

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOTECNOLOGIA E BIOCÊNCIAS**

Margareth Andrea Patiño Lagos

**ENGENHARIA EVOLUTIVA E GENÔMICA DE LEVEDURAS
Saccharomyces cerevisiae RECOMBINANTES
FERMENTADORAS DE XILOSE**

Florianópolis

2015

Margareth Andrea Patiño Lagos

ENGENHARIA EVOLUTIVA E GENÔMICA DE LEVEDURAS
Saccharomyces cerevisiae **RECOMBINANTES**
FERMENTADORAS DE XILOSE

Dissertação submetida ao
Programa de Pós-Graduação em
Biotecnologia e Biociências da
Universidade Federal de Santa
Catarina para a obtenção do Grau
de Mestre em Biotecnologia e
Biociências
Orientador: Prof. Dr. Boris Juan
Carlos Ugarte Stambuk

Florianópolis, SC
2015

Ficha de identificação de obra elaborada na fonte, conforme orientações da biblioteca da Universidade Federal de Santa Catarina

Patiño Lagos, Margareth Andrea
Engenharia evolutiva e genômica de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* recombinantes fermentadoras de xilose / Margareth Andrea Patiño Lagos; orientador, Boris Juan Carlos Ugarte Stambuk - Florianópolis, SC, 2015. 109p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências.

Inclui referências

1. Xilose. 2. *Saccharomyces cerevisiae*. 3. HXT2. 4. FPS1. 5. STB5. I. Stambuk, Boris Juan Carlos Ugarte. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências. III. Título.

Margareth Andrea Patiño Lagos

ENGENHARIA EVOLUTIVA E GENÔMICA DE LEVEDURAS
Saccharomyces cerevisiae **RECOMBINANTES**
FERMENTADORAS DE XILOSE

Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de “Mestre em Biotecnologia e Biociências”, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-graduação em Biotecnologia e Biociências.

Florianópolis, 02 de março de 2015

Prof. Marcelo Maraschin, Dr.
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Boris Juan Carlos Ugarte Stambuk (Presidente)
Orientador

Prof. Dr. Sérgio Luiz Alves Júnior (Campus Chapecó-UFFS)

Prof. Dr. Alcir Luiz Dafre (BQA-CCB-UFSC)

Prof. Dr. Márcio José Rossi (MIP-CCB-UFSC)

Ofereço este trabalho a Deus; sem Ele nada sou; Ele é quem tem me dado tudo: a vida, meu esposo, meus queridos pais e irmãos, minha família e o gosto pela investigação.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus quem tem me guiado sempre e me levado em asas de águia pelos diferentes caminhos da vida, Ele quem dispôs tudo para a realização deste trabalho. Também a Nossa Senhora que tem me acompanhado sempre no meu caminhar.

Ao meu amado esposo Jorge Alejandro Cristancho, presente de Deus, que tem sido na minha vida amigo, colega, parceiro, minha ajuda adequada; pelas discussões científicas (acreditem), pelo seu apoio incondicional em tudo, sua dedicação, acompanhamento e grande paciência.

À minha família toda: pais, irmãos, tios, tias, avós, sobrinhos de coração, sogros e cunhados por sempre senti-los perto apesar da distância. Agradeço suas orações, palavras de ânimo, amor e apoio nas nossas decisões e por ter suportado e entendido nossa ausência.

Ao professor Boris Stambuk pela oportunidade, ensinamentos, orientação e confiança.

Aos meus caros colegas do Laboratório de Biologia Molecular e Biotecnologia de Leveduras LBMBL, Augusto, Adriane, Belisa, Davi, Denis, Marília, Thyane e Victor; assim como também aos professores e colegas do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular de Insetos e Laboratório de Defesas Celulares, pela acolhida, amizade, o espaço e os conhecimentos compartilhados.

Ao povo de Florianópolis, de Santa Catarina e do Brasil pela acolhida, especialmente ao André Vandresen Nunes e Tatiane da Silva Nunes, que agora também são parte da nossa família, pelo carinho, apoio e ajuda incondicional nesses anos. Também, à Maria Isabel Vicente pela sua amizade, carinho e momentos partilhados.

Ao programa de Pós-graduação em Biotecnologia e Biociências do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina (CCB/UFSC) pelas condições dadas para o desenvolvimento deste trabalho e pela oportunidade de crescimento pessoal, acadêmico e profissional, e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro por meio da bolsa de estudos CAPES-DS.

Ao Dr. Gavin Sherlock, professor da *Stanford University* (USA) pelo interesse neste trabalho e colaboração no sequenciamento genômico das linhagens desenvolvidas na pesquisa.

Aos professores Claudia Maria Oliveira de Simões e Flávio Henrique Reginatto do Departamento de Ciências Farmacêuticas do Centro de Ciências da Saúde (PGFar/UFSC) e ao Vitor Clasen Chaves,

doutorando do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências (CCB/UFSC), pelo empréstimo e ajuda com o HPLC.

À *Universidad Nacional de Colombia* pelo acesso às bases de dados para consulta das referências desde casa.

Agradezco a todos mis amigos que compartieron conmigo estos años aquí en Brasil, algunos desde la distancia en otros lugares del mundo, quienes hicieron el paso por este país una aventura inolvidable, especialmente a Paola y Juan Camilo por el cariño demostrado, la compañía, la ayuda con los experimentos, la pizzita, las comiditas, el vinito y sobre todo, por la amistad sincera. También a Nury y Juan Pablo por su ayuda, sinceridad y amistad incondicionales. ¡Dios los bendiga!

Por fim, agradeço às minhas levedurinhas, às vezes um pouquinho tímidas e rebeldes, mais depois do intenso trabalho e tempo juntas, muito bem comportadas com resultados satisfatórios.

Os ideais são como as estrelas:
nunca as alcançaremos.
Mas, como os marinheiros em alto mar,
traçamos nossos caminhos, seguindo-as.
J. P. Sartre

*¿No sabéis que un poco de levadura
fermenta toda la masa?
I Cor 5, 6*

RESUMO

Produzidos a partir de fontes renováveis e utilizados para o transporte automotivo, os biocombustíveis tornam-se cada dia mais importantes no balanço energético mundial devido à necessidade de reduzir a dependência da utilização de petróleo, de origem fóssil. No Brasil, a maior parte da produção de bioetanol é obtida diretamente a partir da cana-de-açúcar, porém, na pouco aproveitada biomassa lignocelulósica residual (como bagaço e palha) encontra-se a xilose, o segundo açúcar mais abundante na natureza. A conversão bem sucedida da hemicelulose em etanol combustível com alto rendimento é o fator decisivo para a viabilidade econômica do processo. *Saccharomyces cerevisiae* é um microrganismo altamente efetivo na produção de etanol a partir de hexoses, com elevada produtividade de etanol, alta tolerância a esse produto, e tolerância às condições industriais de produção de álcool combustível, mas incapaz de utilizar açúcares como a xilose. Linhagens recombinantes de *S. cerevisiae* podem constituir uma alternativa interessante para a fermentação da xilose. Assim, no presente trabalho, foram usadas linhagens de *S. cerevisiae* recombinantes capazes de metabolizar xilose, transformadas com o plasmídeo integrativo pAUR-XKXDHXR, o qual permite a sobre-expressão dos genes das enzimas xilose redutase, xilitol desidrogenase e xilulose cinase. Em primeira abordagem, foi realizado um experimento de engenharia evolutiva com uma linhagem contendo apenas o gene do transportador de glicose *HXT2* sobre-expresso, permitindo a obtenção de uma linhagem mutante no gene *STB5*, que codifica um regulador da via das pentoses-fosfato. Esta linhagem mutante foi capaz de crescer em xilose tão bem quanto em glicose. Em segunda abordagem, usando engenharia genômica, foi deletada uma cópia do gene *FPS1*, o qual codifica um facilitador de glicerol, em uma linhagem industrial selecionada para eficiente fermentação de caldo de cana-de-açúcar, obtendo-se uma linhagem que fermenta a xilose mais eficientemente. Nossos resultados revelam que as estratégias empregadas são promissórias para incrementar consideravelmente a produção de etanol a partir de linhagens de *S. cerevisiae* recombinantes.

Palavras-chave: *Saccharomyces cerevisiae*. Xilose. *HXT2*. *FPS1*. *STB5*. Bioetanol. Etanol de segunda geração.

ABSTRACT

Biofuels produced from renewable sources and used for automotive transport are becoming increasingly more important in the global energy mix, looks for decrease world's oil dependency comes from fossil sources use. Most of the Brazilian ethanol production is obtained directly from sugar cane, however, it don't take advantage of the residual lignocellulosic biomass coming from this process (such as bagasse and straw) which is rich in xylose, the second most abundant sugar in nature. The successful conversion of hemicellulose (compound of lignocellulose) into ethanol fuel with high yields is the decisive factor for economic feasibility of its use. *Saccharomyces cerevisiae* is a highly effective microorganism for ethanol production from hexoses, which poses high ethanol productivity and high tolerance to it, and tolerance to industrial conditions in alcohol fuel production, but is not able to use sugars such as xylose. Recombinant strains of *S. cerevisiae* may constitute an interesting alternative to xylose fermentation. In this research work was used two strains of recombinant *S. cerevisiae*, capables of metabolize xylose, transformed with the integrative plasmid pAUR-XXXDHR which permits overexpression of enzyme genes xylose reductase, xylitol dehydrogenase and xylulose kinase. In first approach, an evolutive engineering experiment was carried out with a strain that only had a transporter gene of glucose *HXT2* overexpressed, turned out to be in a mutant strain in the *STB5* gene that encodes for a regulator pentose-phosphate pathway, mutant lineage capable of grow in xylose efficiently as in glucose. In second approach, using genetic engineering, was deleted a copy of *FPS1* gene which encodes a glycerol facilitator in a selected industrial strain for efficient fermentation of sugar cane broth, coming out a strain that ferments xylose more efficiently. Our results reveal as promissory the strategies used for important increase of ethanol production from recombinant lineages of *S. cerevisiae*.

Keywords: *Saccharomyces cerevisiae*. Xylose. *HXT2*. *FPS1*. *STB5*. Bioethanol. Second generation ethanol.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Conversão de etanol de primeira geração a partir de açúcar e amido.....	32
Figura 2 – Conversão de etanol de segunda geração a partir de biomassa lignocelulósica.....	33
Figura 3 – Estrutura da lignocelulose.....	35
Figura 4 – Produção de etanol a partir de cana-de-açúcar.....	37
Figura 5 – Transporte de açúcares por leveduras.....	39
Figura 6 – Rota metabólica da xilose em leveduras.....	40
Figura 7 – Plasmídeos pAUR-XXDXHR e pPGK.....	46
Figura 8 – Representação do experimento de evolução.....	52
Figura 9 – Módulos de deleção <i>FPS1</i>	53
Figura 10 – Estratégia de transformação da linhagem industrial com o módulo de deleção externa.....	57
Figura 11 – Estratégia de transformação da linhagem B2-MAPL com o módulo de deleção interna.....	58
Figura 12 – Crescimento em microplaca da linhagem DLG-K1T2.....	66
Figura 13 – Digestão do plasmídeo pPGK contendo o gene <i>HXT2</i> com <i>HindIII</i> e <i>BamHI</i>	67
Figura 14 – Crescimento da linhagem DLG-K1T2 em frasco agitado.....	68
Figura 15 – Crescimento da linhagem DLG-K1T2 em maltose.....	69
Figura 16 – Crescimento da linhagem DLG-K1T2 em glicose.....	69
Figura 17 – Crescimento da linhagem DLG-K1T2 em xilose.....	70
Figura 18 – Crescimento da linhagem DLG-K1T2 em xilose+glicose.....	71
Figura 19 – Engenharia evolutiva da linhagem DLG-K1T2.....	73
Figura 20 – Crescimento da linhagem 9C-MA em açúcares.....	74
Figura 21 – Crescimento da linhagem 10A-MA em açúcares.....	75
Figura 22 – Crescimento da linhagem 9C-MA em maltose.....	75

Figura 23 – Crescimento da linhagem 10A-MA em maltose.....	76
Figura 24 – Crescimento da linhagem 9C-MA em glicose.....	76
Figura 25 – Crescimento da linhagem 10A-MA em glicose.....	77
Figura 26 – Crescimento da linhagem 9C-MA em xilose.....	79
Figura 27 – Crescimento da linhagem 10A-MA em xilose.	79
Figura 28 – Crescimento da linhagem 9C-MA em xilose+glicose.	80
Figura 29 – Crescimento da linhagem 10A-MA em xilose+glicose.....	81
Figura 30 – Crescimento da linhagem DLG-K1 transformada com 3 plasmídeos pPGK-HXT2 independentes em xilose.....	82
Figura 31 – Crescimento da linhagem DLG-K1 transformada com 3 plasmídeos pPGK-HXT2 independentes em glicose.	82
Figura 32 – Confirmação da mutação presente nas linhagens 9C-MA e 10A-MA.....	85
Figura 33 – Módulo de deleção interna do gene <i>FPSI</i>	87
Figura 34 – Módulo de deleção externa do gene <i>FPSI</i>	88
Figura 35 – Verificação da deleção de uma cópia do gene <i>FPSI</i>	90
Figura 36 – Fermentação em batelada pela linhagem industrial MP-C5 em meio rico YP contendo 40 g/l de xilose.....	92
Figura 37 – Fermentação em batelada pela linhagem industrial B2-MAPL em meio rico YP contendo 40 g/l de xilose.....	93

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Cepas de <i>S. cerevisiae</i> utilizadas.....	45
Tabela 2 – Plasmídeos utilizados.....	46
Tabela 3 – Sequência dos iniciadores utilizados na construção dos módulos de deleção externa e interna do gene <i>FPS1</i>	54
Tabela 4 – Mistura de reagentes (<i>T Mix</i>) para transformação.....	56
Tabela 5 – Grandezas de transformação da linhagem DLG-K1T2.	70
Tabela 6 – Grandezas de transformação da linhagem 9C-MA.	77
Tabela 7 – Grandezas de transformação da linhagem 10A-MA..	78
Tabela 8 – Resultado do sequenciamento das linhagens.....	83
Tabela 9 – Combinação de iniciadores para verificação de deleção de uma cópia do gene <i>FPS1</i>	91
Tabela 10 – Grandezas de transformação da fermentação.....	94

LISTA DE ABREVIATURAS

2G	Etanol de segunda geração
ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
ADH	Álcool Desidrogenase
AQP	Aquaporinas
BSA	Albumina do soro bovino
BLAST	Do inglês <i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BNDES	Banco Nacional de Desenvolvimento Econômico e Social
CONAB	Companhia Nacional de Abastecimento
D	Fator de diluição
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
dNTP	Desoxinucleotídeo trifosfatado (do inglês <i>Deoxynucleotide Triphosphate</i>)
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
FINEP	Financiadora de Estudos e Projetos
GTE	Glicose-Tris-EDTA
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (do inglês <i>High performance liquid chromatography</i>)
<i>HXT</i>	Transportador de hexose (do inglês <i>Hexose Transporter</i>)
LB	Meio Luria-Bertani
LBMBL	Laboratório de Biologia Molecular e Biotecnologia de Leveduras, setor do Centro de Ciências Biológicas da UFSC
LCA	Do inglês <i>Life Cycle Assessment</i>
NADP ⁺	Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina, forma oxidada
NADPH	Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina, forma reduzida
NCBI	Do inglês <i>National Center for Biotechnology Information</i>
nt	Nucleotídeos

PAISS	Plano de Apoio à Inovação dos Setores Sucoenergético e Sucoquímico
pb	Pares de bases
p/v	Relação peso-volume
PCR	Reação em cadeia da polimerase (do inglês <i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PEG	Polietilenoglicol
PGK	Gene da fosfoglicerato cinase
pH	Potencial Hidrogeniônico
PIPES	Piperazina-1,4-bis (ácido 2-etanosulfônico)
SC	Meio sintético
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
SGD	Do inglês <i>Saccharomyces Genome Database</i> , base de dados disponível no site www.yeastgenome.org
<i>t</i>	tempo
TRIS-HCl	Tampão tris (hidroximetil) aminometano
UFSC	Universidade Federal de Santa Catarina
XDH	Xilitol Desidrogenase
XI	Xilose Isomerase
XR	Xilose Redutase
XK	Xilulose Cinase (antes xiluloquinase)
<i>XYL1</i>	Gene que codifica a xilose redutase
<i>XYL2</i>	Gene que codifica a xilitol desidrogenase
<i>XKS1</i>	Gene que codifica a xilulose cinase
YP	Meio rico

LISTA DE SIMBOLOS E UNIDADES

\approx, \sim	Aproximadamente
μl	Microlitro
Abs_{600}	Absorbância em 600 nanômetros
g	Gramas
h	Hora
kb	Kilobases
kPa	Kilopascal
l	Litro
lb	Libra
min	Minuto
M	Molar
ml	Mililitro
mM	Milimolar
mV	MiliVolts
MW	Megawatt
ng	Nanograma
$^{\circ}\text{C}$	Grau Celsius
P_{ETOH}	Produtividade em etanol
P_X	Produtividade em biomassa
rpm	Rotações por minuto
s	Segundo
t	Tonelada
U	Unidade
$Y_{\text{ETOH/S}}$	Fator de conversão de substrato em etanol
$Y_{\text{Glice/S}}$	Fator de conversão de substrato em glicerol

- $Y_{P/S}$ Fator de conversão de substrato em produto
- $Y_{X/S}$ Fator de conversão de substrato em biomassa
- $Y_{Xil/S}$ Fator de conversão de substrato em xilitol

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	27
2	OBJETIVOS DO TRABALHO	31
2.1	OBJETIVO GERAL	31
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	31
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	32
3.1	PRODUÇÃO DE ETANOL	32
3.1.1	Etanol de primeira geração	32
3.1.2	Etanol de segunda geração	33
3.2	BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA	35
3.3	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	36
3.4	METABOLIZAÇÃO DA XILOSE	38
3.5	TRANSPORTADORES HXT	41
3.6	ENGENHARIA GENÔMICA E EVOLUTIVA.....	42
3.7	O GENE <i>STB5</i>	43
3.8	AQUAPORINAS	43
4	MATERIAIS E MÉTODOS	45
4.1	LINHAGENS DE LEVEDURAS	45
4.1.1	Linhagens DLG-K1 e DLG-KIT2	45
4.1.2	Linhagem MP-C5	46
4.2	CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO	47
4.2.1	Meios de cultura das leveduras	47
4.2.2	Meio de cultivo para bactérias	47
4.3	TÉCNICAS DE BIOLOGIA MOLECULAR	48
4.3.1	Preparação de células competentes	48
4.3.2	Extração de DNA plasmidial de bactérias	49
4.3.3	Extração e purificação de plasmídeos de levedura	50
4.3.4	Extração de DNA genômico de leveduras	50
4.3.5	Digestão com enzimas de restrição	50
4.3.6	Electroforese em gel de agarose	51
4.3.7	Purificação de DNA do gel de agarose	51
4.3.8	Transformação de bactérias	51
4.3.9	Engenharia evolutiva	51
4.3.10	Engenharia genômica	53
4.3.11	Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	55
4.3.12	Transformação de leveduras	56
4.4	ANÁLISE DA CINÉTICA DE CRESCIMENTO	58
4.4.1	Concentração celular	58
4.4.2	Microplaca	59
4.4.3	Frasco agitado	59
4.5	DETERMINAÇÃO DO CONSUMO DE AÇÚCARES, PRODUÇÃO DE ETANOL E OUTROS PRODUTOS	59

4.5.1	Determinação bioquímica de glicose	60
4.5.2	Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)	60
4.6	FERMENTAÇÕES.....	61
4.6.1	Fermentação em batelada	61
4.6.2	Quantificação da biomassa celular	61
4.7	DETERMINAÇÃO DAS GRANDEZAS DE TRANSFORMAÇÃO	62
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	65
5.1	ENGENHARIA EVOLUTIVA	65
5.2	ENGENHARIA GENÔMICA PARA DELEÇÃO DO GENE <i>FPS1</i> .	86
6	CONCLUSÕES E SUGESTÕES PARA TRABALHOS	
	FUTUROS	95
7	REFERÊNCIAS.....	97

1 INTRODUÇÃO

Em decorrência da pioneira utilização de processos para produzir etanol como combustível a partir da cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) aliada às tecnologias e políticas adotadas no Brasil, o país se destaca na produção mundial como o segundo maior produtor de etanol total e o maior produtor de etanol a partir da cana-de-açúcar, com produção reportada da safra 2013/14 superior aos 11,8 milhões de litros de etanol anidro e acima de 16,1 milhões de litros de etanol hidratado, representando acréscimos de 20% e 17% respectivamente, quando comparados à safra 2012/13 (CONAB, 2015).

O etanol é um substituto dos combustíveis fósseis e tem benefícios ambientais adicionais como a minimização da emissão de monóxido de carbono e óxido de nitrogênio (ZHA *et al.*, 2013). Tecnologias sustentáveis para o aumento da produção de etanol sem aumentar a área destinada ao plantio da cana vêm sendo avaliadas a partir do uso do resíduo lignocelulósico proveniente da extração do caldo da cana-de-açúcar.

O etanol obtido através da fermentação alcoólica da sacarose da cana-de-açúcar, assim como o obtido a partir do amido de milho e ainda de outras culturas alimentares é denominado de etanol de primeira geração. Por sua vez, o obtido a partir de culturas não alimentares ou de subprodutos ou resíduos das alimentares é denominado de etanol de segunda geração.

Produção de bioetanol a partir de recursos renováveis como biomassa celulósica (polissacarídeos das paredes celulares vegetais) fornece uma fonte alternativa de combustível líquido enquanto reduz a dependência a combustíveis fósseis. Para isso, requer-se a conversão da biomassa lignocelulósica em açúcares simples e a conversão desses açúcares simples em biocombustíveis (ZHANG, RODRIGUEZ & KEASLING, 2011).

A produção de bioetanol de segunda geração a partir de bagaço de cana e outros materiais lignocelulósicos residuais, depende de pré-tratamentos para a separação dos componentes da parede celular e da conversão de celulose e uma parte de hemicelulose em açúcares fermentáveis, que pode ser realizada por meio de hidrólise enzimática (COLETTA *et al.*, 2013).

A parede celular vegetal possui uma disposição complexa, consistindo principalmente de uma mistura de celulose cristalina e amorfa, rodeado por hemicelulose e lignina. Hemicelulose é o segundo

polissacarídeo mais comum na natureza e representa cerca de 20 a 25% da biomassa lignocelulósica. Hemiceluloses são polímeros heterogêneos de pentoses (xilose e arabinose), hexoses (manose, glicose, e galactose) e ácidos orgânicos (SAHA, 2003).

Em matérias-primas lignocelulósicas o segundo açúcar mais abundante após a glicose é a xilose. Apesar de várias espécies de leveduras terem se mostrado capazes de fermentar esse açúcar (incluindo as linhagens recombinantes de *Saccharomyces cerevisiae*, MATSUSHIKA *et al.*, 2009), a eficiência e as velocidades de fermentação de xilose são baixas, desafiando a viabilidade da produção industrial de bioetanol a partir de lignocelulose (HAHN-HÄGERDAL *et al.*, 2007; STAMBUK *et al.*, 2008; AMORIM *et al.*, 2011).

S. cerevisiae é o microrganismo mais utilizado para produção de etanol a partir de hexoses, com alta produtividade de etanol e alta tolerância a esse composto, além de tolerância às condições estressantes do processo industrial (OLSSON & HAHN-HÄGERDAL, 1993). Porém, *S. cerevisiae* não tem a capacidade para utilizar pentoses presentes na hemicelulose, como a xilose e arabinose (MATSUSHIKA *et al.*, 2009; HANLY & HENSON, 2013). A levedura *S. cerevisiae* é a plataforma preferida para encaminhar esforços de engenharia microbiana na produção de biocombustíveis a partir de hidrolisados lignocelulósicos. Isso porque é um microrganismo robusto, simples de manipular geneticamente e capaz de fluxos elevados de carbono através das vias metabólicas centrais (ZHANG, RODRIGUEZ & KEASLING, 2011).

As linhagens de leveduras utilizadas no processo industrial devem ser adaptadas a diversas condições de estresse como tolerância ao etanol, altas temperaturas, estresse osmótico, estresse oxidativo, lavagem ácida para descontaminação, entre outros (BASSO *et al.*, 2008; SAMPAIO, 2013). A linhagem de levedura CAT-1 foi isolada no ambiente industrial nos anos 90 pela FERMENTEC e ESALQ, e utilizada em grande escala para a produção de bilhões de litros de álcool combustível todo ano (BABRZADEH *et al.*, 2012). Esta linhagem industrial é uma das selecionadas para a produção eficiente de álcool combustível no Brasil (BASSO *et al.*, 2008; STAMBUK *et al.*, 2009).

Neste trabalho foram desenvolvidas duas abordagens para a obtenção de linhagens recombinantes de *S. cerevisiae* com maior capacidade de metabolizar xilose e produzir etanol: a primeira, realizando um experimento de engenharia evolutiva com uma linhagem que apresenta sobre-expresso apenas o gene do transportador *HXT2*; e a

segunda, utilizando engenharia genômica para deletar o gene do facilitador de glicerol *FPSI* em uma linhagem industrial.

2 OBJETIVOS DO TRABALHO

2.1 OBJETIVO GERAL

Obter linhagens recombinantes de *Saccharomyces cerevisiae* com capacidade incrementada de fermentar xilose e produzir etanol.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Usar engenharia evolutiva com uma cepa de *S. cerevisiae* recombinante, que apresenta como único transportador de monossacarídeos a permease codificada pelo gene *HXT2*, em meio contendo xilose;
- usar engenharia genômica para deletar uma cópia do gene *FPS1*, que codifica um facilitador de glicerol, em uma linhagem industrial recombinante;
- comparar as cinéticas de crescimento, consumo de açúcares, e produção de etanol e outros produtos da fermentação, pelas linhagens de leveduras obtidas.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 PRODUÇÃO DE ETANOL

3.1.1 Etanol de primeira geração

Combustíveis considerados de primeira geração como biodiesel e etanol são produzidos a partir de fontes primárias como açúcar, amido, óleo vegetal ou gordura animal (Figura 1). O bioetanol de primeira geração provém da cana-de-açúcar, beterraba doce, trigo, mandioca e milho. Os Estados Unidos é o maior produtor mundial de etanol, sendo o milho a fonte da produção, seguido do Brasil que utiliza cana-de-açúcar. A União Europeia por sua vez, extrai o álcool de batatas e beterrabas, mas esse processo é menos produtivo.

