

Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Biologia Celular
Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular

**Engenharia metabólica de *Saccharomyces cerevisiae* para
aproveitamento de xilose na produção de etanol
lignocelulósico**

Bárbara Gomes Paes

Brasília

2015

Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Biologia Celular

**Engenharia metabólica de *Saccharomyces cerevisiae* para
aproveitamento de xilose na produção de etanol
lignocelulósico**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Biologia
Molecular do Instituto de Ciências
Biológicas da Universidade de Brasília
como requisito parcial para obtenção do
título de Mestre em Biologia Molecular.

Aluna: Bárbara Gomes Paes

Orientadora: Prof.^a Lídia Maria Pepe de Moraes

Coorientador: Dr. João Ricardo Moreira de Almeida

Brasília

2015

À minha avó Mônica.

AGRADECIMENTOS

Antes de tudo, à minha família, que foi fortaleza quando eu já não tinha forças, foram energia quando eu precisei recarregar, foram ouvidos quando eu precisava falar, foram ombros quando eu precisava chorar. Obrigada por me darem a herança mais valiosa que alguém pode ter, muitas vezes com sacrifícios, mas sempre com muito amor.

Ao querido (co)orientador João Ricardo, pela confiança e oportunidade de desenvolver este projeto em seu grupo de trabalho. Por todas as lições, disponibilidade, e todas as vezes que me disse para ter calma, muita calma. Pela paciência, e especialmente por acreditar em mim até quando eu mesma duvidei, muito obrigada.

A minha orientadora Lídia, pela orientação e por acreditar que eu faria um bom trabalho. À Viviane Reis, pela colaboração e disponibilidade na realização dos ensaios enzimáticos.

A Ana Paula Ribeiro, conselheira, consultora, salvadora, ajuda para todos os momentos! Amiga que me ensinou tanto, brigou e me abrigou, e me iluminou tantas vezes com o seu conhecimento. Ao Henrique, sempre disponível para ajudar, que me salvou em especial nos momentos mais difíceis. À Carol e à Talita, que me ajudaram na bancada e fora dela, que dividem comigo vícios adoráveis, histórias incríveis, e risadas intermináveis.

A todos os amigos do grupo ou que já passaram por ele, que dividiram não apenas bancada, meios e soluções comigo, mas também risadas e histórias, e gostam de mim mesmo com as minhas duzentas canetas e mania de organização. Saibam que eu sei que não é fácil me aguentar! Um agradecimento especial à Samantha, que foi minha fiel escudeira, e se me permite, uma pupila e amiga da qual me orgulho!

Obrigada a todos vocês queridos, que tornaram os dias no LGB mais alegres e leves. Sem vocês esta jornada seria infinitamente mais difícil, e certamente sem a mesma graça. Aos analistas do LGB e LPB, sempre dispostos a ajudar. Em especial à Betúlia, que me ajudou a enxergar a beleza do sequenciamento.

Aos amigos da salinha da pós, pelos cafés, lanches, risadas, pelo encorajamento, e por dividirem essa experiência nada simples que é a pós-graduação.

A tantos amigos do Lab MOA, que estão longe, mas foram todos importantes companheiros e antigos mentores. Aos amigos da graduação e a sumida Lena. Sem vocês essa jornada nem teria começado.

As professoras Ildinete e Cynthia, minhas fadas madrinhas, que me salvaram e deram bons conselhos tantas (e tantas) vezes. Vocês me inspiram. Obrigada por cuidarem e acreditarem em mim.

A Thais ‘Japa’ Ziober, que mesmo de longe sempre me apoiou, e me perguntou o que eu tinha almoçado. Ao Bruno ‘Baiano’ Amui, por não desistir de mim por todas as vezes que eu disse “não dá, estou/vou pro lab, e por tentar solucionar meus problemas insolucionáveis (por favor, se forme). Ao Álvaro e à Dri, companheiros de aventuras e divagações, que entraram nessa saga de mestrado, em que dividimos momentos de alegria e dúvida, regados à cafés e cervejas e música boa. À Verô e Igor, que numa amizade recente e surpreendente foram fundamentais neste processo. Ao meu Pedaco querido de Deborah. Pelos papos cabeças e fúteis, pelos conselhos, cervejas, pelos bons momentos e por aparecerem na minha vida!

A todos os meus amigos, os lyndos, os loucos, e a todos aqueles que o sol toca. Aos amigos do Núcleo de PesquisaS pela motivação. Aos amigos perto, amigos longe. Vocês que foram meus psicólogos, meus conselheiros, meus companheiros de aventuras, aguentaram minhas crises, me distraíram, viajaram comigo ou me abrigaram em viagens, me aconselharam, ouviram infinitas vezes eu explicar o meu projeto, e especialmente me amaram durante todo este processo. Eu sei que não foi fácil me aguentar, e por isso e por tudo eu sou profundamente grata.

A Ceres e à cerveja, inspiração e solução, e que empresta seu nome à minha levedura. Com certeza não teria chegado aqui sem estas.

Aos podcasts: Nerdcast, MRG, PDG, Scicast, Rapaduracast, TED Radio Hour, Invisibilia, Seth Andrews, que foram companhia indispensável nos momentos mais solitários, durante as longas horas de lavagem de vidraria e preparação de materiais, e em meus finais de semana no laboratório.

Ao Dream Theater, Pink Floyd, Led Zeppelin, ACDC, Metallica, Janis Joplin, Dear Hunter dentre tantos outros, e especialmente ao Queen, que me inspiraram, me acompanharam, e foram a trilha sonora de tantos momentos.

A CAPES e CNPq pelo apoio financeiro.

A EMBRAPA Agroenergia que me deu todo apoio, oportunidade e estrutura de desenvolver o projeto, foi meu laboratório e casa pelos dois últimos anos.

A sociedade brasileira.

E a todos que, de uma forma ou de outra, se sintam parte deste processo (ou não);

o meu sincero muito obrigada.

“Try not. Do... or do not. There is no try”

Mestre Yoda

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	I
LISTA DE ABREVIATURAS	IV
RESUMO	V
ABSTRACT	VII
INTRODUÇÃO	8
1. PETRÓLEO COMO FONTE DE ENERGIA MUNDIAL	8
2. BIOCOMBUSTÍVEIS: ETANOL	9
2.1. O CENÁRIO BRASILEIRO	10
2.2. PRODUÇÃO DE ETANOL: PRIMEIRA E SEGUNDA GERAÇÕES	11
3. COMPOSIÇÃO DA BIOMASSA	12
3.1. MICRORGANISMOS E VIAS DO CATABOLISMO DE XILOSE	15
4. SACCHAROMYCES CEREVISIAE	16
4.1. ENGENHARIA METABÓLICA DE <i>S. CEREVISIAE</i>	17
5. XI PIROMYCES	19
OBJETIVOS	21
MATERIAIS E MÉTODOS	22
1. MICRORGANISMOS	22
2. GENES	22
3. OLIGONUCLEOTÍDEOS	22
4. VETORES	24
5. ENZIMAS	24
5.1. ENZIMAS DE RESTRIÇÃO	24
5.2. TAQ POLIMERASE	24
5.3. <i>PFU</i> POLIMERASE	24
5.4. T4 DNA LIGASE	24
5.5. RNASE A	24
6. MARCADOR MOLECULAR	25
7. SOLUÇÕES	25
7.1. ANTIBIÓTICOS	25
7.2. ANÁLISE EM GEL DE AGAROSE	25
7.3. SOLUÇÃO DE AMINOÁCIDOS	25
7.4. SOLUÇÃO PARA ANÁLISE EM HPLC (CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA PERFORMANCE)	25
7.5. SOLUÇÃO DE SAIS (10X)	26
7.6. SOLUÇÃO DE VITAMINAS (1000X)	26
7.7. SOLUÇÃO DE ELEMENTOS TRAÇO (1000X)	26
7.8. ERGOSTEROL/TWEEN 80	27
8. MEIOS DE CULTURA	27
8.1. MEIOS DE CULTURA PARA BACTÉRIA	27
8.2. MEIOS DE CULTURA PARA LEVEDURA	27
9. PROTOCOLOS	29
9.1. PCR (POLIMERASE CHAIN REACTION)	29

