

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR

**MODIFICAÇÕES GENÉTICAS EM LINHAGEM
INDUSTRIAL DE *Saccharomyces cerevisiae*
PARA A FERMENTAÇÃO DE XILOSE**

VIVIANE CASTELO BRANCO REIS

BRASÍLIA – DF

2012

VIVIANE CASTELO BRANCO REIS

**MODIFICAÇÕES GENÉTICAS EM LINHAGEM
INDUSTRIAL DE *Saccharomyces cerevisiae*
PARA A FERMENTAÇÃO DE XILOSE**

Tese apresentada ao departamento de
Biologia Celular do Instituto de Ciências
Biológicas da Universidade de Brasília
como requisito parcial para a obtenção do
grau de Doutora em Biologia Molecular

Orientador:

Prof. Dr. Fernando Araripe G. Torres

BRASÍLIA – DF

2012

Viviane Castelo Branco Reis

MODIFICAÇÕES GENÉTICAS EM LINHAGEM INDUSTRIAL DE
Saccharomyces cerevisiae PARA FERMENTAÇÃO DE XILOSE

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Fernando Araripe G. Torres
Presidente e Orientador
Departamento de Biologia Celular
UnB - Brasília

Dra. Lídia Maria Melo Santa Anna
Examinadora externa
CENPES
Petrobrás - Rio de Janeiro

Prof. Dr. Nei Pereira Jr.
Examinador externo
Departamento de Engenharia Bioquímica
UFRJ – Rio de Janeiro

Prof^a Dra. Lidia Maria Pepe de Moraes
Examinadora interna
Departamento de Biologia Celular
UnB - Brasília

Prof^a Dra Elida Geralda Campos
Examinadora interna
Departamento de Biologia Celular
UnB - Brasília

Dra. Nádia Skorupa Parachin
Suplente
Departamento de Biologia Celular
UnB - Brasília

"Se nós soubessemos o que o amanhã traria, não precisaríamos de nossos sonhos, esperanças e planos."

Dedico esta tese aos meus pais

Reis & Teresinha

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Fernando pela orientação, por ter colocado em minhas mãos um projeto tão desafiador, pela oportunidade de crescimento participando de outros projetos, supervisionando alunos entre outras coisas. Pela confiança, carinho, amizade.

À Prof^a Sueli pelas oportunidades e pelo carinho.

À Prof^a Lidia por sempre estar disposta a discutir ciência e ensinar.

À Prof^a Janice, companheira de bancada pelo carinho, amizade, conversas e descontração.

Ao casal Prof. Fernando e Prof^a Janice pelas caronas e companhia na hora do almoço.

Aos Prof Spartacus, Prof^a Sueli, Prof^a Lidia e Prof^a Larisa pelas dicas na qualificação.

À Prof^a Elida pelo ensinamento de escrita de artigo científico.

A todos os professores que de uma forma ou outra contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao André Nicola, Nádia e Osmar pelo auxílio com alguns experimentos deste trabalho.

Ao Hugo pelos artigos e revisões da língua inglesa

À Danuza pelo empenho nos assuntos junto a Petrobrás e pelo carinho.

Ao Vinícius, Betúlia, Fernanda e Gisele por sempre estarem dispostos a ajudar.

Ao Thiago (técnico do citômetro de fluxo) e Adriane (técnica do sequenciamento),

Aos amigos da Confraria do Boteco pela força, amizade, carinho, descontração, incentivo.

Aos amigos do Rio de Janeiro: Cris (grande amiga), Leo, Marcelo e Dani pelo carinho e reconhecimento.

Aos companheiros de luta do laboratório de Biotecnologia de Levedura pelos momentos de descontração.

A todos aqueles que me estenderam a mão quando eu precisei, científica e/ou emocionalmente.

Aos técnicos do laboratório que facilitam a nossa vida: Fátima, Ivonildes, Thompson, Aldaide e Fernanda.

À Conceição

Aos meus pais Reis e Teresinha e meu irmão Marcelo pelo amor, carinho e apoio.

A Deus pela força

A Capes, Petrobras e CNPq pelo apoio financeiro

RESUMO

Para a produção economicamente viável de etanol de segunda geração a partir de bagaço de cana são necessários vários avanços tecnológicos em diferentes etapas deste bioprocessos incluindo o melhoramento genético de microrganismos fermentadores. A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é o microrganismo mais usado para tal por ser uma excelente fermentadora e tolerante aos estresses dos grandes processos fermentativos industriais. Dentre os principais açúcares que compõem o bagaço de cana, destaca-se a xilose, uma pentose que pertence à fração hemicelulósica. Todavia, *S. cerevisiae* só utiliza hexoses na fermentação, não sendo capaz de metabolizar pentoses. O objetivo principal deste trabalho foi desenvolver uma levedura capaz de fermentar xilose. Inicialmente, foi feito um estudo das características genéticas da linhagem industrial de *S. cerevisiae* JP1 – microrganismo hospedeiro selecionado como alvo das modificações desejadas (Capítulo 1). Pode-se verificar que a linhagem JP1 é diploide e heterotática. Mostrou-se também sensível às principais drogas usadas em processo de seleção de recombinantes assim com uma boa eficiência de transformação. Além disso, foi construída uma linhagem auxotrófica para uracila com a dupla deleção do gene *URA3*. Posteriormente, a linhagem JP1 foi modificada geneticamente para se tornar capaz de fermentar xilose a etanol (Capítulo 2). Foram construídos cassetes de expressão para duas enzimas da via metabólica de xilose - xilose isomerase e xiluloquinase – clonados em vetor episomal. A linhagem recombinante obtida foi submetida à adaptação metabólica por 48 dias em meio contendo apenas xilose como fonte de carbono, levando a um aumento na taxa de crescimento de $0,008 \text{ h}^{-1}$ para $0,13 \text{ h}^{-1}$. Estudos preliminares de fermentação em meio sintético mostrou um acúmulo de xilitol ($Y_{X/S} = 0,29 \text{ g g}^{-1}$) e baixa produção de etanol ($Y_{E/S} = 0,27 \text{ g g}^{-1}$). Para incrementar a produção de etanol, um cassete de deleção para o gene *GRE3* (aldose redutase) foi desenvolvido. Além disso, consideramos a introdução de um gene codificador para um transportador com afinidade por xilose, visando aumentar o influxo de xilose para a célula. Para tanto, foi iniciada uma análise transcricional da levedura *Pichia stipitis* (*Scheffersomyces stipitis*) CBS 5774 adaptada ao hidrolisado de bagaço de cana a fim de compreender a regulação em diferentes concentrações

de xilose e glicose, além de selecionar um possível transportador de xilose para ser expresso em *S. cerevisiae* (Capítulo 3). Dados preliminares indicam que o gene com maior expressão em xilose foi *XYL3* e, dentre os transportadores putativos de xilose, *XUT1*.

Esse trabalho representou uma das primeiras iniciativas no País no emprego de abordagens de engenharia metabólica para o desenvolvimento de um bioprocesso em linhagem industrial de *S. cerevisiae*. No seu conjunto, nossos resultados preliminares mostram que o desenvolvimento da tecnologia nacional para a produção de álcool lignocelulósico utilizando microrganismos modificados geneticamente é plenamente viável. Embora a linhagem obtida nesse estudo não tenha apresentado rendimentos de etanol desejáveis a partir de xilose, foi demonstrada a eficácia das ferramentas moleculares desenvolvidas que poderão ser empregada em futuros estudos. Além disso, comprovamos que as características genéticas da linhagem industrial JP1 a tornam uma interessante plataforma para futuras modificações relacionadas a outros bioprocessos.

ABSTRACT

In order to achieve cost-effective, second-generation ethanol production from sugarcane bagasse, several stages of this bioprocess need to be technologically upgraded, which includes the genetic improvement of fermenting microorganisms. The yeast *Saccharomyces cerevisiae* is the most employed microbe to this purpose due to its excellent fermentative properties and high tolerance to the stressing conditions of large-scale industrial fermentation. Among the sugars that constitute sugarcane bagasse, xylose, a pentose abundant in the hemicellulosic fraction, is one of the most important. However, *S. cerevisiae* only uses hexoses in fermentation and is incapable of catabolising pentoses. The main goal of this project was to develop a xylose-fermenting yeast strain. Initially, we made genetic profiled the industrial *S. cerevisiae* strain JP1, which was to be subjected to the genetic manipulations in the pursuit of our goal (Chapter 1). We assessed that JP1 is diploid and heterothallic. It was also shown to be susceptible to the main drugs used in recombinant derivative selection and to be transformable with good efficiency. Next, we created an uracyl-auxotroph derivative by double-deleting the *URA3* gene. Later, the JP1 strain was genetically modified to become able to ferment xylose to ethanol (Chapter 2). We created expression cassettes for two enzymes of the xylose catabolic pathway – xylose isomerase and xylulokinase – cloned into an episomal vector. The recombinant strain was submitted to metabolic adaptation for 48 days in medium with xylose as the sole carbon source, which led to an increase in the growth rate from 0.008 h^{-1} to 0.13 h^{-1} . Preliminary studies of fermentation in synthetic medium revealed a buildup of xylitol ($Y_{X/S} = 0,29 \text{ g g}^{-1}$) and low ethanol production ($Y_{E/S} = 0,27 \text{ g g}^{-1}$) by this strain. In order to increase ethanol production, a deletion cassette for the *GRE3* gene (aldose reductase) was developed. In addition, we considered introducing a gene coding for a membrane transporter with affinity for xylose to increase the influx of xylose to cell. To this end, we carried out a transcriptional analysis of the yeast *Pichia stipitis* (*Scheffersomyces stipitis*) CBS 5774 that had been adapted to sugarcane bagasse hydrolysate in order to understand gene regulation under different xylose and glucose concentrations and thus select a putative xylose transporter that could be expressed in *S. cerevisiae* (Chapter 3).

Preliminary data indicate that the most upregulated gene with xylose as carbon source was *XYL3* and, among putative xylose transporters, *XUT1*.

The present work was one of the first attempts in the country to use metabolic engineering to develop a bioprocess in an industrial strain of *S. cerevisiae*. Overall, our preliminary results show that it is fully possible to develop national technology for production of ethanol from lignocellulosic residues using genetically modified microorganisms. Although the strain obtained in the present study did not show the desired ethanol yield from xylose, the molecular tools developed in this work were shown to be effective and validated to be used in future studies. Besides, we showed that the genetic features of the industrial strain JP1 make it interesting for future modifications related to other bioprocesses.

ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

°C = graus centígrados

5-FOA = ácido 5-fluoroorótico

Amp = ampicilina

Amp^R = ampicilina resistente

ADP = adenosina difosfato

AMP = adenosina monofosfato

ATP = adenosina trifosfato

β-gal = beta-galactosidase

BSA = albumina sérica bovina

CCR = *carbon catabolite repression* (repressão catabólica por carbono)

cDNA = DNA complementar

Da = Dalton

DAHP = 3-deoxi-D-arabino-heptulose-7-fosfato

DIC = *Differential Interference Contrast* (*Contraste de interferência diferencial*)

DMSO = dimetil sulfóxido

DNA = ácido desoxirribonucleico

dATP = deoxiadenosina trifosfato

dNTP = deoxirribonucleotídeos trifosfatados

DTT = ditioneitol

EDTA = ácido etilenodiaminotetracético

EMP = Embden-Meyerhof-Parnas

EtBr = Brometo de etídio

EUA = Estados Unidos da América

FSC = *forward scatter*

g = força da gravidade

g = grama

GEE = gases de efeito estufa

GFP = *Green fluorescent protein* (proteína verde fluorescente)

GJ = gigajoule (1GJ = 10⁹ J)

GRAS = *Generally Recognized as Safe* (geralmente reconhecido como seguro)

GRE3 = aldose redutase

h = hora

ha = hectare

hph = higromicina B fosfotransferase

HPLC = *High-Performance Liquid Chromatography* (Cromatografia Líquida de Alta Performance)

IPTG = isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo

J = joule

Kan = kanamicina

kb = quilobases = 1000 pares de bases

kDa = quilo Dalton = 1000 Dalton

λ BstEII = marcador de DNA de fago λ digerido com a enzima de restrição BstEII

λ E/H = marcador de DNA de fago λ digerido com as enzimas de restrição EcoRI e HindIII

LiAOc = Acetato de lítio

M = molar

mg = miligrama

MIC = Minimum Inhibitory Concentration (concentração inibitória mínima)

min = minuto

MJ = megajoule

mL = mililitro

mM = milimolar

MOPS = *3-(N-morpholino) propanesulfonic acid* (ácido 3-N-morfolino propano sulfônico)

mRNA = ácido ribonucléico mensageiro

MSC = múltiplo sítio de clonagem

F = faraday

μ M = micromolar

NCBI = *National Center for Biotechnology Information*

ng = nanograma

NAD⁺ / NADH = Nicotinamida adenina dinucleotídeo

NADPH = Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato

ng = nanograma

OD₆₀₀ = densidade óptica a 600 nm

OFP = orto-Flúor-DL-Fenilalanina

ORF = *open reading frame* (fase aberta de leitura)

PAGE = *polyacrilamide gel electrophoresis* (eletroforese em gel de poliacrilamida)

pb = pares de base

PB = Paraíba

PCR = *polimerase chain reaction* (reação de polimerização em cadeia)

PEG = polietilenoglicol

PFGE = *Pulsed Field Gel Electrophoresis* (Eletroforese em Gel de Campo Pulsante)

PFK = fosfofrutoquinase

PFP = para-Flúor-DL-Fenilalanina

PGK = 3-fosfoglicerato quinase

pH = potencial hidrogeniônico

PPP = pentose phosphate pathway (via das pentose fosfato)

PSA = persulfato de amônia

qRT-PCR = PCR em tempo real (transcrição reversa e reação de polimerização em cadeia em tempo real)

q.s.p. = quantidade suficiente para

RNA = ácido ribonucléico

RNAse = ribonuclease

rpm = rotações por minuto

RT = transcriptase reversa

s = segundos

SAP = *shrimp alkaline phosphatase* (fosfatase alcalina de camarão)

SDS = *sodium dodecyl sulfate* (Dodecil Sulfato de Sódio)

SGD = *Saccharomyces Genome Database*

snRNA = small nuclear RNA

SSC = *side scatter*

t = tonelada

T = timina

TAL1 = transaldolase 1

TEF = *translation elongation factor* (fator de alongação transcricional)

TKT = transcetolase

TM = Temperatura de anelamento

Tris = tris(hidroximetil)aminometano

tRNA = ácido ribonucleico transportador

UNICA = União da Indústria de Cana-de-açúcar

UV = ultravioleta

V = voltagem

YNB = *yeast nitrogen base* (base nitrogenada de levedura)

X-gal = 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactosídeo

XDH = xilitol desidrogenase

XI = xilose isomerase

XK = xiluloquinase

XR = xilose redutase

W = watt (unidade de potência)

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Contribuição dos gases do efeito estufa de diferentes setores da economia do Brasil para o aquecimento global em 2000.....	2
Tabela 2: Características dos oligonucleotídeos utilizados.....	29
Tabela 3: Características dos oligonucleotídeos para qRT-PCR.....	31
Tabela 4. Reagentes utilizados na PCR.....	36
Tabela 5. Reagentes utilizados na PCR de colônia.....	37
Tabela 6: Reagentes utilizados na reação para adição de dATP.....	38
Tabela 7: Análise quantitativa dos esporos.....	60
Tabela 8: Análise quantitativa da viabilidade dos esporos.....	61
Tabela 9: MIC para PFP.....	64
Tabela 10: Transformação de JP1 com plasmídios epissomais.....	72
Tabela 11: Evolução da linhagem recombinante VCB111.....	106
Tabela 12: Fermentação da linhagem VCB112.....	110
Tabela 13: Comparação do consumo de xilose e formação de produtos de fermentação de diferentes linhagens recombinantes de <i>S. cerevisiae</i> da literatura.....	111

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Consumo de energia per capita por setor.....	2
Figura 2: Esquema do processo de conversão de biomassa em etanol.....	10
Figura 3: Via Entner-Doudoroff (ED) em <i>Z. mobilis</i>	13
Figura 4: Regulação da via glicolítica EMP e via fermentativa.....	16
Figura 5: Vias metabólicas de consumo de xilose.....	19
Figura 6: Rota metabólica da xilose.....	20
Figura 7: Ciclo de vida e reprodução de <i>S. cerevisiae</i>	55
Figura 8: Representação da interconversão do <i>locus</i> ativo <i>MAT</i>	56
Figura 9: Fotomicrografia de células de <i>S. cerevisiae</i>	58
Figura 10: Determinação do tipo de acasalamento por PCR de colônia do <i>locus</i> <i>MAT</i>	58
Figura 11: Análise do conteúdo de DNA de diferentes linhagens de <i>S. cerevisiae</i>	59
Figura 12: Análise do ciclo de vida da JP1.....	61
Figura 13: Esquema condensado da via de biossíntese dos aminoácidos aromáticos.....	63
Figura 14: MIC para canavanina.....	65
Figura 15: MIC da linhagem JP1 para higromicina B.....	66
Figura 16: MIC da linhagem JP1 para zeocina.....	66
Figura 17: MIC para G418.....	68
Figura 18: Vetor pYC280.....	70
Figura 19: Modelo esquemático do plasmídio 2 μ de <i>S. cerevisiae</i>	70
Figura 20: Detecção do plasmídio nativo 2 μ	71
Figura 21: Confirmação dos transformantes resistentes a diferentes antibióticos.....	73
Figura 22: Esquema para construção do cassete de deleção do <i>locus URA3</i>	74
Figura 23: Amplificação das regiões <i>URA3</i>	75
Figura 24: Análise do pVURA por PCR.....	76
Figura 25: Amplificação dos cassetes de seleção.....	77
Figura 26: Obtenção dos cassetes de integração URAZL e URAKL.....	78
Figura 27: Vetor pYRCre.....	79
Figura 28: Análise fenotípica dos transformantes.....	80
Figura 29: Deleção do gene <i>URA3</i>	81
Figura 30: Detecção de fluorescência.....	82
Figura 31: Esquema do cassete de integração CAN-PGK-XI.....	89

Figura 32: Análise da integração do cassete CAN-PGK no <i>locus CAN1</i>	90
Figura 33: Análise da integração do cassete CAN-PGK-XI no <i>locus CAN1</i>	92
Figura 34: Esquema para subclonagem do cassete PGK-XI.....	94
Figura 35: Perfil de restrição do pYXI.....	95
Figura 36: Cinética enzimática do NADH.....	96
Figura 37: Esquema para subclonagem do cassete PGK-XI.....	97
Figura 38: Análise de restrição do pYXI β	98
Figura 39: Esquema para construção do cassete PGI-XK.....	99
Figura 40: Amplificação dos fragmentos PGI e XKS.....	100
Figura 41: Esquema da subclonagem do cassete de expressão PGI-XK no vetor pYXI β	102
Figura 42: Perfil de restrição dos transformantes pYXIXK.....	103
Figura 43: Crescimento dos transformantes em meio MX.....	104
Figura 44: Análise dos transformantes para XI e XK.....	104
Figura 45: Crescimento de <i>S. cerevisiae</i>	107
Figura 46: Curva de crescimento de <i>S. cerevisiae</i> recombinante em 2% xilose.....	108
Figura 47: Teste de fermentação.....	109
Figura 48: Fermentação da linhagem VCB112.....	110
Figura 49: Esquema para construção do cassete de deleção do gene <i>GRE3</i>	113
Figura 50: PCR <i>GRE3</i>	114
Figura 51: Confirmação da deleção de uma região do MSC do vetor pBGRE.3.....	115
Figura 52: Árvore filogenética.....	119
Figura 53: Teste dos <i>primers</i> para qRT-PCR de genes de <i>P. stipitis</i>	122
Figura 54: RNA total de <i>P. stipitis</i> em diferentes condições de cultivo.....	123
Figura 55: Análise da expressão relativa dos gene da via metabólica de xilose de <i>P. stipitis</i> CBS5774 adaptada sob aeração em diferentes fontes de carbono por qRT-PCR.....	124
Figura 56: Análise da expressão relativa da linhagem CBS5774 adaptada sob aeração em diferentes fontes de carbono por qRT-PCR.....	125
Figura 57: Análise da expressão relativa do gene <i>XUT1</i> da linhagem CBS5774 adaptada sob aeração em diferentes fontes de carbono por qRT-PCR.....	126
Figura 58: Análise da expressão relativa dos gene XUTs da linhagem CBS5774 adaptada sob aeração em diferentes fontes de carbono por qRT-PCR.....	127
Figura 59: Perfil de restrição do vetor Y1HXT7.....	129
Figura 60: Perfil de restrição dos transformantes Y1PHXT7.....	130
Figura 61: Amplificação do gene <i>XUT1</i> de <i>P. stipitis</i>	131

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	
1.1. Energia.....	1
1.2. Etanol.....	3
1.3. Biomassa.....	6
1.4. Processo de produção do etanol lignocelulósico.....	9
1.5. Principais microrganismos utilizados na produção de etanol.....	11
1.5.1. Bactérias.....	12
<i>Escherichia coli</i>	12
<i>Zymomonas mobilis</i>	12
1.5.2. Leveduras.....	14
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	14
<i>Pichia stipitis</i> (<i>Scheffersomyces stipitis</i>).....	17
1.6. Metabolismo de xilose.....	19
1.7. Produção de álcool lignocelulósico.....	21
2. OBJETIVO	
2.1. Geral.....	23
2.2. Específico.....	23
3. MATERIAL E MÉTODOS	
3.1. Considerações gerais.....	24
3.2. Linhagens.....	24
3.2.1 <i>E. coli</i>	25
3.2.2 <i>P. stipitis</i>	25
3.2.3 <i>S. cerevisiae</i>	26
3.3. Meios de cultura.....	26
3.4. Estoque das linhagens.....	27
3.5. Soluções.....	27
3.6. Marcadores de DNA.....	27
3.7. Enzimas de restrição.....	28
3.8. Oligonucleotídeos.....	28
3.9. Vetores.....	32
3.10. Sequenciamento.....	32
3.11. Ferramentas de bioinformática e sites.....	32
3.12. Análise de RNA e DNA por eletroforese.....	33

3.13. Extração de DNA total de levedura	34
3.14. Condição de cultivo da levedura <i>P. stipitis</i> para qRT-PCR.....	34
3.15. Extração de RNA total de <i>P. stipitis</i>	35
3.16. Obtenção de cDNA.....	35
3.17. Real Time PCR (qRT-PCR) – SYBR green.....	35
3.18. PCR.....	36
3.19. PCR de colônia.....	37
3.20. Adição de dATP ao produto de PCR.....	38
3.21. Purificação do produto de PCR e de Fragmento de DNA de gel de agarose..	38
3.22. Defosforilação do vetor linear.....	39
3.23. Ligaçã dos fragmentos de DNA.....	39
3.24. Transformação de células de <i>E. coli</i>	
3.24.1 Choque térmico com cloreto de rubídio.....	39
3.25. Purificação de DNA plasmidial.....	
3.25.1. Mini-preparação de plasmídios por lise alcalina.....	40
3.25.2. Midi-preparação de plasmídios.....	41
3.26. Esporulação de leveduras.....	41
3.27. Dissecção de tétrades.....	41
3.28. Citometria de fluxo.....	42
3.29. Análise de MIC	42
3.30. Transformação de levedura em fase estacionária.....	43
3.31. Eletroporação de levedura.....	43
3.32. Transformação de alta eficiência de levedura.....	44
3.33. Excisão da marca de seleção.....	45
3.34. Detecção de fluorescência.....	46
3.35. Adaptação metabólica.....	46
3.36. Cultivo anaeróbico.....	46
3.37. Análise dos produtos de fermentação por HPLC.....	47
3.38. Extrato proteico.....	47
3.39. Curva padrão de NADH.....	48
3.40. Ensaio de atividade para xilose isomerase.....	48
3.41. Quantificação de proteína.....	49
4. ESTRATÉGIA.....	50
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	51
5.1. CAPÍTULO 1: Leveduras Industriais.....	52
5.1.1. Determinação de ploidia.....	57

Teste de esporulação.....	57
Determinação do <i>mating type</i>	58
Citometria de fluxo.....	58
5.1.2. Determinação do ciclo de vida.....	60
5.1.3. Estudo das marcas dominantes em linhagem industrial.....	62
Concentração mínima inibitória para <i>S. cerevisiae</i>	62
▲ PFP.....	62
▲ Canavanina.....	64
▲ Higromicina.....	65
▲ Zeocina.....	66
▲ G418 (geneticina)	67
Construção do vetor episomal com a marca de resistência a zeocina.....	68
Deteção do plasmídeo nativo 2 micron (2 μ).....	70
Transformação da linhagem JP1 com vetores contendo marca de seleção dominante	71
5.1.4. Obtenção de uma linhagem JP1 auxotrófica para uracila.....	73
5.2. CAPÍTULO 2: Levedura Recombinante Capaz de Fermentar Xilose.....	84
5.2.1. Expressão da XI	88
Síntese do cassete de xilose isomerase sintético.....	88
Preparo dos cassetes de integração.....	89
Clonagem da xilose isomerase em vetor episomal.....	93
Análise da atividade da xilose isomerase.....	95
5.2.2. Cassete de expressão de xiluloquinase.....	96
Subclonagem da xilose isomerase em vetor episomal.....	96
Clonagem da xiluloquinase no vetor episomal pYXI β	98
5.2.3. Obtenção da levedura recombinante para XI e XK.....	103
5.2.4. Adaptação Metabólica.....	105
5.2.5. Análise do metabolismo de xilose.....	106
5.2.6. Fermentação.....	108
5.2.7. Deleção do <i>GRE3</i>	112
Construção do cassete de deleção.....	112
5.3. CAPÍTULO 3: Análise da Expressão de Genes Envolvidos no Metabolismo de Xilose em <i>P. stipitis</i>	
5.3.1. <i>Pichia stipitis</i>	116
5.3.2. Transporte de xilose.....	117
5.3.3. Análise da Expressão Diferencial de <i>P. stipitis</i>	120
Desenho dos primers.....	120

Teste dos primers.....	121
Análise de expressão diferencial.....	122
▲ Genes envolvidos no metabolismo de xilose.....	123
▲ Genes envolvidos no transporte de xilose.....	125
5.3.4. Obtenção dos Transportadores.....	128
Gene HXT7 de <i>S. cerevisiae</i>	128
Gene XUT1 de <i>P. stipitis</i>	130
▲ Construção do vetor Y1pHXT7.....	130
▲ Gene <i>XUT1</i>	131
6. CONCLUSÃO.....	132
7. PERSPECTIVAS.....	135
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	136
9. SUPLEMENTOS.....	
Suplemento 1: Sequenciamento pVURA clone 1.....	157
Suplemento 2: Artigo submetido e aceito.....	158
Suplemento 3: Alinhamento dos cDNA referentes aos genes <i>SUT</i> de <i>P. stipitis</i>	159
Suplemento 4: Alinhamento dos cDNA referentes aos genes <i>XUT</i> de <i>P. stipitis</i>	162
10. ANEXOS.....	
ANEXO A: Padrão dos marcadores de massa molecular usados.....	169
ANEXO B: Vetores de clonagem.....	171
ANEXO C: Vetores série pYC de <i>S. cerevisiae</i>	173
ANEXO D: Vetores epissomais para <i>S. cerevisiae</i>	175
ANEXO E: Vetores centroméricos de <i>S. cerevisiae</i>	176
ANEXO F: Vetor replicativo de <i>S. cerevisiae</i>	177
ANEXO G: Vetor de <i>P. pastoris</i>	178

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 Energia

A energia é considerada a força motriz da economia das nações e os combustíveis fósseis respondem por cerca de 80% do consumo mundial de energia, sendo que o petróleo tem uma participação de destaque, respondendo por 37% do suprimento energético mundial (US *Energy Information Administration's* 2006) e 36,7% do suprimento nacional (Desplechin, 2008; Goldemberg *et al.*, 2008). Para atender as necessidades da humanidade, são produzidos por ano 37×10^{19} J de energia, que corresponde a 170 milhões de barris de óleo por dia. (Chow *et al.*, 2003; Weisz, 2004; Somerville, 2007).

O petróleo é uma fonte não-renovável de energia. Segundo relatórios de estatísticas sobre Energia Mundial da *British Petroleum*, as atuais reservas durarão cerca de 45 anos — se a razão reserva/consumo não se alterar — o que levará a um desequilíbrio entre oferta e consumo. De fato, a escassez das reservas de petróleo e a instabilidade política da região do Golfo Pérsico afetam a economia global desde os anos 70 (Somerville, 2007; Vertes *et al.*, 2008).

Outra importante questão está relacionada com o aquecimento global gerado pela emissão de gases resultantes da queima dos combustíveis fósseis. Nos países em desenvolvimento os setores que mais consomem energia são: residencial, industrial e transporte. O perfil muda nos países desenvolvidos onde o setor que mais consome energia é o setor de transporte, seguido do industrial e residencial (Figura 1). O consumo per capita de barril de petróleo nos países desenvolvidos é aproximadamente 6,5 vezes maior. Além disso, estima-se que entre 2006 – 2030 80% do aumento dos combustíveis líquidos serão atribuídos ao setor de transporte (*Energy Information Administration*, 2009). Isso coloca o setor de transporte num lugar de destaque quanto ao consumo de energia (Chow *et al.*, 2003). No Brasil, segundo o Instituto de Eletrotécnica e Energia/USP, 14% do setor de transportes contribuem para o efeito estufa (Tabela 1).

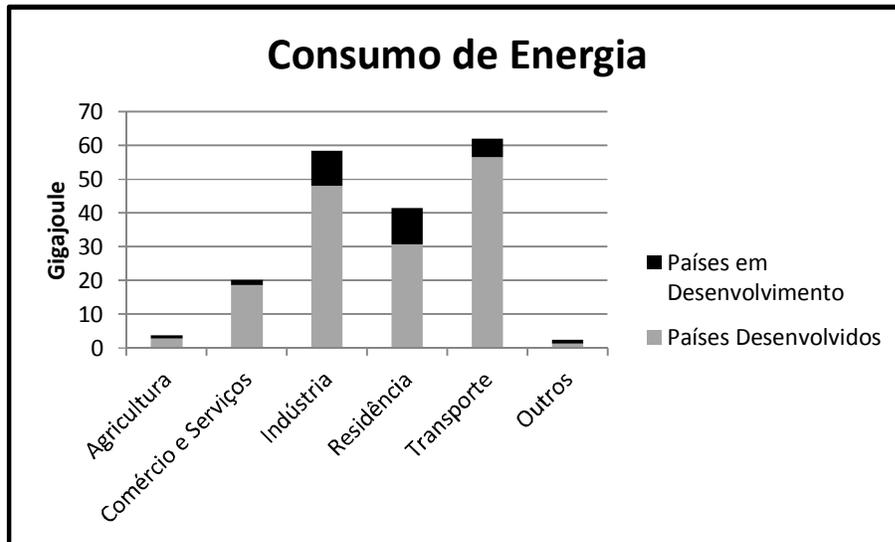
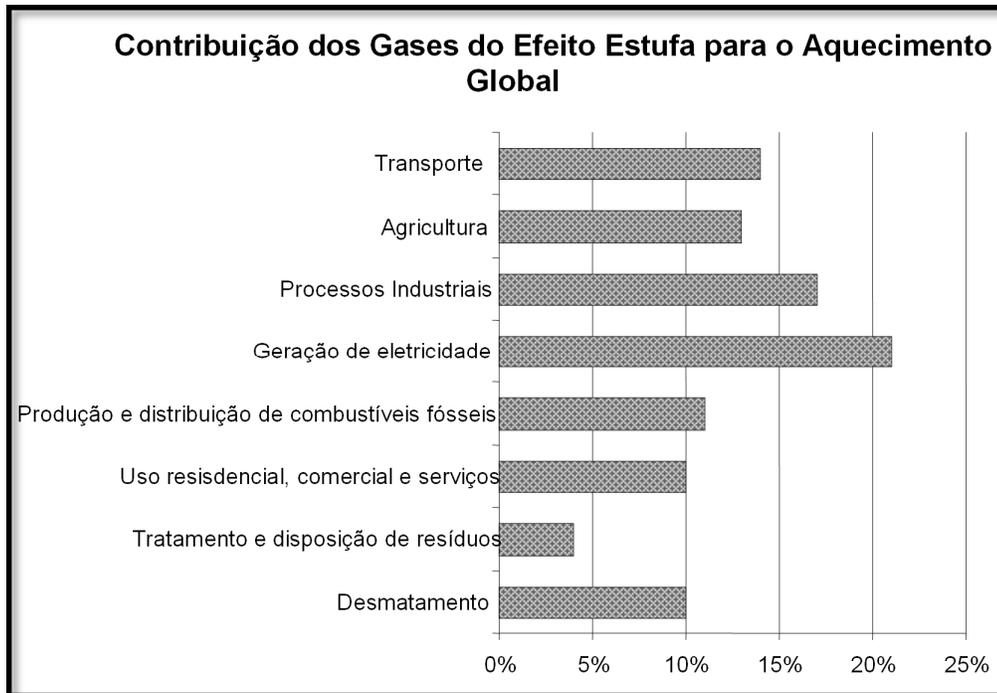


Figura 1: Consumo de energia per capita por setor. (Adaptado de Chow *et al.*, 2003)

Tabela 1: Contribuição dos gases do efeito estufa de diferentes setores da economia do Brasil para o aquecimento global em 2000. Tabela adaptada de Goldemberg (2007).



Na tentativa de reduzir o efeito estufa, vários países assinaram em 1997 o Protocolo de Quioto no qual os países industrializados se comprometeram a reduzir a emissão de gases que promovem o efeito estufa no período de 2008 a 2012 para atingir a meta de redução global equivalente a 5,2% em relação aos valores do ano de 1990. Além disso, foi criado um mecanismo de flexibilização para os países em

desenvolvimentos ajudarem a atingir essa meta de redução global. Esse mecanismo prevê que a redução da emissão de gases do efeito estufa obtida nos países em desenvolvimento seja convertida em créditos de carbono para serem descontadas das metas dos países industrializados na forma de comércio (Cerdeira, 2007; Pereira Jr. *et al.*, 2008). Dentre as ações adotadas para atender as exigências deste protocolo está a utilização de fontes renováveis de energia e a preservação de florestas. Segundo a Agência Internacional de Energia, apenas 10% da energia usada é proveniente dos biocombustíveis (Somerville, 2007).

Devido a todos estes fatores o mundo vem buscando fontes alternativas de energia que sejam sustentáveis. Um produto sustentável é aquele que atende aos seguintes requisitos: “deve ser ambientalmente adequado, socialmente justo e economicamente viável” (Jank & Nappo, 2009). Em vista disto, a biotecnologia tem sido largamente considerada para o desenvolvimento dos biocombustíveis, tais como: hidrogênio, biodiesel, biogás, metanol, butanol e etanol (Wackett, 2008b). Dentre os combustíveis alternativos, o etanol é o mais promissor em curto prazo, pois além de ser sustentável possui uma tecnologia bem desenvolvida.

1.2 Etanol

Após a crise do petróleo na década de 70, vários países se lançaram em projetos de busca por uma fonte alternativa de energia que fosse sustentável. Dentre as possibilidades consideradas, estava o bioetanol que, além de ser uma fonte energética renovável, pode reduzir em até 80% as emissões de CO₂ quando comparado à gasolina (Guandalini & Silva, 2006). Os EUA e a China desenvolveram o processo para a produção do etanol a partir do milho, a Europa a partir da beterraba e trigo, e a Ásia e África a partir de mandioca (Zaldivar *et al.*, 2001; Stein, 2007). No Brasil surge, em 1975, um programa de incentivo a produção de bioetanol a partir de cana de açúcar, o PROÁLCOOL. O álcool passou, então, a ser utilizado como combustível no País, tanto na sua forma hidratada como misturado à gasolina.

Atualmente, o Brasil possui uma tecnologia para produção de etanol a partir da sacarose bem desenvolvida, o que lhe confere o *status* de um dos líderes na

produção deste biocombustível (Savage *et al.*, 2008) perdendo apenas para os EUA com seu etanol derivado de milho. Entretanto em longo prazo, Marcos Jack, do ICONE (Instituto de Estudos do Comércio e Negociações Internacionais), afirma que a produção de etanol derivado do milho nos EUA não será economicamente viável (Salomão & Poloni, 2007), além de competir com a alimentação humana e animal (Weber *et al.*, 2010).

O etanol consumido no Brasil representa mais de 40% do total de gasolina utilizada (Somerville, 2007; Basso *et al.*, 2008; Jank & Nappo, 2009). Além disso, segundo dados do NIPE-UNICAMP (Núcleo Interdisciplinar de Planejamento Energético da Universidade de Campinas), nos últimos anos, o Brasil passou a exportar 15% do etanol produzido (Jank & Nappo, 2009) e controla mais de 75% do mercado de exportação mundial (Mabee, 2007). A Agência Norte-Americana de Proteção Ambiental (EPA) anunciou que o etanol de cana de açúcar reduz em 61% a emissão de GEE em relação à gasolina. Isso classifica o etanol brasileiro como biocombustível avançado. Aliado a isso, a deficiência da produção americana, levou este país a importar etanol nos últimos anos (US Congress, 2005; Taylor *et al.*, 2009; Peralta-Yahya & Keasling, 2010). Os fatos acima abrem boas perspectivas para exportação de etanol brasileiro para o mercado americano estimado em 15 a 40 bilhões de litros até 2022. (Castro, 2010). Outro fator a considerar é que, devido ao Protocolo de Quioto, vários países, entre eles o Japão, já consideram adicionar álcool à gasolina como uma forma de diminuir a emissão de gases poluentes (Jank & Nappo, 2009). Estudos mostram que 39 países criaram leis para desenvolver tecnologia de produção dos biocombustíveis. Dentre estes, 27 tornaram obrigatória a mistura de etanol à gasolina (Salomão & Poloni, 2007). Todavia, a atual produção brasileira não será suficiente para atender a esta futura demanda. Em 2007, foram produzidos 18 bilhões de litros de etanol (Goldemberg, 2008). Sendo o consumo mundial de etanol de 54 bilhões de litros (França, 2008). Segundo as projeções do *National Energy Information Center* (NEIC), no ano de 2025, a demanda por gasolina será de 1,7 trilhão de litros; se houver uma substituição de 10% por etanol, será necessária uma produção de 204 bilhões de litros. A atual produção brasileira representa aproximadamente 9% desta demanda. Haveria a necessidade de aumentar a área de cultivo de cana de açúcar, avançando em áreas de preservação, ou substituindo outros cultivos. Ambas as alternativas são prejudiciais, pois o

carbono liberado no desmatamento somado ao carbono liberado no crescimento da cana de açúcar, refino e a queima do combustível, levaria um maior tempo para começar a diminuição do efeito estufa e até mesmo aumentando a emissão de GEE. A mudança de cultivo levaria a uma diminuição da oferta de alimento, acarretando aumento do preço e diminuindo o acesso a alimentos como grãos e carne pela população mais carente (Fargione *et al.*, 2008; Searchinger *et al.*, 2008). Portanto, sob este ponto de vista, o etanol de 1ª geração não é considerado sustentável (Moore, 2008).

Em virtude dos fatos acima relatados, há uma crescente corrida no mundo para o desenvolvimento de tecnologias de baixo custo para a produção de bicomcombustíveis de 2ª geração, aqueles que não afetam a produção de alimentos. O comitê industrial do parlamento europeu propôs que, até 2020, 10% dos combustíveis fossem de fontes renováveis, sendo que, pelo menos 4% sejam de 2ª geração. Atualmente, essa fonte representa 3% dos combustíveis consumidos na Europa (The European Parliament and the Council of the European Union, 2003; Williams, 2008). Os EUA, por meio do ato político de energia de 2005, propuseram o uso de 7,5 bilhões de galões de etanol até 2012 e, em 2007, uma nova meta foi proposta de 36 bilhões de galões de etanol até 2025, sendo 16 bilhões de etanol celulósico.

O Brasil encontra-se numa posição privilegiada para a produção de etanol de 2ª geração, pois tem uma extensa área de cultivo, principalmente de cana de açúcar, utilizada na indústria do álcool. Segundo dados do Ministério da Agricultura, o País produziu na safra de 2009 cerca de 600 milhões de toneladas de cana de açúcar gerando mais de 200 milhões de toneladas de resíduos agrícolas (bagaço e palha) que são geralmente queimados para cogeração de energia elétrica. Uma tonelada de bagaço com 50% de umidade contém $2,85 \times 10^9$ J de energia (sem levar em consideração a palha) (Reynol, 2010). Só o bagaço corresponde a 55% da energia acumulada numa plantação de cana de açúcar. Estes resíduos (bagaço, folhas e palha) que representam 2/3 da biomassa, podem ser utilizados para a produção de etanol pela chamada “rota bioquímica” após tratamento adequado. Para se ter uma ideia do potencial, se a energia representada por estes rejeitos agrícolas fosse plenamente aproveitada, o País dobraria a produção de etanol sem aumentar a área

plantada. Na queima do bagaço de cana, 35% da energia armazenada na planta podem ser convertidas em eletricidade - se fosse convertido em biocombustível, o aproveitamento seria de 50% (Pereira Jr., *et al.*, 2008; Somerville, 2007; Soccol *et al.*, 2010). O uso da biomassa contribuiria também para a produção de etanol no período de entressafra da cana de açúcar que não pode ser estocada. Além disso, o material lignocelulósico coletado e com certo preparo apresenta um custo de 1€/GJ. Nos países industrializados o custo médio da biomassa nas mesmas condições esta entre 2-3 €/GJ (Macedo, 2007). Esse fator é importante, pois 70% do custo de produção do etanol correspondem a matéria-prima (Soccol *et al.*, 2010). Com o desenvolvimento genético da cana de açúcar aliado ao desenvolvimento de tecnologia para a produção de etanol a partir da biomassa a produção brasileira que é de 7×10^3 L/ha passaria para 13×10^3 L/ha (Jank & Nappo, 2009). O Brasil possui uma vantagem para desenvolver esta tecnologia, pois as unidades para essa produção podem ser montadas próximas as usinas sucroalcooleiras, aproveitando a infraestrutura, a logística e o baixo custo da distribuição da matéria-prima.

Outro aspecto a ser relatado é quanto à distribuição da produção no planeta. A energia oriunda dos combustíveis fósseis, que abastece mais de 200 países esta concentrada em 20 países de uma região conturbada politicamente. Com relação à energia renovável, mais de 100 países tem potencial como fornecedores, gerando milhões de empregos e gerando renda em um grande número de países em desenvolvimento, principalmente na área rural (Jank & Nappo, 2009).

1.3 Biomassa

O potencial bioenergético da biomassa vegetal do planeta é alto, pois da incidência de radiação solar de $1,78 \times 10^{17}$ J sobre a Terra, 0,1% são usados nos processos de fotossíntese. Essa energia seria suficiente para produzir $1,14 \times 10^{11}$ t de biomassa vegetal que corresponde a $1,97 \times 10^{21}$ J de energia (314 trilhões de barris de petróleo) (Bioetanol, 2008). Sabe-se que a produção mundial estimada de resíduos agrícolas é de $3,8 \times 10^9$ t (Lal, 2008). Entretanto, apenas uma parte (40-50%) dos rejeitos agrícolas pode ser utilizada para a produção de energia, pois a outra parte tem que retornar ao solo para seu enriquecimento, evitar erosão, reter

água e reciclar os nutrientes, melhorando a estrutura e estabilidade do solo e, com isso, aumentar a produtividade do cultivo (Lal, 2005). O suprimento mundial de biomassa pode fornecer de 34 a 160 bilhões de barris de petróleo por ano, sendo o consumo mundial atual de 30 bilhões de barris (Huber & Dale, 2009). Os resíduos agrícolas têm uma distribuição geográfica global mais uniforme, possuem um menor custo, geram menos liberação de gases que promovem o efeito estufa - responsável pelo aquecimento global - geram mais emprego e revitalizam a área rural, além de diminuir o conflito da terra entre produzir alimento e produzir energia. Segundo estudos realizados pelo Departamento de Agricultura e Energia dos EUA, $1,2 \times 10^9$ t de biomassa seca pode ser produzida sem afetar a biomassa destinada à alimentação humana, animal e exportação. E essa quantidade de biomassa pode fornecer $3,8 \times 10^{11}$ L de combustível/ano (Huber & Dale, 2009).

Os resíduos agrícolas são constituídos basicamente de material lignocelulósico, o conjunto de biopolímeros mais abundante do planeta (Lee *et al.*, 2008). A lignocelulose é formada por celulose (35-50%), hemicelulose (25-30%) e lignina (15-30%). Alguns resíduos possuem também pectina (2-20%) (Ragauskas *et al.*, 2006, para revisão ver van Maris *et al.*, 2006). A celulose é um homopolissacarídeo constituído basicamente de monômeros de glicose (hexose), unidos por ligação β -1-4, formando uma estrutura linear e plana de alta massa molecular, cristalina, forte e resistente à hidrólise. A hemicelulose é um heteropolissacarídeo de estrutura ramificada, randômica, amorfa, pouco forte, acessível à hidrólise, e de baixa massa molecular. É formada por polímeros de xilose (pentose) unidos por ligações β -1,4 com ramificações de L-arabinose, D-manose, D-galactose, D-glucose, D-ácido glucurônico, D-ácido galacturônico, α -D-4-O-ácido metilglucurônico (Aristidou & Penttilä, 2000; Zaldivar *et al.*, 2001; Pereira Jr. *et al.*, 2008; Wackett, 2008a). As pentoses mais importantes deste polímero são a xilose, o segundo açúcar mais abundante da biomassa (31% do peso seco total), e a arabinose (Aristidou & Penttilä, 2000; Jeffries & Jin, 2004; Ragauskas *et al.*, 2006; Somerville, 2007). As pectinas, encontradas em cascas de frutas cítricas, são heteropolímeros complexos, cuja principal unidade é a cadeia de ácido galacturônico, formado por ligações α -1,4, com ramificações de ramnogalacturonana e xilogalacturonana (para revisão ver van Maris *et al.*, 2006). A proporção exata de cada açúcar contido no material lignocelulósico depende da sua origem, ou seja, do

tipo de biomassa (Hayn *et al.*, 1993). Esse material pode ser dividido em seis grupos principais: resíduos agrícolas, madeira dura, madeira mole, resíduos de papel, biomassa herbácea e lixo sólido municipal (Cardona *et al.*, 2010).

No Brasil, o segundo maior produtor de cana de açúcar do mundo, o bagaço da cana de açúcar é um dos principais resíduos agrícolas gerados (CERPCH, 2011). As proporções dos polímeros constituintes são de aproximadamente 40-45% de celulose, 30-35% de hemicelulose e 20-30% de lignina sendo a composição dos principais açúcares em torno de 43% glicose e 24-32% xilose, dependendo do método empregado no pré-tratamento (Peters, 2007; Peng *et al.*, 2009). Além do alto teor de açúcar, o bagaço de cana de açúcar apresenta baixa quantidade de cinzas (1,9-2,3%), o que lhe traz vantagens em relação a outros resíduos agroindustriais (Cardona *et al.*, 2010; Sun *et al.*, 2004). Na lignina, não há açúcares; esta é formada por compostos fenólicos de difícil degradação, chegando a reter 50% mais carbono que a celulose. É responsável pela rigidez das plantas, constituindo o material de ligação das fibras de celulose. Pelo seu alto valor energético, a lignina pode ser desidratada e queimada gerando 29,54 MJ/kg, além de poder ser utilizada na produção de adesivo, concreto maleável, graxa, asfalto resistente e antioxidante, fibras de carbono, emulsificantes, dispersantes, sequestrante, surfactante, cola, aromatizante e como fragrâncias (Cardona & Sanchez, 2007; Pereira Jr. *et al.*, 2008). A produção de coprodutos aumenta o valor agregado da cana de açúcar, contribuindo para a viabilidade do etanol lignocelulósico.

Outra vantagem do bagaço é o seu custo baixo, pois o replantio da cana ocorre após aproximadamente 7 colheitas, se adapta a solos de baixa produtividade e ao clima de várias regiões do Brasil (Buckeridge *et al.*, 2010 *apud* Amorim *et al.*, 2011, Amorim *et al.*, 2011). Se 50% do bagaço fossem usados na produção de etanol o rendimento de etanol gerado reduziria o uso da terra em 33-38%. (Hahn-Hägerdal *et al.*, 2006; Galbe *et al.*, 2007; Alvira *et al.*, 2010). Além do bagaço de cana de açúcar, outra boa fonte de resíduos lignocelulósico seria a indústria de madeira. O Brasil produz eucalipto com alto valor calorífero; o valor do fator de conversão energética deste material pode chegar a 16, enquanto o etanol de caldo de cana é de 8, e o etanol de milho é de 1-1,5 (Fenning *et al.*, 2008).

O etanol de celulose pode gerar 75% menos CO₂ que o petróleo, não compete com alimento, usa menos terra. O uso de resíduos pode reduzir o custo do processo, quando comparado ao uso de um cultivar próprio, pois este último requer um investimento no cultivo, no uso de fertilizantes e na colheita (Galbe *et al.*, 2007; Antizar-Ladislao & Turrion-Gomez, 2008). Entretanto, para a viabilidade da produção de etanol de 2^a geração é essencial o aproveitamento das pentoses existentes na biomassa (Weber *et al.*, 2010). O desenvolvimento do processo de aproveitamento dos açúcares contidos na biomassa pode gerar 52% de energia contida neste material ao invés dos 35% atuais (Macedo, 2007).

1.4 Processo de produção do etanol lignocelulósico

Para a produção de etanol de 2^a geração, o material lignocelulósico precisa passar por 5 etapas: pré-tratamento, sacarificação da celulose, fermentação, separação e tratamento do efluente. O pré-tratamento permite a desestruturação da lignocelulose. Nesse processo ocorre a liberação da lignina, a hidrólise parcial ou total da hemicelulose e a transformação da celulose cristalina em celulose amorfa, facilitando a etapa posterior. O pré-tratamento pode ser um processo físico (trituração), físico-químico (explosão a vapor), químico (hidrólise ácida, ozonólise ou deslignificação oxidativa) ou biológico (uso de microrganismo ou enzima). A sacarificação é a hidrólise do material celulósico liberando as hexoses. Esse processo pode ser químico (hidrólise ácida) ou enzimático (ação das celulasas). Tanto a pentose liberada no pré-tratamento quanto à hexose liberada na sacarificação são fermentadas a etanol por microrganismos. Depois de fermentado, o material é destilado para obtenção do etanol e os efluentes são tratados (Figura 2) (Cardona & Sanchez, 2007; Sun & Cheng, 2002).

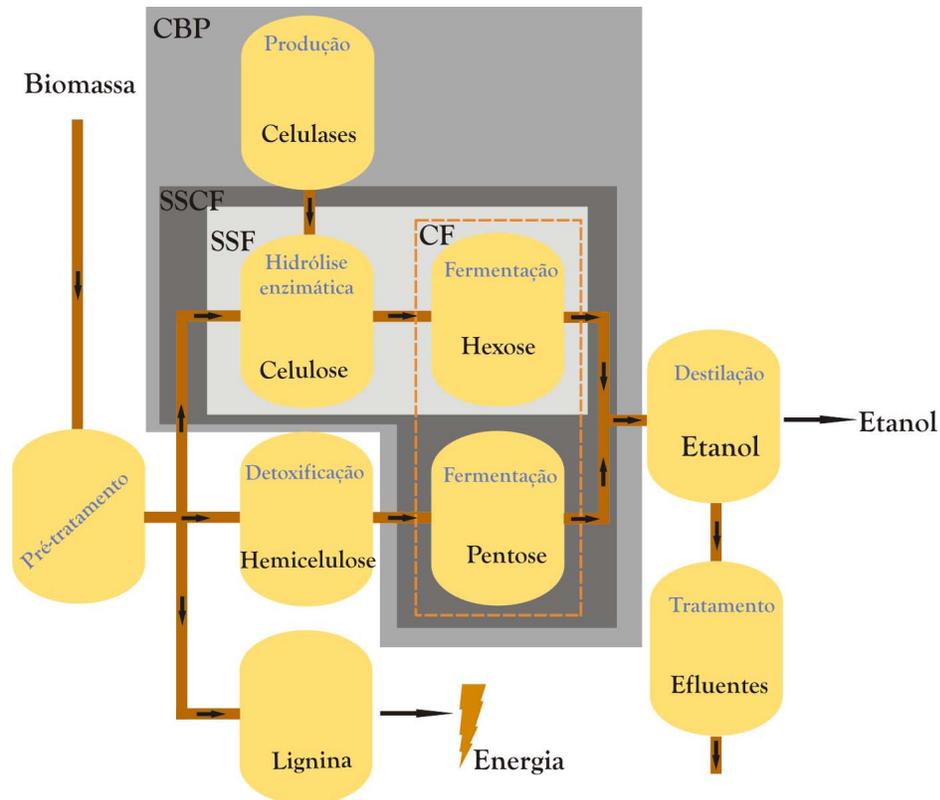


Figura 2: Esquema do processo de conversão de biomassa em etanol. CBP (*consolidated bioprocessing*), SSCF (*simultaneous saccharification and co-fermentation*), SSF (*simultaneous saccharification and fermentation*) e CF (*co-fermentation*).

Atualmente, o processo mais comum para a obtenção de álcool lignocelulósico é o **SHF** (*Separate Hydrolysis and Fermentation*), onde primeiro ocorre a sacarificação do material celulósico e, depois, a fermentação. Após o pré-tratamento, é gerada uma fração sólida, rica em celulose, e a fração líquida, composta por pentoses e inibidores resultantes do pré-tratamento (Figura 2). A fração líquida passa por uma detoxificação, pois os microrganismos são inibidos pelos compostos resultantes do pré-tratamento. Como hoje ainda não existe um microrganismo capaz de fermentar de forma eficiente tanto hexose quanto pentose, faz-se a fermentação das pentoses separadamente. A fração sólida passa pelo processo de sacarificação pela hidrólise enzimática da celulose, gerando monômeros de glicose, podendo ser então fermentada (Olsson & Hahn-Hägerdal, 1996).

Para reduzir custos, o ideal seria otimizar o processo por meio de reações integradas (Figura 2). Existem algumas formas de processo integrado. No **SSF** (*Simultaneous Saccharification and Fermentation*) a hidrólise da celulose e a fermentação ocorrem no mesmo reator e praticamente ao mesmo tempo. Esse processo reduziria o capital investido em 20% (Wingren *et al.*, 2003). O **SSF** não é largamente utilizado, pois as condições de temperatura e pH para a atividade ótima das celulasas são diferentes das condições de cultivo do microrganismo mais utilizado nesse processo, a levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Outro processo é o **CF** (*Co-Fermentation*), ou seja, a fermentação simultânea de hexoses e pentoses. Esse processo pode ser feito por uma cultura mista contendo um microrganismo capaz de fermentar hexose e outro capaz de fermentar xilose, mas normalmente os microrganismos que assimilam hexose crescem mais rápido do que aqueles que assimilam xilose. Outra opção é utilizar um único microrganismo que fermente os dois açúcares de forma eficiente. O processo bastante eficiente é o **SSCF** (*Simultaneous Saccharification and Co-Fermentation*), a união dos dois processos anteriores. Contudo, o processo ideal é o **CBP** (*Consolidated Bioprocessing*) no qual um único microrganismo produz as celulasas e fermenta todos os açúcares presentes no hidrolisado (Cardona & Sanchez, 2007; Pereira Jr. *et al.*, 2008).

1.5 Principais microrganismos utilizados na produção de etanol.

As características ideais para a fermentação de resíduos lignocelulósicos é que ela seja rápida e com um alto rendimento (mais que 90% do valor teórico) e produtividade (mais que $1 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$) de etanol. O microrganismo fermentador deve ser tolerante a etanol, a altas concentrações de açúcar, ao baixo pH, a altas temperaturas e aos produtos resultantes do pré-tratamento, como furfural e hidroximetilfurfural. Deve, ainda, ser resistente a contaminação por outros microrganismos; degradar os componentes lignocelulósicos e utilizar todos os açúcares disponíveis (hexoses e pentoses), de preferência simultaneamente; gerar o menor nível de subprodutos e ser geneticamente estável (Fischer *et al.*, 2008; Walker, 1999; Weber *et al.*, 2010; Dien *et al.*, 2003).

1.5.1 Bactérias

Há bactérias que são capazes de metabolizar pentoses. Entretanto, esses microrganismos normalmente apresentam um baixo rendimento de etanol, baixa tolerância a concentrações de etanol, açúcar e pH, além de gerar vários subprodutos, reduzindo o rendimento da produção de etanol (para revisão ver Hahn-Hägerdal *et al.*, 2007). Bactérias homoacetogênica estão sendo consideradas para uso, pois fermentam tanto hexoses como pentoses gerando ácido acético. Posteriormente este passaria por um processo de esterificação e hidrogenação formando etanol. Nesse processo, 1 mol de hexose geraria 3 moles de etanol (Eggeman & Verser, 2006). Entretanto, as bactérias mais estudadas para o fim de produção de etanol são a *Escherichia coli* e *Zymomonas mobilis*.

Escherichia coli

A bactéria *E. coli* é capaz de usar uma variedade de fontes de substrato para produzir etanol, dentre os quais glicose e xilose. É um organismo de crescimento rápido tanto em condições aeróbicas quanto anaeróbicas. Contudo seu cultivo não permite variações de pH além do neutro, nem concentrações de sal e nem temperatura. Apresenta um baixo rendimento, pois em condições fermentativas gera vários subprodutos como: ácido lático, ácido acético, ácido fórmico e ácido succínico; não cofermenta os açúcares, pois apresenta o mecanismo de repressão catabólica por carbono (CCR – *Carbon Catabolite Repression*) (Dellomonaco *et al.*, 2010) e apresenta uma baixa tolerância a etanol, produto da fermentação (Weber *et al.*, 2010). Outra desvantagem é a massa celular gerada, pois ela não pode ser usada na alimentação animal, visto não ser bem aceita pela população.

Zymomonas mobilis

Z. mobilis é uma bactéria gram-negativa anaeróbica, tolera altos níveis de etanol ($> 120 \text{ g L}^{-1}$), possuindo crescimento e processo fermentativo rápidos. Utiliza a via Entner-Doudoroff (ED) na produção de etanol a partir de glicose, onde um mol de glicose é convertido a 2 moles de etanol (Figura 3). Essa reação gera 1 mol de ATP, com isso há uma redução da sua biomassa, direcionando o carbono para a produção de etanol. Seu rendimento pode chegar a 97% do valor teórico. Quando os níveis de ATP são baixos, o fluxo glicolítico é alto, resultando numa produtividade de

3 a 5 vezes maior que *S. cerevisiae*. Todavia, esse organismo não a substitui por várias razões. *Z. mobilis* metaboliza apenas 3 açúcares: glicose, frutose e sacarose, devido a sua deficiência em enzimas da via glicolítica e da PPP (via das pentose fosfato). Além disso, é deficiente em enzimas para síntese de vitaminas, necessitando de suplementação durante a fermentação. Apenas a glicose oferece um alto rendimento na produção de etanol. A fermentação contínua tende a ser oscilatória, o que pode provocar uma queda no rendimento de etanol. *Z. mobilis* recombinante para metabolismo de pentoses não faz cofermentação. Há uma preferência pelo uso da glicose e posteriormente outros açúcares. Contudo, o principal motivo de *Z. mobilis* não ser utilizada para a produção de etanol é o fato da biomassa celular não ser aceita para utilização em ração animal, apesar de possuir status GRAS. Além disso, ela é sensível a ácido acético, encontrado no hidrolisado lignocelulósico (Bai *et al.*, 2008; Jeffries, 2005; Aristidou & Penttilä, 2000; Weber *et al.*, 2010).

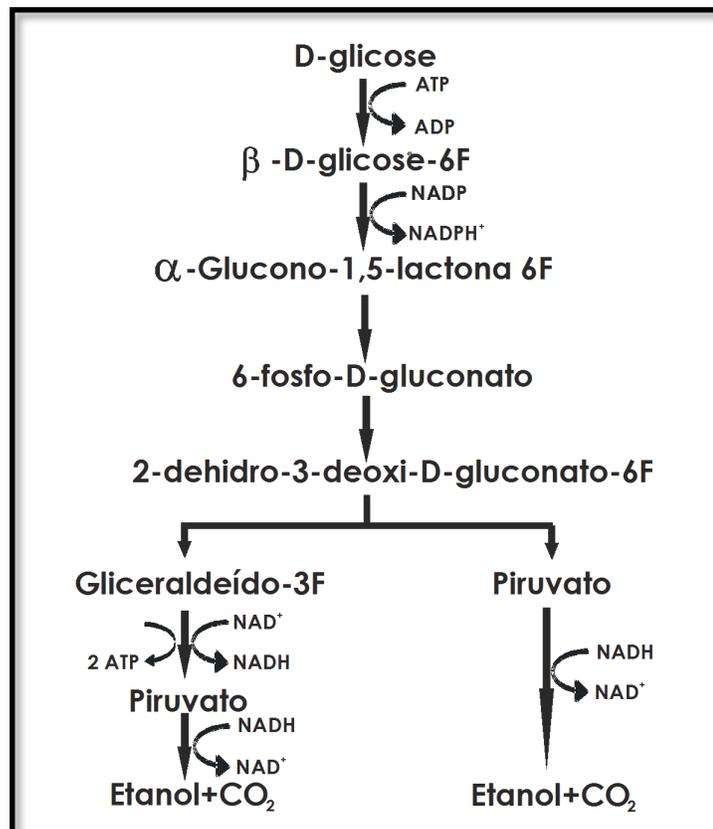


Figura 3: Via Entner-Doudoroff (ED) em *Z. mobilis*. Adaptado de Jeffries (2005).

1.5.2 Leveduras

Dentre as leveduras, a mais usada em processos fermentativos é a *Saccharomyces cerevisiae*, por ser uma excelente produtora e bem tolerante a etanol. Entretanto ela não metaboliza pentoses. Há leveduras que são naturalmente fermentadores de xilose: *Pichia stipitis* (*Scheffersomyces stipitis*), *Pichia segobiensis*, *Candida tenuis*, *Candida shehatae* e *Pacchysolen tannophilus* (Hahn-Hägerdal *et al.*, 2007; Toivola *et al.*, 1984). Alguns microrganismos fermentam a xilose sob condições aeróbicas, outros sob condições limitantes de oxigênio, mas a taxa de produção de etanol é baixa quando comparado à fermentação alcoólica a partir da glicose (Pereira Jr. *et al.*, 2008). Outras apenas assimilam a xilose, mas não a fermentam anaerobicamente, como *Candida utilis* (Tomoyeda & Horitsu, 1966; Bruinenberg, *et al.*, 1984).

Saccharomyces cerevisiae

A levedura *S. cerevisiae* é uma excelente fermentadora de etanol, chegando a uma concentração final de 10-12% em 48-72 horas, além de ser tolerante ao seu produto de fermentação (mais de 15% de etanol). Tolerante bem pH baixo (pH 3-7). É um microrganismo que vem sendo empregado na indústria fermentativa há séculos, mostrando ser robusto e bem adaptado aos equipamentos industriais. Predomina sobre possíveis contaminantes em reatores abertos. Sua fisiologia é bem conhecida e as ferramentas genéticas para sua manipulação estão bem estabelecidas. Possui *status* GRAS e principalmente, é aceito pela população, podendo o subproduto da fermentação (células) ser utilizado na alimentação animal. A taxa de conversão de glicose chega a ser de até 95% do valor teórico máximo (0,51 g g⁻¹ de substrato); pois em torno de 6% da glicose disponível são destinadas ao seu crescimento e manutenção das funções vegetativas (Basso *et al.*, 2008). Além disso, possui um metabolismo em cultivo de batelada respiro-fermentativo (Jeffries, 2006). Nos processos de fermentação alcoólica utilizados no Brasil a maior parte das leveduras usadas (> 90%) é reciclada, o que permite começar um novo processo com alta densidade celular reduzindo, assim, o tempo de fermentação (Basso *et al.*, 2008).

Entretanto, uma das grandes desvantagens de *S. cerevisiae* é a sua incapacidade de metabolizar pentoses, apesar de possuir genes que codifiquem

para xilose redutase - XR (YHR104w/*GRE3*); xilitol desidrogenase - XDH (YLR070c) e xiluloquinase - XK (*XKS1*) em seu genoma, sua expressão é muito baixa. Mas é capaz de metabolizar xilulose (Hahn-Hägerdal *et al.*, 1994; Matsushika *et al.*, 2009). Esta levedura também não é capaz de cofermentar dois açúcares, pois na presença de glicose o metabolismo dos outros açúcares é reprimida pela ação de fatores transcricionais, entre eles Mig1 (Olsson & Nielsen, 2000)

A via metabólica que *S. cerevisiae* utiliza para a produção de etanol a partir da glicose, sacarose, frutose, maltose e manose é a glicólise Embden-Meyerhof-Parnas (EMP), onde 1 mol de glicose gera 2 moles de piruvato, além de 2 moles de ATP (Figura 4). O piruvato é reduzido a etanol liberando CO₂, com um rendimento de 0,51 g de etanol e 0,49 g de CO₂. O ATP gerado é utilizado pela levedura em atividades de biossíntese, permitindo que a levedura fermente ao mesmo tempo em que cresce. Sem o crescimento a produção de etanol cessa, pois o acúmulo de ATP inibe a fosfofrutoquinase (PFK), uma das principais enzimas reguladoras da glicólise (Bai *et al.*, 2008).

A fermentação da glicose em etanol ocorre em 3 fases: fase de ativação, que corresponde à conversão da glicose a frutose 1,6-bifosfato com consumo de 2 moléculas de ATP; fase de geração de ATP, onde a frutose 1,6-bifosfato é convertida a piruvato gerando 4 moléculas de ATP; fase de regeneração do NAD⁺, que é a etapa de fermentação, corresponde a conversão do piruvato a etanol e CO₂ (Figura 4). Sob a baixa concentração de oxigênio, sem essa última etapa, as reações metabólicas cessariam, pois na etapa anterior ocorre a redução de 2 moléculas de NAD⁺ (Bai *et al.*, 2008; Pereira Jr. *et al.*, 2008), necessárias na via glicolítica.

No processo de respiração celular que ocorre em aerobiose/glicose limitante, o ATP é produzido pelo microrganismo tanto a nível de substrato quanto por meio da fosforilação oxidativa (van den Brink *et al.*, 2008). Já a fermentação ocorre em resposta a duas condições: anaerobiose (baixa concentração de O₂) e altas concentrações de glicose (acima de 0,15 g L⁻¹), mesmo na presença de O₂ (efeito Crabtree) sendo a concentração de glicose o fator primário no controle da fermentação (Verduyn *et al.*, 1984; Otterstedt *et al.*, 2004). Na presença de glicose o

crescimento celular é rápido e a glicose entra no processo fermentativo associado a uma repressão dos genes envolvidos na respiração celular (Bravim & Fernandes 2009). Em anaerobiose, a atividade da via glicolítica aumenta em até 8 vezes. Com a baixa concentração de O_2 o organismo não gera ATP no ciclo do ácido cítrico, diminuindo também as atividades de biossíntese. Para compensar a baixa de ATP, necessário a manutenção celular, a atividade da via glicolítica aumenta (van den Brink *et al.*, 2008).

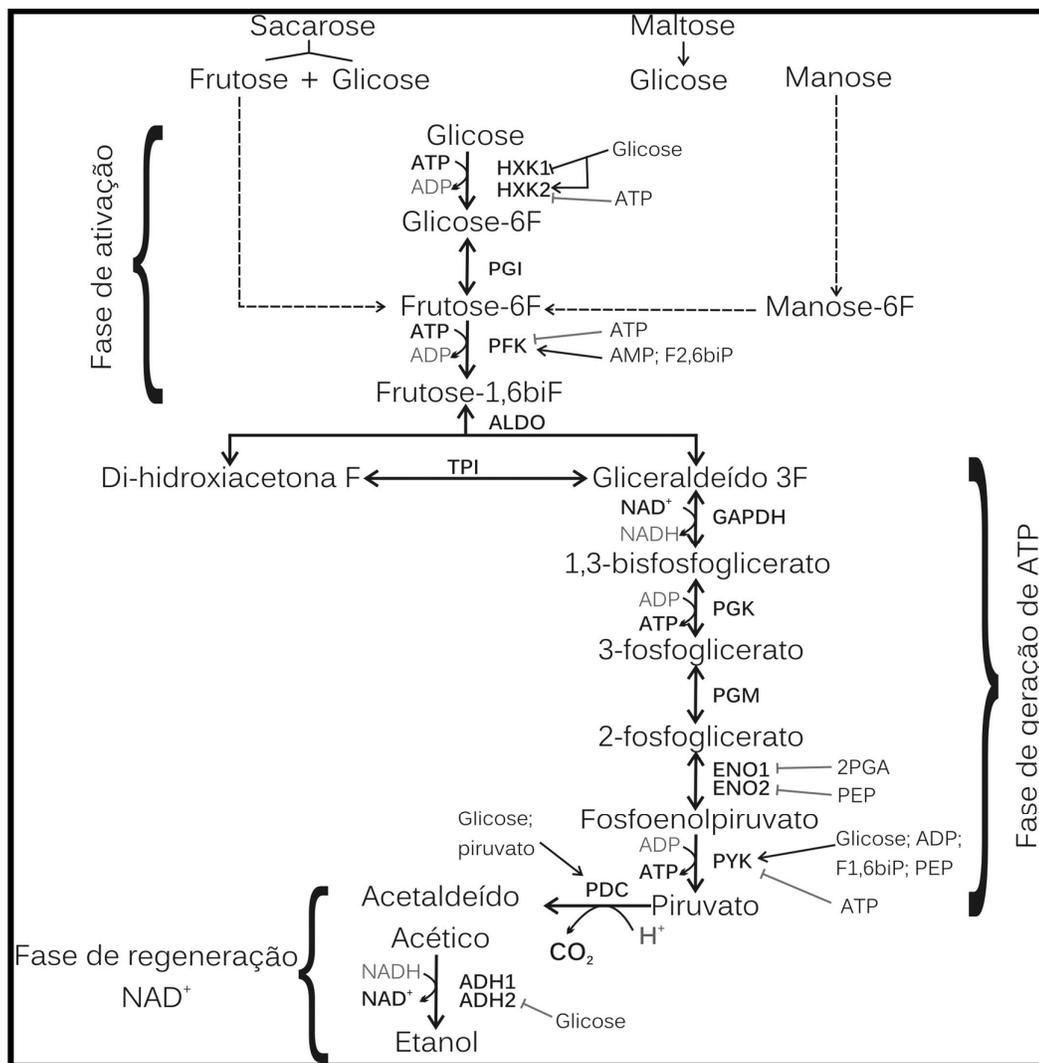


Figura 4: Regulação da via glicolítica EMP e da via fermentativa. A via glicolítica compreende a fase de ativação e fase de geração de ATP, a via fermentativa compreende a fase de regeneração de NAD^+ . As setas pontilhadas indicam a entrada de outros açúcares na via glicolítica. HXK – hexoquinase; PGI – fosfoglicose isomerase; PFK – fosfofruto quinase; ALDO – aldolase; TPI – triose fosfato isomerase; GAPDH – gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase; PGK – fosfoglicerato quinase; PGM – fosfoglicerato mutase; ENO – enolase; PYK – piruvato quinase; PDC – piruvato descarboxilase; ADH – álcool desidrogenase; F2,6biP – frutose 2,6 bifosfato; 2PGA – 2 fosfoglicerato; PEP – fosfoenolpiruvato; F1,6biP - frutose 1,6 bifosfato. Descrição da regulação no texto.

A regulação da glicólise (Figura 4) ocorre principalmente nos pontos de reação irreversível, sendo os principais reguladores o substrato (glicose) e o ATP. A alta concentração de glicose inibe a hexoquinase 1 e a glucoquinase 1 e ativa a hexoquinase 2, responsáveis pela fosforilação da glicose, enquanto o ATP reprime sua atividade. A terceira reação da via catalisada pela PFK é inibida pelo ATP e induzida pelo AMP e pela frutose 2,6 bifosfato. A concentração destes está em alta no processo fermentativo. A última reação irreversível, que converte fosfoenolpiruvato a piruvato, catalisada pela piruvato quinase é induzida pela glicose, ADP, frutose 1,6 bifosfato e pelo próprio substrato, fosfoenolpiruvato. A inibição ocorre pelo ATP e ácido cítrico. Outras enzimas que atuam na via tem uma expressão constitutiva com relação à fonte de carbono, mas sua expressão aumenta na presença de glicose, tais como: gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH), 3-fosfoglicerato quinase (PGK) fosfoglicerato mutase (GPM) e a enolase, apenas na isoenzima Eno2. A isoenzima Eno2 é inibida pelo fosfoenolpiruvato e a Eno1 pelo 2-fosfoglicerato. A PGK também sofre regulação pelo seu cofator (para revisão ver Kruckeberg & Dickinson, 2004; van den Brink *et al.*, 2008).

Na fase fermentativa o piruvato é convertido a acetaldeído com liberação de CO₂. Esta reação irreversível é catalisada pela piruvato descarboxilase (PDC), sendo ativada pelo próprio substrato quanto pela glicose. A conversão do acetaldeído a etanol ocorre pela ação da álcool desidrogenase, com formação de NAD⁺. Apesar de existirem mais de 20 isoenzimas, apenas duas são bem conhecidas: álcool desidrogenase 1 (Adh1), regulada pelo seu cofator (NADH/NAD⁺) e Adh2, reprimida por glicose (Figura 4) (para revisão ver Kruckeberg & Dickinson, 2004; van den Brink *et al.*, 2008).