Figura 1 – Conversão de etanol de primeira geração a partir de açúcar e amido. Mostram-se as etapas do processo de produção do biocombustível desde o pré-tratamento da matéria-prima até a separação em etanol e derivados.



Fonte: Adaptado de SIMS e colaboradores (2008).

Contudo, devido à utilização de terras agricultáveis para produção de combustíveis, tem se promovido polêmicas pela competição com a produção de alimentos para humanos e animais, os preços, a disponibilidade e o destino dos mesmos (SIMS *et al.*, 2008).

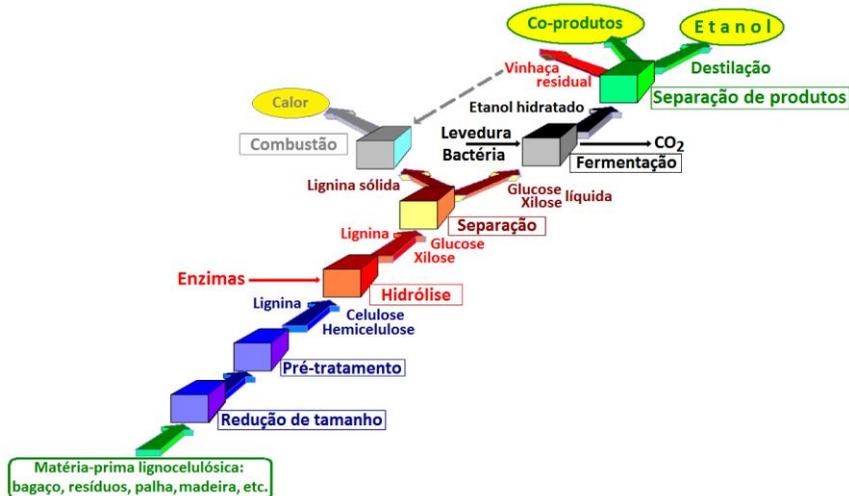
No entanto, a produção dos combustíveis foi analisada pela Avaliação do Ciclo de Vida (LCA, *Life Cycle Assessment*), e através de estudos constatou-se uma redução significativa no consumo de combustíveis fósseis e uma queda nas emissões globais de poluentes (MARGEOT *et al.*, 2009; ZAH *et al.*, 2010; BERNDES *et al.*, 2013).

O processo de obtenção de etanol de primeira geração, a partir da cana-de-açúcar, ocorre pela fermentação do caldo, que possui aproximadamente 15% de sacarose e 15% de fibras. O caldo é tratado e em seguida o processo de fermentação é realizado por linhagens selecionadas de leveduras *S. cerevisiae*, sendo o álcool obtido a partir da destilação do mosto (SIMS *et al.*, 2008; ZAH *et al.*, 2010).

3.1.2 Etanol de segunda geração

Classificam-se como combustíveis de segunda geração (2G), aqueles que utilizam como matéria prima, biomassa vegetal não alimentar, cujo processo é representado a seguir na Figura 2.

Figura 2 – Conversão de etanol de segunda geração a partir de biomassa lignocelulósica. Mostram-se as etapas do processo até a separação de produtos.



Fonte: Adaptado de SIMS e colaboradores (2008).

Particularmente, o bioetanol, etanol celulósico ou etanol 2G é um combustível líquido que poderia aproveitar para sua produção uma ampla gama de matérias-primas com alto conteúdo lignocelulósico, normalmente resíduos de outros processos agrícolas, representando uma

alternativa para o uso energético da biomassa, com grandes vantagens ambientais e econômicas, mas com algumas dificuldades operacionais.

A produção de etanol da lignocelulose é feita com tecnologias ainda em fase de aprimoramento (SIMS *et al.*, 2008; ZAH *et al.*, 2010). A obtenção do etanol 2G ocorre por meio de hidrólise, ácida ou enzimática, que desintegra a parede celular para utilizar os polissacarídeos como fonte de açúcares fermentáveis (RUBIN, 2008; BERNDES *et al.*, 2013). Uma dificuldade na produção do etanol 2G é a necessidade de neutralizar a solução contendo açúcares, para proceder à fermentação. Geralmente, utiliza-se hidróxido de cálcio que não pode ser reaproveitado, principal fator que contribui para o alto custo da técnica. Embora o processo seja possível, vem sendo aperfeiçoado continuamente para melhorar o rendimento e permitir a produção comercial.

Em outubro de 2013 entrou oficialmente em operação a primeira usina mundial de produção industrial de bioetanol de segunda geração em Crescentino, Itália, que compreende desde a obtenção da matéria-prima até a comercialização do biocombustível. Esse empreendimento, da Beta Renewables S.p.A, usa no seu processo tecnologia proprietária Proesa e enzimas da Novozymes, com potencial de produção de 60 mil toneladas de etanol celulósico a partir de 270 mil toneladas de biomassa (BETA RENEWABLES, 2014). A usina recicla a água em 100% além de produzir 13 MW de energia elétrica com a lignina excedente do processo, brindando autossuficiência energética.

No Brasil, o desenvolvimento de combustíveis celulósicos segue com investimentos que dependem do apoio governamental, como o Plano Conjunto BNDES-FINEP de Apoio à Inovação Tecnológica Industrial dos Setores Sucro-energético e Sucro-químico – FINEP/PAISS, lançado em 2012 que disponibilizou R\$ 3,3 bilhões para esse fim, e destinarão mais R\$ 1,48 bilhões para projetos entre 2014 e 2018 (BNDES, 2014).

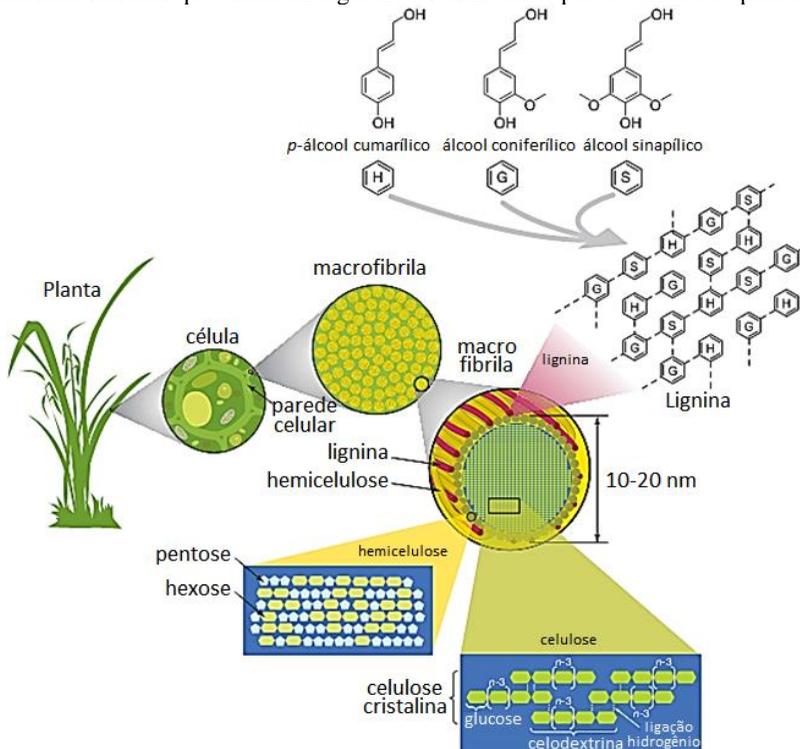
A primeira usina comercial de etanol celulósico do Brasil, Bioflex I, localizada em São Miguel dos Campos no estado de Alagoas, iniciou produção em setembro de 2014. Esse projeto da GranBio utilizando tecnologia Proesa licenciada pela Beta Renewables, tem capacidade para produzir 82 milhões de litros do biocombustível por ano (65.000 t/a). A usina emprega um conjunto de tecnologias (pré-tratamento, hidrólise enzimática e fermentação) que permitem a transformação de palha e bagaço de cana-de-açúcar em combustível líquido, que não compete com a produção de alimentos (GRANBIO, 2014).

3.2 BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA

A biomassa lignocelulósica é um recurso abundante e renovável que pode ser utilizado para a produção de combustíveis líquidos alternativos para o transporte (HIMMEL *et al.*, 2007). Matérias primas lignocelulósicas, consideradas como biomassa não-alimentar, incluem entre outras palha residual de cereais e culturas, bagaço da cana-de-açúcar, resíduos florestais e culturas de uso específico como algumas gramíneas e florestas de curta rotação (SIMS *et al.*, 2008).

Os três principais componentes da lignocelulose, como apresentado na Figura 3, são: celulose, hemicelulose e lignina.

Figura 3 – Estrutura da lignocelulose. O principal componente da lignocelulose é a celulose formada apenas por moléculas de glicose, enquanto a hemicelulose, o seu segundo componente mais abundante, é formada por pentoses e hexoses. A lignina é composta principalmente de três álcoois fenólicos. Celulose, hemicelulose e lignina formam estruturas chamadas microfibrilas organizadas em macrofibrilas que conferem rigidez e estabilidade à parede celular da planta.



Fonte: Adaptado de RUBIN (2008).

A celulose é o principal componente da parede celular das plantas constituída por uma longa cadeia de moléculas de glicose ligadas entre si, principalmente, por enlaces glicosídicos. A hemicelulose é o segundo polissacarídeo mais abundante na natureza, composto por diferentes monosacarídeos de 5 e 6 unidades de carbono, e finalmente, a lignina é um polímero tridimensional que confere rigidez, impermeabilidade e resistência a ataques microbiológicos e mecânicos aos tecidos vegetais (RUBIN, 2008).

Celulose é um polímero altamente ordenado da celobiose cujo comprimento pode apresentar 10.000 unidades de glicose na cadeia da celulose presentes nas fibrilas. Hemiceluloses são menores (grau de polimerização entre 100 e 200), sendo heteropolímeros altamente ramificados de xilose, arabinose, manose, galactose e glicose, como também ácidos urónicos (HA *et al.*, 2013). Pentoses e hexoses unidas através de ligações glicosídicas 1,3 - 1,6 e 1,4 (frequentemente acetiladas) constituem uma estrutura muito hidrofílica que age como adesivo entre a celulose e a lignina (BON & FERRARA, 2007).

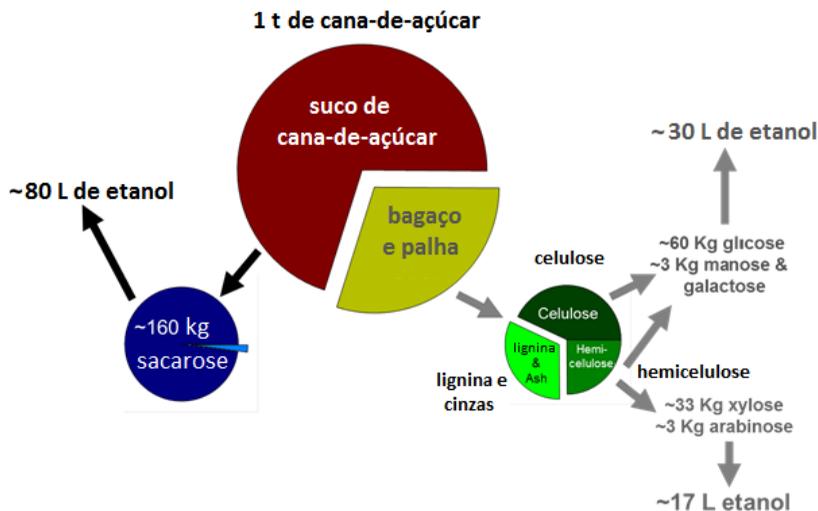
Um esquema da produção de etanol a partir da cana-de-açúcar é representado por meio da Figura 4, onde são mostradas as tecnologias de produção de etanol combustível, por um lado, usando a abundante sacarose do suco da cana-de-açúcar, e por outro lado, a possibilidade de produção de etanol 2G a partir de bagaço e palha que envolve processos de pré-tratamento da biomassa, hidrólise e fermentação de hexoses e pentoses.

3.3 *Saccharomyces cerevisiae*

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é um microrganismo que vem sendo utilizado pelo homem há séculos na panificação, produção de cerveja, vinho, e em geral, na indústria fermentativa. Sua fisiologia é bem conhecida e as ferramentas genéticas para sua manipulação estão bem estabelecidas, sendo ainda uma linhagem dessa levedura (S288C) o primeiro genoma eucarioto sequenciado (GOFFEAU *et al.*, 1996). É uma excelente fermentadora de açúcares para produzir etanol ainda na presença de oxigênio, chegando a uma concentração final de 10-12% em 48-72 horas, tolera bem seu produto de fermentação (mais de 15% de etanol), suporta valores de pH baixos (pH 3-7), variações de temperaturas e estresse osmótico decorrente das altas concentrações de açúcares nos processos fermentativos, predominando sobre possíveis contaminantes em reatores abertos (REIS, 2012). No Brasil, a maior

parte das leveduras usadas nos processos de fermentação alcoólica industrial é reciclada, acima de 90%, o que permite começar um novo processo com alta densidade celular reduzindo o tempo de fermentação (BASSO *et al.*, 2008).

Figura 4 – Produção de etanol a partir de cana-de-açúcar. As setas em preto ao lado esquerdo indicam a tecnologia já estabelecida de produção de etanol 1G, enquanto as setas em cinza, ao lado direito, indicam o potencial de produção de etanol 2G.



Fonte: Stambuk e colaboradores (2008).

Em virtude do conhecimento existente quanto à capacidade de fluxos elevados de carbono através das vias metabólicas centrais e facilidade de manipulação genética, *S. cerevisiae* é o microrganismo mais utilizado na produção de biocombustíveis a partir de hidrolisados de lignocelulose (ZHANG, RODRIGUEZ & KEASLING, 2011). No entanto, uma das grandes dificuldades do uso de *S. cerevisiae* é a sua incapacidade natural de metabolizar pentoses, apesar de possuir genes que codifiquem xilose redutase (XR), xilitol desidrogenase (XDH) e xilulose cinase (XK), devido à sua muito baixa expressão; entretanto, é capaz de metabolizar xilulose (HAHN-HÄGERDAL *et al.*, 1991; MATSUSHIKA *et al.*, 2009). Além disso, a literatura reporta que essa levedura não é capaz de co-fermentar dois açúcares, pois na presença de glicose o metabolismo dos outros açúcares é reprimido pela ação de fatores transcricionais, entre eles Mig1 (TRUMBLY, 1992). Linhagens

de *S. cerevisiae* modificadas com engenharia genômica tem conseguido a metabolização da xilose, embora, problemas com o balanço dos cofatores e a expressão gênica têm dificultado a sua eficiência (MATSUSHIKA *et al.*, 2009).

3.4 METABOLIZAÇÃO DA XILOSE

Várias espécies de bactérias, leveduras e fungos filamentosos podem fermentar xilose a etanol naturalmente (JEFFRIES, 1983). Para que leveduras possam crescer em xilose, o seu metabolismo deve ser induzido pelo transporte ao interior da célula (CHU & LEE, 2007). As espécies de leveduras que usam xilose ou arabinose apresentam atividades de transporte de pentoses com baixa e alta afinidade, cobrindo uma ampla faixa de concentrações de açúcar (2 a 3 ordens de magnitude). No entanto, afinidades para xilose sempre são mais baixas que para glicose (STAMBUK *et al.*, 2008).

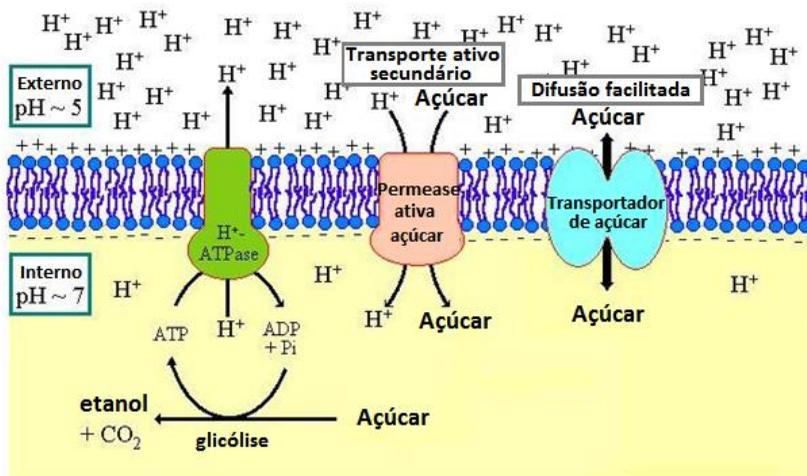
S. cerevisiae capta xilose por difusão facilitada (BATT *et al.*, 1986; Van ZYL *et al.*, 1989). Nesse processo o transporte ocorre a favor do gradiente de concentração, não ocorre gasto energético e as substâncias atravessam a membrana por meio de uma proteína transportadora (Figura 5). Enquanto a maioria das leveduras apresentam co-transportadores H^+ -açúcar de alta afinidade para pentoses (SALOHEIMO *et al.*, 2007), em *S. cerevisiae* a xilose e arabinose são transportadas somente por permeases de hexoses com baixa afinidade pela pentose, sem co-transporte de H^+ (STAMBUK *et al.*, 2008; SMITH, van RENSBURG & GÖRGENS, 2014).

A difusão facilitada ocorre através de transportadores de hexoses codificados pela família de genes *HXT* (KRUCKEBERG & BISSON, 1990; KRUCKEBERG *et al.*, 1999); *HXT2*, *HXT6* e *HXT7* são de alta afinidade por glicose, *HXT3* e *HXT4* são de baixa afinidade, e são ativos em condições de baixa e alta glicose respectivamente (BISSON *et al.*, 1993).

Uma vez no interior das células de leveduras, xilose é convertida por duas reações sequenciais em xilulose (WEBB & LEE, 1990) como apresentado na Figura 6 (pág. 40). A redução da xilose em xilitol pela enzima xilose redutase (XR) é a primeira etapa no metabolismo de xilose (CHIANG & KNIGHT, 1959), logo após, a oxidação do xilitol em xilulose é catalisada pela enzima xilitol desidrogenase (XDH). A xilulose é a seguir fosforilada na posição C5-OH pela xilulose cinase (XK) a xilulose-5-fosfato (X5P), que segue a via das pentoses-fosfato,

e pode ser convertida por transcetolases (TLK) em intermediários glicolíticos como o gliceraldeído-3-fosfato (GA3P) e fructose-6-fosfato (F6P). Esses intermediários são convertidos em piruvato na rota Embden-Meyerhof-Parnas (HAHN-HÄGERDAL *et al.*, 1991). Em condições anaeróbicas, o piruvato é descarboxilado pela enzima piruvato descarboxilase (PDC) a acetaldeído e reduzido pela enzima álcool desidrogenase (ADH) em álcool (vide Figura 6). Uma alternativa da rota para a conversão de xilose a xilulose em um só passo é a reação de isomerização catalisada pela enzima xilose isomerase (XI), empregada por bactérias (MISHRA & SINGH, 1993) e alguns fungos anaeróbios (KUYPER *et al.*, 2003), mas não em leveduras.

Figura 5 – Transporte de açúcares por leveduras. Representam-se os mecanismos de transporte de açúcar por transportadores de difusão facilitada, a favor do gradiente de concentração, e por transporte ativo secundário pela força motriz prótonica através da bomba H^+ -ATPase, permitindo acumulação intracelular de açúcar. O transporte de pentoses em *S. cerevisiae* só ocorre por difusão facilitada, sem gasto energético.

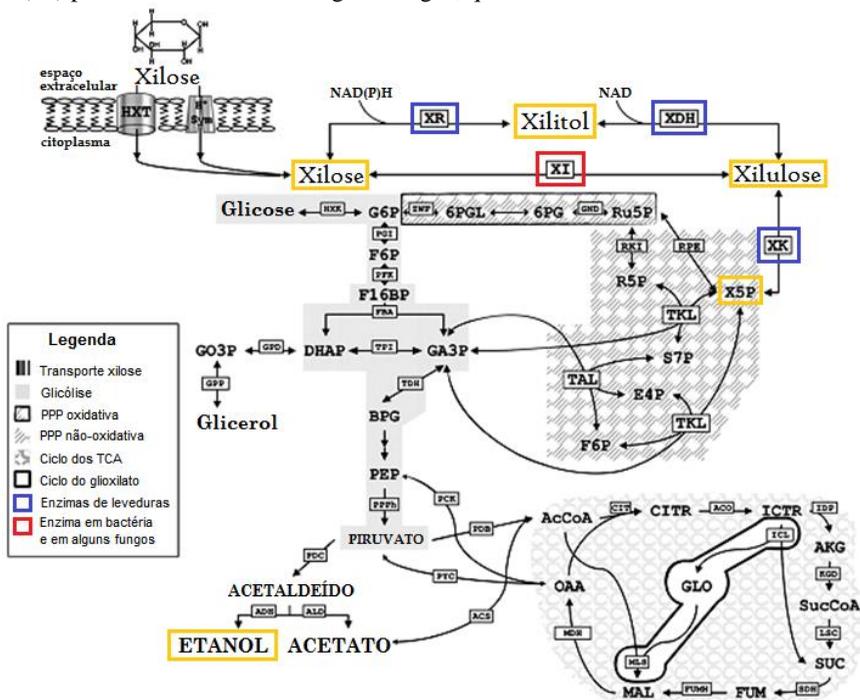


Fonte: Adaptado de Stambuk e colaboradores (2008).

Embora diferentes gêneros de leveduras sejam capazes de fermentar xilose, sua utilização em larga escala é dificultada pelas baixas tolerâncias ao etanol que esses microrganismos possuem. Outro problema que existe na fermentação da xilose é que as enzimas precisam de dois cofatores ($NADPH$ e NAD^+) diferentes. A xilose redutase é geralmente dependente de $NADPH$ (VERDUYN *et al.*, 1985) enquanto

que a xilitol desidrogenase é dependente de NAD^+ (RIZZI *et al.*, 1989). Uma vez que a xilose é convertida em xilulose, várias leveduras podem fermentá-la diretamente em etanol, incluindo *S. cerevisiae* (JEFFRIES & SHI, 1999). Assim, a engenharia genética, visando introduzir os genes da XR, XDH e XK, é uma ferramenta interessante para construção de linhagens recombinantes de *S. cerevisiae* capazes de fermentar xilose, e assim, aproveitar todos os açúcares presentes na biomassa lignocelulósica.

Figura 6 – Rota metabólica da xilose em leveduras. Ressaltam-se em quadrinhos azuis as três enzimas presentes em leveduras (XR: xilose redutase, XDH: xilitol desidrogenase, XK: xilulose cinase). A xilose é reduzida pela XR sendo convertida em xilitol; o xilitol é oxidado pela XDH e convertido em xilulose; por sua vez, a xilulose é fosforilada pela XK a xilulose-5-fosfato (X5P), que segue a via das pentoses-fosfato integrando-se na via glicolítica e finalmente produzindo etanol. Em quadrinho vermelho indica-se a enzima xilose isomerase (XI) presente em bactérias e alguns fungos, que converte xilose em xilulose.



Fonte: Adaptado de Chu & Lee (2007).

Outra dificuldade encontrada na fermentação de xilose é que *S. cerevisiae* não tem transportadores específicos para captação de xilose.

O transporte de xilose para o citoplasma é mediado por transportadores de hexoses, os quais tem maior afinidade por glicose que xilose (CHU & LEE, 2007). A utilização de xilose em *S. cerevisiae* também sofre repressão pela glicose quando ambos os açúcares, xilose e glicose (principais componentes de hidrolisados lignocelulósicos), são usados como matéria prima (TRUMBLY, 1992; CARLSON, 1999; JEFFRIES & SHI, 1999; WESTERGAARD *et al.*, 2007; ZHONG *et al.*, 2009; SUBTIL & BOLES, 2012; ZHA *et al.*, 2013; HARNER *et al.*, 2015).

Estudos do consumo de xilose pelos diferentes transportadores de hexoses, demonstraram que as permeases codificadas pelos genes *HXT1*, *HXT2*, *HXT4*, *HXT5*, *HXT7* e *GAL2* têm a capacidade de permitir a entrada de xilose (SALOHEIMO *et al.*, 2007; BERTILSSON, ANDERSSON & LIDÉN 2008). Estudos recentes, feitos no nosso grupo de pesquisa do LBMBL/UFSC, verificaram que a sobre-expressão do gene *HXT2* em leveduras de laboratório sem transportadores de hexoses, permite às células consumir e fermentar xilose com cinéticas idênticas à da glicose, mas, infelizmente, as fermentações são incompletas porque provavelmente os transportadores sofrem inativação catabólica, provocada pela alta concentração do açúcar (GONÇALVES *et al.*, 2014). No presente trabalho, essa linhagem contendo apenas o transportador *HXT2* foi submetida ao processo de engenharia evolutiva para selecionar leveduras com maior capacidade de consumo de xilose.

3.5 TRANSPORTADORES HXT

A família de transportadores de hexoses inclui os genes *HXT1–HXT17*, *GAL2*, *SNF3* e *RGT2*. *HXT1–HXT4* e *HXT6–HXT7* os quais codificam as proteínas principais que transportam hexoses como glicose, frutose e manose através da membrana plasmática (REIFENBERGER, FREIDEL & CIRIACY, 1995). As proteínas de transporte de hexoses são reguladas diferencialmente, dependendo da fonte e a quantidade de carbono (KRUCKEBERG & BISSON, 1990).

Reifenberger, Freidel & Ciriacy (1995) mostraram que para a glicose *HXT1* e *HXT3* codificam transportadores de baixa afinidade, *HXT2* e *HXT4* codificam transportadores de afinidade moderada, e *HXT6* e *HXT7* codificam transportadores de alta afinidade.

As proteínas Hxt2 e Hxt4 são os transportadores de xilose mais importantes para o processo de co-utilização de glicose e xilose. (BERTILSSON, ANDERSSON & LIDÉN, 2008). Hxt2 é uma proteína

integral da membrana plasmática altamente expressa em meio contendo uma baixa concentração de glicose (WENDELL & BISSON, 1993).

HXT2, com nome sistemático YMR011W na base de dados *Saccharomyces Genome Database* – SGD [disponível em www.yeastgenome.org (ENGEL *et al.*, 2014)], é um gene de 1626 pb que se encontra presente no cromossomo XIII da levedura *S. cerevisiae* (ENGEL *et al.*, 2014). *HXT2* codifica o transportador de glicose Hxt2 de alta afinidade, com alta homologia para uma série de outros transportadores de açúcar, incluindo transportadores de glicose em leveduras e mamíferos (KRUCKEBERG & BISSON, 1990).