9.2. ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE	30
9.3. RESTRIÇÕES	30
9.4. LIGAÇÃO	30
9.5. PURIFICAÇÃO DE FRAGMENTO DE DNA EM GEL DE AGAROSE	31
9.6. PURIFICAÇÃO DE PLASMÍDEOS E PCR	31
9.7. PREPARO DE CÉLULAS ELETROCOMPETENTES	31
9.8. PREPARO E TRANSFORMAÇÃO DE LEVEDURA	31
9.9. TRANSFORMAÇÃO DE BACTÉRIA POR ELETROPORAÇÃO (<i>E. COLI</i>)	31
9.10. EXTRAÇÃO DE DNA PLASMIDIAL POR LISE ALCALINA (MIDIPREPARAÇÃO DE BACTÉRIA)	31
9.11. EXTRAÇÃO DE DNA PLASMIDIAL (MINIPREPARAÇÃO DE LEVEDURA)	32
10. CURVA DE CRESCIMENTO EM TUBO DE ENSAIO	32
11. FERMENTAÇÃO EM ERLLENMEYER	33
12. FERMENTAÇÃO EM BIORREATOR	33
13. CONDICIONAMENTO DE LEVEDURAS	34
14. CURA DE LEVEDURAS	34
14.1. TESTE DE CURA	34
14.2. TESTE FISIOLÓGICO DE CONFIRMAÇÃO DA CURA	35
15. ANÁLISE DE METABÓLITOS – HPLC	35
16. ATIVIDADE ENZIMÁTICA	35
16.1. PREPARO DE EXTRATO CELULAR	35
16.2. ATIVIDADE ENZIMÁTICA	36
16.3. NORMALIZAÇÃO POR CURVA DE BRADFORD	36
16.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA	36
17. SEQUENCIAMENTO DA <i>XIPiRO</i> CONDICIONADA	37
17.1. PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS PARA SEQUENCIAMENTO	37
<u>RESULTADOS</u>	<u>38</u>
1. CONSTRUÇÃO DE LINHAGENS DE <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i> CAPAZES DE CONSUMIR XILOSE	38
1.1. CLONAGEM DOS GENES <i>XKSI</i> E <i>XYLA</i>	38
1.2. TRANSFORMAÇÃO EM DE LEVEDURA	40
1.3. MELHORAMENTO GENÉTICO POR EVOLUÇÃO ADAPTATIVA	42
1.4. AVALIAÇÃO DO PERFIL DE CRESCIMENTO E CAPACIDADE FERMENTATIVA DAS LINHAGENS CONSTRUÍDAS	48
1.5. TESTE DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA	58
2. SEQUENCIAMENTO DA <i>XIPiRO</i> CONDICIONADA	59
2.1. PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS PARA SEQUENCIAMENTO	59
2.2. SEQUENCIAMENTO DAS AMOSTRAS	60
3. INVESTIGAÇÃO DA MELHORIA DAS LINHAGENS CONDICIONADAS E GERAÇÃO DE LINHAGENS DE SELEÇÃO	61
3.1. OBTENÇÃO DE LINHAGENS CURADAS	61
3.2. CONFIRMAÇÃO DA CURA POR TESTE FISIOLÓGICO E PCR	63
3.3. RETRANSFORMAÇÃO DA LINHAGEM LC7	66
<u>DISCUSSÃO</u>	<u>68</u>
<u>CONCLUSÕES</u>	<u>76</u>
<u>PERSPECTIVAS</u>	<u>77</u>

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS **78**

ANEXOS **I**

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Composição percentual da biomassa lignocelulósica, com seus principais monômeros constituintes.	13
Figura 2: Vias metabólicas de catabolismo da xilose: A = oxirredução e B = isomerização.	15
Figura 3: Confirmação da amplificação dos genes <i>XIPiro</i> (1,4kb) e <i>XK</i> (1,8kb).	38
Figura 4: Estratégia de construção do plasmídeo p424-XI.	39
Figura 5: Estratégia de clonagem para a construção do plasmídeo p426-XK.	40
Figura 6: Teste de crescimento das leveduras transformantes geradas.	42
Figura 7: Teste de crescimento entre transformantes isolados originais.	43
Figura 8: Curva de crescimento de seis colônias isoladas das linhagens obtidas a partir de cada população de condicionadas.	45
Figura 9: Confirmação da presença do gene <i>XIPiro</i> nos isolados condicionados.	46
Figura 10: Confirmação da presença do gene <i>XK</i> nos isolados condicionados.	47
Figura 11: Teste de crescimento das linhagens transformantes originais e condicionadas.	48
Figura 12: Teste de crescimento com inóculo inicial alto das linhagens transformantes Originais e Condicionadas.	51
Figura 13: Cofermentação de glicose e xilose pelas linhagens L2XI Original e Condicionada (A, B) em biorreator em anaerobiose.	56
Figura 14: Atividade enzimática de xiluloquinase das linhagens transformantes Originais e Condicionadas. As barras indicam o desvio padrão das amostras.	58
Figura 15: PCR de confirmação da presença do gene <i>XIPiro</i> das colônias de bactéria transformada com DNA extraído das leveduras.	59
Figura 16: Alinhamento entre as sequências de <i>XIPiro</i> das leveduras condicionadas L2XI, L7XIΦ, L7XIXK.	60
Figura 17: Teste de crescimento das leveduras condicionadas curadas.	62
Figura 18: Avaliação do crescimento das leveduras curadas.	64
Figura 19: PCR de colônia das leveduras curadas LC2, LCΦ e L7XIXK.	65
Figura 20: Comparação entre teste de crescimento da linhagem retransformada LC-RT7 (A) e a condicionada L7XIXK (B).	67
Figura 21: Sequência gerada a partir da montagem de <i>contigs</i> do sequenciamento do plasmídeo p424-XI.	I
Figura 22: Sequência gerada a partir montagem de <i>contigs</i> do sequenciamento da PCR de <i>XIPiro</i> utilizando plasmídeo extraído da levedura L2XI Condicionada.	II

- Figura 23: Sequência gerada a partir montagem de contigs do sequenciamento de *XIPiro* dos plasmídeos A B, C, D e E extraídos das colônias de *E. coli* transformadas com plasmídeo da levedura L7XIΦ Condicionada. III**
- Figura 24: Sequência gerada a partir montagem de contigs do sequenciamento de *XIPiro* dos plasmídeos A B, C, D e F extraídos das colônias de *E. coli* transformadas com plasmídeo da levedura L7XIXK Condicionada. IV**
- Figura 25: Alinhamento entre sequências obtidas, dos plasmídeos p424-XI, L2XI, L7XIΦ e L7XIXK Condicionadas. VI**

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Composição percentual de resíduos lignocelulósicos agroindustriais.	14
Tabela 2: Linhagens de microrganismos utilizados neste trabalho.	22
Tabela 3: Oligonucleotídeos utilizados na construção de cassetes de expressão.	23
Tabela 4: Vetores em <i>E. coli</i> e <i>S. cerevisiae</i>.	24
Tabela 5: Linhagens de <i>S. cerevisiae</i> transformantes geradas no trabalho, pela inserção dos vetores construídos.	41
Tabela 6: Concentração final de xilose consumida e de produtos formados.	50
Tabela 7: Taxa de crescimento e rendimento em gramas de produto formado por grama de substrato (xilose) consumido em fermentação aeróbia de baixa OD₆₀₀ inicial.	50
Tabela 8: Concentração final de xilose consumida e produtos formados, em fermentação em xilose com alta OD₆₀₀ inicial.	54
Tabela 9: Rendimento em gramas de produto formado por grama de substrato (xilose) consumido em fermentação aeróbia de alta OD₆₀₀ inicial.	54
Tabela 10: Produtividade específica de produto em fermentação de xilose com alta OD₆₀₀ inicial.	55
Tabela 11: Concentração final de açúcares consumidos e produtos formados por cofermentação em biorreator.	57
Tabela 12: Taxa de crescimento, balanço de carbono e rendimento em gramas de produto formado por grama de açúcar consumido de cofermentação em biorreator.	57
Tabela 13: Produtividade específica de produtos formados por cofermentação em biorreator.	57
Tabela 14: Comparação entre taxas de crescimento de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (linhagens isogênicas de CEN.PK) expressando XI de <i>Piromyces sp</i> em fermentação aeróbica de xilose como fonte de carbono.	71