Pichia stipitis (Scheffersomyces stipitis)

A levedura *P. stipitis*, agora denominada *Scheffersomyces stipitis*, é considerada uma das melhores leveduras fermentadoras de xilose - sua produtividade específica de etanol pode chegar a 0,51 g g⁻¹ h⁻¹, com um rendimento de 0,50 g g⁻¹. Entretanto, quando comparada à fermentação de glicose pela *S. cerevisiae*, sua produtividade é 5 vezes menor. Além disso, esta levedura apresenta taxas de crescimento mais lentas, é menos tolerante ao etanol, além de exigir controle rígido da aeração, não crescer em xilose em condição anaeróbica e não

produz etanol quando há O_2 em excesso. Ao contrário de *S. cerevisiae*, em *P. stipitis* a respiração não é reprimida pelos açúcares nem pela ausência de aeração (efeito Crabtree negativo) (Delgenes *et al.*, 1986; Skoog & Hahn-Hägerdal, 1990; para revisão ver Hahn-Hägerdal *et al.*, 1994; Klinner, 2005). Em cultivo de batelada, apresenta um metabolismo respiratório (Jeffries, 2006). Além de xilose, fermenta também glicose, galactose e celobiose (Parekh & Wayman, 1986 *apud* Weber *et al.*, 2010).

Na maioria das leveduras fermentadoras de xilose há a formação de xilitol concomitante à produção de etanol. A produção de xilitol aumenta com a diminuição da disponibilidade de O_2 . Este é necessário na fermentação de xilose para evitar o desbalanceamento redox que pode ocorrer devido aos diferentes cofatores requeridos na primeira etapa do metabolismo de xilose. Contudo, em *P. stipitis*, não se observa um acúmulo de xilitol significativo quando esta é cultivada em condições limitantes de O_2 , apesar do alto rendimento de etanol. Isso, provavelmente, se deve a dois fatores. *P. stipitis* possui atividade de XR com especificidade pelos dois cofatores (NADPH e NADH), apesar da predileção pelo NADPH, o que alivia o desbalanceamento redox, permitindo uma fermentação anaeróbica com insignificante produção de xilitol. O outro fator para a baixa produção de xilitol se deve à via respiratória alternativa que *S. stipitis* possui: a via sensível SHAM (*Salicyl Hydroxamic Acid*) uma cadeia transportadora de elétrons não-citocromo, que alivia também o desbalanceamento redox (Jeppsson *et al.*, 1995). Estudos demonstraram que o O_2 não tem efeito na atividade da XR e tem pouco efeito na XDH (para revisão ver Hahn-Hägerdal *et al.*, 1994).

A grande desvantagem de se utilizar a *P. stipitis* em fermentação de lignocelulose é que este microrganismo requer uma condição limitante de O_2 para fermentar xilose, não crescendo em condição anaeróbica. Em escala industrial é difícil controlar precisamente o nível de O_2 (para revisão ver Hahn-Hägerdal *et al.*, 1994).

1.6 Metabolismo da xilose

A fermentação microbiana a partir da xilose ocorre pela associação de duas vias: PPP e EMP (Pereira Jr. *et al.*, 2008). Diferentes vias são empregadas pelos procariotos e eucariotos no estágio inicial de assimilação de xilose. Em procariotos, ocorre uma isomerização da xilose em xilulose pela ação da xilose isomerase (XI) e, em eucariotos, é uma reação de oxirredução que gera um produto intermediário, o xilitol. Neste caso, a primeira etapa da reação é catalisada pela XR, utilizando NADPH ou NADH como cofator. A segunda etapa é catalisada pela XDH usando o cofator NAD^+ (Jeffries, 2006; Pereira Jr. *et al.*, 2008; Zaldivar *et al.*, 2001) (Figura 5). Surpreendentemente, estudos recentes revelaram que os fungos anaeróbicos *Piromyces sp* e *Orpinomyces* utilizam XI para o metabolismo de xilose (Harhangi *et al.*, 2003; Madhavan *et al.*, 2008).

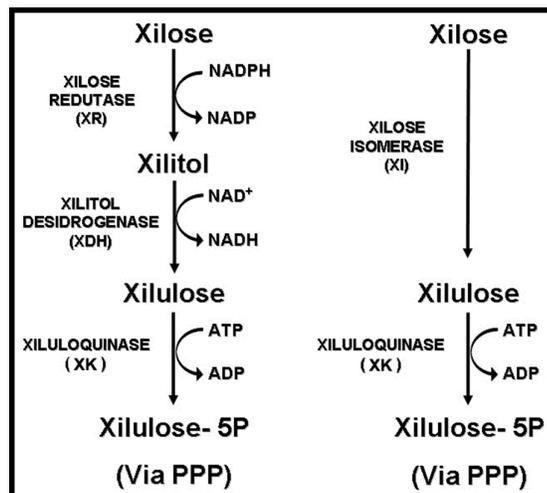


Figura 5: Vias metabólicas de consumo de xilose em eucariotos (A) e procariotos (B). Via PPP = via das pentoses fosfato

Para entrar na PPP, a xilulose precisa ser fosforilada e esse processo ocorre com auxílio da xiluloquinase (XK), gerando a xilulose 5-fosfato. Posteriormente, ocorre a formação do gliceraldeído 3-fosfato e frutose 6-fosfato, que são então convertidos a piruvato na via glicolítica. A PPP tem por função formar NADPH para reações de biossíntese e ribose 5-fosfato para síntese de nucleotídeos. A via consiste de duas fases: uma fase oxidativa, que converte hexoses fosfato em

pentoses fosfato, e a fase não-oxidativa, que converte pentose fosfato em hexose fosfato (Figura 6). Posteriormente, o piruvato pode seguir dois caminhos: respiração ou fermentação. A concentração de ATP e O₂ determinarão qual rota será seguida (Hahn-Hägerdal *et al.*, 1994; Pereira Jr. *et al.*, 2008).

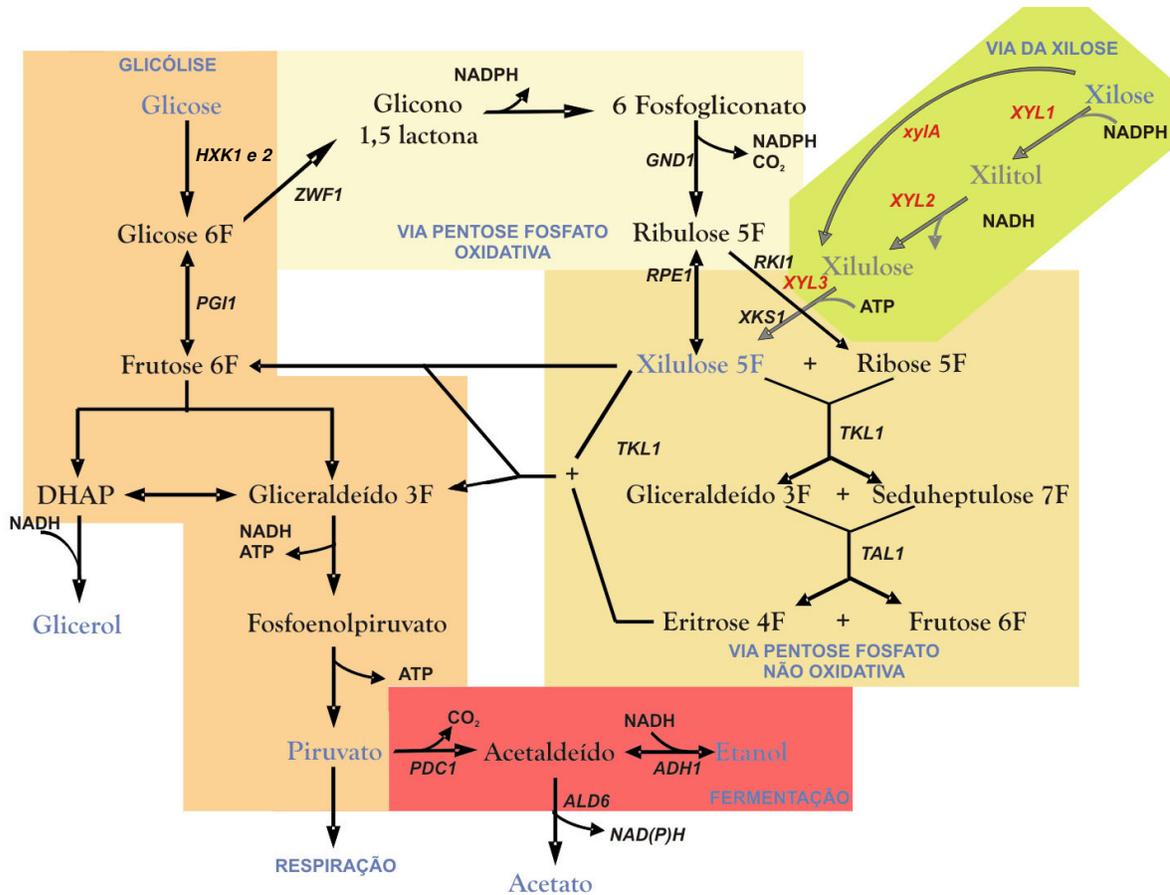


Figura 6: Rota metabólica da xilose. Em azul estão os principais substratos e produtos. Em cinza a via não nativa de *S. cerevisiae*. As enzimas representadas em preto são nativas de *S. cerevisiae*, as enzimas representadas em vermelho são heterólogas. As enzimas representadas em caixa alta são de leveduras e as representadas em caixa baixa são de bactéria. XYL1: xilose redutase, XYL2: xilitol desidrogenase, xylA: xilose isomerase, XYL3: xiluloquinase, XKS1: xiluloquinase, TKL1: transcetolase, TAL1: transaldolase, RPE1: ribulose-5-fosfato-3-epimerase, RKI1: ribulose-5-fosfato isomerase, GND1: 6-fosfogluconato desidrogenase, HXK1 e 2: hexoquinase 1 e 2, ZWF1: glicose-6-fosfato desidrogenase, PGI1: fosfoglicerato isomerase, PDC1: piruvato descarboxilase, ADH1: álcool desidrogenase e ALD6: aldeído desidrogenase.

1.7 Produção de Álcool Lignocelulósico

Para uma produção economicamente viável do etanol, em escala industrial torna-se necessário, um alto rendimento da sua produção e isso é obtido pelo desenvolvimento técnico científico em várias etapas do processo de produção. Primeiro, na coleta, transporte e estoque dos resíduos, depois, nos métodos de processamento da biomassa, por meio da produção de enzimas hidrolíticas mais eficientes e integração dos processos. Por último, nos microrganismos utilizados na fermentação, pelo desenvolvimento de linhagens robustas que sejam tolerantes aos inibidores presentes no hidrolisado e capazes de fermentar todos os açúcares presentes com uma alta produtividade e concentração de etanol. Isso permite a conversão completa tanto da fração sacarídea da biomassa como da fração lignocelulósica, além de uma eficiente fermentação de todos os açúcares presentes (Hahn-Hägerdal *et al.*, 2006, Hahn-Hägerdal & Pamment, 2004, Stephanopoulos, 2008; Wiedemann & Boles, 2008).

Atualmente, de acordo com IEA (*International Energy Agency*), o custo de produção do etanol celulósico é de US\$ 1,10/L de petróleo equivalente (US\$ 4,00 o galão), o etanol de milho e cana de açúcar custa US\$ 0,62-0,75/L equivalente e o petróleo US\$ 0,54/L. A estimativa é de que até 2050 o custo do etanol de 2ª geração chegue a US\$ 0,75/L equivalente, sendo necessário, portanto investimento e pesquisa (Fairley, 2011). A tecnologia para o aproveitamento de celulose já vem sendo desenvolvida em vários países com plantas-piloto em várias partes do mundo. Estima-se que o custo de produção do etanol a partir de resíduos celulolíticos varie entre US\$ 0,28-1,0/L etanol, para escala de laboratório (Hahn-Hägerdal *et al.*, 2006). No Brasil, o Centro de Pesquisa da Petrobras (Cenpes) possui no campus da UFRJ uma usina-piloto para produção de etanol lignocelulósico. Esta planta-piloto usará como substrato açúcares (hexoses e pentoses) oriundos da hidrólise químico-enzimática do bagaço de cana que integra sacarificação e fermentação em um único processo, mais conhecido como SSF. Atualmente a levedura *P. stipitis* que, como dito anteriormente, é capaz de fermentar xilose a etanol, esta sendo usada na fermentação de hidrolisado lignocelulósico. Contudo, para se ter uma boa produtividade é necessário um controle rígido da oxigenação, o que limita a produção em larga escala.

Uma alternativa para a produção de álcool lignocelulósico é a utilização da levedura *S. cerevisiae*, entretanto, esta não é capaz de metabolizar pentoses. O cenário ideal é aquele que reúne, em um único microrganismo, as duas características essenciais para um eficiente processo de fermentação dos resíduos agrícolas: alta produtividade e capacidade de metabolizar hexoses e pentoses (xilose). Isso pode ser obtido por meio das técnicas modernas de Biologia Molecular, que quebram as barreiras genéticas entre as espécies, permitindo acelerar o processo de incorporação de tais características em um único microrganismo. Várias estratégias de engenharia metabólica foram empregadas em linhagens de *S. cerevisiae* de laboratório, mas poucos foram os desenvolvimentos para linhagens industriais (Hahn-Hägerdal *et al.*, 2007). Como as linhagens industriais são mais robustas e apropriadas à produção industrial de etanol, é necessário empregar esforços para realizar a modificação genética nas mesmas obedecendo, contudo, regras de biossegurança a fim de reduzir a possibilidade de transferência de genes de resistência a antibióticos para os microrganismos presentes no meio ambiente.

O presente trabalho está inserido dentro de um programa apoiado pela Petrobras para o desenvolvimento de tecnologia nacional para a produção álcool lignocelulósico. Mais especificamente, buscamos desenvolver uma linhagem industrial de *S. cerevisiae* capaz de fermentar xilose – optamos pela linhagem JP1, largamente utilizada nas usinas de álcool do Nordeste. Para tanto, inicialmente buscamos desvendar algumas características genéticas desta linhagem a fim de apoiar a escolha da estratégia a ser adotada na melhoria desta linhagem visando a fermentação da xilose. Além disso, para aumentar a flexibilidade do uso desta linhagem como plataforma para futuras modificações, buscamos desenvolver um mutante auxotrófico para uracila (Capítulo 1). Usando ferramentas de Biologia Molecular, foram introduzidos na linhagem JP1 genes do metabolismo de xilose e, após adaptação metabólica, a linhagem resultante foi capaz de metabolizar este açúcar (Capítulo 2). Finalmente, com a finalidade de prospectar novos genes que poderão ser introduzidos na linhagem resultante para incrementar a fermentação de xilose, iniciamos uma análise de expressão gênica em *P. stipitis* com ênfase em genes codificadores de transportadores de xilose (Capítulo 3).

OBJETIVO

2 OBJETIVO

2.1 Geral

O presente projeto visa desenvolver uma linhagem industrial de *Saccharomyces cerevisiae* capaz de fermentar xilose a etanol.

2.2 Específico

- I. Caracterização genética da levedura industrial JP1
 - ✓ Determinação da ploidia e estado de homotalismo.
 - ✓ Determinação de sensibilidade a drogas.
 - ✓ Avaliação da “transformabilidade” da linhagem.
 - ✓ Construção de uma linhagem auxotrófica *ura3*.

- II. Obtenção da linhagem de *S. cerevisiae* fermentadora de xilose
 - ✓ Construção de vetor com cassetes de expressão para XI e XK.
 - ✓ Obtenção de linhagem recombinante contendo uma via metabólica de xilose.
 - ✓ Adaptação metabólica da linhagem recombinante para metabolizar e fermentar xilose a etanol.

- III. Análise de expressão gênica em *P. stipitis*:
 - ✓ Analisar expressão de genes da via metabólica de xilose.
 - ✓ Analisar expressão de genes de transportadores de xilose.

MATERIAL E MÉTODOS

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Considerações Gerais

Todas as soluções utilizadas em experimentos com RNA foram preparadas em condições livres de RNase (RNase *free*). O material plástico foi tratado com *Nuclease Decontamination Solution* (IDT) ou com solução composta de 0,1 M NaOH e 1 mM EDTA conforme o manual do kit *SV Total RNA Isolation System* (PROMEGA). As vidrarias foram tratadas com calor a 180 °C durante 16 h.

Quando necessário, soluções e meios de cultura foram submetidos a um processo de esterilização por calor úmido a 120 °C por 15 min. Algumas soluções sensíveis ao calor foram esterilizadas por filtração usando-se membranas tipo *Millipore* com poro de 0,22 µm. As soluções foram preparadas usualmente com água tipo milliQ, salvo algumas exceções relatadas ao longo deste capítulo.

As principais técnicas de Biologia Molecular empregadas neste trabalho foram realizadas essencialmente como descrito por Sambrook & Russell (2001).

3.2 Linhagens

A seguir serão descritas todas as linhagens de bactérias e leveduras que foram utilizadas neste trabalho com seus respectivos genótipos.

3.2.1 *E. coli*

Linhagem	Genótipo	Referência
EPI300™	F ⁻ <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr</i> - <i>hsd</i> RMS - <i>mcrBC</i>) φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ <i>lacX74</i> <i>recA1</i> <i>endA1</i> <i>araD139</i> Δ(<i>ara</i> , <i>leu</i>)7697 <i>galJ</i> <i>galK</i> λ ⁻ <i>rpsL</i> <i>nupG</i> <i>trfA</i> <i>tonA</i> <i>dhfr</i> .	EPICENTRE® Biotechnologies
DH5α	<i>EndA1</i> , <i>recA1</i> , <i>hsdR17</i> , <i>supE44</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>relA1</i> , Δ <i>lacU169</i> (φ <i>80lacZ</i> ΔM15)	(Sambrook & Russell, 2001)
XL10 Gold	<i>endA1</i> <i>glnV44</i> <i>recA1</i> <i>thi-1</i> <i>gyrA96</i> <i>relA1</i> <i>lac Hte</i> Δ(<i>mcrA</i>)183 Δ(<i>mcrCB</i> - <i>hsdSMR</i> - <i>mrr</i>)173 <i>tet^R</i> F'[<i>proAB</i> <i>lacI^f</i> ZΔM15 Tn10(<i>Tet^R</i> <i>Amy</i> <i>Cm^R</i>)]	Stratagene

3.2.2 *P. stipitis*

Linhagem	Características	Origem
CBS 5774	Linhagem selvagem adaptada metabolicamente ao hidrolisado de hemicelulose	Prof. Nei Pereira (UFRJ)

3.2.3 *S. cerevisiae*

Linhagem	Características	Referência/Origem
JP1	Linhagem industrial isolada na destilaria agroindustrial Japungu - PB	da Silva Filho <i>et al.</i> , 2005
MFL	<i>leu2</i> Derivada da linhagem industrial FTPT472	Fundação Tropical de Pesquisas Tecnológicas André Tosello (Campinas SP)
PE-2	Linhagem industrial	Basso <i>et al.</i> , 2008
S288c	<i>MATα</i> <i>SUC2 mal gal2 mel flo1 flo8-1 hap1 ho bio1 bio6</i>	Mortimer & Johnston, 1986
RE1006	<i>MATα</i> <i>can1-100 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-52</i>	R. Strich
CEN PK2	<i>MATα</i> / α <i>ura3-52/ura3-52 leu2-3,112/leu2-3,112 trp1-289/trp1-289 his3Δ1/his3Δ1 MAL2-8C/MAL2-8C SUC2/SUC2</i>	van Dijken <i>et al.</i> , 2000
IH1788	<i>MATα</i> / α <i>trp1 leu2 ura3 his4 can1</i>	Ira Herskowitz

3.3 Meios de Cultura

Para cultivo de *E. coli* foram utilizados os seguintes meios: (i) LB (Luria-Bertani): 0,5% extrato de levedura; 1,0% peptona de caseína e 1,0% NaCl; (ii) Meio *low salt*: 0,5% extrato de levedura; 1,0% peptona de caseína e 0,5% NaCl. (iii) SOB: 2% tripton; 0,5% extrato de levedura; NaCl 10 mM; KCl 2,5 mM. (iv) SOC: é o meio SOB contendo 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄ e 20 mM glicose (Sambrook & Russell, 2001). Para meio sólido foi acrescentado 1,5% ágar bacteriológico.

Para o cultivo de leveduras foram utilizados meio complexo e meio mínimo. O meio complexo YPD (1% extrato de levedura, 2% peptona e 2% glicose). O meio complexo também foi usado variando-se a fonte de carbono. As fontes de carbono

utilizadas foram: glicose (0,1%; 2%; e 8%), xilose (0,1%; 2% e 4%) - YPX, galactose 2% - YPGal e rafinose 2% - YPRaf. O meio mínimo é composto por: 0,17% *Yeast Nitrogen Base without amino acids* (Difco); 0,5% sulfato de amônio e fonte de carbono. A fonte de carbono usada foi 2% glicose (MD), 2% xilose e 5% xilose (MX) e suplementação com aminoácidos e nucleotídeos quando necessário. As concentrações finais dos suplementos foram: 2 mL/L de 1% triptofano, 2 mL/L de 1% histidina, 3 mL/L de 1% leucina e 10 mL/L de 0,2% uracila e 450 mL/L de 0,2% tirosina. Para o meio 2MX foi usado YNB 2X, 2% xilose ou 5% xilose e 50 mM de tampão fosfato pH 6.0. MD-Ura significa meio mínimo sem uracila MD+Ura (meio mínimo suplementado com 10 mL/L de uracila 0,2%) e MD+5-FOA (ácido 5-fluoroorótico) é o meio mínimo suplementado com 25 mL/L de uracila 0,2% e 1 mg/mL 5-FOA. Além destes, foram usados o meio complexo YPAD (1% extrato de levedura, 2% peptona, 2% glicose e 80 mg/L de adenina) para preparar levedura competente; o meio de pré-SPO (0,8% extrato de levedura, 0,3% peptona e 10% glicose) e o meio de SPO (1% acetato de potássio, 0,1% extrato de levedura e 0,05% glicose) (Sherman *et al.*, 1996). Para o meio sólido, foram adicionados 1,2-2% ágar bacteriológico. As fontes de carbono foram preparadas em solução separada para evitar a sua caramelização após autoclavagem.

3.4 Estoque das Linhagens

As linhagens de levedura e *E. coli* foram estocadas a -80°C em meio de cultura com 25% de glicerol.

3.5 Soluções

As soluções de um único soluto foram dissolvidas geralmente em água milliQ na concentração desejada, exceto quando solúveis em outro solvente. As drogas usadas para seleção de recombinantes foram preparadas nas seguintes concentrações e filtradas: PFP (ρ -flúor-DL-fenilalanina) – 10 mg/mL, canavanina – 30 mg/mL, G418 50 mg/mL, kanamicina 50 mg/mL. A ampicilina na concentração de 50 mg/mL foi dissolvida em água com adição de NaOH. As soluções de zeocina e higromicina foram obtidas da Invitrogen na concentração de 100 mg/mL e 50 mg/mL,

respectivamente. A droga 5-FOA foi preparada na concentração de 50 mg/mL, dissolvida em DMSO. A solução de iodeto de propídio foi preparada em PBS 1X na concentração de 1 mg/mL. A solução estoque de X-gal foi preparada em N,N-dimetilformamida a 2%.

3.6 Marcadores para DNA

Foram usados neste trabalho os marcadores 1Kb *plus ladder* (Invitrogen), 1Kb *ladder* (LGC), (Gibco) e (Promega), *O' Gene Ruler™ 1 kb Plus DNA Ladder* (Fermentas), 2-Log DNA ladder (Biolabs), DNA de fago λ digerido com a enzima de restrição BstEII e com EcoRI / HindIII, 100 pb *ladder* (PROMEGA) 100 pb *ladder* (Pharmacia) e 100 pb *ladder* (LGC). Padrão dos marcadores em anexo.

3.7 Enzimas de Restrição

Foram utilizadas diferentes enzimas de restrição juntamente com os tampões apropriados fornecidos pelos fabricantes seguindo-se suas recomendações.

3.8 Oligonucleotídeos (*primers*)

Os oligonucleotídeos usados estão listados na Tabela 2 com suas respectivas sequências, temperatura de dissociação - T_M (quando necessário), sítios de restrição (sublinhados na sequência). Os códons de iniciação e terminação da tradução estão em negrito, bem como a sequência *loxP*. Os oligonucleotídeos foram desenhados a partir de sequências depositadas no banco de dados NCBI e SGD (*Saccharomyces Genome Database*), além de sequências de vetores usados neste trabalho. Para os *primers* do *loci* MAT foram usados os *primers* descritos por Huxley (1990).

Todos os *primers* foram sintetizados pela empresa IDT sendo dissolvidos em Tris-HCl 4 mM (pH 8,0) para solução estoque. A solução de trabalho foi diluída em H₂O milliQ para uma concentração de uso de 5 μ M ou 10 μ M.

Tabela 2: Características dos oligonucleotídeos utilizados.

Nº	Primers	Sequência (5'→3')	TM	Sítio
1	ZeoBlasF2	aggcgcgcccacacacatagcttcaaa	62°C	Ascl
2	ZeoBlasR2	aggcgcgccagcttgcaaattaaagccttc	58°C	Ascl
3	G418F	tcggtttccctccttcttgaa	62°C	
4	G418R	ggatgagagctttgtttaggtg	68°C	
5	hph1	agatctatgacctgaactcaccgac	64°C	BglII
6	hph3	agatctctattcctttgccctcggacg	66°C	BglII
7	Y1PGKF	gatcatcaaggaagtaattatctac	66°C	
8	PGK-TT	ctatcgatttcaattcaattcaat	60°C	
9	XIF	cgaattcacaatggctaaggaatacttc	78°C	
10	XIR	ttattggtacatagcaacgatag	62°C	
11	CANF	atccattgcgctctttcccga	64°C	
12	CANR	atctgatgtgcgagattgagat	62°C	
13	PGIF	taatctggccgcggaattcgtgggtgtatt ggattatagg	60°C	SacII e EcoRI
14	PGIR	tctcgagttttaggctggatcttgattct	60°C	XhoI
15	XKSF	tctcgagttaatgttgtgttcagtaattcagaga	70°C	XhoI
16	XKSR	tggatccgcggtctctctcgttgctgctcaccctt	92°C	BamHI e SacII
17	FLPIN5	ccaattccttctctagctac	62° C	
18	FLPIN3	ggattagtctcatccttcaatg	62° C	
19	HXT7p5	agagctcttctcgttaggaacaatttcgg	64°C	SacI
20	HXT7p3	cggatcccttttgattaaataaaaaacttttg	64°C	BamHI
21	3HXT7	cggatcccttatttgggtgctgaacattctctgta	66°C	BamHI
22	tPGKR	tcctaggtaacgaacgcagaatttcgag	62° C	AvrII
23	HXT-TT	agtcgacgtgaataacagtgcggtcg	58°C	Sall
24	XUT1-F	tggatccaaaatgcacgggtggtggtgacggta	70°C	BamHI
25	XUT1-R	tcgggccgcttattttcaacgtggtagacatc	64°C	NotI
26	5PP-Lox	aggatccataacttcgtataatgtatgctatacga agttatcccacacacacatagcttcaaaa	64°C	BamHI
27	ZeoBlasR3	cggatccataacttcgtatagcatacattatacga agttatagatctagcttgcaaattaaagccttcgag	68°C	BamHI e BglII
28	GRAF1	acgagctcgttaacatatttcattatcggaactctag	60°C	SacI e HpaI
29	GRER1	ttggatccatccgcccgaatcgtcttgaaggattg	62° C	BamHI e SacII

30	GRAF2	ttggatccgcctgtggtgtcatccacg	62° C	BamHI
31	GRER2	gtggtaccggttaacggtgaaatggaagctgctatta	60°C	KpnI e HpaI
32	MAT-Fa	actccacttcaagtaagagtttg	64°C	
33	MAT-Fα	gcacggaatatgggactacttcg	70°C	
34	MAT-R	agtcacatcaagatcgtttatgg	64°C	
35	URA3UP-F	ccagctgctaagagatagtgatgatattc		PvuII
36	URA3UP-R	tggatccgatttatcttcgtttctgcaggtt		BamHI
37	URA3DW-F	tgaattcactgtattataagtaaagcatgtatac		EcoRI
38	URA3DW-R	ccagctgcatctttctaccagattagagtaca		PvuII
39	URA3-F1	caacggttcatcatctcatgga	64°C	
40	URA3-R1	cgctgccctacacgttcgct	66°C	
41	M13 UNIV	gttttcccagtcacgac	52°C	
42	M13 UNIV	caggaaacagctatgac	50°C	
	REV			

Para desenhar os *primers* para Real Time PCR (Tabela 3), as sequências dos 7 transportadores putativos de xilose (*XUT*), do transportador de açúcar *SUT2* foram alinhadas utilizando a ferramenta Clustal W. Os *primers* foram desenhados em regiões de baixa identidade entre as sequências (Suplemento 4). A análise das sequências dos *primers* foi feita utilizando-se o software *Primers Express* (Applied Biosystems) e o software *Amplify 3.0*. Foi desenhado também um par de *primers* para controle da transcrição, baseado num gene constitutivo, o gene da actina (*ACT1*). Os *primers* para os genes da via metabólica de xilose foram desenhados usando a ferramenta *Primers3Plus* e o software *Primers Express* (Applied Biosystems). Para o desenho dos *primers* para qRT-PCR, algumas regras foram seguidas: o tamanho do fragmento amplificado entre 50 e 150 pb; a T_m de 58-60°C; a porcentagem de CG de 20-80%; foram evitadas repetições consecutivas da mesma base (mais de 4), principalmente de G e os 5 nucleotídeos da extremidade 3' não devem ter mais do que 2 C e/ou G. A Tabela 3 mostra o *primers* com sua respectiva sequência e T_m, além do fragmento amplificado com o par de *primers* e o número de acesso do gene no GeneBank dos respectivos cDNA.

Tabela 3: Características dos oligonucleotídeos para qRT-PCR.

Gene	Nº de acesso	primers	Sequência (5'→3')	TM	tamanho
<i>ACT1</i>	XM001386915	P _s ACF	cggtgacgaagcccaatcta	59,7°C	144 pb
		P _s ACR	ttgtagaagggtgtggtgccagat	59,4°C	
<i>XUT1</i>	XM001385546	X1F	atgaacgaagacagagaagacgaat	58,5°C	83 pb
		X1R	ttcattgaacaagagtatcttccttac	58,8°C	
<i>XUT2</i>	XM001387205	X2F1	caagtaagctacgctgttacattcact	58,4°C	120 pb
		X2R1	gtgttaggaagtcctggtgtt	59,8°C	
<i>XUT3</i>	XM001387101	X3F	ggcagaggctgttatgaagaca	59,3°C	100 pb
		X3R	agtagtaagaatatcccagtatccagta	58,4°C	
<i>XUT4</i>	XM001386678	X4F	actcctgttgaagtgggtactatgatt	58,6°C	116 pb
		X4R	aatgaaagaccctgatctaatggttc	58°C	
<i>XUT5</i>	XM001385925	X5F	atcgctcattcgttatcaggtatg	59,4°C	94 pb
		X5R	acttcgctctgtgatgacct	59,7°C	
<i>XUT6</i>	XM001386552	X6F	tgacctgccatccttcca	58,7°C	115 pb
		X6R	gctaaagaagaagacatacaaccgatt	60°C	
<i>XUT7</i>	XM001387030	X7F	agcgttgctctatgattcacatct	58,1°C	110 pb
		X7R	ttcgttcgctcttaggtgtag	58°C	
<i>SUT2</i>	XM001384258	S2F	cagagtcgggttgattgtttcca	60°C	124 pb
		S2R	gacgtagacaaccatagctgaaatga	58,8°C	
<i>SUT1</i>	U77382	S1F	ttggtgacgtctacggtagaagagt	58,9°C	126 pb
		S1R	cagtaatggcagaccaatcataact	58,8°C	
<i>XUT2</i>	XM001387205	X2F2	aatggaatgatattaatgatgctgttatt	58,7°C	120 pb
		X2R2	ttctgccttatcgggcttgaa	59,1°C	
<i>XUT2</i>	XM001387205	X2F3	caaatctggaaatcaggcaaacaca	58,7°C	108 pb
		X2R3	gttaataagattaccaataataccctgttc	59,1°C	
<i>XYL1</i>	NC009045	P _s XR-F	cgtcggtttcggctgttg	59,8°C	69 pb
		P _s XR-R	gtcttgatagcacggtatgctgttc	59,4°C	
<i>XYL2</i>	AF127801	P _s XDH-F2	atgtcctcgtccagggtcaaga	58,2°C	99 pb
		P _s XDH-R2	ccattggcttggtcaaacgaa	58,2°C	
<i>XYL3</i>	AF127802	P _s XKS-F	cctcgtgctctcaaacct	58,3°C	97 pb
		P _s XKS-R	acccttgctgatttcgctgtt	59,5°C	
<i>TAL1</i>	AY854959	P _s TAL-F	accttgatctcgccattcgt	58,2°C	84 pb
		P _s TAL-R	gggtcttcgtcacctcgt	58,5°C	

3.9 Vetores

Foram utilizados os seguintes vetores de clonagem: pGEM[®]T Easy (Promega), pBluescript[®] II SK (+/-) da Stratagene[™] e pPCV-B (desenvolvido no Laboratório de Biotecnologia de Leveduras – UnB). Os vetores de expressão de *S. cerevisiae* utilizados foram: pYC210, pYC230 (Olesen *et al.*, 2000), pYC240, pYC040 (Hansen *et al.*, 2003), pEA2 (Cebollero & Gonzalez, 2004), YEp351PGK (de Moraes *et al.*, 1995) e pGFP-C-FUS (Niedenthal *et al.*, 1996). Para obtenção de alguns fragmentos foram usados os seguintes vetores: pPICZαA (Invitrogen) e pPICKα (Batista, 2012), pSH47 (Güldener *et al.*, 1996) e pJPA113 (Falcon & Aris, 2003). Os mapas dos vetores de expressão encontram-se em anexo.

3.10 Sequenciamento

Os fragmentos dos genes amplificados foram sequenciados automaticamente em um aparelho MegaBACE 1000 utilizando-se o kit MegaBACE *Dye Terminator* (Amersham Biosciences) e ABI 3130X com o *BigDye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit* (Applied Biosystems). A quantidade de amostra submetida ao sequenciamento automático foi de 100 a 200 ng de DNA, utilizando-se 1 µl de solução de *primers* 10 µM. A análise da qualidade do sequenciamento foi realizada pelos programas Phrad e Phred e a análise das sequências foi feita pela comparação com a sequência depositada em banco de dados ou com sequências preditas com o auxílio da ferramenta BLASTn e bl2seq (Altschul *et al.*, 1990). Para obter a sobreposição das sequências (*contig*), foi utilizada a ferramenta CAP3.

3.11 Ferramentas de Bioinformática e Sites

Nome	Utilidade	Endereço
SGD	Informações sobre genoma e análise funcional de <i>S. cerevisiae</i>	genome- www.stanford.edu/ Saccharomyces/

NCBI	Pesquisa bibliográfica e banco de dados de sequencias	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/
BLAST	Alinhamento de sequências em banco de dados	http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi
Clustaw (EMBL-EBI)	Alinhamento múltiplo	http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw/index.html
software <i>Amplify</i> 3.0	Simulador de PCR	http://engels.genetics.wisc.edu/amplify/
<i>Primers3Plus</i> (Untergasser <i>et al.</i> , 2007)	Desenho de <i>primers</i>	http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primers3plus/primers3plus.cgi
NebCutter (Biolabs®)	Análise de restrição	tools.neb.com/NEBcutter/index.php3
Molecular Toolkits	Manipulação de sequencias	http://www.vivo.colostate.edu/molkit/
The sequence manipulation suite	Manipulação de sequencias	bioinformatics.org/sms
Tm calculator (Finnzymes)	Determinação da Tm dos <i>primers</i>	https://www.finnzymes.fi/tm_determination.html

3.12 Análise de RNA e DNA por Eletroforese

Rotineiramente, o gel de agarose na concentração desejada foi feito em tampão TAE 1X (TAE 50X: 2 M Tris Base; 1 M ácido acético glacial, 50 mM EDTA). Após adicionar TAE 1X à agarose, esta foi aquecida até a sua solubilização adicionando-se em seguida 0,5 µg/mL EtBr.

As amostras de DNA e RNA foram preparadas adicionando-se tampão de amostra tipo IV 6X (0,25% azul de bromofenol e 40% sacarose) ou (0,25% xilenocianol, 0,25% orange G e 40% sacarose) numa concentração final de 1X e aplicadas no gel (Sambrook & Russell, 2001). Em seguida, o gel foi submetido a uma eletroforese em tampão de corrida TAE 1X em até 5 V/cm. A visualização dos ácidos nucléicos foi feita sobre a luz ultravioleta de um transluminador.

3.13 Extração de DNA Total de Levedura

O DNA de levedura foi extraído segundo o protocolo descrito por Burke *et al.* (2000) com modificações. A levedura foi crescida em 40 mL de meio YPD, em frasco Erlenmeyer de 250 mL, sob agitação a 30°C até atingir a saturação. Em seguida, as células foram coletadas por centrifugação (3.000 *g* / 5 min) a temperatura ambiente e ressuspensas em 3 mL de tampão SE (0,9 M sorbitol e 100 mM EDTA). Posteriormente, foram adicionados 100 µL de *Novozyme* (100 mg/mL) ou *liticase* (20 mg/mL) à suspensão de células e o sistema foi incubado a 37°C por 1 hora. Após o período de incubação, a suspensão foi centrifugada (3.000 *g* / 5 min) e o sedimento foi ressuspendido em 3 mL de TE₂₀ (10 mM Tampão Tris-HCl [pH 7,5] e 20 mM EDTA). Foram adicionados 500 µL de 10% SDS às células que foram, então, incubadas a 65°C por 30 min. Em seguida, foi adicionado 1,5 mL de 5 M acetato de potássio (pH 8,9) misturando-se gentilmente. Após uma incubação de 30 min no gelo, o material foi centrifugado (10.000 *g* / 5-10 min / 4°C). O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e procedeu-se a extração das proteínas e debris celulares com 1 volume de clorofane (1v de fenol equilibrado e 1v de clorofórmio) invertendo-se o tubo gentilmente várias vezes. A solução foi centrifugada (3.000 *g* / 10 min) e a fase aquosa foi transferida para outro tubo, ao qual foram adicionados 2,5 volumes de etanol absoluto. A solução foi incubada por 5 min a temperatura ambiente e centrifugada logo a seguir (10.000 *g* / 15 min / 4°C). O precipitado foi lavado com etanol 70%. Após seco, o precipitado foi ressuspendido em 200-500 µL de TE (10 mM Tampão Tris-HCl [pH 8,0] e 0,1 mM EDTA) e foram adicionados 100 µg/mL de RNase A. O DNA foi estocado a 4°C.

3.14 Condição de Cultivo da Levedura *P. stipitis* para qRT-PCR

A levedura foi crescida em meio complexo (YP + fonte de carbono) em condição de aerobiose e condições limitantes de oxigênio a 28°C de acordo com Weierstall *et al.* (1999). As fontes de carbono utilizadas foram: glicose (8%, 2%, 0,1%), xilose (4%, 2%, 0,1%), e uma mistura de ambas (8% glicose + 4% xilose).

Primeiro, foi feito um pré-inóculo da levedura *P. stipitis* em 5 mL de meio complexo utilizando as diferentes concentrações de fonte de carbono, a 28°C sob condições de aerobiose (agitação de 200 rpm), por ~16 horas. Em seguida, foi feito cultivo em duas condições: aeróbica e em condição limitante de O₂. Na condição de aerobiose foi feito um inóculo para OD₆₀₀ inicial de 0,2 em 100 mL de meio complexo com diferentes concentrações de fonte de carbono em frasco de 300 mL, fechado com bucha, a 28°C e sob agitação de 200 rpm até atingir a OD₆₀₀ = 1 ± 0,1 (~5 horas). Para a condição limitante de O₂, foi feito um inóculo inicial com OD₆₀₀ = 0,1 em 50 mL de meio complexo com diferentes concentrações de fonte de carbono num frasco tipo Erlenmeyer de 50 mL fechado com rolha de silicone, a 28°C, sob agitação lenta (50 rpm), até a cultura atingir OD₆₀₀ = 0,9 ± 0,1 (~48 horas).

3.15 Extração de RNA Total de *P. stipitis*

O RNA total da *S. stipitis* foi extraído das células cultivadas nas condições citadas acima, até o crescimento atingir OD₆₀₀ = 0,9 ± 0,1. O RNA total foi obtido utilizando-se o kit comercial *SV Total RNA Isolation System* (PROMEGA), de acordo com as recomendações do fabricante. A integridade do material foi verificada em eletroforese de gel de agarose e sua concentração foi determinada por espectrometria a 260 nm usando os equipamentos GeneQuant (GE) e NanoDrop (Thermo).

3.16 Obtenção de cDNA

A síntese da primeira fita de cDNA foi realizada utilizando o kit *SUPERScript[®] III First Strand cDNA Synthesis* (Invitrogen[™]), seguindo-se as recomendações do fabricante. A quantidade de RNA utilizada na reação foi de ~500 ng. O *primers* usado na reação foi o oligo (dT)₂₀.

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

A análise de expressão foi feita pela técnica de Real Time RT-PCR utilizando o equipamento 7500 *Fast Real Time PCR System* (Applied Biosystems) disponível

em nosso laboratório. O kit de detecção utilizado foi o *Fast SYBR[®] Green Master Mix* (Applied Biosystems). A reação e o ciclo foram os recomendados pelo fabricante. Para uma reação de 10 μ L, foram adicionados 5 μ L de SYBR Green 2X, 0,8 μ L do par de *primers* na concentração de 50 μ M, 2 μ L do cDNA, e completando-se o volume com H₂O milliQ. O programa para a reação foi: 95°C por 20 s, 40 ciclos de 95°C por 3 min e 60°C por 20 s. A especificidade do produto formado foi verificada por meio da curva de dissociação feita logo após a reação conforme o programa: 95°C/15 s, 60°C/1 min, 95°C/15 s e 60°C/15 s. A análise dos dados foi feita pelo método comparativo C_T ($\Delta\Delta C_T$) (Livak & Schmittgen, 2001). As reações foram feitas em triplicata.

3.18 PCR

As condições que foram utilizadas para a realização das PCR neste trabalho estão representadas na Tabela 4 e o ciclo da PCR será descrito a seguir.

Tabela 4. Reagentes utilizados na PCR, seus fabricantes e a concentração final na reação.

Reagentes	Concentração final	Marca
dNTP (2,0 mM) 10X	200 mM (1X)	Gibco [®]
Tampão 10X	1X	Cenbiot/LGC
MgCl ₂ (50 mM)	2,0 mM	Cenbiot/ LGC
<i>Taq</i> DNA polimerase (2 U/ μ l ou 5 U/ μ L)	0,04 U	Cenbiot/ LGC
<i>Primers</i> 5' (5 μ M)	0,2 μ M	
<i>Primers</i> 3' (5 μ M)	0,2 μ M	
DNA Molde	\leq 10 ng	

Ciclo da PCR

Desnaturação	94°C	45 s -1 min	
Anelamento	50-60°C	30 - 45 s	
Extensão	72°C	1 min/kb	
Extensão final	72°C	3x tempo de extensão	
	4°C	∞	

Para as polimerases de alta fidelidade, *Phusion® DNA polimerase* (Finnzymes) e *Platinum® Taq DNA Polymerase High Fidelity* (Invitrogen) as condições adotadas foram aquelas recomendadas pelo fabricante.

3.19 PCR de Colônia

As PCR com colônias recombinantes foram feitas da seguinte forma: Uma quantidade mínima de colônia foi coletada com a ponta de um palito e dissolvida em 5 µL de H₂O. Em seguida foi feito um mix da reação de PCR com os reagentes em comum e, posteriormente, distribuídos nos tubos com as colônias dissolvidas. A condição da reação esta descrita na Tabela 5 e o ciclo logo a seguir.

Tabela 5. Reagentes utilizados na PCR de colônia, volume e concentração final na reação.

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

Ciclo da PCR

Desnaturação	94 °C	1 min	
Anelamento	50-60 °C	30 - 45 s	
Extensão	72 °C	1 min/kb	
Extensão final	72 °C	3x tempo de extensão	
	4 °C	∞	

3.20 Adição de dATP ao Produto de PCR

Os produtos de PCR feitos com enzima a *Phusion® DNA polimerase*, possuem extremidade abrupta, pois esta enzima não adiciona dATP ao final da reação. Portanto para os amplicons serem ligada aos vetores que possuem T nas suas extremidades (ex. pGEM[®]T) é necessário fazer uma reação de polimerização para adicionar dATP nas extremidades dos amplicons.

A Tabela 6 descreve os reagentes utilizados, bem como sua concentração final.

Tabela 6: Reagentes utilizados na reação para adição de dATP, e suas concentrações

Reagentes	Concentração final
dATP (10 mM)	0,2 mM
Tampão 10X	1X
MgCl ₂ (50 mM)	2 mM
<i>Taq</i> DNA polimerase (2 U/μl)	0,5 U/μL
Produto de PCR	

A reação foi incubada por 20 min a 72°C

3.21 Purificação do Produto de PCR e de Fragmento de DNA de Gel de Agarose

Os produtos de PCR foram purificados, para eliminação dos *primers*, utilizando o kit: *Wizard® SV Gel and PCR Clean up System* da PROMEGA ou GFX da GE ou *Purelink™ PCR Purification Kit* (INVITROGEN) ou *QIAquick PCR purification kit* (QIAGEN). Para eluição dos fragmentos de DNA do gel de agarose foram usados os kits: *Wizard® SV Gel and PCR Clean up System* da PROMEGA ou GFX da GE ou *Gel Extration kit* (QIAGEN). Sempre seguindo-se as recomendações do fabricante.

3.22 Defosforilação do Vetor Linear

Os vetores que foram linearizados com apenas uma enzima de restrição, foram defosforilados para evitar sua religação. A enzima utilizada foi a fosfatase alcalina de camarão (SAP) da Fermentas e a *Antarctic Phosphatase* (New England Biolabs), conforme orientação do fabricante.

3.23 Ligação dos Fragmentos de DNA

As concentrações de DNA (vetor:inserto) utilizadas no sistema de ligação variaram dentro da proporção de 1:3 a 1:6. Tipicamente, o sistema de ligação foi de 10 μ L. A temperatura de incubação e concentração da enzima variou de acordo com a marca da enzima utilizada, seguindo-se as recomendações do fabricante.

3.24 Transformação de Células de *E. coli*

3.24.1 Choque térmico com cloreto de rubídio

Para a transformação de *E. coli* por choque térmico foi adotado o protocolo proposto por (Hanahan, 1983) com adaptações. As células da linhagem de *E. coli* a serem transformadas foram inoculadas em 5 mL de meio SOB e incubadas a 37 °C, sob agitação (200-250 rpm), durante a noite (~16 horas). No dia seguinte, 2 mL do pré-inóculo foi adicionado a 50 mL de meio SOB. A cultura de células foi incubada a 37 °C sob agitação (250 rpm), até atingir a OD₆₀₀ de 0,3. A cultura foi transferida para tubos de centrifugação seguindo-se incubação no gelo por 15 min. As células foram coletadas por centrifugação (3.000 g / 5 min / 4 °C), e o sedimento foi ressuspensionado em 16 mL de tampão de transformação I (12 g/L RbCl; 9,9 g/L MnCl₂·4H₂O; 1,5 g/L CaCl₂·2H₂O; 150 mL glicerol 100%; 30 mL 1 M acetato de potássio [pH 7,5]). O pH da solução foi ajustado para 5,8 com 0,2 M ácido acético seguindo-se esterilização por filtração. Após 15 min de incubação no gelo as células foram submetidas a uma nova centrifugação. As células foram então ressuspensionadas em 4 mL de tampão de transformação II (1,2 g/L RbCl; 11 g/L CaCl₂·2H₂O; 150 mL glicerol 100%; e 20 mL de

1M MOPS [pH 6,8]) esterilizado por filtração. Alíquotas de 100 µL de células por tubo foram estocadas a -80 °C.

Uma alíquota de células competentes foi utilizada para cada sistema de ligação. As células foram retiradas do freezer -80 °C e deixadas descongelar no gelo. Ao descongelar, foram adicionados 50% do sistema de ligação. As células com o DNA foram incubadas no gelo por 30 min. Após esse período, as células foram submetidas a um choque térmico de 37 °C por 5 min ou 42 °C por 90 s e, em seguida, adicionaram-se 500 a 1000 µL de meio L seguindo incubação a 37 °C por 1 hora. Foram semeados volumes de 50 a 200 µL de cultura de células em placas de Petri com meio LB-ágar contendo antibiótico apropriado e 40 µL de 2% X-gal e 7 µL de 1 M IPTG quando necessário.

3.25 Purificação de DNA Plasmidial

3.25.1 Mini-preparação de plasmídios por lise alcalina (com modificações)

O protocolo de extração de plasmídios de *E. coli* foi baseado na técnica de lise alcalina descrita por Birboim & Dolly (1979) com algumas modificações. Colônias individuais de *E. coli* foram inoculadas em meio L (4-5 mL) com antibiótico apropriado. As células foram crescidas a 37 °C, sob agitação de 200-250 rpm, durante 18 horas. A cultura foi centrifugada (10.000 *g* / 2 min). O sedimento foi ressuspensionado em 200 µL de TE (10 mM Tris-HCl [pH 8,0] e 0,1 mM EDTA), depois foram adicionados 360 µL de solução II (0,2 M NaOH e 1% SDS), invertendo o tubo delicadamente várias vezes e incubando a temperatura ambiente por 5 min. Posteriormente, foram adicionados 300 µL de solução III pH 4,8-5,0 (3 M acetato de sódio e 2 M ácido acético), invertendo gentilmente o tubo várias vezes e incubando no gelo por 5 min. O material foi centrifugado (10.000 *g* / 5 min) e o sobrenadante foi transferido para um novo tubo no qual foram adicionados 750 µL de isopropanol seguindo-se centrifugação a 10.000 *g* / 5 min. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspensionado em 200 µL de TE. Foram adicionados 110 µL acetato de amônia 7,5 M e misturou-se o sistema vigorosamente utilizando-se o *vortex*. A

solução foi centrifugada (10.000 *g* / 10 min) e o sobrenadante transferido para um novo tubo. O DNA foi precipitado pela adição de 750 μ L de 100% etanol gelado seguindo-se centrifugação a 10.000 *g* / 5 min. O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com 70% etanol, sendo novamente centrifugado (10.000 *g* / 2 min). O sobrenadante foi descartado e, após seco, o precipitado foi ressuspenso em 50 μ L de TE ou H₂O milliQ e 0,5 μ L de RNase A 10 mg/mL.

Quando era necessário sequenciar o material, a purificação plasmidial foi realizada utilizando-se o QIAprep Spin Miniprep Kit da QIAGEN seguindo-se as recomendações do fabricante.

3.25.2 Midi-preparação de plasmídios

Para realizar uma preparação em larga escala, foi utilizado o kit QIAGEN-tip500 (QIAGEN), seguindo-se as instruções do fabricante.

3.26 Esporulação de Leveduras

As leveduras de interesse foram inoculadas em meio sólido de pré-SPO. Após cultivo a 30°C por 48 h, as culturas foram transferidas para meio sólido SPO. Após dez dias de incubação, algumas colônias foram dissolvidas em PBS 1X e analisadas no microscópio óptico (Zeiss Axiophot) com uma objetiva de 100X 1,3. As imagens foram feitas com sistema de contraste de interferência diferencial (DIC – *Differential Interference Contrast*) e coletadas com câmera AxioCam MRC e o software AxioVision release 4.7.

3.27 Dissecação de Tétrades

O protocolo usado na dissecação de tétrades foi baseado em Sherman (1996). Após a esporulação, uma pequena quantidade de células foi dissolvida em 50 μ L de H₂O destilada estéril. Após a adição de 50 mg/mL liticase às células, o sistema foi incubado a 30°C por 10 min. Foram adicionados 100 μ L de H₂O destilada estéril ao sistema e este foi incubado no gelo para interromper a ação da enzima. Após o

tratamento enzimático, as células foram transferidas para uma região demarcada da placa de meio YPD com auxílio de uma alça de platina. Para a dissecação das tétrades foi usado o microscópio de dissecação MSM400 (Singer).

3.28 Citometria de Fluxo

Para o preparo das células foi usado o protocolo descrito por Jacques *et al.*, (2010) com modificações. As leveduras foram crescidas em 5 mL de meio YPD a 30°C sob agitação de 200 rpm por ~20 horas (até a fase estacionária). A quantidade de células foi determinada usando câmara de Neubauer. A cultura foi submetida a centrifugação de 5 min a 3.000 *g*. O sobrenadante foi descartado e o sedimento celular foi lavado com H₂O destilada e submetido a uma nova centrifugação. As células foram fixadas em 1 mL de 70% etanol durante a noite a 4°C. Após a incubação, as células foram sedimentadas (3.000 *g* / 5 min) e lavadas com 1 mL de 50 mM citrato de sódio (pH 7,5). Após uma nova centrifugação, as células foram ressuspendidas em 1 mL de 50 mM citrato de sódio (pH 7,5) contendo 0,20 mg/mL de RNase A. Após uma incubação a 55°C por 1 hora, foram adicionados 10 µL de proteinase K (20 mg/mL) às células e incubadas por mais 1 hora a 55°C. O material foi submetido a ultrassom de 30 W por 20 s e ~ 1 x 10⁷ células foram coradas com 50 µg/mL iodeto de propídio (5 mg/mL em PBS [13,7 mM NaCl, 0,7 mM Na₂HPO₄, 0,002% NaN₃]). As células foram mantidas a 4°C e protegida da luz até a leitura no citômetro FACSCalibur (BD) equipado com laser de 488 nm. Foram usadas 50.000 células para a medida de fluorescência. Foi usado o detector de fluorescência FL2. As células foram separadas dos debris pelos parâmetros *forward scatter* (FSC) e *side scatter* (SSC) e os agregados celulares foram excluídos pelos parâmetros FL-W versus FL-A. Para a análise dos dados foi usado o programa FlowJO, por meio de um histograma de PL-H das linhagens celulares.

3.29 Análise de MIC (*Minimum Inhibitory Concentration*)

Foi inicialmente feito o inóculo de uma colônia de levedura em 5 mL de meio YPD. O crescimento foi feito 30°C/200 rpm por ~18 horas. Após determinar o número de células na cultura, foram feitas diluições seriadas de 10⁸-10³ células/mL.

Foram aplicadas 5 μ L de cada diluição em cada placa contendo diferentes concentrações da droga em estudo e numa placa controle sem droga.

3.30 Transformação de Levedura em Fase Estacionária

Foi feito um inóculo das células de *S. cerevisiae* em 5 mL de meio YPD. As células foram crescidas a 30 °C, sob agitação de 250 rpm até a saturação, (~24 h). Foram coletadas 200 μ L de células por centrifugação a 12.000 *g* por 5 s. As células foram ressuspensas em 100 μ L de tampão *One Step* (0,2 N LiAOC; 40% PEG 4000 [p/v]; 100 mM DTT). Foram adicionados de 100-2000 ng de vetor às células que então foram incubadas a 45 °C por 1 hora. Após esse período, as células foram plaqueadas em meio MD com a droga adequada. No caso de seleção por antibiótico, o tampão *One Step* foi removido por centrifugação, as células foram ressuspensas em 1 mL de YPD e incubadas a 30 °C por 2 horas. As células foram submetidas a centrifugação para eliminar o excesso de meio, sendo posteriormente ressuspensas em ~300 μ L de meio para serem espalhadas em placa de YPD contendo o antibiótico adequado (Chen et al., 1992).

3.31 Eletroporação de Levedura

A transformação de leveduras por eletroporação seguiu o protocolo descrito por Scorer *et al.*, (1994) para *Pichia pastoris*. As células da levedura *S. cerevisiae* foram inoculadas em 5 mL de meio YPD para crescer a 30 °C sob agitação durante a noite. No dia seguinte, 1% do pré-inóculo foi transferido para 500 mL de meio YPD para crescer a 30 °C sob agitação até atingir a OD₆₀₀ de 1,3-1,5. Posteriormente, as células foram coletadas por centrifugação a 1.500 *g* / 5 min / 4 °C e o sedimento foi ressuspensado em 500 mL de água estéril gelada. A suspensão foi novamente centrifugada e o sedimento ressuspensado em 250 mL de água estéril gelada seguindo-se da coleta por centrifugação. Esta lavagem foi repetida mais uma vez e após a segunda centrifugação, as células foram ressuspensas em 20 mL de 1 M sorbitol estéril e gelado. Novamente as células foram centrifugadas e ressuspensas em 250-500 μ L de solução de sorbitol gelado para um volume final de 1,5 mL de células competentes. Em 80 μ L de células foram adicionados 5 a 20 μ g

de DNA linear sendo o sistema imediatamente transferido para uma cubeta de eletroporação de 0,2 cm (Bio Rad) gelada. A cubeta com as células foi incubada no gelo por 5 min. Foram adicionados 320 μL de 1 M sorbitol gelado à cubeta. As células foram submetidas a um pulso elétrico no equipamento da Bio Rad com os seguintes parâmetros: 1500 V, 25 μF , 400 Ω . Após eletroporação foram adicionados 680 μL de 1 M sorbitol gelado estéril e o sistema foi transferido para um tubo tipo *Eppendorf*. Após uma centrifugação de 10 s, o excesso de sobrenadante foi descartado, permanecendo o suficiente para se semear 100 μL de suspensão células por placa. O meio utilizado na seleção de leveduras transformantes foi MD, com os suplementos necessários. As placas foram colocadas a 30°C por 48-72 horas.

3.32 Transformação de Alta Eficiência de Levedura

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

Componentes	Volume (μL) / transformação
50%PEG 3350 (p/v)	240 μL
1 M LiAOc	36 μL
DNA carreador ^a (2 mg/mL)	50 μL
Total	336 μL

^a : DNA de esperma de salmão

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

3.33 Excisão da Marca de Seleção

Para remoção da marca de seleção flanqueada pelo *loxP* foi usado o protocolo descrito por Carter & Delneri (2010). Uma colônia da levedura contendo o cassete de seleção flanqueado por sítios *loxP* e o vetor pYRCre foi inoculada em 5 mL de meio YPRaf com 200 $\mu\text{g/mL}$ higromicina B. A cultura foi incubada a 30°C, sob agitação (~200 rpm), durante a noite. No dia seguinte a quantidade de célula necessária para iniciar o inóculo com uma $OD_{600} = 0,3$ foi submetida a centrifugação (3.000 g / 5 min) e lavadas com H_2O destilada estéril. Após uma nova centrifugação as células foram ressuspensas em 10 mL de meio YPGal com 200 $\mu\text{g/mL}$ higromicina B. A cultura foi incubada a 30°C por 3 horas sob agitação. Posteriormente 1 mL da cultura foi plaqueada em meio YPD. As células foram incubadas a 30°C por 24 h. Posteriormente as células foram repicadas para uma nova placa de YPD para obter se colônias isoladas.

3.34 Detecção de Fluorescência

As células foram cultivadas em meio MD a 28 °C por 16 h sob agitação. Em seguida, 10 µl de cada cultura foram adicionados numa lâmina. Um microscópio confocal (Leica SP5) equipado com laser de 488 nm, e uma objetiva 63x NA 1,4 foi usado para avaliar a expressão da GFP. As imagens foram coletadas com o programa LAS software AF.

3.35 Adaptação Metabólica

Adaptação Metabólica foi feita essencialmente como descrito por Kuyper *et al.* (2004). Os transformantes foram inoculados em 5 mL de meio MDX (0,5% glicose e 2% xilose) com G418 (200 µg/mL). Após crescimento durante a noite, sob agitação (200 rpm) a 30 °C, as células foram transferidas para um Erlenmeyer de 500 mL, fechado com bucha, contendo 100 mL de meio MX (2% xilose) com G418 para uma OD₆₀₀ inicial de 0,2. Esta cultura foi crescida até atingir a OD₆₀₀ de ~1,5. Ao atingir esta densidade óptica as células foram transferidas para um novo meio MX com uma OD₆₀₀ inicial de 0,2. O crescimento foi feito sob agitação de 200 rpm (shaker) a 30 °C. Durante o processo foi calculada a taxa de crescimento aparente pela fórmula: $\mu = \ln(X/X_0) / t_2 - t_1$, onde X é a última OD₆₀₀ medida, X₀ é a medida da OD₆₀₀ anterior, t₂ é o tempo da última OD₆₀₀ medida e t₁ é o tempo da medida de OD₆₀₀ anterior.

3.36 Cultivo Anaeróbico

A fermentação das leveduras recombinantes foi feita de acordo com o método descrito por Parachin (2010). Foi feito um inóculo em 100 mL de meio 2MX contendo 3% de xilose e tamponado com 50 mM de tampão fosfato de potássio pH 6,0 em frasco Erlenmeyer de 1000 mL vedado com bucha. As células foram crescidas a 30 °C em sob agitação (200 rpm) até atingir a fase exponencial tardia. A cultura foi sedimentada e lavada 2 vezes com H₂O destilada estéril. O cultivo anaeróbico foi feito em garrafas de 50 mL contendo 45 mL de meio MX (5% xilose), vedadas com rolhas de silicone. Foram inoculados 5 g/L células (peso seco) à cultura. Este foi recoberto com uma camada de óleo mineral estéril evitando a entrada de O₂ na

cultura. O CO₂ produzido foi liberado por meio de agulha colocada através da rolha. Para coletar a amostra foi introduzida uma cânula de borracha no meio conectado ao ambiente por uma seringa. O cultivo foi feito a 30°C sob agitação de ~150 rpm por 100 h.

3.37 Análise dos Produtos de Fermentação por HPLC

O substrato (xilose) e os produtos (etanol, xilitol e glicerol) do cultivo anaeróbico foram analisados por HPLC (High-Performance Liquid Chromatography) com a coluna Shim-pack SPR-Pb 250 x 7,8 mm (Shimadzu). A amostra do cultivo foi sedimentada (5000 *g* / 3 min.). O sobrenadante foi filtrado em membrana tipo durapore com poro de 0,22 μm e diâmetro de 13 mm. Posteriormente a amostra foi aplicada ao equipamento de HPLC (Shimadzu). A coluna foi eluída a 80°C com água como fase móvel a um fluxo de 0,6 mL/min. A detecção foi feita pelo índice de refração RID10 (Shimadzu).

3.38 Extrato Proteico

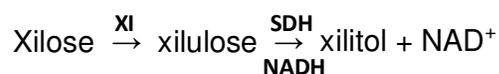
Foi feito um pré-inóculo da levedura em 5 mL de meio YPD (glicose 2%) com G418 a 30°C, sob agitação de 200 rpm, durante a noite. No dia seguinte foi feito um inóculo em 50 mL de meio YPD com G418. O crescimento foi realizado a 30°C, sob agitação (200 rpm), até atingir a OD₆₀₀ = 0,9. A cultura foi submetida a centrifugação (3.000 *g* / 5 min / 4°C). O sedimento foi ressuscitado em 100 mM trietanolamina (pH 7,0) e transferido para um tubo de 2 mL. Após uma nova centrifugação (10.000 *g* / 5 min / 4°C) o sedimento com foi ressuscitado em 1,5 mL de uma solução contendo 100 mM trietanolamina (pH 7,0), 1 mM EDTA e 1 mM PMSF. Foram adicionadas 20 μL de esferas de vidro (diâmetro 0,45 x 0,5 mm). O sistema foi submetido a uma agitação vigorosa utilizando o *vortex* por 45 s durante 10 min resfriando-se a amostra por 2 min entre os intervalos dos pulsos. Posteriormente o material foi sedimentado (10.000 *g* / 20 min / 4°C). O sobrenadante foi removido e estocado a -20°C (Bergdahl, 2006).

3.39 Curva Padrão de NADH

Foi preparada uma solução estoque de 5 mM NADH. A partir desse estoque foi feita diluições para as seguintes concentrações de NADH: 0,06 mM; 0,08 mM; 0,10 mM; 0,12 mM e 0,14 mM. O volume final de cada sistema foi de 1 mL. Foi feita a leitura dessas reações num espectrofotômetro utilizando um comprimento de onda de 340 nm. Com os valores obtidos dessa leitura foi construído um gráfico de regressão linear.

3.40 Ensaio de Atividade para Xilose Isomerase (XI)

O ensaio de atividade de XI foi feito com modificações sugeridas por Kersteis-Hilderson et al. (1987). Como a XI não depende de cofator para a sua atividade, esta é medida indiretamente por meio de duas reações acopladas. Na primeira reação a XI cataliza a reação de conversão da xilose a xilulose. Na segunda a xilulose é convertida a xilitol pela enzima sorbitol desidrogenase (SDH) com oxidação do NADH. A reação de oxidorredução do NADH é medida espectrofotometricamente a 340 nm ao longo do tempo.



1ª reação: xilose → xilulose

Reagente	Trietanolamina 200 mM (pH 7,0)	Xilose 2,5 M	MnCl ₂ 0,5 M	Extrato proteico
Volume	118 µL	28,5 µL	10 µL	100 µL

As reações foram incubadas a 30°C em diferentes tempos: 20 min, 1 h, 2 h e 3 h. Após cada um desses tempos as reações foram interrompidas pela adição de 60 µL de TCA 50%. Após uma centrifugação a 11.000 g por 5 min a reação foi neutralizada com 78 µL de 2 M Na₂CO₃. Foi feito um controle da reação colocando-se o tampão de parada (50% TCA) antes de adicionar o extrato proteico.

Uma unidade de XI é definida como a quantidade de enzima capaz de produzir 1 μmol de xilulose por minuto a 30°C

2ª reação: xilulose \rightarrow xilitol

Reagente	Trietanolamina 200 mM (pH 7,0)	H ₂ O	Amostra da 1ª reação	NADH 5 mM	SDH 0,035 U
Volume	500 μL	370 μL	100 μL	20 μL	10 μL

Procedeu-se as leituras no espectrofotômetro, após 10 min da adição da SDH. As reações da segunda etapa foram feitas em triplicata (Traff *et al.*, 2001).

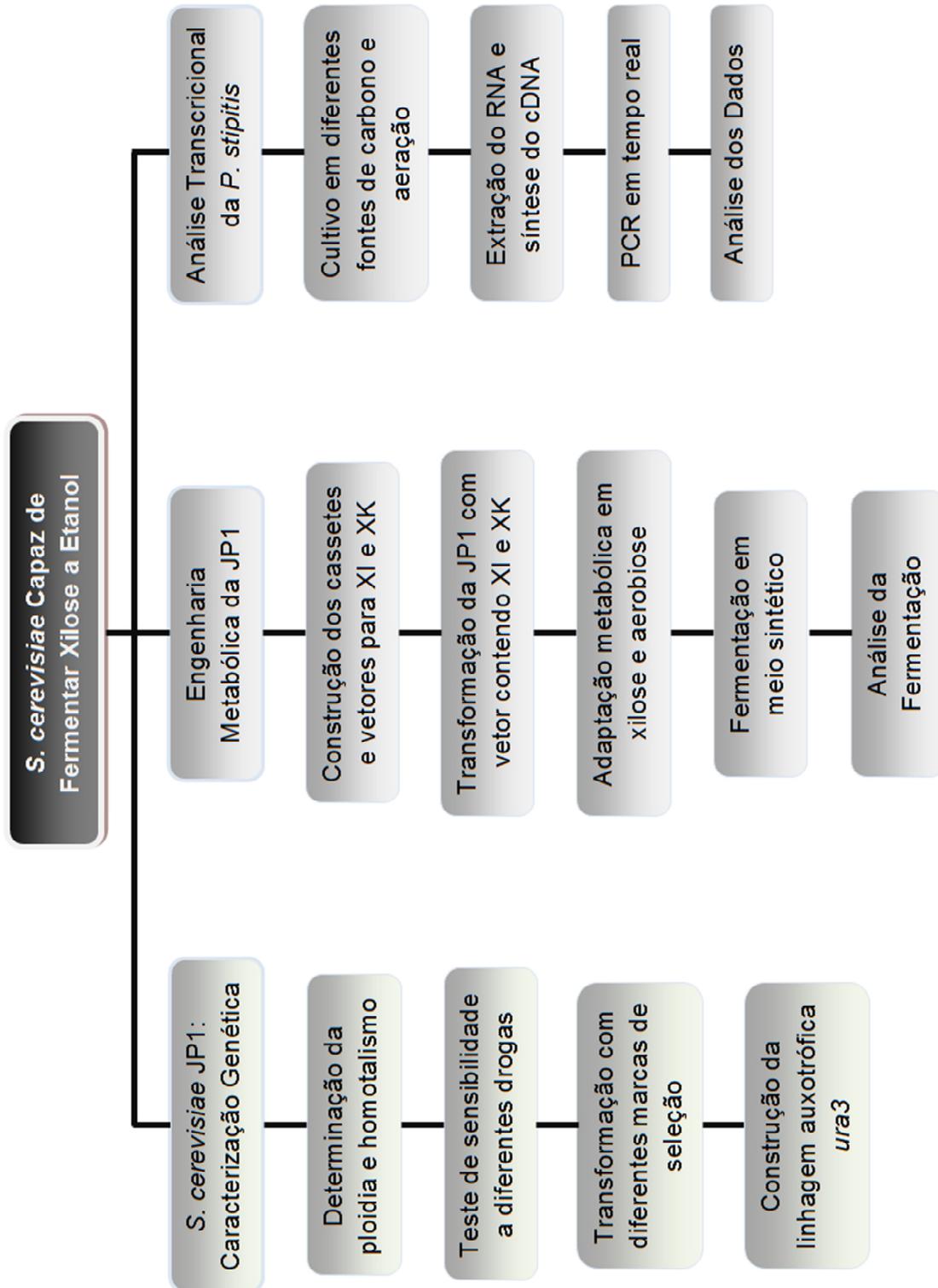
3.41 Quantificação de Proteína

A quantificação da proteína foi feita utilizando-se o reagente comercial de dosagem de proteína *Protein Assay* (Bio Rad), baseado no método colorimétrico de Bradford (Bradford, 1976).

ESTRATÉGIA

4. ESTRATÉGIA

As estratégias usadas para alcançar o objetivo proposto estão representadas no fluxograma abaixo.



RESULTADOS E DISCUSSÃO

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados e discussão deste trabalho estão divididos em capítulos para facilitar a compreensão. No Capítulo 1 estão descritos os resultados obtidos com a caracterização genética da linhagem JP1 bem como da construção da linhagem auxotrófica *ura3*. O Capítulo 2 mostra a obtenção da linhagem industrial de *S. cerevisiae* JP1 capaz de metabolizar xilose. São descritos as construções dos cassetes de expressão contendo os genes envolvidos no metabolismo de xilose, a adaptação da linhagem recombinante em meio com xilose como única fonte de carbono e dados da fermentação anaeróbica. No Capítulo 3 são relatados dados preliminares de análise de expressão dos genes envolvidos no metabolismo de xilose de *P. stipitis* - principalmente com relação aos transportadores - em diferentes concentrações de fonte de carbono.

5.1. CAPÍTULO 1: LEVEDURAS INDUSTRIAIS

Como dito anteriormente, *S. cerevisiae* é o microrganismo mais usado nos processos fermentativos industriais pela sua excelente capacidade fermentativa e por ser bem tolerante aos estresses do bioprocessamento. (Brosnan *et al.*, 2000). O processo fermentativo industrial no Brasil ocorre em condições não-estéreis, a contaminação com bactérias e outras leveduras é inevitável (Amorim *et al.*, 2011). Todavia, a competição favorece a evolução adaptativa de um organismo. Como *S. cerevisiae* é um microrganismo que vem sendo usado pelo homem há milênios para diferentes fins surgiram diversas linhagens com características genéticas mais favoráveis ao ambiente onde foram domesticadas (Borneman *et al.*, 2011). Há, portanto, uma grande diversidade populacional de leveduras onde aquelas que estão fisiologicamente mais adaptadas ao ambiente industrial e à competição com outros microrganismos tendem a dominar (da Silva-Filho *et al.*, 2005; Amorim *et al.*, 2011). Por esse motivo, leveduras provenientes de indústrias alcooleiras estão recebendo uma maior atenção devido à possibilidade de utilização de linhagens mais adaptadas e altamente produtivas.

Além do uso de linhagens adaptadas naturalmente nas dornas de fermentação, é necessário empregar esforços para realizar modificações racionais em leveduras industriais para se melhorar ainda mais o rendimento de etanol. Para isso, é preciso ter conhecimento das características genéticas e fisiológicas da linhagem a ser manipulada, uma vez que a maioria das informações que se tem é resultante do extenso estudo das linhagens laboratoriais, que perderam suas características originais devido a anos de manipulação e cultivo em condições não-estressantes (Wheals *et al.*, 1999). Estudos de genômica comparativa revelam novas ORF e regiões adicionais em diferentes grupos de leveduras industriais que não são encontradas na linhagem referência S288c (Fay e Benavides, 2005; Borneman *et al.*, 2011). Este conhecimento é importante no contexto de um programa de aprimoramento de linhagens industriais.