3.6 ENGENHARIA GENÔMICA E EVOLUTIVA

A engenharia evolutiva é uma estratégia baseada no princípio de seleção e mutação natural para o melhoramento de linhagens (SAUER, 2001), e inclui todas as modificações e perturbações genéticas aleatórias, dependendo principalmente de mutagênese randômica de todo ou parte do genoma, por meio de experimentos de evolução que permitem selecionar linhagens com características diferenciadas. Através de métodos de *screening* adequados, são selecionados os fenótipos evoluídos com as características desejadas, produzidas pela mutação de seqüências limitadas de ADN.

Trabalhos feitos em linhagens de *S. cerevisiae* mostram que mutações espontâneas ou induzidas na levedura podem melhorar o consumo de xilose (NI, LAPLAZA, & JEFFRIES, 2007). Engenharia genômica e adaptação evolutiva para aumentar o fluxo glicolítico junto a estudos de transcriptômica e proteômica, como também estudos de engenharia metabólica e genômica em leveduras nativas fermentadoras de xilose, têm identificado alvos para possíveis modificações de interesse (Van VLEET & JEFFRIES, 2009).

Grupos de pesquisa ao redor do mundo tem realizado engenharia evolutiva bem sucedida em combinação com engenharia genômica para aprimorar a fermentação de xilose (SONDEREGGER & SAUER, 2003; SONDEREGGER *et al.*, 2004; KUYPER *et al.*, 2005; JEFFRIES, 2006; Van VLEET & JEFFRIES, 2009; BASSO, T. O, 2011; SHEN *et al.*, 2012; SMITH, van RENSBURG & GÖRGENS, 2014; HARNER *et al.*, 2015). Sonderegger e Sauer (2003) usando tanto engenharia genômica, para desenvolver uma linhagem com os genes XR-XDH de *Scheffersomyces stipitis* sobre-expressos, quanto engenharia evolutiva, para a seleção de uma cepa após 460 gerações e 266 dias, obtiveram

uma linhagem evoluída com capacidade de produção de etanol a partir da fermentação de xilose de 19% a mais, quando comparado com a parental. Por sua vez, uma linhagem melhorada fermentadora de xilose foi obtida por Shen e colaboradores (2012) através de manipulação genômica e evolução adaptativa, a partir do melhoramento da rota metabólica da xilose e a expressão do gene *XYL-A* de *Piromyces sp.* que codifica xilose isomerase.

3.7 O GENE *STB5*

O gene *STB5* presente no cromossomo VIII do genoma de *S. cerevisiae*, com nome sistemático YHR178W e 2232 pb (base de dados SGD), codifica o fator de transcrição *Stb5*, envolvido na regulação da resistência a múltiplas drogas e na resposta ao estresse oxidativo, o qual forma um heterodímero com outro fator de transcrição codificado pelo gene *PDR1* (AKACHE *et al.*, 2004). Regula a expressão da maioria dos genes da rota da via das pentoses fosfato, assim como de genes envolvidos na produção de NADPH, um metabólito necessário para resistência ao estresse oxidativo (LAROCHELLE *et al.*, 2006). Os resultados do trabalho de Kasten & Stillman (1997) sugerem que *STB5* pode codificar ativadores transcrpcionais ou proteínas envolvidas na transcrição, e, por sua vez, resultados reportados em Hector e colaboradores (2011) mostram que *Stb5* não é essencial para crescer em glicose, mas tem um papel determinante para a assimilação da xilose em *S. cerevisiae*. Conforme Cadière, Galeote & Dequin (2010), a proteína *Stb5* regula genes para fontes alternativas de NADPH como também genes da via não-oxidativa das pentoses fosfato que influenciam no metabolismo da xilose.

3.8 AQUAPORINAS

Aquaporinas (AQPs) foram descobertas como canais que facilitam a circulação de água através da membrana celular. Enquanto algumas AQPs se comportam “estritamente” como canais de água, outras podem conduzir uma ampla variedade de solutos polares, tais como ureia ou glicerol e ainda gases apolares como o dióxido de carbono e óxido nítrico, espécies reativas de oxigênio como peróxido de hidrogênio, e metaloides como antimonita, arsenito, boro e silício (WU & BEITZ, 2007; HACHEZ & CHAUMONT, 2010). AQPs são proteínas transmembrana compostas de 243 a 302 aminoácidos,

contendo tipicamente seis α - hélices de membrana, com os N- e C-terminais alocados no lado citoplasmático da membrana (HACHEZ & CHAUMONT, 2010).

A aquoporina Fps1 da levedura *S. cerevisiae* foi a primeira a ser descrita em eucariotos na rota de captação de As(III) e Sb(III). Fps1 transporta glicerol [(HCOH)₃H₂], arsenito [As(OH)₃], antimônio [Sb(OH)₃], ácido bórico [B(OH)₃] e ácido acético [CH₃COOH] (WYSOCKI *et al.*, 2001). Fps1 também desempenha uma função chave na regulação osmótica por mediar a exportação do glicerol que é produzido pela levedura (LUYTEN *et al.*, 1995).

A perda do gene *FPS1* confere resistência à acroleína e álcool alélico, comprometendo o uso de acetamida como fonte de nitrogênio e sugere que esses compostos podem ser transportados por Fps1 (SHEPHERD & PIPER, 2010). Gene *FPS1*, com nome sistemático YLL043W, apresenta 2010 pares de bases (pb) e está presente no cromossomo XII de *S. cerevisiae* na região 49938 a 51947 – conforme a base de dados SGD.

No trabalho realizado por Wei e colaboradores (2013), foi avaliada a produção de xilitol em duas cepas modificadas de *S. cerevisiae*: uma usada como controle para a produção de xilitol expressando apenas xilose redutase (XR) codificada pelo gene *XYL1* de *S. stipitis*; e a outra, com o gene *FPS1* deletado. Eles observaram que a linhagem com o gene deletado apresentava uma menor produção de xilitol e um aumento na produção de etanol quando comparado à linhagem sem o gene deletado (WEI *et al.*, 2013). Os resultados promissores reportados nessa linhagem de laboratório incentivaram esta pesquisa, visando analisar quais os efeitos na metabolização da xilose pela deleção desse gene em uma levedura industrial capaz de metabolizar xilose.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 LINHAGENS DE LEVEDURAS

As linhagens recombinantes de *Saccharomyces cerevisiae* que foram estudadas neste trabalho são as cepas de laboratório DLG-K1, DLG-K1T2, e a linhagem industrial MP-C5 (Tabela 1).

Tabela 1 – Cepas de *S. cerevisiae* utilizadas.

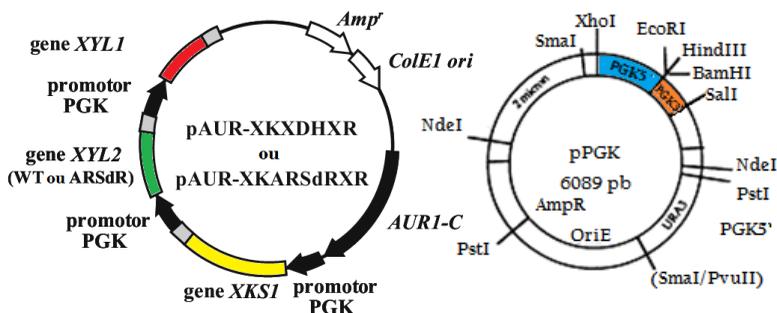
Linhagem	Genótipo ou descrição	Fonte ou referência
S288C	<i>MATα SUC2 gal2 mal2 mel flo1 flo8-1 hap1 ho bio1 bio6</i>	MORTIMER & JOHNSTON, 1986
KY73	<i>MATα hxt1Δ :: HIS3 :: Δ hxt4 hxt5 :: LEU2 hxt2Δ :: HIS3 hxt3Δ :: LEU2 :: hxt6 hxt7 :: HIS3 gal2 Δ :: DR* ura3-52 his3-11,15 leu2-3,112 MAL2 SUC2 GAL MEL</i>	KRUCKEBERG <i>et al.</i> , 1999
DLG-K1	KY73, <i>AUR1::pAUR-KKXDHXR</i>	GONÇALVES <i>et al.</i> , 2014
DLG-K1T2	DLG-K1, pPGK-HXT2	GONÇALVES <i>et al.</i> , 2014
CAT-1	Linhagem diploide industrial, isolada na Usina VO Catanduva, SP, em 1998/1999	BASSO <i>et al.</i> , 2008
MP-C5	CAT-1, <i>AUR1::pAUR-KKXDHXR</i>	GONÇALVES, 2014
9C-MA ou 10A-MA	DLG-K1, pPGK-HXT2 &ea ^(a)	Este trabalho
B2-MAPL	MP-C5, <i>FPS1 / fps1Δ::Ble^r</i>	Este trabalho
Nota: (a) evolução adaptativa		

4.1.1 Linhagens DLG-K1 e DLG-K1T2

Primeiramente a linhagem KY73 (KRUCKEBERG *et al.*, 1999), que tem deletado os genes *HXT1-HXT7* e *GAL2*, e portanto, capaz de crescer somente em maltose, foi transformada com o plasmídeo integrativo pAUR-KKXDHXR (MATSUSHIKA *et al.*, 2008) (vide Figura 7 e Tabela 2), passando a ser denominada DLG-K1 (GONÇALVES, 2014). O plasmídeo foi integrado no genoma da levedura por recombinação homóloga no locus *AUR1*. Na sequência, o gene *HXT2* foi amplificado a partir do DNA genômico da linhagem haploide de laboratório S288C descrita por Mortimer & Johnston (1986)

e inserido no plasmídeo pPGK (KANG *et al.*, 1990) (vide Figura 7). O plasmídeo pPGK-HXT2 foi inserido a seguir na linhagem DLG-K1, resultando na linhagem DLG-K1T2.

Figura 7 – Plasmídeos pAUR-XKXDHXR e pPGK.



Fonte: pAUR à esquerda, MATSUSHIKA e colaboradores (2008); pPGK à direita, KANG e colaboradores (1990).

Tabela 2 – Plasmídeos utilizados.

Plasmídeo	Genotipo ou descrição	Fonte ou referência
pAUR-XKXDHXR	AUR-C expressão de XK, selvagem XDH, e genes XR	MATSUSHIKA <i>et al.</i> , 2008
pPGK	URA 3 PGK 1p-PGK 1t	KANG <i>et al.</i> , 1990
pPGK-HXT2	URA 3 PGK 1p-HXT2-PGK 1t	GONÇALVES, 2014
pUG6	loxP-PTEF-KanMX-TTEF-loxP	GÜLDENER <i>et al.</i> , 1996
pUG66	loxP-PTEF-Ble ^r -TTEF-loxP	GUELDENER <i>et al.</i> , 2002

4.1.2 Linhagem MP-C5

A linhagem CAT-1, utilizada na produção de etanol combustível (BASSO *et al.*, 2008), foi transformada com o plasmídeo integrativo pAUR-XKXDHXR (vide Figura 7, MATSUSHIKA *et al.*, 2008) e passou a ser denominada MP-C5.

4.2 CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO

4.2.1 Meios de cultura das leveduras

Um dos meios de cultura utilizados para o crescimento das leveduras foi o meio sintético (SC) contendo 6,8 g/l de *Yeast Nitrogen Base Without Amino Acids* (Y0626 da SIGMA-ALDRICH), suplementado com 20 g/l dos diferentes açúcares a serem analisados, tamponado com 0,05 M succinato-Tris pH 5,0 e suplementado com solução de aminoácidos sem uracila (*Yeast synthetic drop-out medium supplements without uracil* da Sigma-Aldrich) para permitir o crescimento das linhagens transformadas com plasmídeo. O meio SC sempre foi preparado a uma concentração de 10x, esterilizado por filtração e armazenado a 4 °C. Alternativamente foi utilizado o meio rico completo YP, contendo 10 g/l de extrato de levedura (Fluka), 20 g/l de peptona bacteriológica (Fluka), suplementado com o açúcar de interesse. O pH foi ajustado a 5,0 com solução de HCl 0,1 M. O meio YP foi autoclavado junto com os açúcares a 121 °C, 103 kPa (15 lb) de pressão, durante 15 min.

Os antibióticos utilizados, Geneticina 200 mg/l (G418 – Sigma), Zeocina 500 mg/l (Invitrogen), Aureobasidina-A 0,5 mg/l (Takara-Bio), foram esterilizados previamente por filtração, utilizando filtros de nitrocelulose com porosidade de 0,22 µm (Millipore).

Para a preparação do meio sólido foi adicionado 20 g/l de Bacto-agar (Fluka). As leveduras foram repicadas com alça bacteriológica em placas de Petri e em tubos com 2 % de açúcar, crescidas em estufa a 28 °C durante 3-5 dias.

Quando crescidas em meio líquido, as células de levedura foram incubadas a 28 °C sob agitação orbital a 160 rpm numa incubadora INNOVA®44 (New Brunswick Scientific). A conservação das células foi realizada em placas de petri, e alíquotas com 30% de glicerol foram guardadas a -80 °C em criotubos.

4.2.2 Meio de cultivo para bactérias

A bactéria *Escherichia coli* DH5α foi cultivada em meio Luria-Bertani (LB – Sigma) líquido, e crescimento realizado em estufa bacteriológica a 37 °C entre 24 e 48 horas. Além disso, foram realizadas culturas em meio LB sólido com adição de 2% de agar. Quando

necessário, adicionou-se Ampicilina em condições assépticas com uma concentração de 100 mg/ml.

4.3 TÉCNICAS DE BIOLOGIA MOLECULAR

4.3.1 Preparação de células competentes

Foi inoculada uma colônia isolada da linhagem DH5 α de *E. Coli* em 5 ml de LB e deixou-se crescendo durante a noite até saturação. Uma vez crescidas as bactérias, foi transferido 1 ml do pré-inóculo para 100 ml de meio LB e incubado a 37 °C com agitação até atingir uma absorbância a 600 nm de 0.6 (aproximadamente 3 horas). A cultura de bactérias foi transferida para tubos de 50 ml, deixadas em banho de gelo por 10 minutos e posteriormente centrifugadas 10 min a 4000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o precipitado resuspendido em 10 ml de solução de cálcio gelada (CaCl₂ 60 mM, glicerol 15% , Pipes 10 mM, pH 7,0). A suspensão foi deixada 30 min em banho de gelo. Transcorridos 30 minutos foi centrifugada a 4000 rpm durante 10 min, foi retirado o sobrenadante e se fez uma nova lavagem com a solução de cálcio, sendo o precipitado resuspendido em 2 ml de solução de cálcio, e mantido por 15 minutos no gelo. Foram feitas alíquotas de 80 μ l em tubos de 1,5 ml estéreis e armazenadas a -80°C até seu uso (AUSUBEL *et al.*, 1992).

A preparação de células competentes de levedura foi realizada de acordo a métodos descritos na literatura (ITO *et al.*, 1983; GIETZ *et al.*, 1992; GIETZ & WOODS, 2002). As leveduras foram inoculadas em 5 ml de meio líquido YP ou meio sintético SC e incubadas toda a noite a 28 °C sob agitação orbital de 156 rpm. No dia seguinte, o crescimento da levedura foi determinado com medição da absorbância em espectrofotômetro a 600 nm e iniciado um inóculo com uma absorbância de ~0.1 em 50 ml de meio YP ou SC em um *erlenmeyer* com capacidade de 250 ml. Esse inóculo deixou-se crescendo até atingir uma absorbância de 1,0 (SC ~4-5 horas, YP ~3horas). Após atingir essa absorbância, a cultura foi transferida para um tubo de 50 ml, centrifugada a 3000 rpm durante 5 min e o sobrenadante desprezado com auxílio de pipeta. Em seguida, as células foram lavadas em 25 ml de água destilada, novamente centrifugadas a 3000 rpm durante 5 min e desprezado o sobrenadante. Posteriormente, as células foram resuspendidas em 1 ml de 0,1 M de acetato de lítio e transferidas para um tubo de 1,5 ml estéril. O tubo foi centrifugado a 4000 rpm durante 2

min e descartado o sobrenadante. A essas células foi adicionado um volume de acetato de lítio 0,1 M dependendo da absorbância que apresentaram ($Abs_{600} \sim 1,07$ foi adicionado um volume de 360 μ l, $Abs_{600} \sim 1,42$ foi adicionado um volume de 580 μ l) e agitadas com vórtex. Foram feitas alíquotas de 100 μ l, centrifugadas a 13000 rpm a temperatura ambiente e removido o sobrenadante.

4.3.2 Extração de DNA plasmidial de bactérias

Os criotubos com as bactérias DH5 α de *E. coli* contendo os plasmídeos de interesse, pUG6 (genótipo relevante *loxP-P_{TEF}-KanMX-T_{TEF}-loxP*, GÜLDENER *et al.*, 1996) ou pUG66 (*loxP-P_{TEF}-Ble^r-T_{TEF}-loxP*, GUELDERNER *et al.*, 2002), foram retirados do *ultrafreezer* em condições assépticas. Uma alça bacteriológica foi friccionada na cultura contida no criotubo e foi usada a técnica de esgotamento para transferir na superfície de uma placa de Petri contendo meio sólido LB com os antibióticos de seleção, essas placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 37 °C por 24-48 h. Das colônias de bactérias obtidas foram feitos outros crescimentos para conservação das cepas e para a utilização das mesmas.

A extração dos plasmídeos foi realizada de acordo com a técnica *Miniprep* (MANIATIS, FRITSCH & SAMBROOK, 1982). Para isso, inoculou-se uma colônia das transformantes em meio LB, contendo antibiótico, e incubada durante a noite a 37 °C com agitação (145-220 rpm). Foram transferidos 1,5 ml da cultura para um microtubo que, em seguida, foi centrifugado por 3 min a 6000 rpm, descartado o sobrenadante e o *pellet* resuspendido em 100 μ l de GTE (50 mM de glicose, 10 mM de EDTA e tampão 25 mM Tris-HCl, pH 8.0). Depois, adicionou-se 1 μ l da enzima (*RNAse Ribonuclease*, Thermo Scientific) a uma concentração de 1 mg/ μ l, misturou-se gentilmente invertendo o tubo e foi deixado 5 min a temperatura ambiente. Em seguida, adicionou-se 200 μ l de solução NaOH/SDS (0.2 M de NaOH e 1% de SDS, preparada na hora), misturou-se gentilmente e incubou-se no gelo por 5 min. Após, adicionou-se 150 μ l de solução de acetato de potássio 5 M com um pH de 4,8; deixou-se no gelo por 5 minutos e se agitou 1 s em vórtex. Foi centrifugado a 9000 rpm por 5 min e 400 μ l de sobrenadante foi transferido para um tubo de 1,5 ml.

Foram adicionados 800 μ l de etanol com concentração de 95% e deixados a -20 °C por 30 min. Transcorrido esse tempo, o tubo foi centrifugado 15 min a 12000 rpm e o sobrenadante descartado. O

precipitado foi lavado com 1 ml de etanol a uma concentração de 70%, novamente centrifugado por 5 min a 12000 rpm e descartado o sobrenadante. O tubo com o *pellet* foi secado na capela de fluxo e o DNA resuspendido em 40 µl de água ultrapura estéril.

4.3.3 Extração e purificação de plasmídeos de levedura

Para a extração dos plasmídeos das linhagens 9C-MA e 10A-MA foi usado o kit *Zymoprep™ Yeast Plasmid Miniprep II* (Zymo Research) levando em conta as condições estabelecidas pelo fabricante.

4.3.4 Extração de DNA genômico de leveduras

Para a extração do DNA genômico das leveduras MP-C5 e B2-MAPL, quando confirmada a presença do gene marcador *Ble^r*, foi utilizado o kit comercial *YeaStar™ Genomic DNA Kit* (Zymo Research) seguindo as indicações do fabricante. A eluição do DNA foi realizada usando as colunas do kit com água ultrapura. Os DNAs extraídos foram armazenados a -20 °C para seu uso posterior em alíquotas de 20 µL.

Para a extração de DNA genômico das leveduras e a análise de todas as transformantes que se obtiveram, foram usados protocolos descritos por Harju, Fedosyuk & Peterson (2004) e Lööke, Kristjuhan & Kristjuhan (2011).

4.3.5 Digestão com enzimas de restrição

As enzimas usadas para a digestão do pPGK+HXT2 foram *Bam*HI e *Hind*III (*New England's BioLabs*). As digestões foram preparadas para 20 µl de reação, a qual continha 10 µl de DNA (0,1-1,0 ng), 2,0 µl do *buffer* 10x apropriado para cada enzima, 0,2 µl de BSA (albumina do soro bovino) em uma concentração de 20 mg/ml, 10 unidades da enzima por reação e água estéril ultrapura para completar um volume final de 20 µl. A mistura foi incubada em banho de Maria a 37 °C por ~3 horas, transcorrido esse tempo, foi feita uma eletroforese para verificação dos fragmentos obtidos.

4.3.6 Electroforese em gel de agarose

Os fragmentos de DNA foram analisados por eletroforese em géis de 1% agarose contendo 0,5 mg/l de brometo de etídio em tampão TBE 0,5X (1 mM de EDTA em tampão 45 mM Tris-borato pH 8,0). Cada gel analisado foi carregado com 6 µl do marcador de peso molecular *GeneRuler 1 kb DNA Ladder* (Thermo Scientific) e às soluções de DNA (5 µl) adicionou-se 1 µl de tampão de amostra 6x (10 mM Tris-HCl pH 7,6; 0,03% azul de bromofenol; 0,03% xileno cianol FF; 60% glicerol e 60 mM EDTA). A tensão elétrica (voltagem) aplicada ao gel foi de 90 mV. Os géis foram fotografados e analisados em um fotodocumentador Molecular Imager® Gel Doc™ XR System (Bio-Rad).

4.3.7 Purificação de DNA do gel de agarose

Após a eletroforese em gel de agarose, as bandas dos fragmentos de interesse foram cortadas para purificação do DNA usando o kit *Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (GE Healthcare) seguido às instruções do fabricante.

4.3.8 Transformação de bactérias

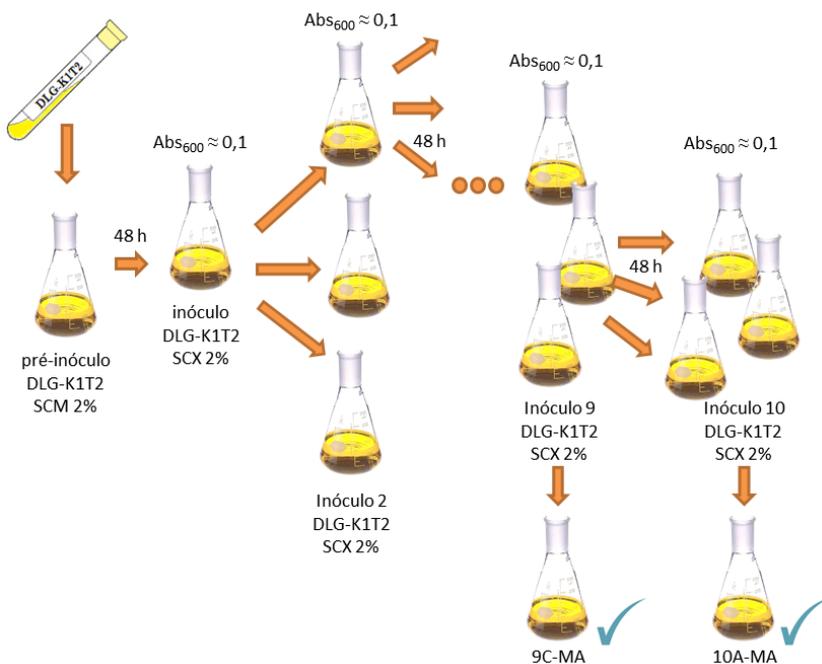
Para cada alíquota contendo 80 µl de células competentes DH5α foram adicionados de 1-5 µl de plasmídeo de interesse, mantidas no gelo por 10 min e incubadas em banho de Maria a 42 °C durante 2 min. Na sequência, as células foram colocadas em gelo por 1 min, depois foram adicionados 500 µl de meio LB, e a seguir, as células foram incubadas por 1 hora a 37 °C com agitação. Depois da incubação, as células foram centrifugadas e resuspendidas em 200 µl de LB, suspensão que foi plaqueada usando alça de Drigalsky em meio sólido LB com ampicilina a uma concentração de 100 µg/ml, e incubadas de novo em estufa bacteriológica a 37 °C por 24-48 horas conforme a procedimento descrito em Ausubel e colaboradores (1992).

4.3.9 Engenharia evolutiva

A linhagem de levedura recombinante DLG-K1T2 foi crescida em meio sintético SC sem uracila, suplementado com 20 g/l de xilose

durante 48 horas, e a seguir, as células foram recuperadas e usadas para estabelecer novas culturas as quais iniciaram seu crescimento a uma absorbância de $\sim 0,1$; como indicado em Ha e colaboradores (2013). Cada novo cultivo foi feito em triplicata, as absorbâncias foram determinadas a cada 24 horas, e guardadas alíquotas de meio para posterior análise. Depois de transcorridas 48 horas, escolheu-se das três culturas a que apresentava melhor crescimento para iniciar um novo cultivo, e assim sucessivamente como ilustrado na Figura 8, até obter duas linhagens de interesse a partir dos inóculos 9 e 10, com capacidade melhorada de crescer em xilose. Essas duas linhagens foram isoladas por esgotamento em meio SC suplementado com 20 g/l de xilose.

Figura 8 – Representação do experimento de evolução. A linhagem DLG-K1T2 foi inoculada em meio SC sem uracila suplementado com 20 g/l de xilose. Todos os crescimentos iniciaram com Abs_{600nm} de $\sim 0,1$ e aquele inóculo com maior absorbância após 48 h de crescimento era utilizado para realizar 3 novos inóculos, e assim sucessivamente até obter as linhagens de interesse.

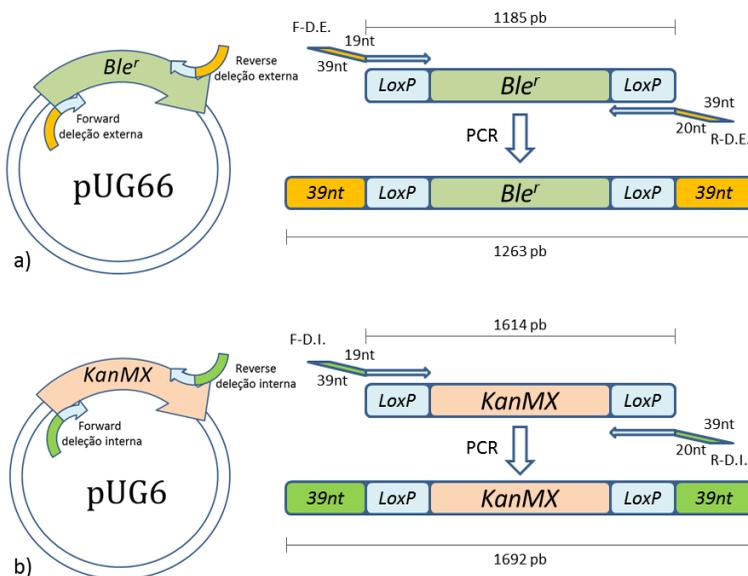


Fonte: Autor.