LISTA DE ABREVIATURAS

°C	Graus Celsius
ADP	Adenosina bi fosfato
ATP	Adenosina tri fosfato
BSA	Albumina do soro bovino (<i>bovine serum albumin</i>)
CO₂	Dióxido de Carbono
dNTP	Desoxirribonucleotídeos Fosfatados (<i>deoxyribonucleotide triphosphate</i>)
EDTA	Ácido Etileno-diamino-tetra-acético
H₂SO₄	Ácido Sulfúrico
HCl	Ácido Clorídrico
HPLC	Cromatografia líquida de alta performance (<i>high performance liquid chromatography</i>)
KOH	Hidróxido de Potássio
LB	Meio de cultura Luria-Bertani
MCS	Sítios de clonagem múltipla (<i>multiple cloning sites</i>)
Mg₂	Complexo binuclear de magnésio
MgCl₂	Cloreto de Magnésio
Mn₂	Complexo binuclear de manganês
NaCl	Cloreto de Sódio
NAD⁺/NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADP⁺/NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NaOH	Hidróxido de Sódio
OD₆₀₀	Densidade ótica à 600nm (densidade celular)
PCR	Reação em cadeia de polimerase (<i>polymerase chain reaction</i>)
Proálcool	Programa Nacional do Álcool
SB	Tampão ácido bórico e sódio
XDH	Xilitol Desidrogenase
XI	Xilose isomerase
XK	Xiluloquinase
XR	Xilose Redutase
Y-PER	Reagente de extração de proteína de levedura
YNB	Base nitrogenada para levedura (<i>yeast nitrogen base</i>)
YPD	Extrato de levedura, peptona, dextrose (<i>yeast peptone dextrose</i>)
YPX	Extrato de levedura, peptona, xilose (<i>yeast peptone xylose</i>)

RESUMO

O aumento na demanda por energias sustentáveis impulsiona o desenvolvimento de estratégias biotecnológicas para a produção de biocombustíveis. Neste contexto, o aproveitamento eficiente da biomassa lignocelulósica como matéria prima é fundamental para a produção de etanol de segunda geração. A levedura *Saccharomyces cerevisiae*, organismo mais utilizado na produção industrial de bioetanol, é incapaz de utilizar pentoses, como a xilose, que é o segundo açúcar mais abundante em algumas biomassas. Neste trabalho, plasmídeos episomais foram construídos para expressão de genes codificadores para xilose isomerase (XI) de *Piromyces sp.* e xiluloquinase (XK) de *S. cerevisiae*. As linhagens laboratoriais de *S. cerevisiae* CEN.PK 113.14A $\Delta trp1-289$ (L2) e CEN.PK 113.3C $\Delta trp1-289$, $\Delta ura-52$ (L7) foram transformadas com os plasmídeos gerados. Desta forma, foram construídas linhagens recombinantes de *S. cerevisiae* expressando XI isoladamente (L2XI) ou em conjunto com XK (L7XIXK). Uma terceira linhagem, L7XI Φ , expressando XI e com o segundo plasmídeo vazio foi construída como controle. A linhagem L7XIXK apresentou melhores taxas fermentativas que as demais linhagens, confirmando o efeito positivo da expressão de XK. As linhagens L2XI, L7XI Φ e L7XIXK obtidas foram submetidas a um processo de condicionamento em meio seletivo contendo xilose como única fonte de carbono. Ao final do condicionamento, quando comparadas com as originais, apresentaram menor fase lag de crescimento e maior taxa de crescimento, maior consumo de xilose (entre 1,8 e 18,5 vezes) e rendimento de etanol (47% para L7XIXK), concomitante à diminuição do rendimento de xilitol (entre 87,6% e 91,8%). A linhagem L2XI, investigada anaerobicamente, também apresentou aumento no consumo específico de xilose (49,8%), rendimento de etanol (19%) e redução no rendimento de xilitol (75%). As linhagens condicionadas foram submetidas então a um processo de cura para remoção dos plasmídeos. Uma das linhagens obtidas, LC7, derivada de L7XIXK perdeu a capacidade de crescer em meio mínimo, indicando a perda dos plasmídeos. Entretanto o gene para XI ainda foi identificado na levedura. A retransformação desta levedura curada com os plasmídeos originais demonstrou que as melhorias da levedura condicionada podem estar associadas a mutações fora do plasmídeo. Esta linhagem curada tem grande potencial

para desenvolvimento de uma linhagem de seleção para novas enzimas da via do catabolismo de xilose.

Palavras-chave: Xilose isomerase, *Saccharomyces cerevisiae*, Engenharia metabólica, Etanol.

ABSTRACT

The increasing demand for sustainable energy drives the development of biotechnological strategies for the production of biofuels. In this context, efficient utilization of lignocellulosic biomass as feedstock is essential for the production of second generation biofuels. The yeast *S. cerevisiae*, main organism utilized in the industrial production of bioethanol, is unable to use pentoses, such as xylose, which is the second most abundant sugar in some biomasses. In this work, multi-copy plasmids were constructed for the expression of genes coding xylose isomerase (XI) from *Piromyces sp.* and xylulokinase (XK) from *S. cerevisiae*. The laboratory strains of *S. cerevisiae* CEN.PK 113.14A $\Delta trp1-289$ (L2) and CEN.PK 113.3C $\Delta trp1-289$, $\Delta ura52$ (L7) were transformed with the generated plasmids. Thus, recombinant strains of *S. cerevisiae* expressing solely XI (L2XI), or combined with XK (L7XIXK) were obtained. A third strain, L7XI Φ , expressing XI and with an empty second plasmid, was constructed as control. The L7XIXK strain presented better fermentative rates than the other strains, confirming the positive effect of XK expression. The obtained strains L2XI, L7XI Φ and L7XIXK underwent a conditioning process in selective medium with xylose as sole carbon source. At the end of the process, when compared to the original strains, conditioned strains presented shorter lag growth phase, and increased growth rate, increased xylose consumption (1,8 to 18,5 fold) and ethanol yield (47% for L7XIXK), along with reduction in xylitol production (between 87,6 and 91,8%). The strain L2XI was investigated under anaerobic conditions and also has presented improved xylose specific consumption (49,8%), ethanol yield (19%) and xylitol reduction (75%). The conditioned strains underwent a curing process, in order to remove the plasmids. One of the obtained strains, LC7, which derived from L7XIXK, has lost its ability to grow on minimal medium, a result consistent with the loss of plasmids. However the XI gene was still identified in the yeast. The retransformation of this curated yeast with the originally constructed plasmids showed that the improvements observed in conditioned strains may be associated with mutations outside of the plasmids. The curated strain has a great potential for the development of a screening strain for new enzymes of the xylose catabolic pathway.

Keywords: Xylose isomerase, *Saccharomyces cerevisiae*, Metabolic engineering, Ethanol.

INTRODUÇÃO

1. Petróleo como fonte de energia mundial

O desenvolvimento industrial e social no século XX ocorreu em boa parte devido ao desenvolvimento da indústria petroquímica. O petróleo se tornou uma fonte de energia de baixo custo, abundante e eficiente, tanto para a indústria, agricultura, e na produção de produtos químicos derivados. Adentramos o século XXI, portanto, cada vez mais dependentes de combustíveis fósseis (ANP, 2014).

Combustíveis fósseis atualmente representam aproximadamente 80% da energia produzida no mundo, incluindo petróleo, carvão e gás natural (HÖÖK; TANG, 2013). Ainda que tenha havido um crescimento da produção de petróleo de 85,7 milhões de barris por dia em 2009 para 90,88 milhões em 2013, a demanda aumentou quase proporcionalmente, de 84,97 para 91,19 milhões de barris por dia no mesmo período (EIA, 2014a). E a demanda mundial de energia está calculada para crescer cerca de 37% até 2040 (IEA, 2014).