A linhagem JP1 de *S. cerevisiae* foi isolada na destilaria Agroindustrial Japungu (Santa Rita – PB). Trata-se de uma linhagem dominante dos processos fermentativos

das indústrias desta Região apresentando alta estabilidade e resistência ao estresse dos processos fermentativos como temperatura, pH e etanol. Apresenta uma taxa de conversão de açúcar de 93%, os outros 7% são destinados ao metabolismo celular (da Silva-Filho *et al.*, 2005; Amorim *et al.*, 2011). Entretanto, apresentou baixa taxa de crescimento ($\mu = 0,16 \text{ h}^{-1}$) em meio de melaço quando comparada à linhagem industrial PE2 usada na Região Sudeste ($\mu = 0,23 \text{ h}^{-1}$), igualando-se a esta quando crescida em caldo de cana diluído ($\mu = 0,3 \text{ h}^{-1}$). Não apresenta alta produtividade, nem alto rendimento, provavelmente devido à alta produção de glicerol. Sendo este responsável pela proteção da célula contra estresse osmótico (Almeida *et al.*, 2011). Quanto à sua manipulação genética, JP1 apresentou eficiência de transformação maior que outras leveduras industriais, tanto para vetores episomais quanto para cassetes integrativos (da Silva-Filho *et al.*, 2005).

Para se realizar manipulações genéticas em leveduras é importante o conhecimento de algumas características genéticas básicas como a ploidia e o tipo de ciclo de vida (homotalismo/heterotalismo). A ploidia influencia várias características da célula como tamanho, tempo de geração, tolerâncias ambientais e características sexuais (Gerstein *et al.*, 2006). São encontradas linhagens de *S. cerevisiae* haploides, diploides, aneuploides e poliploides, sendo que as primeiras são mais fáceis para se criar mutantes “null” por recombinação homóloga.

A reprodução de *S. cerevisiae* pode ocorrer tanto de forma assexuada como sexuada. No primeiro caso, a proliferação ocorre por brotamento, ou seja, a célula filha brota da célula mãe e essa divisão celular se dá por mitose (Figura 7). Na forma sexuada, ocorre a fusão de células haploides com tipos de acasalamento diferentes gerando uma célula diploide (Figura 7). Em *S. cerevisiae* são descritos dois *loci* diferentes associados ao acasalamento: *MATa* e *MAT α* . Nas células haploides há apenas um tipo de acasalamento, **a** (*MATa*) ou α (*MAT α*). Células diploides heterozigotas para o *locus* MAT, quando submetidas a estresse nutricional (baixa concentração de fonte de nitrogênio e baixa concentração de fonte de carbono), sofrem meiose e geram 4 esporos haploides, sendo 2 **a** e 2 α (Figura 7) (Herskowitz, 1988).

Outro aspecto importante a ser estudado é o ciclo de vida desta levedura, que podem apresentar dois tipos: homotática (autoférteis) e heterotática (autoestéreis). Essa classificação é apenas para linhagens haploides. Nas linhagens homotáticas, após duas gerações, ocorre uma interconversão do *locus MAT* na célula mãe levando a uma mudança do tipo de acasalamento o que pode levar ao acasalamento das células mãe com a célula filha gerando uma célula diploide (Figura 7). Nas linhagens heterotáticas esta interconversão não ocorre, mantendo estável o tipo de acasalamento da linhagem e também a sua ploidia. Neste último caso, para que haja a formação de uma célula diploide é necessário o cruzamento com outra linhagem com o tipo de acasalamento oposto (Figura 7) (Herskowitz, 1988).

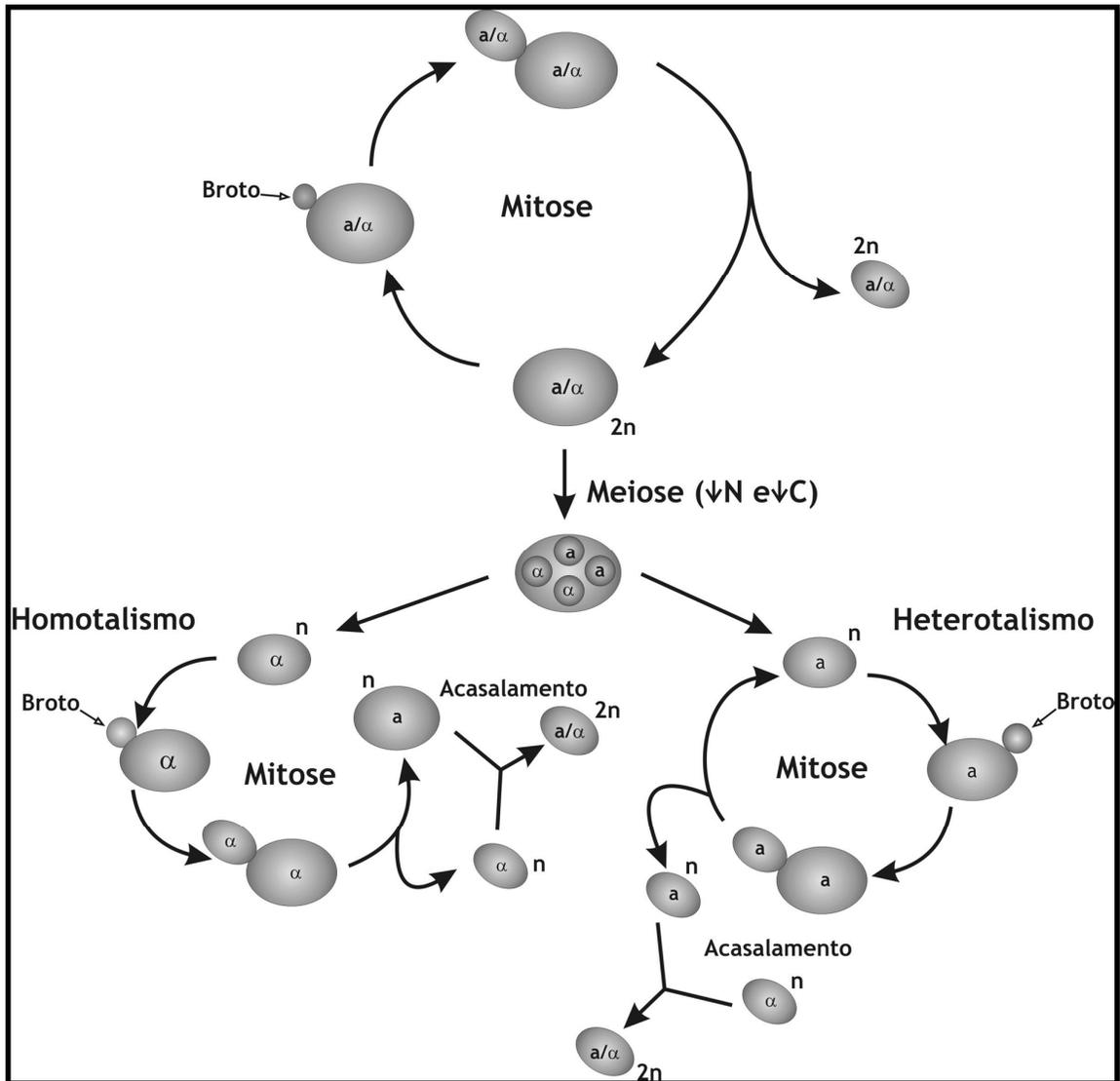


Figura 7: Ciclo de vida e reprodução de *S. cerevisiae*. $\downarrow N$ – baixa fonte de nitrogênio, $\downarrow C$ – baixa fonte de carbono. n célula haploide, $2n$ – célula diploide, a – linhagem com tipo de acasalamento a , α – linhagem com tipo de acasalamento α e a/α – linhagem com os dois tipos de acasalamento.

O tipo de acasalamento se dá pela presença de um *locus* $MATa(\alpha)$ ativo que se encontra entre dois *loci* silenciosos $HML\alpha$ e $HMRa$. O gene responsável pela interconversão do tipo de acasalamento da levedura, HO , codifica para uma endonuclease que cliva nas proximidades do *locus* ativo ($MATa$ ou $MAT\alpha$) permitindo a recombinação com um dos *loci* silenciados ($HML\alpha$ ou $HMRa$) mudando, assim, o tipo de acasalamento ativo da levedura (Strathern *et al.*, 1982; Herskowitz, 1992) (Figura 8). Podem-se obter linhagens haploides estáveis (heterotática) por meio da inativação do *locus* HO .

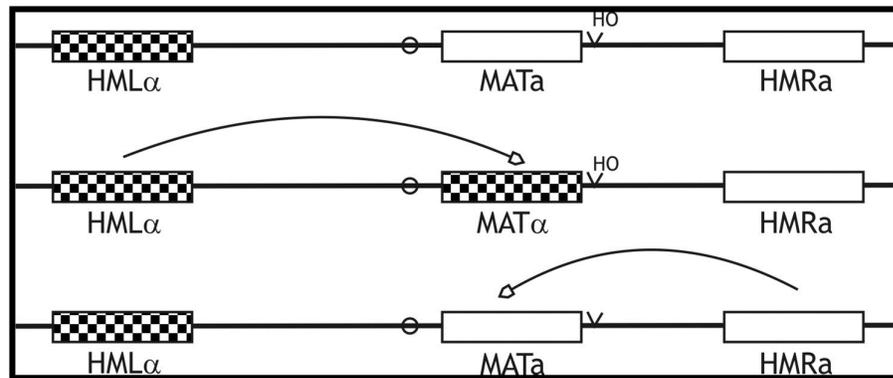


Figura 8: Representação da interconversão do locus ativo MAT. O círculo representa o centrômero, o \vee representa o sítio de clivagem da endonuclease HO e as setas a interconversão.

Outro aspecto importante para a modificação genética de um microrganismo é a forma como as linhagens modificadas são selecionadas. Para isso, são usadas marcas de seleção, que podem ser auxotróficas ou dominantes. Para serem eficientes, as marcas de seleção devem evitar o surgimento de mutantes revertentes (Pronk, 2002). As marcas dominantes são, geralmente, relacionadas à resistência a drogas como antibiótico ou análogos sintéticos de substratos de certas vias metabólicas. As desvantagens destes últimos são a toxicidade e o alto custo, principalmente quando se considera uso industrial (larga escala). No que se refere aos antibióticos, seu custo, a possibilidade de transferência horizontal de genes de resistência, e o fato de afetar as funções celulares são fatores que inibem seu uso em grandes processos fermentativos (Pronk, 2002). Contudo, estas questões podem ser contornadas removendo-se a marca de seleção por meio de recombinação intramolecular uma vez estabelecido o fenótipo desejado. Um dos sistemas eficientes mais usados para este fim é o sistema *Cre-loxP*. Neste caso, as regiões a serem eliminadas são flanqueadas por pequenas sequências repetidas e na mesma direção (sítios *loxP*) que são reconhecidas pela recombinase *CreA* cuja expressão é controlada por um agente indutor externo, geralmente a galactose. A sequência *loxP* tem 34 pb sendo formada por duas sequências repetidas e invertidas de 13 pb separadas por uma sequência central de 8 pb (Sauer, 1987).

Marcas auxotróficas, embora mais aceitas do ponto de vista de biossegurança, têm o uso limitado, pois as leveduras industriais são geralmente diploides ou poliploides. As marcas auxotróficas são bastante usadas em pesquisas laboratoriais,

mas no campo de produção industrial linhagens auxotróficas podem afetar negativamente a produção. Isso se deve a alguns fatores: sobrecarga proteica (em vetores episomais, exceto quando se usa promotor defeitivo); interferência na biossíntese de compostos essenciais devido à suplementação nutricional (Pronk, 2002). Além disso, a mutação auxotrófica afeta o crescimento celular quando comparada à sua progenitora (Baganz *et al.*, 1997).

Leveduras industriais possuem uma genética complexa. Para melhorar e introduzir novas características em linhagens industriais é necessário a integração do conhecimento nas áreas de Genética, Fisiologia e Engenharia Química procurando não afetar as características que a tornam aptas ao ambiente estressante das dornas industriais (Amorim *et al.*, 2011). Sendo assim, neste trabalho procuramos conhecimento básico sobre a genética de *S. cerevisiae* JP1 a fim de que esta linhagem possa se tornar uma plataforma para futuros melhoramentos genéticos relacionados com a produção de etanol ou outros bioprodutos. Dentre as características estudadas, buscamos conhecer sua ploidia, homotalismo, sensibilidade ou não a drogas e a eficiência de transformação com diferentes marcas de seleção. Finalmente, construímos uma linhagem auxotrófica *ura3* que servirá como ferramenta genética para futuros trabalhos de investigação.

5.1.1. Determinação de Ploidia

Para investigar a ploidia da linhagem JP1 foram feitos os seguintes experimentos: indução de esporulação, análise do tipo de acasalamento e determinação do conteúdo de DNA por citometria de fluxo.

Teste de esporulação

As leveduras JP1, CEN.PK2, PE2 (diploide) e RE1006 (haploide) foram semeadas em meio pobre em nutrientes para induzir a esporulação, fenômeno que ocorre em células diploides, poliploides e aneuploides. A análise em microscópio óptico confirmou que JP1 não é haploide, pois foi possível a visualização de ascósporos contendo a tétrade (4 esporos) (Figura 9). O mesmo ocorreu com as linhagens controle PE2 e CEN.PK2 e, como esperado, não foi possível identificar ascósporos na linhagem controle haploide RE1006 (Figura 9).

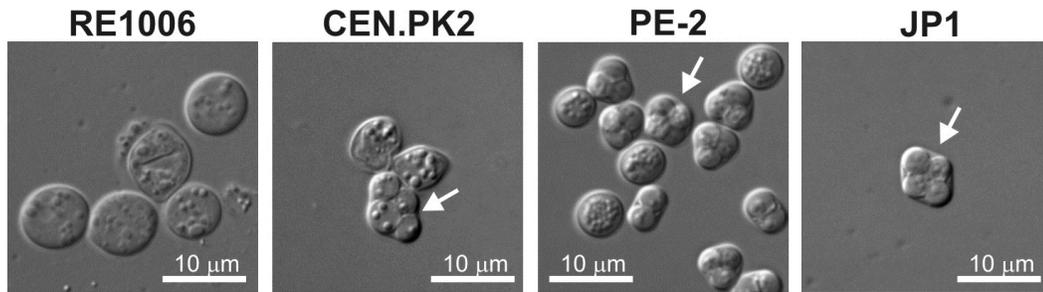


Figura 9. Fotomicrografia de células de *S. cerevisiae*. As células foram crescidas em meio SPO e visualizadas com uma objetiva de 100X 1.3 usando DIC (*Differential Interference Contrast*). **RE1006:** controle haploide, **JP1:** linhagem industrial, **CEN.PK2:** controle diploide e **PE2:** linhagem industrial diploide. As setas indicam os ascósporos.

Determinação do tipo de acasalamento

Para a determinação do tipo de acasalamento foram utilizadas as leveduras JP1 e linhagens controle RE1006, CEN.PK2, PE2 e S288c. Para tanto, foi feita uma PCR de colônia para o *loci* *MAT* com *primers* específicos (*MAT-Fa*, *MAT-Fα* e *MAT-R*) para cada *locus* (*MATa* e *MATα*) conforme descrito por Huxley (1990). Observou-se amplificação de 2 fragmentos referentes aos *loci* *MATa* (544 pb) e *MATα* (404 pb) nas linhagens JP1, CEN.PK2, PE2, e a amplificação de apenas *MATa* na linhagem RE1006, e *MATα*, nas linhagens S288c (Figura 10). Células haploides apresentam apenas um *locus* para um tipo de acasalamento e células diploides ambos os *loci*. Isso confirma que JP1 não é haploide.

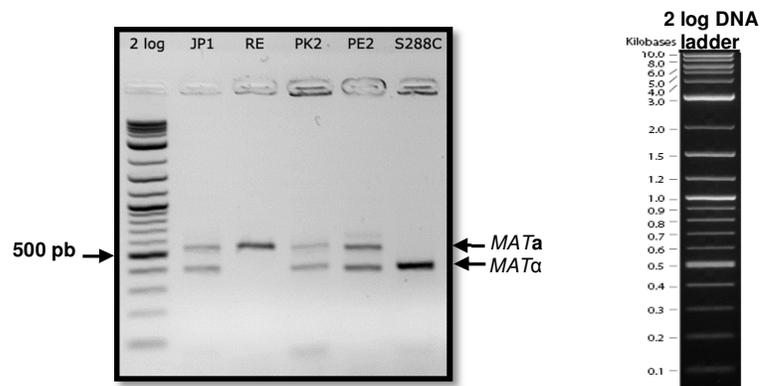


Figura 10: Determinação do tipo de acasalamento por PCR de colônia do *locus* *MAT*. Eletroforese em gel de agarose 1,5%. **2 log:** marcador 2 log DNA ladder (Biolabs); **JP1:** levedura industrial, **RE:** RE1006 (haploide); **PK2:** CEN.PK2 (diploide); **PE2:** levedura industrial diploide; **S288c:** haploide; **2 log DNA ladder:** padrão do marcador de massa molecular.

Citometria de Fluxo

A citometria de fluxo é uma técnica que permite obter informações das características físicas e químicas de uma célula por meio da análise, de uma só vez,

do tamanho da célula, da sua complexidade e da emissão de fluorescência quando se usa um corante. Portanto, essa técnica permite determinar com mais precisão a ploidia da célula por meio da comparação do conteúdo DNA total de cada célula corado com um corante fluorescente. A quantidade de fluorescência emitida pela célula tem relação direta com o conteúdo de ácidos nucleicos.

Foi feita citometria de fluxo das linhagens JP1 e dos controles RE1006, CEN.PK2 e PE2. As células foram coradas com iodeto de propídio. Pela análise do histograma (Figura 11) pode-se observar que o pico de fluorescência de JP1 coincide com o da linhagem industrial PE2 situando-se entre os picos correspondentes da linhagem haploide (RE1006) e da linhagem diploide (CEN.PK2). Foram observados picos únicos, pois as células cresceram até a fase estacionária. Isso descarta a possibilidade de se ter analisado células em diferentes fases do ciclo celular G1/G2 (Olaiya & Sogin, 1979).

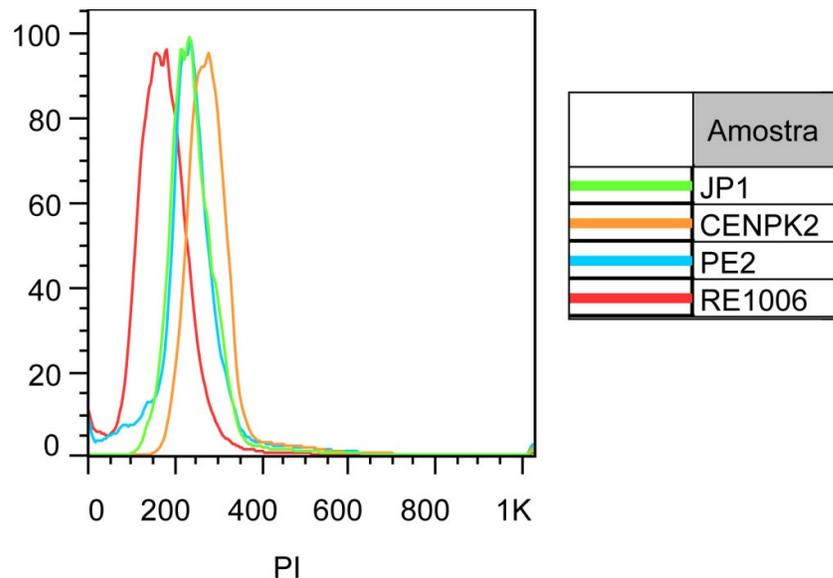


Figura 11: Análise do conteúdo de DNA de diferentes linhagens de *S. cerevisiae*. Histograma de fluorescência das linhagens JP1, PE2, CEN.PK2 e RE1006 coradas com iodeto de propídio. O eixo horizontal indica o conteúdo de DNA pela intensidade de fluorescência e o eixo vertical o número de células medidas.

Os dados da análise de ploidia demonstram que a linhagem JP1 é diploide, pois foi detectada a presença de tetrade, dos dois *loci MAT*, além de apresentar um conteúdo de DNA próximo do conteúdo genômico de uma linhagem industrial

reconhecidamente diploide (PE2). O fato do conteúdo de DNA das linhagens JP1 e PE2 ser menor que o controle diplóide (CEN.PK2) pode ser atribuído ao polimorfismo cromossomal entre linhagens industriais e laboratoriais que se reflete na variação do número e/ou tamanho dos cromossomos. O polimorfismo cromossomal deve ser comum em linhagens industriais devido às condições estressantes a que são submetidas. De fato, experimentos de separação de cromossomos por PFGE mostram que a linhagem JP1 possui 15 bandas cromossomais, tendo sido observado a ausência da banda de 2500 kb encontrada em linhagens laboratoriais (Lucena *et al.*, 2007). Quanto à linhagem PE2, foi observada uma variação no tamanho dos cromossomos em relação à linhagem laboratorial-referência S288c (Argueso *et al.*, 2009). *S. cerevisiae* é evolutivamente diploide, estudos mostram que linhagens haploides e tetraploides tendem a ser diploide tanto em meio não estressante quanto em meio estressante após 1800 gerações (Gerstein *et al.*, 2006).

5.1.2. Determinação do ciclo de vida

Para verificar se a linhagem JP1 é homotática ou heterotática foi feita a dissecação das tétrades e análise da ploidia de cada esporo. Após 3 dias de cultivo em meio de esporulação, foi feita uma análise quantitativa em microscópio óptico dos ascósporos. Foi verificada a presença de ascósporos com 4, 3 e 2 esporos assim como ausência de esporos (Tabela 7).

Tabela 7: Análise quantitativa dos esporos. Contagem em câmara de Neubauer do número de esporos em cada ascósporo.

Tipo	Valor absoluto	Valor relativo (%)
4 esporos	79	11,4
3 esporos	150	21,6
2 esporos	134	19,3
Ausência de esporo	329	47,5
Total	692	

Após tratamento enzimático, 40 tétrades foram dissecadas. A viabilidade das tétrades está mostrada na Tabela 8.

Tabela 8: Análise quantitativa da viabilidade dos esporos

<i>Esporos viáveis</i>	<i>Valor absoluto</i>	<i>Valor relativo (%)</i>
4 esporos	22	64,7
3 esporos	5	14,7
2 esporos	6	17,7
1 esporo	0	0
Ausência de esporo	1	2,9
Total	34	100

Em seguida, foram escolhidos 6 grupo de esporos oriundos da mesma tétrade para determinação do *locus MAT* presente em cada esporo. A análise foi feita por PCR de colônia pela amplificação de regiões específicas de cada *locus MAT*. Pode-se observar a amplificação de 2 fragmentos referentes aos *loci MATa* e *MAT α* na linhagem JP1 nativa, e um perfil variado quanto aos esporos. Na Figura 12 é possível visualizar um exemplo de cada perfil encontrado. A maioria dos esporos apresentou ambos os fragmentos indicando uma diploidização da linhagem (Figura 12a, 12b poços 3 a 5 e figura 12c poços 3 e 6). Apenas 3 esporos apresentaram um fragmento amplificado. (Figura 12b poços 6 e figura 12c poços 4 e 5).

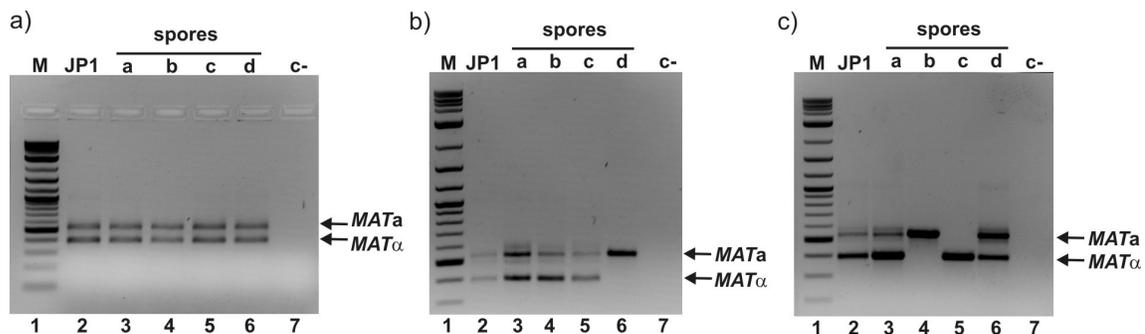


Figura 12: Análise do ciclo de vida da JP1. Eletroforese da PCR de colônia para *loci MAT* dos 4 esporos derivados de 3 asci (a-d). **M:** marcador 2-log DNA ladder (biolabs); **JP1:** linhagem original JP1; **c-:** controle negativo da reação (sem DNA).

Os resultados obtidos são compatíveis com dados da literatura. Linhagens industriais de *S. cerevisiae* de diferentes setores (indústria do vinho, cerveja e pão) foram analisadas apresentando uma ploidia bem variável, assim como o índice de esporulação (0-95%), e a viabilidade dos esporos (0-98%). A viabilidade dos esporos derivados da JP1 de 64,7% pode ser explicada por mutações letais recessivas da linhagem, rearranjo/segregação cromossômica irregular, ou parâmetros ambientais (Bilinski & Casey, 1989). A amplificação de ambos *loci MAT* nos esporos derivados

da linhagem JP1 é uma evidência de que esta é homotática. Já que houve mudança do tipo de acasalamento e a formação de diploides. O fato de alguns esporos não terem apresentados a interconversão do tipo de acasalamento, pode ser explicado pela presença de mutações recessivas de genes envolvidos na via de interconversão do tipo de acasalamento em um dos *loci*. Por exemplo, heterotalismo em *S. cerevisiae* isolada da natureza foi associada com mutações no gene HO que codifica para a endonuclease que desencadeia a recombinação no *locus* do gene MAT (Katz Ezov *et al.*, 2010). Na verdade, uma abordagem comumente usada para gerar linhagens heterotáticas é simplesmente eliminar o gene HO (Tamai *et al.*, 2001).

5.1.3. Estudo das Marcas Dominantes em Linhagem Industrial

Para se utilizar as marcas dominantes, é necessário determinar se a levedura em questão é sensível às drogas escolhidas para permitir uma seleção genética eficaz e avaliar a eficiência de transformação que a mesma proporciona.

Concentração Mínima Inibitória para *S. cerevisiae*

As drogas G418, zeocina, higromicina, PFP e canavanina foram testadas na linhagem industrial JP1 para verificar sua sensibilidade às mesmas. Este teste permitiu selecionar drogas que foram utilizados neste trabalho.

✦ PFP

A marca de resistência à droga PFP (suplementada com tirosina) é uma marca de seleção dominante e vem sendo usada com sucesso em leveduras oriundas da indústria do vinho. A resistência é conferida por um gene endógeno (*ARO4*) que possui apenas uma mutação pontual Q166K (alelo *ARO4*-OFP) causada por uma transversão na base 496 (CAA→AAA) (Fukada *et al.*, 1992). O gene *ARO4* codifica para a enzima 3-deoxi-D-arabino-heptulosonato-7-fosfato sintase (DAHP sintase). Essa enzima catalisa a primeira reação de biossíntese dos aminoácidos aromáticos, onde a eritrose-4-fosfato se condensa a fosfoenolpiruvato resultando na 3-deoxi-D-arabino-heptulosonato-7-fosfato (DAHP). A isoenzima codificada pelo gene *ARO4* é inibida pela tirosina (Meuris, 1974). As reações subsequentes levam à formação do corismato, que gera antranilato e preferato. O

antranilato é o precursor do triptofano, e o prefenato de fenilalanina e tirosina. O alelo *ARO4-OFP* torna a enzima DAHP sintase insensível à inibição por tirosina e apresenta resistência às drogas OFP e PFP + tirosina, mas é sensível a PFP (Fukuda *et al.*, 1991). O PFP é um análogo da fenilalanina, portanto, regula a inibição das enzimas DAHP sintase e prefenato desidratase impedindo a biossíntese de fenilalanina. Ao se adicionar tirosina, há inibição da ação da enzima prefenato desidrogenase, desviando a via para biossíntese de fenilalanina, ocorrendo o mesmo para a síntese de triptofano (Fukuda *et al.*, 1990) (Figura 13).

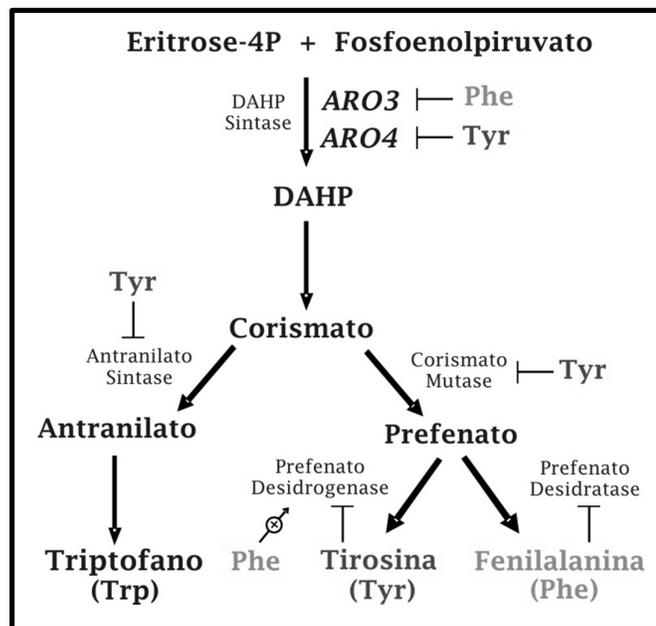


Figura 13: Esquema condensado da via de biossíntese dos aminoácidos aromáticos

Para se determinar a concentração mínima inibitória (MIC) da droga PFP foram utilizadas as seguintes concentrações: 5 mg/mL, 4 mg/mL, 3 mg/ml, 2 mg/mL, 1 mg/mL, 0,75 mg/mL, 0,50 mg/mL, 0,40 mg/mL, 0,3 mg/mL, 0,2 mg/mL, 0,1 mg/mL e 0,05 mg/mL. Foram aplicadas diluições da cultura de células nas placas de MD com diferentes concentrações de PFP contendo 0,09% tirosina, e sem PFP (controle). O crescimento das células foi acompanhado por até 96 horas.

Podemos observar o resultado na Tabela 9, onde a área sombreada indica crescimento celular. Esse resultado difere do encontrado por Cebollero & Gonzalez

(2004), o que é justificado por se tratar de uma linhagem diferente. Para a linhagem JP1 foi definida a concentração de uso de PFP de 300 µg/mL.

Tabela 9: MIC para PFP. As colunas indicam diferentes concentrações da droga PFP, as linhas indicam as diluições das células e o sombreamento indica crescimento celular.

Concentração (mg/mL) Nº de células	5	4	3	2	1	0,75	0,5	0,4	0,3	0,2	0,1	0,05
10 ⁸												
10 ⁷												
10 ⁶												
10 ⁵												
10 ⁴												
10 ³												

↗ Canavanina

A resistência à droga canavanina se dá quando o gene *CAN1*, não essencial, perde sua função. O gene *CAN1* codifica para a arginina permease que permite a entrada de arginina na célula. A droga canavanina é um análogo letal da arginina, portanto, leveduras cujo gene *CAN1* foi deletado crescem na presença da droga, desde que não tenha arginina no meio, pois ambas possuem a mesma afinidade pela permease ocorrendo competição entre a arginina e canavanina (Amberg *et al.*, 2005).

A canavanina foi testada em meio MD nas concentrações de 30 µg/mL, 60 µg/mL e 90 µg/mL, além do controle sem a droga. A linhagem IH1788 foi utilizada como controle positivo de crescimento por ser *can1*. A linhagem JP1 cresceu apenas na placa controle tendo havido crescimento da linhagem IH1788 em todas as diluições e concentrações testadas (Figura 14). Diante desse resultado, foi decidido utilizar a concentração de 60 µg/mL canavanina, conforme recomendado na literatura (Cunha *et al.*, 2006).

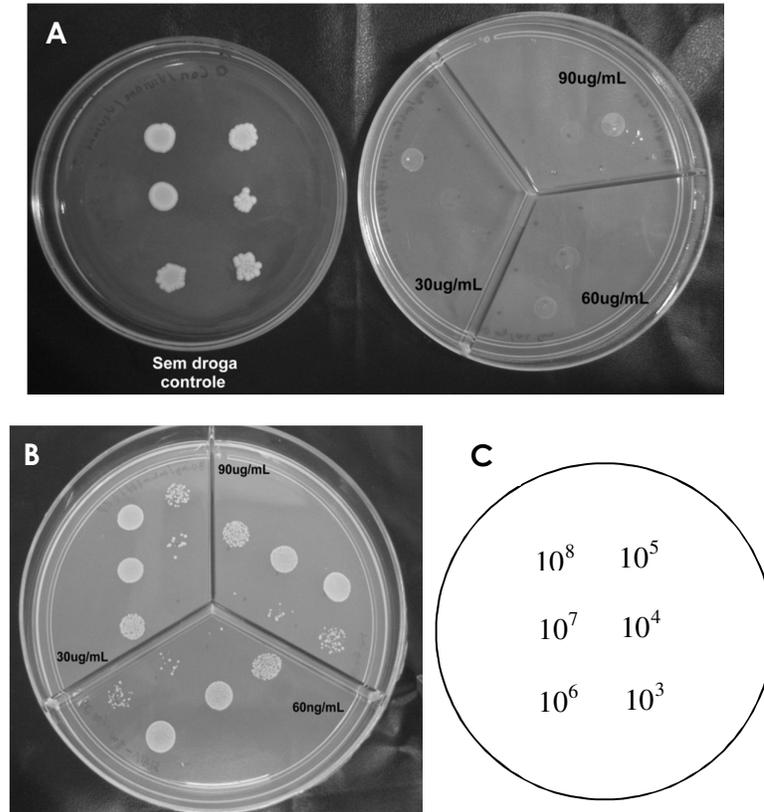


Figura 14: MIC para canavanina. A) Linhagem JP1. B) Linhagem IH1788. C) Esquema das diluições

^ Higromicina B

A higromicina B é um antibiótico aminoglicosídeo isolado da bactéria *Streptomyces hygroscopicus*. A droga age na síntese proteica, no sítio de ligação do tRNA, impedindo a translocação tanto em procaríotos quanto em eucaríotos (González *et al.*, 1978). O gene de resistência *hph*, que codifica para higromicina B fosfotransferase (Hph) foi identificado em *E. coli*. A enzima Hph inativa o antibiótico por fosforilação (Gritz & Davies, 1983)

Para o teste com o antibiótico higromicina B em placas de YPD, foram utilizadas as seguintes concentrações: 100 µg/mL, 200 µg/mL e 300 µg/mL. Após 96 horas de cultivo, pode-se observar crescimento da diluição de 10^8 apenas na placa com 100 µg/mL da droga (Figura 15). Foi decidido, pois, utilizar a concentração de 200 µg/mL de higromicina B, diferentemente do recomendado na literatura, 300 µg/mL (Hansen *et al.*, 2003).

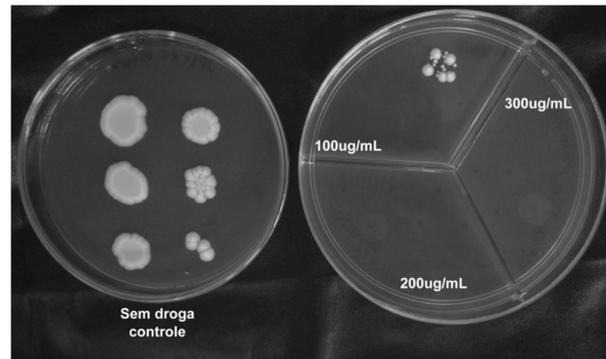


Figura 15: MIC da linhagem JP1 para higromicina B.

▲ Zeocina

A zeocina, antibiótico da família fleomicina/bleomicina foi isolada de *Streptomyces verticillus*. Trata-se de um glicopeptídeo quelante de cobre. Atua ligando-se e quebrando o DNA e causando morte celular. A proteína que confere resistência a zeocina é codificada pelo gene *ble* - presente no Tn5 de *Streptoalloteichus hindustanus* - e se liga à droga impedindo a clivagem do DNA (Gatignol *et al.*, 1987).

As concentrações utilizadas para o teste com zeocina em placa de YPD foram: 50 $\mu\text{g/mL}$, 70 $\mu\text{g/mL}$, 100 $\mu\text{g/mL}$ e o controle sem a droga. Após 96 h, foi observado crescimento na placa controle e com a diluição de 10^8 nas concentrações de 50 $\mu\text{g/mL}$ e 70 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 16). Foi decidido, portanto, utilizar a concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$.

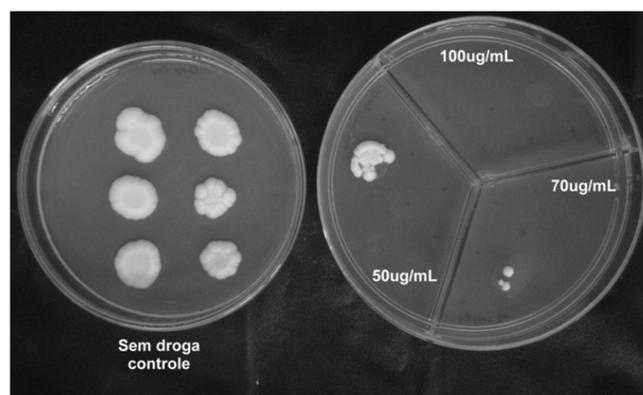


Figura 16: MIC da linhagem JP1 para zeocina.

▲ G418 (Geneticina)

G418 é um antibiótico aminoglicosídeo produzido pela bactéria *Micromonospora rhodorangea* e que afeta a síntese proteica inibindo a etapa de alongação (Bar-Nun *et al.*, 1983). O gene que confere resistência a G418 em leveduras é o mesmo que confere resistência a kanamicina em bactérias (*kan*) (Jimenez & Davies, 1980). Este gene foi isolado do transposon Tn903 de *E. coli* que codifica para a aminoglicosídeo 3 fosfotransferase - APH 3'II (Beck *et al.*, 1982).

Para o antibiótico G418 foram utilizadas as seguintes concentrações em placa de YPD: 50 µg/mL, 100 µg/mL, 200 µg/mL e 300 µg/mL. Foram utilizadas as linhagens JP1, MFL e RE1006 nos ensaios de inibição. Após 96 horas, pode-se observar o crescimento celular na placa controle e apenas na diluição 10⁸ na concentração de 50 µg/mL para JP1 (Figura 17A). Na linhagem MFL, além do crescimento na placa controle, observou-se crescimento celular na diluição 10⁸ nas concentrações de 50 e 100 µg/mL (Figura 17B). Para RE1006, foi observado crescimento celular em todas as diluições no controle e nas concentrações de 50 e 100 µg/mL. Na concentração de 200 µg/mL foi observada uma colônia na diluição de 10⁸ (Figura 17C). Portanto, foi decidido utilizar a concentração de 100 µg/mL para a linhagem JP1, e 200 µg/mL para a linhagem MFL e RE1006.

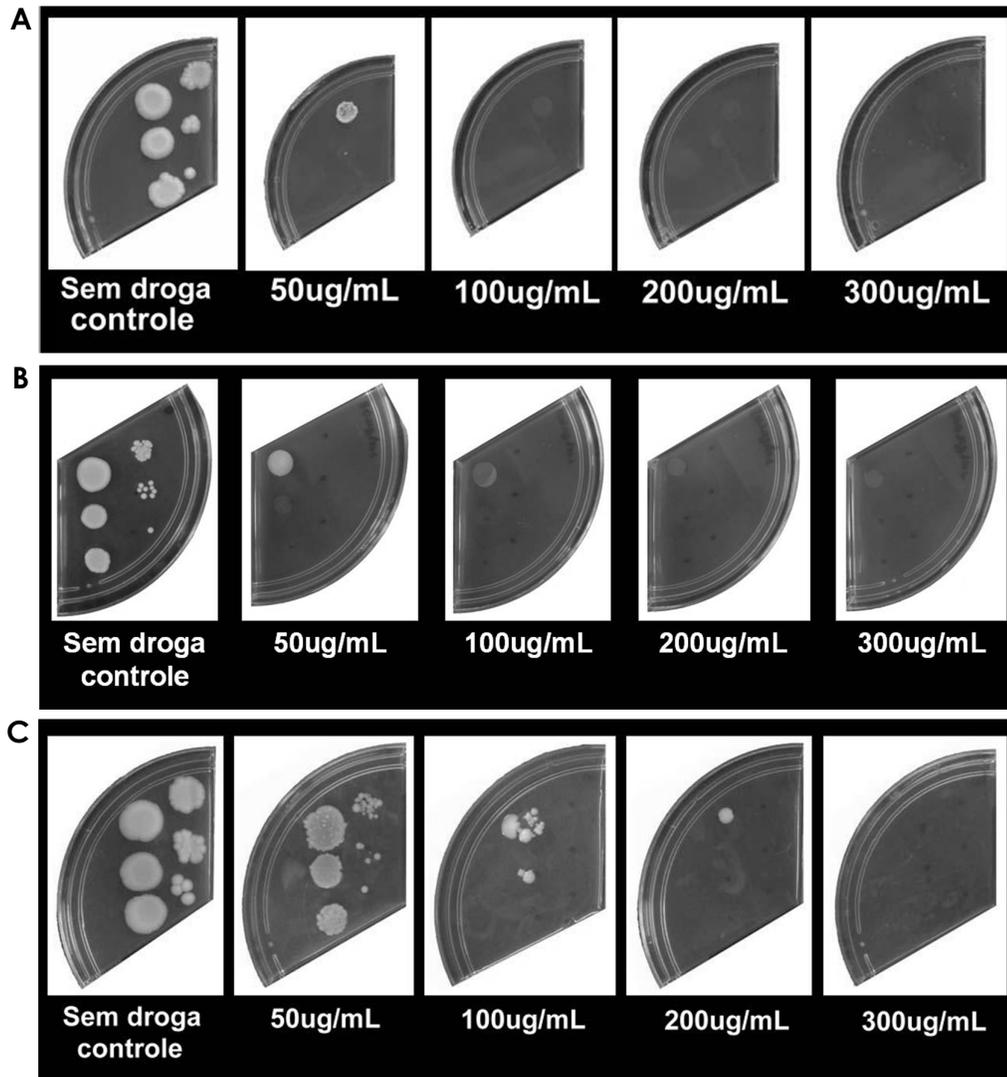


Figura 17: MIC para G418. A) linhagem JP1. B) linhagem MFL. C) linhagem RE1006

A sensibilidade maior da linhagem JP1 em relação à linhagem laboratorial haploide e em relação ao descrito na literatura se deve ao fato da mesma ser diploide onde uma mutação de resistência recessiva tem que ocorrer nos dois alelos (Zeyl, 2004; Gerstein & Otto, 2009). Linhagens tetraploide de *S. cerevisiae* são mais sensíveis a certas drogas que as parentais diploides (Storchová *et al.*, 2006).

Construção do vetor epissomal com a marca de resistência a zeocina

A fim de testar a capacidade de seleção das diferentes marcas de resistência dominante, foram usados vetores epissomais contendo cassete de resistência das

drogas testadas. Como não possuíamos um vetor com a marca de resistência zeocina, este foi construído conforme descrito a seguir.

O vetor epissomal com resistência a zeocina construído foi baseado no cassete do vetor pPICZ α , cujos promotores para levedura e bactéria são *TEF1* e EM7, respectivamente, e o terminador de transcrição é o do gene *CYC1*. O vetor pYC240 foi digerido com a enzima de restrição *Ascl* para remoção do cassete de resistência a higromicina (~1600pb). Em seguida, o vetor pYC240 (*Ascl*) foi purificado por eluição do gel de agarose.

A obtenção do fragmento do cassete de zeocina e clonagem no vetor de expressão foram realizadas pelo aluno de mestrado Osmar Oliveira Neto, sob minha orientação. O cassete de resistência a zeocina (1,1 kb) foi amplificado por PCR usando o vetor pPICZ α como molde. A reação foi feita com a enzima *Phusion® DNA polimerase* e os *primers* ZeoBlasF2 / ZeoBlasR2. O fragmento da PCR foi purificado e clonado no vetor pBlueScript® II SK (+/-) previamente digerido com *EcoRV*, resultando no vetor pBlueZeo. Posteriormente, o vetor pBlueZeo foi digerido com a enzima de restrição *Ascl* e o fragmento referente ao cassete de zeocina foi purificado e subclonado no vetor YC240 previamente digerido com *Ascl* e, defosforilado. A confirmação da clonagem foi feita digerindo-se os transformantes com *Ascl*, onde pode-se observar a liberação de um fragmento de 1,1 kb correspondente ao cassete de zeocina (Figura 18A). O vetor resultante foi denominado pYC280 (Figura 18B).

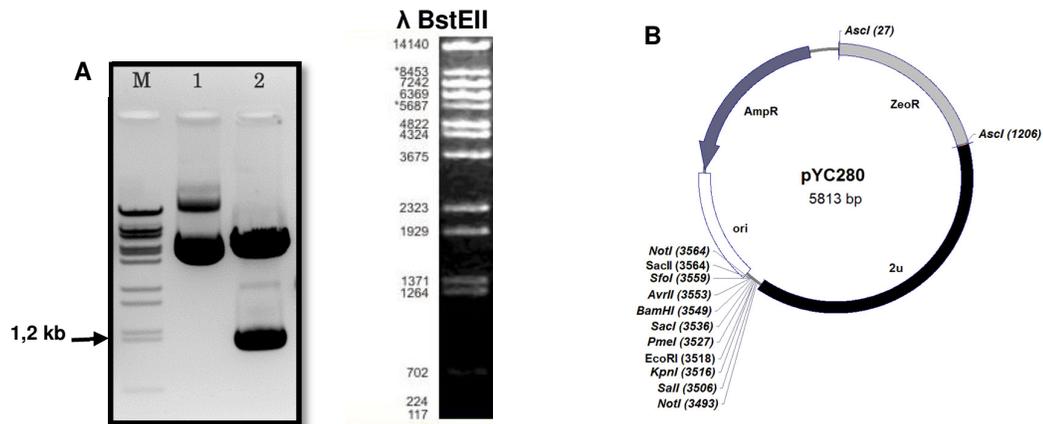


Figura 18: Vetor pYC280. A) Perfil de restrição com a enzima de restrição *Ascl*. Eletroforese em gel de agarose 0,8%. M: marcador λ BstEII; poço 1: plasmídeo intacto; poço 2: plasmídeo digerido; λ BstEII padrão do marcador de massa molecular B) Mapa físico do vetor pYC280.

Detecção do plasmídeo nativo 2 micron (2 μ)

A levedura *S. cerevisiae* possui um plasmídeo endógeno denominado 2 μ (genótipo *cir⁺*) presente em 60 a 100 cópias por célula. Apresenta-se como uma estrutura de alteres (Figura 19), dividida em região direita e esquerda, unidos por uma região central de sequências invertidas repetidas (IR). A região da esquerda possui os *loci* *FLP* e *REP2*, o primeiro codifica para a proteína recombinase. A região da direita possui os *loci* *REP1*, *RAF*, *STB* e *ORI*. Na região central há sítios de recombinação *FRT* que são reconhecidos pela recombinase *FLP*. Os *loci* *REP1*, *REP2*, *RAF*, *STB* estão envolvidos no processo de divisão e *STB* e *ORI* no processo de replicação, sendo *ORI* a origem de replicação e o *STB* responsável pela estabilidade (para revisão ver Bijvoet *et al.*, 1991; Falcon *et al.*, 2005; Xiao & Rank, 1996).

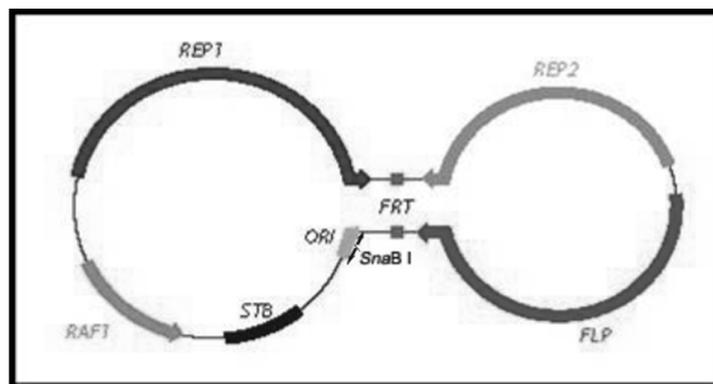


Figura 19: Modelo esquemático do plasmídeo 2 μ de *S. cerevisiae*.

Os vetores epissomais se mantêm nas células por dois motivos. Primeiro, possuem um fragmento de replicação do plasmídio nativo 2 μ de *S. cerevisiae*. Segundo, pela presença do plasmídio nativo devido aos produtos dos elementos *trans* necessários a replicação do vetor epissomal. Para verificar a presença do plasmídio nativo 2 μ na linhagem JP1 foi feita uma PCR de colônia com os *primers* FLPIN5 / FLPIN3 que se anelam na região FLP o que resulta na amplificação de um fragmento de ~600 pb (Figura 20). Isso demonstra que a linhagem JP1 é cir⁺, portanto, é capaz de receber e manter vetores epissomais.

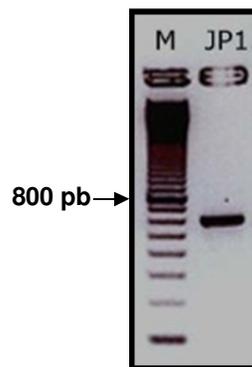


Figura 20: Detecção do plasmídio nativo 2 μ . Eletroforese em gel de agarose 1,5% da PCR de colônia referente a região FLP. **M:** marcador 100 pb ladder (Amersham Pharmacia); **JP1:** amplicon a partir da linhagem JP1.

Transformação da linhagem JP1 com vetores contendo marca de seleção dominante.

A levedura *S. cerevisiae* JP1 foi transformada com os seguintes vetores contendo marca de resistência dominante: pYC230 (resistência a G418), pYC240 (resistência a higromicina B), pYC280 (resistência a zeocina), e pEA2 (resistência a PFP e tirosina), pelo protocolo de transformação em fase estacionária (Chen *et al.*, 1992). Foram utilizados meio complexo para as marcas de resistência a antibiótico e meio mínimo para a seleção com PFP + tirosina. Como controle, células sem vetor foram submetidas ao mesmo processo de transformação e semeadas na mesma concentração de células e meio que os utilizados para os referidos vetores.

Na transformação foram utilizadas ~2 μ g de DNA sendo semeadas $1,5 \times 10^7$ células/placa. Na Tabela 10, pode-se observar o número de transformantes obtidos para cada vetor. Para os vetores contendo marca de resistência a antibiótico não foi observada colônia nas placas controle, exceto para zeocina. O vetor pEA2 teve a

melhor taxa de transformação, entretanto, foram observados transformantes na placa controle, o que indica uma taxa de resistência natural de $1,6 \times 10^{-5}$.

Tabela 10: Transformação de JP1 com plasmídios epissomais.

Vetor	Resistência	Nº colônias *	Nº colônias * - controle negativo	Eficiência (col/ μ g DNA)
pYC230	G418	566	0	$6,06 \times 10^2$
pYC240	Higromicina	1460	0	$2,67 \times 10^3$
pYC280	Zeocina	357	1	$2,9 \times 10^2$
pEA2	PFP + Tir	1228	243	$6,4 \times 10^3$

* - nº de colônias / $1,5 \times 10^7$ células

A eficiência de transformação com os vetores epissomais foi inferior ao relatado por da Silva-Filho *et al.* (2005). Esse fato pode ser devido à 2 fatores: a técnica de transformação empregada neste estudo que é menos eficiente que a usada por aqueles autores, bem como o tipo de vetor usado neste trabalho (epissomal) em relação ao trabalho anterior (centromérico). Trabalhos relatam que a eficiência de transformação de vetor epissomal é menor que vetor centromérico (Baruffini *et al.*, 2009). O vetor pEA2 (marca ARO4-OFP) apresentou a melhor eficiência de transformação, mesmo se levarmos em consideração os falsos positivos. Estudos mostram que ao aumentar a concentração de PFP até 1 mg/mL há uma redução dos falsos positivos para 0 (Shimura *et al.*, 1993). Entretanto, Cebollero e Gonzalez (2004) relataram a presença de falsos positivos em nível de 10% dos transformantes usando o vetor pEA2 e concentração da droga superior a 1 mg/mL. Dentre os vetores com marca de resistência a antibiótico, o que apresentou a melhor eficiência de transformação foi o vetor pYC240 (resistência a higromicina). A pior foi com o vetor com a marca de resistência a zeocina.

Para confirmar a presença do vetor nas colônias de levedura transformada, foi feita uma PCR de colônia de 5 clones escolhidos aleatoriamente. Como controle positivo da reação, foi utilizado o próprio vetor como molde; o controle negativo foi a reação sem DNA (Figura 21). Foram utilizados *primers* específicos para a região do cassete da marca dominante do vetor: (i) higromicina B (hph1/hph3), fragmento de 1 kb; (ii) G418 (G418F/G418R), fragmento de ~1,6 kb e (iii) zeocina (ZeoBlasF2/ZeoBlasR2), fragmento de 1,1 kb.

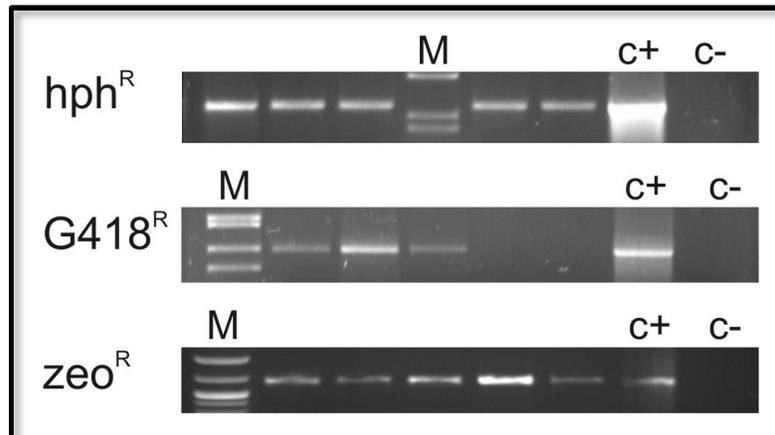


Figura 21: Confirmação dos transformantes resistentes a diferentes antibióticos. Eletroforese em gel de agarose 0,8% das PCR de colônias de transformantes resistentes a higromicina B (**hph^R**), G418 (**G418^R**), zeocina (**zeo^R**). **M**: marcador, **c+**: controle positivo da PCR e **c-**: controle negativo da PCR.

Pode-se observar amplificação do controle positivo e dos clones selecionados, exceto para dois clones obtidos da transformação com o vetor pYC230 (G418). Portanto, houve transformação da linhagem industrial JP1 com os vetores contendo marca de resistência a antibiótico.

5.1.4. Obtenção de uma linhagem JP1 auxotrófica para uracila

Para facilitar os estudos e análises preliminares com a linhagem JP1 em escala laboratorial, foi gerada a linhagem auxotrófica JPU (*ura3/ura3*), pela deleção dupla do gene *URA3*, que codifica para a enzima orotidina 5-fosfato decarboxilase. Esse processo ocorreu por recombinação homóloga. Para tanto, foram construídos dois cassetes de deleção flanqueados por sequências *loxP*. Um com a marca de seleção para zeocina, e outro para G418. Nas extremidades dos cassetes de deleção foram adicionadas sequências homólogas às regiões adjacentes ao gene *URA3*. O mínimo necessário para que ocorra a recombinação em *S. cerevisiae* são 40 pb (Güldener *et al.*, 1996). Usamos uma região de tamanho maior (~400 pb) para garantir o processo de integração. A Figura 22 mostra a estratégia de construção do cassete de deleção.

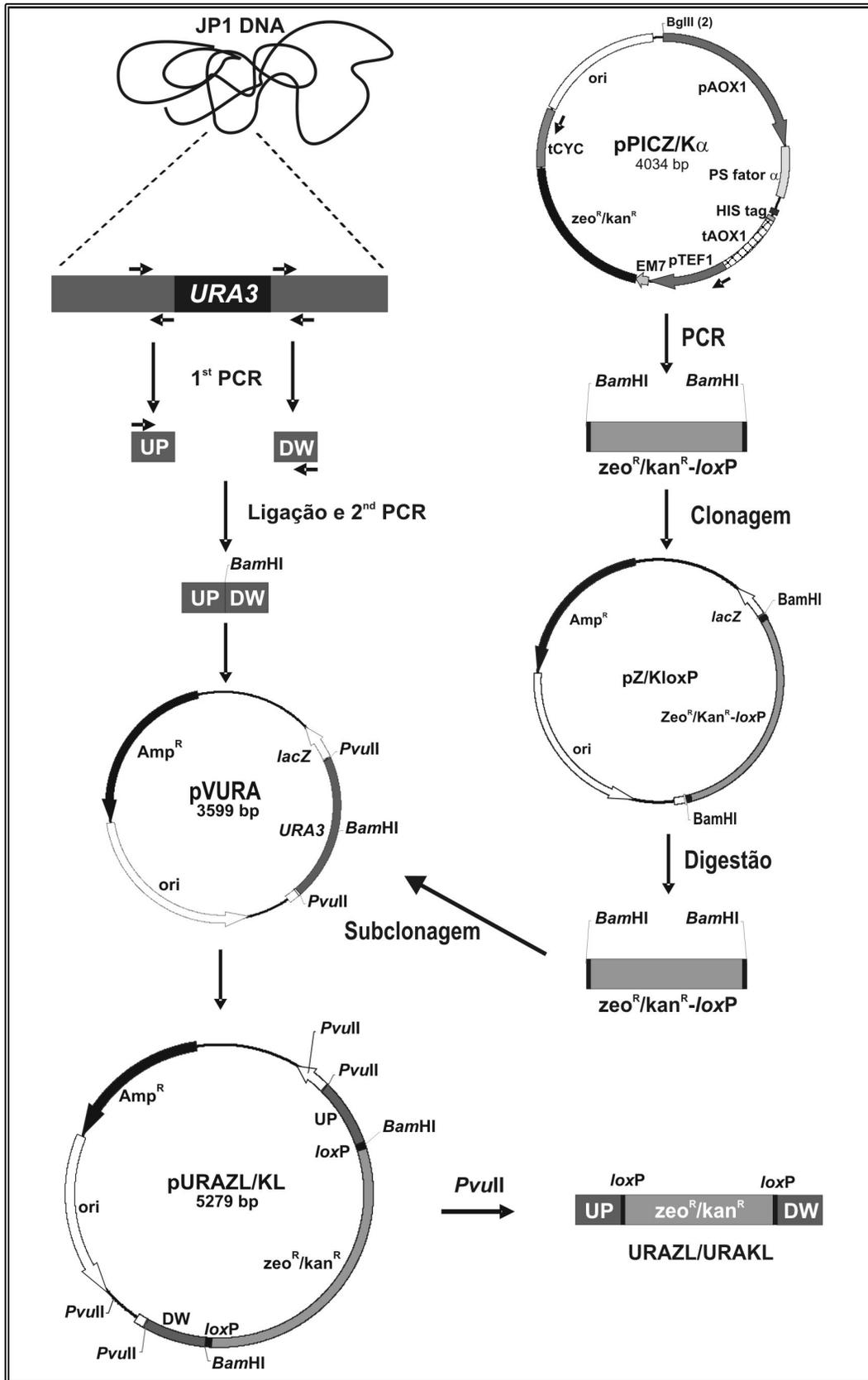


Figura 22: Esquema para construção do cassete de deleção do locus URA3.

Os fragmentos referentes às regiões *upstream* (URAUP - ~400 pb) e *downstream* (URADW - ~350 pb) do gene *URA3* foram obtidos por meio de PCR usando DNA isolado da linhagem *S. cerevisiae* S288c como molde. A reação foi feita com a enzima *Phusion® DNA polimerase* e os pares de *primers* URA3UP-F/URA3UP-R e URA3DW-F/URA3DW-R, respectivamente (Figura 23A). Após purificação dos produtos de PCR, os fragmentos URAUP e URADW foram ligados na mesma proporção (1:1). Posteriormente, o sistema foi submetido a aquecimento de 65°C por 10 min para inativação da DNA ligase. Foi feita uma reação de PCR para amplificar apenas as moléculas ligadas URAUP/URADW usando o sistema de ligação acima como molde. A enzima *Phusion® DNA polimerase* e os *primers* URA3UP-F e URA3DW-R foram usados na reação. Foi obtido um fragmento (“URA”) de ~ 750 pb (Figura 23B).

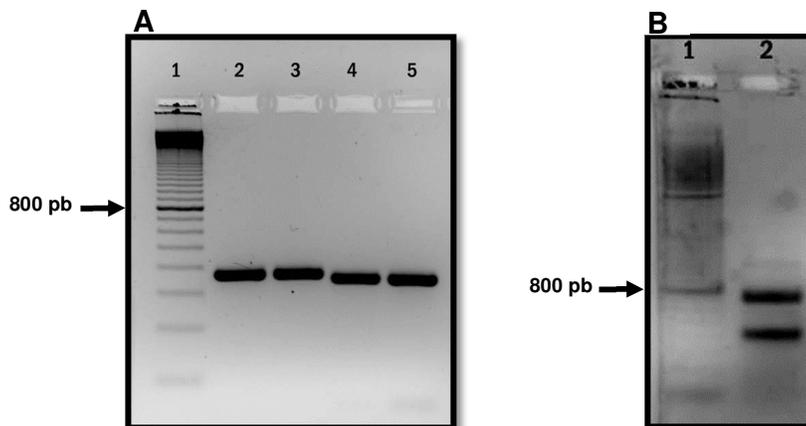


Figura 23: Amplificação das regiões *URA3*. Análise em gel de agarose 2%. **A) Regiões URAUP e URADW.** Poço 1: marcador 100 pb *ladder* (Pharmacia); poço 2 e 3: Produto de amplificação da região URAUP e poço 4 e 5: Produto de amplificação da região URADW. **B) Ligação URAUP e URADW.** Poço 1: marcador 100 pb *ladder* (Pharmacia); poço 2: Produto de amplificação da do URAUP e URADW ligados.

O fragmento “URA” foi ligado ao vetor pPCV-B. Este sistema foi usado para transformar *E. coli* (XL10 Gold). A clonagem foi confirmada por análise de restrição e PCR. O vetor final foi denominado pVURA. Para a análise de restrição foram usadas as enzimas PvuII, HindIII e BamHI, EcoRI. Não houve digestão com EcoRI. Para confirmar a presença dos dois fragmentos, URAUP e URADW foi feita uma PCR usando o plasmídeo pVURA como molde e os pares de *primers* URA3UP-F/URA3UP-R e URA3DW-F/URA3DW-R. Pode-se observar na Figura 24 que ambos

os fragmentos amplificaram e não há nenhum produto amplificado no controle negativo (reação sem molde).

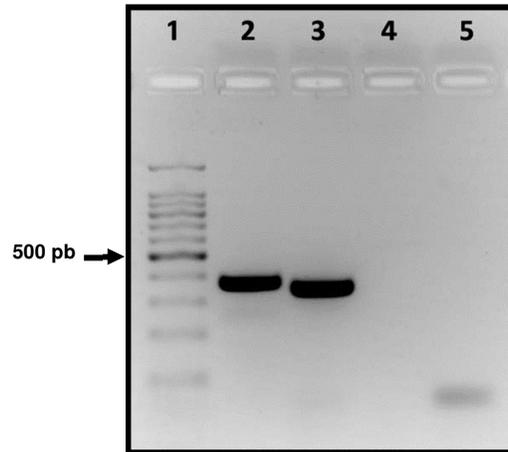


Figura 24: Análise do pVURA por PCR. Eletroforese em gel de agarose 2%. **Poço 1:** marcador 100 pb DNA ladder (PROMEGA); **poço 2:** produto de amplificação do fragmento URAUP; **poço 3:** produto de amplificação do fragmento URADW; **poço 4:** controle negativo para reação URAUP; **poço 5:** controle negativo para reação URADW.

Os clones 1 e 2 foram sequenciados. Pela análise do sequenciamento, observou-se que a sequência das regiões URAUP e URADW estavam corretas, entretanto, o sítio de EcoRI havia sido perdido devido a uma deleção de 3 bases no clone 1 (Suplemento 1), e 6 bases no clone 2.

As marcas de seleção para zeocina (~1,2 kb) e G418 (1,7 kb) foram obtidas por meio de PCR usando os vetores pPICZ α A e pPICK α , respectivamente, como molde da reação. A amplificação foi feita com a *Phusion® DNA polimerase* e os *primers* 5PP-LOX e ZeoBlasR3 que se anelam na região do promotor e terminador dos cassetes de resistência, que é o mesmo para ambos, e adicionam um sítio para BamHI nas extremidades dos amplicons (Figura 25).

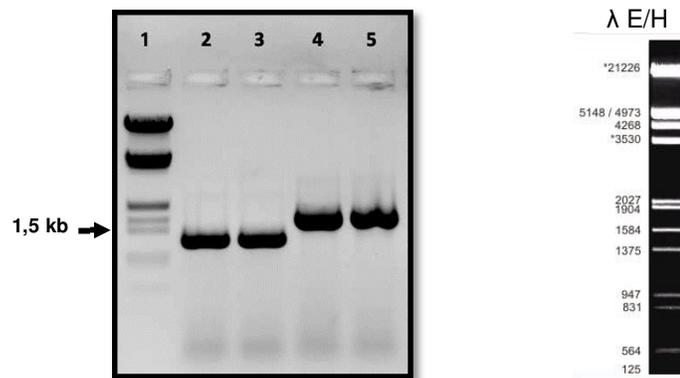


Figura 25: Amplificação dos cassetes de seleção. Análise em gel de agarose 1%. **Poço 1:** marcador λ E/H DNA ladder; **poço 2 e 3:** Produto de amplificação do cassete de resistência para zeocina e **poço 4 e 5:** Produto de amplificação do cassete de resistência para G418. λ E/H: padrão do marcador de massa molecular.

Após adição de adenina nas extremidades dos produtos de PCR “zeolox” e “kanlox”, estes foram clonados no vetor pGEM[®]T easy, resultando nos plasmídios pGZL e pGKL, respectivamente. A seleção dos clones com inserto foi feita com a enzima BamHI, que libera o fragmento zeolox (~1,2 kb) e kanlox (~1,7 kb). A clonagem foi confirmada também com as enzimas NcoI, BglIII / Sall.

Os clones escolhidos (pGZL4 e pGKL1), foram digeridos com BamHI para obtenção dos cassetes de seleção para zeocina e G418. Após purificação, os mesmos foram ligados ao vetor pVURA3 previamente digerido com BamHI e defosforilado. Após transformação de *E. coli*, foram selecionados 6 a 8 clones para análise de restrição com BamHI, HindIII, XmaI, StuI e NcoI. Todos os clones apresentaram digestão, confirmando a clonagem. Os plasmídios escolhidos foram denominados pURAZL5 e pURAKL4. Estes vetores foram digeridos com PvuII para liberar o cassete de integração URA::Zeolox (URA::ZL) - (1,9 kb) e URA::Kanlox (URA::KL) - (2,4 kb) (Figura 26). Após confirmação da digestão os sistemas foram submetidos a precipitação para eliminação de sais e enzima.

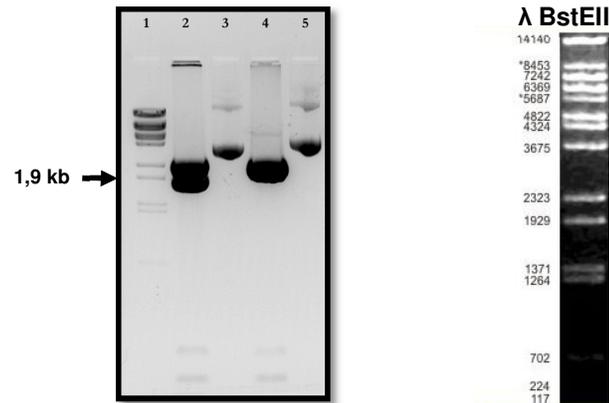


Figura 26: Obtenção dos cassetes de integração URAZL e URZKL. Análise em gel de agarose 0,8% da digestão dos vetores pURAZL5 e pURAKL4 com PvuII. **Poço 1:** marcador λ BstEII DNA ladder; **poço 2:** pURAZL5 digerido; **poço 3:** pURAZL5 intacto; **poço 4:** pURAKL4 digerido; **poço 5:** pURAKL4 intacto. λ BstEII: padrão do marcador de massa molecular.

Para remoção das marcas de resistência a antibiótico, foi usado o sistema *Cre-loxP*. Para tanto, foi construído um vetor replicativo contendo a marca de resistência a higromicina B. Este vetor foi construído pelo aluno de mestrado Osmar Oliveira, sob minha orientação. A escolha de um vetor replicativo se deve a sua instabilidade mitótica (da Silva & Bailey, 1991), facilitando a cura da linhagem, ou seja, a eliminação do vetor contendo a CreA recombinase após crescimento em meio sem pressão seletiva. A origem de replicação *ARS1* e o cassete da Cre recombinase foram clonados no vetor base pYC040. A origem de replicação *ARS1*, de 256 pb, foi obtida do vetor pJPA113 por meio de digestão com as enzimas de restrição HindIII e SacI. Após purificação, o fragmento de 0,25 kb foi ligado ao vetor pYC040 previamente digerido com as mesmas enzimas de restrição. A clonagem foi confirmada pelo perfil de restrição com as enzimas PstI e HindIII / SacI. O vetor resultante foi denominado pYC440.

O cassete de Cre recombinase (2,1 kb), onde a Cre recombinase está sob controle do promotor induzível *GAL1* foi obtido do vetor pSH47 digerido com as enzimas KpnI e SacI. O fragmento de 2,1 kb foi purificado para posterior ligação ao vetor pYC440 previamente digerido com as mesmas enzimas de restrição. A clonagem foi confirmada por análise de restrição com as enzimas KpnI / SacI, HindIII e SacI / HindIII / KpnI. Esta última confirmou a presença dos dois insertos clonados:

ARS1 (0,25 kb) e Cre recombinase (1,6 kb e 0,5 kb) (Figura 27). O vetor final foi denominado pYRCre.

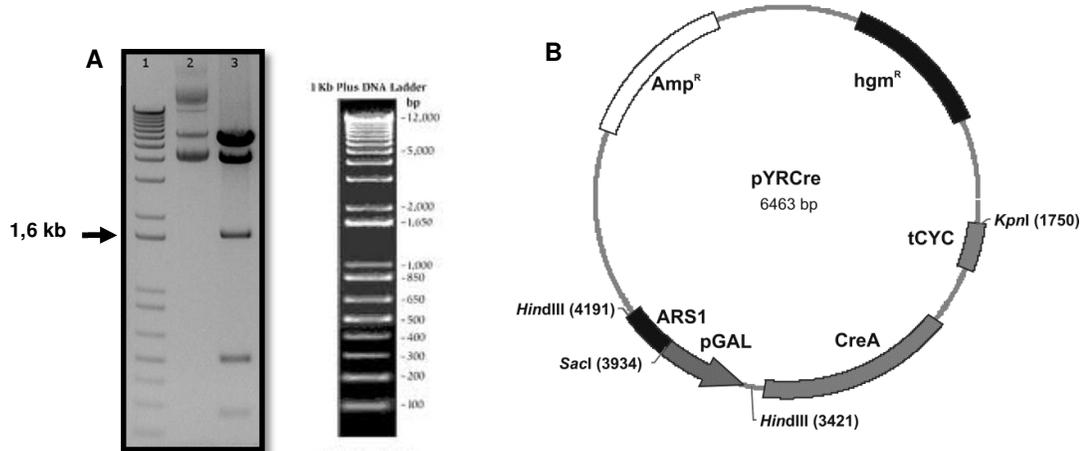


Figura 27: Vetor pYRCre. A) Perfil de restrição do vetor pYRCre com SacI / HindIII / KpnI. Eletroforese em gel de agarose 1%. **Poço 1:** marcador 1kb plus DNA ladder (Invitrogen); **poço 2:** pYRCre intacto, **poço 3:** pYRCre digerido. **1Kb Plus DNA Ladder:** padrão do marcador de massa molecular. **B)** mapa físico do vetor pYRCre.

Os cassetes URA::ZL e URA::KL foram usados para transformar a levedura JP1 pelo método de acetato de lítio, de alta eficiência. A seleção foi feita em meio YPD com 100 µg/mL dos antibióticos zeocina e G418. Foram obtidas mais de 150 colônias para cada sistema sendo que 104 colônias de cada sistema foram transferidas para meio YPD contendo 200 µg/mL dos respectivos antibióticos. Posteriormente, foi feita uma transferência das colônias para meio MD + Ura e MD – Ura. Pode-se observar que apenas o clone 2.24, do sistema URA::ZL, não havia crescido em meio sem uracila. Os 104 transformantes de cada sistema foram também transferidos para meio MD + 5-FOA. Posteriormente, estes clones foram transferidos para meio MD + Ura e MD – Ura. Observou-se que 24 colônias não cresceram em meio sem uracila, indicando a dupla deleção.

Foi feita PCR de colônia de 8 clones de cada sistema antes do tratamento com 5-FOA, e com os mesmos clones depois do tratamento. Foram usados os pares de *primer* URAUP-F/URADW-R (2) e URA-F1/URA-R1 (1). Para o sistema URA::ZL verificou-se que o clone 2.24 foi o único que teve dupla deleção antes do tratamento com 5-FOA, mantendo o genótipo após o tratamento. Quanto aos outros clones, estes apresentaram um perfil variado. A partir desta análise preliminar foram escolhidos 4 clones do sistema URA::ZL (24A, 24D, 25D e 26D) e 2 do sistema

URA::KL (14D e 16D). A letra A significa “antes do tratamento com 5-FOA” e D significa “depois do tratamento com 5-FOA”. Os clones foram transferidos para meio YPD contendo 200 µg/mL de zeocina e G418 respectivamente, para isolamento de colônia. Foi feita uma nova PCR de colônia confirmando a dupla integração e transferência para meio MD + Ura, MD – Ura e MD + 5-FOA (Figura 28).

