líquido (separação de um componente sólido solubilizado por um solvente líquido), mas como ele está presente em pequena proporção (menos de 900 mg em cada 100 g de matéria-prima), esse processo torna-se inviável economicamente.

A produção de xilitol em larga escala ocorre pelo processo químico (figura 5), que consiste na reação de hidrogenação de xilose, um açúcar comumente encontrado na parede de células vegetais na forma do polímero xilana.

Esse processo, patenteado em 1977 por Asko Melaja e Lauri Hamalainen, inclui quatro etapas básicas: 1. obtenção da xilose a partir da hidrólise ácida (quebra de moléculas por adição de água promovida por ácidos) de material vegetal rico em xilana; 2. purificação do material resultante até a xilose pura; 3. hidrogenação catalítica (adição de hidrogênios

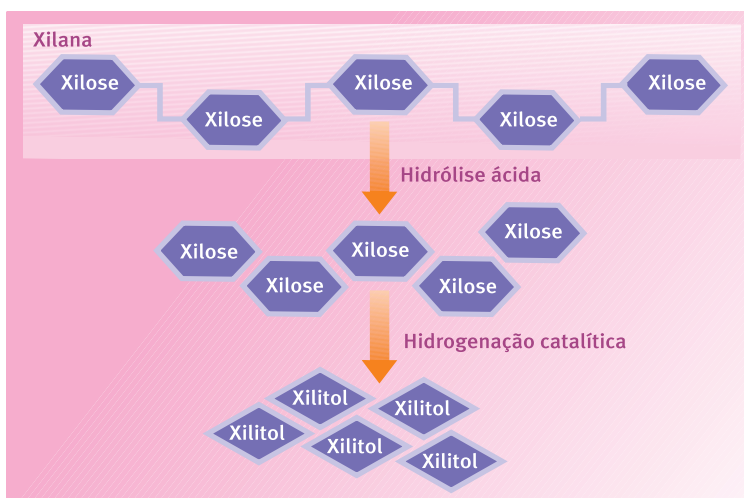


Figura 5. Processo de obtenção de xilitol a partir da xilana

a certas ligações da molécula) da xilose, formando xilitol; e 4. cristalização do composto.

O rendimento do processo químico e a qualidade do xilitol dependem da pureza da solução inicial de xilose, já que a presença de impurezas interfere na reação catalítica. São necessárias operações de métodos de purificação (como troca iônica, descoloração e fracionamento cromatográfico) para obtenção de uma solução de xilose de elevada pureza. Após a remoção do catalisador por filtração e troca iônica, a solução de xilitol é concentrada, fracionada por cromatografia, e cristalizada para obtenção do produto puro. Essas diversas etapas de purificação aumentam o tempo de processamento e encarecem o produto.

Como alternativa ao processo convencional, o xilitol pode ser obtido microbiologicamente a partir da fermentação de soluções ricas em xilose, sem a necessidade de purificação prévia do substrato. Vários outros produtos comerciais são obtidos por fermentação, destacando-se o etanol, utilizado inclusive como combustível.

Entre as vantagens apresentadas pelos processos biotecnológicos destaca-se a redução dos custos em relação aos processos químicos, além de apresentar características que minimizam o impacto ambiental, como diminuição da toxicidade dos efluentes e o uso de recursos renováveis (biomassa vegetal). No caso da via biotecnológica proposta para a produção de xilitol, utilizam-se resíduos agroindustriais como bagaço de cana, palha de arroz, palha de trigo e sobras de eucaliptos, potencializando o caráter de redução de custos financeiros e ambientais.

Vários microrganismos já foram identificados como fermentadores de xilose em xilitol, em sua maioria fungos. Ching Chiang e S. Knight precursores da pesquisa de obtenção de xilitol, identifica-

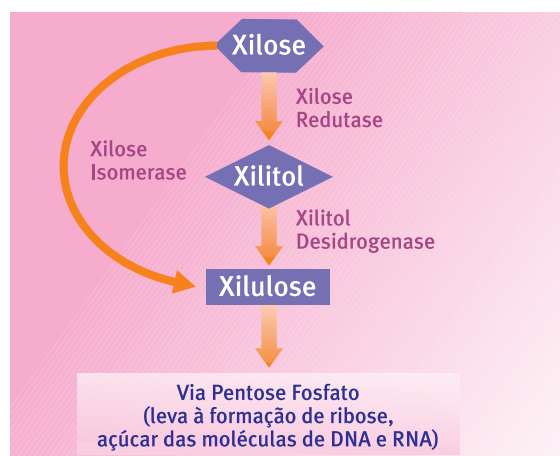


Figura 6. Metabolismo da xilose na maioria das bactérias (à esquerda) e nos fungos usados em sua produção (à direita)