A utilização de combustíveis fósseis tem suscitado várias discussões. Além de disputas geopolíticas e crises econômicas (HE; WANG; LAI, 2010), também a crescente preocupação com os efeitos negativos dos derivados de petróleo para o meio ambiente, como a emissão de gases que contribuem para o efeito estufa (PETERSON; CONNOLLEY; FLECK, 2008), e o dano causado por contaminações subterrâneas e eventuais derramamentos. Adicionalmente, o distante, porém inevitável fato de que o petróleo tem disponibilidade limitada, têm incentivado estudos para o desenvolvimento de combustíveis alternativos (HÖÖK; TANG, 2013).

Ainda que a preocupação com o esgotamento do petróleo e com a utilização de combustíveis sustentáveis pareça uma discussão moderna, Henry Ford, fundador da Ford Motors Company, em 1916, já fazia previsões para o fim da gasolina durante a Primeira Guerra Mundial, apostando no etanol como substituto:

A gasolina está indo; o álcool, chegando [...]. E olhe que está chegando para ficar, pois é uma fonte ilimitada. E é bom nós nos prepararmos para recebê-la. O mundo espera por um substituto para a gasolina. E, quando ele chegar, não haverá mais gasolina; dentro em pouco, os preços da gasolina subirão tanto que será inviável consumi-la como combustível de motor. Não tarda o dia em que cada tambor de gasolina deverá ser substituído por um tambor de álcool.

Henry Ford, 1916

*Wheels for the World: Henry Ford, His Company, and a Century of Progress
(Tradução retirada de GORDINHO, 2010)*

2. Biocombustíveis: Etanol

Biocombustíveis são combustíveis derivados de biomassa e, portanto alternativos aos de origem fóssil (IEA, 2015). Em outras palavras, são definidos como fontes de energia provenientes de processo biológico por fixação recente de carbono. Uma vez que o petróleo também é formado por fixação de carbono, mas em um período de eras, e na produção de biocombustíveis o carbono torna-se disponível em um intervalo de safras, é importante distinguir temporalmente os dois processos (VAN MARIS et al., 2006).

Adicionalmente, no uso dos biocombustíveis, o carbono presente na atmosfera é fixado pela planta, e volta à atmosfera quando queimado, não havendo introdução de mais carbono no sistema (PUPPÁN, 2002). Ao contrário, a queima de combustíveis fósseis reintroduz na atmosfera milhões de toneladas de carbono antes enterradas sob a superfície terrestre por milhares de anos (HÖÖK; TANG, 2013; VAN MARIS et al., 2006).

Se comparadas a outras fontes de energia renováveis atualmente disponíveis, como hidrelétrica, eólica e solar, a utilização de biomassa como matéria-prima para produção de biocombustíveis têm se destacado como principal alternativa aos combustíveis fósseis (NYLUND; AAKKO-SAKSA; SIPILÄ, 2008). Além de se basear em uma matéria prima amplamente disponível, biocombustíveis derivados de biomassa diminuem as emissões de gases responsáveis pelo efeito estufa, auxiliam no processo de sequestro de carbono, são sustentáveis e renováveis, além de economicamente reduzirem a dependência de combustíveis fósseis e suas decorrentes importações (DEMIRBAS, 2009; NIGAM; SINGH, 2011).

Sendo assim, biocombustíveis têm progressivamente ganhado espaço no mercado mundial (CLARK; LUQUE; MATHARU, 2012; MENON; RAO, 2012), tendo destaque o bioálcool (metanol, etanol, butanol), biodiesel, biogás, entre outros (DEMIRBAS, 2008; NIGAM; SINGH, 2011).

O etanol é um biocombustível derivado da fermentação de açúcares, extraídos, dentre outras fontes, de milho, beterraba e cana-de-açúcar (CLARK; LUQUE; MATHARU, 2012). Segundo a Agência de Proteção Ambiental dos EUA (EPA), o etanol proveniente da cana-de-açúcar tem capacidade de reduzir 61% da emissão de gases causadores de efeito estufa quando comparado à gasolina, enquanto o etanol de milho, produzido nos Estados Unidos, apresenta 21% de redução (GORDINHO, 2010).

Atualmente, o bioetanol representa aproximadamente 80% de todo o mercado de biocombustíveis, seguido pelo biodiesel (CLARK; LUQUE; MATHARU, 2012), e sua produção em 2013 foi estimada em aproximadamente 75 bilhões de litros (NIELSEN et al.,

2013). O Brasil é hoje o segundo maior produtor de etanol do mundo, com 27,6 bilhões de litros em 2013, atrás apenas dos Estados Unidos com 50,4 bilhões de litros (ANP, 2014).

Em veículos, este pode ser utilizado em sua forma pura ou combinada à gasolina (DEMIRBAS, 2008), e se destaca como uma das alternativas mais promissoras na redução da dependência de gasolina. O potencial do etanol como combustível não é visionado apenas para veículos terrestres, em 2014 foi lançado o VS-30, primeiro foguete nacional movido por uma combinação de etanol e oxigênio líquido, na base de Alcântara, MA (FAB, 2014).

2.1. O cenário brasileiro

O Brasil, apesar de ter grande potencial na indústria petroquímica e da recente descoberta de jazidas como o pré-sal, ainda é dependente da importação de petróleo para abastecer o mercado interno (EIA, 2014b). Ainda assim, desde 2008, o Brasil se destaca como o único país do mundo em que o consumo de gasolina é superado por um combustível alternativo, o etanol (JANK, 2009; UNICA, 2010).

No Brasil, a indústria sucroalcooleira é bem desenvolvida, e do período colonial até os anos 70 era principalmente voltada para produção de açúcar. Diante da crise do petróleo de 1973, o governo brasileiro criou em 1975 o Proálcool (Programa Nacional do Álcool). Com o programa, foram dados incentivos fiscais para o aumento do uso de etanol como combustível, além de tornar obrigatória a mistura do mesmo na gasolina, visando uma menor dependência da importação do combustível (MOREIRA; GOLDEMBERG, 1999).

Em 2012 no Brasil, o etanol já representava 70% de todo o combustível utilizado em veículos, sendo boa parte representada pelos 20% de etanol adicionados à gasolina comum (CLARK; LUQUE; MATHARU, 2012). Em 2010, atingimos uma frota de 10 milhões de carros “flex”, ou seja, capazes de utilizar tanto gasolina como etanol como combustível. Desde 2003, com o lançamento deste tipo de veículo, a utilização do etanol evitou o lançamento de mais de 100 milhões de toneladas de CO₂ na atmosfera (UNICA, 2010). Contudo, segundo estimativas de crescimento da frota de veículos no Brasil, em 2020 será preciso dobrar a oferta de combustíveis para atender a demanda, assim como aumentar a produção de cana-de-açúcar de 555 milhões para 1,2 bilhões de toneladas por ano (UNICA, 2011a).

É necessário discutir a segurança energética brasileira, de forma que se reduza a dependência da importação de petróleo, e o mercado esteja menos sujeito a flutuações de preços. A demanda e as estimativas para o futuro impulsionam não apenas a indústria como

também pesquisas biotecnológicas com o intuito de aumentar o rendimento e a produtividade do etanol.

2.2. Produção de etanol: Primeira e segunda gerações

Ainda no início do século XX, Albert Jan Kluyver já predizia a utilização de carboidratos e óleos presentes em plantas como matéria-prima para a indústria química:

Assim, a intensificação da agricultura, e seu desenvolvimento associado à indústria moderna, irá, no futuro, tornar-se cada vez mais comum. Isto significa que a indústria química será abastecida principalmente com alguns produtos agrícolas básicos, cujo valor deriva em grande parte de seu conteúdo dos três principais grupos de substâncias, os carboidratos, óleos e proteínas. E assim, particularmente os hidrocarbonetos - os açúcares, amidos, e componentes da parede celular, - se tornarão proeminentes como matérias-primas.