4.3.10 Engenharia genômica

A deleção do gene *FPS1* foi realizada usando metodologias baseadas em PCR para produzir fragmentos de DNA com homologia à região do gene de interesse, que por recombinação homóloga, substituem o gene alvo (PETRACEK & LONGTINE, 2002). Foram produzidos dois fragmentos lineares de DNA denominados módulos de deleção, como representado na Figura 9, usando os iniciadores descritos na Tabela 3 e o DNA dos plasmídeos pUG6 e pUG66 [Tabela 2; (GÜLDENER *et al.*, 1996; GUELDENER *et al.*, 2002)].

Figura 9 – Módulos de deleção *FPS1*. Para construção do módulo de deleção externa (a), utilizaram-se iniciadores (azul-amarelo) que possuem uma região de homologia ao pUG66 flanqueando o gene marcador *Ble^r* (verde) e uma região de homologia ao genoma da levedura na região externa do *FPS1* (extremos em amarelo). No módulo de deleção interna (b), os iniciadores (verde-azul) possuem região de homologia ao pUG66 flanqueando o gene marcador *KanMX* (rosa) e uma região de homologia ao genoma da levedura no início e final do gene *FPS1* (extremos em verde). Em ambos os módulos os genes marcadores são flanqueados por sequências *LoxP* nas suas extremidades (azul).



Fonte: Autor.

Tabela 3 – Sequência dos iniciadores utilizados na construção dos módulos de deleção externa e interna do gene *FPS1*.

INICIADOR	SECUENCIA 5'→3'	POSIÇÃO ^(a)
F-FPS1-D. INTERNA ^(b)	ATGAGTAATCCTCAAAAAGCTCTAAACGACTTTCTGTCC <u>CCAGCTGAAGCTTCGTACG</u> ^(d)	1 a 39
R-FPS1-D. INTERNA ^(c)	TCATGTTACCTTCTTAGCATTACCATAATGCGAATCTTC <u>GCATAGGCCACTAGTGGATC</u> ^(d)	1972 a 2010
F-FPS1-D. EXTERNA ^(b)	CAAGTACGCTCGAGGGTACATTCTAATGCATTAAGAC <u>CCAGCTGAAGCTTCGTACG</u> ^(d)	-39 a -1
R-FPS1-D. EXTERNA ^(c)	TCAGTCTATATTATTTGTTCTTTTTCTGTCTGTTTT <u>GCATAGGCCACTAGTGGATC</u> ^(d)	2049 a 2011
F-V. D-FPS1 ^(b)	TGATGATGTGGCATTGGGCT	969 a 988
R-V. D-FPS1 ^(c)	CCGTCTGAACCTAGATAAGGCT	1275 a 1253
F-V. L-FPS1 ^(b)	TGTGCCGTCCAACAAGGT	-302 a -284
R-V. L-FPS1 ^(c)	ATCGAATCGCTGCTTGATGTT	2350 a 2330
V-KANr-R	GGAATCGAATGCAACCGG	não aplica
V-BLE-F	CCTTCTATGAAAGTTGGGC	não aplica

Nota: (a) Posição de homologia ao genoma da levedura a partir do códon de início da tradução do gene *FPS1*; (b) As sequências em itálico dos iniciadores F (*forward*) nos módulos de deleção externa e interna apresentam homologia à região a montante do gene *FPS1*. Nos iniciadores de verificação, são complementares as fitas 5'→3'; (c) As sequências em itálico dos iniciadores R (*reverse*) apresentam homologia à região a jusante do gene *FPS1*. Nos iniciadores de verificação são complementares as fitas 3'→5'; (d) As sequências sublinhadas são homólogas aos plasmídeos pUG6 e pUG66 (SAMBROOK & RUSSELL, 2001; PETRACEK & LONGTINE, 2002).

O módulo de deleção externa obtido por PCR, fragmento linear de 1263 pb, apresenta homologia à região que flanqueia o gene a montante (correspondente aos nucleotídeos -39 a -1, antes do códon de iniciação) e a jusante (correspondente à região entre os nucleotídeos 2049 e 2011, após o códon de terminação). Para este módulo de deleção foi usado o DNA do plasmídeo pUG66 o qual contém o gene *Ble^r* que confere resistência ao antibiótico Zeocina. Na construção do módulo de deleção interna foi realizado o PCR usando os iniciadores que apresentavam homologia à região interna do gene (correspondente aos nucleotídeos 1 a 39 a partir do códon de iniciação e à região entre os nucleotídeos 1972 e 2010 antes do códon de terminação), da qual foi obtido um fragmento linear de 1692 pb usando o DNA do plasmídeo pUG6 o qual contém o gene *KanMX* que confere resistência ao antibiótico Geneticina.

4.3.11 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Os iniciadores utilizados, indicados na Tabela 3, foram construídos segundo Ye e colaboradores (2012) com o software *on-line* Primer-BLAST da NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>) tendo como base a sequência genômica da levedura *S. cerevisiae* encontrada na base de dados SGD (*Sacharomyces Genome Database in* www.yeastgenome.org). Foi usada a enzima DNA polimerase *GoTaq®* (Promega), ou alternativamente a enzima de alta fidelidade *Phusion High-Fidelity DNA Polymerase* (Thermo Scientific), em reações com os tampões fornecidos pelos fabricantes. Ao usar a enzima de alta fidelidade *Phusion*, as reações continham 1,5 mM MgCl₂, 200 µM de dNTPs, 0,5 µM de cada iniciador, 50 ng de DNA molde, e finalmente 1 U da enzima. As reações de PCR no *Mastercycler Gradient* (Eppendorf) tiveram as seguintes etapas: (1) desnaturação inicial a 98 °C por 30 s; (2) 35 ciclos com um passo de desnaturação a 98 °C por 10 s, anelamento dos iniciadores segundo a T_m calculada por 30 s, extensão das fitas a 72 °C por 15-30 s/kb; e (3) um passo de extensão final de 72 °C por 5 minutos.

No caso da enzima *GoTaq®*, utilizou-se nas mesmas condições citadas acima com 1,25 U da enzima, sendo que as etapas no termociclador foram: (1) desnaturação inicial a 95 °C por 2 min; (2) 35 ciclos com um passo de desnaturação a 95 °C por 1 min, anelamento dos iniciadores segundo a T_m calculada por 1 min, e a extensão das fitas a 72 °C por 1 min/kb; e (3) um passo de extensão final de 72 °C por 5 minutos.

4.3.12 Transformação de leveduras

A transformação de leveduras foi realizada de acordo com métodos descritos na literatura (ITO *et al.*, 1983; GIETZ *et al.*, 1992; GIETZ & WOODS, 2002). A cada alíquota de células de levedura competentes (100 µl) foram adicionados 360 µl da mistura de reagentes (*T Mix*) apresentados na Tabela 4. As suspensões celulares foram agitadas gentilmente e incubadas em Banho Maria a 42 °C por 40 min. Transcorridos os 40 min, os tubos foram centrifugados a 13000 rpm durante 30 s, após foi removido o sobrenadante com pipeta, e adicionou-se por tubo 1 ml de meio líquido SC ou YP com 20 g/l do açúcar. Em seguida, as células suspensas foram agitadas gentilmente por 10 minutos com pipeta.

Os tubos foram incubados a 28 °C sob agitação orbital de 160 rpm por 3-4 horas, depois foram centrifugados a 4000 rpm durante 2 min e desprezado o sobrenadante. A seguir as células foram suspendidas em 500 µl de água estéril e as mesmas inoculadas usando alça de Drigalsky na superfície de placas de Petri contendo o meio sólido seletivo requerido, meio SC menos uracila e com aurobasidina 0.5 mg/l (Takara-Bio) ou meio suplementado com Geneticina (G-418, Sigma) a uma concentração de 200 mg/l, ou ainda Zeocina (Invitrogen) a uma concentração de 500 mg/l.

Tabela 4 – Mistura de reagentes (*T Mix*) para transformação.

Reagentes	Número de transformantes planejadas		
	1	5 (6x)	10 (11x)
PEG 3350 SIGMA (50% p/v)	240 µl	1440 µl	2640 µl
Acetato de lítio 1 M	36 µl	216 µl	396 µl
DNA de esperma de salmão de fita simples [10 g/l]^(a)	5 µl	30 µl	55 µl
DNA puro (0,1 – 1,0) µg	40 µl	240 µl	440 µl
Água estéril ultrapura	39 µl	234 µl	429 µl
Volume total	360 µl	2160 µl	3960 µl

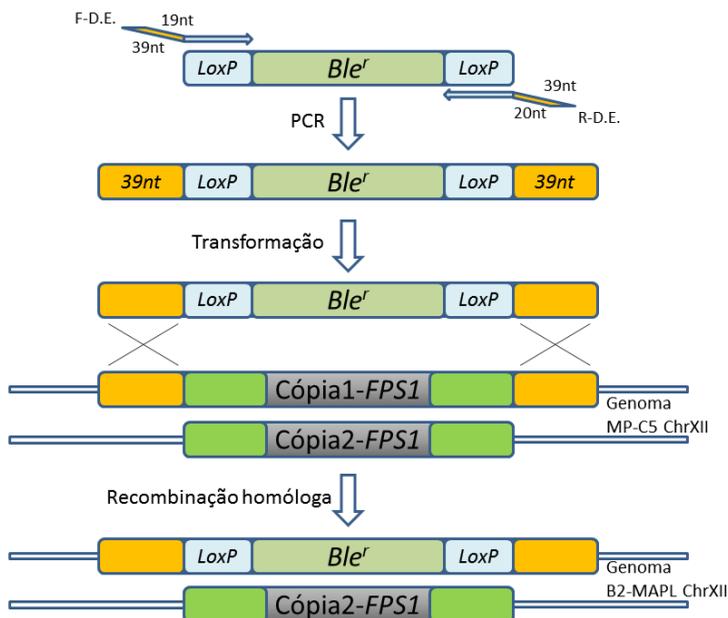
Nota: (a) O DNA foi previamente incubado em Banho de Maria a 100 °C por 5 min e resfriado rapidamente em banho de gelo.

As placas foram deixadas com a tampa semiaberta dentro da capela de fluxo laminar até secar a superfície do meio sólido (~15 min) e, por fim, foram incubadas a 28 °C (2-3 dias para YP e 3-5 dias para

SC) até surgirem colônias de células na superfície do meio. As colônias que cresceram foram repicadas com alça bacteriológica para novas placas contendo o meio com o antibiótico de seleção.

Usando DNA dos plasmídeos das linhagens evoluídas obtidas foram realizadas as transformações na linhagem DLG-K1, na abordagem de engenharia evolutiva do trabalho. Para a outra abordagem, de engenharia genômica, as transformações para deleção do gene *FPS1* foram realizadas na linhagem industrial MP-C5. Assim, a estratégia de deleção do primeiro gene *FPS1* usando o módulo de deleção externa é representada por meio da Figura 10.

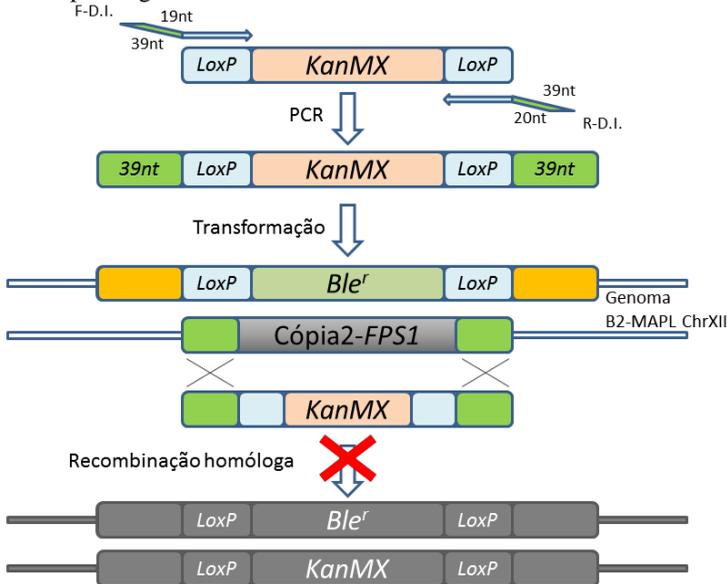
Figura 10 – Estratégia de transformação da linhagem industrial com o módulo de deleção externa. O módulo de deleção externa apresenta o marcador *Ble^r*, e regiões (amarelo) de homologia com a região montante e a jusante do gene *FPS1*. Entre essas regiões ocorre um evento de recombinação homóloga o qual é o responsável por deletar a primeira cópia do gene e originar a linhagem B2-MAPL.



Fonte: Autor.

Por sua vez, a estratégia de deleção da segunda cópia do gene *FPS1* para a transformação da linhagem é representada na Figura 11.

Figura 11 – Estratégia de transformação da linhagem B2-MAPL com o módulo de deleção interna. O módulo de deleção interna apresenta o marcador *KanMX* (rosa) e regiões com homologia ao começo e final do gene *FPS1* (verde). Entre essas regiões espera-se um evento de recombinação homóloga para deletar a segunda cópia do gene *FPS1*.



Fonte: Autor.

4.4 ANÁLISE DA CINÉTICA DE CRESCIMENTO

Para analisar a cinética de crescimento foram feitas coletas de alíquotas em diferentes tempos. Os tempos eram determinados dependendo da linhagem e do açúcar em que estava sendo feita a cultura.

4.4.1 Concentração celular

As medidas de absorbância foram realizadas em espectrofotômetro *Agilent Cary 60 UV-Vis* a 600 nm para monitorar o aumento da massa celular, sendo aceitas leituras de absorbância entre 0,03 e 0,3.

4.4.2 Microplaca

Para os cultivos em microplaca, foi preparado previamente (48 horas antes) o pré-inóculo da linhagem DLG-K1T2 em 10 ml de meio SC menos a base uracila suplementado com 2% de maltose e aurobasidina a uma concentração final de 0.5 mg/l em *erlenmeyer* com capacidade de 50 ml, incubado com agitação orbital a 156 rpm. Para cada um dos açúcares (maltose, glicose, xilose e xilose+glicose) foram preparadas concentrações de 0,5%, 1%, 2%, 4%, 6% e 10%.

Em capela de fluxo, foram transferidos os 10 ml do pré-inóculo para um tubo estéril de 15 ml, depois centrifugado a 5000 rpm com temperatura de 4°C durante 5 min e descartado o sobrenadante. Depois foram adicionados 10 ml de água destilada estéril, agitado por vórtex e centrifugado novamente. Esse processo foi realizado duas vezes e, por fim, o sobrenadante foi resuspendido em 4 ml de água destilada estéril. A cada poço da microplaca foram colocados 90 µl de meio e adicionou-se 10 µl de células já ajustadas com a absorbância de 1,0 para que os crescimentos nas placas iniciarem em uma absorbância de aproximadamente 0,1. A placa foi colocada na leitora de placas *TECAN Infinite® M200 Pro* (Tecan Group Ltd.) e iniciado o programa previamente desenhado que apresenta 384 ciclos de 15 minutos, cada ciclo a uma temperatura de 28 °C (STAMBUK *et al.*, 2009).

4.4.3 Frasco agitado

O crescimento das culturas foram realizados em frascos agitados com meio líquido, incubadas em *erlenmeyers* de 250 ml contendo 1/5 do seu volume de meio sob agitação orbital de 160 rpm a 28 °C.

4.5 DETERMINAÇÃO DO CONSUMO DE AÇÚCARES, PRODUÇÃO DE ETANOL E OUTROS PRODUTOS

Para a quantificação do consumo de açúcares, produção de etanol e outros produtos (como glicerol e xilitol), as amostras foram centrifugadas a 14000 rpm durante 5 minutos para remover qualquer resto celular, e o sobrenadante foi guardado a -20°C para análise posterior.

4.5.1 Determinação bioquímica de glicose

Usando o sistema enzimático comercial *GLICOSE Liquiform* (Labtest) foi determinada a concentração de glicose nas amostras. O procedimento usado segundo as indicações do fabricante foi o método do ponto final. Nesse método, 10 µl de cada amostra reagiram com 1,0 ml do reagente do kit, que tem as enzimas glicose oxidase e peroxidase. As amostras foram incubadas durante 10 min em Banho de Maria mantido a temperatura constante de 37 °C. Foram determinadas as absorbâncias do teste e do padrão em 505 nm, acertando o zero com o branco, e feita a correlação entre as absorbâncias para determinação da glicose em g/l.

O princípio do método consiste em que a enzima glicose oxidase (GOD) catalisa a oxidação da glicose produzindo ácido glucônico e peróxido de hidrogênio (H₂O₂). O peróxido formado reage com 4-aminoantipirina e fenol, sobre a ação catalisadora da peroxidase (POD), formando uma antipirilquinonimina vermelha cuja intensidade de cor é proporcional à concentração de glicose na amostra.

4.5.2 Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

Para a análise das amostras por cromatografia líquida de alta eficiência, cada uma das amostras foi filtrada com membranas filtrantes *fluoropore* de 13 mm de diâmetro e tamanho de poro de 0,45 µm. Para cada amostra a analisar foi realizada uma diluição com água estéril ultrapura para completar um volume de 600 µL, as quais foram analisadas no *HPLC Perkin Elmer Series 200* equipado com uma coluna Aminex HPX-87H, 300 x 7,8 mm, a uma temperatura de 35 °C, em uma fase móvel de 5 mM H₂SO₄ com fluxo de 0,6 ml/min. O programa *TotalChrom v.6.2.0.0* foi o empregado para a análise dos dados.

Para cada açúcar (maltose, glicose, xilose) e produtos analisados (xilitol, glicerol e etanol), foram realizados pelo menos cinco padrões em diferentes concentrações. Os produtos foram identificados por comparação com os tempos de retenção e eluição das soluções usadas como padrão (MONOŠÍK *et al.*, 2013). Os valores em g/l das amostras analisadas foram calculados por meio da equação da reta, determinada pelas curvas de calibração com os padrões.

4.6 FERMENTAÇÕES

4.6.1 Fermentação em batelada

As células das leveduras foram crescidas em meios contendo xilose a uma temperatura de 28 °C e 160 rpm, até atingir uma concentração de aproximadamente 10 g/l de células. Uma vez atingida essa concentração, as células foram centrifugadas a 4 °C e 14000 rpm. A concentração final de células foi ajustada a ~10 g/l em meio rico YP contendo 40 g/l da fonte de carbono (GONÇALVES, 2010). Durante a fermentação foram removidas alíquotas de meio em tempos determinados, centrifugadas e guardados os sobrenadantes para posterior análise de consumo de açúcares, produção de etanol e outros produtos.

4.6.2 Quantificação da biomassa celular

Para a determinação da concentração da biomassa celular em g/l, das linhagens de levedura, foram realizadas medições iniciais por triplicata, de absorvância a 570 nm e 600 nm em amostras de 5 ml e 10 ml dos inóculos de interesse, tendo como referência o trabalho de Sonderegger e colaboradores (2004). Com as absorvâncias conhecidas, filtraram-se as amostras usando filtro com poro de 0,45 µm, cujo peso seco foi determinado previamente em balança analítica de precisão (Radwag AS60/C/2). Logo depois de secagem em estufa, realizada por 16 h a 60 °C, e resfriado ao ambiente em câmara de fluxo laminar, realizou-se novamente a medição do peso dos filtros usados.

A determinação da biomassa foi calculada com a Equação (1) descrita em Dário (2012),

$$C_{\text{celular}} = \text{Abs}_{\text{amostra}} \cdot D \cdot \text{FC} \quad \text{Eq. (1)}$$

onde,

C_{celular} é a concentração de biomassa celular na amostra em g/l;

$\text{Abs}_{\text{amostra}}$ é a absorvância da amostra a 600 nm;

D é o fator de diluição da amostra;

FC é o fator de conversão da Abs. para massa seca em g/l.

Determinou-se o fator de conversão 0,21 para medições de absorvância a 570 nm e de 0,23 para absorvância a 600 nm, onde os valores obtidos da triplicata variaram em torno de 1%.

4.7 DETERMINAÇÃO DAS GRANDEZAS DE TRANSFORMAÇÃO

O estudo cinético de um processo fermentativo consiste inicialmente na análise da evolução dos valores de concentração de um ou mais componentes do sistema de cultivo, em função do tempo da fermentação. Entende-se como componentes, o microrganismo (ou biomassa), os produtos de metabolismo (ou metabólitos) e os nutrientes ou substratos que compõem o meio de cultura. Esses valores de concentração foram determinados durante a fase exponencial das leveduras, conforme descrito por Schmidell e colaboradores (2001).

Durante essa fase exponencial de crescimento celular, a velocidade de crescimento é proporcional à concentração celular. A velocidade específica de crescimento celular, admitindo-se que nessa fase é constante, pode ser calculada a partir das equações (2) e (3) descritas em Stroppa e colaboradores (2009) como,

$$\frac{dX}{dt} = \mu \cdot X \rightarrow \text{Ln}X_f = \text{Ln}X_i + \mu \cdot t \quad \text{Eq. (2)}$$

$$\mu = \frac{\text{Ln}X_f - \text{Ln}X_i}{t} \quad \text{Eq. (3)}$$

onde,:

μ é a velocidade específica de crescimento (h^{-1});

$\text{Ln}X_f$ é o logaritmo neperiano da concentração celular final;

$\text{Ln}X_i$ é o logaritmo neperiano da concentração celular inicial;

t é o tempo em horas.

As fases de crescimento das linhagens foram identificadas a partir dos valores do logaritmo neperiano da concentração celular ($\text{Ln}X$) em função do tempo (t).

O fator de conversão de substrato a biomassa ($Y_{X/S}$), foi calculado por meio da Equação (4) descrita em Fontan e colaboradores (2012) como,

$$Y_{X/S} = \frac{X_f - X_i}{S_i - S_f} \quad \text{Eq. (4)}$$

onde:

X_f é a concentração g/l final de células;

X_i é a concentração g/l inicial de células;

S_i é a concentração g/l inicial de substrato;

S_f é a concentração g/l final de substrato.

O fator de conversão de substrato a produto $Y_{P/S}$ (xilitol, glicerol ou etanol) foi realizado através da razão da concentração máxima do produto alcançada em relação à concentração de substrato consumido no mesmo intervalo de tempo, segundo a Equação (5),

$$Y_{P/S} = \frac{P_{máx}}{S_i - S_f} \quad \text{Eq. (5)}$$

onde:

$P_{máx}$ é a concentração máxima em g/l do produto;

S_i é a concentração g/l inicial de substrato;

S_f é a concentração g/l final de substrato.

A produtividade em etanol P_{ETOH} e a produtividade em biomassa P_X foram calculadas de acordo com as equações (6) e (7) a seguir,

$$P_{ETOH} = \frac{C_{ETOH}}{t} \quad \text{Eq. (6)}$$

onde:

P_{ETOH} é a produtividade em etanol;

C_{ETOH} é a concentração máxima de etanol produzido;

t é o tempo em horas; e,

$$P_X = \frac{X_{máx} - X_i}{t} \quad \text{Eq. (7)}$$

onde:

$X_{máx}$ é a concentração máxima em g/l de biomassa produzida;

X_i é a concentração inicial de biomassa;

t é o tempo em horas.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ENGENHARIA EVOLUTIVA

Linhagens *hxt null* são usadas para a caracterização de transportadores de açúcar, sendo que a deleção de todos os genes que codificam transportadores de açúcar impede a captação de glicose e xilose permitindo a manipulação e avaliação dos transportadores reintroduzidos (YOUNG *et al.*, 2011; FARWICK *et al.*, 2014; YOUNG *et al.*, 2014).

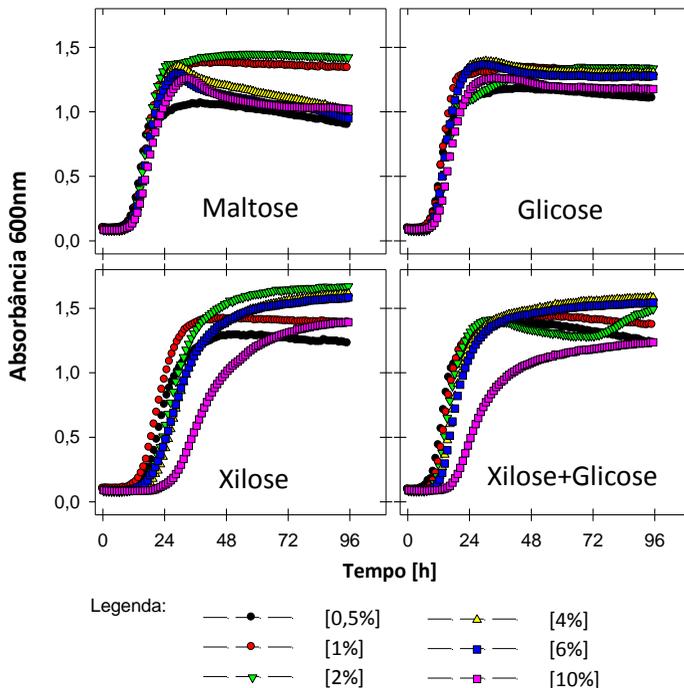
Em trabalho anterior de nosso grupo de pesquisa, com diferentes linhagens recombinantes que sobre-expressavam apenas um transportador *HXT*, a linhagem DLG-K1T2, que apresenta apenas o transportador *HXT2* sobre-expresso, mostrou um fenótipo interessante já que era capaz de consumir e fermentar a xilose com a mesma cinética do que a glicose, inclusive durante co-fermentações com ambos os açúcares xilose e glicose (GONÇALVES, 2014).