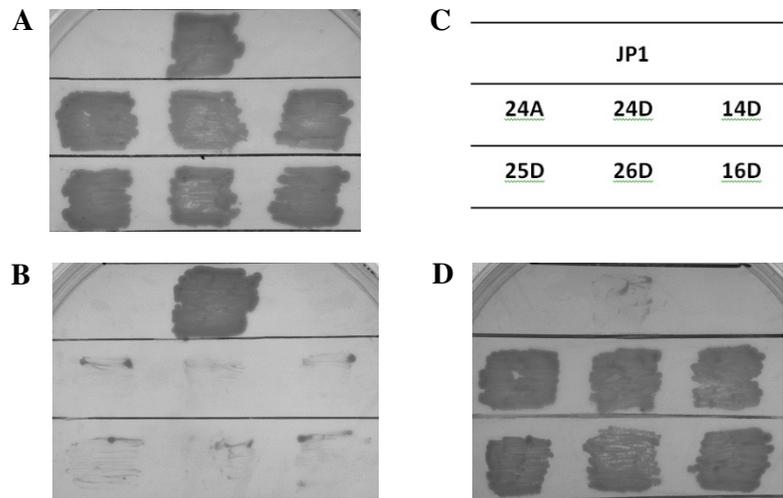


Figura 28: Análise fenotípica dos transformantes. A: Meio MD + Ura; B: Meio MD – Ura; C: esquema da posição dos clones e D: Meio MD + 5FOA.

A análise fenotípica confirma esta dupla integração, pois houve crescimento apenas da linhagem JP1 nativa em meio mínimo sem uracila (Figura 29B) e crescimento dos mutantes auxotróficos em meio mínimo contendo 5-FOA (Figura 29D). Foram escolhidos os clones 24A e 14D para prosseguir. Os clones 24A (JP1ΔZ) e 14D (JP1ΔK) foram transformados com o vetor pYRCre pelo método da fase estacionária. Após a transformação foram escolhidos 2 clones de cada sistema para a indução da Cre recombinase em meio com galactose para remoção dos cassetes de seleção de zeocina e G418 respectivamente. Após a indução foram transferidos 52 clones derivados da linhagem JP1ΔZ e 52 clones derivados da linhagem JP1ΔK para meio YPD e YPD com 200 µg/mL dos respectivos antibióticos zeocina e G418. Observou-se a ausência de crescimento de 4 clones de cada sistema. Para confirmar a excisão do cassete de resistência foi feita uma PCR de colônia dos transformantes que não cresceram em meio com antibiótico. A remoção foi confirmada em todos os transformantes selecionados. Os transformantes também foram transferidos para meio YPD + higromicina B (200 µg/mL) para confirmar a eliminação do vetor replicativo pYRCre. Todos os transformantes derivados do clone

JP1 Δ K perderam o vetor pYRCre. No sistema derivado do clone JP1 Δ Z, dos 52 clones apenas 48 perderam o vetor. Isso confirma a instabilidade mitótica do vetor replicativo. Foram escolhidos os clones 8 e 32 que perderam o cassete de resistência e o vetor pYRCre. Estes foram denominados de linhagem JPUK e JPU, respectivamente. Para confirmar o perfil genotípico (Figura 29A) foi feita uma PCR com os primers URA-F1/URA-R1 (Figura 29B). Para o perfil fenotípico as células foram transferidas para meio MD + Ura, MD - Ura, MD + 5-FOA e YPD suplementado com 200 μ g/mL do respectivo antibiótico (Figura 29C).

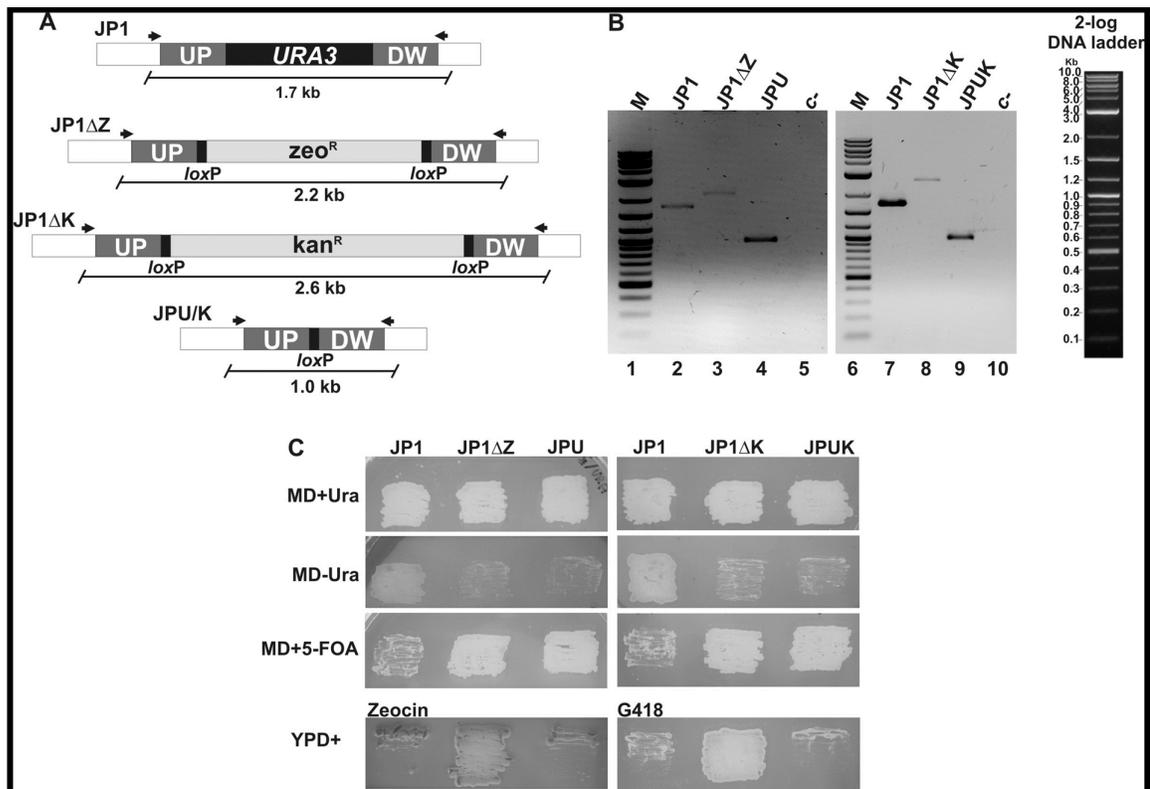


Figura 29: Deleção do gene *URA3*. **A** Representação esquemática do tamanho dos produtos de PCR das diferentes linhagens – **JP1**: linhagem nativa; **JP1 Δ ZL**: linhagem interrompida com o cassete de resistência a zeocina; **JP1 Δ KL**: linhagem interrompida com o cassete de resistência a G418 e **JPU/JPUK**: linhagem resultante após excisão da marca de resistência. As setas indicam a posição de anelamento dos primers URAF1 e URAR1 **B** Análise da PCR. Eletroforese em gel de agarose 1% dos produtos de PCR de colônia feitas com os primers URAF1 e URAR1. **c-**: PCR controle; **M**: 2 log DNA ladder (New England Biolabs). **C** Análise fenotípica. Crescimento das células em diferentes meios de cultura para verificar o fenótipo Ura⁻ ou resistência a drogas das linhagens obtidas nas diferentes etapas do processo de deleção.

Para testar a transformabilidade das novas linhagens, foram usados os vetores pYC210 e pGFP-C-FUS; ambos possuem a marca auxotrófica *URA3*, mas o segundo possui o gene repórter da proteína fluorescente verde (GFP – *Green*

fluorescente protein). As linhagens JPUK e JPU foram transformadas pelo método da fase estacionária. Como controle, foi transformado um sistema de cada linhagem contendo H₂O no lugar de DNA. A seleção foi feita em meio MD - Ura. A transformação foi bem sucedida, e o controle não apresentou nenhuma colônia.

Para confirmar a eficiência do processo de transformação uma colônia da linhagem JPU transformada com o vetor pGFP-C-FUS foi analisada em microscopia confocal quanto a emissão de fluorescência (Figura 30). Pode-se observar ausência de fluorescência nas células controle – JPU não transformada – e fluorescência nas células transformadas indicando a expressão de GFP.

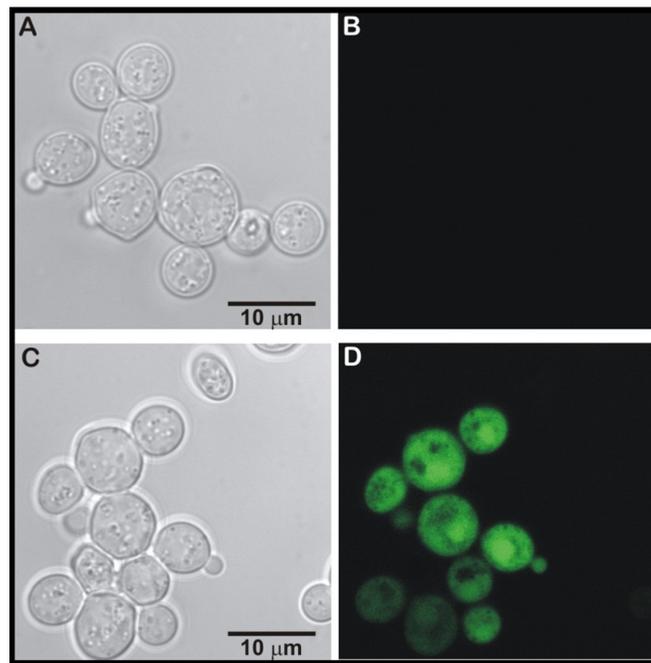


Figura 30: Detecção de fluorescência. Visualização da expressão do gene repórter *gfp* por meio da microscopia confocal. JPU não transformada visualizada em campo claro (A) sob fluorescência (B); JPU transformada com pGFP-C-FUS visualizada em campo claro (C) sob fluorescência (D).

Em resumo, a linhagem industrial auxotrófica para uracila foi obtida com sucesso. Isso permitirá seu uso para pesquisas usando cassetes de integração ou vetores episomais que possuam a marca *URA3* que permite contrasseleção em meio contendo 5-FOA. Há uma grande disponibilidade de vetores com a marca auxotrófica e vetores com a marca *URA3* são mais estáveis tanto em meio seletivo como em meio não seletivo (Ugolini *et al.*, 2002). Além disso, a eficiência de

transformação com marcas auxotróficas é maior que com marcas dominantes (Shimura *et al.*, 1993).

Foi possível transformar a linhagem JP1 com cassete de integração e, apesar de raro, houve uma dupla integração (0,5% dos transformantes analisados) após a transformação. O agente mutagênico 5-FOA aumentou a taxa de dupla integração. Na presença deste agente a integração no segundo alelo garante a sobrevivência da célula. A droga 5-FOA é muito usada para se obter mutantes auxotróficos *ura3* em linhagens industriais. O 5-FOA quando metabolizado pela enzima Ura3p é convertida em um composto tóxico, 5-fluorouracil, que leva a célula a morte (Boeke *et al.*, 1984). Quando o gene *URA3* é deletado ou sofre uma mutação, não há a síntese da enzima Ura3p ou esta é sintetizada numa forma inativa. Assim, o 5-FOA não é metabolizado não tendo nenhuma ação sobre a viabilidade celular. As mutações decorrentes da ação do 5-FOA podem ser revertidas pelo sistema de reparo da célula. Portanto a deleção gênica proporciona uma linhagem auxotrófica mais estável.

Os resultados deste capítulo foram aceitos para publicação no *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* sob o título: “*Characterization and Construction of an Auxotrophic Strain of Saccharomyces cerevisiae JP1, a Brazilian Industrial Yeast Strain for Bioethanol Production*” (Suplemento 2).

5.2 CAPÍTULO 2: LEVEDURA RECOMBINANTE CAPAZ DE FERMENTAR XILOSE

Para o etanol ser economicamente viável como fonte alternativa de energia, é importante que seja produzido em grande quantidade e a baixo custo. Cálculos indicam que o etanol deve ser produzido no mínimo em concentrações de 100 g L^{-1} com uma produtividade mínima de $2 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ e um rendimento de 95% do valor teórico (Sheridan, 2009). Para que o etanol lignocelulósico consiga atingir esta meta é necessário que a levedura usada nos processos fermentativos aproveite todos os açúcares presentes nas frações celulósicas, rica em hexoses, e hemicelulósica, rica em pentoses. A levedura *S. cerevisiae* é uma excelente fermentadora de hexoses, entretanto, é incapaz de fermentar pentoses, pois não possui via metabólica para tal.

Vários estudos foram realizados com a finalidade de criar linhagens de *S. cerevisiae* modificadas geneticamente para expressar genes codificadores de enzimas do metabolismo de xilose, como XR e XDH de *P. stipitis*, e XI bacteriana (Lönn *et al.*, 2003; Jeffries & Jin, 2004; para revisão, ver Hahn-Hägerdal *et al.*, 2007). A primeira linhagem recombinante para metabolizar xilose foi construída em 1993, usando a via XR/XDH (Kötter & Ciriacy, 1993). Entretanto, linhagens de *S. cerevisiae* expressando XR e XDH apresentaram fraco crescimento e baixo nível de fermentação em xilose devido a alguns fatores: desbalanceamento redox, baixo fluxo na PPP e ineficiência de transporte de xilose para o interior da célula (Hector *et al.*, 2008). O desbalanceamento redox ocorre porque XR tem maior afinidade por NADPH enquanto XDH por NAD^+ o que leva ao acúmulo de xilitol e glicerol na célula (Jin & Jeffries, 2003; Kuyper *et al.*, 2004). O acúmulo de glicerol ocorre como forma de compensar o déficit de NAD^+ pela via de produção de glicerol, onde o NADH é reciclado (Jeffries, 2006). Para solucionar a questão de desbalanceamento redox, foram relatadas algumas estratégias: a expressão heteróloga de uma transidrogenase para converter NADH em NADPH - com queda no rendimento da produção de etanol (Nissen *et al.*, 2001), e a alteração na especificidade pelo cofator da XR que leva a uma redução do rendimento de xilitol e um aumento no rendimento de etanol (Jeppsson *et al.*, 2006; Bengtsson *et al.*, 2009; Krahulec *et al.*, 2010). Watanabe *et al.* (2007) mostraram que o rendimento de etanol pode chegar a 0,43 g

g^{-1} , alterando-se a especificidade da XR pelo cofator. A ineficiência da PPP, com o desbalanceamento das atividades das enzimas transaldolase (TAL) e transcetolase (TKL), resultam no acúmulo de intermediários, como sedoheptulose-7-fosfato e gliceraldeído-3-fosfato. Esse acúmulo afeta a via glicolítica e, com isso, o rendimento da produção de etanol, pois o gliceraldeído-3-fosfato gerado na PPP é um intermediário da via glicolítica (Boles *et al.*, 1993). O baixo transporte de xilose para o interior da célula se deve ao fato de *S. cerevisiae* apresentar transportadores com baixa afinidade para este açúcar, além disso, a glicose é preferencialmente internalizada (Lee *et al.*, 2002; Weierstall *et al.*, 1999). Entretanto, estudos mostram que a expressão da XR mutante tem um impacto maior sobre o rendimento de etanol do que a expressão do transportador Gxf1 (Olofsson *et al.*, 2011).

Para aumentar o fluxo metabólico de xilose, e com isso melhorar a eficiência de fermentação da xilose, o gene que codifica para XK em *S. cerevisiae*, *XKS1*, foi superexpresso, uma vez que a atividade desta enzima é um fator limitante do metabolismo de xilulose nesta levedura (Jeffries & Jin, 2004). A expressão desta enzima leva a um aumento na produção de etanol em fermentação anaeróbica (Ho *et al.*, 1998) e em cofermentação de glicose e xilose (Wahlbom *et al.*, 2003). Independentemente da aeração, apenas a superexpressão da XK aumenta o influxo de xilose e o rendimento de etanol em *S. cerevisiae* recombinante contendo XR e XDH (Toivari *et al.*, 2001). Entretanto, quando os genes *XYL1*, *XYL2* e *XKS1* são superexpressos em vetor episomal, a linhagem recombinante apresenta um baixo consumo de xilose de no máximo 50%, apesar de ter um bom rendimento na produção de etanol em cofermentação e da enzima XK apresentar um aumento da atividade de 300 vezes (Johansson *et al.*, 2001). Jin *et al.* (2003) demonstram que a superexpressão de XK afeta tanto o crescimento da levedura em xilose como a produção de etanol, mas o aumento da expressão em níveis adequados aumenta a produtividade do etanol. Matsushika & Sawayama (2011) demonstram que quando o gene é integrado, a expressão de XK sob controle de 2 promotores com diferentes forças (*PGK1* e *ADH1*) afeta o crescimento e a produção de etanol: o promotor mais forte - PGK -afeta negativamente o crescimento, mas aumenta a produtividade de etanol. Linhagem recombinante de *S. cerevisiae* contendo os genes *psXYL1* e *psXYL2* transformada com uma biblioteca gênica de *P. stipitis* mostra que recombinantes que crescem em xilose continham em seus vetores os genes *XYL3*,

que codifica para XK, e o gene *TAL1*, enzima envolvida na via PPP não-oxidativa (Jin *et al.*, 2005). Estudos de proteômica em linhagem recombinante para XR/XDH e XK mutagenizada revelou um aumento proteico das enzimas Tkl1, Ald6, Eno2 (Karhumaa *et al.*, 2009). Quando se utiliza métodos de evolução randômica também se observa um aumento da expressão de XK (Jim & Jeffries 2003; para revisão ver Hahn-Hägerdal *et al.*, 2007).

As primeiras tentativas de expressar XI bacteriana em *S. cerevisiae* tiveram pouco sucesso (Hahn-Hägerdal *et al.*, 2001; Lönn *et al.*, 2003; Walfridsson *et al.*, 1996). Recentemente, observou-se que a expressão de XI do fungo *Piromyces* sp. em *S. cerevisiae* levou ao melhor rendimento na produção de etanol a partir de xilose até hoje verificado nesta levedura (Kuyper *et al.*, 2005a). A grande vantagem do uso de XI é que não há desbalanceamento redox, como ocorre na via XR/XDH. Além disto, o fato de ter sido usado um gene para XI de origem eucariótica pode ter contribuído para este sucesso (Kuyper *et al.*, 2003; Kuyper *et al.*, 2004). Melhoramentos genéticos posteriores nesta linhagem de laboratório, incluindo evolução adaptativa, elevaram ainda mais o rendimento de etanol para 0,43 g g⁻¹, mas a levedura ainda apresentava crescimento específico (μ) baixo quando crescida em xilose (Kuyper *et al.*, 2005b). Acredita-se que esta característica se deva ao fato de *S. cerevisiae* não possuir um eficiente sistema para o transporte de xilose para dentro da célula (Kuyper *et al.*, 2005b). Outras expressões bem sucedidas de XI foram obtidas com o gene homólogo oriundo do fungo *Orpinomyces* (Madhavan *et al.*, 2009) e o gene otimizado da bactéria *Clostridium phytofermentans*. A vantagem deste último é que a enzima recombinante é menos inibida pelo xilitol (Brat *et al.*, 2009).

S. cerevisiae possui uma aldose redutase inespecífica, codificada pelo gene *GRE3*, que é capaz de reduzir xilose a xilitol, um inibidor da XI (Kuhn *et al.*, 1995; Yamanaka, 1969). A deleção de *GRE3* reduziu a formação de xilitol em linhagem recombinante de *S. cerevisiae* expressando XI e XK e aumentou o rendimento de etanol em cofermentação de glicose e xilose (Traff *et al.*, 2001; Tanino *et al.*, 2010). Outras modificações foram realizadas para melhorar o rendimento de etanol, como a superexpressão de enzimas da PPP oxidativa, deleção de enzimas da PPP não-

oxidativa (para revisão ver Hahn-Hägerdal *et al.*, 2007 e Matsushika *et al.*, 2009) e superexpressão da GAPDH (Bera *et al.*, 2011)

Estudos semelhantes vêm sendo realizados na tentativa de se aproveitar também a arabinose em processos fermentativos a partir de resíduos lignocelulósicos utilizando-se *S. cerevisiae* recombinante. Entretanto, foram observados problemas de desbalanceamento redox quando se utilizou a via fúngica de L-arabinose (Richard *et al.*, 2002) e crescimento lento em meio com arabinose, quando se utilizou a via metabólica de bactéria (Becker & Boles, 2003). Wiedemann & Boles (2008) otimizaram para *S. cerevisiae* os códons dos genes que codificam para as enzimas da via metabólica de L-arabinose de bactéria e observaram uma melhora na produtividade e rendimento de etanol em relação às sequências nativas.

Os resultados apresentados acima mostram que as estratégias de expressão heteróloga e deleção gênica são às vezes por demais simplistas para se obter fenótipo desejado. O fenótipo não é o resultado da expressão de um gene e sim da interação de vários eventos celulares: da interação de vários genes, da regulação da expressão dos genes, da cinética das reações metabólicas (Bailey, 1999). Além disso, envolve também a interação com o meio ambiente.

Uma forma de se alterar o fenótipo de um microrganismo para uma característica de interesse biotecnológico é por meio da adaptação metabólica. A adaptação metabólica é uma evolução *in vitro* do microrganismo de forma direcionada, ou seja, na condição de interesse (presença de determinado substrato, ou tolerância a um inibidor ou a algum estresse). O microrganismo é cultivado, os clones sobreviventes são submetidos à mesma condição, até se obter um mutante com as características desejadas. Dessa forma há seleção do microrganismo capaz de sobreviver sob a condição de interesse, resultando num microrganismo com as características desejadas.

Apenas a expressão de XI não é capaz de promover uma rápida fermentação de xilose. Cultivo prolongado em condições de aerobiose, com limitação de oxigênio e anaerobiose, são necessários para obter uma levedura capaz de produzir etanol a partir de xilose com um bom rendimento (0,42 g g⁻¹) apesar do lento crescimento em

anaerobiose ($\mu = 0,03 \text{ h}^{-1}$) (Kuyper *et al.*, 2004). Somente quando foram superexpressas as enzimas da PPP, XI, XK, e se deletou o gene *GRE3*, adaptando a linhagem obtida em meio com glicose e xilose em anaerobiose, é que foi observado um aumento significativo da taxa de crescimento ($\mu = 0,12 \text{ h}^{-1}$) (Kuyper *et al.*, 2005a; Kuyper *et al.*, 2005b).

No presente trabalho procuramos obter uma linhagem industrial de *S. cerevisiae* capaz de usar a xilose como substrato para fermentação alcoólica. Optamos pela introdução da via metabólica de xilose que não necessita de cofator em *S. cerevisiae*. Para isso, o gene da xilose isomerase de *Pyromyces* sp e o gene endógeno *XKS1* foram expressos em *S. cerevisiae*. Para introduzir estes genes, foi escolhida a linhagem industrial JP1 como hospedeira. A linhagem recombinante foi submetida à adaptação metabólica em xilose.

5.2.1 Expressão de XI

Para obtermos expressão heteróloga estável na linhagem industrial JP1, foi construído originalmente um cassete de integração dirigido para o locus *CAN1* contendo o gene XI de *Pyromyces* sp com códons otimizados para *S. cerevisiae*. A vantagem desta estratégia é que não seria necessária uma marca de seleção uma vez que a ruptura gênica do locus *CAN1* resulta em células resistentes a canavanina. Entretanto, devido à dificuldade para integração nos dois alelos do gene *CAN1*, optou-se pela expressão de XI em vetor episomal.

Síntese do cassete de xilose isomerase

Para a expressão de XI, foi construído sinteticamente o cassete de expressão de 3380 pb denominado CAN-PGK-XI (Figura 31). Este cassete contém o gene da XI sob controle de um promotor forte e constitutivo, o promotor *PGK1*, e flanqueado por sequências do gene *CAN1*, para direcionar a integração por recombinação homóloga neste locus.

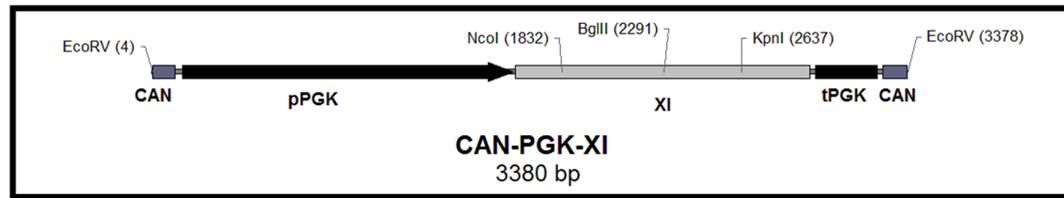


Figura 31: Esquema do cassete de integração CAN-PGK-XI.

A sequência sintética do gene da XI foi desenhada baseando-se na sequência proteica da enzima de *Piromyces* sp cepa E2 obtida do banco de dados NCBI (nº de acesso CAB76571). O desenho da sequência gênica foi feito com base nos códons preferenciais dos genes mais expressos de *S. cerevisiae*, levando-se em consideração a proporção de CG ideal para este organismo. Foram adicionados sítios de restrição estratégicos e eliminados os indesejáveis. O alinhamento da sequência de DNA com sequências do banco de dados no GenBank mostrou uma identidade de 87% com a sequência de XI de *Piromyces* sp E2. Para a região promotora e terminadora do cassete de expressão foram utilizados 1480 pb da região *upstream* ao gene *PGK1* e 276 pb *downstream* deste mesmo gene. Nas extremidades do cassete foram adicionadas 100 pb da sequência do gene *CAN1*. As sequências foram obtidas no banco de dados do SGD. Depois de desenhada a sequência do cassete, adicionando-se sítios de restrição necessários para estratégias futuras, esta foi enviada para a empresa EpochBiolabs (EUA) para análise quanto à formação de estruturas secundárias e posterior síntese química. A empresa clonou o cassete sintético no sítio para SmaI do vetor pBlueScript® II SK (Stratagene). O vetor resultante foi denominado pBSK-CAN-PGK-XI ou, mais simplificada, pBCPX.

Preparo dos cassetes de integração

O vetor pBSK-CAN-PGK-XI foi digerido com BamHI para a remoção do gene XI sendo depois religado. Com isso, foi obtido o vetor pBSK-CAN-PGK (pBCP) que foi usado como controle negativo.

Os vetores pBCPX e pBCP foram digeridos com EcoRV / BglII. A primeira enzima, para liberar os cassetes CAN-PGK-XI, de 3,3 kb, e CAN-PGK, de 3,1 kb; a segunda, para fragmentar o vetor e facilitar a purificação dos fragmentos.

A levedura JP1 foi transformada pelo método de eletroporação com o cassete CAN-PGK, (3,1 kb), e pela técnica de acetato de lítio com o cassete CAN-PGK-XI, (3,3 kb). Na transformação com o controle negativo (CAN-PGK) foram analisados 13 clones por PCR de colônia utilizando o par de *primers* CANF/CANR que anelam no *locus* *CAN1* na região de integração (Figura 32A). A análise em gel de agarose 0,8% mostrou que destes, apenas um clone apresentou integração do cassete, pois apresentou uma banda de 2 kb (vide seta na Figura 32B) indicando que o *locus* *CAN1* foi interrompido. Os outros apresentaram um fragmento de 1,2 kb correspondente ao *locus* *CAN1* nativo, conforme mostrado no esquema da Figura 32A.

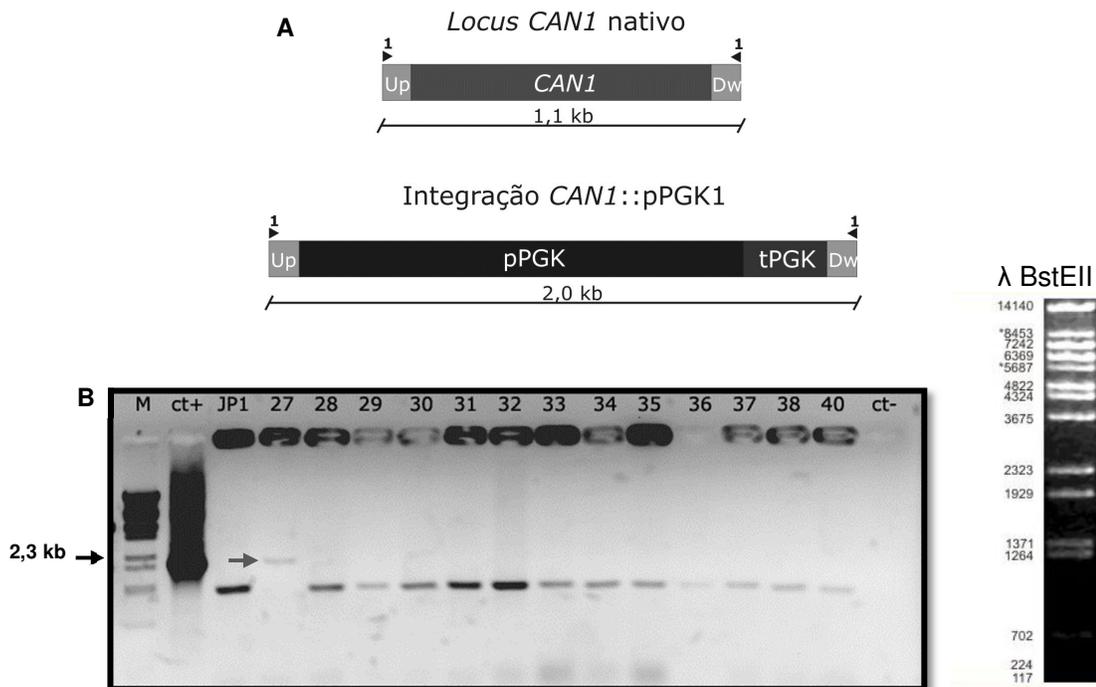


Figura 32: Análise da integração do cassete CAN-PGK no *locus* *CAN1*. A) Esquema de integração do cassete CAN-PGK. As setas indicam a posição de anelamento dos primers CANF/CANR (nº 1) e tamanho dos amplicons esperados em caso de integração ou não. B) PCR de colônia dos transformantes com o cassete de integração. Eletroforese em gel de agarose 0,8% M: marcador λ BstEII; ct+: plasmídeo pBCP (controle positivo); JP1: JP1 nativa (controle); 27-40: diferentes transformantes, ct-: reação sem DNA (controle negativo). A seta cinza indica a banda referente à dupla integração.

Na transformação com CAN-PGK-XI foram analisadas 5 transformantes por PCR de colônia com o par de *primers* CANF/CANR que se anelam no *locus* *CAN1*. Destes, 3 foram positivos, pois na análise em gel pode-se visualizar uma banda de 3,3 kb referente ao *locus* *CAN1* interrompido. Entretanto, pode-se observar também

uma banda de 1,2 kb referente ao *locus CAN1* nativo (Figura 33B) conforme mostrado na Figura 33A. Isso indica que houve integração em apenas um dos alelos.

Para confirmar que o cassete contendo XI fora efetivamente integrado, foram feitas mais duas PCR de colônia com os *primers* XIF/XIR que amplificam o gene referente à XI de ~1,3 kb, e com os *primers* Y1PGK/PGKtt, que se anelam na região adjacente ao gene *PGK1*. Neste caso, haveria uma amplificação de um fragmento de ~1,2 kb (*PGK1* nativo), e de ~1,4kb, no caso de haver interrupção (Figura 33A). Pode-se observar na Figura 33C que, dos 3 transformantes, 2 resultaram na amplificação de um fragmento referente à XI, ausente no controle feito com a linhagem JP1 nativa. O último transformante não resultou em amplificação, provavelmente devido ao pouco material na reação. Na Figura 33D, observa-se que a PCR dos 3 transformantes resultou na amplificação de uma banda ligeiramente superior ao controle. Isso confirma que houve integração no genoma da levedura JP1.

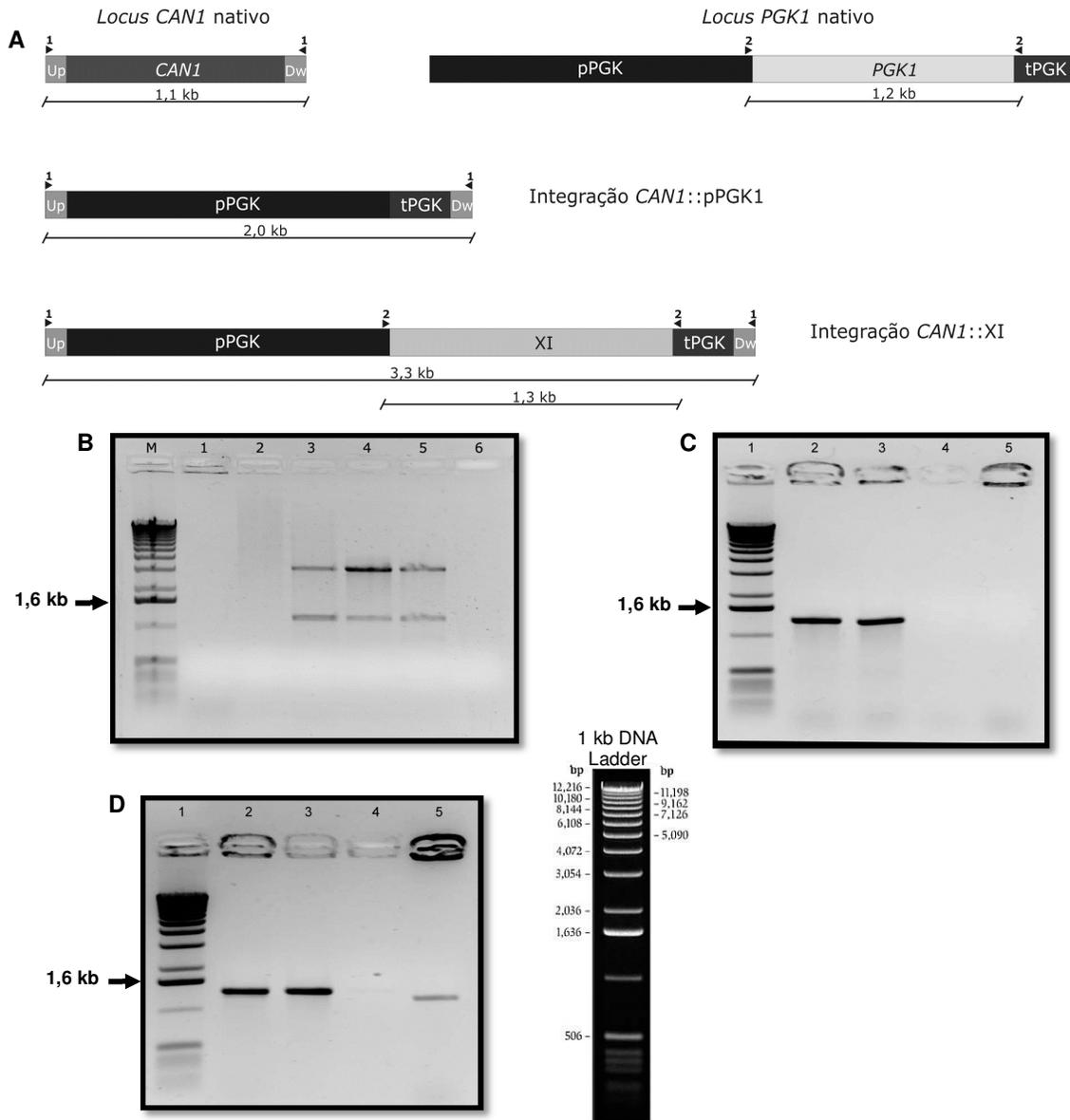


Figura 33: Análise da integração do cassete CAN-PGK-XI no locus CAN1. A) Esquema de integração do cassete CAN-PGK-XI. As setas numeradas indicam a posição de anelamento dos primers CANF/CANR (nº 1), Y1PGK/PGKtt (nº 2) e XIF/XIR (nº 3) além do tamanho dos amplicons esperados em caso de integração ou não B) PCR de colônia dos transformantes com o par de primers CANF/CANR (1). Análise em gel de agarose 0,8%. M: Marcador de 1kb ladder (Gibco); poço 1: clone 1; poço 2: clone 2; poço 3: clone 3; poço 4: clone 4; Poço 5: clone 5; Poço 6: controle negativo (reação sem DNA). C) PCR de colônia dos transformantes com o par de primers XIF/XIR (3). Análise em gel de agarose 0,8%. Poço 1: Marcador de 1kb ladder (Gibco); poço 2: clone 3; poço 3: clone 4; poço 4: clone 5; poço 5: JP1 nativa; D) PCR de colônia dos transformantes com o par de primers Y1PGK/PGKtt (2). Análise em gel de agarose 0,8%. Poço 1: Marcador de 1kb ladder (Gibco); poço 2: clone 3; poço 3: clone 4. Poço 4: clone 5. Poço 5: JP1 nativa. 1 kb DNA ladder: padrão de massa molecular.

Os resultados mostrados acima não foram reproduzíveis. A repetição da PCR para *CAN1* mostrou apenas a banda de 1,2 kb referente ao *locus CAN1* nativo. Provavelmente, houve reversão do alelo interrompido para sua forma nativa.

Concluimos que a marca de seleção CAN^R não se mostrou adequada para os propósitos deste trabalho e buscamos, assim, uma estratégia alternativa; a expressão de XI em vetor epissomal.

Clonagem da xilose isomerase em vetor epissomal

Os vetores epissomais possuem um alto número de cópias dentro da célula e, portanto são ideais quando se deseja superexpressar genes em *S. cerevisiae*. Visando testar a atividade da enzima XI heteróloga em *S. cerevisiae* bem como seu comportamento em condições de superexpressão sob controle de um promotor forte e constitutivo, o cassete PGK-XI foi subclonado no vetor epissomal pYC230, conforme esquema da Figura 34.

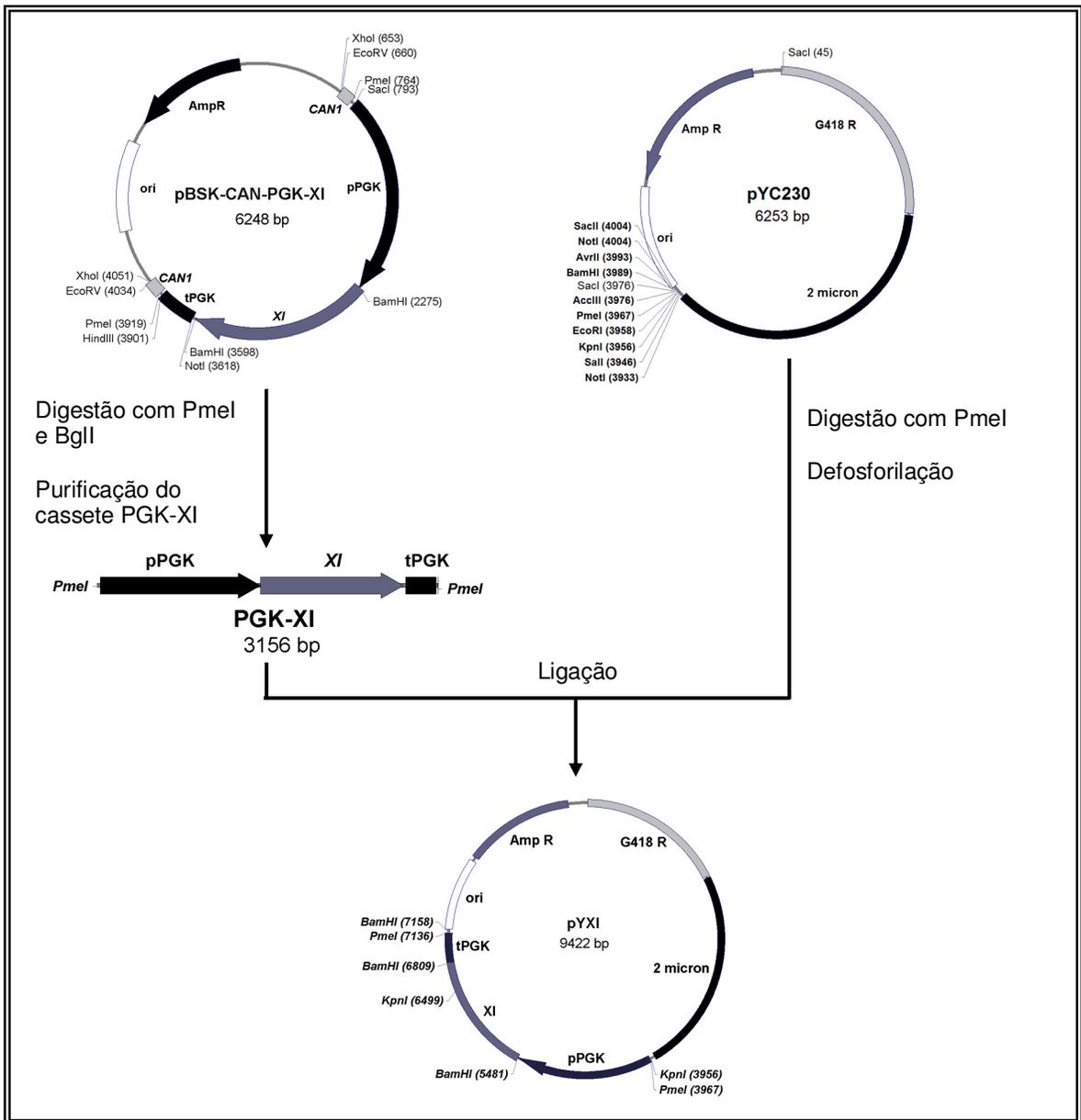


Figura 34: Esquema para subclonagem do cassete PGK-XI.

O vetor pBCPX foi digerido com as enzimas de restrição PmeI e BglI. A primeira enzima, para liberar o cassete PGK-XI de 3,1 kb, e a segunda, para facilitar a purificação.

Após a eluição e purificação do fragmento do gel de agarose, o mesmo foi subclonado no vetor pYC230 previamente digerido com PmeI. Foram analisados 4 transformantes com as enzimas BamHI, KpnI e PmeI para verificar a presença do

inserto, assim como sua orientação. O vetor resultante foi denominado pYXI (Figura 35).

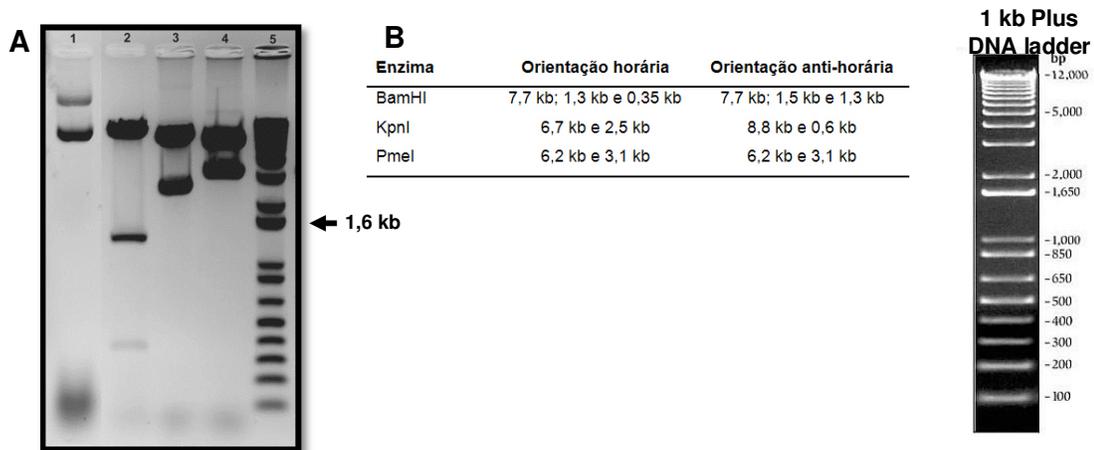


Figura 35: Perfil de restrição do pYXI. A) Eletroforese em gel de agarose 1%. Poço 1: pYXI intacto; **poço 2:** pYXI digerido com BamHI; **poço 3:** pYXI digerido com KpnI; **poço 4:** pYXI digerido com PmeI; **poço 5:** marcador 1kbplus DNA ladder (INVITROGEN). **B) Perfil de restrição esperado. 1kb plus DNA ladder:** padrão de massa molecular

Análise da atividade da xilose isomerase

As linhagens de *S. cerevisiae* JP1, RE1006 e S288c foram transformadas com os vetores pYXI pelo método de transformação em fase estacionária (Chen *et al.*, 1992) e clones transformantes foram selecionados em meio YPD contendo 100 µg/mL G418. Foi feita uma PCR de colônia de 12 transformantes para verificar a presença do vetor utilizando o par de *primers* G418F/G418R para amplificar a marca de seleção G418. Dos 12 transformantes, 7 geraram amplicons.

Um clone de cada linhagem transformada com pYXI, e um clone do controle negativo da JP1 previamente transformado (pYC230), foram selecionados para a obtenção do extrato proteico. As linhagens foram denominadas VCB001 (controle JP1+ pYC230) e VCB101 (JP1 + pYXI), VCB301 (RE1006 + pYXI) e VCB401 (S288c + pYXI). A determinação da atividade da XI do extrato proteico foi avaliada pela cinética enzimática de redução do NADH (Figura 36). Os resultados obtidos foram utilizados na equação de regressão linear obtida pela curva padrão de NADH. Verificou-se que no controle negativo (vetor sem XI) e no controle da reação (reação interrompida antes da adição do extrato proteico) a concentração de NADH permaneceu a mesma (0,1mM) e nos 2 clones recombinantes a redução foi de 10

vezes (0,01mM) em todos os tempos de reação. Pode-se concluir que houve detecção de atividade de XI nos extratos de células transformadas.

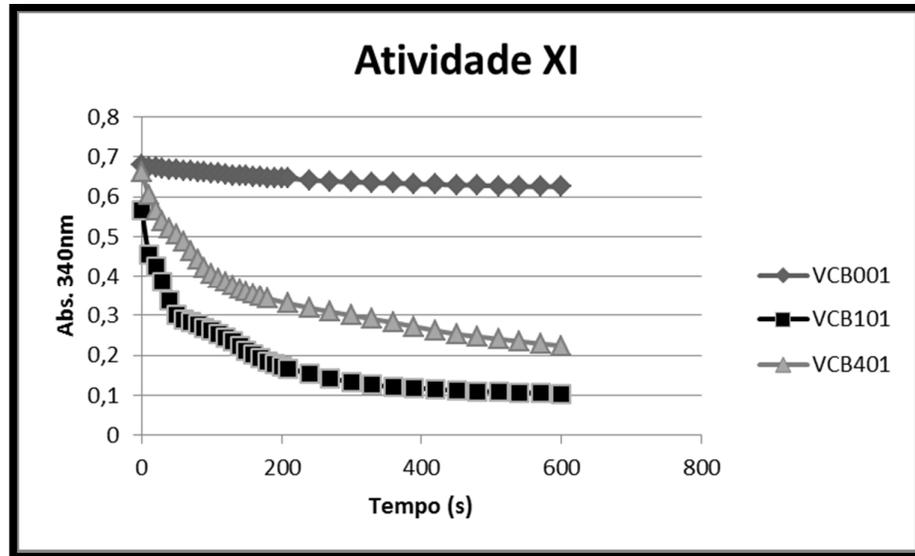


Figura 36: Cinética enzimática do NADH. VCB001: controle negativo, linhagem com vetor vazio; VCB101: linhagem JP1 com pYXI e VCB401: linhagem S288c com o vetor pYXI.

5.2.2 Cassete de expressão XK

A superexpressão apenas de XI leva a um acúmulo de xilulose, portanto, é necessário aumentar a atividade de XK para a conversão daquele metabólito em xilulose-5-fosfato. Estudos mostram que a superexpressão deste gene inibe o crescimento da levedura em xilose (Jin *et al.*, 2003; Johansson *et al.*, 2001). Portanto, a XK de *S. cerevisiae* foi expressa sob controle do promotor *PGI* no mesmo vetor em que foi clonado o gene da XI.

Subclonagem da xilose isomerase em vetor epissomal

Para poder colocar os cassetes de expressão da XI e da XK no mesmo vetor foi necessário fazer uma nova subclonagem do cassete PGK-XI no vetor epissomal pYC230, conforme esquema da Figura 37.

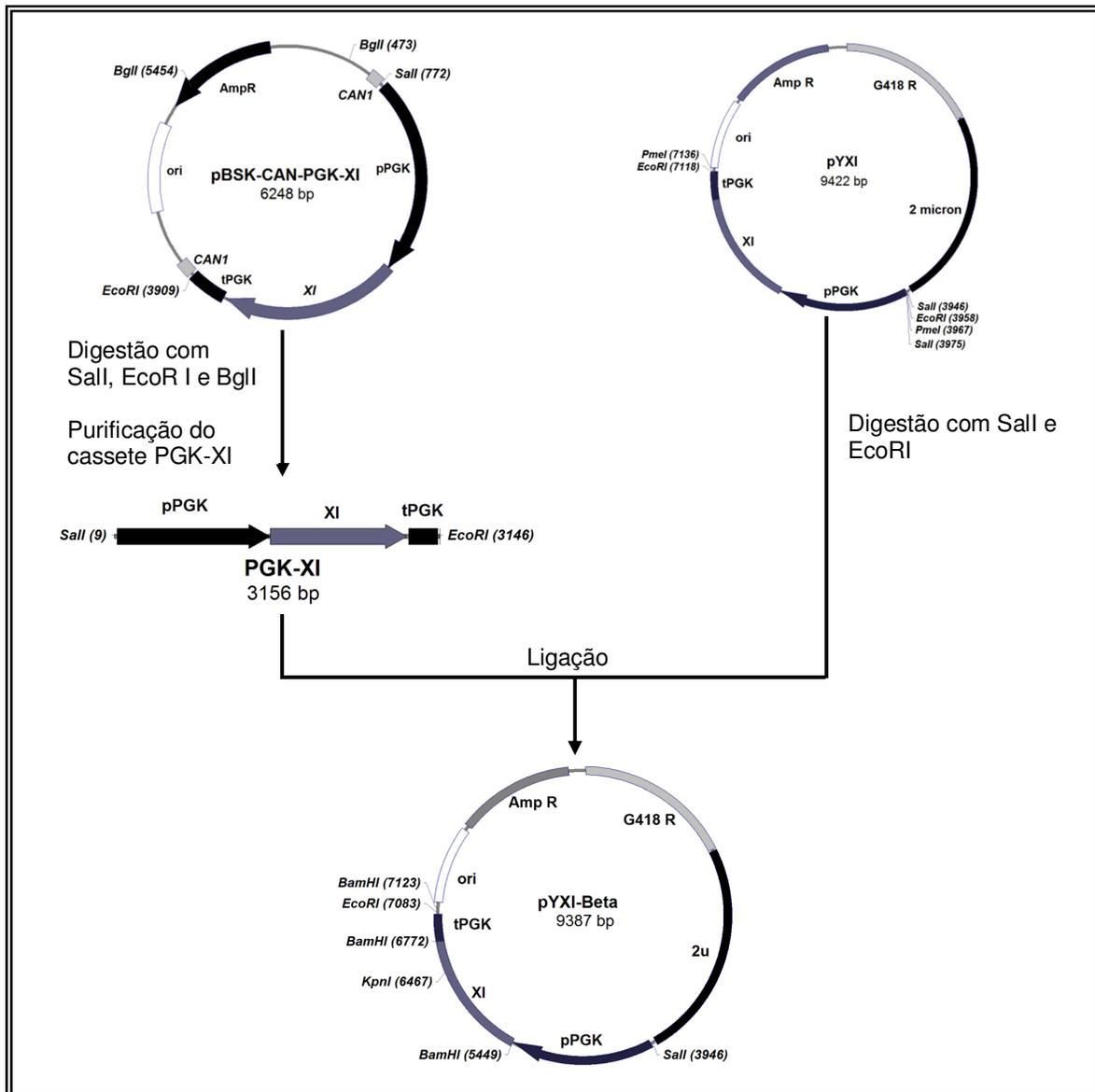


Figura 37: Esquema para subclonagem do cassete PGK-XI

O vetor pBCPX foi digerido com as enzimas de restrição Sall/EcoRI/BglI. As duas primeiras enzimas, para liberar o cassete PGK-XI de 3,1 kb, e a terceira, para facilitar a purificação. O vetor pYXI foi digerido com Sall / EcoRI, liberando um fragmento de 3,1kb referente a XI e o vetor YC230 de 6,3kb. Ambos tiveram digestão total.

Os fragmentos PGK-XI (3,1 kb) e o vetor YC230 (Sall/EcoRI) de 6,3 kb foram eluídos e purificados do gel de agarose. O fragmento PGK-XI foi, então, clonado no vetor YC230 (Sall/EcoRI). Após transformação de *E. coli* XL10 Gold, 5 clones foram

selecionados e analisados com as enzimas BamHI, KpnI, Sall. Destes, 4 apresentaram o perfil esperado. Posteriormente, foram feitas digestões com EcoRI, Sall/EcoRI. Conforme esperado, houve liberação de um fragmento de ~3,1 kb na dupla digestão Sall/EcoRI, e um fragmento linear de ~8kb na digestão com EcoRI (Figura38). O vetor obtido foi denominado pYXI β . O inserto presente neste vetor foi sequenciado, indicando que o fragmento clonado se refere à XI.

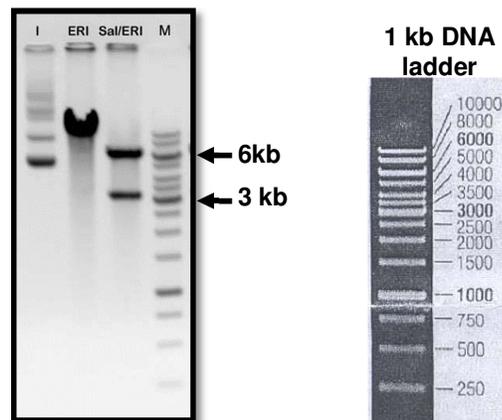


Figura 38: Análise de restrição pYXI β . Análise em gel de agarose 1%. **I:** pYXI β intacto; **ERI:** pYXI β digerido com EcoRI; **Sal/ERI:** pYXI β digeridos com Sall / EcoRI; **M:** marcador 1kb DNA *ladder*(LGC). **1kb DNA ladder:** padrão de massa molecular

Clonagem da xiluloquinase no vetor epissomal pYXI β

Para a construção do cassete de xiluloquinase foi adotada a estratégia esquematizada na Figura 39. O cassete da xiluloquinase é composto do promotor do gene *PGI* (glicose-6-fosfato isomerase), do terminador e gene *XKS1* (xiluloquinase), ambos de *S. cerevisiae*.

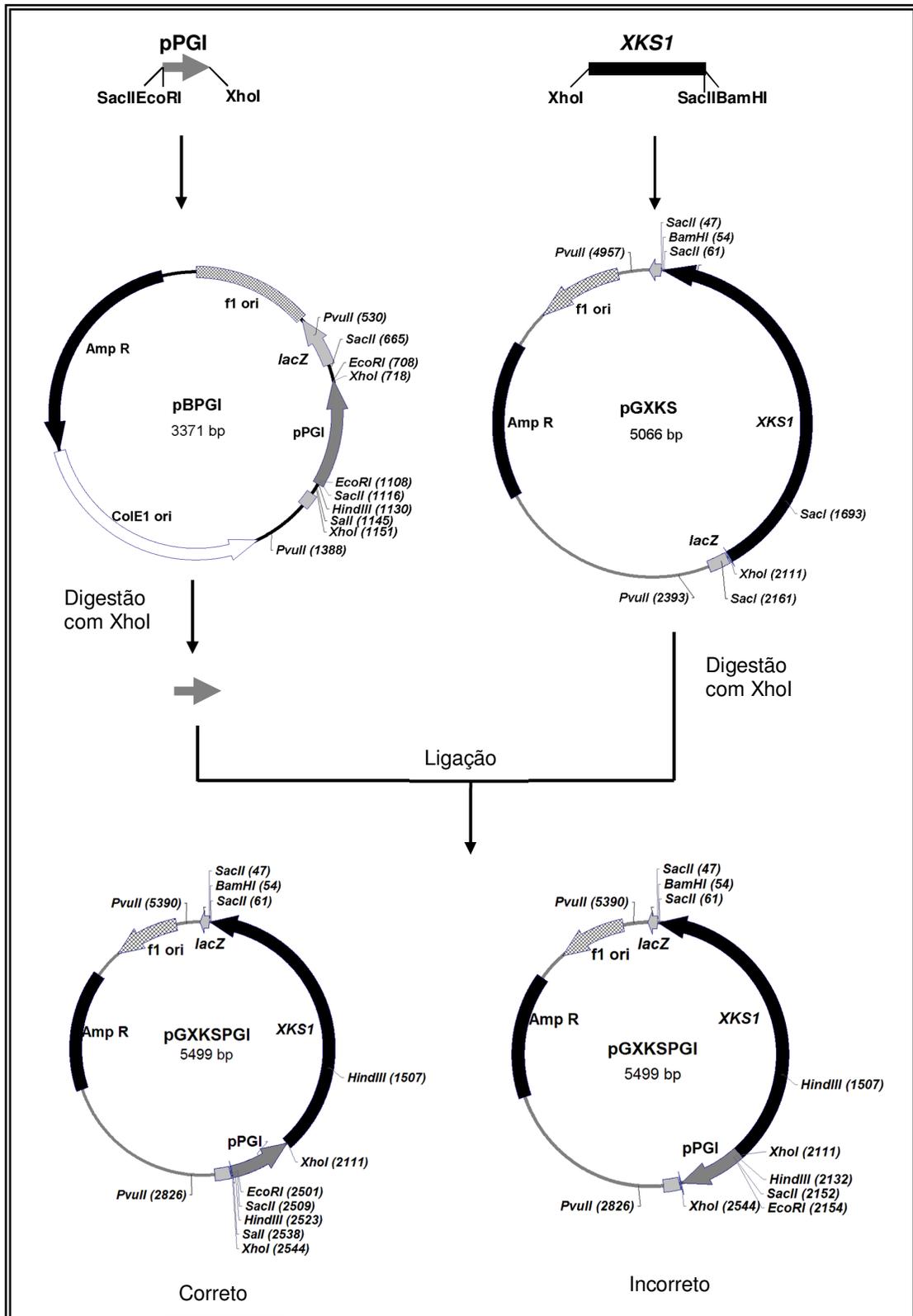


Figura39: Esquema para construção do cassete PGI-XK.

O promotor do gene *PGI* (pPGI) foi obtido pela técnica de PCR usando a enzima *Phusion® DNA polimerase* e os *primers* PGIF e PGIR. O fragmento XKS foi obtido por PCR usando a enzima *Platinum® Taq DNA Polymerase High Fidelity* e os *primers* XKSF e XKSR. Em ambos os casos, como molde foi usado o DNA genômico de *S. cerevisiae* S288c. Pode-se observar na Figura 40 que houve amplificação de um fragmento de ~0,4 kb referente ao promotor *PGI*, e de um fragmento de ~2 kb referente ao gene *XKS1* e seu terminador.

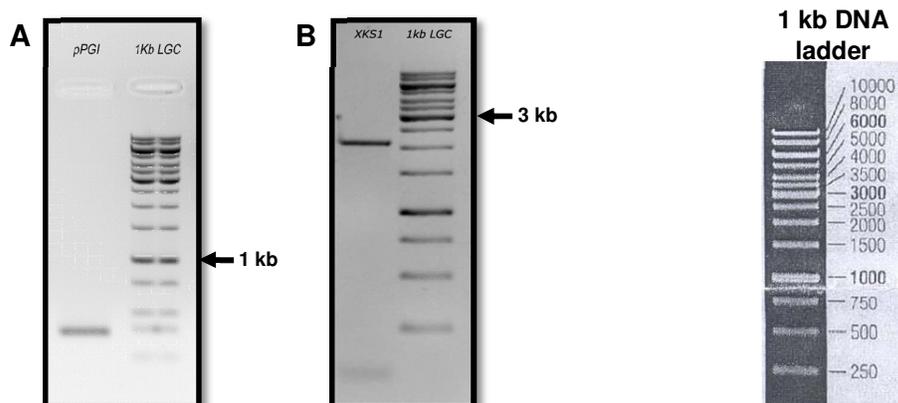


Figura 40: Amplificação dos fragmentos PGI (A) e XKS (B). Análise em gel de agarose 1%. **pPGI:** Produto da amplificação do promotor PGI. **1kb LGC:** Marcador 1kb *ladder* (LGC). **XKS1:** Produto da amplificação do fragmento XKS. **1 kb DNA ladder:** padrão do marcador 1kb DNA *ladder* (LGC).

Os fragmentos foram eluídos do gel de agarose. Posteriormente, o fragmento pPGI foi clonado no vetor de clonagem pBlueScript® II SK (+/-) e o fragmento XKS no vetor pGEM®T.

Foram analisados por restrição com a enzima PvuII 5 transformantes do sistema pBlueScript® II SK (+/-) + PGI. Todos os clones analisados apresentaram inserto. Para verificar a orientação dos insertos, os clones foram digeridos com a enzima SacII. Todos os clones mostraram o mesmo perfil, indicando que o inserto está no mesmo sentido do gene *lacZα* (Figura 39). Um clone foi selecionado e o vetor resultante foi denominado pBPGI.5.

Após análise de restrição com a enzima SacI de 5 transformantes do sistema pGEM®T + XKS, observou-se que dos 4 clones com inserto, 2 estavam com o inserto na orientação contrária à do *lacZα* e 2 estavam com o inserto na mesma orientação do gene *lacZα*. Posteriormente, foi selecionado um clone de cada

orientação para análise de restrição com as enzimas BamHI/XhoI, confirmando a clonagem. O clone escolhido foi denominado pGXKS.

Os vetores resultantes pBPGI e pGXKS foram sequenciados, confirmando a sequência dos fragmentos clonados.

Os vetores pBPGI e pGXKS foram digeridos com a enzima de restrição XhoI. O primeiro, para liberar o fragmento correspondente ao pPGI, o segundo para, linearizar o vetor. Tanto o vetor como o fragmento pPGI foram eluídos do gel. Posteriormente, o vetor pGXKS(XhoI) foi defosforilado para melhor eficiência de ligação do inserto pPGI. Após transformação de *E. coli* com este sistema de ligação, foram selecionados 10 transformantes para análise por PCR de colônia usando os *primers* PGIF e PGIR. Houve amplificação do fragmento referente ao pPGI em todos os clones analisados.

Análise com as enzimas de restrição EcoRI, HindIII, SacII e XhoI foi realizada para confirmar a clonagem em 12 clones. Destes, 5 apresentaram o inserto clonado na orientação desejada, 4 na outra orientação, e 3 apresentaram um perfil não condizente com o esperado. Foi escolhido o clone 7 sendo o vetor resultante denominado pGXK-PGI.

O cassete PGI-XK oriundo do vetor pGXK-PGI foi subclonado no vetor de expressão pYXI β conforme esquematizado na Figura 41.

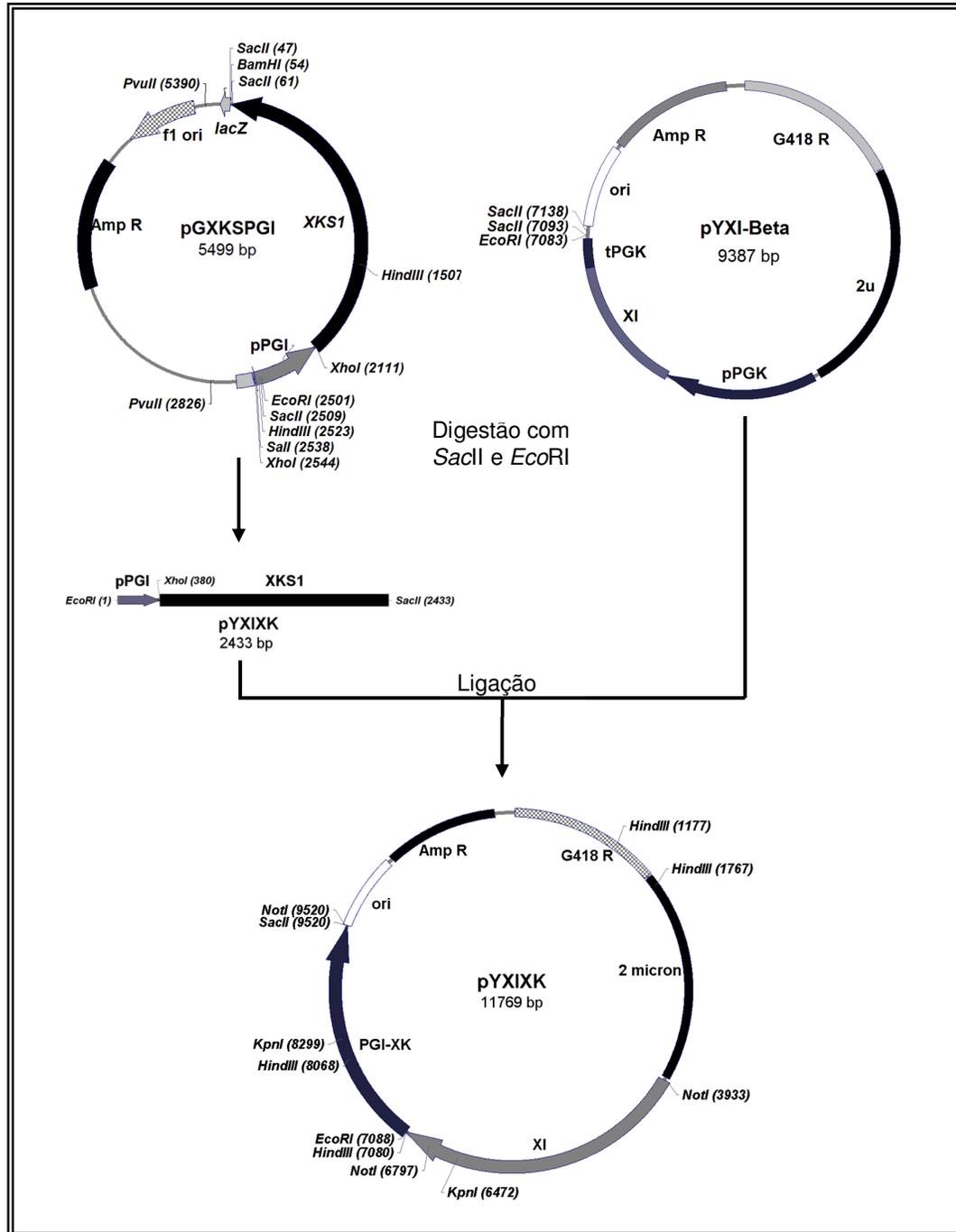


Figura 41: Esquema da subclonagem do cassete de expressão PGI-XK no vetor pYXI β .

O vetor pYXI β foi digerido com a enzima *SacII*. Após confirmação da completa digestão foi adicionada a enzima *EcoRI*. Posteriormente, o sistema foi incubado a 65°C por 30 minutos para inativação das enzimas de restrição. O vetor pGXKPGI foi digerido com as enzimas *SacII* e *EcoRI*, liberando o fragmento de ~2,4 kb referente ao cassete PGI-XK. O fragmento foi purificado e ligado ao vetor pYXI β (*SacII*/*EcoRI*).

Após transformação de *E. coli* DH5 α , foi feita uma análise de restrição de 4 transformantes com KpnI e HindIII. Dois clones apresentaram o perfil esperado, indicando a presença do inserto PGI-XK. Os 2 clones foram digeridos com NotI e SacII/EcoRI confirmando a clonagem (Figura 42). Ambos possuem os cassetes de expressão para XI e XK, pois na digestão com NotI foram observados fragmentos de ~ 2,7kb; 2,8kb (sobrepostos) e 6,1kb, e na dupla digestão com EcoRI/SacII foi observado a liberação do fragmento de 2,4kb (Figura 42). O clone escolhido foi denominado pYXIXK.

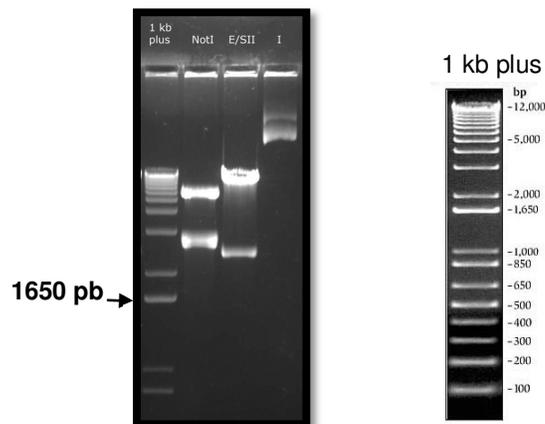


Figura 42: Perfil de restrição do vetor pYXIXK. Análise em gel de agarose 1%. **1kb plus:** marcador 1 kb plus DNA ladder (Invitrogen); **NotI:** pYXIXK digerido com NotI e **E/S:** pYXIXK digerido com EcoRI/SacII; **I:** pYXIXK intacto. **1 kb plus:** padrão de massa molecular 1 kb plus DNA ladder.

5.2.3 Obtenção da Levedura Recombinante para XI e XK

As linhagens de *S. cerevisiae* JP1, MFL e RE1006 foram transformadas com os vetores pYXIXK e pYC230 pelo protocolo de fase estacionária. Os transformantes foram selecionados em placa de YPD contendo 200 μ g/mL G418 para linhagens industriais e 300 μ g/mL para linhagem RE1006. Os transformantes foram transferidos para placas contendo os meios YPD com G418, MX e MDX (0,5% glicose e 2% xilose).

Após 9 dias de crescimento em meio MX, pode-se observar que o transformante para JP1 assinalado na Figura 43 mostrou um melhor crescimento. Os transformantes com vetor controle e os transformantes da linhagem laboratorial RE1006 não apresentaram crescimento.

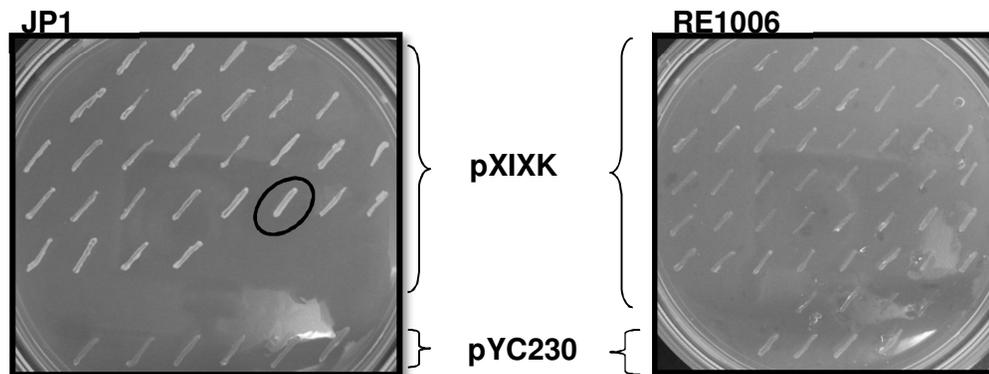


Figura 43: Crescimento dos transformantes em meio MX. pXIXK: transformantes como vetor pXIXK e **pYC230:** transformantes como vetor controle (pYC230). Elipse indica clone com melhor crescimento.

Para verificar a presença do plasmídeo nos transformantes, foi feita uma PCR de colônia multiplex com os pares de *primers* G418F/G418R, para amplificar o gene de resistência a G418 (~1,6 kb), e XIF/XIR, para amplificar o gene da XI (~1,3 kb). Foram escolhidos 5 transformantes aleatórios para XIXK e 2 transformantes controles (YC230) (Figura 44).

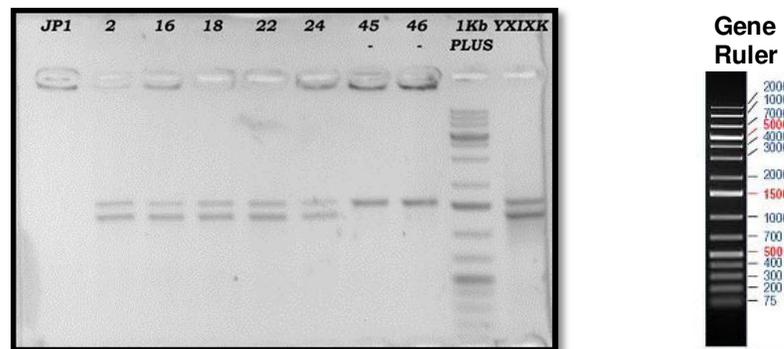


Figura 44: Análise dos transformantes de JP1 para XI e XK. Eletroforese em gel de agarose 1% da PCR de colônia multiplex. **JP1:** produto da PCR da linhagem não transformada. **2, 16, 18, 22 e 24:** produto da PCR dos transformantes para pYXIXK, **45 e 46:** produto da PCR dos transformantes para pYC230 **1kb plus:** marcador O' Gene Ruler 1 kb *plus* (Fermentas) e **YXIXK:** produto da PCR do vetor pYXIXK. **Gene Ruler:** padrão do marcador o' Gene Ruler 1 kb *plus*

Pode-se observar na Figura 44 que não houve amplificação na linhagem não-transformada. Houve amplificação dos fragmentos referente ao gene de resistência a G418 e da XI nos clones para pYXIXK, bem como no controle positivo (vetor pYXIXK) e amplificação apenas do fragmento referente ao gene de resistência a G418 nos transformantes com o vetor pYC230.