Albert Jan Kluyver

Albert Jan Kluyver, His Life and Work, 1959)

(Tradução Livre)

Existe hoje a tendência de classificação dos biocombustíveis em primeira e segunda geração, baseada nas suas matérias primas (LENNARTSSON; ERLANDSSON; TAHERZADEH, 2014; MACHADO, 2013), tal como previsto por Kluyver. Combustíveis de primeira geração são aqueles derivados de açúcares e óleos, de fontes vegetais como cana-de-açúcar, milho, beterraba, sementes e oleaginosas, entre outras. De forma geral, da extração ao produto final, são combustíveis relativamente fáceis de obter (NIGAM; SINGH, 2011). No caso do etanol, pode-se utilizar qualquer matéria prima contendo carboidratos, seja ela sacarina (cana-de-açúcar, beterraba) ou amilácea (milho, trigo, arroz). Depois da extração dos açúcares fermentescíveis, a levedura *Saccharomyces cerevisiae* é responsável pela fermentação dos açúcares a etanol. A última etapa consiste na destilação do caldo, para purificação do etanol (MACHADO, 2013). As fontes de matéria prima para o etanol de primeira geração costumam entrar em conflito econômico e social, uma vez que também são usados na indústria alimentícia (CLARK; LUQUE; MATHARU, 2012; NIGAM; SINGH, 2011).

Os combustíveis de segunda geração são derivados de açúcares e óleos encontrados na biomassa lignocelulósica de plantas, e convertidos a combustíveis por meio de processos biológicos de esterificação (biodiesel) ou fermentação (etanol), ou ainda processos termoquímicos (pirólise) (TAYLOR, 2008). Geralmente, esses combustíveis são produzidos a

partir de resíduos agroindustriais, como bagaço de cana, palha de milho e de trigo, ou de resíduos das indústrias madeireiras e de papel (CHERUBINI, 2010; SLUITER et al., 2010).

Uma vez que a produção de etanol de segunda geração utiliza os resíduos (principalmente) agroindustriais como fonte de matéria prima, o aumento da produção de etanol independe do aumento de áreas cultiváveis. Adicionalmente, não competem com o mercado de alimentos, como ocorre com o etanol de primeira geração (NIGAM; SINGH, 2011), e apresentam vantagens de distribuição, uma vez que esta matéria prima é comumente disponível para processamento no local de produção, quando comparada à difícil localização geográfica, acesso e transporte do petróleo (MENON; RAO, 2012).

O etanol brasileiro é produzido a partir de carboidratos presentes no caldo da cana-de-açúcar e classificado como combustível de primeira geração (DELLA-BIANCA; GOMBERT, 2013). Estima-se que a produção de etanol de segunda geração a partir de resíduos da produção de etanol de primeira geração (especialmente bagaço da cana) poderia aumentar em até 50% por unidade de área plantada (STAMBUK et al., 2008). Atualmente este bagaço não é desperdiçado. De cada tonelada de cana, cerca 288kg são aproveitados na produção de energia elétrica de importância fundamental uma vez que a queima para produção de energia coincide com a seca dos reservatórios de usinas hidrelétricas (UNICA, 2011b). Nas safras de 2013/2014, foram produzidas 653.519 mil toneladas de cana de açúcar no Brasil, ou seja, aproximadamente 188213 mil toneladas de bagaço (UNICA, 2014).

A produção de etanol de segunda geração, a partir de resíduos lignocelulósicos é significativamente mais complexa do que a produção de primeira geração. Antes da fermentação, a biomassa lignocelulósica precisa passar por pré-tratamento, afim de reduzir a recalcitrância do material, e liberar os monômeros de açúcar para fermentação (ALMEIDA et al., 2011).

3. Composição da Biomassa

A biomassa lignocelulósica é o principal componente estrutural de plantas e a maior fonte de matéria orgânica terrestre. Os principais componentes da lignocelulose são: celulose, hemicelulose e lignina, sendo que as porcentagens desta composição variam significativamente entre diferentes espécies de plantas (ALMEIDA et al., 2011). A celulose é um polímero homogêneo linear composto por monômeros de D-glicose (açúcares de seis carbonos). A hemicelulose é um polímero heterogêneo, sendo formado por pentoses como

xilose e arabinose (açúcares de cinco carbonos) e hexoses (manose, glicose e galactose) (SAHA, 2004), conforme a Figura 1.

A utilização da biomassa lignocelulósica como matéria prima para produção de etanol esbarra em dois principais impasses relacionados à sua composição. Primeiramente, os monômeros de açúcar precisam ser liberados para fermentação, o que requer um pré-tratamento químico, físico, térmico e/ou enzimático da biomassa a fim de reduzir sua recalcitrância (PARACHIN; ALMEIDA, 2013).

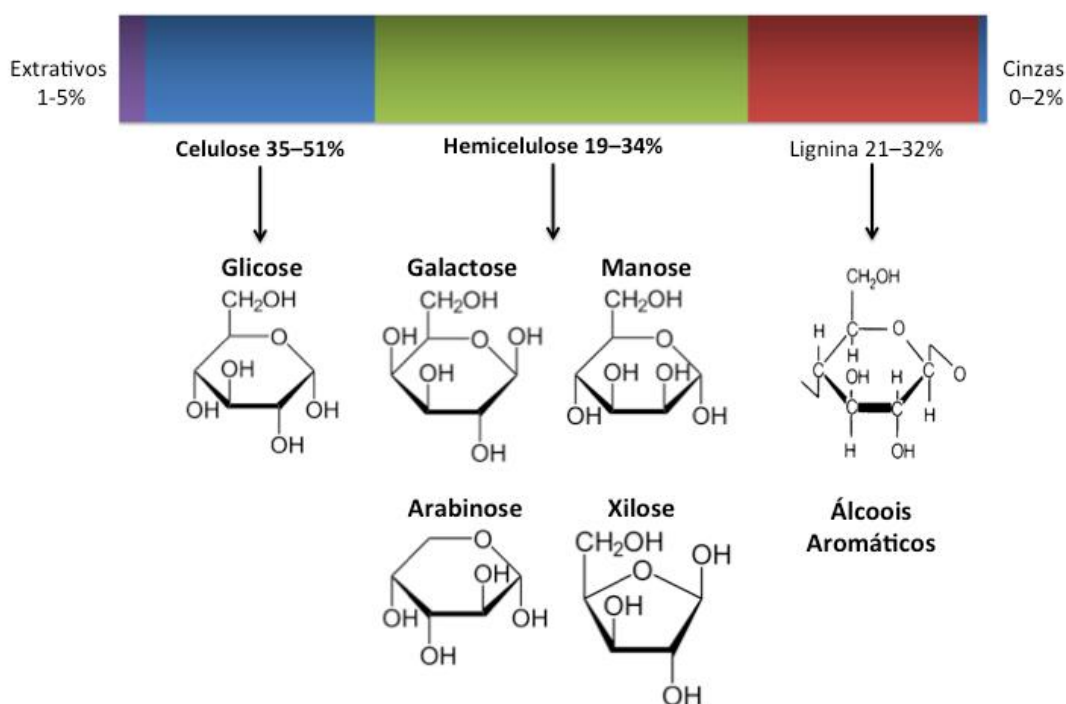


Figura 1: Composição percentual da biomassa lignocelulósica, com seus principais monômeros constituintes.

Adaptado de (ALMEIDA et al., 2007).

Em segundo lugar, nem todos os açúcares (hexoses) liberados são facilmente convertidos a etanol pelos microrganismos hoje empregados no processo industrial (GONG et al., 1983).

Como mostrado na Figura 1, a hemicelulose é composta por diferentes pentoses, como arabinose e, principalmente xilose (PARACHIN; ALMEIDA, 2013). A Tabela 1 mostra a composição percentual de algumas fontes de biomassa ricas em pentoses.

Tabela 1: Composição percentual de resíduos lignocelulósicos agroindustriais.