Para análise da velocidade de crescimento inicial, foram realizados cultivos em microplaca durante 96 horas em meio SC suplementado com 5, 10, 20, 40, 60 e 100 g/l de maltose, glicose, xilose, xilose mais glicose (xilose+glicose) para determinar o perfil de crescimento dessa linhagem de levedura nos diferentes açúcares, com medições tomadas a cada 15 minutos pela leitora de placas, como apresentado na Figura 12. Observou-se nesses microcultivos que em concentrações de 2%, 4% e 6% dos açúcares, a levedura DLG-K1T2 apresentou um maior crescimento (em todos os açúcares exceto maltose), apesar dos crescimentos em xilose serem mais lentos do que em maltose ou glicose, enquanto que em presença de 10% de xilose (e xilose+glicose) claramente afetava o crescimento das células. Reifenger, Freidel & Ciriacy (1995) mostraram que a expressão dos genes *HXT2*, *HXT6* e *HXT7* em uma linhagem *hxt-null* é suficiente para o crescimento na presença de 0,1% de glicose, enquanto para a linhagem com apenas *HXT1*, *HXT3* e *HXT4* requer concentrações mais elevadas de glicose (>1%).

Por outro lado, crescimentos preliminares da linhagem DLG-K1T2 em frascos agitados com 2% de xilose (dados não mostrados) revelaram ser pouco representativos e muito lentos no açúcar de interesse, o que motivou, antes de iniciar o experimento de evolução, realizar uma verificação da presença do gene que codifica o

transportador *HXT2* nessa linhagem. Para essa verificação, o plasmídeo pPGK-*HXT2* (vide Tabela 2, pág. 46) foi extraído da linhagem DLG-K1T2 e a estrutura do mesmo analisado com as enzimas de restrição *Bam*HI e *Hind*III. A enzima *Bam*HI, empregada por Gonçalves (2014) para inserir o gene *HXT2* no plasmídeo pPGK, foi usada como controle e não corta o gene *HXT2* (com 1626 pb), enquanto a enzima *Hind*III, usada para cortar o gene, corta também o plasmídeo próximo ao sítio de clonagem *Bam*HI (vide Figura 7, pág. 46).

Figura 12 – Crescimento em microplaca da linhagem DLG-K1T2 em meio SC sem uracila contendo os açúcares maltose, glicose, xilose e xilose+glicose em concentrações de 5, 10, 20, 40, 60 e 100 g/l.

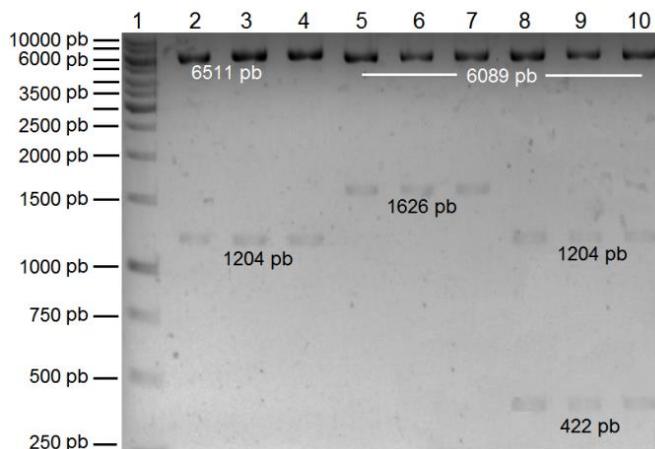


Fonte: Autor.

Na Figura 13 pode-se observar que na digestão do plasmídeo com a enzima *Hind*III se obtêm um fragmento de alto peso molecular, com tamanho estimado de 6511 pb (6089 pb de pPGK + 422 pb do *HXT2*) e um fragmento de 1204 pb que corresponde ao restante da sequência do

HXT2. Usando *Bam*HI se obteve, além do plasmídeo (6089 pb), um fragmento de 1626 pb correspondendo à sequência completa do gene *HXT2* inserido no plasmídeo. Finalmente, ao usarmos *Bam*HI e *Hind*III foram obtidos 3 fragmentos: o plasmídeo, o fragmento de 1204 pb contendo parte do *HXT2*, e um fragmento de 422 pb contendo o restante do gene *HXT2*.

Figura 13 – Digestão do plasmídeo pPGK contendo o gene *HXT2* com *Hind*III e *Bam*HI. No gel de agarose apresentado mostra-se o resultado da digestão realizada com as enzimas *Hind*III e *Bam*HI. Na coluna (1) Marcador de tamanho Molecular 1 kb, (2-4) digestão de pPGK-HXT2 com *Hind*III, (5-7) digestão de pPGK-HXT2 com *Bam*HI, (8-10) digestão pPGK-HXT2 com *Hind*III+*Bam*HI.

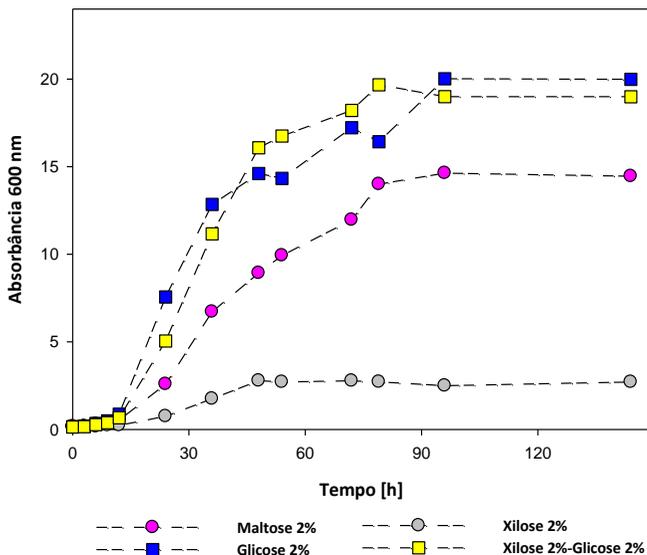


Fonte: Autor.

Após ter confirmada a presença do gene do transportador *HXT2* no plasmídeo da linhagem DLG-K1T2, foram realizados crescimentos desta linhagem em meio mínimo SC sem uracila contendo 20 g/l dos açúcares maltose, glicose, xilose, e xilose+glicose. Maltose e glicose foram usados como controle para comparar o comportamento da levedura quando crescida em xilose ou em xilose+glicose.

A Figura 14 compara as curvas de crescimento da linhagem DLG-K1T2 em meio sintético SC contendo as diferentes fontes de carbono, mantendo a cinética observada nos experimentos preliminares à confirmação da presença de *HXT2*. O lento e baixo crescimento em xilose é evidente.

Figura 14 – Crescimento da linhagem DLG-K1T2 em frasco agitado. Mostra-se o crescimento da linhagem em meio contendo os açúcares maltose, glicose, xilose e xilose+glicose em concentração de 20 g/l.

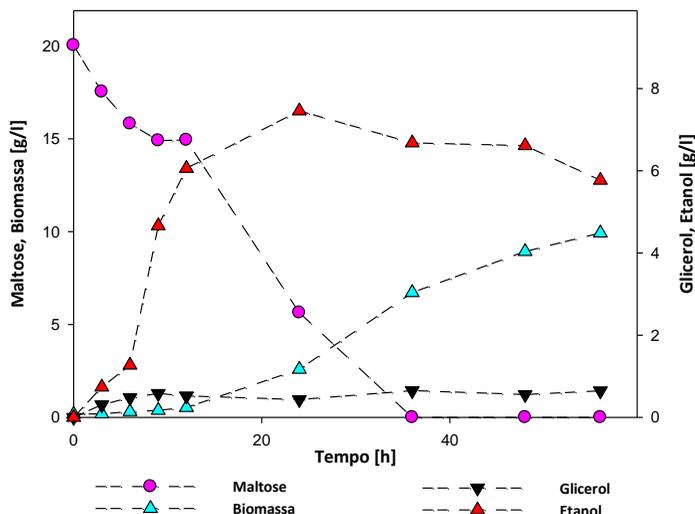


Fonte: Autor.

Na presença de 20 g/l maltose (Figura 15), a levedura DLG-K1T2 consome a maltose em 36 h, produzindo ~7 g/l de etanol e uma pequena quantidade de glicerol. Na presença de 20 g/l glicose (Figura 16) essa linhagem também consome o açúcar em 36 h, porém, a produção de biomassa é maior e a produção de etanol (~3 g/l) menor do que com maltose (vide também a Tabela 5, pág. 70).

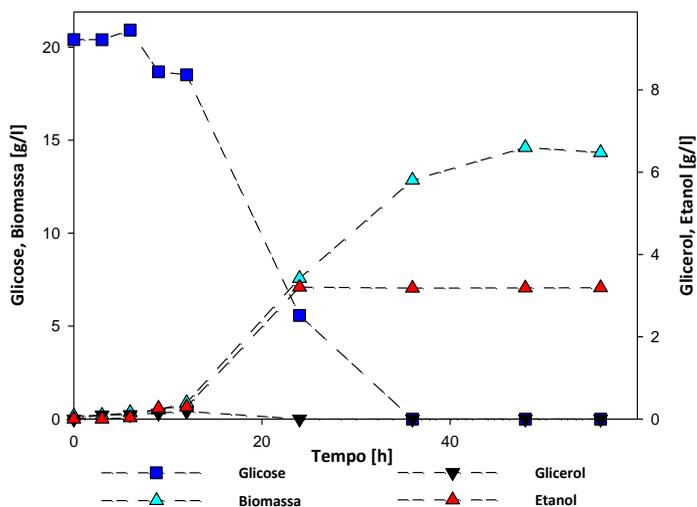
Um comportamento totalmente diferente foi observado na presença de 20 g/l de xilose já que as células consumiram apenas ~3 g/l do açúcar, mesmo após 144 h de incubação, e conseqüentemente cresceram muito pouco nessa fonte de carbono, produzindo quantidades pequenas de etanol, xilitol e glicerol (Figura 17 e Tabela 5). Incubações por períodos de tempo até 432 h (dados não mostrados) não revelaram crescimentos ou consumo de açúcar, significativamente maiores, do que até as 144 h apresentadas na Figura 17.

Figura 15 – Crescimento da linhagem DLG-K1T2 em meio SC contendo 20 g/l de maltose. Apresenta-se o consumo do açúcar maltose e a produção de biomassa, glicerol e etanol até 60 horas.



Fonte: Autor.

Figura 16 – Crescimento da linhagem DLG-K1T2 em meio SC contendo 20 g/l de glicose. Apresenta-se o consumo do açúcar glicose, e a produção de biomassa, glicerol e etanol até 60 horas.

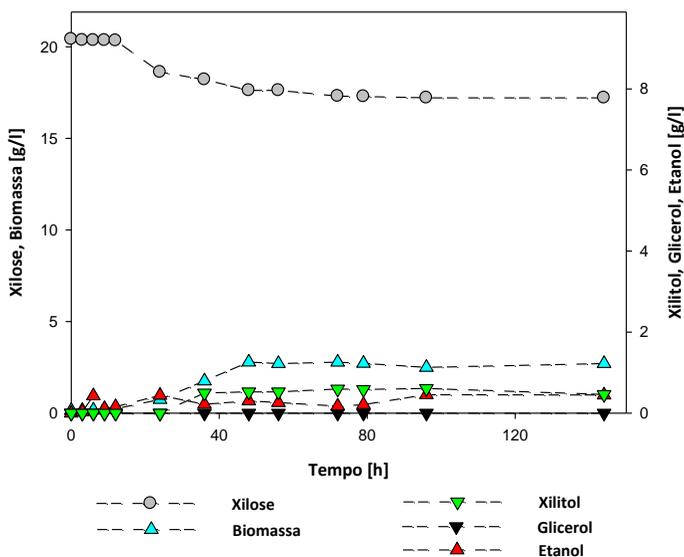


Fonte: Autor.

Tabela 5 – Grandezas de transformação da linhagem DLG-K1T2. Mostram-se os fatores de conversão de substrato em biomassa ($Y_{X/S}$), de substrato a produto ($Y_{Xil/S}$, $Y_{Glice/S}$, $Y_{ETOH/S}$), a produtividade em biomassa (P_X) e a produtividade em etanol (P_{ETOH}) dos cultivos da linhagem em meio SC contendo 20 g/l dos açúcares maltose, glicose, xilose e xilose+glicose.

Meio de cultura	$Y_{X/S}$ [$\frac{gX}{gS}$]	$Y_{Xil/S}$ [$\frac{gXil}{gS}$]	$Y_{Glice/S}$ [$\frac{gGlice}{gS}$]	$Y_{ETOH/S}$ [$\frac{gETOH}{gS}$]	P_X [$\frac{g}{l.h}$]	P_{ETOH} [$\frac{g}{l.h}$]
2%-Maltose	0,166	-	0,032	0,518	0,035	0,311
2%-Glicose	0,224	-	0,051	0,216	0,048	0,133
2%-Xilose	0,217	0,189	0	0,139	0,013	0,003
2%-Xilose+glicose	0,140	0,065	0	0,146	0,057	0,075

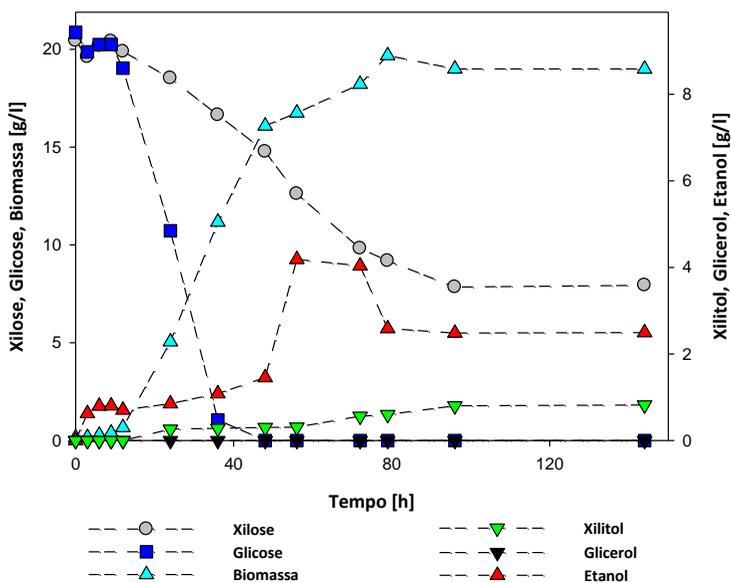
Figura 17 – Crescimento da linhagem DLG-K1T2 em meio SC contendo 20 g/l de xilose. Apresenta-se o consumo do açúcar xilose, e a produção de biomassa, xilitol e etanol até 144 horas.



Fonte: Autor.

Durante o crescimento em 20 g/l de xilose mais 20 g/l de glicose (Figura 18) é possível observar uma clara preferência das células de levedura pela hexose (a glicose é consumida em ~40 h), mas a xilose também passa a ser consumida, e em 96 h aproximadamente ~12 g/l da pentose são captadas pelas células, quando o consumo do açúcar termina (Figura 18). Embora a produtividade de etanol seja maior durante o consumo inicial da xilose, a produção final de etanol praticamente não difere daquela observada quando as células cresceram apenas em glicose (Figura 16, Tabela 5 e Figura 18), sendo um pouco maior com os dois açúcares juntos.

Figura 18 – Crescimento da linhagem DLG-K1T2 em meio SC contendo 20 g/l de xilose e 20 g/l de glicose. Apresenta-se o consumo dos açúcares glicose e xilose, e a produção de biomassa, xilitol, glicerol e etanol até 144 horas.



Fonte: Autor.

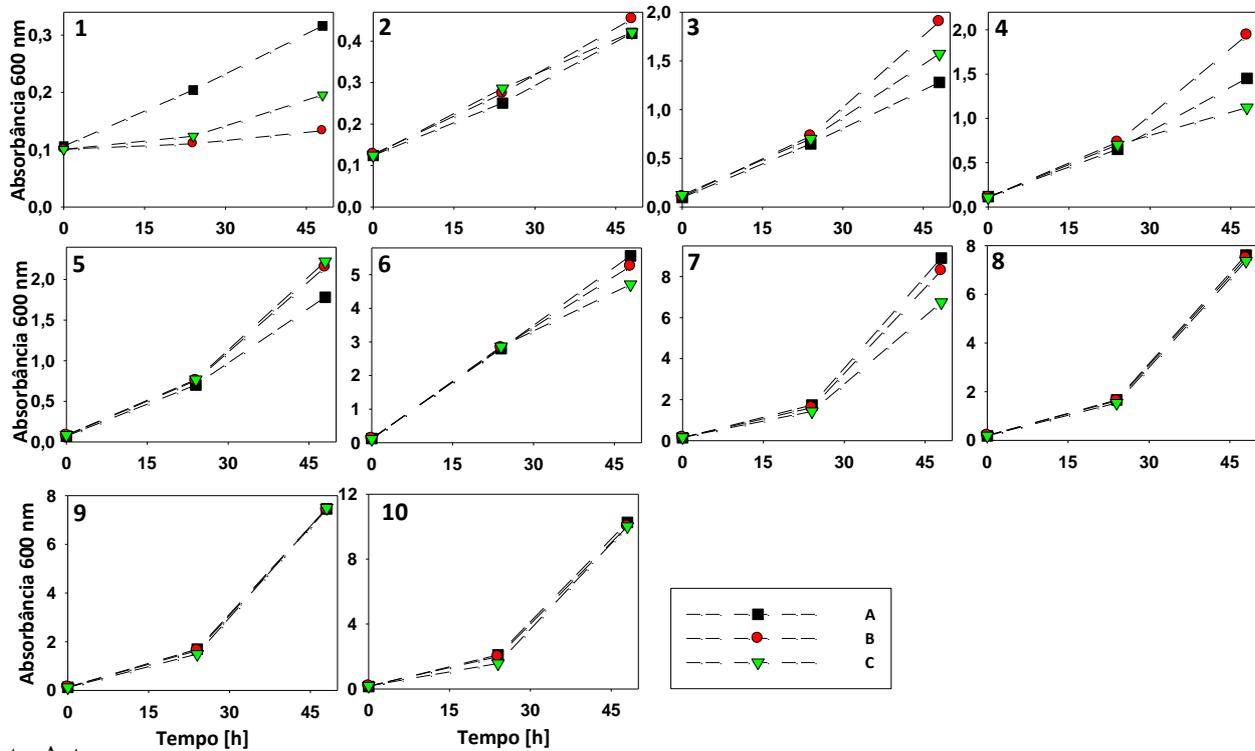
A repressão por glicose é um fenômeno difundido em microrganismos, onde na presença desse açúcar, reprime a expressão de um grande número de genes necessários para o metabolismo de outras fontes de carbono (TRUMBLY, 1992). Esse problema se apresenta na

fermentação de hidrolisados lignocelulósicos usados na produção de etanol de segunda geração, onde o consumo de pentoses como arabinose e xilose presentes é inibido pela alta concentração de glicose, afetando a produção de etanol. Para melhorar o rendimento na produção do etanol celulósico visando sua industrialização em escala comercial, todos os açúcares presentes na celulose e hemicelulose devem ser convertidos a etanol (HAHN-HÄGERDAL *et al.*, 2007).

Experimentos de evolução realizados em linhagens recombinantes de *S. cerevisiae* têm demonstrado que é possível melhorar o crescimento e fermentação de açúcares como a xilose (SONDEREGGER & SAUER, 2003; JEFFRIES, 2006; NEVOIGT, 2008; Van VLEET & JEFFRIES, 2009; SHEN *et al.*, 2012; SMITH, van RENSBURG & GÖRGENS, 2014). Por exemplo, Shen e colaboradores (2012) construíram uma linhagem recombinante BSPC095 contendo o gene das enzimas xilulose cinase, xilose isomerase, e quatro genes da via não oxidativa das pentoses fosfato sobre-expressos, além do gene *COX4* deletado. Com essa levedura realizaram uma evolução adaptativa e após 1000 h de crescimento sequencial, as células foram melhorando o crescimento na presença de xilose, originando a levedura recombinante BSPX013, que apresentou maior atividade da enzima xilose isomerase e melhor fermentação do açúcar em relação à linhagem parental. Altos rendimentos de etanol foram também obtidos quando linhagens de *S. cerevisiae* transformadas com a xilose isomerase foram expostas à engenharia evolutiva (MARGEOT *et al.*, 2009).

Considerando o baixo e lento consumo de xilose pela linhagem DLG-K1T2, em seguida realizou-se um experimento de engenharia evolutiva dessa linhagem, conforme mostrado na Figura 8 na página 52. Conforme mostrado na Figura 19, nos primeiros cultivos sempre foi possível observar um deles com maior crescimento celular, utilizado para inocular nos próximos 3 frascos com meio SC contendo 20 g/l xilose, e assim sucessivamente. Dessa forma, células capazes de crescer melhor nessa fonte de carbono passaram a ser selecionadas, sendo que no sétimo repique as células de levedura já cresciam tão bem em xilose quanto em maltose como única fonte de carbono. Como nos 3 ciclos de seleção/crescimento seguintes (8 a 10) o crescimento foi rápido e praticamente igual nos 3 frascos, o experimento de engenharia evolutiva foi concluído e duas linhagens, 9C-MA e 10A-MA, foram isoladas para avaliar seu novo fenótipo.

Figura 19 – Engenharia evolutiva da linhagem DLG-K1T2. Apresentam-se os crescimentos celulares em meio SC suplementado com 20 g/l de xilose, realizados em triplicata (A, B e C) ao longo de 10 cultivos sucessivos, sempre a partir do frasco com o maior crescimento celular.

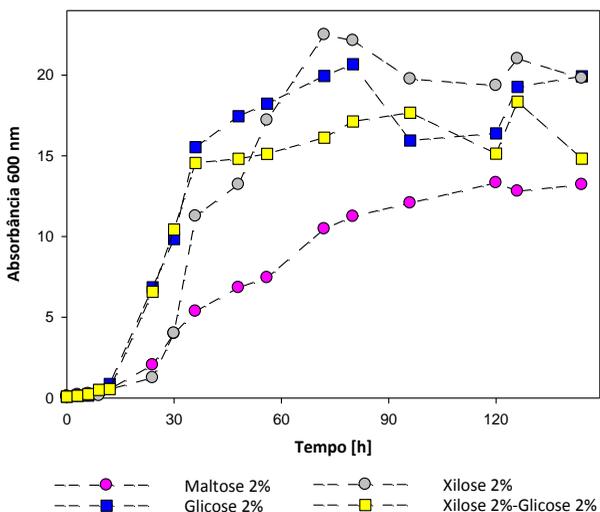


Fonte: Autor.

As Figuras 20 e 21 mostram o perfil de crescimento nos vários açúcares das linhagens obtidas no experimento de engenharia evolutiva em xilose. Tanto a linhagem 9C-MA (Figura 20) quanto a linhagem 10A-MA (Figura 21) apresentaram maior capacidade de crescer em xilose, sendo que o crescimento em 2% xilose foi tão rápido quanto em 2% glicose, ou xilose+glicose. Para melhor avaliar as linhagens selecionadas, o crescimento e consumo de 2% maltose, glicose, xilose e xilose+glicose foi realizado como descrito anteriormente para a linhagem parental DLG-K1T2 (vide Figuras 15-18 págs. 69-71).

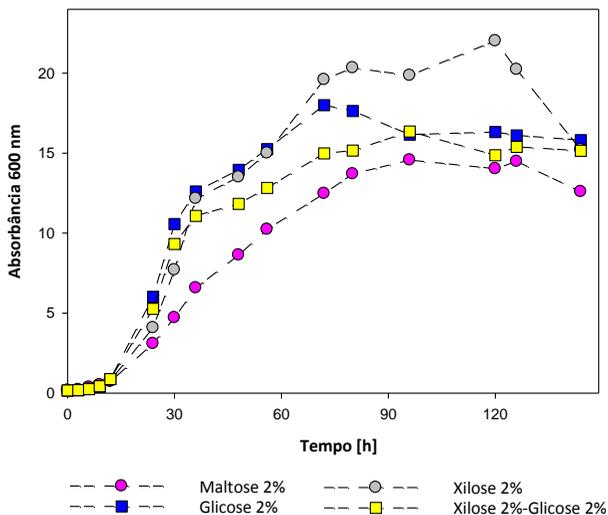
Tanto a linhagem 9C-MA quanto a linhagem 10A-MA cresceram e consumiram 20 g/l de maltose (Figuras 22 e 23, respectivamente) e de glicose (Figuras 24 e 25, respectivamente, págs. 76 e 77) com parâmetros semelhantes aos da linhagem parental, relacionados nas Tabelas 6 e 7, págs. 77 e 78. No entanto, essas linhagens passaram a apresentar um fenótipo totalmente distinto quando crescidas em meio sintético SC contendo xilose como única fonte de carbono (Figuras 26 e 27, respectivamente na pág. 79).

Figura 20 – Crescimento da linhagem 9C-MA em meio SC contendo 20 g/l dos açúcares maltose, glicose, xilose e xilose+glicose.



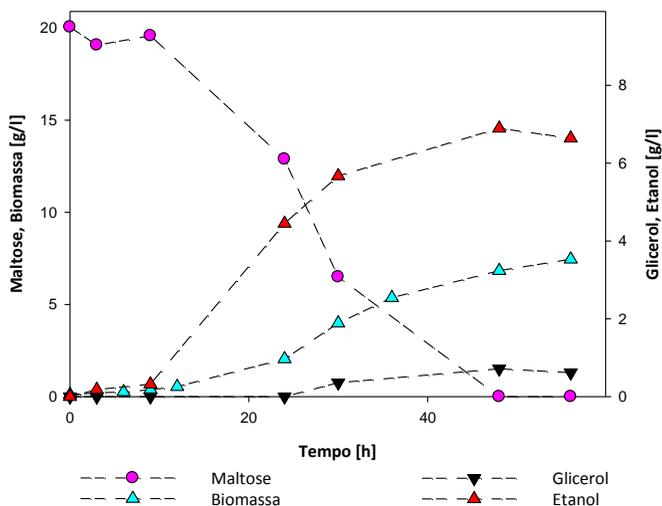
Fonte: Autor.

Figura 21 – Crescimento da linhagem 10A-MA em meio SC contendo 20 g/l dos açúcares maltose, glicose, xilose e xilose+glicose.



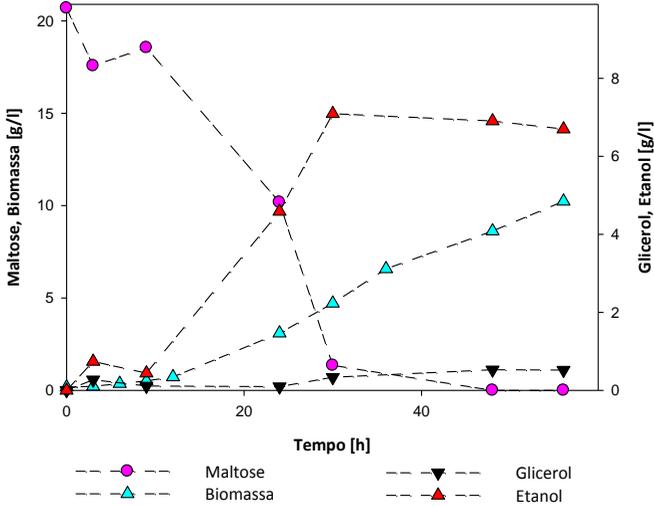
Fonte: Autor.