5.2.4 Adaptação Metabólica

Foi escolhido um clone de cada linhagem transformada com o vetor pYXIXK para os ensaios de adaptação metabólica em xilose. Os clones escolhidos foram denominados VCB111 (JP1 + pYXIXK); VCB211 (MFL+ pYXIXK) e VCB311 (RE1006 + pYXIXK). Durante o processo, amostras da cultura foram visualizadas no microscópio. Pode-se observar apenas células com características de *S. cerevisiae* indicando a ausência de contaminação. No último ponto de coleta, as células apresentaram um aspecto morfológico bacilar, embora com um tamanho compatível com o de levedura. Estas células foram crescidas em meio com glicose e analisadas no microscópio. As células voltaram a apresentar o aspecto morfológico típico de levedura. Portanto, concluiu-se que a levedura alterou seu aspecto morfológico por estresse ao meio com xilose. Há relatos na literatura de alteração morfológica por estresse (Morris *et al.*, 1983).

O processo de adaptação metabólica para a linhagem VCB111 durou 48 dias, tendo sido mais rápido do que o relatado no trabalho de Kuyper *et al.*(2004), que durou 79 dias (Tabela 11). Provavelmente, a adaptação foi mais rápida pela presença do gene XK superexpresso. A taxa de crescimento da levedura em xilose, que era inicialmente de $0,008 \text{ h}^{-1}$, atingiu $0,13 \text{ h}^{-1}$ ao final do processo. A linhagem resultante ao final da adaptação metabólica foi denominada VCB112. Para a linhagem VCB211, a taxa de crescimento inicial foi de $0,006 \text{ h}^{-1}$ atingindo $0,13 \text{ h}^{-1}$ após 38 dias. A linhagem VCB311 começou com uma taxa de crescimento de $0,007 \text{ h}^{-1}$ e, após 55 dias, atingiu $0,11 \text{ h}^{-1}$. Pode-se observar que as linhagens industriais tiveram aumento de sua taxa de crescimento em menos tempo que a linhagem de laboratório.

Tabela 11: Evolução da linhagem recombinante VCB111

	OD ₆₀₀ inicial	OD ₆₀₀ final	Tempo (h)
VCB1111	0,19	1,48	151
VCB1112	0,40	1,40	118
VCB1113	0,18	1,80	90
VCB1114	0,18	1,48	73
VCB1115	0,18	1,56	52
VCB1116	0,20	1,48	38
VCB1117	0,21	1,56	34
VCB1118	0,20	2,02	44
VCB1119	0,21	1,96	44
VCB111.10	0,21	1,52	32,5
VCB111.11	0,21	2,20	40,5
VCB111.12	0,19	2,72	53
VCB111.13	0,22	2,20	41,5
VCB111.14	0,20	1,80	28
VCB111.15	0,19	1,52	42
VCB111.16	0,38	2,10	25,5
VCB111.17	0,23	3,48	45
VCB111.18	0,23	2,12	22,5
VCB111.19	0,21	2,16	23
VCB111.20	0,22	2,24	23
VCB111.21	0,23	2,26	53,5
VCB111.22	0,24	1,72	17,5
VCB111.23	0,18	2,40	28,5
VCB111.24	0,22	1,40	14

5.2.5 Análise do metabolismo de xilose

Foi realizada uma comparação de crescimento das linhagens VCB001 (JP1 + YC230), VCB101(JP1 + YXI), VCB111 (JP1 + pYXIXK), VCB112 (JP1 + pYXIXK após adaptação) e JP1 não-transformada em meio MX e MD sólido. Foi aplicada a mesma concentração de células para as quatro linhagens com diluições de $1,5 \times 10^7$ até $1,5 \times 10^3$. Pode se observar na Figura 45A que a linhagem que apresentou maior crescimento em placa foi a VCB112 (linhagem adaptada), seguida da VCB111, VCB101 e JP1 e depois da VCB001. Esta última deve ter crescido menos devido à presença do vetor YC230. Como relatado anteriormente, a marca dominante influi no crescimento celular pelo fato de afetar as funções celulares (Pronk, 2002). Observa-se também uma alteração no aspecto da linhagem VCB112, que apresenta colônias com tom amarelado. Isso pode ser devido ao acúmulo de algum metabólito que apresenta esta cor. A adaptação ocorre em todo o sistema celular, o que pode levar a alguma alteração fenotípica da célula. Granek & Magwene (2010) mostraram que ocorre alteração morfológica em diferentes linhagens de *S. cerevisiae* de acordo com o ambiente nutricional em que a colônia cresce, havendo mudança entre as

diferentes condições nutricionais e entre as linhagens. No meio com glicose, observa-se um crescimento mais lento da linhagem VCB112 com um aspecto morfológico semelhante às outras linhagens (Figura 45B). Esse crescimento mais lento é relatado para a linhagem RWB217 em relação à sua linhagem parental (Kuyper *et al.*, 2005a)

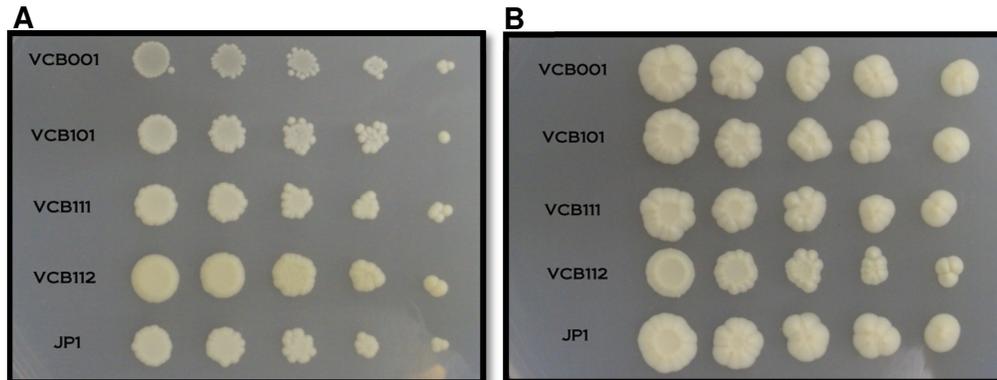


Figura 45: Crescimento de *S. cerevisiae*. A) meio MX B) meio MD. VCB001: JP1 + YC230; VCB101: JP1 + YXI; VCB111: JP1 + pYXIXK; VCB112: JP1 + pYXIXK após adaptação e JP1: linhagem não transformada

Uma comparação de crescimento em meio líquido foi realizada para verificar a funcionalidade da enzima XK. Uma colônia de cada linhagem (VCB112, VCB111, VCB101 e VCB001) foi inoculada em meio YPD. A cultura foi crescida a 30°C / 200 rpm / ~20 horas. Após esse período, a quantidade de células necessárias para iniciar o inóculo com $OD_{600} = 0,2$ em 100 mL de meio MX foi sedimentada e lavada com água destilada estéril. Foram retiradas alíquotas das culturas até a linhagem VCB112 atingir a fase estacionária. Como pode ser observado na Figura 46A, houve um aumento da taxa de crescimento da linhagem VCB111, que possui as enzimas XI e XK, em relação ao controle VCB001 (vetor sem inserto) e VCB101 (apenas XI), demonstrando a atuação da XK no metabolismo de xilose. A linhagem VCB112 (adaptada) teve um aumento significativo na taxa de crescimento ($\mu = 0,117 \text{ h}^{-1}$) em relação a VCB111 ($\mu = 0,03 \text{ h}^{-1}$) indicando que, provavelmente, houve uma adaptação de outras vias metabólicas favorecendo o metabolismo de xilose (Figura 46B). Pelo tempo analisado, a taxa de crescimento da linhagem VCB101 não teve um aumento significativo em relação ao controle VCB001. Futuramente, será necessário realizar este ensaio em triplicata, com análise estatística para validar os dados, além de coletar dados com um tempo maior de cultivo. A linhagem VCB111 teve o

acompanhamento do crescimento até ~300 h para o cálculo da taxa de crescimento (Figura 48B).

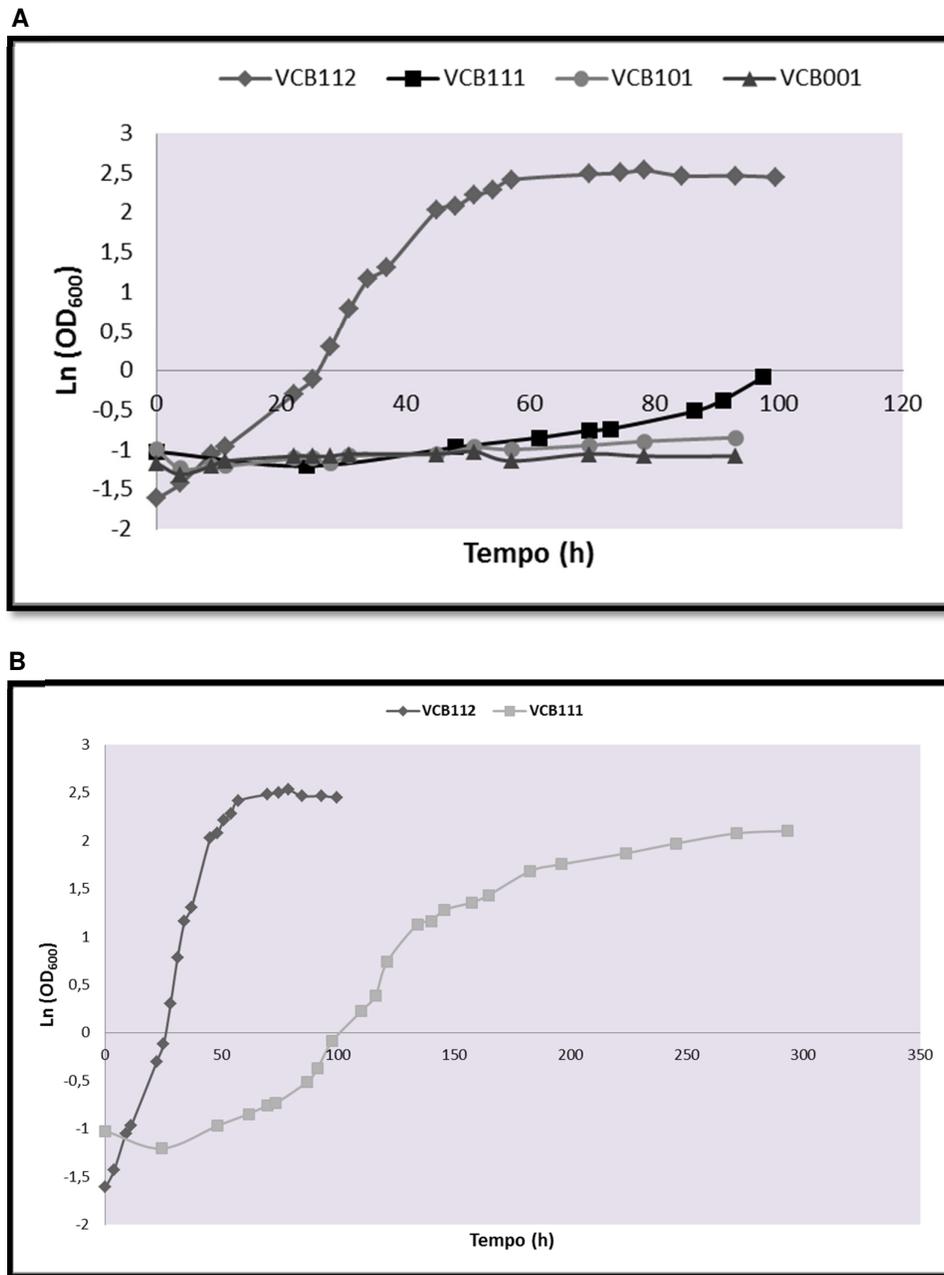


Figura 46: Curva de crescimento de *S. cerevisiae* recombinante em xilose 2%. A) Comparação da taxa de crescimento entre as 4 linhagens. VCB001 – JP1 + pYG230; VCB101 – JP1 + pYXI; VCB111 – JP1 + pXIXK e VCB112 – JP1 + pXIXK após adaptação metabólica. B) Comparação da taxa de crescimento das linhagens VCB111 e VCB112. No eixo X está representado o tempo em horas e no eixo Y a taxa de crescimento (Ln da OD₆₀₀). n=1.

A linhagem VCB111 apresentou um $\mu=0,03 \text{ h}^{-1}$, superior à linhagem RWB202 ($\mu=0,005 \text{ h}^{-1}$) (Kuyper *et al.*, 2003). A diferença é que em VCB111 há a superexpressão das enzimas XI e XK e, em RWB202, apenas de XI.

A linhagem VCB112 apresentou uma taxa de crescimento inferior ao relatado anteriormente (seção 5.2.4 deste capítulo), pois a adaptação foi feita até a OD_{600} de 1,5, conforme descrito por Kuyper *et al.* (2004).

5.2.6 Fermentação

Para analisar a capacidade fermentativa da levedura adaptada, foram inoculadas $0,75 \times 10^7$ células das linhagens VCB001 (JP1 + YC230), VCB101 (JP1 + YXI), VCB111 (JP1 + pYXIXK) e VCB112 (JP1 + pYXIXK após adaptação) em meio MX em tubos de Durham. Pode-se observar na Figura 47A que, após 72 horas, já havia a formação de CO_2 no tubo da linhagem VCB112 e que aumentou após 120 horas de incubação (Figura 47B). Nas outras linhagens, não pode ser detectada a formação de CO_2 indicando que não eram capazes de fermentar xilose de forma eficiente como VCB112. Isso mostra que o processo de adaptação metabólica tornou a levedura JP1 modificada geneticamente capaz de metabolizar e fermentar xilose.

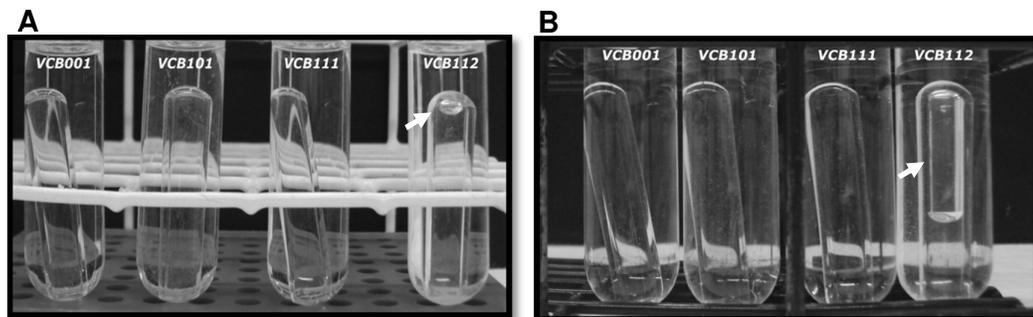


Figura 47: Teste de fermentação. Análise por tubo de Durham. **A) Após 72 horas B) Após 120 horas.** **VCB001:** JP1 + YC230, **VCB101:** JP1 + YXI, **VCB111:** JP1 + pYXIXK e **VCB112:** JP1 + pYXIXK após adaptação. A seta branca indica local de acúmulo de CO_2 .

Foi feita uma fermentação em pequena escala da linhagem VCB112 com a colaboração da Dra. Nádia Skorupa Parachin. A linhagem VCB112 foi semeada em meio 2MX (5% xilose) a partir do estoque congelado a -80°C . A primeira colônia a crescer foi transferida para uma nova placa de meio 2MX a fim de obter massa

celular para o inóculo. A fermentação foi feita em 50 mL de meio 2MX (5% xilose) por 96 horas iniciando o inóculo com 5 g L^{-1} de células. Amostras da fermentação foram recolhidas ao longo da fermentação para análise dos produtos formados e consumo do substrato por HPLC (Figura 48).

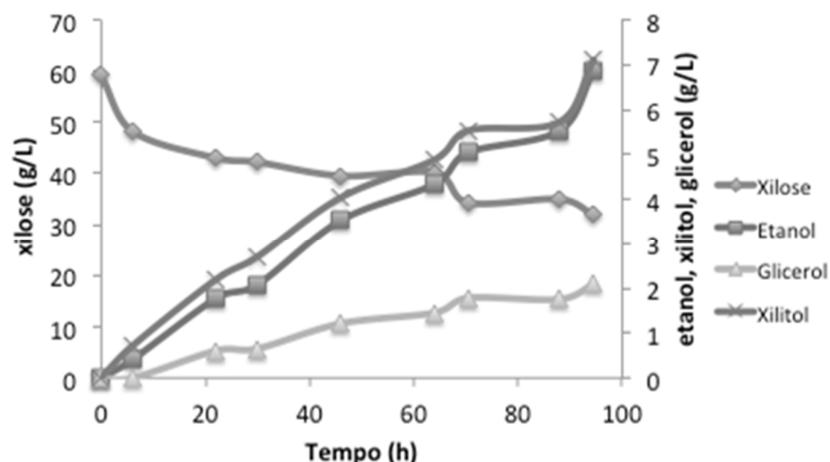


Figura 48: Fermentação da linhagem VCB112. Gráfico representando o consumo do substrato (xilose) e formação dos produtos (etanol) e subprodutos (xilitol e glicerol) ao longo do tempo.

Os valores do consumo de xilose, a formação dos produtos e subprodutos estão descritos na Tabela 12. O consumo final de xilose foi de 48,6%, com uma baixa produção de etanol ($Y_{E/S} = 0,3 \text{ g g}^{-1}$) e alta produção do subproduto xilitol ($Y_{X/S} = 0,31 \text{ g g}^{-1}$) (Tabela 12). O valor teórico para o máximo de rendimento de etanol é de $0,51 \text{ g g}^{-1}$, portanto, a produção de etanol foi de 58,82% do valor teórico.

Tabela 12: Fermentação da linhagem VCB112. Análise quantitativa do consumo de xilose e formação do produto (etanol) e subprodutos (xilitol e glicerol). Rendimento (g g^{-1} : g do produto ou subproduto/g de xilose).

Cepa	Xilose Cons.	EtOH	Glicerol	Xilitol	Balanço C	ETOH	Glicerol	Xilitol
VCB1*	27.4671	6.8628	2.089	7.1078	99	0.25	0.08	0.26
VCB2*	23.7013	4.1571	1.2848	4.1909	89.2	0.28	0.08	0.32
VCB3*	21.7805	6.709	2.0222	6.6699	91.6	0.3	0.09	0.31
Média	24.3163	5.9096	1.7986	5.9895	93.2	0.27	0.08	0.29
DP	2.36192	1.2408	0.3643	1.2843	4.1	0.02	0.004	0.02

* Colônias derivadas da matriz VCB112

A linhagem VCB112 em fermentação anaeróbica gerou, além do etanol, os subprodutos glicerol e xilitol. A formação de glicerol foi semelhante aos principais dados da literatura (Tabela 13). É esperado que *S. cerevisiae* gere glicerol como subproduto durante o crescimento em condições anaeróbicas (Olsson & Nielsen, 2000). Quanto ao xilitol, a formação foi alta. Isso pode ter levado a uma queda no rendimento de etanol, visto que a xilose isomerase de *Piromyces* sp é inibida por este metabólito (Brat *et al.*, 2009), além de afetar o influxo de xilose para célula, devido à interrupção do metabolismo de xilose. A presença da aldose redutase da própria levedura, codificada pelo gene *GRE3*, que converte xilose a xilitol, também pode ter contribuído para este acúmulo (Kuhn *et al.*, 1995; Yamanaka, 1969) embora outras linhagens sem a deleção do *GRE3* tenham apresentado um acúmulo menor de xilitol (Tabela 13). Isso pode ser explicado pelo tipo de linhagem usada. Além disso, após a adaptação metabólica a expressão da *GRE3* pode ter sido alterada. Todas as linhagens mostradas na Tabela 13 são linhagens laboratoriais, haploides, enquanto a usada neste estudo foi uma linhagem industrial diploide. Brat *et al.* (2009) expressaram a XI de *Clostridium phytofermentans* otimizada na linhagem industrial Barra Grande obtendo um rendimento de etanol 0,43 g g⁻¹ e um menor acúmulo de xilitol (0,18 g g⁻¹). A XI de *C. phytofermentans* é 3 vezes menos sensível à inibição pelo xilitol que a enzima homóloga de *Piromyces* sp. Isso permite que o fluxo metabólico não seja interrompido. Outro ponto importante foi a condição de fermentação usada, 3% xilose e 170 horas de fermentação. Além disso, não há relatos sobre as características genéticas da linhagem Barra Grande que possam ser usadas para comparação com JP1.

Tabela 13: Comparação do consumo de xilose e formação de produtos de fermentação de diferentes linhagens recombinantes de *S cerevisiae* da literatura

	VCB112	MT8-1/XKδXI	INVSc1/pRS406XKS/pWOXYLA	RWB202-AFX
	Xilose 5% anaeróbico	Xilose 3% anaeróbico	Xilose 5% anaeróbico	Xilose 2% anaeróbico
Xilose consumida	161,9 mM	145,9 mM	69,3 mM	137,4 mM
Etanol	128,0 mM	150,0 mM	88,1 mM	186,8 mM
Xilitol	39,0 mM	18,6 mM	5,84 mM	2,76 mM
Glicerol	19,0 mM	16,9 mM	9,33 mM	18,3 mM
Referência	Neste estudo	Tanino <i>et al.</i> , 2010	Madhavan <i>et al.</i> , 2009	Kuyper <i>et al.</i> , 2004

Quanto à baixa produção de etanol, alguns pontos devem ser considerados: o acúmulo de xilitol dito anteriormente afeta o fluxo metabólico; a concentração de

xilose usada pode ter afetado o influxo de xilose, visto que não há transportadores específicos para este açúcar em *S. cerevisiae*. A expressão da xiluloquinase em vetor episomal (alto número de cópias) pode ter afetado negativamente a produção de etanol, conforme relatado por Jin *et al.* (2003).

Quanto ao consumo de xilose, a linhagem VCB112 (48,6%) comparada à linhagem INVSC1/PRS406XKS/pWOXYLA (20,8%) foi superior, fato relevante quando se leva em consideração que o tempo de fermentação foi de 96 h para a primeira e 140 h para a segunda. Mesmo após a introdução do gene *SUT1* nesta última linhagem, o consumo de xilose (31,1%) foi inferior à VCB112 (Madhavan *et al.*, 2009).

Portanto, a linhagem VCB112 mostrou-se promissora para a fermentação de xilose quando comparada a outras linhagens descritas na literatura. Uma abordagem para melhorar o rendimento de etanol na linhagem VCB112 é a eliminação da atividade endógena de aldose redutase (*GRE3*), o que resultaria em um menor acúmulo de xilitol, visto que não há uma xilitol desidrogenase funcional em *S. cerevisiae* para converter o xilitol a xilulose.

5.2.7 Deleção do *GRE3*

Construção do cassete de deleção

Foi iniciada a construção do cassete de deleção do gene *GRE3* com a simultânea integração do gene *XKS1* neste *locus*. Para tal, foi montada a seguinte estratégia (Figura 49).

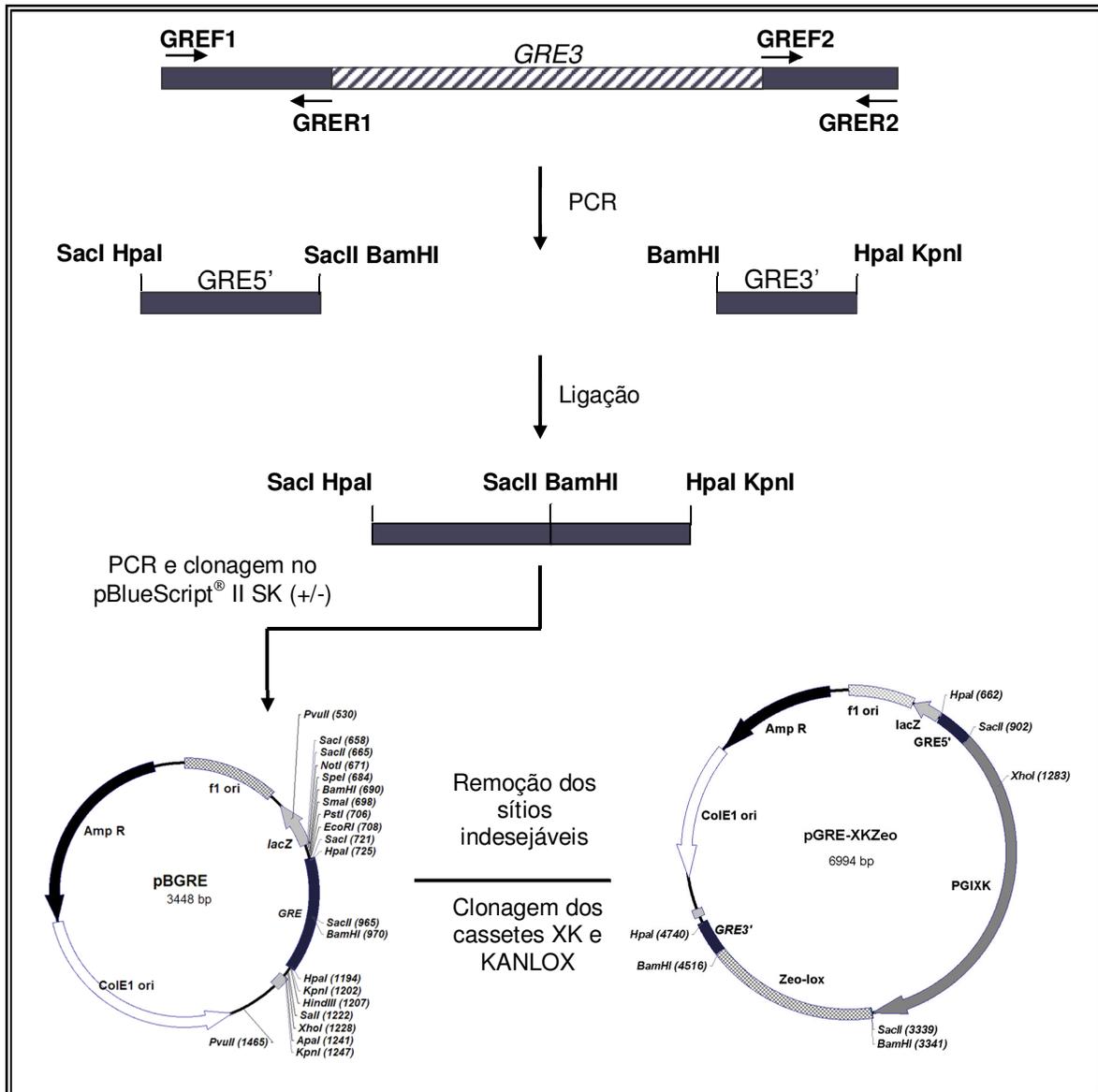


Figura 49: Esquema para construção do cassete de deleção do gene *GRE3*.

A região *upstream* do gene *GRE3* (*GRE5'* - 230pb) foi amplificada usando a enzima *Platinum® TaqDNA Polymerase High Fidelity* e os primers *GREF1/GRER1*. A região *downstream* (*GRE3'* - 220pb) foi amplificada usando a enzima *Phusion® DNA polimerase* e os primers *GREF2/GRER2*. Como molde, foi usado o DNA genômico de *S. cerevisiae* S288c. Houve amplificação de ambas as regiões (Figura 50A). Os produtos da PCR foram eluídos do gel. Posteriormente, foi feita uma digestão dos produtos de PCR com a enzima *BamHI*. Após inativação da enzima de restrição a 85°C/30min os fragmentos foram ligados. O sistema de ligação foi inativado a 65°C/10min e usado como molde numa nova reação de PCR com os

primers GREF1/GRER2 e a enzima *Phusion® DNA polimerase*. Pode-se observar na Figura 50B que houve amplificação de um fragmento de ~450pb correspondente aos 2 fragmentos de *GRE3* ligados.

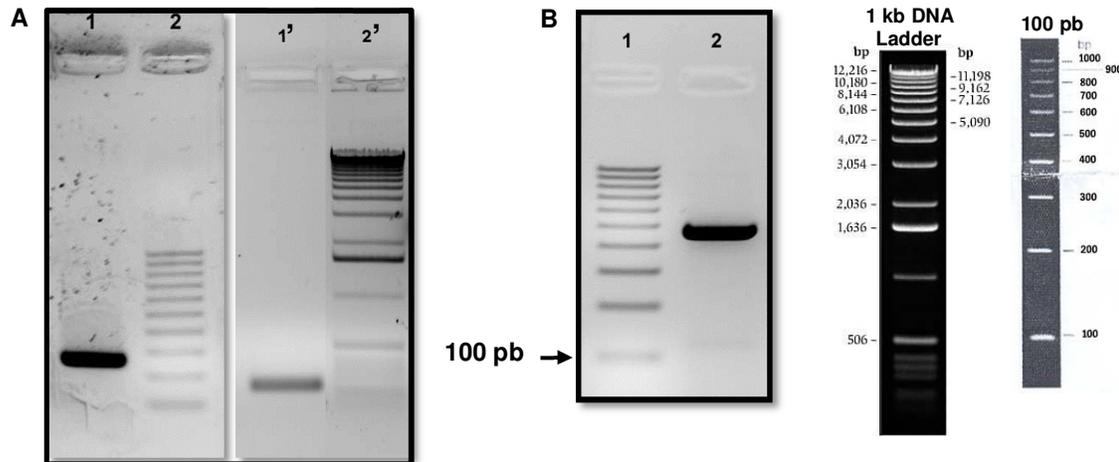


Figura 50: PCR *GRE3*. A) Amplificação da região *upstream* e *downstream* ao *GRE3*. Eletroforese em gel de agarose 1%. **Poço 1:** amplificação do fragmento *GRE5'*, **poço 2:** 100pb *ladder* (LGC). **poço 1':** amplificação do fragmento *GRE3'*, **poço 2':** 1kb DNA *ladder* (INVITROGEN). B) Amplificação dos fragmentos *GRE3* ligados. Eletroforese em gel de agarose 2%. **Poço 1:** 100pb *ladder* (LGC), **poço 2:** amplificação do sistema de ligação.

O fragmento referente ao *GRE3* ligado foi eluído do gel de agarose e clonado no vetor pBlueScript® II SK (+/-) previamente digerido com *EcoRV*. Foi feita uma análise de restrição de 6 transformantes com as enzimas *XbaI* e *BamHI* para determinar a presença do inserto assim como sua orientação. Foi identificado um clone com inserto no sentido horário, e 3 clones com inserto no sentido anti-horário. Foi escolhido o clone 1, sendo então denominado pBGRE.1. Como há presença de sítios de restrição para as enzimas *BamHI* e *SacII* no vetor, foi necessário removê-los para não dificultar futuras clonagens. Portanto, o vetor pBGRE.1 foi digerido com *SacI*, eliminando ~70pb de sequências do MSC (múltiplos sítios de clonagem) seguindo-se religação do vetor linearizado. Foram selecionados 5 clones que foram analisados com as enzimas *BamHI* e *SacII*. Todos apresentaram um único fragmento linear indicando que houve perda dos sítios indesejáveis. O vetor foi denominado pBGRE.3. Foi feita também uma PCR dos vetores pBGRE.1 e pBGRE.3 com os *primers* M13 Univ e M13 Univ Rev para confirmar a perda dos ~70pb (Figura 51).

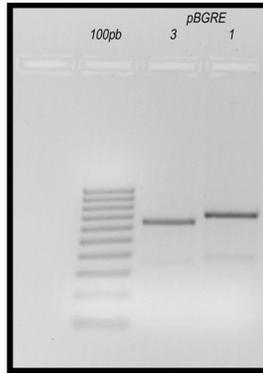


Figura 51: Confirmação da deleção de uma região do MSC do vetor pBGRE3. Análise em gel de agarose 1% da PCR com os *primers* M13 Univ e M13 Univ Rev. **100pb**: 100pb ladder (LGC), **pBGRE 3**: vetor molde - pBGRE 3 e **pBGRE 1**: vetor molde - pBGRE 1

Pode-se observar que houve redução do tamanho do fragmento amplificado, sendo mais um indício da perda dos sítios. O vetor foi sequenciado confirmando a sequência correta das regiões flangeadoras do gene *GRE3*.

O vetor está pronto para receber a marca de seleção, para posterior deleção do *loci GRE3*.

5.3 CAPÍTULO 3: ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE GENES ENVOLVIDOS NO METABOLISMO DE XILOSE EM *Pichia stipitis*

5.3.1 *Pichia stipitis*

A levedura *P. stipitis* é um importante microrganismo no contexto da produção de álcool de segunda geração. Além de ser uma fonte de genes para expressão heteróloga em *S. cerevisiae*, é também uma opção para a fermentação de resíduos lignocelulósicos. É importante, pois, conhecer a regulação da expressão dos genes relacionados ao metabolismo de xilose neste organismo para que haja transferência de informações para outros sistemas biológicos.

P. stipitis, encontrada originalmente no sistema gastrointestinal de besouro, é uma levedura haploide, homotática, possuindo um genoma de ~15,4 Mb com 8 cromossomos. Seu genoma foi sequenciado, e foram identificados 5841 genes preditos, a maioria sem íntrons. Não segue o código genético universal, pois o códon CUG codifica para leucina ao invés de serina. Apresenta uma morfologia elipsoide, quando se encontra na fase vegetativa de crescimento e sua divisão ocorre por brotamento. Seus esporos são em forma de chapéu e forma pseudo-hifas sob condições limitantes de fonte de carbono (Jeffries *et al.*, 2007; Passoth *et al.*, 1992).

Dentre as leveduras, é considerada uma das melhores fermentadoras de xilose (Kurzman, 1990; Melake *et al.*, 1996). Seu rendimento de etanol em cultivo de batelada alimentada é de 0,35-0,44 g g⁻¹ xilose. A fermentação do hidrolisado pode chegar a 80% do valor teórico (Hahn-Hägerdal & Pamment, 2004; Nigam, 2001), pois é capaz de utilizar uma grande variedade de substratos, tais como, glicose, xilose, galactose, manose, celobiose, polímeros de manose e de xilana, além de metabolizar lignina de baixa massa molar e arabinose, (Nigam, 2002; Jeffries *et al.*, 2007; Jeffries & Van Vleet, 2009).

Diferentemente de *S. cerevisiae*, *P. stipitis* não fermenta em condições aeróbicas, mesmo em altas concentrações de açúcares. O que regula a mudança de respiração para fermentação é a disponibilidade de O₂. Uma mudança para 20% de

oxigênio dissolvido leva à formação de etanol (Klinner *et al.*, 2005). Na presença de O₂ há formação de biomassa e a baixa disponibilidade de O₂ leva à produção de etanol (du Preez, 1994). O crescimento celular e fermentação não ocorrem de forma simultânea como em *S. cerevisiae*. Portanto, o O₂ é um importante agente regulatório da fisiologia deste microrganismo, pois está envolvido no crescimento celular (respiração), na fermentação, no balanceamento redox e no transporte celular (Skoog & Hahn-Hägerdahl, 1990). Para a indústria, esse fato se torna uma desvantagem quanto ao uso desta levedura em fermentação de resíduos lignocelulósicos, pois o controle rígido de O₂ torna o processo oneroso em escalas superiores.

Visando melhorar o desempenho de *P. stipitis* ao processo fermentativo de material lignocelulósico, a linhagem CBS 5774 foi submetida a um processo adaptativo em hidrolisado hemicelulósico rico em xilose pela equipe do Prof. Nei Pereira, da UFRJ. Entender as modificações genéticas ocorridas neste processo gera conhecimento para ser aplicado à engenharia metabólica de outros microrganismos como *S. cerevisiae*. Os genes codificadores de transporte de xilose são de particular interesse, pois poderiam ser transferidos para a levedura fermentadora de xilose obtida neste trabalho a fim de aumentar a produção de etanol.

5.3.2 Transporte de xilose

Uma importante característica a ser observada num processo fermentativo envolvendo xilose é o transporte deste açúcar para o interior da célula que ocorre por meio de proteínas de membrana, os transportadores. Em *S. cerevisiae*, foram identificados 20 genes envolvidos com o transporte de açúcar (*HXT1-17* e *GAL2*) e os sensores de hexoses codificados por *SNF3* e *RGT2* (Boles & Hollenberg, 1997). Os transportadores codificados pelos genes *HXT8-18* possuem um nível de expressão muito baixo, já *HXT1-7* e *GAL2*, que também possuem afinidade por glicose, apresentam expressão alta em determinadas condições de concentração de glicose. *HXT1-7* e *GAL2* foram caracterizados como transportadores de difusão facilitada, sendo *HXT1* e *HXT3* de baixa afinidade, *HXT2* e *HXT4* de afinidade moderada, e *HXT6*, *HXT7* e *GAL2* de alta afinidade (Maier *et al.*, 2002). Entretanto,

todos têm um alto K_M para xilose (~190 mM), ou seja, uma baixa afinidade por este açúcar (Hector *et al.*, 2008). A afinidade por xilose chega a ser até 200 vezes menor que por glicose (Kötter & Ciriacy, 1993).

Em *S. cerevisiae*, o transporte de xilose e arabinose na presença de glicose é mais rápido em condições anaeróbicas (Jeffries, 1983). Estudos mostram que os transportadores de alta e moderada afinidade Hxt4, Hxt5, Hxt7 e Gal2 são os mais importantes no transporte de xilose (Hamacher *et al.*, 2002). Quando uma linhagem de *S. cerevisiae* recombinante para fermentação de xilose foi cultivada em xilose sob condições aeróbicas ou limitantes de oxigênio, foi observada uma indução da expressão dos transportadores de alta afinidade, os de baixa afinidade tiveram um aumento de 2-5%. Isso sugere que se utilize em *S. cerevisiae* transportadores de alta afinidade para o transporte de xilose (Jeffries & Jin, 2004). Outros transportadores já foram expressos em *S. cerevisiae*: Xlt1 de *Trichoderma reesei* promoveu o crescimento em xilose (Saloheimo *et al.*, 2007), At5g59250 e At5g17010 de *Arabidopsis thaliana* melhorou o influxo de xilose (Hector *et al.*, 2008), Sut1 de *P. stipitis* (Katahira *et al.*, 2008) e Gxf1 de *Candida intermedia* (Runquist *et al.*, 2009), melhoraram o influxo de xilose e o rendimento de etanol. Além disso, verificou-se a importância da interação do transportador heterólogo com as proteínas de membrana (transportadores e sensores) da própria *S. cerevisiae* (para revisão ver Young *et al.*, 2010)

Em *P. stipitis*, o transporte de xilose e glicose ocorre pelo sistema de “próton simporte”, envolvendo tanto transportadores de alta quanto de baixa afinidade por xilose. O sistema “próton simporte” pode representar uma desvantagem para a eficiente e completa fermentação de xilose devida à restrição energética. Estudos demonstraram que, em condições de anaerobiose e limitação de O_2 , a assimilação da xilose é menor, mas isso provavelmente ocorre não por uma regulação dos transportadores por O_2 , mas por comprometimento nas primeiras etapas da via metabólica de xilose que requer O_2 para a produção dos cofatores (Hahn-Hägerdal *et al.*, 1994; Weber *et al.*, 2010). Outro ponto importante, é que os transportadores de baixa afinidade são responsáveis pelo influxo de glicose e xilose, entretanto, há uma inibição não-competitiva da glicose por estes transportadores, impedindo a entrada de xilose (Kilian & van Uden, 1988).

Foram caracterizados três genes que codificam transportadores de açúcar em *P. stipitis*: *SUT1*, *SUT2* e *SUT3*. O primeiro é induzido por glicose, independentemente da oxigenação. Os outros dois são expressos em condições aeróbicas, independentemente da fonte de carbono. Entretanto, todos têm uma afinidade maior por glicose do que por xilose (Weierstall *et al.*, 1999). Após a conclusão do sequenciamento do genoma de *P. stipitis*, foram identificadas, por meio de análises computacionais, mais de 15 ORFs com homologia significativa com genes transportadores de açúcar. Dentre as 15 ORFs analisadas, 7 são similares a genes que codificam transportadores putativos de xilose em outras leveduras e receberam, pois, a denominação “*XUT*” (*Xylose Uptake Transporter*) (Jeffries *et al.*, 2007) (Figura 52).

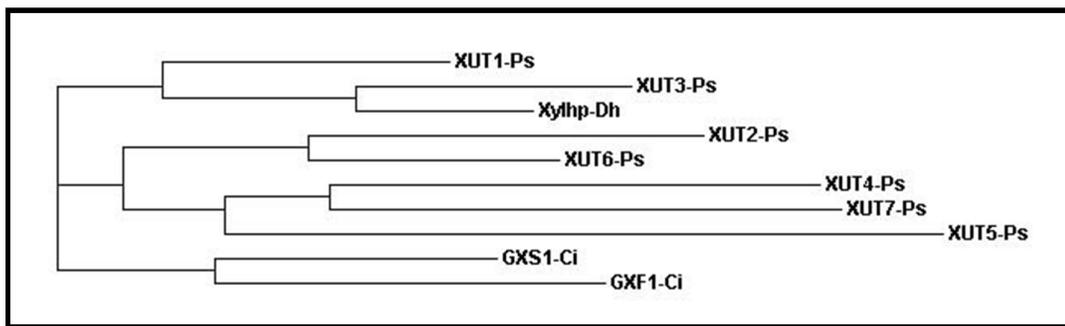


Figura 52: Árvore filogenética. Análise filogenética dos 7 transportadores *XUT* de *P. stipitis* (Ps) e de outros putativos transportadores de xilose das leveduras *Debaryomyces hansenii* (Dh) e *Candida intermedia* (Ci)

No interior da célula, o nível de expressão de cada gene é diferente, e varia de acordo com as necessidades metabólicas. Portanto, a expressão varia conforme a condição em que a célula se encontra. Os substratos, sua concentração, e as condições ambientais em que a célula se encontra são sinais para ativar ou reprimir a expressão dos genes. Existem diferentes técnicas que permitem analisar o nível de expressão gênica em um organismo. Dentre elas podemos citar: Microarranjo de DNA, *Northern blot*, *PCR semi-quantitativo*, e o *Real Time qRT-PCR* (*Real Time quantitative Reverse Transcription Polimerase Chain Reaction*).

O *Real Time qRT-PCR* é baseada na técnica de PCR e permite quantificar, em tempo real, o produto formado a cada ciclo de amplificação. Determina os níveis

de RNA mensageiro ou de RNAs não-codantes com maior precisão e acurácia. Essencialmente, essa técnica é realizada em três etapas: (i) Obtenção da fita de cDNA por meio de transcrição reversa do RNA. (ii) Amplificação do cDNA por PCR. (iii) Detecção e quantificação em tempo real do produto formado (Nolan, 2006).

Neste trabalho, foi avaliada a expressão diferencial de alguns genes da via metabólica de xilose na linhagem adaptada de *P. stipitis* CBS5774 em diferentes fontes de carbono sob aeração. Este estudo teve o intuito de lançar luzes sobre as alterações de padrões de expressão gênica que ocorrem na levedura em diferentes condições de cultivo. Em particular, buscamos focar na expressão dos genes dos transportadores de xilose (putativos e experimentalmente confirmados). Este estudo teve como meta principal escolher um transportador alternativo para ser expresso na linhagem recombinante de *S. cerevisiae*, VCB112, desenvolvida neste trabalho, para melhorar o crescimento e, conseqüentemente, a produção de etanol em meio contendo xilose. Apesar da sua maior afinidade por glicose, o transportador *HXT7* de *S. cerevisiae* é o mais eficiente no transporte de xilose (Sedlak & Ho, 2004). Portanto, este foi o primeiro transportador de escolha para ser expresso na levedura recombinante VCB112.

5.3.3 Análise da expressão diferencial de *P. stipitis*

Desenho dos *primers*

As sequências dos genes a serem analisados foram obtidas no GeneBank. Os números de acesso encontram-se na seção 3.8 de “Material e Métodos”. Foram selecionados para análise os principais genes do metabolismo de xilose (*XYL1*, *XYL2*, *XYL3*, *TAL1* e *TKT1*), os genes correspondentes aos transportadores de hexoses, e transportadores putativos para xilose (*SUT1*, *SUT2*, *XUT1*, *XUT2*, *XUT3*, *XUT4*, *XUT5*, *XUT6* e *XUT7*). Como controle endógeno da reação, selecionamos um gene constitutivo (*ACT1*- codifica para actina) que deve ter padrões de expressão similares em todas as condições a serem analisadas.

Inicialmente, foi feito o alinhamento das sequências dos transportadores para verificar a similaridade entre as mesmas (vide Suplementos 3 e 4). O par de *primers* foi desenhado para se anelar em regiões de baixa similaridade, obedecendo-se as

regras para qRT-PCR. Posteriormente, essas sequências foram analisadas no programa *Primer Express* (*Applied Biosystem*) para identificar a possível formação de estruturas secundárias, T_M e porcentagem de C+G. Para análise de ampliações inespecíficas entre as sequências de transportadores foi usado o programa *Amplify 3.1*. Os genes *SUT3* e *SUT4* não foram incluídos por terem a sequência com 99% e 97% de identidade com *SUT2* (vide Suplemento 3).

Para o desenho dos *primers* referentes ao gene codificador de actina (*ACT1*) e os genes do metabolismo de xilose, foi usada a ferramenta *Primer3Plus* (Untergasser *et al.*, 2007) obedecendo-se as regras para qRT-PCR e, posteriormente, as sequências dos *primers* foram analisados no programa *Primer Express* quanto à formação de estruturas secundárias.

Teste dos primers

Após desenho e síntese dos *primers* para qRT-PCR, estes foram primeiramente testados com DNA genômico de *P. stipitis* CBS 5774 adaptada em uma PCR usando-se *Taq* DNA polimerase (LGC). Os fragmentos esperados variam de tamanho de 70-150 pb aproximadamente (vide Tabela 3 – seção “Material e Métodos”). Pode-se observar que, dos genes da via metabólica de xilose, houve falha na amplificação dos genes *XDH* e *TKL* (Figura 53A). Foi feita a síntese de novos *primers* para *XDH*, que desta vez propiciou amplificação (Figura 53B). Para os transportadores, apenas não houve amplificação para *XUT2* (Figura 53C); foram feitos mais 2 pares de *primers* para este gene, mais ainda assim não obtivemos amplificação. Sendo assim, foram excluídos da análise os genes *TKL* e *XUT2*.

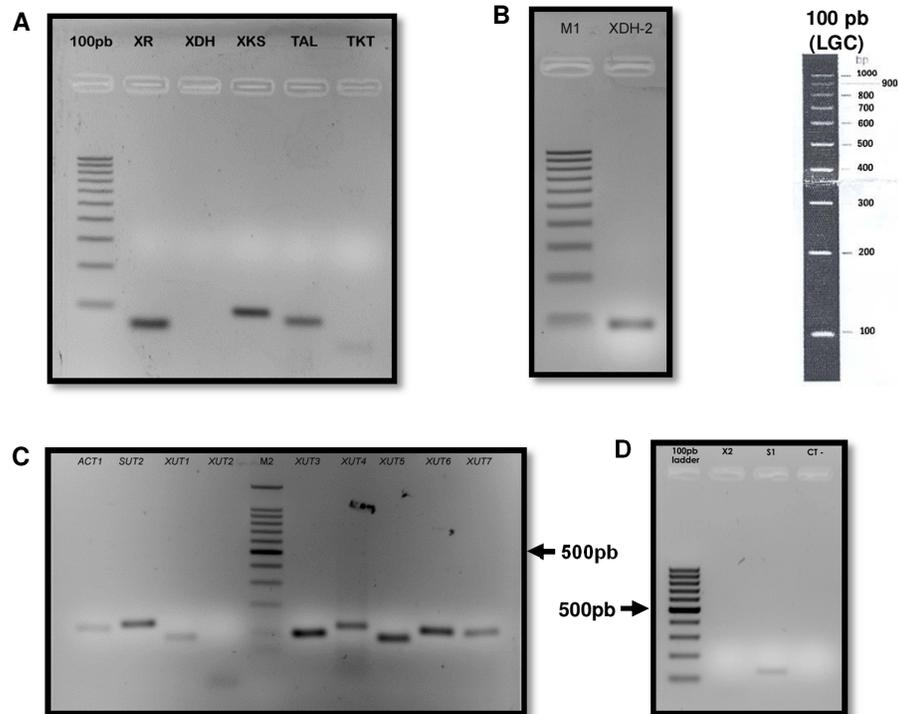


Figura 53: Teste dos primers para qRT-PCR de genes de *P. stipitis*. Análise eletroforética em gel de agarose 2%. **A) Genes da via metabólica de xilose.** 100 pb: 100pb ladder (LGC); **XR:** amplicon para xilose redutase; **XDH:** amplicon para xilitol desidrogenase; **XKS:** amplicon para xiluloquinase; **TAL:** amplicon para transaldolase e **TKL:** amplicon para transcetolase. **B) Genes da via metabólica de xilose.** **M1:** 100pb ladder (LGC); **XDH-2:** amplicon para xilitol desidrogenase. **C) Transportadores e controle endógeno.** **ACT1:** amplicon para actina (controle endógeno); **SUT2:** amplicon para *SUT2*; **XUT1:** amplicon para *XUT1*; **XUT2:** amplicon para *XUT2*; **M2:** marcador 100 pb DNA ladder (Promega); **XUT3:** amplicon para *XUT3*; **XUT4:** amplicon para *XUT4*; **XUT5:** amplicon para *XUT5*; **XUT6:** amplicon para *XUT6*; **XUT7:** amplicon para *XUT7*. **D) Transportadores.** 100 pb ladder: marcador 100 pb DNA ladder (Promega); **X2:** amplicon para *XUT2*; **S1:** amplicon para *SUT1*; **CT-:** controle negativo da reação. 100 pb (LGC): padrão do marcador de massa molecular.

Análise de expressão diferencial

A levedura *P. stipitis* adaptada foi cultivada em meio complexo YP, tendo como fonte de carbono glicose (8%, 2% e 0,1%), xilose (4%, 2%, 0,1%) e ambos, na proporção de 8% glicose e 4% xilose. O crescimento foi feito a 28°C em aerobiose e em condição limitante de O₂, até atingir a OD₆₀₀ de 0,8-1,0 conforme descrito em “Material e Métodos”. Após crescimento, o RNA total foi extraído com sucesso não sendo observada degradação do mesmo (Figura 54).

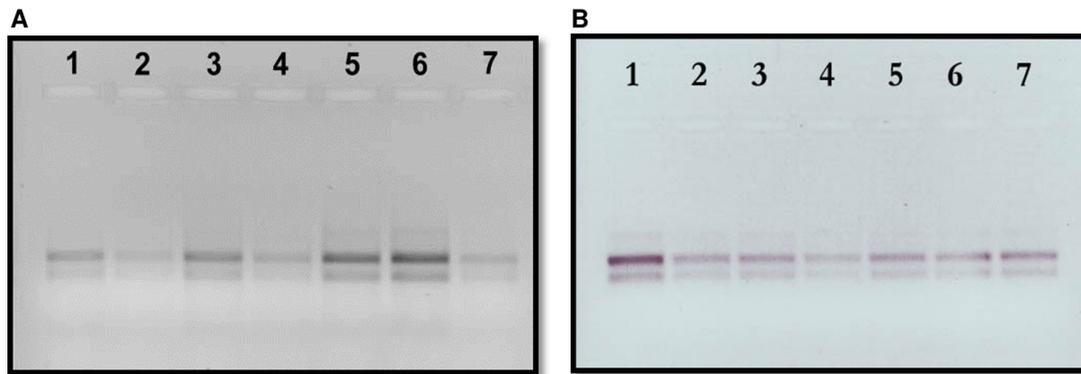


Figura 54: RNA total de *P. stipitis* em diferentes condições de cultivo. Eletroforese em gel de agarose 0,8%. **A) linhagem CBS5774 adaptada crescida em condição limitante de O₂.** **B) linhagem adaptada crescida em condição aeróbica. Poço 1: glicose 8%; poço 2: xilose 4%; poço 3: glicose 2%; poço 4: xilose 2%; poço 5: glicose 0,1%; poço 6: xilose 0,1%; poço 7: glicose 8% + xilose 4%.**

O RNA foi quantificado por espectrometria. Posteriormente, foi sintetizada a fita de cDNA usando-se o kit *SUPERSCRIPT[®] III First Strand cDNA Synthesis* (InvitrogenTM). Em seguida, foi feita uma reação de qRT-PCR para escolher a melhor diluição de cDNA. As reações de qRT-PCR foram feitas usando a 1:20 do cDNA da linhagem adaptada. As reações de qRT-PCR foram feitas usando o kit *Fast SYBR[®] Green Master Mix* (Applied Biosystems). As análises foram feitas pelo método comparativo C_T ($\Delta\Delta C_T$), onde o controle endógeno foi o gene *ACT1* e o experimento referência foi baseado no sistema crescido em 2% glicose. O C_T indica o ciclo no qual a fluorescência começa a ser detectada.

▲ Genes envolvidos no metabolismo de xilose

Foi feita uma comparação dos padrões de expressão dos genes envolvidos no metabolismo de xilose em diferentes concentrações de xilose e numa mistura de 4% xilose com 8% glicose, crescidas em aerobiose da linhagem de *P. stipitis* CBS5774 adaptada. Conforme esperado, os genes envolvidos no metabolismo de xilose são mais expressos em xilose (Figura 55). Pode-se observar que, em alta concentração de glicose, mesmo na presença de xilose, o nível de expressão dos genes analisados é menor que em 2% glicose.

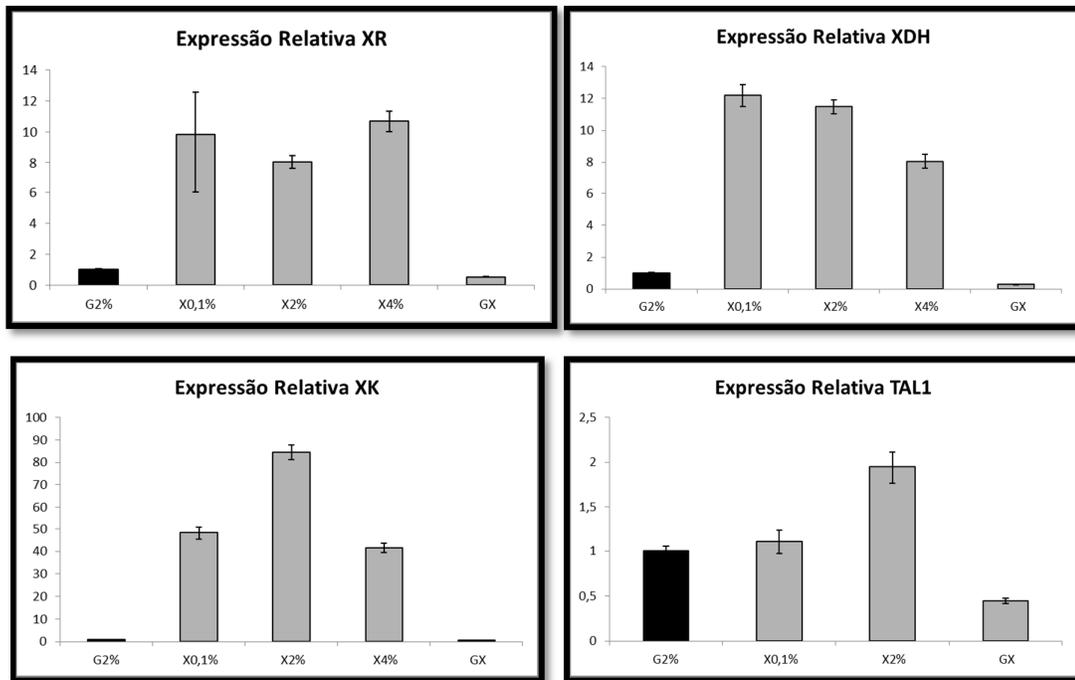


Figura 55: Análise da expressão relativa dos gene da via metabólica de xilose de *P. stipitis* CBS5774 adaptada sob aeração em diferentes fontes de carbono por qRT-PCR. A barra preta é o experimento referência. O desvio padrão é referente à reação (reação em triplicata). n=1.

Os genes *XYL1*, *XYL2* e *XYL3*, que codificam para XR, XDH e XK, respectivamente, apresentam um aumento de expressão em 2% e 4% xilose. Quanto a *TAL1*, foi o que apresentou menor diferença de níveis de expressão quando a levedura foi crescida em meio com xilose. Como a reação para o gene *TAL1* na condição de 4% xilose não ficou satisfatória, este foi retirado da análise. Análise de transcritos de *P. stipitis* CBS6054 em 4 diferentes condições (glicose/aeróbica, glicose/anaeróbica, xilose/aeróbica e xilose/anaeróbica) mostram que os genes *XYL1*, *XYL2* *XYL3* são expressos em baixos níveis em glicose, e os genes, *TKT1* e *TAL1* são menos expressos em glicose que em xilose, independentemente da oxigenação (Jeffries & Van Vleet, 2009). Outro estudo mostra que a expressão dos genes *XYL1*, *XYL2* e *XYL3* em meio complexo contendo 0,6% xilose em diferentes tempos tem um aumento de expressão apenas do gene *XYL1*, aumentando também quando o meio é suplementado com diferentes concentrações de xilose (Han *et al.*, 2010).

Estudos de transcritos por RNA-seq de *P. stipitis* em meio complexo com 5% xilose, e em meio com 5% glicose, revelam que há um aumento considerável da

expressão dos genes envolvidos no metabolismo de xilose, sendo o maior aumento para *XYL3*, seguido de *XYL1* e *XYL2*. Os genes *TKT1* e *TAL1* aumentaram pouco (Yuan *et al.*, 2011).

▲ Genes envolvidos no transporte de xilose

Quanto aos genes envolvidos no transporte de xilose foi observado que houve uma diminuição da expressão do *SUT1* nas outras fontes de carbono em relação a 2% glicose. A reação com 4% xilose não funcionou (Figura 56A). Para o gene *SUT2*, houve diminuição para concentrações menores de açúcares e um aumento de 0,5x da sua expressão em 2% xilose. Quando em concentrações maiores de açúcares houve falha na reação (Figura 56B).

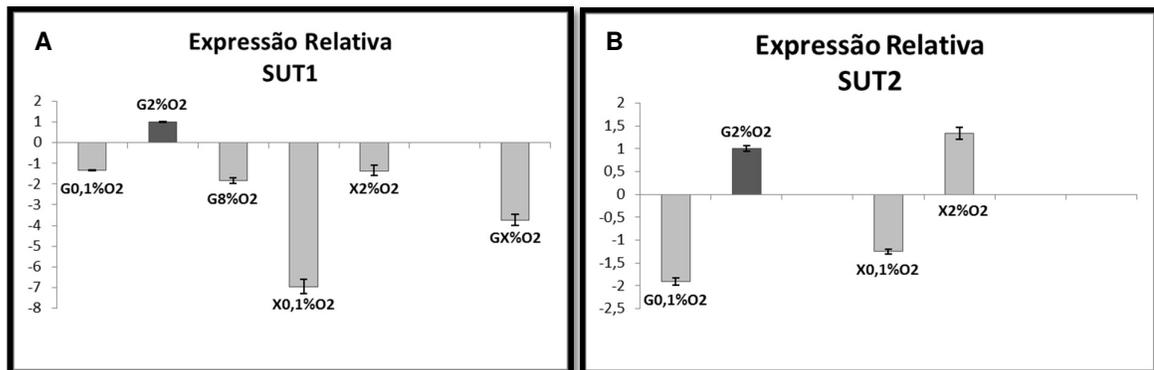


Figura 56: Análise da expressão relativa da linhagem CBS5774 adaptada sob aeração em diferentes fontes de carbono por qRT-PCR. A) Expressão relativa do gene *SUT1*. B) Expressão relativa do gene *SUT2*. A barra escura é o experimento referência. O desvio padrão é referente à reação (reação em triplicata). n=1.

Pelos dados da Figura 56, pode-se observar que o gene *SUT1* teve uma diminuição da expressão independente da fonte de carbono e da concentração utilizada, sendo maior para concentrações menores de xilose e na mistura de açúcares. Para o gene *SUT2*, foi observada uma diminuição de expressão em baixa concentração da fonte de carbono, independente da fonte usada. Dados da literatura mostram que o gene *SUT1* é expresso em glicose independentemente da concentração e da oxigenação. O gene *SUT2* é expresso em aerobiose, independente da fonte de carbono e concentração. Não há comparação do nível de expressão (Weierstall *et al.*, 1999). Yuan *et al.* (2011) relatam uma repressão do gene *SUT2* em meio com 5% xilose. Houve falha na reação com 4% xilose, portanto, não houve como comparar os resultados.

O gene *XUT1* foi o que teve maior aumento de expressão, ~180 vezes em baixa concentração de xilose que em 2% glicose. Houve um aumento menor em 2% xilose (Figura 57) Quanto às concentrações maiores de açúcar houve falha na reação.

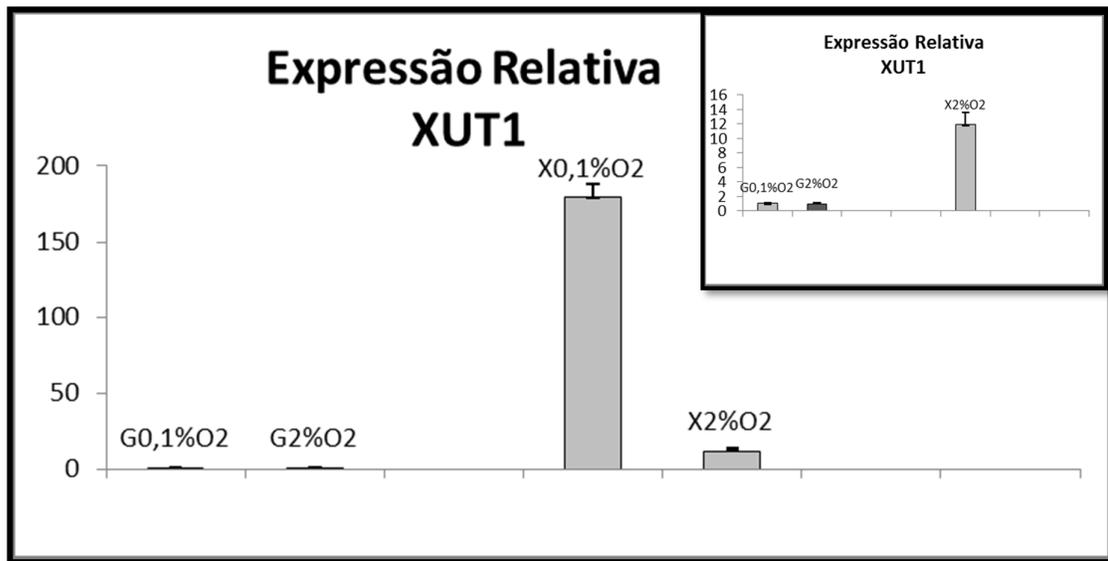


Figura 57: Análise da expressão relativa do gene *XUT1* por qRT-PCR da linhagem CBS5774 adaptada sob aeração em diferentes fontes de carbono. A barra escura é o experimento referência. O desvio padrão é referente a reação (reação em triplicata). Na Figura menor foi retirada a condição X0,1%O2 para visualizar as outras condições. n=1.

Não houve análise para o gene *XUT2*. Foram sintetizados 3 pares de *primers* diferentes e não houve reação de qRT-PCR para nenhum deles, portanto, ele foi eliminado da análise.

Os genes *XUT3*, *XUT4* e *XUT5* tiveram sua expressão diminuída em todas as condições testadas, exceto na condição 2% xilose para o *XUT5* em relação ao meio com 2% glicose (Figura 58A, B e C). Para o gene *XUT6*, houve aumento de expressão em todas as condições relativas a 2% glicose (Figura 58D). O gene *XUT7* teve aumento de expressão apenas para 8% glicose, e redução nas outras condições testadas (Figura 58E).

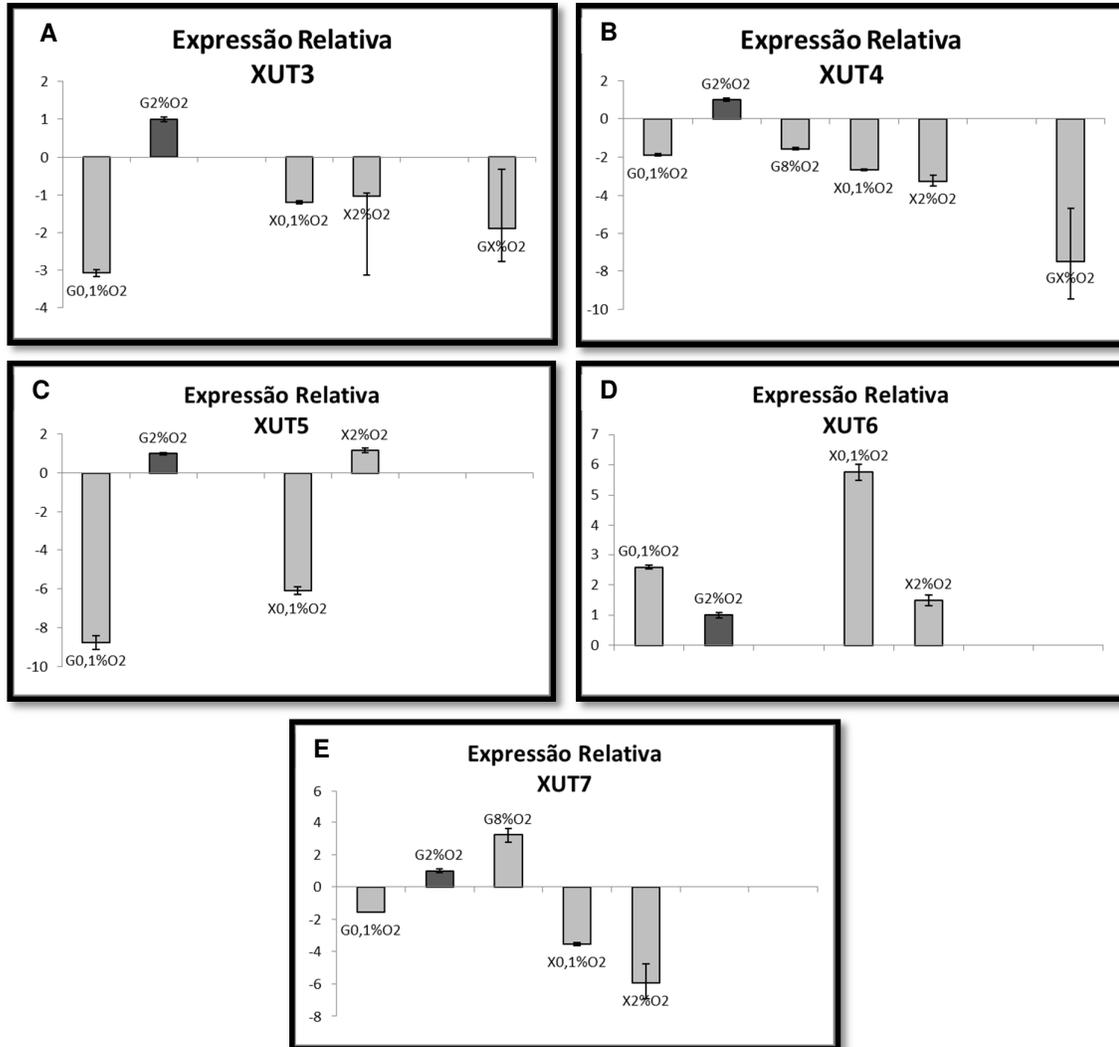


Figura 58: Análise da expressão relativa dos gene XUTs da linhagem CBS5774 adaptada sob aeração em diferentes fontes de carbono por qRT-PCR. A) Expressão relativa do gene *XUT3*. B) Expressão relativa do gene *XUT4*. C) Expressão relativa do gene *XUT5*. D) Expressão relativa do gene *XUT6*. E) Expressão relativa do gene *XUT7*. A barra escura é o experimento referência. O desvio padrão é referente à reação (reação em triplicata). n=1

Dados de RNA-seq revelam um aumento de expressão para o gene *XUT1*. Para os outros XUTs não houve diferença significativa de expressão entre os meios com glicose e 5% xilose. No caso do *XUT2*, assim como neste trabalho, não foi detectada expressão em nenhuma condição (Yuan *et al.*, 2011).

Pelas diferentes concentrações de açúcar usadas neste trabalho e a variação de expressão em cada uma destas concentrações, pode-se suspeitar do grau de afinidade dos transportadores analisados, apesar da falha de algumas reações. Como *XUT1* teve um maior aumento em baixa concentração de xilose,

provavelmente se trate de um transportador de alta afinidade. Entretanto, para validar esta informação, são necessários testes de velocidade de reação e determinação do K_m .

5.3.4 Obtenção dos Transportadores

Acredita-se que um dos gargalos de um melhor rendimento de etanol por uma levedura recombinante seja o influxo de xilose para o interior da célula (Kuyper *et al.*, 2005b). Em virtude dos resultados de fermentação da linhagem VCB112, procuramos expressar um transportador nesta linhagem. Os transportadores escolhidos foram *HXT7* de *S. cerevisiae* e *XUT1* de *P. stipitis*.

Gene *HXT7* de *S. cerevisiae*

O gene *HXT7* foi amplificado por PCR juntamente com seu promotor (~2,1 kb) usando os *primers* HXT7p5 e 3HXT7, a enzima *Phusion*[®] DNA *Polymerase* (Finnymes) e o DNA genômico da linhagem S288c de *S. cerevisiae* como molde. Após a eluição do amplicom em gel de agarose, o fragmento foi digerido com as enzimas *SacI* e *BamHI* seguindo-se inativação a 85°C/30min. Posteriormente, este fragmento foi ligado ao vetor Y1PGK previamente digerido com *SacI* e *BamHI*. Este sistema foi usado para transformar *E. coli* XL10 Gold. A análise de 3 transformantes foi feita por perfil de restrição com as enzimas *KpnI*, *HindIII*, *EcoRI* e *SacI/BamHI*. Dois clones apresentaram o perfil esperado. O vetor resultante foi denominado Y1HXT7 (Figura 59).

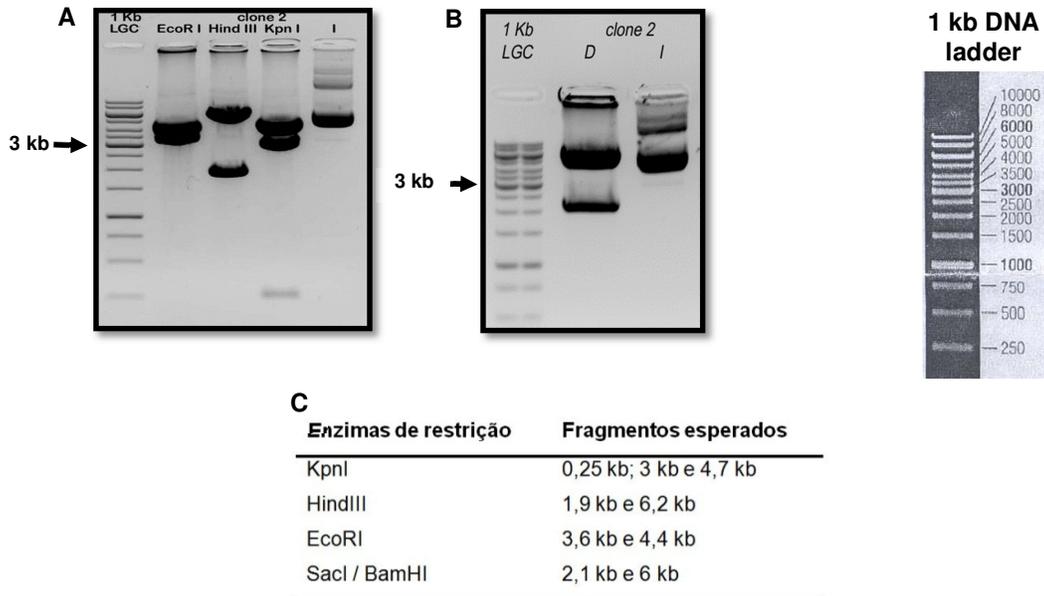


Figura 59: Perfil de restrição do vetor Y1HXT7. A) e B) Eletroforese em gel de agarose 1%. 1 kb LGC: marcador 1 kb DNA ladder (LGC), EcoRI, HindIII, KpnI: Y1HXT7 digerido com as respectivas enzimas, I: Y1HXT7 intacto, D: Y1HXT7 digerido com Sac I/BamH I. 1 kb DNA ladder: padrão do marcador de massa molecular C) Perfil dos fragmentos esperados.

O vetor Y1HXT7 possui uma marca auxotrófica *LEU2* e não uma marca dominante. Portanto seria necessário transferir o cassete HXT7-HP (promotor e gene *HXT7* e terminador *PGK1*) para o vetor YC240 de marca dominante (resistência a higromicina). Foram tentadas várias estratégias para tal subclonagem, todas sem sucesso.

Como alternativa ao cassete anterior, foi construído um cassete de expressão do *HXT7* com seu próprio promotor e terminador. Foi feita uma PCR com *Phusion*[®] DNA Polymerase (Finnymes), os primers HXT7p5/HXT-TT para amplificação de todo o cassete de expressão do gene *HXT7*. Após purificação, o fragmento de 2,4 kb foi ligado ao vetor pBlueScript II SK. Este sistema foi usado para transformar *E. coli* XL10 Gold. Os transformantes foram analisados por perfil de restrição com a enzima PvuII. Apenas um clone teve o perfil esperado. O vetor foi denominado pBHXT.9.

Não foi obtido sucesso na subclonagem deste cassete para o vetor YC240. É possível que o gene esteja sendo expresso em *E. coli* e, mesmo em baixas concentrações, pode ser tóxico para este organismo.