Material	Glucano	Manano	Galactana	Xilana	Arabinana	Lignana	Referência
Bagaço de cana-de-açúcar	41,4	3,4	1,3	22,5	1,3	23,6	(FERREIRA-LEITÃO et al., 2010)
Bagaço de cana-de-açúcar	43,3	N.D	N.D	24,3	2,0	22,8	(CARRASCO et al., 2010)
Resíduo de milho (Americana)	36,1	1,8	2,5	21,4	3,5	17,2	(ÖHGREN et al., 2007)
Resíduo de milho (Italiana)	36,8	0,3	2,9	22,2	5,5	21,2	Ohgren et al., 2007
Palha de trigo	41,2	N.D	N.D	26,1 ^a	--	19,1	(RÉMOND et al., 2010)
Palha de cevada	36,8	N.D	2,2	17,2	5,3	14,3	(LINDE; GALBE; ZACCHI, 2007)
Palha de arroz	36,6	N.D	N.D	16,1	N.D	14,9	(HSU et al., 2010)

N.D. não determinado; ^a = inclui arabinana

Adaptado de ALMEIDA, JOÃO R M *et al.*, 2011.

A xilana é um polissacarídeo composto por monômeros de xilose. Esta, por sua vez, é uma pentose, e o segundo açúcar mais presente na lignocelulose, atrás apenas da glicose (HAHN-HÄGERDAL et al., 2006). No bagaço de cana, glicose e xilose podem representar respectivamente 62% m/m e 33% m/m do total de açúcares (FERREIRA-LEITÃO et al., 2010). Sua grande disponibilidade faz com que seja um importante alvo para desenvolvimento de estratégias de aproveitamento para produção de compostos de valor agregado, dentre eles o etanol (HAHN-HÄGERDAL et al., 2006).

Nesse contexto, um dos principais alvos de melhoramento do processo de utilização de biomassa para produção de etanol, é o desenvolvimento de linhagens de microrganismos capazes de fermentar hidrolisados contendo todos os diferentes açúcares (pentoses e hexoses) componentes da biomassa (PARACHIN; ALMEIDA, 2013).

3.1. Microrganismos e vias do catabolismo de xilose

Microrganismos naturalmente capazes de fermentar xilose apresentam duas principais vias de catabolismo de xilose: a via da oxirredução e a via da isomerização (Figura 2).

A via da oxirredução da xilose é encontrada principalmente em leveduras e fungos filamentosos, e é composta de duas etapas: na primeira a xilose é reduzida a xilitol pela xilose redutase (XR) e este, oxidado à xilulose pela xilitol desidrogenase (XDH - Figura 2: A). Na via da isomerização a xilose é isomerizada a xilulose pela xilose isomerase (XI - Figura 2: B) encontrada principalmente em procariotos, mas também presente em fungos filamentosos. Em ambas as vias a xilulose é fosforilada à xilulose-5-fosfato pela xiluloquinase (XK). A xilulose-5-fosfato é metabolizada pela via das pentoses fosfato até entrar na via glicolítica (KARHUMAA et al., 2007; KUYPER et al., 2003).

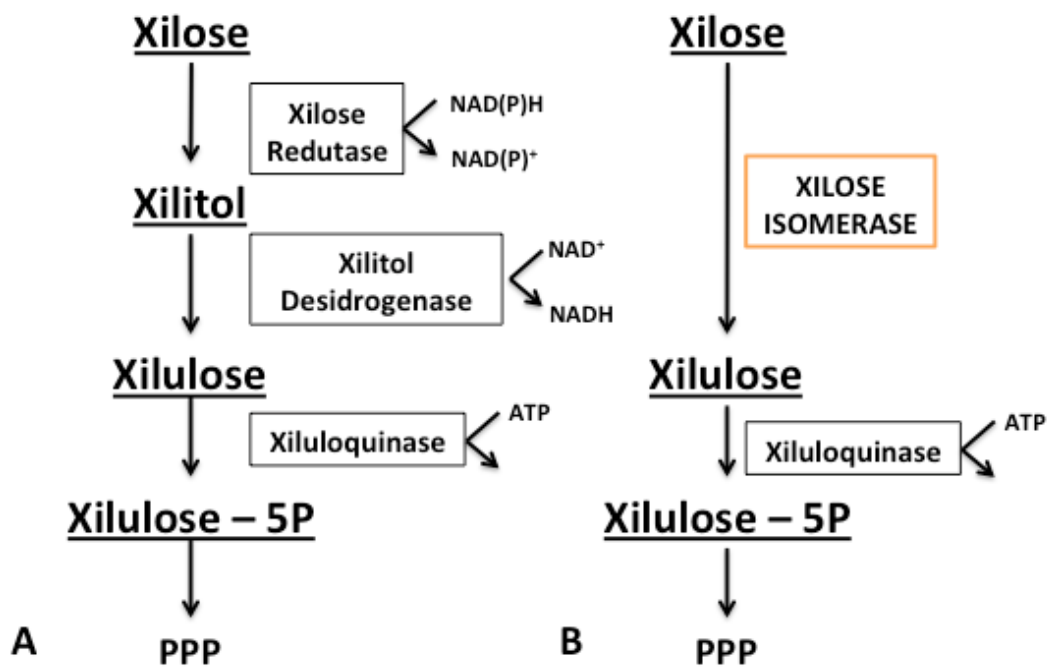


Figura 2: Vias metabólicas de catabolismo da xilose: A = oxirredução e B = isomerização.

Adaptado de: KARHUMAA et al., 2007.

Na via de oxirredução, as duas enzimas envolvidas na conversão de xilose à xilulose, utilizam diferentes cofatores. Enquanto XDH utiliza unicamente NAD^+ , XR utiliza preferencialmente NADPH (KOTTER; CIRIACY, 1993). Esta diferença gera um desbalanço de cofatores, levando ao excesso de formação de NADH (BRUINENBERG et al., 1983).

Anaerobicamente, o excesso de NADH pode ser reoxidado, por meio da formação de xilitol (TOIVARI et al., 2004). O desbalanço de cofatores é um dos responsáveis pela redução da produtividade de etanol (KUYPER et al., 2004). Enquanto isso, a xilose isomerase depende da presença de cátions divalentes para atuar, frequentemente Co^{2+} , Mn^{2+} ou Mg^{2+} , dependendo da origem da enzima (BHOSALE; RAO; DESHPANDE, 1996).

As duas vias metabólicas são encontradas em diversos microrganismos entre archaeas, bactérias, fungos filamentosos e leveduras, capazes de fermentar xilose (HAHN-HÄGERDAL et al., 2006). Pelo interesse na utilização de xilose como fonte de carbono para produção de etanol, a expressão heteróloga e a modificação destas vias em diferentes organismos têm sido amplamente exploradas (revisado por HAHN-HÄGERDAL et al., 2007).

Atualmente já foram construídas linhagens recombinantes de *Zymomona mobilis*, *Klebsiella oxytoca* e *Escherichia coli* entre outras, capazes de fermentar xilose a etanol (revisado por HAHN-HÄGERDAL et al., 2006). Entretanto, o organismo mais comumente utilizado em processos fermentativos industriais de produção de etanol é a levedura *Saccharomyces cerevisiae* (HAHN-HÄGERDAL et al., 2006).

4. *Saccharomyces cerevisiae*

Saccharomyces cerevisiae é uma levedura amplamente conhecida e utilizada pelos seres humanos. Desde a antiguidade é aplicada na panificação e na produção de vinhos e cervejas (NEVOIGT, 2008). Atualmente, é o eucarioto mais bem descrito e conhecido genética, fisiológica e metabolicamente (revisado por PAES; ALMEIDA, 2014). Seu genoma foi o primeiro de eucariotos a ser completamente sequenciado (GOFFEAU et al., 1996).