Figura 22 – Crescimento da linhagem 9C-MA em SC contendo 20 g/l de maltose. Apresenta-se o consumo do açúcar maltose, a produção de biomassa, glicerol e etanol até 144 h.



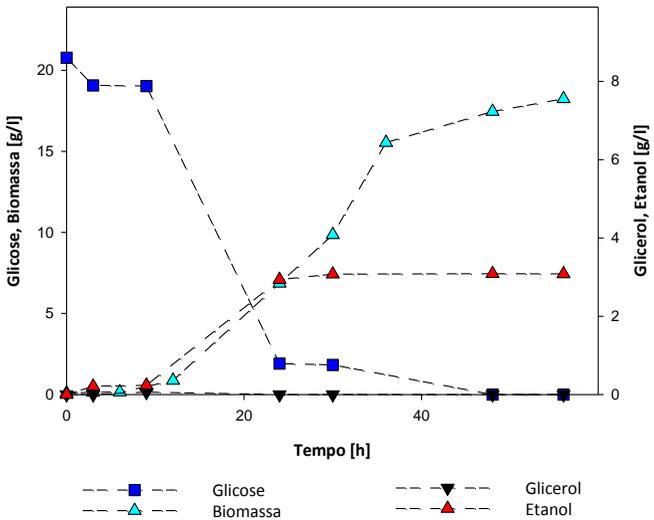
Fonte: Autor.

Figura 23 – Crescimento da linhagem 10A-MA em meio SC contendo 20 g/l de maltose. Apresenta-se o consumo do açúcar maltose, a produção de biomassa, glicerol e etanol até 144 h.



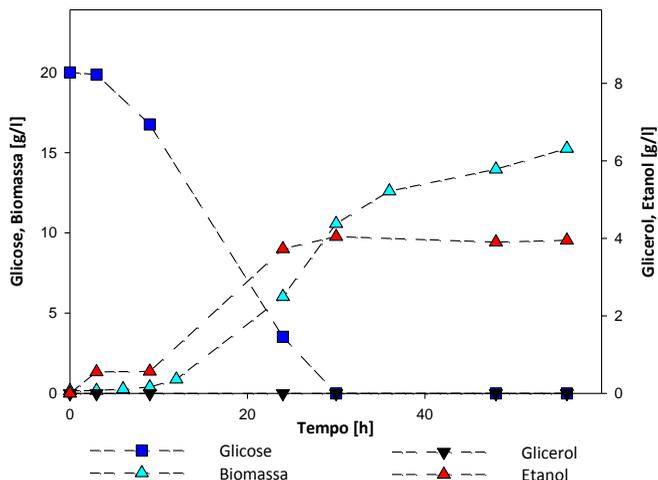
Fonte: Autor.

Figura 24 – Crescimento da linhagem 9C-MA em meio SC suplementado com 20 g/l glicose, consumo do açúcar e produção de biomassa, glicerol e etanol.



Fonte: Autor.

Figura 25 – Crescimento da linhagem 10A-MA em meio SC contendo 20 g/l de glicose. Apresenta-se o consumo do açúcar glicose e a produção de biomassa, glicerol e etanol.



Fonte: Autor.

Tabela 6 – Grandezas de transformação da linhagem 9C-MA. Mostram-se os fatores de conversão de substrato em biomassa ($Y_{X/S}$), de substrato a produto ($Y_{Xil/S}$, $Y_{Glucose/S}$, $Y_{ETOH/S}$), a produtividade em biomassa (P_X) e a produtividade em etanol (P_{ETOH}) nos crescimentos da linhagem em meio SC contendo 20 g/l dos açúcares maltose, glicose, xilose e xilose+glicose.

Meio de cultura	$Y_{X/S}$	$Y_{Xil/S}$	$Y_{Glucose/S}$	$Y_{ETOH/S}$	P_X	P_{ETOH}
	$\left[\frac{gX}{gS}\right]$	$\left[\frac{gXil}{gS}\right]$	$\left[\frac{gGlucose}{gS}\right]$	$\left[\frac{gETOH}{gS}\right]$	$\left[\frac{g}{l.h}\right]$	$\left[\frac{g}{l.h}\right]$
2%-Maltose	0,152	-	0,035	0,344	0,025	0,144
2%-Glicose	0,228	-	0,035	0,148	0,059	0,064
2%-Xilose	0,314	0	0	0,222	0,072	0,031
2%-Xilose+glicose	0,125	0,116	0,004	0,198	0,033	0,051

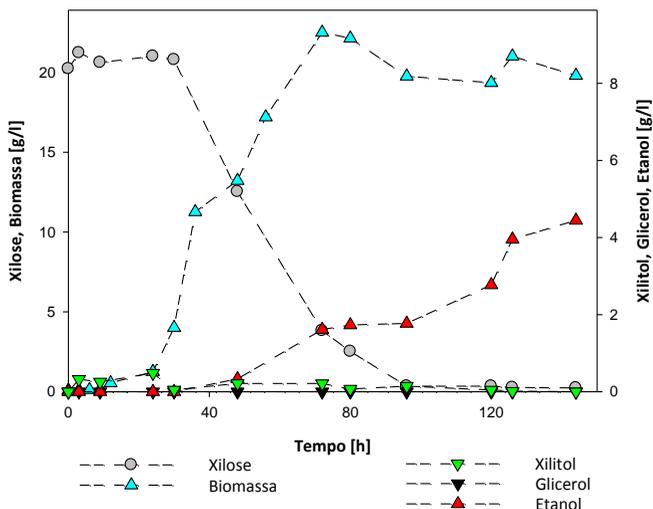
Tabela 7 – Grandezas de transformação da linhagem 10A-MA. Mostra-se os fatores de conversão de substrato em biomassa (Y_{XS}), de substrato a produto (Y_{XilS} , $Y_{GlucoseS}$, Y_{ETOHs}), a produtividade em biomassa (P_X) e a produtividade em etanol (P_{ETOH}) apresentado pelos crescimentos da linhagem em meio SC contendo 20 g/l dos açúcares maltose, glicose, xilose e xilose+glicose.

Meio de cultura	$Y_{\frac{X}{S}}$	$Y_{\frac{Xil}{S}}$	$Y_{\frac{Glucose}{S}}$	$Y_{\frac{ETOH}{S}}$	P_X	P_{ETOH}
	$[\frac{gX}{gS}]$	$[\frac{gXil}{gS}]$	$[\frac{gGlucose}{gS}]$	$[\frac{gETOH}{gS}]$	$[\frac{g}{l.h}]$	$[\frac{g}{l.h}]$
2%-Maltose	0,159	-	0,025	0,367	0,026	0,367
2%-Glicose	0,205	-	0	0,202	0,057	0,135
2%-Xilose	0,254	0	0	0,234	0,042	0,033
2%-Xilose+glicose	0,125	0,289	0,005	0,251	0,039	0,097

Os crescimentos dos cultivos com as linhagens selecionadas durante o experimento de evolução verificaram o fenótipo conferido para metabolização da xilose.

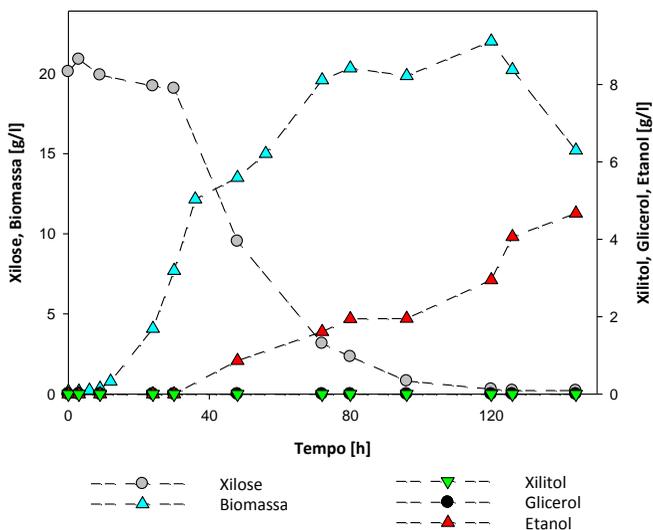
Como pode ser observado na Figura 26, embora as células da linhagem 9C-MA apresentem uma extensa fase *lag*, de aproximadamente 36 horas sem ocorrer consumo significativo da xilose, a seguir o açúcar passa a ser totalmente consumido e as células de levedura passam a produzir ~4,5 g/l de etanol a partir da pentose. Comportamento semelhante foi observado com a linhagem 10A-MA crescendo em 20 g/l xilose como apresentado na Figura 27 (vide Tabelas 6 e 7).

Figura 26 – Crescimento da linhagem 9C-MA em meio SC suplementado com 20 g/l de xilose. Apresenta-se o consumo do açúcar xilose e a produção de biomassa, xilitol e etanol.



Fonte: Autor.

Figura 27 – Crescimento da linhagem 10A-MA em meio SC contendo 20 g/l de xilose. Apresenta-se o consumo do açúcar xilose e as produções de biomassa, xilitol e etanol.

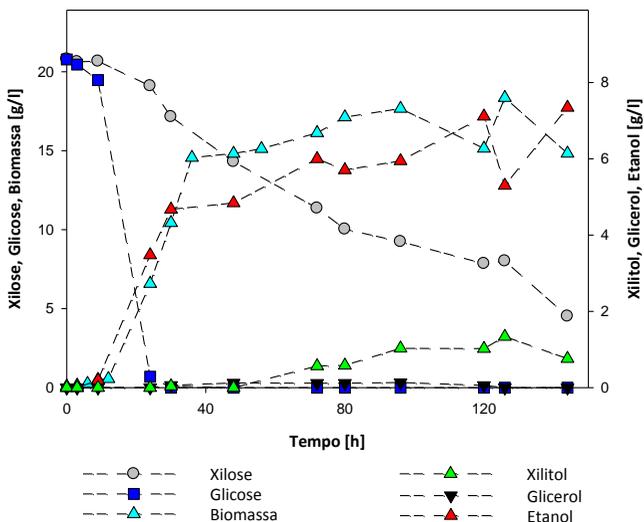


Fonte: Autor.

No meio sintético SC contendo 20 g/l de xilose mais 20 g/l de glicose é possível verificar um maior consumo da xilose pelas células da linhagem 9C-MA (Figura 28), produzindo conseqüentemente mais etanol do que a linhagem parental DLG-K1T2 (vide Figura 18, pág. 71). No caso da linhagem 10A-MA não é possível observar uma melhora no consumo da xilose na presença de glicose (Figura 29) quando comparada com a linhagem parental, embora, novamente essa linhagem produziu mais etanol a partir dos dois açúcares do que a linhagem DLG-K1T2.

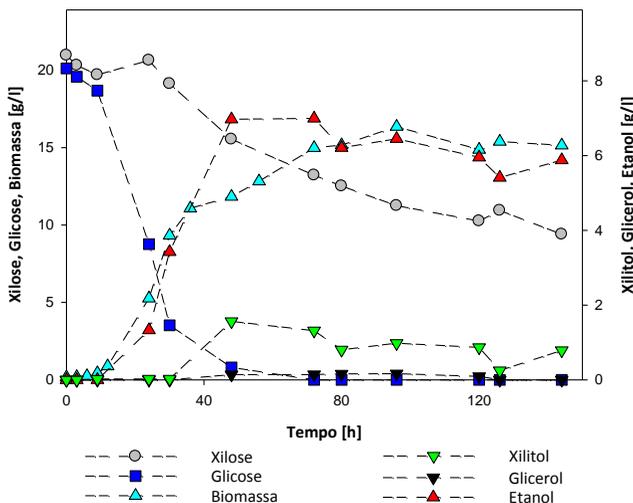
Tendo confirmado que as linhagens selecionadas 9C-MA e 10A-MA passaram a consumir melhor a xilose e produzir mais etanol a partir dessa fonte de carbono, verificou-se se a mudança no fenótipo das células seria conseqüência de alguma mutação no plasmídeo pPGK-HXT2 (contendo a permease *HXT2*) presente nas linhagens. Com esse intuito o plasmídeo pPGK-HXT2, presente nas linhagens 9C-MA e 10A-MA, foi extraído das células de levedura, e, obtiveram-se 10 colônias de bactéria transformadas com o plasmídeo pPGK-HXT2 a partir de cada linhagem. A seguir três plasmídeos independentes extraídos da linhagem 10A-MA foram re-introduzidos na linhagem *hxt-null* DLG-K1, reconstituindo assim a linhagem parental DLG-K1T2.

Figura 28 – Crescimento da linhagem 9C-MA em xilose+glicose em concentrações de 20 g/l para cada açúcar. Apresentam-se os consumos de xilose e glicose e as produções de biomassa, xilitol, glicerol e etanol de essa linhagem.



Fonte: Autor.

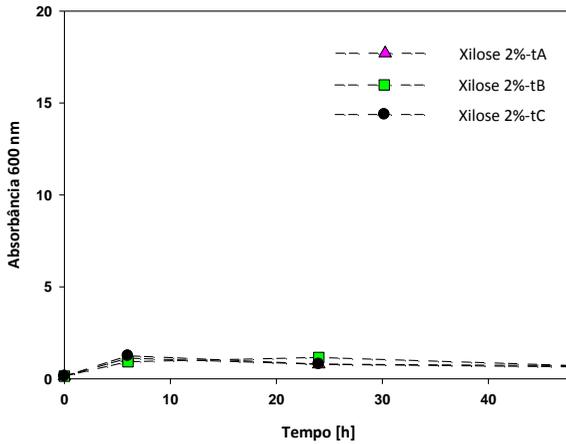
Figura 29 – Crescimento da linhagem 10A-MA em meio SC contendo 20 g/l de xilose e 20 g/l de glicose. Apresentam-se os consumos de xilose e glicose e as produções de biomassa, xilitol, glicerol e etanol de essa linhagem.



Fonte: Autor.

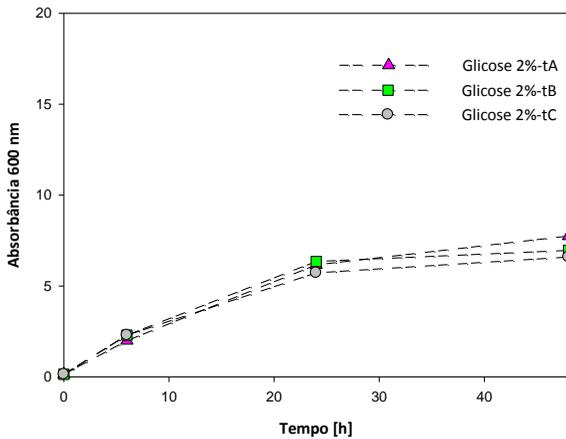
O crescimento dos 3 novos transformantes em meio líquido SC suplementado com 20 g/l de xilose ou de glicose está mostrado nas Figuras 30 e 31, respectivamente. Como é possível observar nessas figuras, as linhagens re-transformadas, com o plasmídeo extraído da linhagem 10A-MA, continuaram crescendo pouco em xilose, mas crescem em glicose, mostrando o mesmo fenótipo da linhagem parental DLG-K1T2. Esse resultado sugere que a possível alteração que deu origem às linhagens selecionadas no experimento de engenharia evolutiva não se encontrava no plasmídeo pPGK-HXT2 presente na linhagem 10A-MA.

Figura 30 – Crescimento da linhagem DLG-K1 transformada com 3 plasmídeos pPGK-HXT2 independentes (tA, tB, e tC) extraídos da linhagem 10A-MA, em meio SC contendo 20 g/l de xilose.



Fonte: Autor.

Figura 31 – Crescimento da linhagem DLG-K1 transformada com 3 plasmídeos pPGK-HXT2 independentes (tA, tB, e tC) extraídos da linhagem 10A-MA, em meio SC contendo 20 g/l de glicose.



Fonte: Autor.

Esse resultado foi inesperado, uma vez que geralmente experimentos de engenharia evolutiva levam à seleção de linhagens com mutações/alterações no passo limitante na metabolização do nutriente objeto da seleção, como o caso de quimiosstatos limitados em glicose que leva a rearranjos e amplificação dos genes *HXT* (DUNHAM *et al.*, 2002). O experimento de engenharia evolutiva com a linhagem DLG-K1T2 foi desenhado para selecionar alterações no gene *HXT2* presente no plasmídeo pPGK-HXT2, mas os resultados obtidos indicavam que provavelmente a alteração selecionada nas linhagens 9C-MA e 10A-MA ocorreu no genoma da levedura. Dessa forma, em colaboração com o Prof. Dr. Gavin Sherlock do Departamento de Genética da *Stanford University* (USA), os genomas, da linhagem parental e das duas obtidas, foram sequenciados com tecnologia de nova geração conforme descrito por Schwartz e colaboradores (2012). Em resumo, o DNA de cada linhagem foi extraído com fenol-clorofórmio, quebrado por sonicação (sonicador COVARIS) a fragmentos de ~500 pb, e ligado a sequências adaptadoras para sequenciamento através da plataforma *Illunima HiSeq 2000*. Na Tabela 8 encontram-se relacionados os resultados do sequenciamento para as três linhagens.

Tabela 8 – Resultado do sequenciamento das linhagens.

Linhagem	Sequências	Total sequência (pb)	Cobertura ^(a)
DLG-K1T2	1.582.941	474.882.300	38 x
9C-MA	1.422.142	426.642.600	34 x
10A-MA	1.182.683	354.804.900	28 x

Nota: a) baseado no genoma de ~12,5 milhões de pb da linhagem S288C.

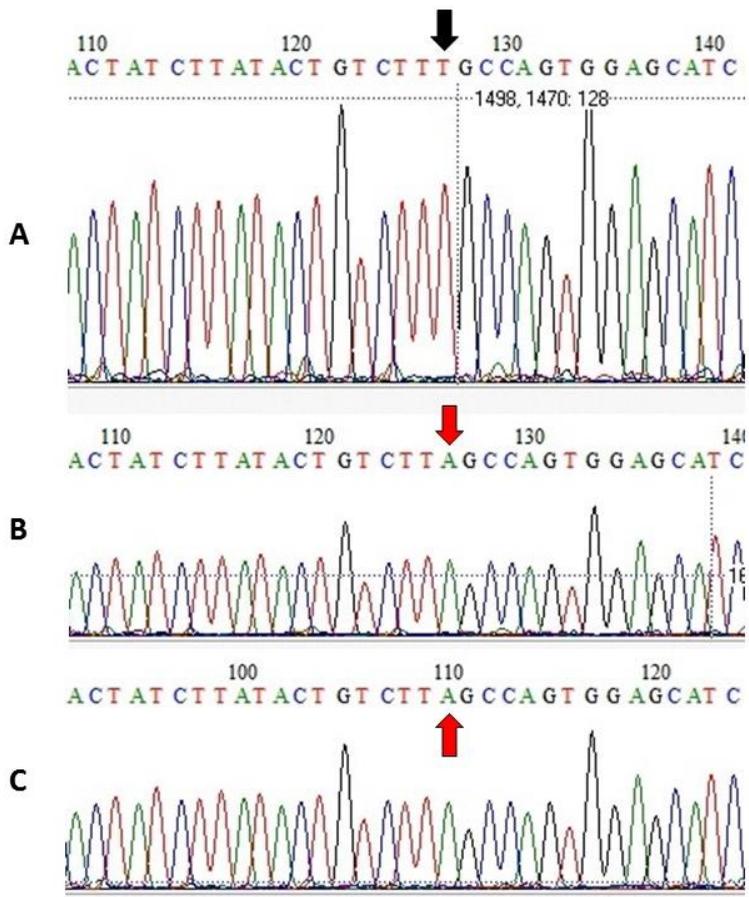
Após ter obtido uma boa cobertura do genoma das linhagens (28-38 vezes o genoma de uma linhagem haploide), as sequências foram analisadas com duas abordagens diferentes. Inicialmente as sequências foram alinhadas tendo como referência o genoma da linhagem S288C (SGD disponível em www.yeastgenome.org), e após identificar as mutações/alterações no genoma da linhagem parental DLG-K1T2 (com mais de 85% das sequências mostrando a alteração), as mesmas foram subtraídas do genoma das linhagens selecionadas 9C-MA e 10A-MA visando identificar mutações/alterações exclusivamente presentes no genoma das linhagens selecionadas. Em uma outra abordagem o genoma da linhagem DLG-K1T2 foi montado independentemente *de*

novo, dando lugar a um genoma com 235 *contigs* onde as sequências das linhagens selecionadas foram mapeadas, e as mutações/alterações identificadas. Ambas as abordagens identificaram uma única alteração no genoma das linhagens 9C-MA e 10A-MA envolvendo uma mutação no gene *STB5* que codifica o fator de transcrição.

A Figura 32 mostra a confirmação da mutação presente no genoma das linhagens 9C-MA e 10A-MA utilizando outro método de sequenciamento (*Sanger*), onde uma timina presente no gene *STB5* da linhagem parental DLG-K1T2 foi mutada para uma adenina nas linhagens selecionadas. A proteína de 743 aminoácidos codificada pelo gene *STB5* é um fator de transcrição contendo dedos de zinco envolvido na regulação da resistência a múltiplas drogas e resposta ao estresse oxidativo, formando um heterodímero com outro fator de transcrição codificado pelo gene *PDR1* (AKACHE *et al.*, 2004). Esse fator de transcrição regula a expressão da maioria dos genes da via das pentoses fosfato, incluindo os genes envolvidos na produção de NADPH, um metabólito necessário para resistência ao estresse oxidativo (LAROCHELLE *et al.*, 2006), mas também para a metabolização da xilose através da via da xilose redutase e xilitol desidrogenase. De fato, recentemente foi descrito que a melhora na fermentação de xilose observada em linhagens de *S. cerevisiae* deletadas na fosfatase codificada pelo gene *PHO13* (NI, LAPLAZA & JEFFRIES 2007; Van VLEET, JEFFRIES & OLSSON, 2008; LEE, JELLISON & ALPER, 2014) ocorre via o fator de transcrição *STB5* (KIM *et al.*, 2015).

Essa mutação, presente em ambas as leveduras evoluídas e/ou selecionadas, troca uma cisteína (C-654) por uma serina nessa posição. Embora ainda seja necessário confirmar que de fato a mutação observada seja a responsável pela mudança no fenótipo das leveduras, permitindo uma fermentação da xilose mais eficiente, a mudança ocorrida no gene *STB5* pode alterar a estrutura terciária da proteína (pela perda de uma cisteína possivelmente envolvida em pontes dissulfeto), ou ainda promover uma maior fosforilação desse fator de transcrição pelo ganho de uma serina extra. Novos estudos deverão confirmar o envolvimento do fator de transcrição *STB5* mutante na melhora da fermentação de xilose por *S. cerevisiae* recombinantes, e caracterizar o tipo de alteração estrutural e/ou funcional provocado pela mutação.

Figura 32 – Confirmação da mutação presente nas linhagens 9C-MA e 10A-MA. O cromatograma do sequenciamento pelo método de *Sanger* mostra a timina presente no genoma da linhagem parental DLG-K1T2 (A, seta preta) sendo substituída por uma adenina (setas vermelhas) no genoma da linhagem 9C-MA (B) e 10A-MA (C).



Fonte: Autor.

5.2 ENGENHARIA GENÔMICA PARA DELEÇÃO DO GENE *FPS1*

A engenharia genômica (modificação de genes diretamente nos cromossomas da célula) pode melhorar as atividades fermentativas de leveduras fermentadoras de xilose como *Scheffersomyces stipitis* (anteriormente denominada *Pichia stipitis*) e *S. cerevisiae* recombinantes (JEFFRIES, 2006; HARNER *et al.*, 2015). As altas taxas de recombinação homóloga em *S. cerevisiae* e outras leveduras permitem a modificação dirigida de genes de leveduras em regiões cromossômicas específicas (PETRACEK & LONGTINE 2002).

O emprego da engenharia genômica e metabólica para que *S. cerevisiae* consiga metabolizar pentoses como a xilose é uma estratégia atrativa que já vem mostrando resultados promissórios. Um estudo realizado por Wei e colaboradores (2013), demonstrou uma nova estratégia para reduzir a formação de xilitol e aumentar o fluxo de carbono para melhorar a fermentação da xilose e controlar o processo de secreção de xilitol. Nesse estudo foi deletado o gene *FPS1* de linhagens de laboratório de *S. cerevisiae*, as quais apresentaram uma diminuição na produção de xilitol e um aumento na produção de etanol. As linhagens de *S. cerevisiae* com o gene *FPS1* deletado, usadas por eles, mostraram uma baixa excreção de xilitol em relação à linhagem parental, sugerindo que a aquaporina codificada pelo gene *FPS1* estaria envolvida na passagem desse álcool através da membrana celular. Baseados nesses resultados, no presente trabalho se fez a tentativa da deleção do gene *FPS1* em uma linhagem industrial de *S. cerevisiae* recombinante capaz de metabolizar a xilose.

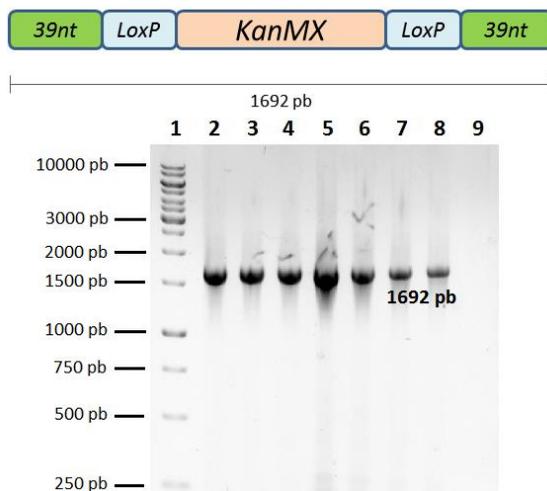
Para realizar o processo de deleção do gene *FPS1*, foi utilizada a linhagem industrial (diploide) recombinante MP-C5 (GONÇALVES, 2014), a qual possui integrado em seu genoma o plasmídeo pAUR-XXDXHR (MATSUSHIKA *et al.*, 2008), contendo os genes *XYL1*, *XYL2* e *XKS1* sobre-expressos. Os genes *XYL1* e *XYL2* presentes nesse plasmídeo pertencem à linhagem de levedura *S. stipitis* e permitem a expressão das enzimas XR e XDH respectivamente. O gene *XKS1* pertence a *S. cerevisiae* e permite a sobre-expressão da enzima XK, enzimas que são necessárias para a metabolização da xilose em leveduras. A linhagem MP-C5 é derivada da linhagem industrial CAT-1, utilizada para a produção industrial de etanol combustível no Brasil (BASSO *et al.*, 2008).