Gene *XUT1* de *P. stipitis*

Diante do alto nível de expressão do gene *XUT1* demonstrado nas análises de qRT-PCR trabalho, optou-se pelo sua expressão sob controle do promotor do gene *HXT7* e o terminador *PGK1*, ambos de *S. cerevisiae*. Para tanto, foi construído um vetor contendo este promotor e terminador.

▲ Construção do vetor Y1pHXT7

Foi amplificado por PCR um fragmento de ~400 pb correspondente ao promotor do gene *HXT7* de *S. cerevisiae*. Foi usado *Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity* (Invitrogen), o par de *primer* HXT7p5/HXT7p3 e DNA genômico da linhagem S288c de *S. cerevisiae*. Após a purificação do fragmento, o mesmo foi digerido com as enzimas *SacI* e *BamHI* seguindo-se inativação a 85 °C/30 min. O vetor Y1PGK1 foi digerido com as mesmas enzimas de restrição para liberar o promotor *PGK1* (~1,5 kb). O fragmento referente ao vetor (~6,9 kb) foi purificado para posteriormente ser ligado ao fragmento pHXT7 digerido. Este sistema foi usado para transformar *E. coli* (XL10 Gold). Os transformantes foram analisados por perfil de restrição (Figura 60). Foi observado que, dos 4 clones analisados com *EcoRI*, 3 liberaram inserto. A digestão com *BstBI* e a dupla digestão *SacI/BamHI* confirmaram a clonagem. O vetor resultante foi denominado Y1pHXT7 (Figura 60D), a sequência foi confirmada por sequenciamento automático de DNA.

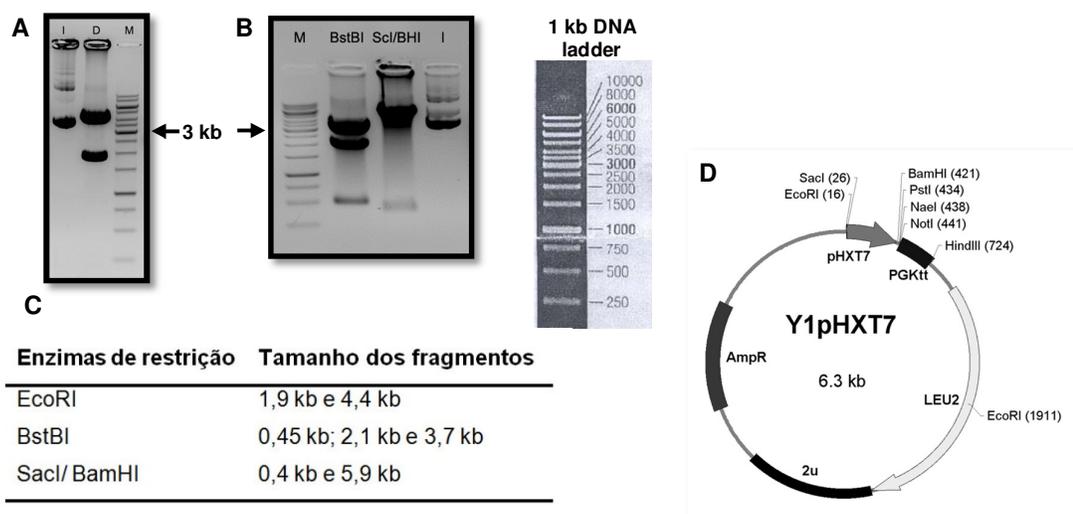


Figura 60: Perfil de restrição do vetor Y1pHXT7. Análise em gel de agarose 1%. **M:** marcador 1 kb DNA *ladder* (LCG) **A)** Perfil de restrição com a enzima *EcoRI*. **I:** vetor intacto; **D:** vetor digerido com *EcoRI*. **B)** Perfil de restrição com as enzimas *BstBI* e *SacI/BamHI*. **I:** vetor intacto; **BstBI:** vetor digerido com *BstBI* e **SacI/BamHI:** vetor digerido com *BamHI* / *SacI*. **C)** Perfil de restrição esperado. **D)** mapa físico do vetor Y1pHXT7. 1 kb DNA *ladder*: padrão de massa molecular.

Gene *XUT1*

Para amplificação do gene *XUT1* foram usados os *primers* XUT1-F/XUT1-R, o DNA genômico de *P. stipitis* CBS 5774 e a enzima *Phusion*[®] DNA Polymerase (Finnzymes). Houve amplificação do fragmento esperado (Figura 61). O fragmento foi purificado, para posterior clonagem.

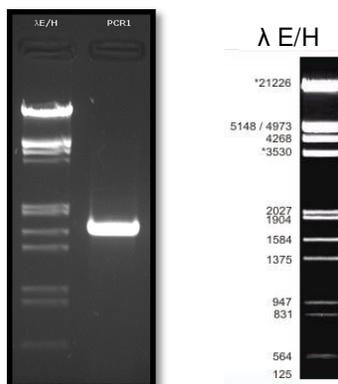


Figura 61: Amplificação do gene *XUT1* de *P. stipitis*. Eletroforese em gel de agarose 1%. λ E/H: marcador λ EcoRI / HindIII. PCR1: amplificação do fragmento *XUT1*. λ E/H: padrão do marcador de massa molecular.

Estudo com 26 diferentes transportadores (23 heterólogos e 3 nativos de *S. cerevisiae*) expressos em *S. cerevisiae* linhagem *null* para Hxt mostra que a expressão de 7 transportadores permitiu o crescimento da levedura em xilose como única fonte de carbono. Destacam-se os genes *GAL2* e *HXT7* de *S. cerevisiae* e *GXF1* de *C. intermedia* que propiciaram as melhores taxas de crescimento. Dentre os genes *XUT* de *P. stipitis*, apenas *XUT1* e *XUT3* permitiram que a célula crescesse em 2% xilose. Durante a cofermentação, todos apresentaram preferência por glicose, sendo que o que apresentou menor preferência por glicose em relação a xilose foi *XUT1* (Young *et al.*, 2011). Como dito anteriormente, para avaliar um transportador que aumente o influxo de xilose para célula e melhore o rendimento de etanol, é importante analisar a interação destes transportadores com as proteínas de membrana, principalmente os sensores. Portanto, após a construção dos vetores epissomais contendo os transportadores Hxt7 e Xut1, estes vetores serão usados para transformar a linhagem recombinante VCB112 para analisar se a presença do transportador melhora o rendimento de etanol.

CONCLUSÃO

6. CONCLUSÃO

O conhecimento de aspectos básicos da genética da linhagem JP1 é muito importante para nortear estratégias de modificação genética nesse microrganismo. Antes do início desse projeto, esse conhecimento era muito limitado, o que é surpreendente considerando a importância desta linhagem para a economia canavieira da Região Nordeste. Este trabalho mostrou que a linhagem industrial de *S. cerevisiae* JP1 é diploide e homotática. Nem todos os esporos apresentarão a interconversão do locus MAT, isso indica que a linhagem pode apresentar alguma mutação recessiva na via de do processo de interconversão.

Ainda, dentro do contexto de caracterização genética desta linhagem, foi avaliada a sensibilidade de JP1 a diferentes drogas usadas para seleção de transformantes, uma informação importante em pesquisas envolvendo organismos geneticamente modificados. Pudemos constatar que a linhagem é sensível às drogas testadas, não apresentando nenhuma mutação que pudesse lhe conferir resistência natural. Além disso, apresentou uma boa eficiência de transformação quando foi usado um protocolo simples e rápido. Foi observado que as melhores marcas de seleção são aquelas que conferem resistência a antibióticos, onde a taxa de falsos positivos é insignificante ou praticamente nula. A marca de resistência a higromicina B apresentou a melhor eficiência de transformação.

Foi construída com sucesso uma linhagem de JP1 auxotrófica para uracila (*ura3*), um feito raro quando se trata de leveduras industriais. O uso de marcas de resistência a antibiótico não é recomendado em trabalhos biotecnológicos devido à possibilidade de transferência horizontal de genes para a microbiota ambiental. Além disso, o uso de mutantes auxotróficos revela-se mais barato, pois os antibióticos são geralmente caros. Portanto, neste trabalho tivemos a preocupação em eliminar a marca de seleção usada para criar os mutantes *ura3* pelo uso do eficiente sistema *Cre-loxP*. Apesar de raro foi observado um evento de recombinação entre os dois alelos selvagens *URA3* no momento da transformação. Outros clones tiveram a recombinação no segundo alelo devido ao uso da droga 5-FOA, que por ser tóxica a

célula forçou a sobrevivência apenas daquelas com a dupla integração. O sucesso na criação desse mutante foi confirmado pela transformação do mesmo com dois vetores contendo a marca auxotrófica *URA3*. Um dos vetores usado possui como gene repórter a proteína GFP. Houve transformação e seleção com ambos os vetores, além da visualização da fluorescência do gene repórter GFP, comprovando a presença do vetor na célula.

Para a obtenção de uma linhagem capaz de metabolizar xilose, optamos por expressar os genes envolvidos na via metabólica de xilose que não requerem cofatores. Para obtermos uma melhor expressão, o gene codificador de XI de *Piromyces* sp foi otimizado baseado no *codon usage* de *S. cerevisiae*. Diante da dificuldade de integração do cassete de expressão da XI no *loci CAN1*, optamos pela expressão em vetor episomal com marca de seleção de resistência a antibiótico. Ensaio de atividade mostraram que a enzima possui atividade. Foi construído com sucesso o cassete da segunda enzima importante no metabolismo de xilose, *XKS1*.

A linhagem industrial de *S. cerevisiae* JP1 foi transformada com sucesso com o vetor episomal contendo os dois cassetes de expressão: XI e XK. A linhagem foi submetida a adaptação metabólica em meio contendo xilose como única fonte de carbono tendo sido observado um aumento da taxa de crescimento de $0,008 \text{ h}^{-1}$ para $0,13 \text{ h}^{-1}$. Mais importante, a linhagem adaptada foi capaz de fermentar xilose a etanol. Apresentou um $Y_{E/S}$ de $0,3 \text{ g g}^{-1}$, ou seja, 58,82% do valor teórico. Ficou evidente neste trabalho que a adaptação metabólica é uma etapa essencial para que uma levedura modificada geneticamente possa metabolizar xilose. Após o processo de adaptação metabólica, um subproduto indesejado se destacou, o xilitol ($Y_{X/S} = 0,31 \text{ g g}^{-1}$). Para reduzir a concentração de xilitol propomos a deleção do gene *GRE3* nativo que codifica para aldose redutase, enzima responsável pela conversão de xilose em xilitol, um inibidor da XI. Uma vez que não se trata de um gene essencial, a deleção deste gene pode ser realizada na célula diploide.

Além desta modificação, propusemos a expressão de um transportador que tenha afinidade por xilose a fim de melhorar o influxo deste açúcar na levedura recombinante. Nesse sentido, voltamos nossa atenção para a levedura *P. stipitis*

que reconhecidamente fermenta xilose sendo uma boa fonte de genes para expressão heteróloga em *S. cerevisiae*. Para tanto, fizemos uma análise de expressão de alguns genes do metabolismo de xilose nesse organismo com foco nos genes codificadores de transportadores de xilose anotados em seu genoma. Utilizamos como modelo uma linhagem de *P. stipitis* adaptada ao hidrolisado lignocelulósico contendo xilose, gentilmente cedida pelo Prof. Nei Pereira, da UFRJ. Nossa hipótese de trabalho é que esta linhagem, por ser adaptada a um meio rico em pentoses, pudesse revelar um interessante perfil transcricional dos genes envolvidos no metabolismo de xilose.

Dados da análise transcricional mostraram que o gene que teve maior alteração na expressão em meio com xilose foi *XYL3*, que codifica para XK, e o menor, *TAL1*. Isso comprova a importância da enzima XK no metabolismo de xilose. Dentre os transportadores, o que teve o maior aumento em baixas concentrações de xilose foi *XUT1*.

Em suma, este trabalho pioneiro no País mostrou que as técnicas de genética molecular podem ser aplicadas em uma levedura industrial brasileira que poderá servir como plataforma para futuras modificações. Além disso, ficou demonstrado que o desenvolvimento de um bioprocessamento envolvendo linhagens industriais de *S. cerevisiae* modificadas geneticamente para a produção de etanol lignocelulósico é factível.

PERSPECTIVAS

7. PERSPECTIVAS

Nosso laboratório está engajado em um projeto para eliminar outros genes da linhagem JP1 a fim de evitar a possibilidade de esta cepa transferir genes heterólogos para microrganismos naturais. Consideramos deletar os genes *STE5* e *IME1* que tornariam a linhagem incompetente para a meiose e o acasalamento, respectivamente. Com o conhecimento agora adquirido sobre a genética de JP1 e as ferramentas desenvolvidas neste trabalho, a concretização desses objetivos é agora plenamente factível. Além disso, propomos sequenciar o genoma de clones derivados de esporos dissecados a fim de compreendermos a extensão da heterozigose em JP1. Este estudo contribuirá para um maior conhecimento da complexidade genômica de leveduras industriais.

Verificamos que os cassetes de XI e XK são funcionais. O próximo passo será integrá-los no genoma a fim de torná-los geneticamente estáveis e reduzir a possibilidade de transferência horizontal. Além da adaptação metabólica em meio contendo xilose como fonte de carbono em aerobiose e também realizar um segundo ciclo de adaptação metabólica em meio contendo ambos os açúcares (xilose e glicose) em anaerobiose.

Com o intuito de diminuir a concentração de xilitol produzido o gene *GRE3* nativo que codifica para aldose redutase, enzima responsável pela conversão de xilose em xilitol, um inibidor da XI, será deletado.

Quanto ao transporte de xilose para o interior da célula será feito uma comparação entre o nativo de *S. cerevisiae* *HXT7* e um putativo para xilose de *P. stipitis* *XUT1*. Além disso, será repetido o estudo de expressão por Real Time PCR para as reações que falharam. Todas as reações serão feita em triplicata para uma análise estatística mais apurada. Será analisado também o perfil transcricional de *P. stipitis* crescida em condição de anaerobiose. Comparando sempre a linhagem nativa e a adaptada para se avaliar quais as modificações que o microrganismo sofreu no processo de adaptação do ao hidrolisado.

**REFERÊNCIA
BIBLIOGRÁFICA**

8 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- Almeida, J.R., Runquist, D., Sánchez Nogué, V., Lidén, G., Gorwa-Grauslund, M.F. **2011**. Stress-related challenges in pentose fermentation to ethanol by the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol J* **6**:286-299.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. & Lipman, D.J. **1990**. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* **215**:403-410.
- Alvira, P., Tomas-Pejo, E., Ballesteros, M. & Negro, M.J. **2010**. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. *Bioresour Technol* **101**:4851-4861
- Amberg, D.C., Burke, D. & Strathern, J.N. **2005**. Methods in yeast genetics: a Cold Spring Harbor Laboratory course manual. 2005 ed. New York. Cold Spring Harbor Laboratory
- Amorim, H.V., Lopes, M.L., de Castro Oliveira, J.V., Buckeridge, M.S. & Goldman, G.H. **2011**. Scientific challenges of bioethanol production in Brazil. *Appl Microbiol Biotechnol* **91**:1267-1575
- Antizar-Ladislao, B. & Turrion-Gomez, J.L. **2008**. Second-generation biofuels and local bioenergy systems. *Biofuel Bioprod Bior* **2**:455–469
- Argueso, J.L., Carazzolle, M.F., Mieczkowski, P.A., Duarte, F.M., Netto, O.V., Missawa, S.K., Galzerani, F., Costa, G.G., Vidal, R.O., Noronha, M.F., Dominska, M., Andrietta, M.G., Andrietta, S.R., Cunha, A.F., Gomes, L.H., Tavares, F.C., Alcarde, A.R., Dietrich, F.S., McCusker, J.H., Petes, T.D. & Pereira, G.A. **2009**. Genome structure of a *Saccharomyces cerevisiae* strain widely used in bioethanol production. *Genome Res* **19**:2258-2270.
- Aristidou, A. & Penttila, M. **2000**. Metabolic engineering applications to renewable resource utilization. *Curr Opin Biotechnol* **11**:187-198
- Baganz, F., Hayes, A., Marren, D., Gardner, D.C.J. & Oliver, S.G. **1997**. Suitability of Replacement Markers for Functional Analysis Studies in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **13**:1563-1573

- Bai, F.W., Anderson, W.A. & Moo-Young, M. **2008**. Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks. *Biotechnol Adv* **26**:89-105.
- Bailey, J.E. **1999**. Lessons from metabolic engineering for functional genomics and drug discovery. *Nat Biotechnol* **17**:616-8.
- Bar-Nun, S., Shneyour, Y. & Beckmann, J.S. **1983**. G-418, an elongation inhibitor of 80 S ribosomes. *Biochim Biophys Acta* **741**:123-127.
- Baruffini, E., Serafini, F. & Lodi, T. **2009**. Construction and characterization of centromeric, episomal and GFP-containing vector for *Saccharomyces cerevisiae* prototrophic strains. *Journal of biotechnology* **143**:247-254.
- Basso, L.C., de Amorim, H.V., de Oliveira, A.J. & Lopes, M.L. **2008**. Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil. *FEMS Yeast Res* **8**:1155-1163
- Batista, V.D.F. **2012**. Construção de um vetor para expressão heteróloga em *Pichia pastoris*. Departamento de Biologia Celular, UnB, Brasília. 1-69.
- Beck, E., Ludwig, G., Auerswald, E.A., Reiss, B. & Schaller, H. **1982**. Nucleotide sequence and exact localization of the neomycin phosphotransferase gene from transposon Tn5. *Gene* **19**:327-336.
- Becker, J. & Boles, E. **2003**. A modified *Saccharomyces cerevisiae* strain that consumes L-Arabinose and produces ethanol. *Appl Environ Microbiol* **69**:4144-4150.
- Bengtsson, O., Hahn-Hagerdal, B., Gorwa-Grauslund, M.F. **2009**. Xylose reductase from *Pichia stipitis* with altered coenzyme preference improves ethanolic xylose fermentation by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Biofuels* **2**:9.
- Bera, A.K., Ho, N.W., Khan, A. & Sedlak, M. **2011**. A genetic overhaul of *Saccharomyces cerevisiae* 424A(LNH-ST) to improve xylose fermentation. *J Ind Microbiol Biotechnol* **38**:617-626
- Bergdahl, B. **2006** Expression of xylose isomerase from *Xanthomonas campestris* in *Saccharomyces cerevisiae* for enhanced ethanol production from xylose. Department of Applied Microbiology Sigillum University, Lund. 1-59.

-
- Bijvoet, J. F. M., Vander Zanden, A. L., Goosen, N., Brouwer, J. & Van de Putte, P. **1991**. DNA Insertions in the 'Silent' Regions of the 2 um Plasmid of *Saccharomyces cerevisiae* Influence Plasmid Stability. *Yeast*, **7**: 347-356.
- Bilinski C.A. & Casey G.P. **1989**. Developments in sporulation and breeding of brewer's yeast. *Yeast* **5**:429-438.
- Birnboim, H.C. & Doly, J. **1979**. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic acids res* **7**:1513-1523.
- Bioetanol de cana-de-açúcar: energia para o desenvolvimento sustentável **2008** organização BNDES e CGEE. – Rio de Janeiro.
- Boeke, J.D., LaCroute, F., Fink, G.R. **1984**. A positive selection for mutants lacking orotidine-5'-phosphate decarboxylase activity in yeast: 5-fluoro-orotic acid resistance. *Mol Gen Genet* **197**:345-346.
- Boles, E., Heinisch, J. & Zimmermann, F.K. **1993**. Different signals control the activation of glycolysis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **9**:761-770.
- Boles, E. & Hollenberg, C.P. **1997**. The molecular genetics of hexose transport in yeasts. *FEMS Microbiol Rev* **21**:85-111.
- Borneman, A.R., Desany, B.A., Riches, D., Affourtit, J.P., Forgan, A.H., Pretorius, I.S., Egholm, M. & Chambers, P.J. **2011**. Whole-genome comparison reveals novel genetic elements that characterize the genome of industrial strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS Genet* **7**:1-10
- Bradford, M. M. **1976**. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**:248-254.
- Brat, D., Boles, E. & Wiedemann, B. **2009**. Functional expression of a bacterial xylose isomerase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol* **75**:2304-2311.
- Bravim, F. & Fernandes, P.M.B. **2009**. A Levedura *Saccharomyces cerevisiae*. In: Fernandes, P.M.B (Org.). Levedura: Do Pão à Biotecnologia. Vitória-ES: EDUFES,. p. 35-51

-
- Brosnan, M.P., Donnelly, D., James, T.C. & Bond, U. **2000**. The stress response is repressed during fermentation in brewery strains of yeast. *J Appl Microbiol* **88**:746-755.
- Bruinenberg, P.M., de Bot, P.H.M., van Dijken, J.P. & Scheffers, W.A. **1984**. NADH-linked aldose reductase: the key to anaerobic alcoholic fermentation of xilose by yeast. *Appl. Microbiol. Biotechnol* **19**:256-260
- Burke, D., Dawson, D. & Stearns, T. **2000**. Methods in Yeast Genetics. A cold Spring Harbor Laboratory Course Manual. Edição 2000
- Cardona, C.A. & Sanchez, O.J. **2007**. Fuel ethanol production: process design trends and integration opportunities. *Bioresour Technol* **98**:2415-2457.
- Cardona, C.A., Quintero, J.A. & Paz, I.C. **2010**. Production of bioethanol from sugarcane bagasse: Status and perspectives. *Bioresour Technol* **101**:4754-4766.
- Carter, Z. & Delneri, D. **2010**. New generation of *loxP*-mutated deletion cassettes for the genetic manipulation of yeast natural isolates. *Yeast* **27**:765-775
- Castro, F. **2010**. Pesquisar para exportar. Agência FAPESP disponível no site: <http://www.agencia.fapesp.br/materia/11731/especiais/pesquisar-para-exportar.htm>. Acessado em 6/3/2010.
- Cebollero, E. & Gonzalez, R. **2004**. Comparison of two alternative dominant selectable markers for wine yeast transformation. *Appl Environ Microbiol* **70**:7018-7023.
- Cerdeira, N.R.L. **2007**. O Protocolo de Kyoto e os Projetos de MDL. *Newsletter* **27**.
- CERPCH – Centro Nacional de Referência em Pequenas Centrais Hidroelétricas. Fontes renováveis **2011**. Disponível em: <http://www.cerpch.unifei.edu.br/biomassa.php>. Acessado em 01/12/2011.
- Chen, D.C., Yang, B.C. & Kuo, T.T. **1992**. One-step transformation of yeast in stationary phase. *Curr Genet* **21**:83-84.
- Chow, J., Kopp, R.J. & Portney, P.R. **2003**. Energy resources and global development. *Science* **302**:1528-1531.

-
- Cunha, A.F., Missawa, S.K., Gomes, L.H., Reis, S.F. & Pereira, G.A. **2006**. Control by sugar of *Saccharomyces cerevisiae* flocculation for industrial ethanol production. *FEMS Yeast Res* **6**:280-287.
- da Silva Filho, E.A., de Melo, H.F., Antunes, D.F., dos Santos, S.K., do Monte Resende, A., Simões, D.A. & de Moraes Jr, M.A. **2005**. Isolation by genetic and physiological characteristics of a fuel-ethanol fermentative *Saccharomyces cerevisiae* strain with potential for genetic manipulation. *J Ind Microbiol Biotechnol* **32**:481-486.
- da Silva, N.A. & Bailey, J.E. **1991**. Influence of plasmid origin and promoter strength in fermentations of recombinant yeast. *Biotechnol Bioeng* **37**:318-324.
- Delgenes, J.P., Moletta, R & Navarro, A.M. **1986**. The effect of aeration on D-xylose fermentation by *Pachysolen tannophilus*, *Pichia stipitis*, *Kluyveromyces marxianus* and *Candida shehatae*. *Biotechnol Lett* **8**:897-900
- de Moraes, L.M., Astolfi-Filho, S., Oliver, S.G. **1995**. Development of yeast strains for the efficient utilisation of starch: evaluation of constructs that express alpha-amylase and glucoamylase separately or as bifunctional fusion proteins. *Appl Microbiol Biotechnol* **43**:1067-1076.
- Dellomonaco, C., Fava, F. & Gonzalez, R. **2010**. The path to next generation biofuels: successes and challenges in the era of synthetic biology. *Microb Cell Fact* **9**:3
- Desplechin, E. **2008**. Biofuels in developing countries: The Brazilian experience: The Brazilian Experience. UNICA.
- Dien, B.S., Cotta, M.A. & Jeffries, T.W. **2003**. Bacteria engineered for fuel ethanol production: current status. *Appl Microbiol Biotechnol* **63**:258-266.
- du Preez, J.C. **1994**. Process parameters and environmental factors affecting D-xylose fermentation by yeast. *Enzyme Microb Technol* **16**:944-956
- Eggeman, T. & Verser, D. **2006**. The importance of utility systems in today's biorefineries and a vision for tomorrow. *Appl Biochem Biotechnol* **129-132**:361-381.

-
- Energy Information Administration, International Energy Outlook 2009, **2009**. Disponível em <http://www.scribd.com/doc/15863397/EIA-Int.-Energy-Outlook>. Acessado em 23/12/2010.
- Fairley, P. **2011**. Next Generation biofuels. *Nature* **474**: S2-S5
- Falcon, A.A. & Aris, J.P. **2003**. Plasmid accumulation reduces life span in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **278**:41607-41617.
- Falcon, A. A., Rios, N. & Aris, J. P. **2005**. 2-micron circle plasmids do not reduce yeast life span. *FEMS Microbiol Lett* **250**: 245-251.
- Fargione, J., Hill, J., Tilman, D., Polasky, S. & Hawthorne, P. **2008**. Land clearing and the biofuel carbon debt. *Science* **319**:1235-1238.
- Fay, J.C. & Benavides, J.A. **2005**. Evidence for domesticated and wild populations of *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS Genet* **1**:1-6
- Fenning, T.M., Walter, C. & Gartland, K.M. **2008**. Forest biotech and climate change. *Nat Biotechnol* **26**:615-617.
- Fischer, C.R., Klein-Marcuschamer, D. & Stephanopoulos, G. **2008**. Selection and optimization of microbial hosts for biofuels production. *Metab Eng* **10**:295-304.
- França, R. **2008**. 70 Questões Para Entender o Etanol. Veja. São Paulo: Editora Abril. 2052: 104-114.
- Fukuda K, Watanabe M, Asano K. **1990**. Altered Regulation of Aromatic Amino Acid Biosynthesis in β -Phenylethyl-alcohol-overproducing Mutant of *Sake Yeast Saccharomyces cerevisiae*. *Agric Biol Chem* **54**:3151-3156.
- Fukuda, K., Watanabe, M., Asano, K., Ouchi, K. & Takasawa, S. **1991**. A mutated *ARO4* gene for feedback-resistant DAHP synthase which causes both o-fluoro-DL-phenylalanine resistance and beta-phenethyl-alcohol overproduction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet* **20**:453-456.

- Fukuda, K., Asano, K., Ouchi, K. & Takasawa, S. **1992**. Feedback-insensitive mutation of 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate-7-phosphate synthase caused by a single nucleotide substitution of *ARO4* structural gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Ferment Bioeng* **74**:117-119.
- Galbe, M., Sassner, P., Wingren, A. & Zacchi, G. **2007**. Process engineering economics of bioethanol production. *Adv Biochem Eng Biotechnol* **108**:303-327.
- Gatignol, A., Baron, M. & Tiraby, G. **1987**. Phleomycin resistance encoded by the *ble* gene from transposon Tn 5 as a dominant selectable marker in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet* **207**:342-348
- Gerstein, A.C., Chun, H.E., Grant, A. & Otto, S.P. **2006**. Genomic Convergence toward diploidy in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS Genetics* **2**:1396-1401
- Gerstein, A.C. & Otto, S.P. **2009**. Ploidy and the causes of genomic evolution. *J Hered* **100**:571-581.
- Gietz, R.D. & Schiestl, R.H. **2007**. High-efficiency yeast transformation using the LiAc/SS carrier DNA/PEG method. *Nature protocols* **2**:31-34
- Goldemberg, J. **2007**. Energia e Meio Ambiente. Fórum de Desenvolvimento Sustentável V. Fernandes. Brasil: Época.
- Goldemberg, J. **2008**. The Brazilian biofuels industry. *Biotechnol Biofuels* **1**:6.
- Goldemberg, J., Nigro, F.E.B. & Coelho, S.T. **2008** Bioenergia no Estado de São Paulo. Situação atual, Perspectivas, Barreiras e Propostas
- González, A., Jiménez, A., Vázquez, D., Davies, J.E. & Schindler, D. **1978**. Studies on the mode of action of hygromycin B, an inhibitor of translocation in eukaryotes. *Biochim Biophys Acta* **521**:459-469
- Granek, J.A. & Magwene, P.M. **2010**. Environmental and genetic determinants of colony morphology in yeast. *PLoS Genet* **6**:e1000823
- Gritz, L. & Davies, J. **1983**. Plasmid-encoded hygromycin B resistance: the sequence of hygromycin B phosphotransferase gene and its expression in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* **25**:179-188.

-
- Guandalini, G. & Silva, C. **2006**. A dupla conquista. Veja. São Paulo - Brasil: Roberto Civita. 39:90-94.
- Güldener, U., Heck, S., Fiedler, T., Beinhauer, J. & Hegemann, J.H. **1996**. A new efficient gene disruption cassette for repeated use in budding yeast. *Nucleic Acids Res* **24**:2519-2524.
- Hahn-Hägerdal, B., Jeppsson, H., Skoog, K. & Prior, B.A. **1994**. Biochemistry and Physiology of Xylose Fermentation by Yeast. *Enzyme and Microb Technol* **16**:933-943.
- Hahn-Hägerdal, B., Wahlbom, C.F., Gardonyi, M., van Zyl, W.H., Cordero Otero, R.R. & Jonsson, L.J. **2001**. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for xylose utilization. *Adv Biochem Eng Biotechnol* **73**:53-84.
- Hahn-Hägerdal, B. & Pamment, N. **2004**. Microbial pentose metabolism. *Appl Biochem Biotechnol* **113-116**:1207-1209.
- Hahn-Hägerdal, B., Galbe, M., Gorwa-Grauslund, M.F., Liden, G. & Zacchi, G. **2006**. Bio-ethanol--the fuel of tomorrow from the residues of today. *Trends Biotechnol* **24**:549-556.
- Hahn-Hägerdal, B., Karhumaa, K., Fonseca, C., Spencer-Martins, I. & Gorwa-Grauslund, M.F. **2007**. Towards industrial pentose-fermenting yeast strains. *Appl Microbiol Biotechnol* **74**:937-953.
- Hamacher, T., Becker, J., Gardonyi, M., Hahn-Hägerdal, B. & Boles, E. **2002**. Characterization of the xylose-transporting properties of yeast hexose transporters and their influence on xylose utilization. *Microbiology* **148**:2783-2788.
- Han, J.H., Park, J.Y., Kang, H.W., Choi, G.W., Chung, B.W. & Min, J. **2010**. Specific expression patterns of *xyl1*, *xyl2* and *xyl3* in response to different sugars in *Pichia stipitis*. *J Microbiol Biotechnol* **20**:946-949.
- Hanahan, D. **1983**. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166**:557-580.

- Hansen, J., Felding, T., Johannesen, P. F., Piskur, J., Christensen, C. L. & Olesen, K. **2003**. Further development of the cassette-based pYC plasmid system by incorporation of the dominant hph, nat and AUR1-C gene markers and the lacZ reporter system. *FEMS Yeast Res* **4**:323-327.
- Harhangi, H.R., Akhmanova, A.S., Emmens, R., van der Drift, C., de Laat, W.T., van Dijken, J.P., Jetten, M.S., Pronk, J.T. & Op den Camp, H.J. **2003**. Xylose metabolism in the anaerobic fungus *Piromyces* sp. strain E2 follows the bacterial pathway. *Arch Microbiol* **180**:134-141.
- Hayn, M., Steiner, W., Klinger, R., Steinmüller, H., Sinner, M. & Esterbauer, H. **1993**. Basic research and pilot studies on the enzymatic conversion of lignocellulosic. In: J. N. Saddler (Ed.). *Bioconversion of forest and agricultural plant residues*. Wallingford UK: CAB International, Basic research and pilot studies on the enzymatic conversion of lignocellulosic.33-72
- Hector, R.E., Qureshi, N., Hughes, S.R. & Cotta, M.A. **2008**. Expression of a heterologous xylose transporter in a *Saccharomyces cerevisiae* strain engineered to utilize xylose improves aerobic xylose consumption. *Appl Microbiol Biotechnol* **80**:675-684.
- Herskowitz, I. **1988**. Life cycle of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Rev* **52**:536-552.
- Herskowitz, I. **1992**. Fungal physiology. Yeast branches out. *Nature* **357**:190-1.
- Ho, N.W., Chen, Z. & Brainard, A.P. **1998**. Genetically engineered *Saccharomyces* yeast capable of effective cofermentation of glucose and xylose. *Appl Environ Microbiol* **64**:1852-1859.
- Huber, G.W. & Dale, B.E. **2009**. Gasolina de capim e outros vegetais. *Sci. Am. Brasil* **87**:24-31
- Huxley, C., Green, E.D. & Dunham, I. **1990**. Rapid assessment of *S. cerevisiae* mating type by PCR. *Trends Genet* **6**:236.
- Jacques, N., Sacerdot, C., Derkaoui, M., Dujon, B., Ozier-Kalogeropoulos, O & Casaregola, S. **2010**. Population Polymorphism of Nuclear Mitochondrial DNA Insertions Reveals Widespread Diploidy Associated with Loss of Heterozygosity in *Debaryomyces hansenii*. *Eukaryot Cell* **9**:449-459

-
- Jank, M.S. & Nappo, M. Etanol de cana-de-açúcar: uma solução energética global sob ataque. *In* Abramovay, R. Biocombustíveis: a energia da controvérsia. São Paulo: Editora SENAC; **2009**. p.19-57.
- Jeffries, T.W. **1983**. Utilization of xylose by bacteria, yeasts, and fungi. *Adv Biochem Eng Biotechnol* **27**:1-32.
- Jeffries, T.W. & Jin, Y.S. **2004**. Metabolic engineering for improved fermentation of pentoses by yeasts. *Appl Microbiol Biotechnol* **63**:495-509.
- Jeffries, T.W. **2005**. Ethanol fermentation on the move. *Nat Biotechnol* **23**:40-41.
- Jeffries, T.W. **2006**. Engineering yeasts for xylose metabolism. *Curr Opin Biotechnol* **17**:320-326.
- Jeffries, T.W., Grigoriev, I.V., Grimwood, J., Laplaza, J.M., Aerts, A., Salamov, A., Schmutz, J., Lindquist, E., Dehal, P., Shapiro, H., Jin, Y.S., Passoth, V. & Richardson, P.M. **2007**. Genome sequence of the lignocellulose-bioconverting and xylose-fermenting yeast *Pichia stipitis*. *Nat Biotechnol* **25**:319-326.
- Jeffries, T.W. & Van Vleet, J.R. **2009**. *Pichia stipitis* genomics, transcriptomics, and gene clusters. *FEMS Yeast Res* **9**:793-807.
- Jeppsson, H., Alexander, N.J. & Hahn-Hägerdal, B. **1995**. Existence of Cyanide-Insensitive Respiration in the Yeast *Pichia stipitis* and Its Possible Influence on Product Formation during Xylose Utilization. *Appl Environ Microbiol* **61**:2596-2600.
- Jeppsson, M., Bengtsson, O., Franke, K., Lee, H., Hahn-Hägerdal, B. & Gorwa-Grauslund, M.F. **2006**. The expression of a *Pichia stipitis* xylose reductase mutant with higher K(M) for NADPH increases ethanol production from xylose in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Bioeng* **93**:665-673.
- Jimenez A. & Davies, J. **1980**. Expression of a transposable antibiotic resistance element in *Saccharomyces*. *Nature* **287**:869-871.
- Jin, Y.S. & Jeffries, T.W. **2003**. Changing flux of xylose metabolites by altering expression of xylose reductase and xylitol dehydrogenase in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Biochem Biotechnol* **105 -108**:277-286.

- Jin, Y.S., Ni, H., Laplaza, J.M. & Jeffries, T.W. **2003**. Optimal growth and ethanol production from xylose by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* require moderate D-xylulokinase activity. *Appl Environ Microbiol* **69**:495-503.
- Jin, Y.S., Alper, H., Yang, Y.T. & Stephanopoulos, G. **2005**. Improvement of xylose uptake and ethanol production in recombinant *Saccharomyces cerevisiae* through an inverse metabolic engineering approach. *Appl Environ Microbiol* **71**:8249-8256.
- Johansson, B., Christensson, C., Hobbey, T. & Hahn-Hägerdal, B. **2001**. Xylulokinase overexpression in two strains of *Saccharomyces cerevisiae* also expressing xylose reductase and xylitol dehydrogenase and its effect on fermentation of xylose and lignocellulosic hydrolysate. *Appl Environ Microbiol* **67**:4249-4255.
- Karhumaa, K., Pahlman, A.K., Hahn-Hägerdal, B., Levander, F., Gorwa-Grauslund, M.F. **2009**. Proteome analysis of the xylose-fermenting mutant yeast strain TMB 3400. *Yeast* **26**:371-382
- Katahira, S., Ito, M., Takema, H., Fujita, Y., Tanino, T., Tanaka, T., Fukuda, H. & Kondo, A. **2008**. Improvement of ethanol productivity during xylose and glucose co-fermentation by xylose-assimilating *S. cerevisiae* via expression of glucose transporter *SUT1*. *Enzyme Microb Technol* **43**:115-119.
- Katz Ezov, T., Chang, S.L., Frenkel, Z., Segrè, A.V., Bahalul, M., Murray, A.W., Leu, J.Y., Korol, A., Kashi, Y. **2010**. Heterothallism in *Saccharomyces cerevisiae* isolates from nature: effect of HO locus on the mode of reproduction. *Mol Ecol* **19**:121-131.
- Kerstens-Hilderson, H., Callens, M., Opstal, O.V., Vangrýsperre, W. & De Bruyne, C.K. **1987**. Kinetic characterization of D-xylose isomerases by enzymatic assays using D-sorbitol dehydrogenase. *Enzyme Microb Technol* **9**:145-148
- Kiliam, S.G. & van Uder, N. **1988**. Transport of xylose and glucose in the xylose-fermenting yeast *Pichia stipitis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol* **27**:545-548
- Klinner, U., Fluthgraf, S., Freese, S. & Passoth, V. **2005**. Aerobic induction of respiratory growth by decreasing oxygen tensions in the respiratory yeast *Pichia stipitis*. *Appl Microbiol Biotechnol* **67**:247-253
- Kötter, P. & Ciriacy, M. **1993**. Xylose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol* **38**:776-783

-
- Krahulec, S., Petschacher, B., Wallner, M., Longus, K., Klimacek, M., Nidetzky, B **2010**. Fermentation of mixed glucose-xylose substrates by engineered strains of *Saccharomyces cerevisiae*: role of the coenzyme specificity of xylose reductase, and effect of glucose on xylose utilization. *Microb Cell Fact* **9**:16.
- Kruckeberg, A.L. & Dickinson, J.R. Carbon metabolism. In: Dickinson, J.R. & Schweizer, M. (Eds). *The metabolism and Molecular Physiology of Saccharomyces cerevisiae*. USA: CRC Press, **2004**. p.42-103
- Kuhn, A., van Zyl, C., van Tonder, A. & Prior, B. A. **1995**. Purification and partial characterization of an aldo-keto reductase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol* **61**:1580-1585.
- Kurtzman, C.P. **1990**. *Candida shehatae*-genetic diversity and phylogenetic relationships with other xylose-fermenting yeasts. *Antonie Van Leeuwenhoek* **57**:215-222.
- Kuyper, M., Harhangi, H.R., Stave, A.K., Winkler, A.A., Jetten, M.S., de Laat, W.T., den Ridder, J.J., Op den Camp, H.J., van Dijken, J.P. & Pronk, J.T. **2003**. High-level functional expression of a fungal xylose isomerase: the key to efficient ethanolic fermentation of xylose by *Saccharomyces cerevisiae*? *FEMS Yeast Res* **4**:69-78.
- Kuyper, M., Winkler, A.A., van Dijken, J.P. & Pronk, J.T. **2004**. Minimal metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for efficient anaerobic xylose fermentation: a proof of principle. *FEMS Yeast Res* **4**:655-664.
- Kuyper, M., Hartog, M.M., Toirkens, M.J., Almering, M.J., Winkler, A.A., van Dijken, J.P. & Pronk, J.T. **2005a**. Metabolic engineering of a xylose-isomerase-expressing *Saccharomyces cerevisiae* strain for rapid anaerobic xylose fermentation. *FEMS Yeast Res* **5**:399-409.
- Kuyper, M., Toirkens, M. J., Diderich, J. A., Winkler, A. A., van Dijken, J. P. & Pronk, J. T. **2005b**. Evolutionary engineering of mixed-sugar utilization by a xylose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae* strain. *FEMS Yeast Res* **5**:925-934.
- Lal, R. **2005**. World crop residues production and implications of its use as a biofuel. *Environ Int* **31**:575-584.
- Lal, R. **2008**. Crop residues as soil amendments and feedstock for bioethanol production. *Waste Manag* **28**:747-758.

- Lee, S.K., Chou, H., Ham, T.S., Lee, T.S. & Keasling, J.D. **2008**. Metabolic engineering of microorganisms for biofuels production: from bugs to synthetic biology to fuels. *Curr Opin Biotechnol* **19**:556-563.
- Lee, W.J., Kim, M.D., Ryu, Y.W., Bisson, L.F. & Seo, J.H. **2002**. Kinetic studies on glucose and xylose transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol* **60**: 186-191.
- Livak K.J. & Schmittgen T.D. **2001**. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* **25**:402-408.
- Lönn, A., Träff-Bjerre, K.L., Otero, R.R.C., Zyl, W.H.v. & Hahn-Hägerdal, B. **2003**. Xylose isomerase activity influences xylose fermentation with recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strains expressing mutated *xylA* from *Thermus thermophilus*. *Enzyme Microb Technol* **32**:567-573.
- Lucena, B.T.L. Silva-Filho E.A., Coimbra M.R., Morais J.O., Simões D.A., Morais Jr, M.A. **2007**. Chromosome instability in industrial strains of *Saccharomyces cerevisiae* batch cultivated under laboratory conditions. *Genet Mol Res* **6**:1072-1084.
- Mabee, W.E. **2007**. Policy options to support biofuel production. *Adv Biochem Eng Biotechnol* **108**:329-57.
- Macedo, I.C. 2007. Situação atual e perspectivas do etanol. *Estudos Avançados* **21**:157-165
- Madhavan, A., Tamalampudi, S., Ushida, K., Kanai, D., Katahira, S., Srivastava, A., Fukuda, H., Bisaria, V.S. & Kondo, A. **2009**. Xylose isomerase from polycentric fungus *Orpinomyces*: gene sequencing, cloning, and expression in *Saccharomyces cerevisiae* for bioconversion of xylose to ethanol. *Appl Microbiol Biotechnol* **82**:1067-1078.
- Maier, A., Volker, B., Boles, E. & Fuhrmann, G.F. **2002**. Characterization of glucose transport in *Saccharomyces cerevisiae* with plasma membrane vesicles (countertransport) and intact cells (initial uptake) with single Hxt1, Hxt2, Hxt3, Hxt4, Hxt6, Hxt7 or Gal2 transporters. *FEMS Yeast Res* **2**:539-550.

- Matsushika, A., Inoue, H., Kodaki, T. & Sawayama, S. **2009**. Ethanol production from xylose in engineered *Saccharomyces cerevisiae* strains: current state and perspectives. *Appl Microbiol Biotechnol* **84**:37-53.
- Matsushika, A. & Sawayama, S. **2011**. Comparative study on a series of recombinant flocculent *S. cerevisiae* strains with different expression levels of xylose reductase and xylulokinase. *Enzyme Microb Technol* **48**: 466-471
- Melake, T., Passoth, V.V. & Klinner, U. **1996**. Characterization of the Genetic System of the Xylose-Fermenting Yeast *Pichia stipitis*. *Curr Microbiol* **33**:237-242
- Meuris P. **1974**. Feedback-insensitive mutants of the gene for the tyrosine-inhibited DAHP synthetase in yeast. *Genetics* **76**:735-744.
- Moore, A. **2008**. Biofuels are dead: long live biofuels(?) - Part one" *N Biotechnol* **25**:6-12
- Morris, G.J., Winters, L., Coulson, G.E. & Clarke, K.J. **1983**. Effect of Osmotic Stress on the Ultrastructure and Viability of the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Gen Microbiol* **129**:2023-2034.
- Mortimer, R.K. & Johnston, J.R. **1986**. Genealogy of principal strains of the yeast genetic stock center. *Genetics* **113**:35-43.
- Niedenthal, K.R., Riles, L., Johnston, M. & Hegemann, J.H. **1996**. Green Fluorescent Protein as a Marker for Gene Expression and Subcellular Localization in Budding Yeast. *Yeast* **12**:773-786
- Nigam, J.N. **2001**. Ethanol production from wheat straw hemicellulose hydrolysate by *Pichia stipitis*. *J Biotechnol* **87**:17-27.
- Nigam, J.N. **2002**. Bioconversion of water-hyacinth (*Eichhornia crassipes*) hemicellulose acid hydrolysate to motor fuel ethanol by xylose-fermenting yeast. *J Biotechnol* **97**:107-116
- Nissen, T.L., Anderlund, M., Nielsen, J., Villadsen, J. & Kielland-Brandt, M.C. **2001**. Expression of a cytoplasmic transhydrogenase in *Saccharomyces cerevisiae* results in formation of 2-oxoglutarate due to depletion of the NADPH pool. *Yeast* **18**:19-32.

-
- Nolan, T., Hands, R.E. & Bustin, S.A. **2006**. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nat. Protoc* **1**:1559–1582.
- Olaiya, A. & Sogin, S. **1979**. Ploidy determination of *Candida albicans*. *J. Bacteriol* **140**:1043-1049
- Olesen, K., Franke Johannesen, P., Hoffmann, L., Bech Sorensen, S., Gjermansen, C. & Hansen, J. **2000**. The pYC plasmids, a series of cassette-based yeast plasmid vectors providing means of counter-selection. *Yeast* **16**:1035-1043.
- Olofsson, K., Runquist, D., Hahn-Hagerdal, B. & Liden, G. **2011**. A mutated xylose reductase increases bioethanol production more than a glucose/xylose facilitator in simultaneous fermentation and co-fermentation of wheat straw. *AMB Express* **1**:4
- Olsson, L. & Hahn-Hägerdal, B. **1996**. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates for ethanol production. *Enzyme Microb Technol* **18**:312-331.
- Olsson, L. & Nielsen, J. **2000**. The role of metabolic engineering in the improvement of *Saccharomyces cerevisiae*: utilization of industrial media. *Enzyme Microb Technol* **26**:785-792.
- Otterstedt, K., Larsson, C., Bill, R.M., Stahlberg, A., Boles, E., Hohmann, S. & Gustafsson, L. **2004**. Switching the mode of metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO Rep* **5**:532–537.
- Parachin, N.S. **2010**. Biocatalyst Engineering. Metabolic engineering, kinetic modeling and metagenomics applied to industrial biotechnology. Division of Applied Microbiology, Lund University, Lund.
- Passoth, V., Hansen, M., Klinner, U. & Emeis, C.C. **1992**. The electrophoretic banding pattern of the chromosomes of *Pichia stipitis* and *Candida shehatae*. *Curr Genet* **22**:429-431.
- Peng, F., Ren, J.L., Xu, F., Bian, J., Peng, P. & Sun, R.C. **2009**. Comparative study of hemicelluloses obtained by graded ethanol precipitation from sugarcane bagasse. *J Agric Food Chem* **57**:6305-6317.
- Peralta-Yahya, P.P. & Keasling, J.D. **2010**. Advanced biofuel production in microbes. *Biotechnol J* **5**:147-162

-
- Pereira Jr., N., Couto, M.A.P.G. & Santa Anna, L.M.M. **2008**. Biomass of Lignocellulosic Composition for Fuel Ethanol Production within the Context of Biorefinery. Rio de Janeiro: UFRJ, **2**. 46. (Series on Biotechnology)
- Peters, D. **2007**. Raw materials. *Adv Biochem Eng Biotechnol* **105**:1-30.
- Pronk, J.T. 2002. Auxotrophic Yeast Strains in Fundamental and Applied Research. *Appl Environ Microbiol* **68**:2095-2100
- Ragauskas, A.J., Williams, C.K., Davison, B.H., Britovsek, G., Cairney, J., Eckert, C. A., Frederick, W.J., Jr., Hallett, J.P., Leak, D.J., Liotta, C.L., Mielenz, J.R., Murphy, R., Templer, R. & Tschaplinski, T. **2006**. The path forward for biofuels and biomaterials. *Science* **311**:484-489.
- Reynol, F. **Bagaçõ de cana vira matéria-prima para etanol de segunda geração**. 06/01/2010. Disponível em <http://www.inovacaotecnologica.com.br/noticias/noticia.php?artigo=bagaco-cana-vira-materia-prima-etanol-segunda-geracao&id=>. Acesso em 17/11/2010
- Richard, P., Putkonen, M., Vaananen, R., Londesborough, J. & Penttila, M. **2002**. The missing link in the fungal L-arabinose catabolic pathway, identification of the L-xylulose reductase gene. *Biochemistry* **41**:6432-6437.
- Runquist, D., Fonseca, C., Radstrom, P., Spencer-Martins, I., Hahn-Hagerdal, B. **2009**. Expression of the Gxf1 transporter from *Candida intermedia* improves fermentation performance in recombinant xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol* **82**:123-130.
- Saloheimo, A., Rauta, J., Stasyk, O.V., Sibirny, A.A., Penttila, M., Ruohonen, L. **2007**. Xylose transport studies with xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae* strains expressing heterologous and homologous permeases. *Appl Microbiol Biotechnol* **74**:1041-1052.
- Salomão, A. & Poloni, G. **2007**. Combustível da riqueza. Portal Exame: 4.
- Sambrook, J. & Russell, D.W. **2001**. Molecula Cloning: A Laboratory Manual. 3ª Edição.
- Sauer, B. **1987**. Functional Expression of the *cre-lox* Site-Specific Recombination System in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **7**:2087-2096.
-

-
- Savage, D.F., Way, J. & Silver, P.A. **2008**. Defossilizing fuel: how synthetic biology can transform biofuel production. *ACS Chem Biol* **3**:13-16.
- Scorer, C.A., Clare, J.J., McCombie, W.R., Romanos, M.A. & Sreekrishna, K. **1994**. Rapid Selection Using G418 of High Copy Number Transformants of *Pichia pastoris* for High-level Foreign Gene Expression. *Bio/Technology* **12**:181-184
- Searchinger, T., Heimlich, R., Houghton, R.A., Dong, F., Elobeid, A., Fabiosa, J., Tokgoz, S., Hayes, D. & Yu, T.H. **2008**. Use of U.S. croplands for biofuels increases greenhouse gases through emissions from land-use change. *Science* **319**:1238-1240.
- Sedlak, M. & Ho, N.W. **2004**. Characterization of the effectiveness of hexose transporters for transporting xylose during glucose and xylose co-fermentation by a recombinant *Saccharomyces* yeast. *Yeast* **21**:671-684.
- Sheridan, C. **2009**. Making green. *Nature* **27**:1074-1076.
- Sherman F., Fink G.R. & Hicks J.B. **1996**. Methods in yeast genetics. Cold Spring Harbour Laboratory Press; Cold Spring Harbour; NY
- Shimura, K., Fukuda, K. & Ouchi, K. **1993**. Genetic transformation of industrial yeasts using an amino acid analog resistance gene as a directly selectable marker. *Enzyme Microb Technol* **15**:874-6.
- Skoog, K & Hahn-Hängerdal, B. **1990**. Effect of oxygenation on xylose fermentation of *Pichia stipitis*. *Appl. Environ. Microbiol* **56**:3389-3394.
- Soccol, C.R., Vandenberghe, L.P., Medeiros, A.B., Karp, S.G., Buckeridge, M., Ramos, L.P., Pitarelo, A.P., Ferreira-Leitao, V., Gottschalk, L.M., Ferrara, M.A., da Silva Bon, E.P., de Moraes, L.M., Araújo, J. de A. & Torres, F.A. **2010**. Bioethanol from lignocelluloses: Status and perspectives in Brazil. *Bioresour Technol* **101**:4820-4825
- Somerville, C. **2007**. Biofuels. *Curr Biol* **17**: R115-R119.
- Stein K. **2007**. Food vs biofuel. *J Am Diet Assoc* **107**:1870, 1872-6, 1878.

- Stephanopoulos, G. **2008**. Metabolic engineering: Enabling technology for biofuels production. *Metab Eng* **10**:293-294.
- Storchová, Z., Breneman, A., Cande, J., Dunn, J., Burbank, K., O'Toole, E. & Pellman, D. **2006**. Genome-wide genetic analysis of polyploidy in yeast. *Nature* **443**:541-547.
- Strathern, J.N., Klar, A.J., Hicks, J.B., Abraham, J.A., Ivy, J.M., Nasmyth, K.A. & McGill, C. **1982**. Homothallic switching of yeast mating type cassettes is initiated by a double-stranded cut in the *MAT locus*. *Cell* **31**:183-192.
- Sun, J.X., Sun, R., Sun, X.F. & Su, Y. **2004**. Fractional and physico-chemical characterization of hemicelluloses from ultrasonic irradiated sugarcane bagasse. *Carbohydr Res* **339**:291-300.
- Sun, Y. & Cheng, J. **2002**. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresour Technol* **83**:1-11.
- Tamai Y., Tanaka K., Kaneko Y. & Harashima S. **2001**. *HO* gene polymorphism in *Saccharomyces* industrial yeasts and application of novel *HO* genes to convert homothallism to heterothallism in combination with the mating-type detection cassette. *Appl Microbiol Biotechnol* **55**:333-340
- Tanino, T., Hotta, A., Ito, T., Ishii, J., Yamada, R., Hasunuma, T., Ogino, C., Ohmura, N., Ohshima, T. & Kondo, A. **2010**. Construction of a xylose-metabolizing yeast by genome integration of xylose isomerase gene and investigation of the effect of xylitol on fermentation. *Appl Microbiol Biotechnol* **88**:1215-1221.
- Taylor M.P., Eley K.L., Martin S, Tuffin M.I., Burton S.G. & Cowan D.A. **2009**. *Thermophilic ethanologensis*: future prospects for second-generation bioethanol production. *Trends Biotechnol* **27**:398-405.
- The European Parliament and the Council of the European Union. **2003**. Directive 2003/30/EC of the European Parliament and of the Council of 8 May 2003 on the promotion of the use of biofuels or other renewable fuels for transport. In Official Journal of the European Union, L123/42, pp. 42–46 (<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2003:123:0042:0046:EN:PDF>)
- Toivari, M.H., Aristidou, A., Ruohonen, L. & Penttila, M. **2001**. Conversion of xylose to ethanol by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*: importance of xylulokinase (*XKS1*) and oxygen availability. *Metab Eng* **3**:236-249.

- Toivola, A., Yarrow, D., van den Bosch, E., van Dijken, J. P. & Scheffers, W. A. **1984**. Alcoholic Fermentation of d-Xylose by Yeasts. *Appl Environ Microbiol* **47**:1221-1223.
- Tomoyeda, M. & Horitsu. **1966**. Pentose metabolism by *Candida* utilities. Part II. Ribose-5-phosphate Ketol-isomerase. *Agr Biol Chem* **30**:956-961
- Traff, K. L., Otero Cordero, R. R., van Zyl, W. H. & Hahn-Hägerdal, B. **2001**. Deletion of the *GRE3* aldose reductase gene and its influence on xylose metabolism in recombinant strains of *Saccharomyces cerevisiae* expressing the *xyIA* and *XKS1* genes. *Appl Environ Microbiol* **67**:5668-5674.
- Ugolini, S., Tosato, V. & Bruschi, C.V. **2002**. Selective fitness of four episomal shuttle-vectors carrying *HIS3*, *LEU2*, *TRP1*, and *URA3* selectable markers in *Saccharomyces cerevisiae*. *Plasmid* **47**:94-107
- Untergasser, A., Nijveen, H., Rao, X, Bisseling, T., Geurts, R., & Leunissen, J.A.M. **2007**. Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. *Nucleic Acids Res* **35**:W71-W74
- US Congress. **2005**. Energy Policy Act of 2005, 109th cong., 58th sess. (http://www.epa.gov/oust/fedlaws/publ_109-058.pdf). Acessado em 18/12/2010.
- van den Brink, J., Canelas, A.B., van Gulik, W.M., Pronk, J.T., Heijnen, J.J., de Winde, J.H. & Daran-Lapujade, P. **2008**. Dynamics of glycolytic regulation during adaptation of *Saccharomyces cerevisiae* to fermentative metabolism. *Appl Environ Microbiol* **74**:5710-5723.
- van Dijken, J.P., Bauer, J., Brambilla, L., Duboc, P., Francois, J.M., Gancedo, C., Giuseppin, M.L., Heijnen, J.J., Hoare, M., Lange, H.C., Madden, E.A., Niederberger, P., Nielsen, J., Parrou, J.L., Petit, T., Porro, D., Reuss, M., van Riel, N., Rizzi, M., Steensma, H.Y., Verrips, C.T., Vindeløv, J., Pronk, J.T. **2000**. An interlaboratory comparison of physiological and genetic properties of four *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Enzyme Microb Technol* **26**:706-714.
- van Maris, A.J., Abbott, D.A., Bellissimi, E., van den Brink, J., Kuyper, M., Luttik, M.A., Wisselink, H.W., Scheffers, W.A., van Dijken, J.P., Pronk, J.T. **2006**. Alcoholic fermentation of carbon sources in biomass hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*: current status. *Antonie Van Leeuwenhoek* **90**:391-418.

- Verduyn, C., Zomerdijk, T.P.L., Dijken, J.P. & Scheffers, W.A. **1984**. Continuous measurement of ethanol production by aerobic yeast suspensions with an enzyme electrode. *Appl Microbiol Biotechnol* **19**:181-185
- Vertes, A.A., Inui, M. & Yukawa, H. **2008**. Technological options for biological fuel ethanol. *J Mol Microbiol Biotechnol* **15**:16-30.
- Wackett, L. P. **2008a**. Biomass to fuels via microbial transformations. *Curr Opin Chem Biol* **12**:187-193.
- Wackett, L. P. **2008b**. Microbial-based motor fuels: science and technology. *Microb Biotechnol* **1**:211-225
- Wahlbom, C.F., van Zyl, W.H., Jonsson, L.J., Hahn-Hägerdal, B. & Otero, R.R. **2003**. Generation of the improved recombinant xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae* TMB 3400 by random mutagenesis and physiological comparison with *Pichia stipitis* CBS 6054. *FEMS Yeast Res* **3**:319-326.
- Walfridsson, M., Bao, X., Anderlund, M., Lilius, G., Bulow, L. & Hahn-Hägerdal, B. **1996**. Ethanol production of xylose with *Saccharomyces cerevisiae* harboring the *Thermus thermophilus* xylA gene, which expresses an active xylose (glucose) isomerase. *Appl Environ Microbiol* **62** 4648-4651.
- Walker, G.M. **1999**. Yeast Technology. In: (Ed.). *Yeast Physiology and Biotechnology*. England: John Wiley e Sons Ltd, Yeast Technology 265-320
- Watanabe, S., Saleh, A.A., Pack, S.P., Annaluru, N., Kodaki, T., Makino, K. **2007**. Ethanol production from xylose by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* expressing protein-engineered NADH-preferring xylose reductase from *Pichia stipitis*. *Microbiology* **153**:3044-3054
- Weber, C., Farwick, A., Benisch, F., Brat, D., Dietz, H., Subtil, T. & Boles, E. **2010**. Trends and challenges in the microbial production of lignocellulosic bioalcohol fuels. *Appl Microbiol Biotechnol* **87**:1303-1315.
- Weierstall, T., Hollenberg, C. P. & Boles, E. **1999**. Cloning and characterization of three genes (SUT1-3) encoding glucose transporters of the yeast *Pichia stipitis*. *Mol Microbiol* **31**:871-883.

-
- Weisz, P.B. **2004**. Basic choice and constraints on long-term energy supplies. *Physics Today* **July**: 47-52.
- Wheals, A.E., Basso, L.C., Alves, D.M.G. & Amorim, H.V. **1999**. Fuel ethanol after 25 years. *Focus* **17**:482-487.
- Wiedemann, B. & Boles, E. **2008**. Codon-optimized bacterial genes improve L-Arabinose fermentation in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol* **74**:2043-2050.
- Williams, N. **2008**. Biofuel Debate Deepens. *Current Biology* **18**:R891-R892.
- Wingren, A. Galbe, M. & Zacchi, G. **2003**. Techno-economic evaluation of producing ethanol from softwood: comparison of SSF and SHF and identification of bottlenecks. *Biotechnol Prog* **19**:1109-1117.
- Xiao, W. & Rank, G. H. **1996**. The 2 micron plasmid of laboratory yeast strains is a type-1/type-2 hybrid. *Yeast* **12**: 809-813.
- Yamanaka, K. **1969**. Inhibition of D-xylose isomerase by pentitols and D-xylose. *Arch Biochem Biophys* **131**:502-506.
- Young, E., Lee, S.M., Alper, H. **2010**. Optimizing pentose utilization in yeast: the need for novel tools and approaches. *Biotechnol Biofuels* **3**:24.
- Young, E., Poucher, A., Comer, A., Bailey, A., Alper, H. **2011**. Functional survey for heterologous sugar transport proteins, using *Saccharomyces cerevisiae* as a host. *Appl Environ Microbiol* **77**:3311-3319.
- Yuan, T., Ren, Y., Meng, K., Feng, Y., Yang, P., Wang, S., Shi, P., Wang, L., Xie, D. & Yao, B. **2011**. RNA-Seq of the xylose-fermenting yeast *Scheffersomyces stipitis* cultivated in glucose or xylose. *Appl Microbiol Biotechnol* **92**:1237-1249.
- Zaldivar, J., Nielsen, J. & Olsson, L. **2001**. Fuel ethanol production from lignocellulose: a challenge for metabolic engineering and process integration. *Appl Microbiol Biotechnol* **56**:17-34.
- Zeyl, C. **2004**. Experimental studies on ploidy evolution in yeast. *FEMS Microbiol Lett* **233**:187-192.

SUPLEMENTO

9. SUPLEMENTO

Suplemento 1: Sequenciamento pVURA clone1

```

Query 1   CAGCTGCTAAGAGATAGTGATGATATTTCATAAATAATGTAATTCATATATATGTTAATTA 60
          |
Sbjct 186 CAGCTGCTAAGAGATAGTGATGATATTTCATAAATAATGTAATTCATATATATGTTAATTA 245

Query 61  CCTTTTTGCGAGGCATATTTATGGTGAAGGATAAGTTTTGACCATCAAAGAAGGTTAAT 120
          |
Sbjct 246 CCTTTTTGCGAGGCATATTTATGGTGAAGGATAAGTTTTGACCATCAAAGAAGGTTAAT 305

Query 121 GTGGCTGTGGTTTCAGGGTCCATAAAGCTTTTCAATTCATCtttttttttttgttcttt 180
          |
Sbjct 306 GTGGCTGTGGTTTCAGGGTCCATAAAGCTTTTCAATTCATCtttttttttttgttcttt 365

Query 181  tttttgattccggtttctttgaaattttttGATTCCGTAATCTCCGAGCAGAAGGAAGA 240
          |
Sbjct 366 TTTTGTATTCCGGTTTCTTTGAAATTTTTTGTATTCCGTAATCTCCGAGCAGAAGGAAGA 425

Query 241  ACGAAGGAAGGAGCACAGACTTAGATTGGTATATATACGCATATGTGGTGTGAAGAAAC 300
          |
Sbjct 426 ACGAAGGAAGGAGCACAGACTTAGATTGGTATATATACGCATATGTGGTGTGAAGAAAC 485

Query 301  ATGAAATTGCCAGTATCTTAACCCAACGCACAGAACAAAAACCTGCAGGAAACGAAG 360
          |
Sbjct 486 ATGAAATTGCCAGTATCTTAACCCAACGCACAGAACAAAAACCTGCAGGAAACGAAG 545

Query 361  ATAAATCGGATCCATGAATTCACCTGTATTATAAGTAAATGCATGTATACTAAACTCACA 420
          |
Sbjct 546 ATAAATCGGATCC---AATTCACCTGTATTATAAGTAAATGCATGTATACTAAACTCACA 602

Query 421  ATTAGAGCTTCAATTTAATTATATCAGTTATTACCCGGGAATCTCGGTCGTAATGATTTC 480
          |
Sbjct 603 ATTAGAGCTTCAATTTAATTATATCAGTTATTACCCGGGAATCTCGGTCGTAATGATTTC 662

Query 481  TATAATGACGaaaaaaaaaTTGGAAAGAAAAGCTTCATGGCCTTTATAAAAAGGAA 540
          |
Sbjct 663 TATAATGACGAAAAAAAAAATTGGAAAGAAAAGCTTCATGGCCTTTATAAAAAGGAA 722

Query 541  CTATCCAATACCTCGCCAGAACCAAGTAACAGTATTTTACGGGGCACAATCAAGAACAA 600
          |
Sbjct 723 CTATCCAATACCTCGCCAGAACCAAGTAACAGTATTTTACGGGGCACAATCAAGAACAA 782

Query 601  TAAGACAGGACTGTAAAGATGGACGCATTGAACTCCAAGAACAACAAGAGTTCCAAAAA 660
          |
Sbjct 783 TAAGACAGGACTGTAAAGATGGACGCATTGAACTCCAAGAACAACAAGAGTTCCAAAAA 842

Query 661  GTAGTGGAACAAAAGCAAATGAAGGATTTTCATGCGTTTGTACTCTAATCTGGTAGAAAGA 720
          |
Sbjct 843 GTAGTGGAACAAAAGCAAATGAAGGATGTCATGCGTTTGTACTGTAATCTGGTAGAGAGA 902

Query 721  TGCAGCTG 728
          |
Sbjct 903 TGCAGCTG 910
    
```

A sequência obtida do sequenciamento (Sbjct) foi alinhada com a sequência predita (Query). Em realce as bases deletadas. Os asteriscos indicam mutações não conclusivas por estarem em região de baixa qualidade do sequenciamento

Suplemento 2: Artigo submetido e aceito

O artigo *Characterization and Construction of an Auxotrophic Strain of Saccharomyces cerevisiae JP1, a Brazilian Industrial Yeast Strain for Bioethanol Production* (DOI: 10.1007/s10295-012-1170-5) foi aceito para publicação na revista *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*.

Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology

Genetic characterization and construction of an auxotrophic strain of *Saccharomyces cerevisiae* JP1, a Brazilian industrial yeast strain for bioethanol production --Manuscript Draft--

Manuscript Number:	JIMB-D-12-00353R1
Full Title:	Genetic characterization and construction of an auxotrophic strain of <i>Saccharomyces cerevisiae</i> JP1, a Brazilian industrial yeast strain for bioethanol production
Article Type:	Original Paper
Section/Category:	Genetics and Molecular Biology of Industrial Organisms
Corresponding Author:	Fernando Torres, PhD Universidade de Brasília Brasília, Distrito Federal BRAZIL
Corresponding Author Secondary Information:	
Corresponding Author's Institution:	Universidade de Brasília
Corresponding Author's Secondary Institution:	
First Author:	Viviane C. B. Reis, PhD
First Author Secondary Information:	
Order of Authors:	Viviane C. B. Reis, PhD André M. Nicola, PhD Osmar S. Oliveira Neto, MSc Vinicius Daniel F. Batista, MSc Lidia Maria P Moraes, PhD Fernando Torres, PhD
Order of Authors Secondary Information:	
Abstract:	Used for millennia to produce beverages and food, <i>Saccharomyces cerevisiae</i> also became a workhorse in the production of biofuels, most notably bioethanol. Yeast strains have acquired distinct characteristics which are the result of evolutionary adaptation to the stresses of industrial ethanol production. JP1 is a dominant industrial <i>S. cerevisiae</i> strain isolated from a sugarcane mill which is becoming increasingly popular for bioethanol production in Brazil. In this work we carried out the genetic characterization of this strain and developed a set of tools to permit its genetic manipulation. Using flow cytometry, mating type and sporulation analysis we verified that JP1 is diploid and homothallic. Vectors with dominant selective markers for G418, hygromycin B, zeocin and p-fluoro-DL-phenylalanine were used to successfully transform JP1 cells. Also, an auxotrophic <i>ura3</i> mutant strain of JP1 was created by gene disruption using integration cassettes with dominant markers flanked by <i>loxP</i> sites. Marker excision was accomplished by the <i>Cre/loxP</i> system. The resulting auxotrophic strain was successfully transformed with an episomal vector that allowed the expression of the green fluorescent protein.
Response to Reviewers:	Reviewers' comments: Comments of the Senior Editor: "This is a fairly straightforward description of an industrial strain of <i>Saccharomyces cerevisiae</i> used for fuel ethanol production in Brazil. It is not clear that the manuscript elaborates the reasons that this particular strain is favored over others (e.g. P2) or what advantages it might have. The manuscript does, however, describe a genetic transformation system for the strain. All of the elements of the transformation system

are widely used in the *S. cerevisiae* community, but it is useful to have a *ura3* selection available. The authors should note in the discussion that the *ura3* mutation has been reported to confer ethanol sensitivity."

Answer: We added some information about the advantages of JP1 over PE-2 (see lines 54-58). Also, the *ura3* strain developed in this work (JPU) would only be used to produce ethanol after complementation with wild type *URA3* because it is also known that auxotrophic mutants tend to grow less well than prototrophs (we referenced that info in the manuscript).

"In addition to the edits offered by the reviewers please attend to the following:

1. L. 47L starch

2. L. 89 fluoroorotic"

Answer: All two corrections were made in the text.

"Reviewer #1: This manuscript discusses the characterisation of an industrial strain of *S. cerevisiae*. While there are no technical flaws in the analysis, the paper may benefit from a redirection of the discussion.

In its current form, the manuscript seems to focus on a comparison between strain JP1 and what the authors call "laboratory strains". The authors indicate that the strains normally used in laboratory conditions present several disadvantages compared to those used in real processes. Wouldn't it be more relevant to make comparisons with other strains of industrial interest, then?

Experimentally, it should be interesting to see how this strain differs from other strains in terms of its physiology and growth features (growth rates, ethanol yields, etc.). A few simple experiments could be performed to address this."

Answer: It was not the goal of our work to compare JP1 with other strains because this has already been done elsewhere (see reference 13).

"Another issue to address is the repeated reference to the origin of the strain: Is it REALLY necessary to say that it is a Brazilian strain, used in NE Brazil? Scientific information should be of universal use. The geographic origin of a strain is irrelevant for this type of study, unless it is directed to ecological aspects, effect of human intervention on the environment, or any other such issue."

Answer: we think it is important to emphasize that JP1 was isolated in the NE Brazil as a dominant strain because local production conditions are quite different from those found in other parts of Brazil, especially São Paulo. In the NE, average temperatures are higher and this may partially explain the robustness of JP1 when compared to PE-2. In fact, we got word that JP1 is drawing more attention from alcohol producers who have found it a better starter strain than PE-2. We have added some sentences in the manuscript regarding this issue (lines 54-58).

"In the conclusions, it is again necessary to emphasize the importance of this study for the bioethanol industry in Brazil? I expect that the findings will contribute to the general body of scientific knowledge and are not limited to local interests. The conclusions should be expanded to discuss the comparison with other industrial strains, as indicated above."

Answer: we have modified the conclusion and some parts of the discussion in order to emphasize that the tools developed in our work will ultimately help to understand general physiological features of industrial strains. However, we can not deny that JP1 should be considered as a prime platform for future genetic modifications for increased bioethanol production.

"Some minor issues:

P2, line 54: Dominate, not dominated
P3. Are the strains publicly available? Is strain JP1 protected by a patent?
P10, line 269: Rephrase
P10, line 288: "plated",not "platted"

Answer. All issues were addressed in the text. In the "Material" section we added information about the availability of JP1 (see lines 84-86). Also, we have rephrased the sentence originally found in line 269 (see lines 271-274)

Reviewer #2: The authors present a manuscript concerning the construction of an auxotrophic of *Saccharomyces cerevisiae*. Although the molecular techniques are not new and have already been employed to create mutant in diploid strains, such studies are rather rare and deserve to be published. However, English should be corrected. Key words do not cover adequately the subject, cre-lox system should be added.

Answer: we considered all the suggestions from this reviewer.

Reviewer #3: The manuscript describes the genetic characterization and construction of an auxotrophic strain of *Saccharomyces cerevisiae* JP1, a Brazilian industrial yeast strain for bioethanol production. The introduction, material and methods, results and discussion sections are clearly written and logically organized. The description of a set tools developed to genetically manipulate *S.cerevisiae* is relevant from both the academic and industrial points of view. The main considerations raised after reading the revised manuscript are as follow:

Specific comments:

1. Page 9 - lines 262-263 Important PCR data that confirm the success of the transformation were obtained but not shown. Why? It would be interesting to include these data in the work

Answer: we have added a second supplementary figure (Figure S2) with this result.

2. Page 11- lines 307-313 Discussion about the detection of GFP fluorescence (Figure 5) is very short. Please expand the analysis of the findings.

Answer: we considered this suggestion (see lines 314-319).