A quantidade de conhecimentos acumulado sobre este organismo, e disponível em bancos de dados, o torna uma plataforma atraente para melhoramentos genéticos e para engenharia metabólica (NEVOIGT, 2008; PAES; ALMEIDA, 2014; VAN MARIS et al., 2006). Atualmente é aplicado em indústrias para a produção dos mais diversos compostos, dentre eles propanodiol, farneseno, metil-ésteres, butanol, ácido succínico, lactato, glicerol, e claro, etanol (NEVOIGT, 2008; PAES; ALMEIDA, 2014).

Apesar de conhecermos o potencial de bactérias e outros microrganismos como possíveis produtores de etanol em escala industrial, a *S. cerevisiae* é hoje o microrganismo mais comumente utilizado na produção de biocombustíveis (VAN MARIS et al., 2007). Algumas características intrínsecas à *S. cerevisiae* são amplamente desejáveis, como sua

capacidade de produzir etanol a altas taxas e com alto rendimento a partir de açúcares simples em diferentes condições de aeração (PAES; ALMEIDA, 2014).

A *S. cerevisiae* é a principal levedura que apresenta crescimento rápido em hexoses em condição de anaerobiose (KUYPER et al., 2003). Esta característica é fundamental para aplicação industrial da levedura, uma vez que a produção de etanol se dá em reatores, onde a aeração do sistema é considerada economicamente inviável (VAN MARIS et al., 2006). Além disso, *S. cerevisiae* apresenta alta tolerância a etanol, e é capaz de crescer em baixo pH, o que reduz problemas de contaminação do sistema por bactérias (NEVOIGT, 2008; PAES; ALMEIDA, 2014). Outro fator relevante para a produção de etanol de segunda geração, a *S. cerevisiae* também apresenta maior tolerância a compostos inibidores formados durante o processo de pré-tratamento da biomassa quando comparada a outros microrganismos (OLSSON; HAHN-HÄGERDAL, 1993).

Uma vez que a *S. cerevisiae* é a principal levedura utilizada para produção de etanol de primeira geração, ao tentar aplicar a mesma levedura para produção de etanol de segunda geração, esbarramos em restrições quanto à sua capacidade de fermentar todos os açúcares presentes na biomassa (GONG et al., 1983). Dentre os carboidratos encontrados na fração lignocelulósica, as linhagens selvagens de *S. cerevisiae* são capazes de fermentar outras hexoses além da glicose, como manose, frutose e galactose, por vias acopladas à via das pentoses fosfato. Entretanto estas linhagens são incapazes de fermentar ou assimilar pentoses (xilose e arabinose) (BATT et al., 1986; GONG et al., 1983), com exceção da D-xilulose, um isômero de xilose, que pode ser lentamente metabolizado na via das pentoses fosfato (UENG et al., 1981) ao ser fosforilada à D-xilulose-5-fosfato pela xiluloquinase (XK) (RODRIGUEZ-PEÑA et al., 1998).

4.1. Engenharia metabólica de *S. cerevisiae*

A engenharia metabólica, ou seja, a manipulação de fluxos metabólicos para produção de compostos desejados baseia-se em conhecimentos de genética, biologia molecular e bioquímica, como estratégia de melhoramento de organismos (NEVOIGT, 2008; VAN MARIS et al., 2007). Dentre as estratégias de engenharia metabólica de microrganismos podemos destacar quatro principais alvos frequentemente abordados no melhoramento de linhagens para o aproveitamento de xilose na produção de etanol de segunda geração: i) aumento de afinidade e especificidade dos transportadores para internalização de xilose (HAMACHER et al., 2002; SUBTIL; BOLES, 2012) e a cofermentação de açúcares (KIM et

al., 2012); ii) expressão heteróloga de genes da via da isomerização e iii) da via de oxirredução da xilose (revisado por CAI; ZHANG; LI, 2012; SAUER, 2001; VAN MARIS et al., 2007) e iv) outros genes envolvidos com o metabolismo de xilose (revisado por VAN VLEET; JEFFRIES, 2009; NEVOIGT, 2008).

Outra estratégia que pode ser utilizada para melhoramento genético é a evolução adaptativa. Refletindo os princípios da seleção natural, a evolução adaptativa se aproveita da variação genética existente entre indivíduos para selecionar aqueles mais aptos diante de determinada pressão seletiva (SAUER, 2001). No caso de microrganismos utilizados em biotecnologia, a evolução adaptativa pode ser utilizada para obter linhagens mais tolerantes a compostos inibidores, linhagens com maior eficiência na produção de compostos desejáveis e na utilização de diferentes substratos (NEVOIGT, 2008; PAES; ALMEIDA, 2014; VAN MARIS et al., 2007).

Para que a *S. cerevisiae* seja capaz de utilizar outros carboidratos que não a glicose são necessários três requisitos principais. Primeiramente, a levedura deve ter transportadores funcionais para o carboidrato, caso contrário, este será fisicamente impossibilitado de participar de qualquer via metabólica. Em segundo lugar, é necessário que exista uma via ativa de catabolismo do carboidrato que se conecte com a via glicolítica para utilização deste carbono. Adicionalmente, é necessário que o balanço redox da célula seja mantido durante a utilização desses carboidratos (VAN MARIS et al., 2006).

A *S. cerevisiae* apresenta um conjunto de genes que possibilitariam a assimilação da xilose pela via de oxirredução (BATT et al., 1986; GONG et al., 1983). Na presença de xilose, genes essenciais para o metabolismo deste açúcar são induzidos, o que sugere que *S. cerevisiae* já foi capaz de crescer em xilose (TOIVARI et al., 2004). Entretanto, os baixos níveis de expressão destes genes, ocasionando a impossibilidade de converter eficientemente xilose a xilulose, inviabilizam o crescimento da levedura em xilose como única fonte de carbono (BATT et al., 1986; MATSUSHIKA et al., 2009).

É importante ressaltar que, o gene responsável pela enzima xiluloquinase, presente em ambas as vias de metabolismo de xilose, é endógeno da levedura *S. cerevisiae* (RODRIGUEZ-PEÑA et al., 1998), e responsável pela capacidade desta levedura de metabolizar xilulose (UENG et al., 1981) Figura 2).

Imagina-se que *S. cerevisiae* tenha evoluído de forma que a atividade das enzimas endógenas envolvidas no metabolismo de xilose seja tão baixa que impossibilitem o seu crescimento (TOIVARI et al., 2004; VAN MARIS et al., 2007).

Duas principais soluções têm sido propostas para possibilitar o eficiente uso de xilose para produção de etanol pela *S. cerevisiae*. Primeiramente, selecionar ou engenheirar uma linhagem de *S. cerevisiae* capaz de utilizar o mesmo conjunto de cofatores tanto para XR quanto para XDH, evitando acúmulo de xilitol. Outra alternativa seria a expressão heteróloga de uma XI sem a necessidade de enfrentar os problemas de desbalanço de cofatores da oxirredução, uma vez que essa enzima utiliza cátions divalentes como cofator (revisado por VAN MARIS et al., 2007; VAN VLEET; JEFFRIES, 2009).

5. XI *Piromyces*

Dado o potencial no desenvolvimento de linhagens de *S. cerevisiae* capazes de utilizar xilose para a produção de etanol, há também um grande interesse na identificação e caracterização de novos genes codificadores de XI. Diferentes XI foram identificadas em grupos de archaea (JOHNSEN; SCHÖNHEIT, 2004; JOHNSEN et al., 2009) e bactéria, animais (DING et al., 2009), além de algumas plantas. O banco de dados de proteínas Interpro (HUNTER et al., 2012) tem registradas atualmente mais de 3165 sequências da família das xiloses isomerases, sendo 5 de archaeas, 200 de eucariotos e mais de 2960 de bactérias, além de algumas sequências não classificadas (INTERPRO, 2015).

Durante décadas, não houve sucesso nas tentativas de expressão de xiloses isomerases de diferentes microrganismos em *S. cerevisiae* (revisado por VAN MARIS et al., 2007). No estudo de Sarthy de 1987, em que a xilose isomerase de *E. coli* foi expressa em *S. cerevisiae*, diferentes hipóteses foram propostas para explicar o fracasso da expressão da XI na levedura, tal como modificações pós-traducionais, mal dobramento de proteína, pH intracelular ou inespecificidade de cofatores. Entretanto, nenhum fator determinante foi encontrado (GÁRDONYI; HAHN-HÄGERDAL, 2003; MOES; PRETORIUS; ZYL, 1996; SARTHIIY et al., 1987).