A linhagem MP-C5 apresenta duas cópias do gene *FPS1* no cromossomo XII de seu genoma. Dessa forma, para a deleção completa do gene foi desenhada uma estratégia utilizando os genes marcadores

KanMX e *Ble^r*, que conferem resistência à geneticina e zeocina, respectivamente, para a construção dos módulos de deleção conforme descrito por Petracek & Longtine (2002). Segundo esse trabalho, para a construção dos iniciadores é preciso que eles apresentem uma homologia de ~40 nt à região do gene alvo e ~19 nt de homologia à região do plasmídeo contendo o gene marcador.

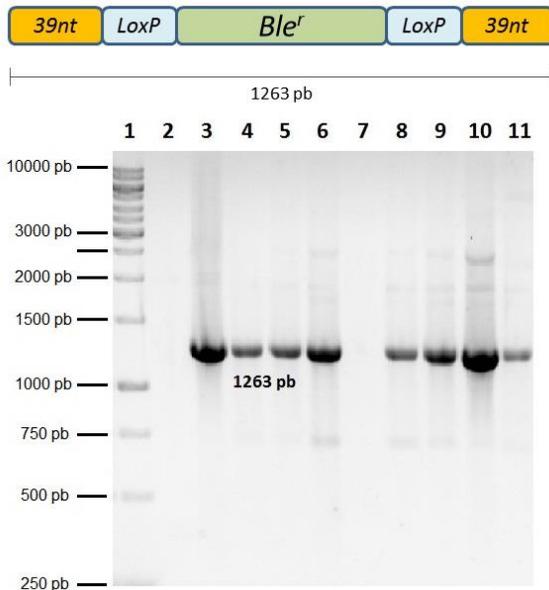
Os módulos de deleção construídos para deletar o gene *FPSI* foram denominados módulo de deleção interna (Figura 33) e módulo de deleção externa (Figura 34). No módulo de deleção interna, como apresentado na Figura 33, os iniciadores *forward* (Tabela 3, pág. 54) apresentam 39 nucleotídeos (nt) de homologia ao genoma da levedura na região interna do gene *FPSI* (os primeiros 39 nt do gene) e 19 nt de homologia a região do *loxP* que flanqueia o gene marcador *KanMX* do plasmídeo pUG6 (GÜLDENER *et al.*, 1996) enquanto que os iniciadores *reverse* apresentam 39 nt de homologia ao gene *FPSI* (últimos 39 nt do gene) e 20 nt de homologia ao plasmídeo pUG6.

Figura 33 – Módulo de deleção interna do gene *FPSI*. Os iniciadores *forward* e *reverse* apresentam homologia a genoma da levedura na região interna do gene *FPSI* (verde) e homologia a região do *loxP* (azul) que flanqueia o gene marcador *KanMX* (rosa). Na coluna 1 do gel de agarose apresenta-se o marcador de tamanho molecular de 1 kb, nas 2 à 8 são encontrados os produtos de DNA obtidos por PCR contendo 1692 pb (1614 pb do gene marcador *KanMX* + 78 pb de homologia ao *FPSI*) e na coluna 9 o controle negativo.



Fonte: Autor.

Figura 34 – Módulo de deleção externa do gene *FPS1*. Os iniciadores *forward* e *reverse* apresentam homologia ao genoma da levedura na região a montante e a jusante do gene *FPS1* (amarelo) e homologia a região do *loxP* (azul) que flanqueia o gene marcador *Ble^r* (verde). Na coluna 1 do gel de agarose apresenta-se o marcador de tamanho molecular de 1 kb, nas colunas 3 à 11 são encontrados os produtos de DNA obtidos através de PCR contendo 1263 pb (1185 pb do gene marcador *Ble^r* + 78 pb de homologia ao *FPS1*). As colunas 2 e 7 são controles negativos.



Fonte: Autor.

No módulo de deleção externa os iniciadores *forward* (Tabela 3, pág. 54) apresentam 39 nt de homologia à região a montante que flanqueia o gene *FPS1* e 19 nt de homologia à região *loxP* que flanqueia o gene marcador *Ble^r* presente no plasmídeo pUG66 (GUELDENER *et al.*, 2002), enquanto que os iniciadores *reverse* apresentam 39 nt de homologia a região jusante do gene *FPS1* após o códon de terminação e 20 nt de homologia à região jusante que flanqueia o gene marcador no plasmídeo pUG66. Ambos os módulos, de deleção interna e de deleção externa, foram construídos por PCR como descrito anteriormente na seção 4 - Materiais e Métodos (pág. 53).

Construídos os módulos de deleção interna e externa para o gene *FPS1*, a levedura industrial MP-C5 foi submetida ao evento de

transformação genômica. Para a deleção das duas cópias do gene *FPS1*, a melhor estratégia foi a deleção inicial de uma cópia do gene usando o módulo de deleção externa. Desse modo, evita-se a possibilidade que em um segundo evento de transformação seja deletado do genoma o módulo de deleção inicial (de deleção interna) com o segundo módulo de deleção aplicado nesse caso (de deleção externa), ao invés da segunda cópia do gene *FPS1* (o que seria possível de ocorrer caso a sequência de deleções fosse ao contrário). Na Figura 10 (pág. 57) é mostrada a estratégia de deleção do primeiro gene *FPS1* usando o módulo de deleção externa.

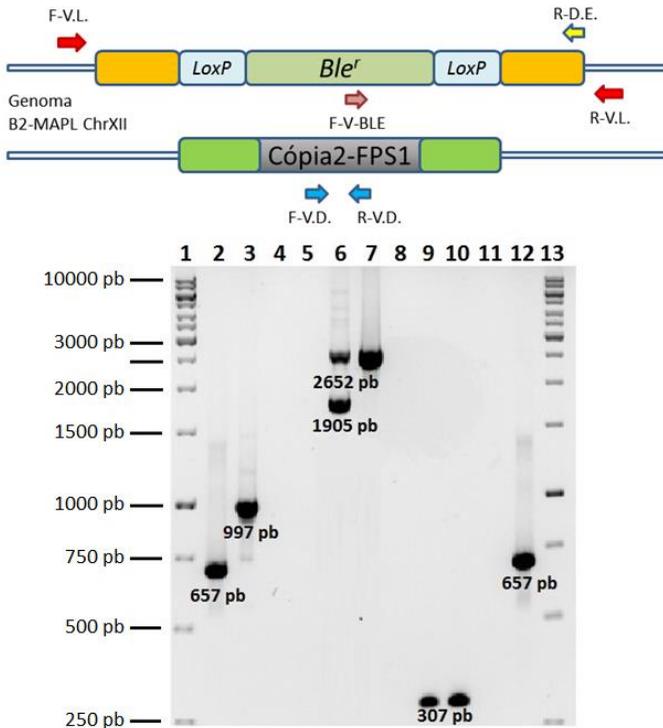
Após a transformação da levedura MP-C5 utilizando o módulo contendo o gene marcador *Ble^r*, as células foram selecionadas em placas de Petri contendo meio YPD-ágar suplementado com zeocina a uma concentração de 500 mg/l. Embora tenham sido obtidas várias colônias resistentes ao antibiótico, a maioria desses transformantes não tinha deletada a cópia do gene *FPS1* (dados não mostrados), mas em uma colônia, que passou a ser denominada de linhagem B2-MAPL, foi possível confirmar a deleção de uma cópia do gene *FPS1* com o gene de resistência *Ble^r*. A verificação do inserto/deleção por meio de reações de PCR é apresentada na Figura 35, e a combinação dos iniciadores utilizados para a verificação da inserção do gene no local correto *Ble^r* no genoma da levedura B2-MAPL encontra-se na Tabela 9.

Como pode ser observado na Figura 35, usando o iniciador *forward* de verificação do gene *Ble^r* e o iniciador *reverse* usado para a construção do módulo de deleção externa, permitiram a amplificação de uma banda de ~657 pb, indicando a presença do gene marcador *Ble^r* no genoma da levedura recombinante B2-MAPL. Usando os iniciadores *forward* de verificação do gene *Ble^r* e o iniciador *reverse* de verificação externa (340 pb após o códon de terminação do gene *FPS1*) permitiu a amplificação de uma banda de 957 pb, confirmando a presença do gene *Ble^r* no cromossomo XII da linhagem transformada.

O iniciador *forward* de verificação externa (302 pb antes do códon de iniciação do gene *FPS1*) e o iniciador *reverse* de verificação externa, permitiram na linhagem transformada B2-MAPL a amplificação de duas bandas: uma de 2652 pb (302 pb + 2010 pb + 340 pb) e outra de 1905 pb (302 pb + 1263 pb + 340 pb) (Figura 35), confirmando a presença do módulo de deleção externa deletando uma cópia apenas do gene *FPS1*. Com esses iniciadores uma única banda de 1905 pb indicaria a deleção completa do gene usando o módulo. Como também foi obtida a amplificação da banda de 2652 pb, estava confirmado a presença de uma cópia normal do gene *FPS1*. Além disso,

realizou-se outra reação de verificação usando os iniciadores *forward* de verificação e *reverse* de verificação dentro do gene, no qual se obteve um fragmento de 307 pb tanto na linhagem parental MP-C5 quanto na transformante B2-MAPL (*FPS1* / *fps1* Δ ::*Ble*^r).

Figura 35 – Verificação da deleção de uma cópia do gene *FPS1*. A seta roxa mostra o iniciador *forward* (F-V-BLE) que apresenta homologia ao gene *Ble*^r, a seta amarela mostra o iniciador *reverse* (R-D.E) usado na construção do módulo de deleção externa, as setas vermelhas representam os iniciadores *forward* (F-V.L) e *reverse* (R-V.L) externos ao gene, as setas azuis representam os iniciadores *forward* (F-V.D) e *reverse* (R-V.D) internos ao gene. No gel de agarose (colunas 1 e 13) marcador de tamanho molecular 1 kb; (2) B2-MAPL+F-V-BLE+R-D.E; (3) B2-MAPL+F-V-BLE+R-V.L; (4) MP-C5+F-V-BLE+R-V.L; (6) B2-MAPL+F-V.L+R-V.L; (7) MP-C5+F-V.L+R-V.L; (9) B2-MAPL+F-V.D+R-V.D; (10) MPC5+F-V.D+R-V.D; (12) B2-MAPL+F-V-BLE+R-D.E; as colunas 5 e 8 são controles negativos.



Fonte: Autor.

Tabela 9 – Combinação de iniciadores para verificação de deleção de uma cópia do gene *FPS1*.

Posição no gel	Iniciador <i>Forward</i>	Iniciador <i>Reverse</i>	Linhagem	Tamanho (pb)
2 e 12	F-V- BLE	R-FPS1-DELEÇÃO EXTERNA	B2-MAPL	657
3	F-V- BLE	R-VERIFICAÇÃO L-FPS1	B2-MAPL	997
4	F-V- BLE	R-VERIFICAÇÃO L-FPS1	MP-C5	-
6	F-VERIFICAÇÃO L-FPS1	R-VERIFICAÇÃO L-FPS1	B2-MAPL	2652 e 1905
7	F-VERIFICAÇÃO L-FPS1	R-VERIFICAÇÃO L-FPS1	MP-C5	2652
9	F-VERIFICAÇÃO D-FPS1	R-VERIFICAÇÃO D- FPS1	B2-MAPL	307
10	F-VERIFICAÇÃO D-FPS1	R-VERIFICAÇÃO D- FPS1	MP-C5	307

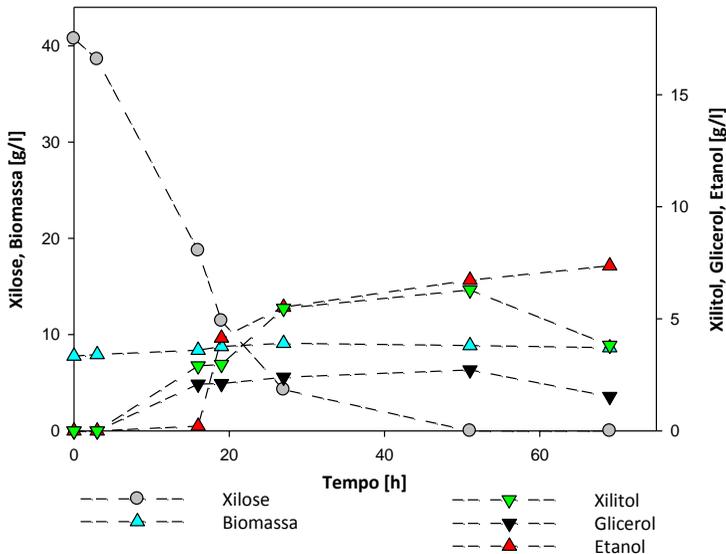
Uma vez confirmada a correta deleção na transformante B2-MAPL, passamos a usar o módulo de deleção interna (Figura 33 na pág. 87) com o gene marcador *KanMX* para deletar o gene *FPS1* presente nesta levedura diploide. Na Figura 11 da página 58 foi mostrada a estratégia de transformação da linhagem B2-MAPL para a deleção da segunda cópia do gene *FPS1*. Apesar de termos utilizado diferentes métodos de transformação de leveduras descritos na literatura (ITO *et al.*, 1983; SCHIESTL & GIETZ, 1989; GIETZ *et al.*, 1992; GIETZ & WOODS, 2002), e de eventualmente termos conseguido isolar algumas colônias resistentes à geneticina, não foi possível obtermos uma linhagem de levedura com deleção do gene *FPS1* usando o módulo contendo o marcador *KanMX*. Essa dificuldade na deleção do gene *FPS1* usando o marcador *KanMX*, não foi evidenciada em trabalhos que mostram as vantagens apresentadas da remoção de esse gene em linhagens haploides (WEI *et al.*, 2013; NAVARRETE, NIELSEN & SIEWERS, 2014). No entanto, para este trabalho, foi usada uma linhagem diploide. Porém, a explicação para esse insucesso é desconhecida.

Existem outras metodologias reportadas para deleção desse gene, como a descrita por Kong e colaboradores (2006). Nesse trabalho foi construído o plasmídeo pUC18-RYUR e o cassette RYUR foi flanqueado por porções do códon de iniciação e códon de terminação do *FPS1*, necessário para a recombinação homóloga. O gene *FPS1* foi amplificado por reações de PCR e clonado nos sítios *EcoRI* e *HindIII* de

pUC18 produzindo pUC18-FPS1-ORF. Por reações de PCR foi amplificada a região de pUC18-FPS1-ORF obtendo um produto com homologia nas extremidades ao *FPS1* de 130 pb e 120 pb respectivamente, o qual foi digerido com enzimas de restrição originando o pUC18-FRYURF, linearizado com *EcoRI* e *HindIII* para transformar a linhagem parental, obtendo-se por fim, a linhagem KAM-3 com o gene deletado.

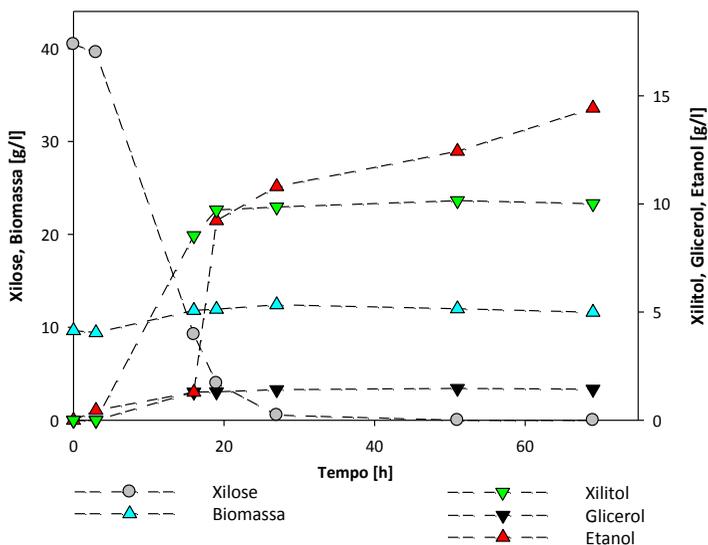
Mesmo sem termos obtido uma linhagem com a deleção das duas cópias do gene *FPS1*, realizamos fermentações em batelada para ambas as linhagens MP-C5 (Figura 36) e B2-MAPL (Figura 37), com o intuito de conhecer se a deleção de uma cópia do gene *FPS1* verificada na linhagem recombinante B2-MAPL poderia ter mudado o padrão de metabolização de xilose, em relação à linhagem parental. O meio rico YP foi usado visando se aproximar às condições industriais onde as leveduras realizam os processos de fermentação em presença de múltiplos nutrientes e outros compostos.

Figura 36 – Fermentação em batelada pela linhagem industrial MP-C5 em meio rico YP contendo 40 g/l de xilose. Mostra-se o consumo do açúcar e a produção de biomassa, glicerol, xilitol e etanol ao longo do tempo.



Fonte: Autor.

Figura 37 – Fermentação em batelada pela linhagem industrial B2-MAPL (*FPS1 / fps1Δ::Ble^r*) em meio rico YP contendo 40 g/l de xilose. Apresenta-se o consumo do açúcar e a produção de biomassa, glicerol, xilitol e etanol ao longo do tempo.



Fonte: Autor.

Como pode ser observado na Figura 36 (linhagem parental MP-C5) e Figura 37 (linhagem B2-MAPL), a linhagem industrial deletada em apenas uma única cópia do gene *FPS1*, apresentou um consumo de xilose mais rápido do que a linhagem parental, sendo que praticamente todos os parâmetros fermentativos da linhagem B2-MAPL, com exceção da produção de glicerol, foram superiores (o dobro) do que os obtidos com a linhagem MP-C5, como relacionado na Tabela 10. Porém, diferente ao trabalho de Wei e colaboradores (2013), a linhagem com o gene *FPS1* deletado não apresentou uma menor produção de xilitol o qual pode estar relacionado com o fato de que as duas cópias do gene *FPS1* da linhagem diploide não foram deletadas neste trabalho.

No entanto, apesar da produção incrementada de xilitol, a linhagem obtida teve maior produção de etanol quando comparada com a parental. Por outro lado, conforme observado nas Figuras 36 e 37, a biomassa inicial da linhagem modificada foi um pouco maior em relação à linhagem parental, o que sugeriria o aprimoramento do processo fermentativo pela maior quantidade de células. Contudo, observou-se

em cultivos realizados em experimentos prévios, com as mesmas condições de crescimento em concentração de 40 g/l de xilose para as duas linhagens, parental e modificada (dados não mostrados), que a cepa modificada obtida B2-MAPL (*FPS1 / fps1Δ::Ble'*) cresce melhor nesse açúcar, relacionando-se possivelmente à produção incrementada de etanol.

Tabela 10 - Grandezas de transformação da fermentação. Mostram-se, velocidade específica de crescimento, fatores de conversão de substrato em biomassa ($Y_{X/S}$), de substrato a produto ($Y_{Xil/S}$, $Y_{Glice/S}$, $Y_{ETOH/S}$), produtividade em biomassa (P_X) e produtividade em etanol (P_{ETOH}) apresentado pelos crescimentos das linhagens MP-C5 e B2-MAPL em meio SC contendo 40 g/l xilose.

Linhagem	μ	$Y_{\frac{X}{S}}$	$Y_{\frac{Xil}{S}}$	$Y_{\frac{Glice}{S}}$	$Y_{\frac{ETOH}{S}}$	P_X	P_{ETOH}
	h^{-1}	$[\frac{gX}{gS}]$	$[\frac{gXil}{gS}]$	$[\frac{gGlice}{gS}]$	$[\frac{gETOH}{gS}]$	$[\frac{g}{l.h}]$	$[\frac{g}{l.h}]$
MP-C5	0,006	0,036	0,154	0,067	0,226	0,049	0,100
B2-MAPL	0,011	0,070	0,308	0,075	0,444	0,103	0,131

6 CONCLUSÕES E SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

O experimento de engenharia evolutiva com a linhagem DLG-K1T2, que sobre-expressa apenas a permease codificada pelo gene *HXT2*, permitiu selecionar duas linhagens (9C-MA e 10A-MA) após sucessivos cultivos em meio mínimo SC contendo 20 g/l de xilose. Essas linhagens selecionadas foram capazes de consumir xilose e produzir etanol a partir dessa fonte de carbono. A análise dessas linhagens revelou que o plasmídeo pPGK-HXT2 não foi responsável pelo fenótipo apresentado pelas linhagens selecionadas, mas o sequenciamento do genoma revelou uma única mutação (a cisteína 654 mudando para serina) no fator de transcrição codificado pelo gene *STB5*, envolvido na regulação dos genes da via das pentoses fosfato e produção de NADPH em leveduras.

Como perspectiva futura dessa parte do trabalho, seria necessário confirmar se a mutação realmente é responsável pelo fenótipo adquirido pelas linhagens selecionadas/evoluídas, e também investigar se a mutação é dominante ou recessiva. Seria importante analisar o efeito da mutação identificada no gene *STB5* em uma linhagem de *S. cerevisiae* contendo todos os transportadores *HXT* (linhagem *wild-type*), além de verificar se o gene *STB5* mutado leva a uma maior expressão dos genes da via das pentoses-fosfato.

Em uma segunda parte desta dissertação foram usadas técnicas de engenharia genômica para promover a deleção do gene *FPS1* em uma linhagem industrial recombinante MP-C5 capaz de utilizar xilose. Embora tenha sido possível deletar apenas uma cópia do gene *FPS1*, que codifica uma aquaporina, na linhagem industrial diploide, originando a levedura recombinante B2-MAPL, essa apresentou um melhor consumo de xilose e produção de etanol do que à linhagem parental durante fermentações em batelada com 40 g/l xilose.

Seria importante verificar também se as linhagens obtidas na presente dissertação (9C-MA, 10A-MA e B2-MAPL) são capazes de fermentar quantidades maiores de xilose (p.ex. 100 g/l), principalmente em biorreatores com condições controladas que permitam melhor avaliar os parâmetros fermentativos, incluindo o consumo de oxigênio e produção de CO₂. De qualquer forma os resultados já obtidos e pelas sugestões futuras apresentadas, poderão abrir novos caminhos para a engenharia genética de linhagens de *S. cerevisiae* recombinantes capazes de fermentar eficientemente a xilose para a produção de etanol de segunda geração.

7 REFERÊNCIAS

- AKACHE, B., S. McPHERSON, M-A. SYLVAIN & B. TURCOTTE. 2004. "Complex Interplay among Regulators of Drug Resistance Genes in *Saccharomyces cerevisiae*." *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 279 (27), p. 27855–60.
- AMORIM, H. V., M. L. LOPES, J. DE CASTRO OLIVIEIRA, M. S. BUCKERIDGE, & G. H. GOLDMAN. 2011. "Scientific Challenges of Bioethanol Production in Brazil." *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 91 (5): 1267–75.
- AUSUBEL, F. M., R. BRENT, R. E. KINGSTON, D. D MOORE, J. G. SEIDMAN, J. A. SMITH, & K. STRUHL. 1992. *Short Protocols in Molecular Biology*. 2nd ed. John Wiley & Sons.
- BABRZADEH, F., R. JALILI, C. WANG, S. SHOKRALLA, S. PIERCE, A. ROBINSON-MOSHER, P. NYREN, et al. 2012. "Whole-Genome Sequencing of the Efficient Industrial Fuel-Ethanol Fermentative *Saccharomyces cerevisiae* Strain CAT-1." *Molecular Genetics and Genomics: MGG* 287 (6): 485–94.
- BASSO, L. C., H. V. de AMORIM, A. J. de OLIVEIRA, & M. L. LOPES. 2008. "Yeast Selection for Fuel Ethanol Production in Brazil." *FEMS Yeast Research*, vol. 8 (7): 1155–63.
- BASSO, T. O. 2011. "Melhoramento da fermentação alcoólica em *Saccharomyces cerevisiae* por engenharia evolutiva." 2011. 137 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Curso de Pós-Graduação interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, Universidade de São Paulo.
- BATT, C. A., S. CARYALLO, D. D. EASSON, M. AKEDO & A. J. SINSKEY. 1986. "Direct Evidence for a Xylose Metabolic Pathway in *Saccharomyces cerevisiae*." *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 28 (4): 549–53.
- BERNDES, G., S. AHLGREN, P. BÖRJESSON & A. L. COWIE. 2013. "Bioenergy and Land Use Change—state of the Art." *Wiley Interdisciplinary Reviews: Energy and Environment*, vol. 2 (3): 282–303.
- BERTILSSON, M., J. ANDERSSON & G. LIDÉN. 2008. "Modeling Simultaneous Glucose and Xylose Uptake in *Saccharomyces*

- cerevisiae* from Kinetics and Gene Expression of Sugar Transporters.” *Bioprocess and Biosystems Engineering*, vol. 31 (4): 369–77.
- BETA RENEWABLES. 2014. “Beta Renewables.” Disponível em: <<http://www.betarenewables.com/>>. Acesso em: 12 nov. 2014.
- BISSON, L. F., D. M. COONS, A. L. KRUCKERBERG & D. A. LEWIS. 1993. “Yeast Sugar Transporters.” *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, vol. 28 (4): 259–308.
- BNDES. 2014. “BNDES E Finep Lançam Programa de R\$ 1,48 Bi Para Incentivar Inovação No Setor Sucoenergético - BNDES.” Disponível em: <http://www.bndes.gov.br/SiteBNDES/bndes/bndes_pt/Institucional/Sala_de_Imprensa/Noticias/2014/Energia/20140217_paiss.html>. Acesso em: 17 fev. 2015.
- BON, E. P. S. & M. A. FERRARA. 2007. “Bioethanol Production via Enzymatic Hydrolysis of Cellulosic Biomass.” In *FAO 2007*. Roma. Disponível em: <<http://www.fao.org/biotech/docs/bon.pdf>> Acesso em: 16 fev. 2015.
- CADIÈRE, A., V. GALEOTE & S. DEQUIN. 2010. “The *Saccharomyces Cerevisiae* Zinc Factor Protein Stb5p Is Required as a Basal Regulator of the Pentose Phosphate Pathway.” *FEMS Yeast Research*, vol. 10 (7): 819–27.
- CARLSON, M. 1999. “Glucose Repression in Yeast.” *Current Opinion in Microbiology*, vol. 2 (2): 202–7.
- CHIANG, C. & S. G. KNIGHT. 1959. “D-Xylose Metabolism by Cell-Free Extracts of *Penicillium Chrysogenum*.” *Biochimica Et Biophysica Acta* 35: 454–63.
- CHU, B. C. H. & H. LEE. 2007. “Genetic Improvement of *Saccharomyces cerevisiae* for Xylose Fermentation.” *Biotechnology Advances*, vol. 25 (5): 425–41.
- COLETTA, V. C., C. A. REZENDE, F. R. DA CONCEIÇÃO, I. POLIKARPOV & F. E. GUIMARÃES. 2013. “Mapping the Lignin Distribution in Pretreated Sugarcane Bagasse by Confocal and Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy.” *Biotechnology for Biofuels*, sec. 6:43.