Leveduras	Xilitol (g/l)
<i>Candida boidinii</i> (NRRL Y-17213)	2,9
<i>Candida guilliermondii</i> (FTI-20037)	37
<i>Candida intermedia</i> (RJ-248)	5,7
<i>Candida mogii</i> (ATCC 18364)	31
<i>Candida parapsilosis</i> (ATCC 34078)	20
<i>Candida pseudotropicalis</i> (IZ-431)	4,3
<i>Candida tropicalis</i>	2,1
<i>Candida tropicalis</i> (HXP 2)	4,8
<i>Candida tropicalis</i> (1004)	17
<i>Candida tropicalis</i> (ATCC 7349)	20
<i>Candida tropicalis</i> (ATCC 20240)	5,5
<i>Candida utilis</i> (ATCC 22023)	1,8
<i>Candida utilis</i> (C-40)	3
<i>Debaryomyces hansenii</i> (C-98, M-21)	0,8
<i>Hansenula anomala</i> (IZ-1420)	6,1
<i>Kluyveromyces fragilis</i> (FTI-20066)	4,6
<i>Kluyveromyces marxianus</i> (IZ-1821)	6,1
<i>Pichia (Hansenula) anomala</i> (NRRL Y-366)	2
<i>Pachysolen tannophilus</i> (NRRL Y-2460)	2,2
<i>Saccharomyces</i> (SC-13)	0,7
<i>Saccharomyces</i> (SC-37)	2,3
<i>Schizosaccharomyces pombe</i> (16979)	0,2

Figura 7. Leveduras produtoras de xilitol (os códigos indicam diferentes linhagens dos fungos, e a produção é por litro de meio de cultura)

ram em 1960 espécies dos gêneros *Penicillium*, *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Glicocladium*, *Byssoschlamys*, *Myrothecium*, *Neurospora*, *Rhodotorula*, *Torulopsis*. Poucas bactérias formam xilitol, porque geralmente convertem xilose diretamente em xilulose por possuírem a enzima xilose isomerase (figura 6). Quanto às leveduras (fungos anamorfos), várias espécies foram identificadas como produtoras de xilitol, destacando-se as do gênero *Candida*, pela maior eficiência de conversão (figura 7).

Apesar das diversas pesquisas desenvolvidas na produção biotecnológica via fermentação, ainda não foi possível obter concentrações de xilitol suficientes para a etapa de cristalização. Para aumentar a produtividade desse processo, estão sendo aplicadas estratégias de engenharia metabólica, que consistem no desvio do metabolismo para aumentar a formação desse poliálcool e diminuir o seu consumo pelo próprio microrganismo. ■