1 Genetic characterization and construction of an auxotrophic strain of *Saccharomyces cerevisiae* JP1, a Brazilian
2 industrial yeast strain for bioethanol production

3

4 Viviane Castelo Branco Reis¹, André Moraes Nicola², Osmar de Souza Oliveira Neto¹, Vinícius Daniel Ferreira
5 Batista¹, Lidia Maria Pepe de Moraes¹ and Fernando Araripe Gonçalves Torres^{1*}

6

7 ¹Centro de Biotecnologia Molecular

8 Instituto de Ciências Biológicas

9 Universidade de Brasília

10 Brasília, DF, Brazil, 70910-900

11

12 ²Programa de Pós-Graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia

13 Universidade Católica de Brasília

14 Brasília, DF, Brazil, 709790-160

15

16 *Corresponding author:

17 Fernando Araripe Gonçalves Torres

18 Centro de Biotecnologia Molecular

19 Instituto de Ciências Biológicas

20 Universidade de Brasília

21 Brasília, DF, Brazil, 70910-900

22 e-mail: ftorres@unb.br

23 Phone: +55 61 31073119

24

25

26

27

28

29

30

31 **ABSTRACT**

32

33 Used for millennia to produce beverages and food, *Saccharomyces cerevisiae* also became a workhorse in the
34 production of biofuels, most notably bioethanol. Yeast strains have acquired distinct characteristics which are the
35 result of evolutionary adaptation to the stresses of industrial ethanol production. JP1 is a dominant industrial *S.*
36 *cerevisiae* strain isolated from a sugarcane mill which is becoming increasingly popular for bioethanol
37 production in Brazil. In this work we carried out the genetic characterization of this strain and developed a set of
38 tools to permit its genetic manipulation. Using flow cytometry, mating type and sporulation analysis we verified
39 that JP1 is diploid and homothallic. Vectors with dominant selective markers for G418, hygromycin B, zeocin
40 and ρ -fluoro-DL-phenylalanine were used to successfully transform JP1 cells. Also, an auxotrophic *ura3* mutant
41 strain of JP1 was created by gene disruption using integration cassettes with dominant markers flanked by *loxP*
42 sites. Marker excision was accomplished by the *Cre/loxP* system. The resulting auxotrophic strain was
43 successfully transformed with an episomal vector that allowed the expression of the green fluorescent protein.

44

45 **INTRODUCTION**

46 Ethanol is an important alternative for fossil fuels, being the USA and Brazil the two major global
47 producers. Industrial production of ethanol involves biological fermentation of corn starch (USA) or sugar cane
48 sucrose (Brazil). Also, there is great interest in the use of lignocellulosic biomass as renewable source of raw
49 material for ethanol production although, in this case, many technological challenges are still encountered [30].

50 The yeast *Saccharomyces cerevisiae* is the microorganism of choice for industrial bioethanol production
51 due to its superior fermentative capacity and tolerance to the stresses involved in large-scale bioprocesses [8].
52 Because the industrial fermentative process takes place under non-sterile conditions, contamination with
53 endogenous yeasts is almost inevitable [3] and only strains that are more physiologically adapted tend to
54 dominate [13,3]. *S. cerevisiae* JP1, a dominant industrial strain isolated from a sugarcane mill in Northeast Brazil
55 has shown to be more adapted to the local environmental conditions where temperatures are normally higher
56 than in other parts of the country where strain PE-2 is more commonly used [13,3]. This physiological
57 robustness is reflected by its tolerance to acidic pH, high temperatures and high ethanol concentration when
58 compared to other Brazilian industrial strains [13]. Although it shows an excellent sugar to ethanol conversion
59 rate (93%) [13], productivity and yields are lower than those observed in other industrial strains which has been
60 explained by its robust glycerol production that protects the cell against osmotic stress [2].

61 When seeking to improve ethanol production using industrial yeast strains it is often necessary to
62 perform controlled genetic modifications and for that purpose it is necessary to gain insights into the genetics
63 and physiology of the strains involved. Most information obtained from laboratory strains cannot be simply
64 applied to industrial yeasts because the latter have lost many original features due to extensive cultivation and
65 manipulation under non-stressful conditions [7,17,39]. In addition, laboratory strains can be more easily
66 manipulated because they are usually isogenic, haploid of either **a** or α mating type, are prompt to sporulate
67 when diploid, and show several auxotrophic mutations [1]. On the other hand, industrial yeast strains have
68 complex genetics, are either diploid or polyploid, show low competence for sporulation and are prototrophic [1].

69 Because industrial yeast strains are extremely important in large-scale processes (food, beverages and
70 ethanol industries), it is of utmost interest to develop molecular tools to allow their genetic manipulation [1]. In
71 this paper we describe the genetic characterization of JP1 and the development of a set of molecular tools created
72 to genetically manipulate this important industrial yeast strain.

73

74 **MATERIALS AND METHODS**

75

76 Strains and cultivation

77

78 *Escherichia coli* XL10-Gold (Tet^r $\Delta(mcrA)183 \Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1$
79 *gyrA96 relA1 lac Hte* [F' *proAB lacI^rZAM15 Tn10(Tet^r) Amy Cam^r*] was used as host for routine recombinant
80 DNA manipulations. *E. coli* was grown in modified Luria-Bertani medium (0.5% yeast extract; 1% peptone; 1%
81 NaCl) or low salt medium (0.5% yeast extract; 1% peptone; 0.5% NaCl) at 37 °C. The media were
82 supplemented, when necessary, with appropriate antibiotics: 100 µg/mL ampicillin, 50 µg/mL kanamycin or 25
83 µg/mL zeocin. For solid medium 1.5% agar was added. The *S. cerevisiae* strains used in this study are listed in
84 Table 1. *S. cerevisiae* JP1 was deposited at the Department of Mycology Culture Collection (Universidade
85 Federal de Pernambuco - Brazil) from where it can be released for research. JPU, which was constructed in this
86 work, is also available upon request for the same purpose. Yeast was grown at 28-30 °C in different media. YP
87 complex medium (1% yeast extract, 2% peptone) was prepared with different carbon sources: 2% glucose
88 (YPD); 2% raffinose (YPRaf); 2% galactose (YPGal). MD minimal medium (0.17% Yeast Nitrogen Base
89 without amino acids (Difco, USA), 0.5% ammonium sulfate, 2% glucose) was supplemented with amino acids
90 and nucleotides as necessary. The final concentrations of supplements were: 20 mg/L tryptophan, 20 mg/L

91 histidine, 30 mg/L leucine, 20 mg/L uracil and 900 mg/L tyrosine. For solid medium 2% agar was added. For
92 selection of uracil auxotrophic mutants 1 mg/mL 5-FOA (5-fluoroorotic acid, Sigma, USA) plus 50 µg/mL uracil
93 was added to solid MD [9]. Media used for sporulation were: pre-sporulation medium (0.8% yeast extract, 0.3%
94 peptone, 10% glucose, 2% agar) and SPO (1% potassium acetate, 0.1% yeast extract, 0.05% glucose, 2% agar).

95

96 Sporulation and tetrad dissection

97

98 For sporulation, yeast was grown on pre-sporulation medium for 48 hours then a patch of cells was
99 transferred to SPO and grown for 3-10 days [35]. After that, cells were dissolved in phosphate buffered saline
100 (PBS: 13.7 mM NaCl; 0.7 mM Na₂HPO₄) for microscopic analysis. Differential interference contrast (DIC)
101 images were captured with a Zeiss Axiophot microscope equipped with a 100x NA 1.3 objective, an AxioCam
102 MRC camera and AxioVision software release 4.7. Images were edited with Adobe Photoshop 7.0. Tetrad
103 dissection was performed according to a previously described method [9] using the MSM400 dissection
104 microscope (Singer, England).

105

106 Flow cytometry

107

108 Yeast cell DNA quantification was adapted from a previously reported method [27]. Cells were grown
109 in YPD medium until stationary phase. Cells were fixed in 70% ethanol at 4 °C for 16 hours, washed with 1 mL
110 of 50 mM sodium citrate (pH 7.5) and treated with 200 µg RNase A for 1 hour at 55 °C. After that, cells were
111 treated with 200 mg of proteinase K for 1 more hour and submitted to a 20 s ultrasound burst (60 W). Cells (1 x
112 10⁷) were stained with 50 µg/mL propidium iodide (PI, Sigma, USA) and kept on ice until analyzed on a
113 FACSCalibur flow cytometer (BD Bioscience) equipped with a 488 nm argon ion laser. About 50,000 events
114 were captured and individual cells were separated from debris and cell clumps by forward scatter (FSC) versus
115 side scatter (SSC) and FL-W versus FL-A plots. Data was acquired with CellQuest and analyzed with FlowJo
116 software. *S. cerevisiae* haploid strain RE1006, diploid strain CEN.PK2 and industrial diploid strain PE-2 were
117 used as standards.

118

119 Mating type determination

120

121 Mating type was determined by a PCR approach [26]. Briefly, a small portion of a colony was
122 dissolved in 5 μ L sterilized dH₂O and then the following PCR mix was added: 0.13U *Taq* polymerase, 1X
123 reaction buffer, 2 mM MgCl₂, 200 μ M each dNTP, 0.2 μ M each primer (MATFa, MATF α and MATR). PCR
124 conditions were: 30 cycle of 94 °C/45 s; 50 °C/45 s; 72 °C/40 s and final extension of 72 °C/5 min.

125

126 Yeast transformation with plasmid containing drug-resistance markers

127

128 For the determination of the minimal inhibitory concentration (MIC), yeast cells were grown in 5 mL
129 YPD and 3 μ L of each dilution containing 10⁸ to 10³ cells/mL were spotted onto YPD plates supplemented with
130 different concentrations of the following drugs: 50-300 μ g/mL G418 (USB, USA), 50-100 μ g/mL zeocin
131 (Invitrogen, USA), 100-300 μ g/mL hygromycin B (Invitrogen) 0,05-5 mg/mL and *p*-fluoro-DL-phenylalanine
132 (PFP, Sigma, USA). Yeast transformation with different plasmids containing dominant markers was performed
133 by an one-step method [12] with 2 μ g plasmid DNA. Cells (1.5 x 10⁷) were plated on appropriated selective
134 solid media. When using PFP, the MD plates were supplemented with tyrosine. Plates were incubated for 24-96
135 hours.

136

137 DNA manipulation

138

139 Plasmids used in this work are summarized in Table 1. All DNA manipulation was essentially
140 performed as previously described [33]. Phusion® DNA polymerase (Finnzymes, Finland) was used for PCR
141 according to manufacturer's instructions. Primers used in this study are listed in Table 2. Wizard® SV Gel and
142 PCR Clean up System (Promega, USA) were used to elute DNA from agarose gels and for amplicon
143 purification.

144

145 Plasmid construction

146

147 *Construction of episomal plasmid with zeocin resistance marker*

148 The episomal plasmid pYC240 [24] was digested with *Asc*I in order to remove the hygromycin B
149 resistance cassette (*hph*MX) which was replaced with a 1189 bp fragment containing the zeocin resistance
150 cassette derived from pPICZ α A (Invitrogen, USA) by PCR using ZeoBlas-F2 and ZeoBlas-R2 primers. The

151 amplicon was cloned into pBlueScript[®] II SK (+/-) and then subcloned into pYC240 after *AscI* digestion. The
152 resulting plasmid was named pYC280 (Figure S1a).

153

154 *Construction of Cre recombinase replicative plasmid*

155 The 252 bp autonomous replication sequence (ARS1) fragment derived from pJPA113 [16] was isolated
156 by digestion with *HindIII* and *SacI*. The ARS1 fragment was cloned into pYC040 [24] digested with the same
157 restriction enzymes resulting in plasmid pYC440. The 2183 bp fragment containing the CreA recombinase
158 expression cassette from pSH47 plasmid [21] was purified after digestion with *SacI* and *KpnI* and cloned into
159 pYC440 digested with the same enzymes. The resulting plasmid was named pYRCre (Figure S1b).

160

161 *Construction of URA3 disruption cassettes*

162 *URA3* disruption cassettes were constructed as shown in Figure 1. Two regions, UP (~400 bp) and DW
163 (~350 bp) which flank the *URA3* gene were amplified from S288c genomic DNA using the pair of primers
164 URAUP-F/URAUP-R and URADW-F/URADW-R, respectively. Purified amplicons were ligated and a second
165 round of PCR was performed with URAUP-F and URADW-R primers. The 750 bp amplicon was purified and
166 cloned into pPCV-B (a pBlueScript[®] II SK-derived plasmid constructed in our lab with alternative cloning
167 sites). The resulting plasmid, pVURA, has a *BamHI* site between the UP and DW regions in order to subclone
168 the cassettes for zeocin and G418 resistance flanked by *loxP* sequences, *zeo^R-loxP* and *kan^R-loxP*, respectively.
169 The *zeo^R-loxP* cassette (1261 bp) was amplified using pPICZ α A as template and 5PPLOX and ZeoBlasR3
170 primers. In order to construct the *kan^R-loxP* cassette, first, the *kan* coding sequence was amplified from pPIC9K
171 (Invitrogen) with kan-F1 and kan-R1 primers. The amplicon was digested with *NcoI* and *StuI* and subcloned into
172 pPICZ α A digested with the same enzymes. The resulting plasmid, pPICK α , was used as template for the
173 amplification of the *kan^R-loxP* cassette (1702 bp) with 5PPLOX and ZeoBlasR3 primers. Both disruption
174 cassettes were cloned into pGEMTeasy (Promega) and then digested with *BamHI* for subcloning into *BamHI*-
175 linearized pVURA. The resulting plasmids were named pURAZL and pURAKL, for zeocin and G418 resistance,
176 respectively. The *URA3* disruption cassettes, URAZL and URAKL, were purified after digestion with *PvuII*
177 prior to yeast transformation.

178

179 *Construction of ura3 strain*

180

181 For disruption of *URA3* alleles yeast was transformed by lithium acetate method [20]. Cells transformed
182 with each disruption cassette were selected on YPD+100 µg/mL zeocin (URAZL) or G418 (URAKL). After
183 growth, colonies were transferred to plates containing twice the concentration of each antibiotic and then replica
184 plated to MD+Ura, MD-Ura and MD+5-FOA to identify *ura3* mutants. Correct integration was confirmed by
185 colony PCR with URAF1 and URAR1 primers. Marker excision was performed as described previously [10].
186 Briefly, after transformation with pYRCre, an individual colony was grown in 5 mL YPRaf+200 µg/mL
187 hygromycin B. This pre-culture was collected, washed with sterile dH₂O and inoculated in 10 mL
188 YPGal+hygromycin B to an OD₆₀₀ = 0.3. The culture was incubated for 3 hours and after that 1 mL cells were
189 plated on YPD. After 1 day, a patch of cells were transferred to a fresh YPD plate to obtain isolated colonies.
190 Colonies in which the drug resistance marker was excised were screened on YPD+200 µg/mL G418 or zeocin.
191 Marker excision was confirmed by colony PCR with URAF1 and URAR1 primers. Plasmid curing was verified
192 by the absence of growth on YPD+200 µg/mL hygromycin B.

193

194 Fluorescence analysis

195

196 Cells transformed with pGFP-C-FUS and negative control were cultivated in MD for 16 h. Then, 10 µL
197 of each culture were added onto a slide. A Leica SP5 laser scanning confocal microscope equipped with 488 nm
198 laser and a 63x NA 1.4 objective was used to evaluate the expression of GFP (green fluorescent protein). Images
199 were collected with LAS AF software and edited with Photoshop 7.0.

200

201 **RESULTS AND DISCUSSION**

202

203 *Determination of ploidy*

204 The yeast cycle involves both haploid and diploid stages of development. When a haploid yeast strain is
205 submitted to a nutritional stress condition (glucose and nitrogen limitation) it arrests at the stationary phase, but
206 diploid and polyploid cells can undergo meiosis and sporulate [15]. In order to gain insight into the ploidy of JP1
207 we first investigated its ability to form spores when grown in SPO medium. As expected, we did not detect
208 spores derived from RE1006, a haploid strain, but CEN.PK2, PE-2 (both diploid) and JP1 showed many asci
209 containing 4 spores (Figure 2a). The ability to sporulate suggests that JP1 is at least diploid. In order to confirm

210 this we carried out flow cytometry analysis which allows a more accurate determination of cell ploidy. As seen
211 on Figure 2b, the peak corresponding to the DNA content of JP1 matches that of PE-2 and is positioned between
212 those from RE1006 and CEN.PK2. This result is consistent with JP1 being diploid although its total DNA
213 content is somewhat different from laboratory strains but similar to another industrial strain, PE-2, which is
214 known to be diploid with extensive chromosome rearrangements [4]. Previous work using pulsed field gel
215 electrophoresis showed that JP1 has 15 chromosomal bands unlike laboratory strains which commonly show 16
216 bands [31]. The variation of the number and/or size of chromosomes found between laboratory and industrial
217 strains may reflect an evolutionary adaptation to the stressful conditions at which the former are submitted [31].
218 In fact, it has been show that haploid and tetraploid strains of *S. cerevisiae* eventually evolve to a more stable
219 diploid form after 1.800 generations when cultivated in different conditions [19].

220

221 *Determination of life cycle*

222 *S. cerevisiae* displays two life cycles: homothallic (self-fertile) and heterothallic (self-sterile) [22,24].
223 Essentially, homothallic cells can undergo an interconversion at the *MAT* locus which leads to mating type
224 switch while heterothallic cells do not. Most laboratory strains are heterothallic because stable mating types are
225 required to promote controlled crosses. However, industrial yeast strains are generally homothallic frequently
226 switching mating types [22]. Because this switch occurs in haploid cells, we dissected 34 tetrads derived from
227 JP1. The majority of the dissected *asci* contained 4 spores with a viability of 64.7% (Table 3). This value is
228 smaller than that obtained with PE-2 (93.3%) [4] and could be the result of recessive lethal mutations, uneven
229 chromosome rearrangement/segregation or environmental parameters [5]. Cells derived from dissected *asci* were
230 submitted to colony PCR with primers specific for each mating type showed amplification of regions of *MATa*
231 (544 bp) and *MAT α* (404 bp). The results shown on Figure 3a show a pattern consistent with homothallism as
232 judged by the presence of two PCR products which reflects the formation of diploids after mating type
233 switching. This indicates that JP1 is homothallic. The fact that some segregants did not undergo mating type
234 switching (Figure 3b, lane 6; Figure 3c, lanes 4 and 5) could be explained as the result of recessive mutations in
235 different genes of the mating type switching pathway. For example, heterothallism in *S. cerevisiae* isolated from
236 nature was associated with mutations in the *HO* gene which codes for the endonuclease that triggers gene
237 recombination at the *MAT* locus [28]. In fact, a commonly used approach to generate heterothallic strains is to
238 simply delete the *HO* gene [36].

239

240 *Transformation with vectors containing dominant markers*

241 In order to develop molecular tools for JP1, first, we assessed the sensibility of this strain to several
242 drugs commonly used for genetic manipulation of industrial yeast strains [1]. The MIC observed for various
243 drugs were: 100 µg/ml for G418, 100 µg/ml for zeocin, 200 µg/ml for hygromycin B and 300 µg/ml for PFP.
244 These drug concentrations were used thereafter for transformations assays. Strain JP1 had previously been
245 transformed with a yeast centromeric plasmid (YCp) [13]. These vectors rely solely on chromosome-encoded
246 proteins for proper maintenance because they carry an autonomous replicating sequence (ARS) which functions
247 as replication origin. Another class of yeast vectors called YE_p (yeast episomal plasmid) are present at high copy
248 number due to the presence of an endogenous plasmid, the 2µ circle, whose products are required in *trans* for
249 plasmid maintained [32]. We investigated the presence of the 2µ circle by PCR using FLPIN5 and FLPIN3
250 primers specific for the 2µ-encoded *FLP* gene. A fragment of expected size of ~600 bp was amplified (data not
251 shown) thus demonstrating that JP1 has the *cir*⁺ genotype (presence of 2µ) and therefore is prompt for
252 transformation with YE_p vectors. We then transformed JP1 with different episomal vectors containing dominant
253 markers (Table 4). Transformation efficiency for all drug-resistance vectors was around 10²/µg DNA which is
254 lower than that previously reported [13] but can be explained by the fact that in this particular experiment we
255 used a fast and simple transformation protocol. Nonetheless, it has been shown that JP1 shows transformation
256 efficiency greater than other industrial strains [13]. In our work, the highest transformation efficiency was
257 observed with vector pEA2, however, it also exhibited the highest number of false-positives (see negative
258 control column in Table 4). Plasmid pEA2 carries the *ARO4-OF_P* allele which confers resistance to the
259 dominant markers *o*-fluoro-DL-phenylalanine (OF_P) and *p*-fluoro-DL-phenylalanine (PFP) [18]. This marker
260 has been successfully used with wine yeast strains but with a rate of 10% false positives [11]. We propose that
261 JP1 should be transformed with vectors containing other dominant markers such as G418, zeocin or hygromycin
262 B resistance because in these cases we never observed false positives (Table 4). To confirm the presence of the
263 vectors in transformed cells, colony PCR was performed with primers (G418F/G418R, ZeoBlastF2/ZeoBlastR2,
264 hph1/hph3) designed to amplify specific regions of the dominant markers. In all cases, PCR products of the
265 expected sizes were obtained (Figure S2) thus confirming the success of the transformation.

266

267 *Construction of an auxotrophic ura3 strain*

268 Although drug resistance markers are a valuable tool for genetic manipulation of industrial yeasts, they
269 are often not tolerated in transgenic yeasts used in large industrial processes, such as bioethanol production. This

270 is mainly due to the possibility of horizontal transference of antibiotic resistance genes to microorganisms
271 present in the biodiversity. Alternatively, auxotrophic markers are more accepted because they are derived from
272 yeasts themselves and provide higher transformation efficiencies and less false-positive colonies when compared
273 to drug resistance markers [23]. In this work we sought the construction of an auxotrophic strain deficient in
274 uracil metabolism. For that purpose, we designed a strategy to create a null *URA3* mutant by gene disruption. It
275 has been shown that among several auxotrophic markers tested, *URA3* revealed as the best for plasmid
276 maintenance in both selective and non-selective conditions [37]. Also, *ura3* cells can be easily screened on plates
277 containing the drug 5-FOA, a counter selectable marker which is toxic for *Ura3*⁺ cells [6]. However, recessive
278 mutations are more difficult to obtain in diploid strains (which is the case for JP1) because the genetic events that
279 lead to gene disruption need to occur in both alleles [25]. In order to disrupt each *URA3* allele separately, we
280 constructed two deletion cassettes based on zeocin (URA-ZL cassette) or G418 (URA-KL cassette) resistance
281 markers flanked by *loxP* sites which are recognized by CreA, a site-specific recombinase. The Cre/*lox* system is
282 used to promote recombination of sequences present between *loxP* sites and is commonly employed to remove
283 drug resistance markers in industrial yeasts [34]. The URAZL and URAKL cassettes were cloned between PCR-
284 derived DNA fragments from upstream and downstream regions of the *URA3* gene in order to promote gene
285 disruption of this *locus* by homologous recombination [38].

286 JP1 cells were separately transformed with each disruption cassettes and 104 colonies from each
287 transformation system were analyzed. First, colonies were replica plated to YPD supplemented with twice the
288 concentration of zeocin or G418 normally used. Colonies were then plated on MD+Ura and MD-Ura. Only one
289 colony from the URAZL system did not grown on MD-Ura, this clone was named JP1ΔZ. The isolation of this
290 rare clone (0.5% of analyzed transformants) may have been driven by the second round of selection in which the
291 transformed cells were submitted to higher concentrations of zeocin. Cells transformed with URAKL cassette
292 were replica plated onto MD+5-FOA and after growth two colonies were tested on selective media for the *Ura*⁻
293 phenotype. The selected *Ura*⁻ clone was name JP1ΔK. The resulting *Ura*⁻ strains, JP1ΔZ and JP1ΔK, were
294 submitted to colony PCR with URAF1 and URAR1 primers to confirm *URA3* disruption. These primers were
295 designed to anneal ~100 bp upstream and downstream from the *URA3* regions yielding amplicons of different
296 sizes (Figure 4a). Strains JP1ΔZ and JP1ΔK produced amplicons of 2.2 kb and 2.6 kb, respectively (Figure 4b,
297 lanes 3 and 8), while JP1 yielded an amplicon of expected 1.7 kb (Figure 4b, lanes 2 and 7). These results
298 showed that the *Ura*⁻ phenotype observed in JP1ΔZ and JP1ΔK was the result of a double knockout of *URA3*.

299 In order to remove the drug resistance markers from the *URA3*-disrupted strains we used the *Cre/lox*
300 system. For that, we constructed a replicative expression vector, pYRCre, containing the CreA recombinase gene
301 under control of the inducible *GALI* promoter. The reason for choosing a replicative vector was because it is
302 mitotically unstable [14] allowing to cure cells after growth in non-selective medium. After the gene pop-out
303 procedure and plasmid curing we performed colony PCR with URAF1 and URAR1 primers to confirm the loss
304 of the drug resistance marker. The native *URA3 locus* yields a 1.7 kb amplicon whereas in the disrupted strains
305 this fragment is reduced to ~1.0 kb (Figure 4b, lanes 4 and 9). Furthermore, we checked the phenotypes of the
306 resulting strains JPU and JPUK on plates either supplement with G418 or zeocin. As expected both strains were
307 resistant to 5-FOA and lacked the ability to grown on minimal medium lacking uracil (Figure 4c). Together,
308 these results demonstrated that *ura3* auxotrophic strains of JP1 were successfully obtained. Because the gene-
309 knockout strategy in this work involved complete removal of the *URA3* coding sequence the rate of phenotypic
310 reversion should be neglectable [29] which makes the resulting strain ideal for genetic manipulation.

311 Since JPU and JPUK are isogenic, only the latter was tested for transformability with plasmid pGFP-C-
312 FUS, a vector bearing the *URA3* auxotrophic marker and the *gfp* reporter gene. JPU was successfully
313 transformed and, as expected, no transformants were obtained with the negative control without transforming
314 DNA. In order to further confirm the success of JP1 transformation, a selected colony was chosen to check for
315 the expression of plasmid-encoded GFP by confocal scanning fluorescence microscopy. As shown in Figure 5,
316 fluorescence was only detected in transformed cells thus showing that the *MET25* promoter which drives GFP
317 expression in pGFP-C-FUS was properly recognized by the transcriptional machinery of JPU. Together, these
318 results show that JPU not only shows a stable Ura⁻ phenotype – a result of the complete deletion of *URA3*
319 coding sequences – but it is also transformable with plasmids bearing the *URA3* marker.

320

321 CONCLUSION

322 Because of its physiological robustness JP1 should be considered as an attractive model to study the
323 molecular basis of yeast adaptation to industrial processes. For that purpose, its genetic characterization and the
324 molecular tools developed in this work will certainly provide the means to understand genetic fitness of
325 industrial yeast strains thus paving the way for future genetic modifications which may include the production of
326 second generation ethanol.

327

328

329 **KEYWORDS**

330 *Saccharomyces cerevisiae*, industrial yeast, bioethanol, auxotrophic strain, uracil metabolism, Cre/loxP
331 recombination

332

333 **ACKNOWLEDGMENTS**

334 The research was supported by Petrobras, CNPq and Capes (Brazil). The authors would like to thank
335 Dr. Olssen, Dr. Falcon and Dr. González for donation of plasmid vectors. We are in debt with Dr. Marcos
336 Morais (Universidade Federal de Pernambuco) for critical review of this manuscript.

337

338 **REFERENCES**

- 339 1. Akada R (2002) Genetically modified industrial yeast ready for application. *J Biosci Bioeng* 94
340 (6):536-544. doi:10.1016/S1389-1723(02)80192-X
- 341 2. Almeida JR, Runquist D, Sánchez Nogué V, Lidén G, Gorwa-Grauslund MF (2011) Stress-
342 related challenges in pentose fermentation to ethanol by the yeast *Saccharomyces*
343 *cerevisiae*. *Biotechnol J* 6 (3):286-299. doi:10.1002/biot.201000301
- 344 3. Amorim HV, Lopes ML, de Castro Oliveira JV, Buckeridge MS, Goldman GH (2011) Scientific
345 challenges of bioethanol production in Brazil. *Appl Microbiol Biotechnol* 91 (5):1267-
346 1275. doi:10.1007/s00253-011-3437-6
- 347 4. Argueso JL, Carazzolle MF, Mieczkowski PA, Duarte FM, Netto OV, Missawa SK, Galzerani F,
348 Costa GG, Vidal RO, Noronha MF, Dominska M, Andrietta MG, Andrietta SR, Cunha AF,
349 Gomes LH, Tavares FC, Alcarde AR, Dietrich FS, McCusker JH, Petes TD, Pereira GA
350 (2009) Genome structure of a *Saccharomyces cerevisiae* strain widely used in
351 bioethanol production. *Genome Res* 19 (12):2258-2270. doi:10.1101/gr.091777.109
- 352 5. Bilinski CA, Casey GP (1989) Developments in sporulation and breeding of brewer's yeast.
353 *Yeast* 5 (6):429-438. doi:10.1002/yea.320050603
- 354 6. Boeke JD, LaCroute F, Fink GR (1984) A positive selection for mutants lacking orotidine-5'-
355 phosphate decarboxylase activity in yeast: 5-fluoro-orotic acid resistance. *Mol Gen*
356 *Genet* 197 (2):345-346. doi:10.1007/BF00330984
- 357 7. Borneman AR, Desany BA, Riches D, Affourtit JP, Forgan AH, Pretorius IS, Egholm M,
358 Chambers PJ (2011) Whole-genome comparison reveals novel genetic elements that
359 characterize the genome of industrial strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS Genet*
360 7 (2):e1001287. doi:10.1371/journal.pgen.1001287
- 361 8. Brosnan MP, Donnelly D, James TC, Bond U (2000) The stress response is repressed during
362 fermentation in brewery strains of yeast. *J Appl Microbiol* 88 (5):746-755.
363 doi:10.1046/j.1365-2672.2000.01006.x
- 364 9. Burke D, Dawson D, Stearns T (2000) *Methods in Yeast Genetics: A Cold Spring Harbor*
365 *Laboratory Course Manual*. 2000 edn. Burke, D, New York
- 366 10. Carter Z, Delneri D (2010) New generation of *loxP*-mutated deletion cassettes for the
367 genetic manipulation of yeast natural isolates. *Yeast* 27 (9):765-775.
368 doi:10.1002/yea.1774
- 369 11. Cebollero E, Gonzalez R (2004) Comparison of two alternative dominant selectable markers
370 for wine yeast transformation. *Appl Environ Microbiol* 70 (12):7018-7023.
371 doi:10.1128/AEM.70.12.7018-7023.2004

- 372 12. Chen DC, Yang BC, Kuo TT (1992) One-step transformation of yeast in stationary phase.
373 Curr Genet 21 (1):83-84
- 374 13. da Silva Filho EA, de Melo HF, Antunes DF, dos Santos SK, do Monte Resende A, Simoes DA,
375 de Morais MA, Jr. (2005) Isolation by genetic and physiological characteristics of a fuel-
376 ethanol fermentative *Saccharomyces cerevisiae* strain with potential for genetic
377 manipulation. J Ind Microbiol Biotechnol 32 (10):481-486. doi:10.1007/s10295-005-
378 0027-6
- 379 14. Da Silva NA, Bailey JE (1991) Influence of plasmid origin and promoter strength in
380 fermentations of recombinant yeast. Biotechnol Bioeng 37 (4):318-324.
381 doi:10.1002/bit.260370405
- 382 15. Dickinson JR (2004) Life cycle and morphogenesis. In: Dickinson JR, Schweizer M (eds) The
383 Metabolism and Molecular Physiology of *Saccharomyces cerevisiae*. CRC Press, Florida,
384 pp 1-19
- 385 16. Falcon AA, Aris JP (2003) Plasmid accumulation reduces life span in *Saccharomyces*
386 *cerevisiae*. J Biol Chem 278 (43):41607-41617. doi:10.1074/jbc.M307025200
- 387 17. Fay JC, Benavides JA (2005) Evidence for domesticated and wild populations of
388 *Saccharomyces cerevisiae*. PLoS Genet 1 (1):66-71. doi:10.1371/journal.pgen.0010005
- 389 18. Fukuda K, Watanabe M, Asano K (1990) Altered Regulation of Aromatic Amino Acid
390 Biosynthesis in β -Phenylethyl-alcohol-overproducing Mutant of *Sake* Yeast
391 *Saccharomyces cerevisiae*. Agric Biol Chem 54 (12):3151-3156
- 392 19. Gerstein AC, Chun HJ, Grant A, Otto SP (2006) Genomic convergence toward diploidy in
393 *Saccharomyces cerevisiae*. PLoS Genet 2 (9):e145. doi:10.1371/journal.pgen.0020145
- 394 20. Gietz RD, Schiestl RH (2007) High-efficiency yeast transformation using the LiAc/SS carrier
395 DNA/PEG method. Nat Protoc 2 (1):31-34. doi:10.1038/nprot.2007.13
- 396 21. Güldener U, Heck S, Fielder T, Beinhauer J, Hegemann JH (1996) A new efficient gene
397 disruption cassette for repeated use in budding yeast. Nucleic Acids Res 24 (13):2519-
398 2524. doi:10.1093/nar/24.13.2519
- 399 22. Haber JE (1998) Mating-type gene switching in *Saccharomyces cerevisiae*. Annu Rev Genet
400 32:561-599. doi:10.1146/annurev.genet.32.1.561
- 401 23. Hashimoto S, Ogura M, Aritomi K, Hoshida H, Nishizawa Y, Akada R (2005) Isolation of
402 auxotrophic mutants of diploid industrial yeast strains after UV mutagenesis. Appl
403 Environ Microbiol 71 (1):312-319. doi:10.1128/AEM.71.1.312-319.2005
- 404 24. Herskowitz I (1988) Life cycle of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Microbiol Rev
405 52 (4):536-553
- 406 25. Hiraoka M, Watanabe K, Umezu K, Maki H (2000) Spontaneous loss of heterozygosity in
407 diploid *Saccharomyces cerevisiae* cells. Genetics 156 (4):1531-1548
- 408 26. Huxley C, Green ED, Dunham I (1990) Rapid assessment of *S. cerevisiae* mating type by PCR.
409 Trends Genet 6 (8):236. doi:10.1016/0168-9525(90)90190-H
- 410 27. Jacques N, Sacerdot C, Derkaoui M, Dujon B, Ozier-Kalogeropoulos O, Casaregola S (2010)
411 Population polymorphism of nuclear mitochondrial DNA insertions reveals widespread
412 diploidy associated with loss of heterozygosity in *Debaryomyces hansenii*. Eukaryot Cell
413 9 (3):449-459. doi:10.1128/EC.00263-09
- 414 28. Katz Ezov T, Chang SL, Frenkel Z, Segre AV, Bahalul M, Murray AW, Leu JY, Korol A, Kashi Y
415 (2010) Heterothallism in *Saccharomyces cerevisiae* isolates from nature: effect of *HO*
416 locus on the mode of reproduction. Mol Ecol 19 (1):121-131. doi:10.1111/j.1365-
417 294X.2009.04436.x
- 418 29. Klinner U, Schafer B (2004) Genetic aspects of targeted insertion mutagenesis in yeasts.
419 FEMS Microbiol Rev 28 (2):201-223. doi:10.1016/j.femsre.2003.10.002

- 420 30. Kumar R, Singh S, Singh OV (2008) Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical
421 and molecular perspectives. *J Ind Microbiol Biotechnol* 35 (5):377-391.
422 doi:10.1007/s10295-008-0327-8
- 423 31. Lucena BT, Silva-Filho EA, Coimbra MR, Morais JO, Simoes DA, Morais MA, Jr. (2007)
424 Chromosome instability in industrial strains of *Saccharomyces cerevisiae* batch
425 cultivated under laboratory conditions. *Genet Mol Res* 6 (4):1072-1084
- 426 32. Reynolds AE, Murray AW, Szostak JW (1987) Roles of the 2 microns gene products in stable
427 maintenance of the 2 microns plasmid of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 7
428 (10):3566-3573. doi:10.1128/MCB.7.10.3566
- 429 33. Sambrook J, Russell DW (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd edn. Cold
430 Spring Harbor Laboratory Press, New York
- 431 34. Sauer B (1987) Functional expression of the *cre-lox* site-specific recombination system in
432 the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 7 (6):2087-2096.
433 doi:10.1128/MCB.7.6.2087
- 434 35. Sherman F, Fink G, Hicks J (1996) *Methods in Yeast Genetics*. Cold Spring Harbor
435 Laboratory Press, New York
- 436 36. Tamai Y, Tanaka K, Kaneko Y, Harashima S (2001) *HO* gene polymorphism in *Saccharomyces*
437 industrial yeasts and application of novel *HO* genes to convert homothallism to
438 heterothallism in combination with the mating-type detection cassette. *Appl Microbiol*
439 *Biotechnol* 55 (3):333-340. doi:10.1007/s002530000490
- 440 37. Ugolini S, Tosato V, Bruschi CV (2002) Selective fitness of four episomal shuttle-vectors
441 carrying *HIS3*, *LEU2*, *TRP1*, and *URA3* selectable markers in *Saccharomyces cerevisiae*.
442 *Plasmid* 47 (2):94-107. doi:10.1006/plas.2001.1557
- 443 38. Wach A (1996) PCR-synthesis of marker cassettes with long flanking homology regions for
444 gene disruptions in *S. cerevisiae*. *Yeast* 12 (3):259-265. doi:10.1002/(SICI)1097-
445 0061(19960315)12:3<259::AID-YEA901>3.0.CO;2-C
- 446 39. Wheals AE, Basso LC, Alves DM, Amorim HV (1999) Fuel ethanol after 25 years. *Trends*
447 *Biotechnol* 17 (12):482-487. doi:10.1016/S0167-7799(99)01384-0

448
449
450

451 **FIGURE LEGENDS**

452 **Figure 1** Construction scheme for the *URA3*-disruption cassette. Briefly, upstream (UP) and downstream (DW)
453 regions of *URA3* gene were amplified by PCR. The short arrows represent primer annealing position. The
454 resulted fragments were ligated prior to a 2nd round of PCR. After purification this fragment was cloned,
455 resulting in plasmid pVURA3. The resistance marker cassette obtained from pGKL and PGZL by *Bam*HI
456 digestion were cloned into *Bam*HI-digested pVURA3 resulting in plasmids pURAZL and pURAKL. The
457 disruption cassettes URAZL and URAKL were obtained by digestion with *Pvu*II

458

459 **Figure 2** Ploidy determination (a) Photomicrographs of yeasts ascospores indicated by arrows. Cells were
460 grown on SPO medium then visualized with a 100X 1.3 objective using DIC. RE1006 (haploid), CEN.PK2
461 (diploid), PE-2 (diploid), JP1. (b) DNA content comparison of JP1 with standard (RE1006, CEN.PK2 and PE-2).

462 Fluorescence histogram of followed *S. cerevisiae* strains stained with PI. White peak, JP1; gray peak, reference
463 strains

464

465 **Figure 3** Life cycle analysis. Electrophoresis of PCR products for the *MAT locus* analyzed from 4 different
466 segregants (spores) derived from 3 representative *asci* (**a-c**). JP1, parental strain control; M, 2 log DNA ladder
467 (New England Biolabs); c-, negative control without template DNA

468

469 **Figure 4** Disruption of *URA3*. (**a**) Schematic representation of amplicon sizes in different strains: JP1, wild-type;
470 JP1 Δ ZL, strain disrupted with zeocin resistance cassette; JP1 Δ KL, strain disrupted with G418 resistance cassette,
471 and JPU/JPUK, strain resulted from excision of drug resistance cassettes. The arrows indicate the annealing
472 position of URAF1 and URAR1 primers (**b**) PCR analysis. Colony PCR was performed with URAF1 and
473 URAR1 primers and amplicons analyzed on 1% agarose gel. c-, PCR control; M, 2 log DNA ladder (New
474 England Biolabs). (**c**) Phenotypic analysis. Cells were grown on different media to verify Ura⁻ phenotype or drug
475 resistance in different steps of the deletion process

476

477 **Figure 5** Detection of GFP fluorescence. Reporter gene expression was visualized by confocal laser scanning
478 microscopy. Untransformed JPU viewed under light (**a**) or fluorescent microscopy (**b**); JPU cells transformed
479 with pGFP-C-FUS viewed under light (**c**) or fluorescent microscopy (**d**)

480

Figure 1
[Click here to download high resolution image](#)

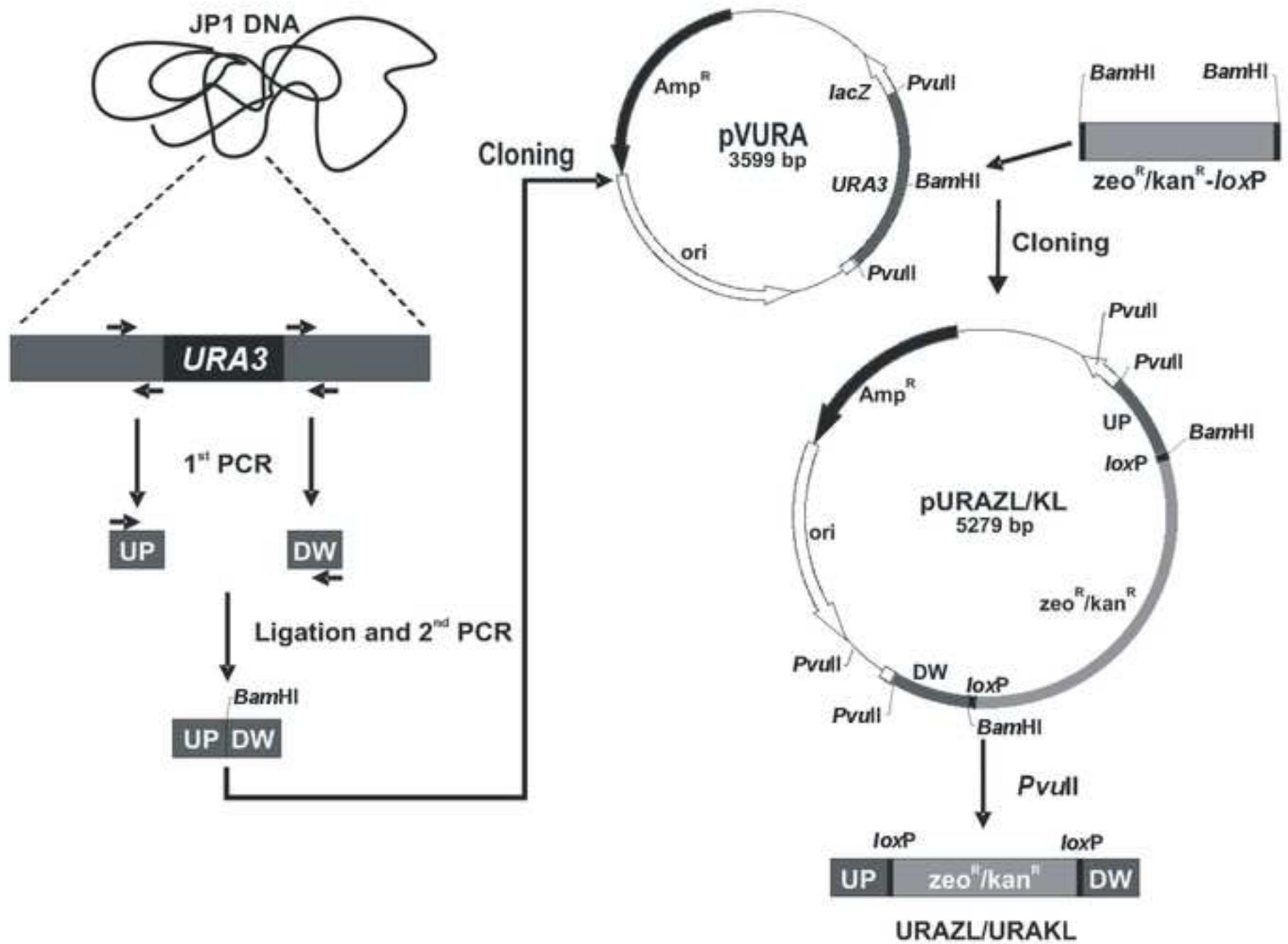
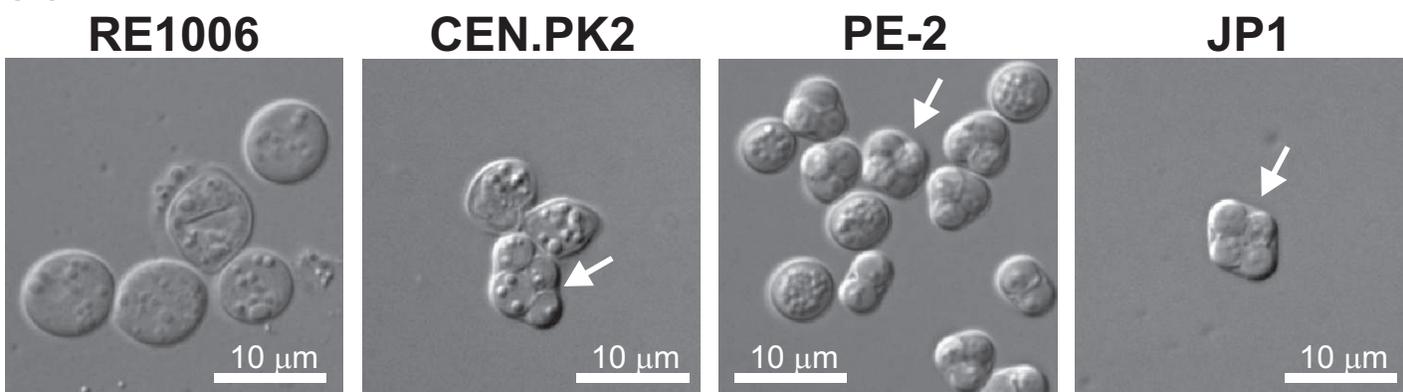


Figure 2

(a)



(b)

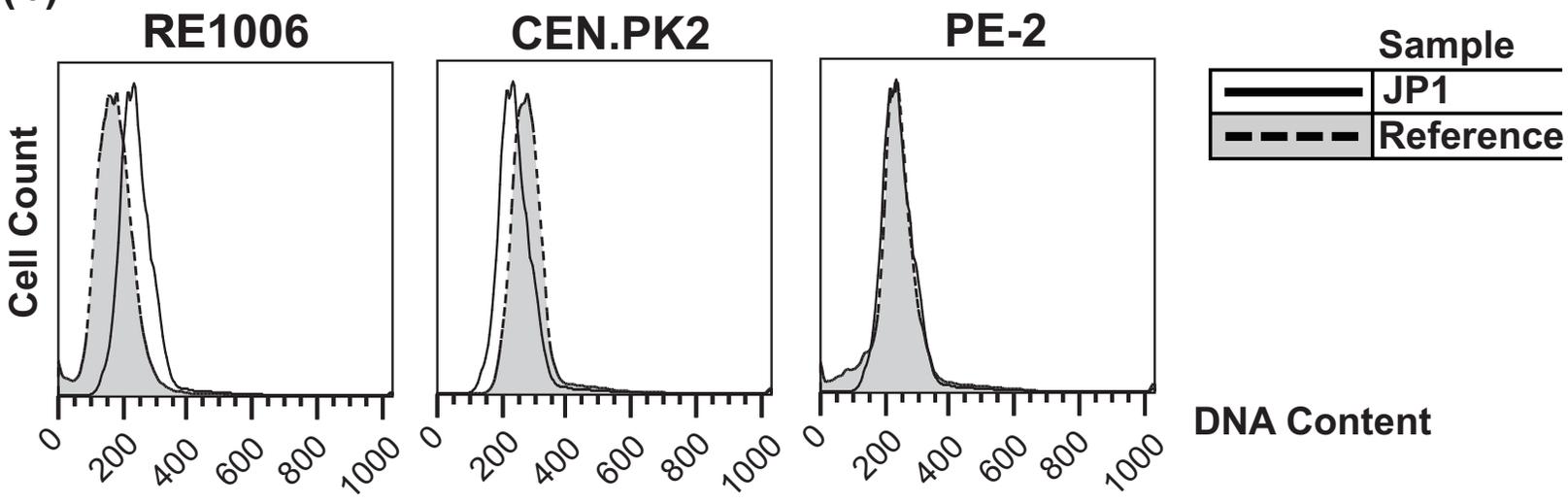


Figure 3

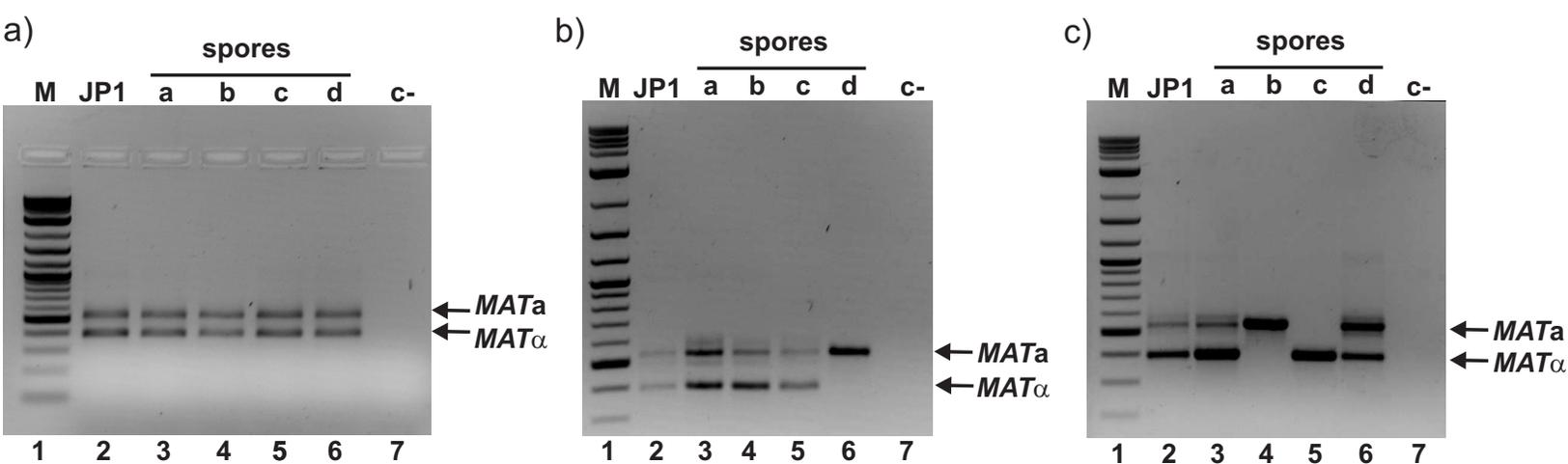


Figure 4

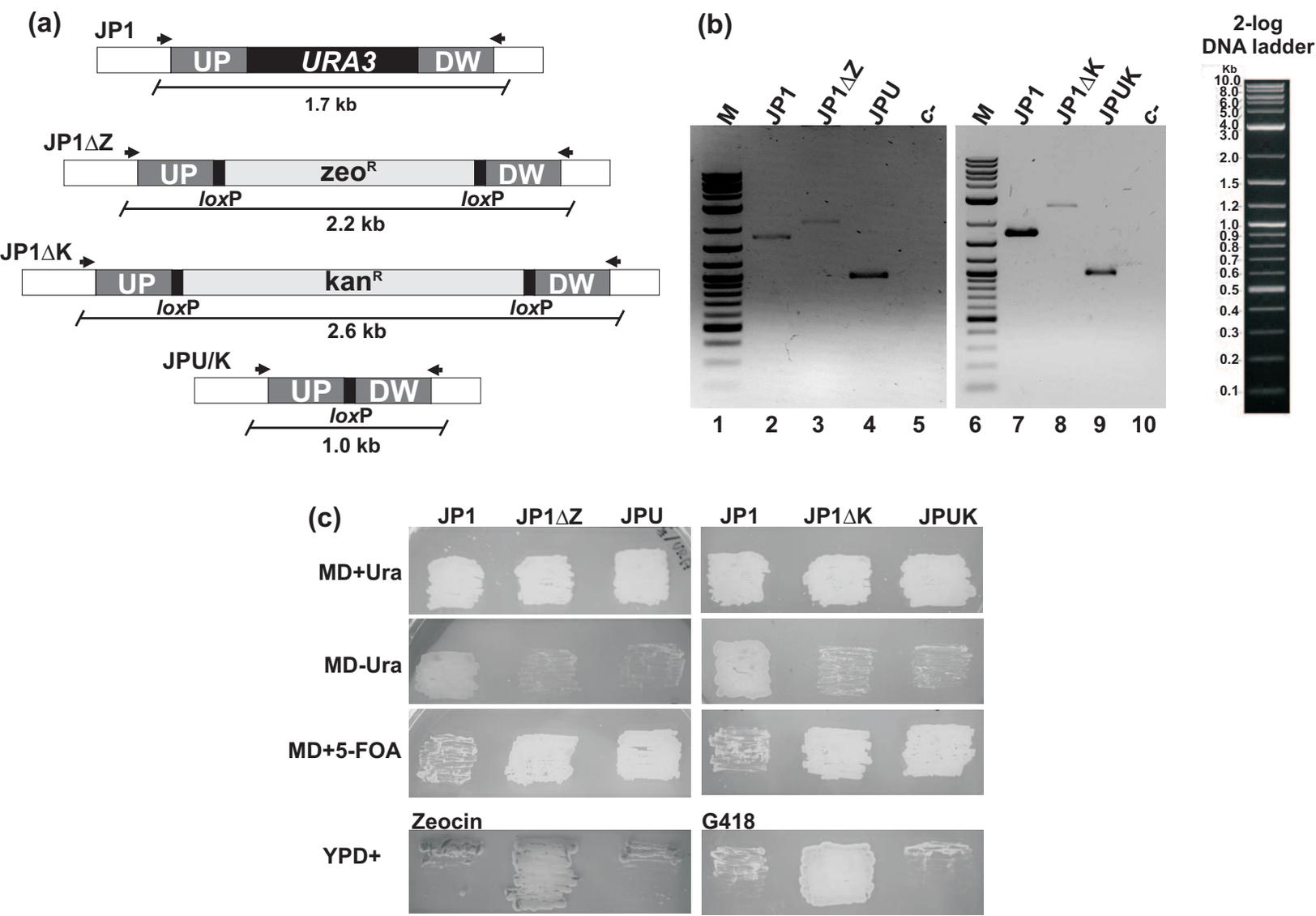


Figure 5

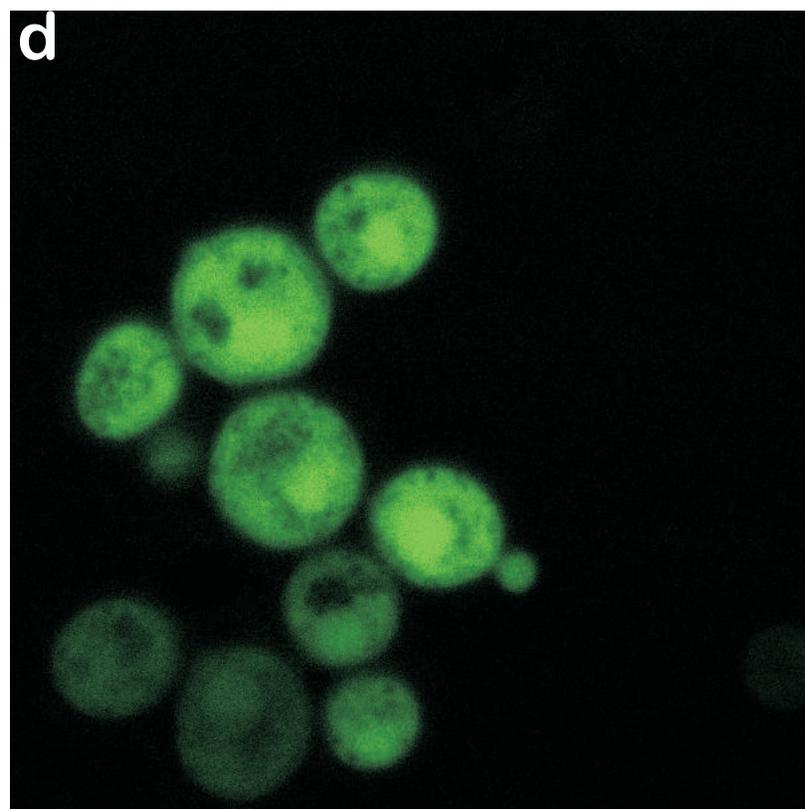
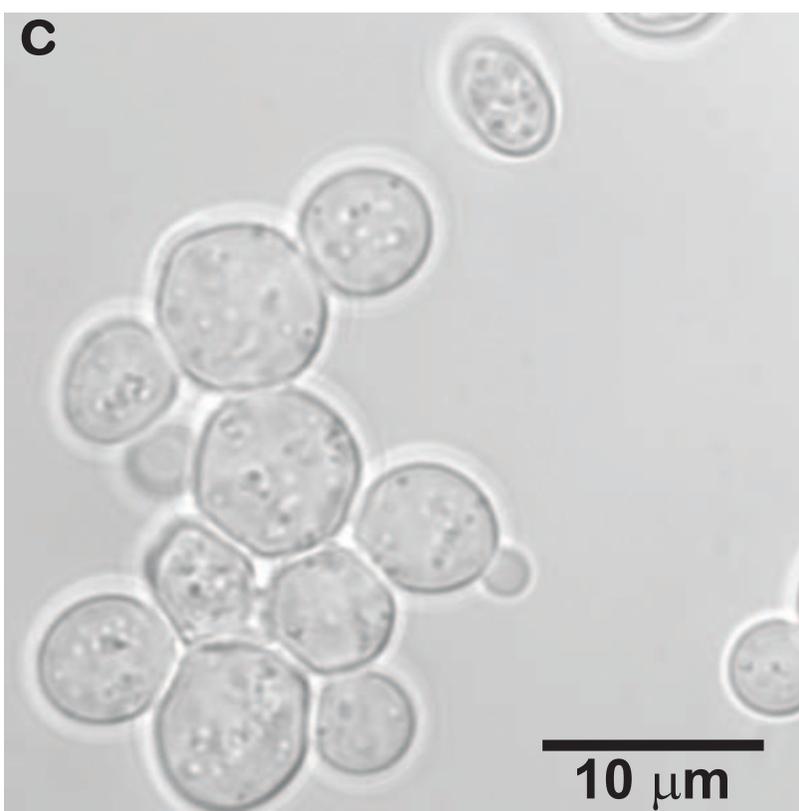
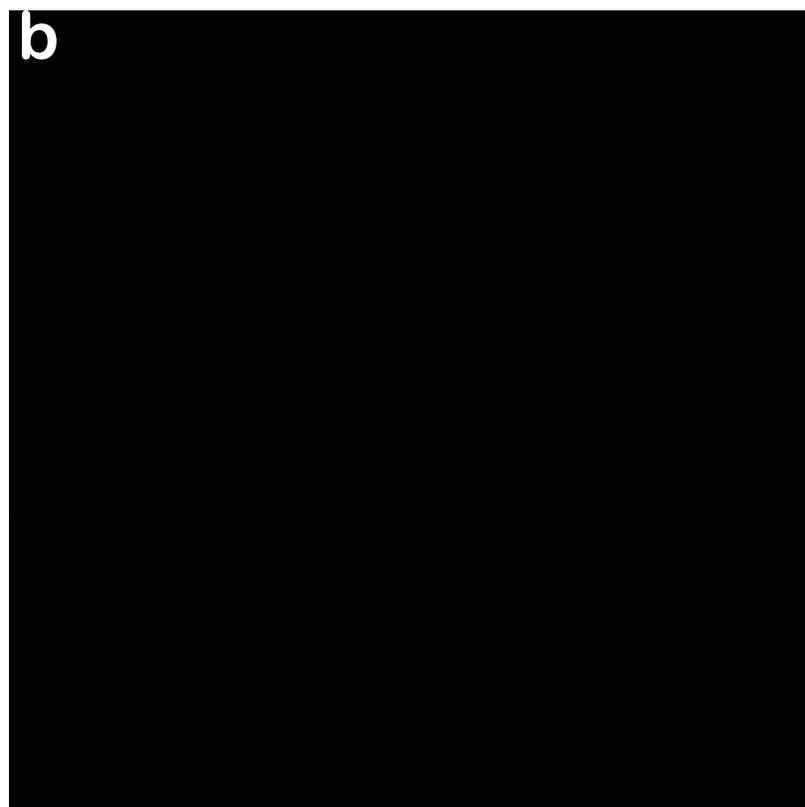
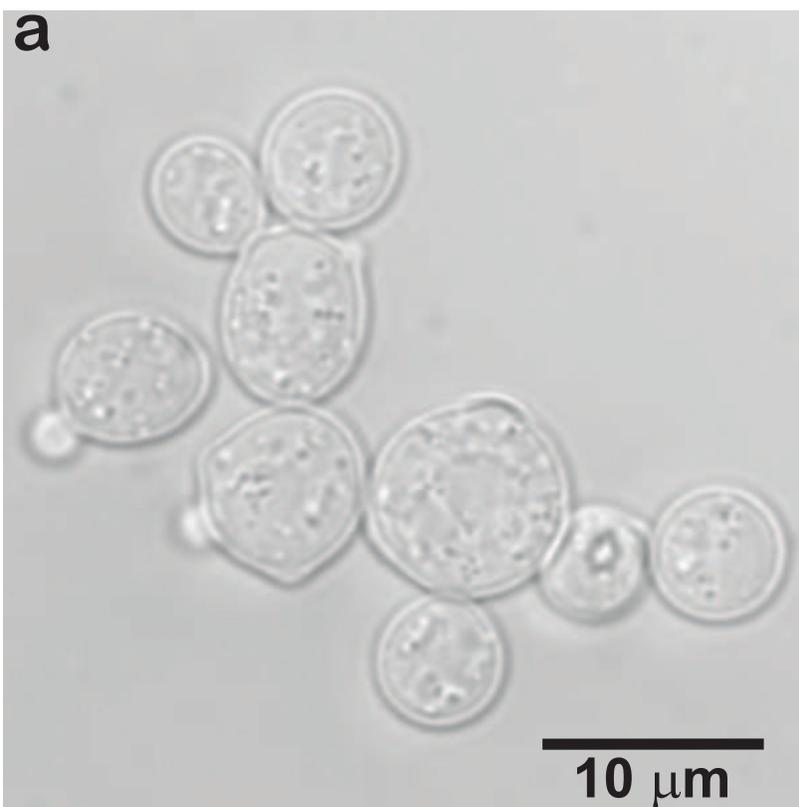


Table 1 Yeast strains and plasmids used in this work

Strain	Relevant genotype	Source or reference
JP1	Industrial strain	[14]
PE-2	Industrial strain	[5]
RE1006	<i>MATa can1-100his3-11,15leu2-3,112trp1-1ura3-52</i>	R. Strich
CEN.PK2	<i>MATa/α ura3-52/ura3-52 leu2-3,112/leu2-3,112 trp1-289/trp1-289 his3-Δ1/his3-Δ1)</i>	[43]
YEL106	<i>MATa ade2 his3 trp1 ura3 can1 sst1::LEU2</i>	[32]
S288c	<i>MATα SUC2 mal gal2 mel flo1 flo8-1 hap1 ho bio1 bio6</i>	[34]
JP1ΔZ	<i>MATa/α ura3::zeo^R-loxP</i>	This work
JP1ΔK	<i>MATa/α ura3::kan^R-loxP</i>	This work
JPU	<i>MATa/α ura3Δ</i>	This work
JPUK	<i>MATa/α ura3Δ</i>	This work
Plasmid	Relevant Phenotypes	
pEA2	<i>ARO4-ORF, URA3</i> and 2μ	[12]
pYC230	kan/G418 ^R and 2μ	[36]
pYC240	hgm ^R and 2μ	[24]
pYC280	zeo ^R and 2μ	This work
pYC040	hgm ^R	[24]
pYC440	ARS1 and hgm ^R	This work
pSH47	CreA recombinase	[22]
pJPA113	ARS1 replication origin	[17]
pGFP-C-FUS	<i>gfp</i> reporter gene	[35]
pVURA	<i>URA3</i> upstream and downstream regions	This work
pURAKL	<i>URA3</i> -disruption cassette kan ^R -loxP	This work
pURAZL	<i>URA3</i> -disruption cassette zeo ^R -loxP	This work
pRCre	CreA recombinase and hgm ^R	This work

kan^R – kanamycin resistance; G418^R – G418 resistance; zeo^R – zeocin resistance; hgm^R – hygromycin B resistance.

Table 2 Primers used in this work

Primer	Sequence 5'→3'	RS*	Reference
MAT-Fa	actccactcaagtaagagttg		[27]
MAT-Fa	gcacggaatatgggactactcg		[27]
MAT-R	agtcacatcaagatcgttatgg		[27]
FLPIN5	ccaattcctcttctagctac		
FLPIN3	ggattagtctcatccttcaatg		
G418F	tcggttccctccttctgaa		
G418R	ggatgagagctttgttaggtg		
hph1	<u>agatctat</u> gcctgaactaccgcgac	<i>Bgl</i> III	
hph3	<u>agatctctat</u> tcttgcctcggacg	<i>Bgl</i> III	
ZeoBlaF2	<u>aggcgcgccc</u> cacacacatagctcaaa	<i>Asc</i> I	
ZeoBlaR2	aggcgcgccagcttgcataaataagccttc	<i>Asc</i> I	
Kan-F1	<u>gccatgg</u> ccatattcaacggaaacgtctgcttagccgcgattaaattcca	<i>Nco</i> I	
Kan-R1	<u>gaggcctggg</u> accctgggcccgcgtcggacgttagaaaaactcatcgagca	<i>Stu</i> I	
URA3UP-F	<u>ccagctg</u> ctaagagatagtgatgatattc	<i>Pvu</i> II	
URA3UP-R	<u>tggatccg</u> atttatcttctgttctgcaggtt	<i>Bam</i> HI	
URA3DW-F	<u>tgaattc</u> actgtattataagtaaatgcatgtatac	<i>Eco</i> RI	
URA3DW-R	<u>ccagctg</u> catcttctaccagattagagtaca	<i>Pvu</i> II	
URA3-F1	caacggtcatcatctcatgga		
URA3-R1	cgctgccctacacgttgcct		
5PP-Lox	<u>aggatccataacttcgtataatgtatgctatacgaagttat</u> cccacacacatagc ttcaaaa	<i>Bam</i> HI	
ZeoBlaR3	<u>cggatccataacttcgtatagcatatacgaagttat</u> agatctagcttgc ataaagccttcgag	<i>Bam</i> HI	

* RS: restriction site. Only relevant restriction sites are indicated by the underline. Sequences in bold indicate *loxP* sites.

Table 3 Spore viability.

Viable spores per asci	Absolute value	Relative value (%)
4	22	64.7
3	5	14.7
2	6	17.7
1	0	0.0
0	1	2.9
Total	34	100

Table 4 Transformation of JP1 with different plasmids.

Plasmid	Resistance	Number of colonies	Number of colonies (negative control)	Transformation efficiency*
pYC240	hygromycin B	566	0	6.06×10^2
pYC230	G418	1460	0	2.67×10^3
pYC280	zeocin	357	1	3.57×10^2
pEA2	PFV	1228	243	6.4×10^3

*Transformation efficiency is measured as the number of colonies/ μ g DNA

Supplementary Material S1

[Click here to download Supplementary Material: supplementary material.doc](#)

Supplementary Material S2

[Click here to download Supplementary Material: Supplementary material S2.docx](#)

<i>SUT2</i>	GTCGGTTCGCTGGTATGTTTCGTTTGTTCATCATTTACTCCGTTATTGGTACAACCTCAT	1185
<i>SUT3</i>	GTCGGTTCGCTGGTATGTTTCGTTTGTTCATCATTTACTCCGTTATTGGTACAACCTCAT	1185
<i>SUT4</i>	GTCGGTTCGCTGGTATGTTTCGTTTGTTCATCATTTACTCTGTCATTGGTACAACCTCAT	1185
<i>SUT1</i>	GTGGTTCGCTGGTATGTTTGTTCATCATTTACTCTACCATTGGAAAGTTCCAC	1191
	** ***** **	
<i>SUT2</i>	TTGTTTCATTGATGGAGTAGTA-GATAACGACAACACCCGTCACCTGCTGGTAATGCTAT	1244
<i>SUT3</i>	TTGTTTCATTGATGGAGTAGTA-GATAACGACAACACCCGTCACCTGCTGGTAATGCTAT	1244
<i>SUT4</i>	TTGTTTCATTGATGGAGTAGTA-GATAACGACAACACCCGTCACCTGCTGGTAATGCTAT	1244
<i>SUT1</i>	TTGTACAAGGATGGTG-AATACAACGACAACACCTATAAACCATCCGGTAACGCTTT	1250
	***** **	
<i>SUT2</i>	GATCTTTATCACTTGTGGTTTGTTCATCTTCTTCTTTCCTGTACATGGGCTGGAGGTGTTTT	1304
<i>SUT3</i>	GATCTTTATCACTTGTGGTTTGTTCATCTTCTTCTTTCCTGTACATGGGCTGGAGGTGTTTT	1304
<i>SUT4</i>	GATCTTTATCACTTGTGGTTTGTTCATCTTCTTCTTTCCTGTACTGGGCTGGAGGTGTTTT	1304
<i>SUT1</i>	GATCTTCATTACTGTTTGTTCATCTTCTTCTTTCCTCCACTGGGCTGGTGTCTA	1310
	***** **	
<i>SUT2</i>	TACCATCATTCCGAATCATATCCATTGAGAATCAGATCCAAGGCAATGCTATTGCTAC	1364
<i>SUT3</i>	TACCATCATTCCGAATCATATCCATTGAGAATCAGATCCAAGGCAATGCTATTGCTAC	1364
<i>SUT4</i>	TACAATCATTCCGAATCATATCCATTGAGAATCAGATCCAAGGCTATGCTATTGCCAC	1364
<i>SUT1</i>	CACCATCATCTCTGAAAGTTACCATTGAGAATCAGATCCAAGGCTATGGCCATTGCCAC	1370
	* * * * *	
<i>SUT2</i>	TGCTGCTAACTGGATGTGGGGCTTCTTGATTTCCTTCTGCACCTCCATTTCATTGTTAATGC	1424
<i>SUT3</i>	TGCTGCTAACTGGATGTGGGGCTTCTTGATTTCCTTCTGCACCTCCATTTCATTGTTAATGC	1424
<i>SUT4</i>	TGCCGCTAACTGGATGTGGGGTTCCTTGATTTCATTCTGCACCTCCATTTCATTGTTAATGC	1424
<i>SUT1</i>	TGCTGCTAACTGGGTTTTCGGTTTCTTGATCTCATTTTCACTCCATTTCATTGTTAGTGC	1430
	** ***** *	
<i>SUT2</i>	CATCAACTTCAAGTTCGGCTTTGTGTTTACTGGTTGTTACTCTTTTCGTTCTTCTATGT	1484
<i>SUT3</i>	CATCAACTTCAAGTTCGGCTTTGTGTTTACTGGTTGTTACTCTTTTCGTTCTTCTATGT	1484
<i>SUT4</i>	CATCAACTTCAAGTTCGGCTTTGTGTTTACTGGTTGTTGCTCTTTTCGTTCTTCTATGT	1484
<i>SUT1</i>	CATTCATTTCAAGTTCGGTTACGTTTTCAGTGGATGTTTATTTCTCTTCTTCTACGT	1490
	** * * * *	
<i>SUT2</i>	CTACTTCTTTGTGAGCGAAACCAAGGTTTGTGCTTGAAGAAGTTGATGAGTTGTACGC	1544
<i>SUT3</i>	CTACTTCTTTGTGAGCGAAACCAAGGTTTGTGCTTGAAGAAGTTGATGAGTTGTACGC	1544
<i>SUT4</i>	CTACTTCTTTGTGAGCGAAACCAAGGTTTGTGCTTGAAGAAGTTGATGAGTTGTACGC	1544
<i>SUT1</i>	CTACTTCTTCTGTTGTTGAAACCAAGGTTTGTGCTTGAAGACGTAGACGAATTGTACGC	1550
	***** **	
<i>SUT2</i>	TGAAGGTATTGCACCATGGAAGTCTGGTGCATGGGTTCCCTCTCTGCC-CAACAACAAA	1603
<i>SUT3</i>	TGAAGGTATTGCACCATGGAAGTCTGGTGCATGGGTTCCCTCTCTGCC-CAACAACAAA	1603
<i>SUT4</i>	TGAGGGAATTGCACCATGGAATCCGGTGCATGGGTTCCCTCTCTGCA-CAACAACAAA	1603
<i>SUT1</i>	TTCCAACGTGGTTCCATGGAATCCAGCAAGTGGGTTCCACCATCGACTGCTGCCATGGC	1610
	* * * * *	
<i>SUT2</i>	TGCAAACTCCACTTATGGTGCCGAAGCAAAA---GAGCAAGAGCAAGTTTAG-----	1653
<i>SUT3</i>	TGCAAACTCCACTTATGGTGCCGAAGCAAAA---GAGCAAGAGCAAGTTTAG-----	1653
<i>SUT4</i>	TGCAAACTCTACTTATGGTGCCGAAGCAAAA---GAGCAAGAGCAAGTTTAGCTTTATG	1660
<i>SUT1</i>	TACCGAAG-CTGGTTACGCTGCTGATGAAAAGCCTGTTGACGAACATGTTTAA-----	1662
	* * * * *	
<i>SUT2</i>	-----	
<i>SUT3</i>	-----	
<i>SUT4</i>	GTTAATGCTTTATCCCAATGATTTTTGAATTTTAAATATAGACTATAGATTACAAA	1720
<i>SUT1</i>	-----	
<i>SUT2</i>	-----	
<i>SUT3</i>	-----	
<i>SUT4</i>	AGGCAATGCCTTTTAAATGAACCTTAAATGAACGATTATGAT	1761
<i>SUT1</i>	-----	

Suplemento 4: Alinhamento dos cDNA referente aos genes *XUT* de *P. stipitis*

Foi realizado um alinhamento múltiplo dos transportadores putativos de xilose (*XUT*) e 2 SUT de *P. stipitis* usando CLUSTALW2. Foi gerado o arquivo [clustalw2-l20110616-235218-0097-84983882-oy.dnd]. Abaixo estão listados o tamanho das sequências, o *score* do alinhamento, bem como o alinhamento propriamente dito. As bases em comum estão realçadas. Região de anelamento dos primers em vermelho e negrito primers sobrepostos.