- CONAB. 2015. *Séries Históricas de Área Plantada, Produtividade E Produção, Relativas Às Safras 1976/77 a 2014/15 de Grãos, 2001 a 2014 de Café, 2005/06 a 2014/15 de Cana-de-Açúcar*. Companhia Nacional de Abastecimento. Séries históricas de área plantada, produtividade e produção, relativas às safras 1976/77 a 2014/15 de grãos, 2001 a 2014 de café, 2005/06 a 2014/15 de cana-de-açúcar. Disponível em: <www.conab.gov.br>. Acesso em: 28 jan. 2015.
- DÁRIO, M. G. 2012. “Efeito da alteração na captação de sacarose ao metabolismo de *Saccharomyces cerevisiae*.” 2012. 153 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Curso de Pós-Graduação interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, Universidade de São Paulo.
- DUNHAM, M. J., H. BADRANE, T. FEREA, J. ADAMS, P. O. BROWN, F. ROSENZWEIG & D. BOTSTEIN. 2002. “Characteristic Genome Rearrangements in Experimental Evolution of *Saccharomyces cerevisiae*.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 99 (25): 16144–49.
- ENGEL, S. R., F. S. DIETRICH, D. G. FISK, G. BINKLEY, R. BALAKRISHNAN, M. C. COSTANZO, S. S. DWIGHT, et al. 2014. “The Reference Genome Sequence of *Saccharomyces cerevisiae*: Then and Now.” *G3-Genes/Genomes/Genetics* 4 (3): 389–98.
- FARWICK, A., S. BRUDER, V. SCHADEWEG, M. OREB & E. BOLES. 2014. “Engineering of Yeast Hexose Transporters to Transport D-Xylose without Inhibition by D-Glucose.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111 (14): 5159–64.
- FONTAN, R. C. I., L. A. A. VERÍSSIMO, W. S. SILVA, R. C. F. BONOMO & C. M. VELOSO. 2012. “Cinética da fermentação alcoólica na elaboração de vinho de melancia.” *Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos*, vol. 29 (2).
- GIETZ, R. D., A. ST JEAN, R. A. WOODS & R. H. SCHIESTL. 1992. “Improved Method for High Efficiency Transformation of Intact Yeast Cells.” *Nucleic Acids Research*, vol. 20 (6): 1425.
- GIETZ, R. D. & R. A. WOODS. 2002. “Transformation of Yeast by Lithium Acetate/single-Stranded Carrier DNA/polyethylene Glycol Method.” *Methods in Enzymology*, vol. 350: 87–96.

- GOFFEAU, A., B. G. BARRELL, H. BUSSEY, R. W. DAVIS, B. DUJON, H. FELDMANN, F. GALIBERT, et al. 1996. "Life with 6000 Genes." *Science* (New York, N.Y.), vol. 274 (5287): 546, 563–67.
- GONÇALVES, D. L. 2010. "Produção de álcool combustível a partir de hidrolizados enzimáticos de bagaço de cana-de-açúcar por leveduras industriais e leveduras fermentadoras de xilose." Dissertação (Mestrado em Biotecnologia), Florianópolis - SC: Universidade Federal de Santa Catarina.
- . 2014. "Influência dos transportadores de açúcares na fermentação de xilose por linhagens recombinantes de *Saccharomyces cerevisiae*." Tese (Doutorado em Bioquímica), Florianópolis - SC: Universidade Federal de Santa Catarina.
- GONÇALVES, D. L., A. MATSUSHIKA, B. B. de SALES, T. GOSHIMA, E. P. S. BON & B. U. STAMBUK. 2014. "Xylose and Xylose/glucose Co-Fermentation by Recombinant *Saccharomyces cerevisiae* Strains Expressing Individual Hexose Transporters." *Enzyme and Microbial Technology*, vol. 63: 13–20.
- GRANBIO. 2014. "Biocombustíveis | Grupos de Conteúdo | GranBio." Disponível em: <<http://www.granbio.com.br/conteudos/biocombustiveis/>>. Acesso em: 9 fev. 2015.
- GUELDENER, U., J. HEINISCH, G. J. KOEHLER, D. VOSS & J. H. HEGEMANN. 2002. "A Second Set of loxP Marker Cassettes for Cre-Mediated Multiple Gene Knockouts in Budding Yeast." *Nucleic Acids Research*, vol. 30 (6): e23.
- GÜLDENER, U., S. HECK, T. FIELDER, J. BEINHAUER & J. H. HEGEMANN. 1996. "A New Efficient Gene Disruption Cassette for Repeated Use in Budding Yeast." *Nucleic Acids Research*, vol. 24 (13): 2519–24.
- HACHEZ, C. & F. CHAUMONT. 2010. "Aquaporins: A Family of Highly Regulated Multifunctional Channels." In *MIPs and Their Role in the Exchange of Metalloids*, edited by T. P. JAHN and Gerd P. Bienert, 1–17. Advances in Experimental Medicine and Biology 679. Springer New York.
- HAHN-HÄGERDAL, B., K. KARHUMAA, C. FONSECA, I. SPENCER-MARTINS & M. GORWA-GRAUSLUND. 2007.

- “Towards Industrial Pentose-Fermenting Yeast Strains.” *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 74 (5): 937–53.
- HAHN-HÄGERDAL, B., T. LINDÉN, T. SENAC & K. SKOOG. 1991. “Ethanol Fermentation of Pentoses in Lignocellulose Hydrolysates.” *Applied Biochemistry and Biotechnology*, vol. 28-29 (1): 131–44.
- HANLY, T. J. & M. A. HENSON. 2013. “Dynamic Metabolic Modeling of a Microaerobic Yeast Co-Culture: Predicting and Optimizing Ethanol Production from Glucose/xylose Mixtures.” *Biotechnology for Biofuels*, sec. 6:44.
- HARJU, S., H. FEDOSYUK & K. R. PETERSON. 2004. “Rapid Isolation of Yeast Genomic DNA: Bust N’ Grab.” *BMC Biotechnology* 4 (April): 8.
- HARNER, N. K., X. WEN, P. K. BAJWA, G. D. AUSTIN, C-Y. HO, M. B. HABASH, J. T. TREVORS & H. LEE. 2015. “Genetic Improvement of Native Xylose-Fermenting Yeasts for Ethanol Production.” *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, vol. 42 (1): 1–20.
- HA, S-J., J. M. GALAZKA, E. J. OH, V. KORDIC, H. KIM, Y-S. JIN & F. C. O. CATE. 2013. “Energetic Benefits and Rapid Cellobiose Fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* Expressing Cellobiose Phosphorylase and Mutant Cellodextrin Transporters.” *Metabolic Engineering*, vol. 15 (January): 134–43.
- HECTOR, R. E., J. A. MERTENS, M. J. BOWMAN, N. N. NICHOLS, M. A. COTTA & S. R. HUGHES. 2011. “*Saccharomyces cerevisiae* Engineered for Xylose Metabolism Requires Gluconeogenesis and the Oxidative Branch of the Pentose Phosphate Pathway for Aerobic Xylose Assimilation.” *Yeast (Chichester, England)*, vol. 28 (9): 645–60.
- HIMMEL, M. E., S-Y. DING, D. K. JOHNSON, W. S. ADNEY, M. R. NIMLOS, J. W. BRADY & T. D. FOUST. 2007. “Biomass Recalcitrance: Engineering Plants and Enzymes for Biofuels Production.” *Science (New York, N.Y.)*, vol. 315 (5813): 804–7.
- ITO, H., Y. FUKUDA, K. MURATA & A. KIMURA. 1983. “Transformation of Intact Yeast Cells Treated with Alkali Cations.” *Journal of Bacteriology*, vol. 153 (1): 163–68.

- JEFFRIES, T. W. 1983. "Utilization of Xylose by Bacteria, Yeasts & Fungi." In *Pentoses and Lignin*, 1–32. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, vol. 27. Springer Berlin Heidelberg.
- . 2006. "Engineering Yeasts for Xylose Metabolism." *Current Opinion in Biotechnology*, vol. 17 (3): 320–26.
- JEFFRIES, T. W. & N. Q. SHI. 1999. "Genetic Engineering for Improved Xylose Fermentation by Yeasts." *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, vol. 65: 117–61.
- KANG, Y. S., J. KANE, J. KURJAN, J. M. STADEL & D. J. TIPPER. 1990. "Effects of Expression of Mammalian G Alpha and Hybrid Mammalian-Yeast G Alpha Proteins on the Yeast Pheromone Response Signal Transduction Pathway." *Molecular and Cellular Biology*, vol. 10 (6): 2582–90.
- KASTEN, M. M. & D. J. STILLMAN. 1997. "Identification of the *Saccharomyces cerevisiae* Genes STB1–STB5 Encoding Sin3p Binding Proteins." *Molecular and General Genetics MGG*, vol. 256 (4): 376–86.
- KIM, S. R., H. XU, A. LESMANA, U. KUZMANOVIC, M. AU, C. FLORENCIA, E. J. OH, G. ZHANG, K. H. KIM & Y-S. JIN. 2015. "Deletion of PHO13, Encoding Haloacid Dehalogenase Type IIA Phosphatase, Results in Upregulation of the Pentose Phosphate Pathway in *Saccharomyces cerevisiae*." *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 81 (5): 1601–9.
- KONG, Q-X., J-G. GU, L-M. CAO, A-L. ZHANG, X. CHEN & X-M. ZHAO. 2006. "Improved Production of Ethanol by Deleting FPS1 and over-Expressing GLT1 in *Saccharomyces cerevisiae*." *Biotechnology Letters*, vol. 28 (24): 2033–38.
- KRUCKEBERG, A. L. & L. F. BISSON. 1990. "The HXT2 Gene of *Saccharomyces cerevisiae* Is Required for High-Affinity Glucose Transport." *Molecular and Cellular Biology*, vol. 10 (11): 5903–13.
- KRUCKEBERG, A. L., L. YE, J. A. BERDEN & K. van DAM. 1999. "Functional Expression, Quantification and Cellular Localization of the Hxt2 Hexose Transporter of *Saccharomyces cerevisiae* Tagged with the Green Fluorescent Protein." *The Biochemical Journal*, vol. 339 (Pt 2) (April): 299–307.

- KUYPER, M., H. R. HARHANGI, A. K. STAVE, A. A. WINKLER, M. S. M. JETTEN, W. T. A. M de LAAT, J. J. J. den RIDDER, H. J. M. op den CAMP, J. P. van DIJKEN & J. T. PRONK. 2003. "High-Level Functional Expression of a Fungal Xylose Isomerase: The Key to Efficient Ethanolic Fermentation of Xylose by *Saccharomyces cerevisiae*?" *FEMS Yeast Research*, vol. 4 (1): 69–78.
- KUYPER, M., M. J. TOIRKENS, J. A. DIDERICH, A. A. WINKLER, J. P. van DIJKEN & J. T. PRONK. 2005. "Evolutionary Engineering of Mixed-Sugar Utilization by a Xylose-Fermenting *Saccharomyces Cerevisiae* Strain." *FEMS Yeast Research*, vol. 5 (10): 925–34.
- LAROCHELLE, M., S. DROUIN, F. ROBERT & B. TURCOTTE. 2006. "Oxidative Stress-Activated Zinc Cluster Protein Stb5 Has Dual Activator/repressor Functions Required for Pentose Phosphate Pathway Regulation and NADPH Production." *Molecular and Cellular Biology*, vol. 26 (17): 6690–6701.
- LEE, S-M., T. JELLISON & H. ALPER. 2014. "Systematic and Evolutionary Engineering of a Xylose Isomerase-Based Pathway in *Saccharomyces cerevisiae* for Efficient Conversion Yields." *Biotechnology for Biofuels*, vol. 7 (August).
- LÖÖKE, M., K. KRISTJUHAN & A. KRISTJUHAN. 2011. "Extraction of Genomic DNA from Yeasts for PCR-Based Applications." *BioTechniques*, vol. 50 (5): 325–28.
- LUYTEN, K., J. ALBERTYN, W. F. SKIBBE, B. A. PRIOR, J. RAMOS, J. M. THEVELEIN & S. HOHMANN. 1995. "Fps1, a Yeast Member of the MIP Family of Channel Proteins, Is a Facilitator for Glycerol Uptake and Efflux and Is Inactive under Osmotic Stress." *The EMBO Journal*, vol. 14 (7): 1360–71.
- MANIATIS, T., E. F. FRITSCH & J. SAMBROOK. 1982. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed. New York, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- MARGEOT, A., B. HAHN-HAGERDAL, M. EDLUND, R. SLADE & F. MONOT. 2009. "New Improvements for Lignocellulosic Ethanol." *Current Opinion in Biotechnology*, Energy biotechnology / Environmental biotechnology, vol. 20 (3): 372–80.
- MATSUSHIKA, A., H. INOUE, T. KODAKI & S. SAWAYAMA. 2009. "Ethanol Production from Xylose in Engineered

- Saccharomyces cerevisiae* Strains: Current State and Perspectives.” *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 84 (1): 37–53.
- MATSUSHIKA, A., S. WATANABE, T. KODAKI, K. MAKINO, H. INOUE, K. MURAKAMI, O. TAKIMURA & S. SAWAYAMA. 2008. “Expression of Protein Engineered NADP⁺-Dependent Xylitol Dehydrogenase Increases Ethanol Production from Xylose in Recombinant *Saccharomyces cerevisiae*.” *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 81 (2): 243–55.
- MISHRA, P. & A. SINGH. 1993. “Microbial Pentose Utilization.” *Advances in Applied Microbiology* 39: 91–152.
- MONOŠÍK, R., P. MAGDOLEN, M. STREDANSKÝ & E. ŠTURDÍK. 2013. “Monitoring of Monosaccharides, Oligosaccharides, Ethanol and Glycerol during Wort Fermentation by Biosensors, HPLC and Spectrophotometry.” *Food Chemistry*, vol. 138 (1): 220–26.
- MORTIMER, R. K. & J. R. JOHNSTON. 1986. “Genealogy of Principal Strains of the Yeast Genetic Stock Center.” *Genetics*, vol. 113 (1): 35–43.
- NAVARRETE, C., J. NIELSEN, & V. SIEWERS. 2014. “Enhanced Ethanol Production and Reduced Glycerol Formation in *fps1Δ* Mutants of *Saccharomyces cerevisiae* Engineered for Improved Redox Balancing.” *AMB Express*, vol. 4 (1): 86.
- NEVOIGT, E. 2008. “Progress in Metabolic Engineering of *Saccharomyces cerevisiae*.” *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, vol.72 (3): 379–412.
- NI, H., J. M. LAPLAZA & T. W. JEFFRIES. 2007. “Transposon Mutagenesis To Improve the Growth of Recombinant *Saccharomyces cerevisiae* on D-Xylose.” *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 73 (7): 2061–66.
- OLSSON, L. & B. HAHN-HÄGERDAL. 1993. “Fermentative Performance of Bacteria and Yeasts in Lignocellulose Hydrolysates.” *Process Biochemistry*, vol. 28 (4): 249–57.
- PETRACEK, M. E. & M. S. LONGTINE. 2002. “PCR-Based Engineering of Yeast Genome.” *Methods in Enzymology*, vol. 350: 445–69.
- REIFENBERGER, E., K. FREIDEL & M. CIRIACY. 1995. “Identification of Novel HXT Genes in *Saccharomyces cerevisiae*

- Reveals the Impact of Individual Hexose Transporters on Glycolytic Flux.” *Molecular Microbiology*, vol. 16 (1): 157–67.
- REIS, V. C. B. 2012. “Modificações genéticas em linhagem industrial de *Saccharomyces cerevisiae* para a fermentação de xilose.” Tese (Doutorado em Biologia Molecular), Universidade de Brasília.
- RIZZI, M., K. HARWART, P. ERLEMANN, N-A. BUI-THANH & H. DELLWEG. 1989. “Purification and Properties of the NAD⁺-Xylitol-Dehydrogenase from the Yeast *Pichia Stipitis*.” *Journal of Fermentation and Bioengineering*, vol. 67 (1): 20–24.
- RUBIN, E. M. 2008. “Genomics of Cellulosic Biofuels.” *Nature*, vol. 454 (7206): 841–45.
- SAHA, B. C. 2003. “Hemicellulose Bioconversion.” *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, vol. 30 (5): 279–91.
- SALOHEIMO, A., J. RAUTA, O. V. STASYK, A. A. SIBIRNY, M. PENTTILÄ & L. RUOHONEN. 2007. “Xylose Transport Studies with Xylose-Utilizing *Saccharomyces cerevisiae* Strains Expressing Heterologous and Homologous Permeases.” *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 74 (5): 1041–52.
- SAMBROOK, J. & D. W. RUSSELL. 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. CSHL Press. <http://jpkc.gmu.cn/swhx/book/Molecular%20Cloning.pdf>.
- SAMPAIO, N. M. V. 2013. “Caracterização fenotípica e fisiológica de cepas de *Saccharomyces cerevisiae* mutadas para genes potencialmente envolvidos em fermentação sob condição industrial.” Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) - Programa de pós-graduação em Genética de Microorganismos, Campinas, SP.
- SAUER, U. 2001. “Evolutionary Engineering of Industrially Important Microbial Phenotypes.” In *Metabolic Engineering*, edited by J. NIELSEN, L. EGGELING, J. DYNESEN, M. GÁRDONYI, R. T. GILL, A. A. de GRAAF, B. HAHN-HÄGERDAL, *et al.*, 129–69. Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology 73. Berlin, Germany: Springer Berlin Heidelberg.
- SCHIESTL, R. H., & R. D. GIETZ. 1989. “High Efficiency Transformation of Intact Yeast Cells Using Single Stranded Nucleic Acids as a Carrier.” *Current Genetics*, vol. 16 (5-6): 339–46.

- SCHMIDELL, W., U. LIMA, E. AQUARONE & W. BORZANI. 2001. *Biotechnologia Industrial: Engenharia Bioquímica*, vol. 2. São Paulo, SP: Edgard Blucher Ltda.
- SCHWARTZ, K., J. W. WENGER, B. DUNN & G. SHERLOCK. 2012. "APJ1 and GRE3 Homologs Work in Concert to Allow Growth in Xylose in a Natural *Saccharomyces Sensu Stricto* Hybrid Yeast." *Genetics*, vol. 191 (2): 621–32.
- SHEN, Y., X. CHEN, B. PENG, L. CHEN, J. HOU & X. BAO. 2012. "An Efficient Xylose-Fermenting Recombinant *Saccharomyces cerevisiae* Strain Obtained through Adaptive Evolution and Its Global Transcription Profile." *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 96 (4): 1079–91.
- SHEPHERD, A. & P. W. PIPER. 2010. "The Fps1p Aquaglyceroporin Facilitates the Use of Small Aliphatic Amides as a Nitrogen Source by Amidase-Expressing Yeasts." *FEMS Yeast Research*, vol. 10 (5): 527–34.
- SIMS, R., M. TAYLOR, J. SADDLER & W. MABEE. 2008. *From 1st to 2nd Generation Biofuels Technologies - An Overview of Current Industry and RD&D Activities - International Energy Agency IEA*. Paris.
- SMITH, J., E. van RENSBURG & J. F. GÖRGENS. 2014. "Simultaneously Improving Xylose Fermentation and Tolerance to Lignocellulosic Inhibitors through Evolutionary Engineering of Recombinant *Saccharomyces cerevisiae* Harboring Xylose Isomerase." *BMC Biotechnology*, vol. 14: 41.
- SONDEREGGER, M., M. JEPSSON, C. LARSSON, M. GORWA-GRAUSLUND, E. BOLES, L. OLSSON, I. SPENCER-MARTINS, B. HAHN-HÅGERDAL & U. SAUER. 2004. "Fermentation Performance of Engineered and Evolved Xylose-Fermenting *Saccharomyces cerevisiae* Strains." *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 87 (1): 90–98.
- SONDEREGGER, M. & U. SAUER. 2003. "Evolutionary Engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for Anaerobic Growth on Xylose." *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 69 (4): 1990–98.
- STAMBUK, B. U., B. DUNN, S. L. ALVES, E. H. DUVAL & G. SHERLOCK. 2009. "Industrial Fuel Ethanol Yeasts Contain

- Adaptive Copy Number Changes in Genes Involved in Vitamin B1 and B6 Biosynthesis.” *Genome Research*, vol. 19 (12): 2271–78.
- STAMBUK, B. U., ELEUTHERIO, E. C. A., FLOREZ-PARDO, L. M., SOUTO-MAIOR A. M. & E. P. S. BON. 2008. “Brazilian Potential for Biomass Ethanol: Challenge of Using Hexose and Pentose Co-Fermenting Yeast Strains,” sec. 67.
- STROPPA, C. T., José G. L. F. ALVES, A. L. F. FIGUEIREDO & C. C. CASTRO. 2009. “Kinetic Parameters of Yeasts Strains Isolated from Cachaça Distilleries in Minas Gerais/Brazil.” *Ciência E Agrotecnologia*, vol. 33 (SPE): 1978–83.
- SUBTIL, T. & E. BOLES. 2012. “Competition between Pentoses and Glucose during Uptake and Catabolism in Recombinant *Saccharomyces cerevisiae*.” *Biotechnology for Biofuels*, vol. 5: 14.
- TRUMBLY, R. J. 1992. “Glucose Repression in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*.” *Molecular Microbiology*, vol. 6 (1): 15–21.
- Van VLEET, J. H. & T. W. JEFFRIES. 2009. “Yeast Metabolic Engineering for Hemicellulosic Ethanol Production.” *Current Opinion in Biotechnology*, vol. 20 (3): 300–306.
- Van VLEET, J. H., T. W. JEFFRIES & L. OLSSON. 2008. “Deleting the Para-Nitrophenyl Phosphatase (pNPPase), PHO13, in Recombinant *Saccharomyces cerevisiae* Improves Growth and Ethanol Production on D-Xylose.” *Metabolic Engineering*, vol. 10 (6): 360–69.
- Van ZYL, C. V., B. A. PRIOR, S. G. KILIAN & J. L. F. KOCK. 1989. “D-Xylose Utilization by *Saccharomyces cerevisiae*.” *Journal of General Microbiology*, vol. 135 (11): 2791–98.
- VERDUYN, C., R. van KLEEF, J. FRANK, H. SCHREUDER, J. P. van DIJKEN & W. A. SCHEFFERS. 1985. “Properties of the NAD(P)H-Dependent Xylose Reductase from the Xylose-Fermenting Yeast *Pichia Stipitis*.” *Biochemical Journal*, vol. 226 (3): 669–77.
- WEBB, S. R. & H. LEE. 1990. “Regulation of D-Xylose Utilization by Hexoses in Pentose-Fermenting Yeasts.” *Biotechnology Advances*, vol. 8 (4): 685–97.
- WEI, N., H. XU, S. R. KIM & Y-S. JIN. 2013. “Deletion of FPS1, Encoding Aquaglyceroporin Fps1p, Improves Xylose Fermentation

- by Engineered *Saccharomyces cerevisiae*.” *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 79 (10): 3193–3201.
- WENDELL, D. L. & L. F. BISSON. 1993. “Physiological Characterization of Putative High-Affinity Glucose Transport Protein Hxt2 of *Saccharomyces cerevisiae* by Use of Anti-Synthetic Peptide Antibodies.” *Journal of Bacteriology*, vol. 175 (23): 7689–96.
- WESTERGAARD, S. L., A. P. OLIVEIRA, C. BRO, L. OLSSON & J. NIELSEN. 2007. “A Systems Biology Approach to Study Glucose Repression in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*.” *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 96 (1): 134–45.
- WU, B. & E. BEITZ. 2007. “Aquaporins with Selectivity for Unconventional Permeants.” *Cellular and Molecular Life Sciences*, vol. 64 (18): 2413–21.
- WYSOCKI, R., C. C. CHÉRY, D. WAWRZYCKA, M. Van HULLE, R. CORNELIS, J. M. THEVELEIN & M. J. TAMÁS. 2001. “The Glycerol Channel Fps1p Mediates the Uptake of Arsenite and Antimonite in *Saccharomyces cerevisiae*.” *Molecular Microbiology*, vol. 40 (6): 1391–1401.
- YE, J., G. COULOURIS, I. ZARETSKAYA, I. CUTCUTACHE, S. ROZEN & T. L. MADDEN. 2012. “Primer-BLAST: A Tool to Design Target-Specific Primers for Polymerase Chain Reaction.” *BMC Bioinformatics*, vol. 13: 134.
- YOUNG, E., A. POUCHER, A. COMER, A. BAILEY & H. ALPER. 2011. “Functional Survey for Heterologous Sugar Transport Proteins, Using *Saccharomyces cerevisiae* as a Host[∇].” *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 77 (10): 3311–19.
- YOUNG, E., A. TONG, H. BUI, C. SPOFFORD & H. ALPER. 2014. “Rewiring Yeast Sugar Transporter Preference through Modifying a Conserved Protein Motif.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 111 (1): 131–36.
- ZAH, R., C. BINDER, S. BRINGEZU, J. REINHARD, A. SCHMID & H. SCHÜTZ. 2010. *Future Perspectives of 2nd Generation Biofuels*. Zürich.
- ZHA, J., B-Z. LI, M-H. SHEN, M-L. HU, H. SONG & A. H. YUAN. 2013. “Optimization of CDT-1 and XYL1 Expression for Balanced

Co-Production of Ethanol and Xylitol from Cellobiose and Xylose by Engineered *Saccharomyces cerevisiae*.” *PLoS ONE*, sec. 8(7).

ZHANG, F., S. RODRIGUEZ & J. D. KEASLING. 2011. “Metabolic Engineering of Microbial Pathways for Advanced Biofuels Production.” *Current Opinion in Biotechnology* 22 (6): 775–83.

ZHONG, C., M. W. LAU, V. BALAN, B. E. DALE & Y-J. YUAN. 2009. “Optimization of Enzymatic Hydrolysis and Ethanol Fermentation from AFEX-Treated Rice Straw.” *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 84 (4): 667–76.