ANEXO 4
Seqüência depositada no GenBank

LOCUS DQ220745 1538 bp DNA linear PLN 19-OCT-2005
DEFINITION Candida tropicalis xyliitol dehydrogenase (xyl2) gene, complete cds.
ACCESSION DQ220745
VERSION DQ220745.1 GI:77732525
KEYWORDS .
SOURCE Candida tropicalis
ORGANISM Candida tropicalis
Eukaryota; Fungi; Ascomycota; Saccharomycotina; Saccharomycetes;
Saccharomycetales; mitosporic Saccharomycetales; Candida.
REFERENCE 1 (bases 1 to 1538)
AUTHORS Lima,L.H., Pinheiro,C.G., Freitas,S.M. and Torres,F.A.
TITLE Cloning and structural analysis of the xyl2 gene encoding xyliitol
dehydrogenase from Candida tropicalis
JOURNAL Unpublished
REFERENCE 2 (bases 1 to 1538)
AUTHORS Lima,L.H., Pinheiro,C.G., Freitas,S.M. and Torres,F.A.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (23-SEP-2005) Departamento de Biologia Celular,
Universidade de Brasilia, Campus Universitario Darcy Ribeiro,
Brasilia, DF 70910-900, Brazil
FEATURES
source Location/Qualifiers
1..1538
/organism="Candida tropicalis"
/mol_type="genomic DNA"
/db_xref="taxon:5482"
gene <343..>1437
/gene="xyl2"
mRNA <343..>1437
/gene="xyl2"
/product="xyliitol dehydrogenase"
CDS 343..1437
/gene="xyl2"
/EC_number="1.1.1.9"
/note="oxidoreductase"
/codon_start=1
/transl_table=12
/product="xyliitol dehydrogenase"
/protein_id="ABB01368.1"
/db_xref="GI:77732526"
/translation="MTANPSLVLNKVDDISFEEYEAPKLESPRDVIVEVKKTGICGSD
IHYYAHGSIGPFILRKPMVLGHESAGVVS AVGSEVTNLKVGDRVAIEPVPSPRFSDET
KSGHYHLCPHMSFAATPPVNPDEPNPQGTLCCKYRVPDFLFLKLPDHVLELGLAMVEP
LTGVVHGCKLADLKFGEDEVVVFAGPVGLLTAAVARTIGAKRVMVVDIFDNKLMKAKD
MGAATHIFNSKTGGDYQDLIKSFDGVQPSVLECSGAQPCYMGVKILKAGGRFVQIG
NAGGDVNFPIADFSTRELALYGSFRYGYGDYQTSIDILDRNYVNGKDKAPINFELLIT
HRFKFKDAIKAYDLVRAGNGAVKCLIDGPE"
ORIGIN
1 accttcctat tgtttggaaa cgggaaaaa ataatatattt gtatggagat cctcaaattt
61 cggggaaatt gtagatttac cttcctcttg caattacgca ttgactactat tttgtttttt
121 agtttgggct ttcttttgta ttgcttcacg tatgggtgatt ataactttgtg tacacttggt
181 catttactcc cccaagtttt cctctccccc tccatttata atgtatgaat taattatata
241 aatactgccg caaatctccc caggttgaaa ttttttttgt tacttctaaa gtttcttatt
301 tcttttcatt caataacttt caattctaca aatacaaaa gtcattgctgc aaacctatca
361 ttagtctcta acaaagtga cgatatttcc tttgaagaat acgaagctcc aaaactcgaa
421 tcaccaagag atgtcattgt tgaagttaag aaaactggta tctgtggatc agatatccat
481 tactatgccc atggttcaat tgggtccatt attttaagaa aaccaatggt tttaggtcac
541 gaatcagcag gtgtgttttc tgctgtcggg agtgaagtta ccaacttgaa ggttgggtg
601 agagttgcca ttgaacctgg tgaaccttca agatttagtg atgagaccaa atctgggtcat
661 tatcatttgt gccacacatat gtcttttgcc gccacccccc cagttaaccc agatgaacca
721 aatcctcaag gtactttatg taaatactac agagtcccat gtgacttttt attcaaaata
781 ccagatcatg tttctttgga gttgggtgct atggttgaac cattaactgt tgggtgccac
841 ggttgtaaat tggctgattt gaaatttggg gaagacgttg ttgtttttgg tgccgggtcca
901 gttgggttgg tgaccgctgc cgttgctaga acaattgggtg ctaaaagagt catggttgtt
961 gatatttttg acaacaattt gaagatggca aaagatatgg gtgctgccac tcataatttc
1021 aactcaaaaa ccggtgtgta ttatcaaatg ttgatcaaga gttttgatgg tgmtcaacct
1081 tcagttgttt tggaaatgtag tgggtgctcaa ccatgtatct atatgggtgt taaaactttg
1141 aaagctgggt gtgatttgtg tcaaatgggt aatgccggtg gtgatgtcaa tttccaatt
1201 gctgatttct caaccagaga attggcatta tatggttctt tcagatatgg ttaccggtgac
1261 taccaaaact caattgatat tttagacaga aactacgtca atggttaaaga caaagcacca
1321 attaatctcg aattgtgat tactcacaga ttcaagttta aagatgcat caaagcctat
1381 gatttggatc gagcagaaa tgggtgctgc aaatgtttaa ttgatggtcc agaatagagg
1441 tatatagtat tagaaaaaga atatacagta tatatatata tatatgtgaa taattcatgc
1501 ttaagtttaa tatcagtaaa gcatctacta taaatcca