Sequência 1: XUT1	1701 bp	Sequências (1:2) alinhadas. Score: 60
Sequência 2: XUT2	1404 bp	Sequências (1:3) alinhadas. Score: 60
Sequência 3: XUT3	1656 bp	Sequências (1:4) alinhadas. Score: 54
Sequência 4: XUT4	1587 bp	Sequências (1:5) alinhadas. Score: 56
Sequência 5: XUT5	1488 bp	Sequências (1:6) alinhadas. Score: 59
Sequência 6: XUT6	1635 bp	Sequências (1:7) alinhadas. Score: 62
Sequência 7: XUT7	1251 bp	Sequências (1:8) alinhadas. Score: 59
Sequência 8: SUT1	1662 bp	Sequências (1:9) alinhadas. Score: 60
Sequência 9: SUT2	1653 bp	Sequências (2:3) alinhadas. Score: 60
		Sequências (2:4) alinhadas. Score: 53
		Sequências (2:5) alinhadas. Score: 56
		Sequências (2:6) alinhadas. Score: 61
		Sequências (2:7) alinhadas. Score: 53
		Sequências (2:8) alinhadas. Score: 61
		Sequências (2:9) alinhadas. Score: 57
		Sequências (3:4) alinhadas. Score: 52
		Sequências (3:5) alinhadas. Score: 60
		Sequências (3:6) alinhadas. Score: 54
		Sequências (3:7) alinhadas. Score: 59
		Sequências (3:8) alinhadas. Score: 58
		Sequências (3:9) alinhadas. Score: 56
		Sequências (4:5) alinhadas. Score: 53
		Sequências (4:6) alinhadas. Score: 55
		Sequências (4:7) alinhadas. Score: 62
		Sequências (4:8) alinhadas. Score: 51
		Sequências (4:9) alinhadas. Score: 52
		Sequências (5:6) alinhadas. Score: 57
		Sequências (5:7) alinhadas. Score: 56
		Sequências (5:8) alinhadas. Score: 57
		Sequências (5:9) alinhadas. Score: 57
		Sequências (6:7) alinhadas. Score: 59
		Sequências (6:8) alinhadas. Score: 58
		Sequências (6:9) alinhadas. Score: 56
		Sequências (7:8) alinhadas. Score: 57
		Sequências (7:9) alinhadas. Score: 58
		Sequências (8:9) alinhadas. Score: 77
		Sequências (6:7) alinhadas. Score: 59

<i>SUT1</i>	ATGTCITCTCAAGATATTCCTTCAGGTGTTCAAAACCTTCAA-ATG---CTTCCTTTTT	56
<i>SUT2</i>	ATGTCCTCACAAGATTACCCTCGGTGCTCAAACCCAATCG-ATGGTTCTTCCATCCT	59
<i>XUT2</i>	ATG-----AAGTATT-----TTCAA-AT-----C---	18
<i>XUT6</i>	ATGTCC---AGTGTGAAAAAAGTGCCTGAAACTGCTTCCT-ATA-----CGT---	43
<i>XUT3</i>	ATG-----AGAGAACTTGGTATTCT--TGATGTT--GCCC-----	31
<i>XUT5</i>	ATG-----ACGGAAGAAGCATTG--GACCTTTA-ATCC-----	31
<i>XUT1</i>	ATG-----CACGGTGGTGGTGA--CGGTAAACGATATCA-----	31
<i>XUT4</i>	-----ATGCTT-----	7
<i>XUT7</i>	-----ACTTT-----	5
	*	
<i>SUT1</i>	AGAAAAGGATGAAGATAAGATTGAA-GAAGTAC---CCCAA--ACCATGATGCAACCT-	109
<i>SUT2</i>	-----CGAAGATAAGTTGAGCAAAGTTGCTCTCAAATAGCCAAAGTG-ATT-T-	107
<i>XUT2</i>	-----TGGAAATCAG-GCAAACA-A-----GTAA-----GTACCC-	47
<i>XUT6</i>	-----CCAGGTGAGCCGAAGCG--GCTC--TGCAA-GACCAACA-GCTACCT-	86
<i>XUT3</i>	-----ATGGCAACGTT-GTAACTATAATG--ATGAAAGATCCAGTAGTATTTT-	76
<i>XUT5</i>	-----CCAGAAATAA--GCACCTATTCT--ATC--GATCC--GTATTAT-	67
<i>XUT1</i>	-----CAGAAATTATTGCAGCCAGACGTC--TCCAGATCCTGGTAAAGTCTGGT-	79
<i>XUT4</i>	-----CGTTATTGAC-----	17
<i>XUT7</i>	-----TCCAGTTAAC-----	15
<i>SUT1</i>	TGGTAGCCTTGGAGTCCAAAGGGTATTTCTGAATATCTTTTGATTTGTTTCTTCTGTTGT	169
<i>SUT2</i>	AGCTTCCATTCCAG-CAACAGGTATCAAAGCCTATCTCTTGGTTTGTCTTCTGCAATGT	166
<i>XUT2</i>	TG-----CTTAAATTCTTGT-----TTAATTCACTTGT	63
<i>XUT6</i>	TGG---CCTCAGAGGCCACAAA-----CTTAATT--TTGCTGCTCTTGT	126
<i>XUT3</i>	TGG-----TGAT--TTATTTCG	92
<i>XUT5</i>	TGA-----TGAATATTGTT--C	82
<i>XUT1</i>	TGGCTGTTTAGTCGCAAA-----CTCAAGATCTTCTTCTCATCGCATC	123
<i>XUT4</i>	-----TAAAGAACTT-C	30
<i>XUT7</i>	-----TTGATGTTTGC	29
	*	
<i>SUT1</i>	TA-GTTGCTTTTGGTGGTTTGTCTTTGGTTCGACACTGGTACATTTCGTGATTTGT	228
<i>SUT2</i>	TG-GTTGCCTTTGGTGGATTCTATTCCGGTTCGATACCGGTACAATTTCGGTTTCCT	225
<i>XUT2</i>	GA-ATTGGCATTATT-----CTTTTGGTATTGAACAGGGTATTATTGGTAATCTTATT	117
<i>XUT6</i>	TTTGCCTGGTGTGGTTTCTTACTTTTCCGGTACGATCAAGGTGTATGGGT---TCATT	182
<i>XUT3</i>	AT-----CCCTTGGAGTTTGTCTTTTGGTATTGATCAAGGGTATTAGTGGCATTGTC	147
<i>XUT5</i>	AC-----CC-----AACTA--TCATGGGATACGATTCATATGTTGGTAGTATT	129
<i>XUT1</i>	TTTGATCTCTTGGTGGATTGGTCTACGGTTACAATCAAGGTATTTCCGGTCAATTCC	183
<i>XUT4</i>	AA-----AGACTACTACCAACCCGACTC-----CTGTTGAAGT--GGGT	69
<i>XUT7</i>	AG-----TTGGTAGAGTCTTTCTGGGTGGG-----TGTAGGAGTCTATCG	72
	*	
<i>SUT1</i>	AACATGTCGACTTCTGAAAGG---TTT---GGTCAAACAGAGCTGACGGCACTC-A	281
<i>SUT2</i>	AATATGCTGATTTCCTTCCAGA---TTT---GGTCAAAGATGGTTCGAAGGAA---A	275
<i>XUT2</i>	AA-AAACAGGACTTCCT---AAACACTTTT---GG---A---AACCCACCGGTA---G-	161
<i>XUT6</i>	CTTGACCTTGCCCTCCTTCGAAACACTTCCCGGCCATG--AAGGCTAGCAACAA-CG-	238
<i>XUT3</i>	ACAATGGAAT-CTTTGGTGCAAAAT-TCC---CCAGA--ATTTTATGGATGCCGA	197
<i>XUT5</i>	AATCTAGATGC-AT--ATGTAATTTATT---CCA-----CTTAACCGCTGCT-A	172
<i>XUT1</i>	GGTATGACT-CATCTCCA-AAAGCTATTGGT--GTTGAA--AAGATTCAAGCAATC--	235
<i>XUT4</i>	ACTATGA-TGCTATC-----TTAGAGATC	93
<i>XUT7</i>	ACTATGG-TGCCGTC-----CTATCAA	94
	*	
<i>SUT1</i>	CTACTTGCCAAATGTCAGAGTTGGTTGCT-TGTGCTATC-TTCAATATTGGCTGTGCT	339
<i>SUT2</i>	ATAATTGCTGATATCAGAGTCGGTTGAT-TGTTTCCAATT-TTAAACATTGGTTGTGCA	333
<i>XUT2</i>	TTATTT---A-----GGTATTAT-GTTCCTATC-TATACCTTAGGTTGTTT	204
<i>XUT6</i>	CTACCTTACAA-----GGGCCCT-TATTGCACTT-TATGAATCGGTTGTATG	285
<i>XUT3</i>	TTACAA-----GGTTGTTTGTGCTACTTTTTTGTCTATGCGCATGGT	241
<i>XUT5</i>	CCACTG-----GACTCAATAC-TG-CTGCACTATGGCT-TGGGCAAGTA	213
<i>XUT1</i>	CTACTTTGCAA-----GGTTTGT-TACTTCTATTCTTGAACCTGGTCCCTG-G	282
<i>XUT4</i>	-----GGCGCACTTTTTCTCCTTCACTAGCTGGAAG---A	126
<i>XUT7</i>	-----GCGAAATTAGTCCAGC---GAAGAAAGAGGCA---A	125
	* * *	
<i>SUT1</i>	ATTGGTGGTATTTCCTTG--TCCAAGATTGG--TGACGTCTACGGTAGAAGATCGGTAT	395
<i>SUT2</i>	ATTGGTGGTATTTCCTT--TCTAAGATAGG--AGATGTTTACGGTAGAAGAAATGGTAT	389
<i>XUT2</i>	TTTGGTTGTCTTATGAAC--TTCTTCATTGG--TGATCGAATGGGAGAGAAGCAAAT	260
<i>XUT6</i>	TCTTTTCTT-TAGCAACC--ATTTACCTTGG--TGAAGATTGGGTAGATTGAAGATGAT	341
<i>XUT3</i>	TTGGCT-CTATTATTAAT-ACTCCA-ATTGT--TGATAGGTTTGGAAAGCGTATTCTAT	296
<i>XUT5</i>	ATTGC-ACATTGACAGTTATTCTGTATTCAATGACAAATTTGGTAGAAGAACTCAGT	272
<i>XUT1</i>	GTGGTGTCTTATGAAC--GGTTACATTGC--TGATAGATTGGGTCGTAAAGACTCAGT	338
<i>XUT4</i>	CTAGGTACATCTTTCG-----CAGAAAGAAACACAT	158
<i>XUT7</i>	GTGGTG-TGTGAGAGT-----TACGGGAAATATCAC	158
	*	

SUT1 T---ATGGCTTCCATG-GTTATC-TACGTTGTTGGTATCATCGTCCAAATGCTTCCCAA 450
 SUT2 **C**---**ATTTCAGCTATG-GTTCTC-TACGTC**GTGGTATTATCAICCAAGATCTCGTCCCAA 444
 XUT2 T---GCTTCCTCAATG-ACAGTT-ATCACAATTGGTGTGCTCTCAATGTAGTTCCTT- 314
 XUT6 ---GTTTATTGGCTGTGTAATT-GTCTGTATTGGTGTGCTTTCAAGCTTCTGCTTT- 395
 XUT3 C---ACAACTCTCT-TGTGTTATT-TTGTCAATTGGTTCTGGTTCCAAATGTGCTGGCAATT 351
 XUT5 TTGTATAAG-TAT-TGCATCAG-TTTG--GTTGGGTTGCATTCAATCAGCAGCCCAA 327
 XUT1 T----GTTGTCGGTGTTTTCTTCTTCATCGGTGCATTGTACAAGCTGTTGCTCGT 393
 XUT4 **T**---**AGATACGGGTCTTTCATT**-TTTGTAGTAGGGCTCTTGTACAAGCTACTTCGGTC 213
 XUT7 T---GGTTATG---CTCTCAG---TGTA-TGGGCCGA-TTACTTCTGCTACTTTATTTC 205

* **

SUT1 CACGCTTGGTACCAAG---TTATGATTGCTCGTCCATTACTGGTTTGGCTGTGGT--- 504
 SUT2 CACAACTGGTACCAAC---TTACAATTGGACGGAGTTACAGGATTAGGTGTGGT--- 498
 XUT2 TTCAGTTGAA---CAAT---TGATGATTGGAAGATTTATCACTGGCTTGGAAATGGTTGG 369
 XUT6 CACTTTGGT---CACT---TGACTTTGGTGTAGAATTATCACTGGTTTAGGTACAGGTTTC 450
 XUT3 AATACAAGTA---TGT---TATTTGGTGGGCGTCTGTTGCTGGTCTTGCAGTCGGTCA- 404
 XUT5 AACATTGAGA---TGT---TTATTATCGGAAGAATAGTTATTGGTTTGGAAAT---ATCT- 378
 XUT1 **G**CTGCTAACTACGACTACATCTTAGGGTGTAGATTTGCTGCTGGTATTGGTCTGGGT--- 450
 XUT4 AA---TATTGT---CAATCTCTCACTA---GGAAGATTGATTGCCGGTATTGCCATTGGC--- 264
 XUT7 AAGATATAGG--TGAT----GCAA--GGGAGAA----GCC-----TCATAGCT--- 241

* *

SUT1 ACCGTTTCIGTATGTGC-TCCATTGTTT---ATTGGTGAA---AGTTCTCCAAAGC---ACT 556
 SUT2 ACTGTTTCAGTGTGTGC-TCCAATGTTT---ATTAGTGAA---AGTCTCCAAAGC---ATT 550
 XUT2 GAACAATTC---TACTTC-TCCAATGT---ATCAGGCAG---AATTTCCACCICCAAAG 418
 XUT6 ATCACTTC---TACTGT-TCCAGTTT---ACCAATCGG---AGTCTCTCCAGCCAAAG 499
 XUT3 ATTAACCA---TGTAGT-TCCAATGTAC-ATGTCGG---AATGGCTCCCTCCATCGG 454
 XUT5 ATTGTTT---TG---TCTCATCTACCATTTTGGTAAGTGAATAGCCCTCCCA---GA 428
 XUT1 ATTTCTTCTAIGGTTGT-GCCATTGTACAATGCTGA-----AGTT-TCTCCACCAAGAA 502
 XUT4 ---TTTTGACAACCATCATCCCATGCT---ACCAGTCTG---AAATCAGCCCCAGAGCG 316
 XUT7 --TCTTTCCTCAC--TTGTCCTG-GGG---ATT-GCTC--TATTCA-TCCAGGTGCTG 288

*

SUT1 TAAGAGGTACTTTGGT-TTACTGTTTCCAATTGTCATTACTTTGGGTATCTTCATTGG- 614
 SUT2 TGAGAGGTACTTTGGT-ATACTGTTACCAATTATGTATCACCTTAGGTATTTTCATTGG- 608
 XUT2 TTAGAGGACTTTGGT-GTCTCAGAAGCATTGTTTGTGTGAGTTGGT-FTA--ATCT-- 472
 XUT6 TAAGAGGACTTTGATCATGATG-GAAGGTTCTCTTATCGCCCTTGGCATTGCCATCTC- 557
 XUT3 TGAGAGGTGGTTGGTTGTAAT-TCAAGCACTTTCGATTACAATTGGTATCATGATTTC 513
 XUT5 CAAAAGA-GGATTTATT---CTTGGATTG-AGTT--TTACAAGCTTTC- 469
 XUT1 TTCGTGTTCTTTGGTTGCTTTG-CACAATTGGCTATTACTTTGGTATTATGATTTC- 560
 XUT4 ATAGAGGTTTCTATGCC-TGTTTGGAGTTCAACCAGAAATATCATTGGATATGCTAGTAG- 374
 XUT7 ATAGCGCTGTTCTCTT-TGTTGGGGGATTTTT-----TATGTGAGT----- 331

*

*

*

SUT1 --TTACTGTG-----TCACCTACGGTACTAAA-AGAT----- 643
 SUT2 --TTACTGTG-----TCACTTATGGAACCAAA-GAAT----- 637
 XUT2 --ATGC-ATA-----TTGGTTT--GATTATGC-TCIT----- 498
 XUT6 --ATACTGGA-----TTGACTTTGGATTTAC-TTTT----- 586
 XUT3 TATTGGTTGGATTATGGCACTAATTTATTTGGAAGGTAATAG-ATGTGCTCCTAGTCAACC 572
 XUT5 --TAGTAGGAA-----GTTTAAATGCAAG---CAG-GTGT-----CAC 500
 XUT1 --TTACTGGA-----TTACCTACGGTACCAACTACAAT----- 590
 XUT4 --TATTTGG-----GTAGACTACGGGTTTTCATTTT----- 404
 XUT7 --CACCTCG-----TT-----GGTTATTAGAAT----- 353

*

*

*

SUT1 -TA-----TCCGACTCT-----AGAC--AG-- 660
 SUT2 -TA-----AATGATTCA-----AGAC--AA-- 654
 XUT2 -T-----CT-----TTCACTTCT-----GGTCTAT-- 518
 XUT6 -TGAGAAACGATGGTT-----TGCACTCCT-----CGGCTTCT- 618
 XUT3 ATACCAAGGTGAACCTTTTAAACCCTAATGTGGATGTTCTCC-----AGGTGCTGCTAT 627
 XUT5 ATA-----TGGAAC--AAG-----AAATGCTCCT-----GGAGACTGGT-- 532
 XUT1 -TG-----GTGGT-----ACTGGCTCTGGTCAAAGTAAAGCTTCT-- 624
 XUT4 -----AGAC-----AATGATTTC-----AGCT----- 421
 XUT7 -----AGAC-----CAGGAC--C-----AAC----- 367

*

SUT1 -----TG--GAGAGTCCATTAGGCTTGTGCTTCTC-TGGGCTA 697
 SUT2 -----TG--GAGACTCCCTTGGGTTTATGTTTCTT-TGGGCTA 691
 XUT2 -----TGCAAGGACTTCTCTTGGCTCTCAGATTGTG-TTCCGC- 558
 XUT6 -----TG--GAGACACCTATCGGCTTCAATGTGTCT-TTCGCTG 655
 XUT3 GGTCAAAGTGATGCCAGTTG-----GAGAATTCCTTTTGGTCTTCAGATTGCT-CCAG-CA 681
 XUT5 -----GTTG--GAGAATCCATCAATTATTCAGGGCT-CCAGATA 571
 XUT1 -----TG--GTTGGTTCCTATTGTATCCAATTGTT-CCAGCT- 660
 XUT4 -----G--GAGAGCCCATTTGATTTCCAGGTTGTTATTGGCT- 457
 XUT7 -----TAG--GTT-----GCT- 392

**

*

SUT1 TT-TTCTTGTTCTTGGT--ATGTTGCCATGCCAG--AATCTCCAAGATACTTGGTTGA 752
 SUT2 TT-TTCTTAGTTCTCGGT--ATGTTGGCTATGCCIG--AATCCCAAGATCTTAATTGA 746
 XUT2 -T-TTGTGTTTTCTGTTCACITTTGCAATACCCG--AATCCCCTAGATACATGTTTGA 614
 XUT6 TC-TTGTGATTTCAC--AGTCTTCTTCTTCCAG--AATCTCCAAGATGGTTGCTCAA 710
 XUT3 GTGTTGTTGGIATTGGA--ATGATATTTTCCAA--GATCTCCAGATGGTTACTCTC 737
 XUT5 TTGTTGCTAT-TATTAC--ATACTCTTATTTTCAG--AATCACCAGGTGGTTGATGTC 626
 XUT1 TTGCTCTTGGGTCTTGGT--ATCTTCTTATGCTG--AGTCTCCAAGATGGTTGATGA 716
 XUT4 -CCATGTTATTTATGGT--TCATTCTTATTTAG-AAAACCC--TAGATGGCT-CTTG- 510
 XUT7 **CTATG--ATTCA-----CAT-CT**AGATGATAACAAACCACGTGAAGAGTT-CTTTA 439

* * * * *

SUT1 AAAGAAGAGAAATCGA--AGATGCCA-AGAAGTCTGTCGCTAGATCCAACAAATATC-- 806
 SUT2 AAAGAAGAGAAATCGA--AGAAGCCA-AGAAGTCCCTTGCAGATCCAACAAATATC-- 800
 XUT2 CAAAGGAGAGAAAGA--AGAAGCCAAAAGAAATTTTATCTTATGTCCTT-TGGAAAGCC-- 668
 XUT6 CAAAGGTAGGACCGA--AGAAGCTAGAGAAGTTTTTCTGCTCTTTTA-CGAATTGGC-- 764
 XUT3 TAAAGGTCGCGACGA--AGAAGCT-TGGAGCTCTTT-----GAAATATCTC-- 780
 XUT5 AAAGGAAGATTCAG--CGAAGCTCGTGAATTTATTCTATCAT-TAGTGAATGTTCC-- 680
 XUT1 **CGAAGAAGACAAGA--CGAATGTTG**CCGTTCTTCCAACTT-----GCGTTCC-- 765
 XUT4 -GATCACAACCATGATATCGAAGGCAATGTTGCTATTCTGACTTGTATGCATGGTGA 569
 XUT7 TGATCAAAACTCCATCTTGTAGAAAGA--GAA**CTAC--ACC**TAAGAGCGGAACGA--A 493

* * * * *

SUT1 CCAGAAGACCCAAGTGTCTACACTGAAATCCAAT----TG-ATTCAAGCTGGTA---- 856
 SUT2 TCCAGAAGATCCAGGTGTCTACACTGAAATCCAAT----TG-ATTCAAGCTGGTA---- 850
 XUT2 AGGAGATCATCTCGACATTTCTAAG-**CAATGGAAT**-----**GATATTAATGATGTTG**---- 718
 XUT6 AGCCGACTCTGAAAGATTTCTATTTCAAATGAA-----GAAATTCAGCTGCTA---- 814
 XUT3 AGAAGAAAGAGT-CATG--AGGATCAAATCGAAA-----GAGAG-TTGCTGAAA---- 826
 XUT5 TATTGAAGATGCATG--AGA--ATCTGAAAA-----GATA-CATGCCATA---- 724
 XUT1 **TGCTAAG-CAAGATACTCTGTTCAAATGGAA**TTCCCTTGAATGAAAGCAAAAGTT 824
 XUT4 TGTGGAAGACGATGATGCTATTGCT-GAGTACAGA-----AACATAAGGA--AAGT-- 618
 XUT7 CTITGGA-ACA-----TAT-----GTTCAG-----AAC-TACATGACCCGAGT-- 530

* * * * *

SUT1 --TTGACAGAGAGGCTATTGC-----TGGATCCGCTTCTGGAC 893
 SUT2 --TTGACAGAGAGCTGCTGC-----AGGTTCTGCTTCAATGGAT 887
 XUT2 **TTATTT**TGAAACTTTCAG-----AAGGAGCTTTCCTGCTGGC 755
 XUT6 -TAGATTTAGAAAGACAAGC-----CGGAGAGGTTTCTACTTAA 854
 XUT3 -TTAA**GCAGAG--GT**-----**CGTTTATGAGACACA**AGTCAA 860
 XUT5 -TTCAAAC**TGAGAAG**CTGC-----TTTCCCTGGCAATAGGTGGAA 764
 XUT1 GTTCGAAAGAGAACTTTCTGCAAAGTACTTCCCTCACCTCCAGAGCGGTTCTCCAAAGAG 884
 XUT4 -GCT**TTGATAGC**-----CAGA-----GTTGAGGGCGGACAGAGATC 653
 XUT7 -GCT**T--ATAGC**TTGTTTCAAG-----ACTGGCGTACCAAAGGGTAC 568

* * * * *

SUT1 TGAAT--TGATTA-----CC-----GGTAAGCCTGCCATT-----TTCAGAAG 929
 SUT2 GGAAT--TGATCA-----CT-----GGTAAGCCAGCTATT-----TTCAGAAG 923
 XUT2 **AAAC--TTTCA--AGCC--GTAAGCAAGAA**CTGGA-----TACAGAGT 797
 XUT6 GGAAT--TGTTCACTCAGGGGCC-----AGCCAGAACT-----TGCAGCGT 894
 XUT3 GGAAA--AG--A-----GATTCCT--TGGTAAGCTGGAGTTGC-----TTTAAACA 900
 XUT5 **ACAAA--TGGTGA--GCTCCAA--GAGCAATCAAGAAGAGT-----TATTAT--** 806
 XUT1 **CAACT--TCTTGAT--GGTTCAA**CCAATACAAGTCCATGATTACTACTACCCAAGCT 940
 XUT4 GTAC**AGTATTG**-----TTC-----ACCA-AATA-----TACCAAGA 685
 XUT7 **AGAA**CGATATCCG-----C-C-----ACAACGATG-----TAGAAATG 600

* * * * *

SUT1 AG---TTGT--TATGGGATATCATGCACTCT-----TACAACAATTGACTGGTGTC 978
 SUT2 AG---TTAT--CATGGGAATTTACTTACAGTCTT-----TGCAACAATTAAGTGGTGTC 972
 XUT2 CT--TCTTGG--CAT--ACATGAGC--ATGTTTG-----CGCAACAGTTGATGGTGTT 843
 XUT6 GTGGCCTTGT--CAT--GT-TGGTCT--CAATAA-----TGCAACAATCACTGGTATT 942
 XUT3 -----CT**TAC--FGG-ATACTGGGATATCTTAC**-----**TAC--TAAATC-TCACTTCA** 943
 XUT5 -----CTTGT--TC--ACAC-AGCCATAGTTAC-----TG---AAATGGCCGGTTC 845
 XUT1 TCAAGCGTGT--TGCAGTTGC--TG-TT-TAATTATGACCTTCCAACAATGGACTGGTGT 996
 XUT4 GACTTCTGTGGCAT-GCTTTTCGCAAAATGTTTGC-----CCAGATGAATGGTATA 735
 XUT7 GACGATTTG---GAC-GATTTGACTGGC--TTTGC-----ACAGTTCAAGGGCATA 646

* * * * *

SUT1 AACTACTTTTTCT--ACTACGGAACTACCATTTTCCAAGC-----TGTGCGATTGAA 1028
 SUT2 AACTATTTCTTCT--ATTACGGAACTACCAATTTCCAAGC-----TGTGGTTTGGCA 1022
 XUT2 AATCTAGTTAAT--ACTATATTA-CATTGTTTTGATTAACAG--TGTGGCATCGA 896
 XUT6 AACAATTATTACGT--ACTATGCTGTACTATTTTTGAATGATA--CATTGGTAT--G 993
 XUT3 AGAGAGTTTTTATGGATCA-GCTGTCATGTTCTTCCAACAATTCATTGGCTGCAATGCA 1002
 XUT5 -----TTCAAGTTGGATCGTACTATTTTTCATTTATATTAACCTCA--AGCTGGGGT--CA 895
 XUT1 AACTTCATCTTGT--ACTATGCT-CCATTCACTTCTAGTCTTTA--GGTTTGTCTGGA 1050
 XUT4 AACTTCGATCTT--ACTATGCTCTATGATCTTCAATCTGCT--GGCTGGGTTGGT 789
 XUT7 AATACTATTTCTG--ACTATGCCCCATGGTATTTGAAGAAGCA--GGCT--TCAAC 697

* * * * *

SUT1 GG-AC**T**CTTT-----CCAAA-CCT**T**ATT-ATCT----TGGGTGTTG**T**CA--AC 1068
 SUT2 AG-AT**T**CTT-----CCAGA-CTT**C**ATC-ATCT----TAGGT**A**AGTCA--AC 1062
 XUT2 AG-ACA**A**CTTG-----GCC**T**AA**T**CTTGG**T**G-GTGT----TGC-CGT**C**ATC--TGT 939
 XUT6 AG-TC**A**TTTAT-----GTCA**A**GA**T**CTTGG**T**-GCCT----TGAAC**G**T**A**CTGAAT 1041
 XUT3 AT-A--ATTATACGC**A**CTT**A**CA**T**TTT**C**AC**A**CA**A**TTGGGA**T**GA**A**CT**C**T**A**CA**A**C-TAC 1058
 XUT5 AA-G--ATT**C**G-----A**A**T--G**A**T**A**-G**A**CT**A**AG**A**GT**A**AT**A**TTGT**G**AT-G**A**G 935
 XUT1 AAC**A**CC**A**TTT**C**T-----TT**T**T**A**CTT**C**TGG**T**G--T**T**----G**T**C**G**GT**A**T**C**GT**C**AT--G 1095
 XUT4 AG--**A**C-----**A**AG**T**AT**T**CT**T**G-----T**T**----AT**G****A**CT**G**T**A**T**C**A--**A**C 819
 XUT7 AA--**C****T****C****A**-----**A**GG**T**TT**A**CT**T**-----AT**G****A**CT**G**GC**A**T**C**A--**A**C 730

*

SUT1 TTT**C**CT**G**C-----T**A**CC**T**T**C**-----ATTGGT**A**T**T**GGG-----C**C**A----- 1099
 SUT2 TTT**C**CT**T**C-----T**A**CA**T**TT-----G**T**GGT**A**TTGGG-----C**C**A----- 1093
 XUT2 T**T**CA**T**GT-----TGG**T**-**T**C-----ATTAG**T**CT**C**T**A**CT**T**CT**T**GT----- 973
 XUT6 T**T**CT**T**GT-----G**T**CT**T**T-----ATTG**T**TT**T**CT**A**C**A**-----C**C**G----- 1072
 XUT3 TT**C**CT**T**GT**T**GGT**A**CTGGT**C**TT**A**TGGT**A**TTG**T**TA**A**TTG-**T**CT**T**CC**A**CC**T**CT**C**AG**C**AG 1117
 XUT5 T**T**C-----TGG**T**C-----ATTGGT**A**AT**T**GC**T**TT**C**CG**A**T**G**CT**A**----- 973
 XUT1 TT**C**CT**T**GC-----T**A**CC**A**TT**C**-----C**A**CT**G**T**T**CT**T**GGG----- 1126
 XUT4 T**C**CA**T**T**A**T**C**T**A**-----C**A**T**C**TT**A**GT**A**CC**A**TT**C**CT**C**AT**G**GT-**A**CT**T**AG----- 862
 XUT7 T**C**T**A**T**A**GT**A**T**A**-----T**T**GG**T**CT**A**GT**A**CT**C**CT**C**GT**G**GT-**T**CT**T**CG----- 773

* * * *

SUT1 -----TTGA**A**AG**A**TTGG**T**AG**A**AG**A**T**C**TT**C**TTG**T**TAG**T**TGG**T**---CT**G**CT**G**G-**T** 1146
 SUT2 -----TTGA**A**AG**A**TTGG**A**AG**A**AG**A**CA**A**T**C**TTG**T**TAG**T**CG**G**TT---CT**G**CT**G**G-**T** 1140
 XUT2 -----CTG**A**TAG**A**T**G**GA**A**AG**A**AG**A**T**T**GC**T**CT**C**AG**C**AG**T**GG**A**G---CT**T**TTGG**T** 1021
 XUT6 -----T**C**GA**A**AG**A**T**A**GG**T**AG**A**AG**A**T**T**-**C**CT**T**TT**G**T**T**CTGGG**G**T---G**C**AT**C**CG**C** 1119
 XUT3 TG**T**TT**T**GA**T**CT**G**AT**A**GT**A**GT**G**GA**A**AG**A**AG**A**CA**T**TTG**T**T**A**AT**G**CG**A**GT---G**C**T**A**TT**G**A- 1173
 XUT5 -----T**G**TT**T**GA**C**AG**A**TT**G**GA**A**AG**A**AA**A**---T**G**C-**A**AT**C**GT**C****A**TT**C**GT**T**AT**C****A**GG**T** 1023
 XUT1 -----T**C**GA**C**AG**A**CT**T**GG**T**AG**A**AG**A**AG**C**CA**T**TT**T**GA**T**TT**C**CG**G**TG---C**C**AT**T**A**T**-**C** 1173
 XUT4 -----T**T**GA**T**CT**T**GGG**G**CAG**A**AA**A**CT**T**GG**T**TT**A**T**C**TGG**A**T---C**T**GT**G**CT**C** 909
 XUT7 -----T**G**GA**T**CA**T**TTGGG**G**TAG**A**AG**C**CA**T**TT**T**GA**T**AT**C**CG**G**G---G**T**TT**A**T**C**T 820

** * * * *

SUT1 AT**G**TT**T**GG**T**TT**C**AT**C**ATT**A**CT**C**T**A**C**A**TTGG**A**AG**T**TT**C**CA**T**TTG**T**ACA**AG**AT**G**GT 1206
 SUT2 AT**G**TT**T**GG**T**TT**T**TT**C**AT**C**ATT**A**CT**C**CG**T**T**A**TTGG**T**AG**A**AG**C**CA**T**TT**T**GG**T**CA**T**AG**A**GG**A** 1200
 XUT2 GT**G**G-T**G**TT**T**GT-**A**TG**A**GT**C**T**A**TT**T**CA**A**CT**T**---A---T**T**AA**G**TT-**T**TC**A**----- 1067
 XUT6 AT**G**G-**C**T**T**GT**C**AT**G**-**G**CT**G**TT**A**AC**T**GT**T**---A**C**CG**T**AA**A**CT-**T**GCC-----G**T** 1167
 XUT3 ACT**T**TT**A**TT**T**CT**T**GG**T**T**A**T---G**T**CG**G**CG**C**A---AT**C**GT**T**GG**C**AG**A**T**A**GG**C**AT**C**GT 1227
 XUT5 **A**T**G**AT**C**AT**A**T**G**CT**T**T**A**T**A**GT**T**---T**T**AG**T**GT**T**---T**T**GG**T**AA**A**GA**A**T**A**GG**C**AT**-GG** 1076
 XUT1 AT**G**GG**T**AT**T**GT**C**ACT**T**GT**T**---G**T**GG**C**CT**G**C**A**---AT**C**TT**A**GG**T**CA**G**TT**C**GG**T**GG**T**AA**C** 1227
 XUT4 AT**G**GG---T**G**TT**C**CG**C**CT**T**AA---C**C**AT**T**GT**C**---T**G**TT**C**GT**T**AT**T**CT----- 949
 XUT7 AT**G**GG**A**AT**A**T**G**T**A**TTGG**T**TT**G**A---T**T**GC-----G**T**GG**T**AT**T**CT**A**----- 859

* *

SUT1 G-**A**AT---ACA**A**CA**A**CG**A**CA**A**CA**C**CT**A**TA**A**CA**C**AT**C**CG**G**T**A**AC**G**CT**T**GT**A**T**C**T---T**C**AT**T** 1260
 SUT2 G**T**AG**T**---A-G**A**TA**A**CG**A**CA**A**CA**C**CG**T**CA**A**CT**G**TC**G**GT**A**AT**G**CT**A**T**A**T**C**T---T**T**AT**C** 1254
 XUT2 C-----A**A**T**C**CA**A**AG**T**GA**A**GA**A**GA**G**CA**G**TT**G**A---G**C**T**G**CT**G**CT**G**GG**T**TT---T**C**-**T** 1115
 XUT6 G-----A**A**GG**C**CA**A**CA**C**CT**A**CT**C**-----T**G**GT---G**T**CG**T**CT**G**CT**T**TC-----T**T**-**T** 1208
 XUT3 TT**A**T**C**T**G**AA**T**TC**A**A-G**A**CA**G**CA**GG**G**A**AG**A**CT**G**CA---A**T**GT**C**TT**C**AT-----T**T**-**T**C 1275
 XUT5 **T**CA**T**---**A**G-**C**AA-**G**A---**G**C-**GG**A**A**GT**T**AC**G**CA---G**C**T**G**T**C**CC**A**T**A**T**G**T---T**T**-**T** 1121
 XUT1 TT-----T**G**TC**A**CA**C**CA**T**CC**G**GT**C**CT**T**GG**T**GG**T**GG**T**GG**T**GT**T**CT**T**CT**T**TTGG**A**TT**T**C 1281
 XUT4 -----T**A**A---ACA**A**CA**C**AT**A**CA**C**CA**C**CG**G**GT**T**GT**G**GT**T**G---G**C**AG---T**C**-**T** 989
 XUT7 CT**A**G---ACA**A**GT**C**GT**C**CA**C**CA**C**-----G**T**CT**A**T**G**GT**T**CG**G**GT**A**T---T**G**GT 900

*

SUT1 AC**T**GT**T**TT**G**TT**C**AT**T**GT**T**TT**C**TT**T**CG**C**-T**C**CA**T**TTGG**C**CG**T**GG**T**GT**C**T---A--C**CA**CA 1315
 SUT2 ACT**T**GT**T**TT**G**TT**C**AT**C**TT**C**TT**T**CG**C**-T**G**T**A**CA**T**GG**G**CT**G**AG**G**TT**T**TT---T--T**CA**CA 1309
 XUT2 TTT**C**GT**T**T-T**C**CA**A**CT**T**GT-**C**TT**CG**C-T**C**CA**T**-**G**GT-**A**AT**T**GT**A**TT**C**CA**T**-**G**CG**T**G 1167
 XUT6 G**T**TT**G**CA**T**-**T**C-**A**ACT**C**AT**T**CT**T**CG**G**CT**C**CT-**G**GT**A**GG**T**GG**A**T**C**C---T-**G**GT**G** 1260
 XUT3 ATTT**A**T**G**AT**G**IG**A**AT**T**-**C**TC**G**T**A**CA**G**TT**G**GT---C**CA**AT**T**GG**A**T**G**---G**T**-**T** 1323
 XUT5 AT**T**CA**C**AG---G**A**TT**T**ACT**C**AT**T**CA**T**TT**C**ACT---C**CA**-T**T**GA**A**CT**C**-----T**T** 1166
 XUT1 G**C**T-**A**TC**G**GT**T**CG**G**TT**A**CT**T**GG**G**-T**C**CA**T**G---T**C**TT**G**GG**T**CC----- 1324
 XUT4 **A**AT**C**GT**A**T---T**CA**AT**G**CT**G**CT**T**TT**G**GA-T**A**CA**G**T-----T**G**GG**T**CC**A**AT-----T**C**C 1034
 XUT7 G**A**TA**A**T**C**T---A**CA**AT**G**CA**T**CT**T**TT**G**GC-T**A**CA**G**T-----T**G**GG**G**T**C**CA**T**CG**G**AT**C** 949

* * *

SUT1 TC**A**T**C**T**C**T**G**A---A**A**GT**A**CT---C---ATT**G**AG**A**AT---C**A**GT**C**CA**A**G-G**C**T**A**T**G**-G**C**CA**T** 1364
 SUT2 TC**A**TT**T**CC**G**A---A**T**CA**T**AT**C**---C---ATT**G**AG**A**AT---C**A**GT**C**CA**A**G-G**C**A**A**T**G**-T**C**T**A**T 1358
 XUT2 AT**G**AT**T**TC**A**G---A**G**CT**T**AT**CC**C---C**T**TC**A**---T**G**-C**A**CT**G**CT**A**A-AG**A**T-**C**T**T**CA**T** 1216
 XUT6 TT**A**CC**A**CT**T**G---A**A**-T**T**GT**T**GT**C**---T**T**T**G**AA**T**T**G**-A**G**ACT**C**CT**G**-G**T**GC**T**GT**T**GT 1312
 XUT3 TT**A**CC**T**CA**G**---A**G**AT**TT**CC**A**---A**T**CG**G**CA**T**C---A**G**AT**CC**A**A**T-G**C**CA**T**-**C**T**C**CA**T** 1373
 XUT5 GT**A**CC**T**CT**C**A---G**A**AT**T**GT**CC**C---C**T**AC**G**T**T**GA**A**AG**T**AC**A**CA**G**TT**A**CA**C**CT**T** 1221
 XUT1 TT**G**TT**T**CC**G**A---A**G**-T**C**TT**CC**C---A**T**GG**G**TT---C**CG**T**G**T**A**AG**G**GT**T**-T**T**CA**T** 1373
 XUT4 TT**G**GT**C**AT**T**CA**G**CA**A**GT**T**CC**C**TA**A**CT---C**A**CT**T**---A**G**AT**C**AA**A**AG**G**GT**C**---G**C**CA**T** 1088
 XUT7 TT**G**A-T**CC**CG**G**AG**G**T**A**T**G**CC---A**T**GG**CA**CT**T**---A**G**AT**C**GA**A**AG**G**GT**T**-T**C**T**A**T 1002

* *

SUT1 TG-CCACTGCTGCTAACTGGGTTTTTCGGTTTCTTGATCTCATTTCCTACTCCATTTCATTG 1423
 SUT2 TG-CTACTGCTGCTAACTGGATGTGGGGCTTCTTGATTTCCTTCTGCACTCCATTTCATTG 1417
 XUT2 TAGCTACATCAAGTAACTGGCTTTGGAAATTCCTTGTGTTGATGATCACTCCAACTATCA 1276
 XUT6 CGACCGCTTC--TAACTGGGCTTTTAACTTCATGGTTGTGATGATCACTCC--TGTCG 1366
 XUT3 AA-CTACCTCATCTACTGGATGAATAAATTTATTTATGGCTTGGTCACTCCACATAT-G 1431
 XUT5 AA-TATTTTCAACGGCT--GCTGGGACATTTT--CGCAAGTTT--CATTTTACCCATTG 1273
 XUT1 CG-GTGCCCTTCTTAECTGGTTGAACAACCTTCGCTGTGCGCATGTCTACCCAGATTTTG 1432
 XUT4 GT-CTACTGCAACCAACTGGCTCTTAACTTTATTTGTTGGAGAGATGACACC--TATTT 1144
 XUT7 TT-CTACGGCTACAACCTGGTTTGCCAATTTTGTGTGGTTCAGATGACGCC--AATTC 1058

* * ** *

SUT1 ---TTAGTGCCATTCAATTTCAAGTTCGGTTACCTTTT---CACTGGATGTTTATTATT 1475
 SUT2 ---TTAATGCCATCAACTTCAAGTTCGGCTTTCTGTT---TACTGGTGTGTTACTCTT 1469
 XUT2 ---TTGAAAAGT-TCAAGTGGAAAGCAATTTGATCTT---TATGTGCTG-CAACTTCT 1327
 XUT6 GTTTCGAAAAGTATTGGTTTCTTACACTAGCTTATCTT---TGC-TGCCATCAATTTGT 1420
 XUT3 TTAGAAAAC--AATGAAGTGGGGCACCTACATTTTTTTTCGACGCGTTTGCTA-TTATTGCG 1488
 XUT5 CAATGAATGGAATTTGGCTGGAAATTTTACATCATT---AATGCTTGCTA-TGACGTCA 1327
 XUT1 TTGCTAAAGG--CTAAGTTCGGTCTTACATTTCTT---AGGTTGATGTCTATTTT-T 1484
 XUT4 TGTTCGATAACAATTACCTGGAGAACTTACTTGTATCCC--GGCAACTTCGTGTCTATTATC 1202
 XUT7 TACAGCAGAGATTGGGCTGGGGAACCTTATCTATTTCCC--GGCTGCTAG-T-TGCTATCATC 1114

* * *

SUT1 CTCCTTCTTCTACG-TCTACTTCTTCTGTTGTTGAAACCAAGGGTTTGTCTTGGGAAGACG 1534
 SUT2 TTCGTTCTTCTATG-TCTACTTCTTGTGACCGAAACCAAGGGTTTGTCTTGGGAAGAA 1528
 XUT2 CCTTCGTACCAATGTTTACTTTTCTTCTTCCCGAGACAAAGA----- 1369
 XUT6 TGATGGCTCCCGTCACTACTTCTTGTATCCCAGAAACCAAGGGTAGATCGTTGGAAGAAA 1480
 XUT3 T-TCTTTTTCACCTGGCTTATCATCCCGGA---AACCAAGGGAATTCATTGGAAGAAA 1543
 XUT5 TATTCTTCCAATAATAATGTTCTGTGGATTGAGACAAGGGAATTAATTTGGATACAA 1387
 XUT1 CGGTCCCGATACG-TTCAATCTTCTGTTCCAGAAACTAAGGGTCTGACCTTGGAAAGAAA 1543
 XUT4 GTTTTGTGCTGTTGG--ATTTTATTT--CCAGAGACCAAGGGTTTAGCATTGGAGGATA 1258
 XUT7 --TCGGTGATAGTGGTGAATTTCTTCTATCCAGAGACAAGGGTCTGAGAGCTAGAGGATA 1172

* ** **

SUT1 TAGACGA-ATTGTACGCTTCCA-----ACGTGGTT-----CCATGG-- 1569
 SUT2 TTGATGA-GTGTACGCTGAAG-----GTATTGCA-----CCATGG-- 1563
 XUT2 -----ACCTT-AC-----TTTGAAG-----CCATTG-- 1390
 XUT6 TGGATATCATTTCACCAATGTCTT-----GTTTGGGAG-----CCATGG-- 1521
 XUT3 TGGATCCCGTGTGTTGGCG-----ATACTGCA-----GCATTG-- 1575
 XUT5 TTAGTGAAGTATTGCACG-----GAAGAGGA-----CC-TG-- 1417
 XUT1 TTGATGAACTTTTCGGTGACACCTCTGGTACTTCCAAAGATGAAAAGGAAATCCATGAGC 1603
 XUT4 TGGGCTCCGTATTCCGATGATAATTGTCAT--ATTTTCAATATC--ACTCAACTCCT 1311
 XUT7 TGGACTCTGTGTTTCGA-GA-----GCTTTTA-----CAACTAC- 1204

*

SUT1 -----AAATCCAGCAAG-----TGGGTTCCACCATCGACTGCTG 1603
 SUT2 -----AAGTCTGGTGCA-----TGGGTTCTCTCTCTGCC-CAA 1596
 XUT2 -----ACGATT-----TGTTC 1401
 XUT6 -----AAGCTTGTCAAATTGCCAGAGACTCCCTATTATGCAC 1560
 XUT3 -----CAGCAAAAAGAA-----TTGG 1591
 XUT5 -----AAGATGAAGAAA-----GCAT 1433
 XUT1 AA-----AAGCTTAAGGAAG---TTGGTTTCTTCAATTGCTCGG 1640
 XUT4 TCCACTGGGTATGGTGCACCGAGTCTAACAGTAAATGCCAGGAGAGCAAGTGTATCTCT 1371
 XUT7 -----AAGTCT-----CCGT 1214

SUT1 CCATGG-CTACCGA--AG-CTGGTTACGCTG-----CTGAT----- 1635
 SUT2 CAACTAA--ATGCAAA--ACTCCACTTATGGTG-----CCGAA----- 1629
 XUT2 TCA----- 1404
 XUT6 TCAGAA--GTCTTG--ACCACGAAAAGGATG-----TCATTAAT 1596
 XUT3 TTAGCATTACGTCAG--TTTCTGAATCTGACG-----CCAAGGAT----- 1629
 XUT5 TGAAGA--AAGTCAC--AGCCT-AATCAGAC-----AAGGTT----- 1465
 XUT1 TGAAGAAAATGCT-----TCTGAATCCGAAA-----ACAGCAAG----- 1674
 XUT4 TCAGAAAACCTACCAGGATAGTTTGCATCAGACGCGGCTTCATTGGCTAGAAAATCCTTCA 1431
 XUT7 TCAAGA--TTTACGAAAAG--AGACA-----CCAGAA----- 1242

*

SUT1 -----GAAAAGCCTGTTGACGAAACATGTTTAA----- 1662
 SUT2 -----GCAAAA--GAGCAAGAGCAAGTTTAG----- 1653
 XUT2 ----- 1404
 XUT6 -----GAAAAATCTAGATAGAGCATGTCGAAAACATCAGCTAA----- 1635
 XUT3 -----CGCAACTCGATTGAAATGTCAGAAATA----- 1656
 XUT5 -----T---TGTGTTAATACAAAGAAATA----- 1488
 XUT1 -----GCTGATGCTACACGTTGAAAAATA----- 1701
 XUT4 AGCATGAGGCCTGATTACGATGGCAATAATCACAGGAGCTGCTACCTTTGCCAGTACCA 1491
 XUT7 -----TGATGGC-----CA----- 1251

```
SUT1 -----  
SUT2 -----  
XUT2 -----  
XUT6 -----  
XUT3 -----  
XUT5 -----  
XUT1 -----  
XUT4 CCATTAAAACCAATAAACATTCCAGCAATATTCGCGAGGAAATTGAACCACCAACCTTT 1551  
XUT7 -----
```

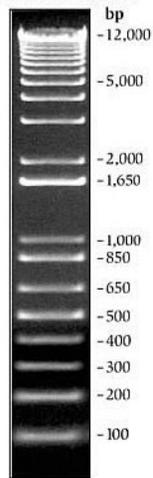
```
SUT1 -----  
SUT2 -----  
XUT2 -----  
XUT6 -----  
XUT3 -----  
XUT5 -----  
XUT1 -----  
XUT4 GATGAAATCTTTAAGTACAAGTTGAATGAGATGGAA 1587  
XUT7 -----
```

ANEXO

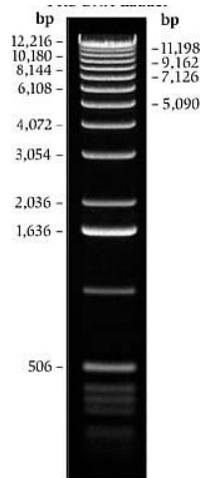
10. ANEXO

Anexo A: Padrão dos marcadores de massa molecular usados

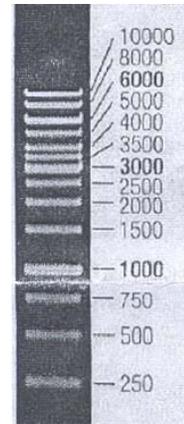
1 kb Plus DNA Ladder
(INVITROGEN)



1 kb DNA Ladder
(Gibco/INVITROGEN)



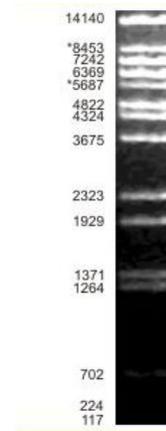
1 kb DNA Ladder
(LGC)



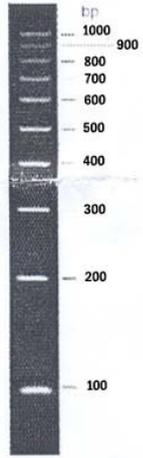
Lambda EcoRI -
HindIII



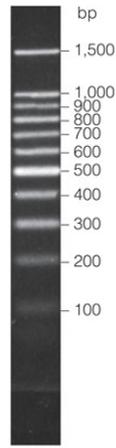
Lambda BstEII



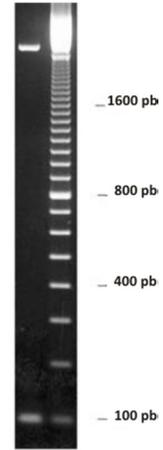
100 pb DNA Ladder (LGC)



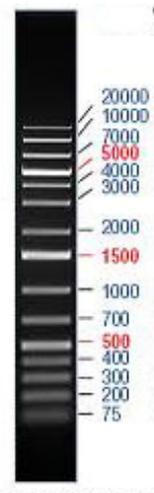
100 pb DNA Ladder (PROMEGA)



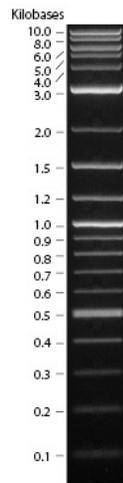
100 pb DNA Ladder (Pharmacia)



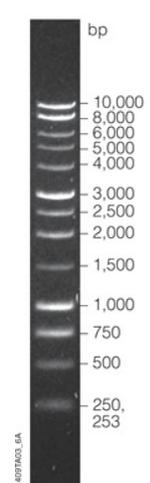
O' Gene Ruler 1 kb Plus (FERMENTAS)



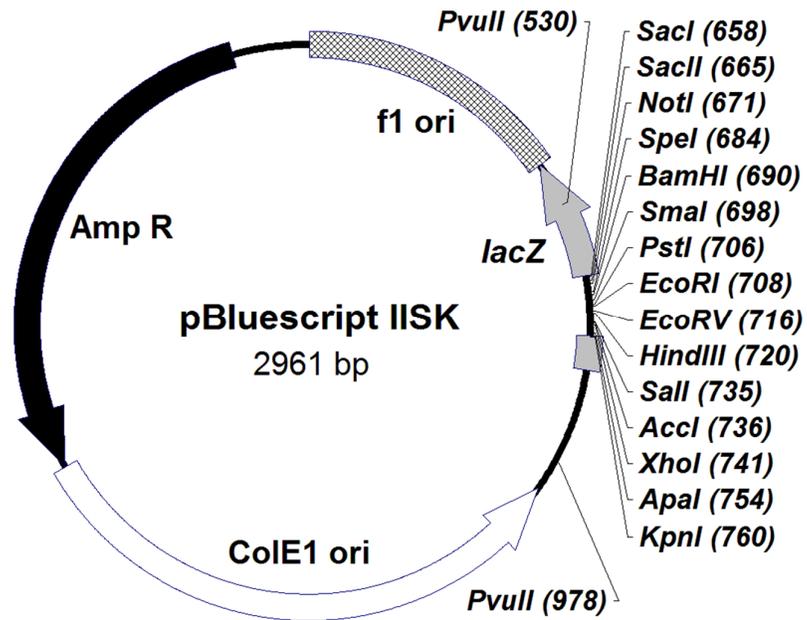
2-Log DNA ladder (Biolabs)



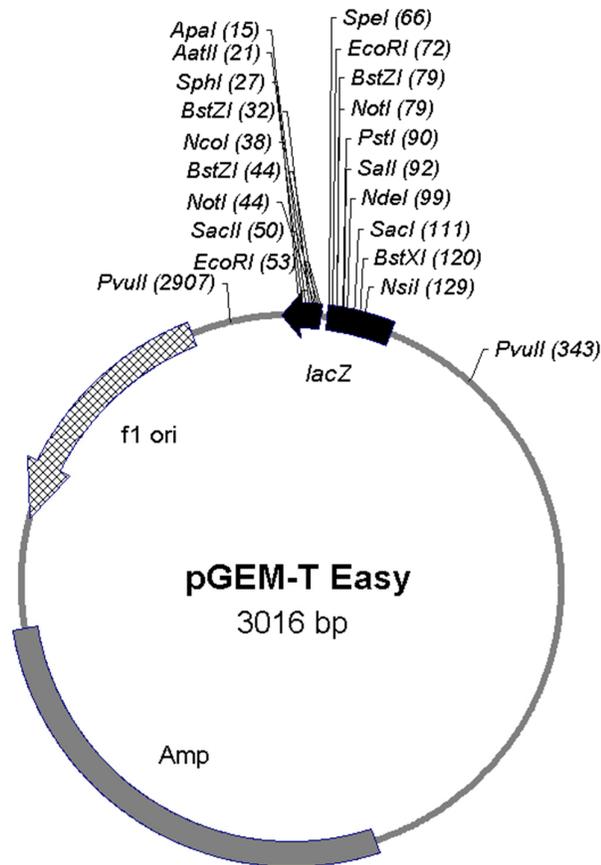
1 kb DNA ladder (PROMEGA)



Anexo B: Vetores de clonagem

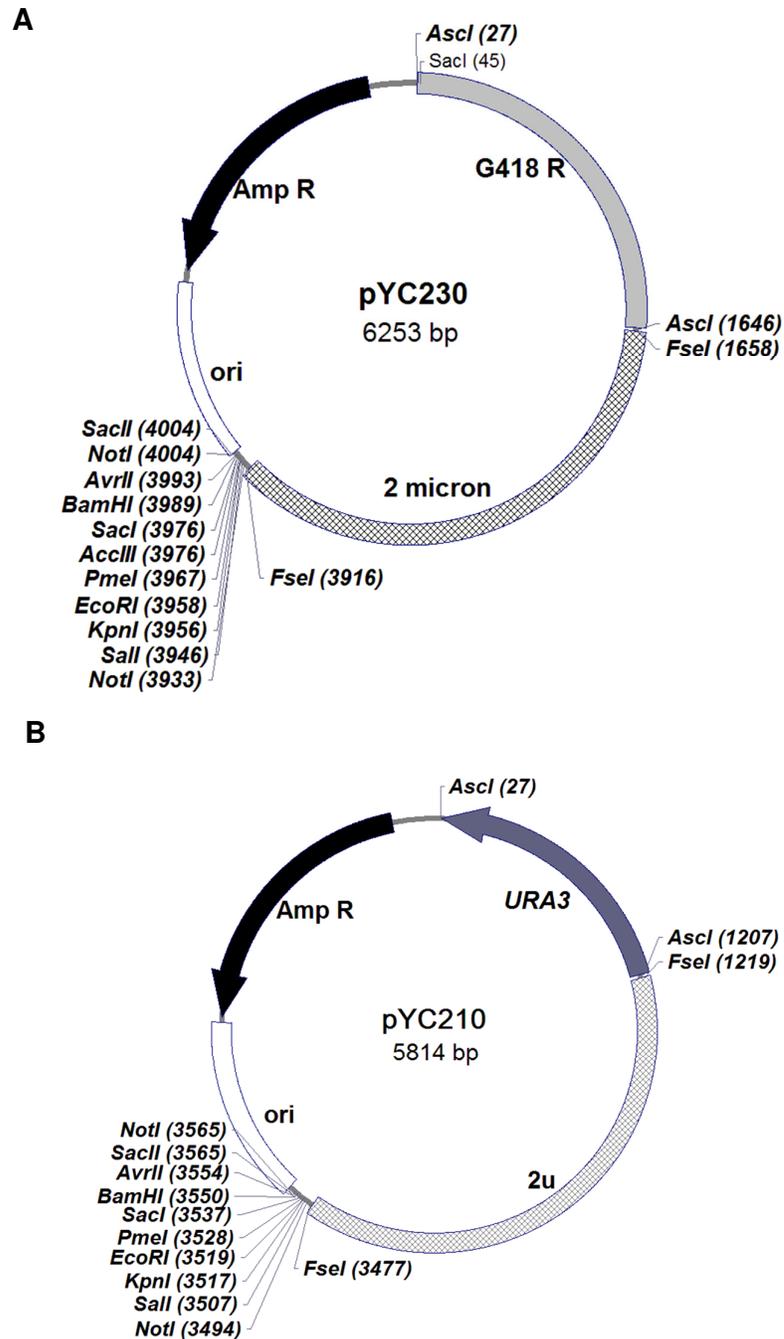


Mapa físico do vetor de clonagem pBluescript IISK (Stratagene). Este vetor possui origem de replicação (CoIE1ori), marca de seleção para ampicilina (AmpR), gene repórter *lacZ* e sítios de múltipla clonagem, MSC.

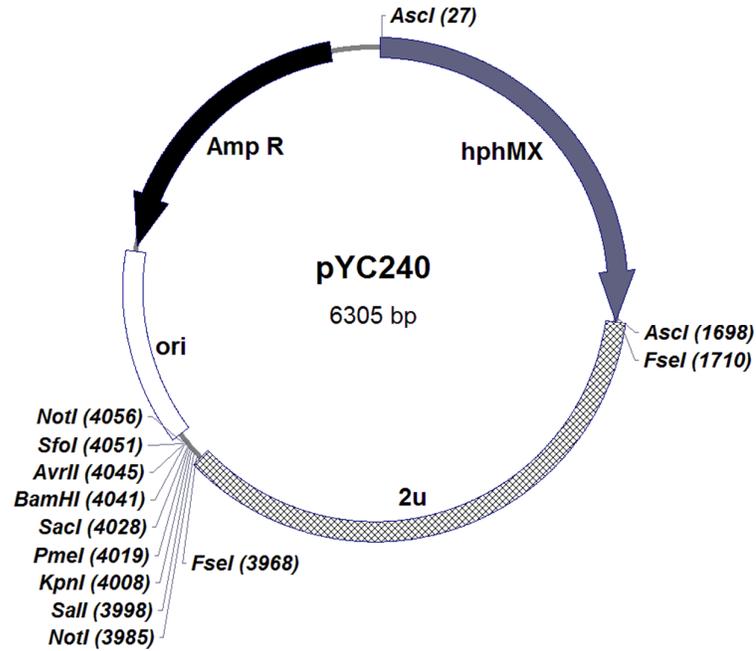


Mapa físico do vetor de clonagem pGEM[®]T easy (PROMEGA) O vetor possui a origem de replicação do pBR322(ori), marca de seleção para ampicilina (AmpR), gene repórter *lacZ*, e sítio de múltipla clonagem, MSC.

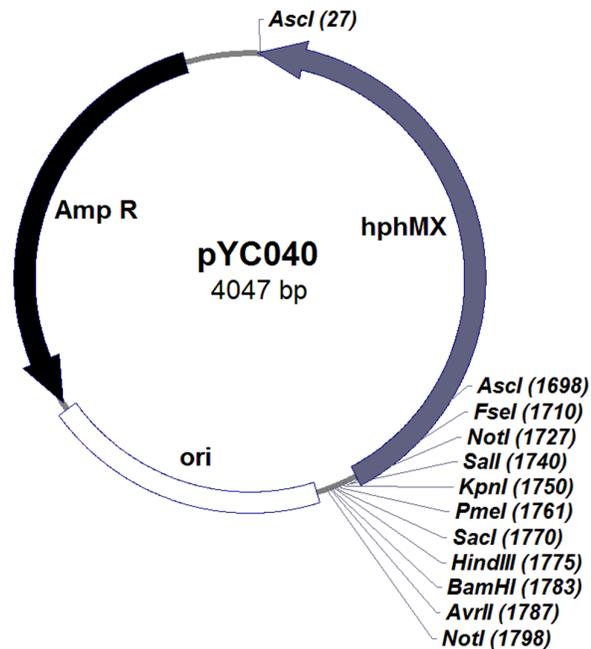
Anexo C: Vetores série pYC de *S. cerevisiae*



Mapa físico dos vetores epissemiais pYC230 **(A)** de 6,2 kb e pYC210 **(B)** de 6,3 kb (Olesen *et al.*, 2000). Os vetores possuem além das sequências para amplificação em bactéria, a origem de replicação do 2 micron (2u), sítios múltiplos de clonagem, a marca de resistência para G418 (G418R) **(A)** e marca auxotrófica para *URA3* **(B)**.

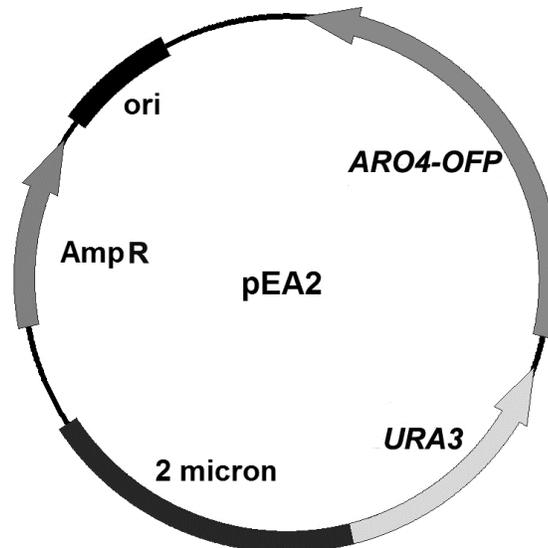


Mapa físico do vetor episomal pYC240 de 6,3 kb (Hansen *et al.*, 2003). O vetor possui além das sequências para amplificação em bactéria, a origem de replicação do 2 micron (2u), a marca de seleção para higromicina (hphMX) e sítios múltiplos de clonagem.

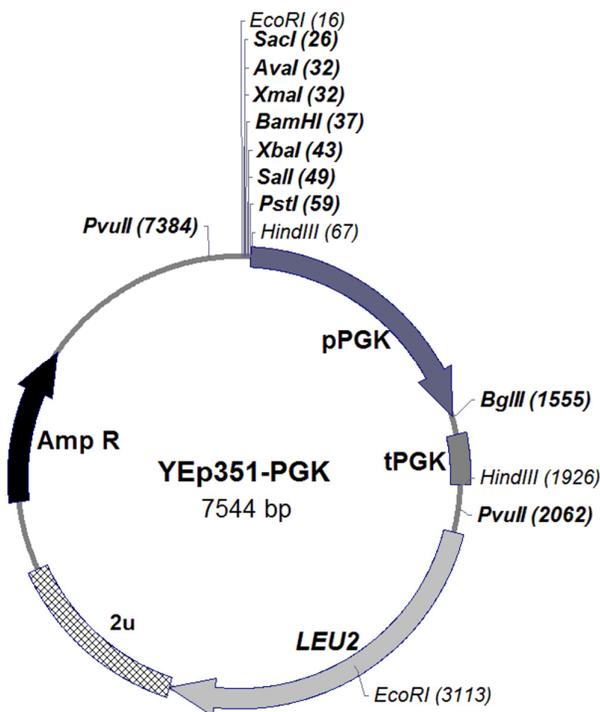


Mapa físico do vetor pYC040 de 4 kb (Hansen *et al.*, 2003). O vetor possui além das sequências para amplificação em bactéria, a marca de seleção para higromicina (hphMX) e sítios múltiplos de clonagem.

Anexo D: Vetores episomais para *S. cerevisiae*

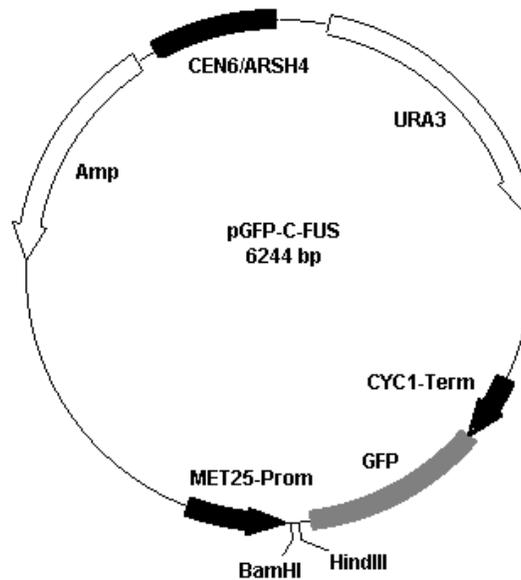


Mapa físico do vetor episomais pEA2 (Cebollero & Gonzalez, 2004). O vetor possui além das sequências para amplificação em bactéria, a origem de replicação do elemento 2 micron (2u), a marca auxotrófica *URA3* e a marca de seleção *ARO4-OFP*.

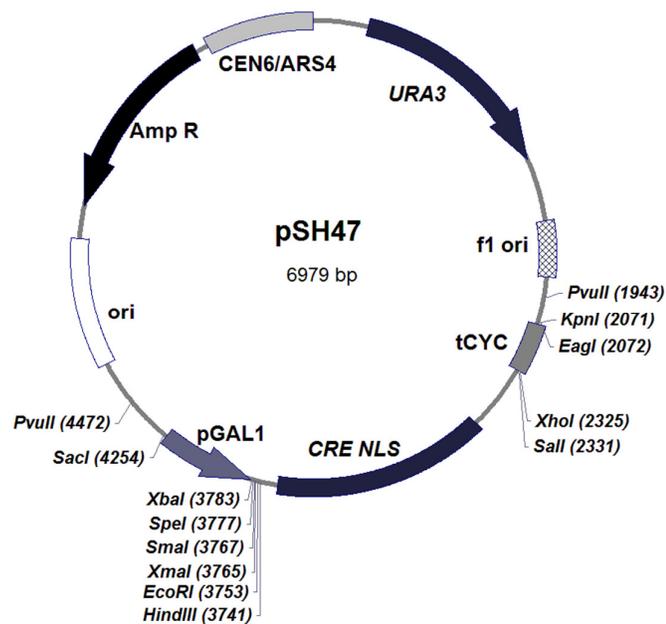


Mapa físico do vetor de expressão episomais YEp351-PGK de 7,5 kb (de Moraes *et al.*, 1995). O vetor possui além das sequências para amplificação em bactéria, a origem de replicação do elemento 2 micron (2u), a marca auxotrófica *LEU2*, o promotor e terminador do gene *PGK1* (pPGK e tPGK) e sítio de clonagem (BglII).

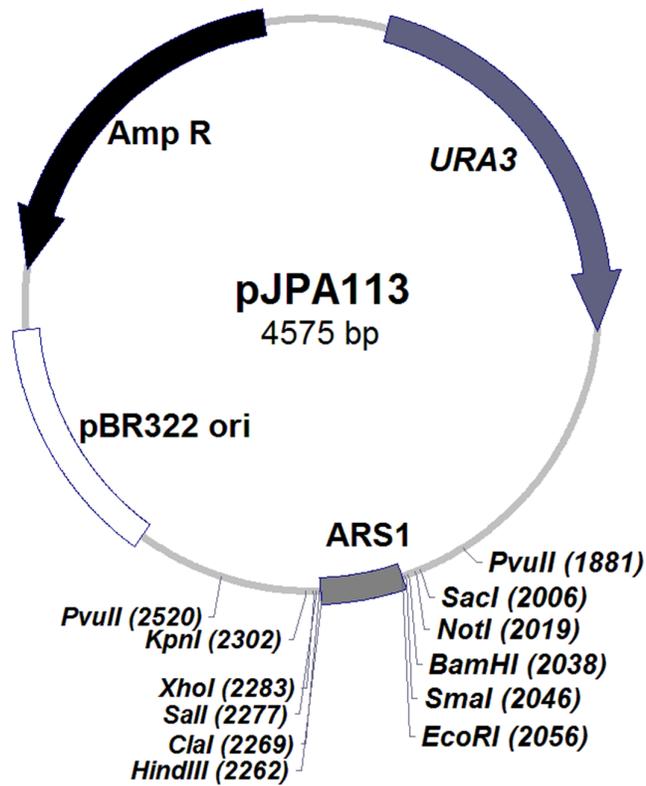
Anexo E: Vetores centromérico de *S. cerevisiae*



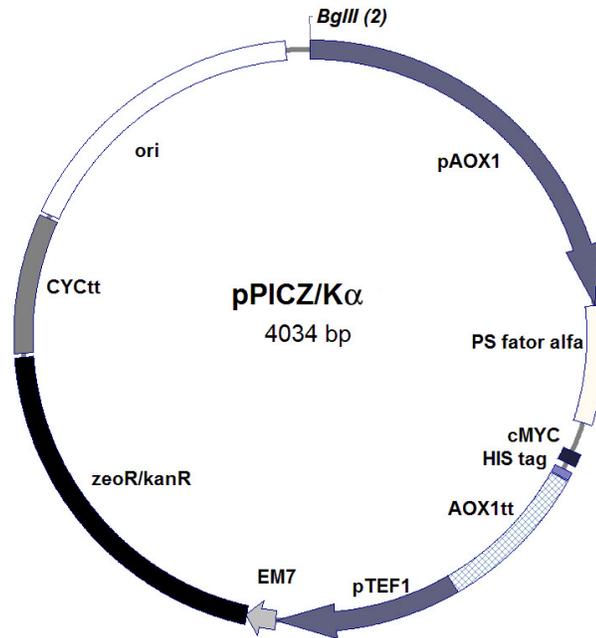
Mapa físico do vetor de expressão pGFP-C-FUS de 6,2 kb (Niedenthal, 1996). O vetor possui além das sequências para amplificação em bactéria, a origem de replicação cromossômico ARSH4, o centrômero CEN6, a marca auxotrófica *URA3*, o promotor MET25, o terminador CYC1, o gene repórter *GFP* e sítio de clonagem (*Xba*I, *Spe*I, *Bam*HI, *Sma*I, *Eco*RI, *Hind*III e *Cla*I). Apenas dois sítios, *Bam*HI e *Hind*III estão representados.



Mapa físico do vetor de expressão pSH47 de 6,9 kb (Güldener *et al.*, 1996). O vetor possui além das sequências para amplificação em bactéria, a origem de replicação cromossômico ARSH4, o centrômero CEN6, a marca auxotrófica *URA3*, o promotor GAL1, o terminador CYC1, o gene CreA (CRE NLS) e sítios de restrição

Anexo F: Vetor replicativo de *S. cerevisiae*

Mapa físico do vetor replicativo pJPA113 de 4,5 kb (Falcon & Aris, 2003). O vetor possui além das sequências para amplificação em bactéria, a origem de replicação cromossômico ARS1, a marca auxotrófica *URA3* e sítios de restrição.

ANEXO G: Vetor de *P. pastoris*

Mapa físico do vetor pPICZαA de 3,5 kb (INVITROGEN) O vetor possui o gene de resistência a zeocina sob controle dos promotores pTEF1 (levedura) e EM7 (bactéria) e o terminador da transcrição do gene *CYC1*. No vetor pPICKα houve a substituição do gene de resistência para kanamicina / G418 (Batista, 2012).