Em 1996 foi obtida uma linhagem de *S. cerevisiae* com atividade significativa de XI, a partir da expressão heteróloga do gene de *Thermus thermophilus*. Entretanto, a temperatura ótima para funcionamento da enzima, compatível com a origem termofílica do organismo, era inviável para *S. cerevisiae* (WALFRIDSSON et al., 1996).

Em 2003, KUYPER e colaboradores descreveram a expressão funcional de uma xilose isomerase eucariótica em *S. cerevisiae*. O fungo filamentosso anaeróbico obrigatório *Piromyces sp.*, do qual se originou o gene utilizado, foi isolado das fezes do elefante indiano. No entanto, não foi identificada a atividade das enzimas da via de oxirredução. Os autores demonstraram

que a via da xilose presente no fungo era de isomerização, e não oxirredução como comumente encontrada em eucariotos. Após identificar o possível gene codificador para XI, e expressá-lo em linhagem laboratorial de *S. cerevisiae*, observou-se o crescimento da levedura em meio mínimo com xilose com taxa de crescimento de 0,005 h⁻¹. A expressão de XI de *Piromyces* em *Saccharomyces cerevisiae*, apesar de não ser a única funcional descrita, impulsionou estudos na área de expressão da via de XI para fermentação anaeróbia de xilose para produção de etanol.

Neste trabalho, os genes *XylA* de *Piromyces sp.* e *XKS1* endógeno de *S. cerevisiae* foram clonados em vetores episomais sob controle dos promotores constitutivos fortes GPD (BITTER; EGAN, 1984) e TEF (COTTRELLE et al., 1985) de *S. cerevisiae*, respectivamente. Os vetores episomais permitem um maior nível de expressão dos genes devido às múltiplas cópias do plasmídeo que podem ser mantidas no citoplasma. O alto nível de expressão dos genes é desejável para possibilitar o crescimento dos transformantes em xilose.

O desenvolvimento de linhagens laboratoriais eficientes na conversão anaeróbia de xilose a etanol é fundamental para a melhor compreensão dos mecanismos envolvidos no processo, e aplicação destes conhecimentos em leveduras industriais. Adicionalmente, considerando a diversidade microbiológica, a identificação e caracterização de novas XI podem revelar enzimas ainda desconhecidas, e com potencial para aplicação biotecnológica na produção de etanol.

OBJETIVOS

Objetivo geral

- **Construção de linhagens recombinantes de *S. cerevisiae* para aproveitamento de xilose na produção de etanol.**

Objetivos específicos

- Construção de linhagens transformantes capazes de utilizar xilose através da via de isomerização;
- Evolução adaptativa das linhagens transformantes para utilização de xilose como única fonte de carbono;
- Caracterização fisiológica das linhagens recombinantes geradas
- Desenvolvimento de linhagens para seleção de novas XI.

MATERIAIS E MÉTODOS

1. Microorganismos

Linhagens de bactérias e leveduras congênicas utilizadas no trabalho (Tabela 2).

Tabela 2: Linhagens de microrganismos utilizados neste trabalho.

Bactérias		
Linhagens	Genótipo	Referência
<i>E. coli</i> XL 10 Gold	Tet ^r Δ(<i>mcrA</i>)183 Δ(<i>mcrCB</i> <i>hsdSMR-mrr</i>)173 <i>endA1</i> <i>supE44 thi-1 recA1</i> <i>gyrA96 relA1 lac Hte</i> [F' <i>proAB lacI^qZΔM15 Tn10</i> (Tet ^r) Amy Cam ^r]	Stratagene (ROTHEN et al., 1998)
Leveduras		
Linhagens	Genótipo	Referência
<i>S. cerevisiae</i> CEN.PK 113.3C	<i>MATa, trp1-289, MAL2-8C, SUC2</i>	(ENTIAN; KOTTER, 2007)
<i>S. cerevisiae</i> CEN.PK 113.14A	<i>MATa, ura3-52, trp1-289, MAL2- 8C, SUC2</i>	(ENTIAN; KOTTER, 2007)

2. Genes

Genes da via de catabolismo de xilose utilizados na construção de cassete para expressão em *S. cerevisiae*.

XylA: gene codificador para xilose isomerase de *Piromyces sp.*

XKS1: gene endógeno de *S. cerevisiae* para expressão de xiluloquinase.

3. Oligonucleotídeos

Conjunto de oligonucleotídeos utilizados neste trabalho (Tabela 3).

Tabela 3: Oligonucleotídeos utilizados na construção de cassetes de expressão.

	Oligonucleotídeo	Sequência (5' → 3')	Descrição	Referência
1	BamHI-GPD - F	CG GGATCC agtttatcattatcaa tactgc	Amplificação de cassete de expressão a partir do promotor GPD inserindo sítio de restrição <i>BamHI</i> na região 5' do gene.	(MUMBERG; MULIER; FUNK, 1994)
2	BamHI-Cyc-R	CG GGATCC ggccgcaaattaa gc	Amplificação de cassete de expressão a partir de terminador Cyc inserindo sítio de restrição <i>BamHI</i> na região 5' do gene.	(MUMBERG; MULIER; FUNK, 1994)
3	BamHI-TEF-F	CG GGATCC catagctcaaaaatg ttct	Amplificação de cassete de expressão a partir de promotor TEF	(MUMBERG; MULIER; FUNK, 1994)
7	SpeI - <i>XylA</i> - F	GTGGCCCA GCCGGC- CAAAATGG CTAAGGAA TATTTC	Amplificação do gene para <i>XIPiro (XylA)</i> inserindo sítio de restrição <i>SpeI</i> na região 5' do gene.	(KUYPER et al., 2003)
8	Sal - <i>XylA</i> -R	AATC- TAGATATTG GTACATGGC ACAATAG	Amplificação do gene para <i>XIPiro (XylA)</i> inserindo sítio de restrição <i>Sall</i> na região 3' do gene.	(KUYPER et al., 2003)
9	SpeI 5'- <i>XKS1</i> -F	gACTAGTatgt tgtgttcagtaattca g	Amplificação do gene para <i>XK (XKS1)</i> inserindo sítio de restrição <i>SpeI</i> na região 5' do gene.	(KUYPER et al., 2005)
10	3' <i>XKS1</i> - <i>SalI</i> -R	tgcaGTCGAC attttagatgagagt ctttcc	Amplificação do gene para <i>XK (XKS1)</i> inserindo sítio de restrição <i>Sall</i> na região 3' do gene.	(KUYPER et al., 2005)
11	p423-F	caccagaacttagtt tcgac	Amplificação de porção da região 3' do promotor GPD	Este trabalho
12	P423-R	gcgtgaatgtaagc gtgac	Amplificação de porção da região 5' do terminador TEF	Este trabalho

4. Vetores

Vetores utilizados no trabalho (Tabela 4).

Tabela 4: Vetores em *E. coli* e *S. cerevisiae*.

Plasmídeo	Descrição	Referência
p424	P _{GPD} T _{Cyc} , ampR , TRP1, 2 μ origin	(MUMBERG; MULIER; FUNK, 1994)
P426	P _{TEF} T _{Cyc} , ampR , URA3, 2 μ origin	(MUMBERG; MULIER; FUNK, 1994)
pRH218	pBluescript II SK+, URA3, 2 μ origin + PHXT7-Piromyces XI-THXT7	(HECTOR et al., 2011a)
pRH195	pBluescript II SK?, TRP1, CEN6, ARSH4 ? PHXT7-XKS1-THXT7	(HECTOR et al., 2011b)

5. Enzimas

5.1. Enzimas de restrição

As enzimas de restrição utilizadas foram *Fast Digest Restriction Enzyme* (Thermo Scientific), seguindo recomendações do fabricante.

5.2. Taq Polimerase

Enzima Taq DNA *Polymerase* (Thermo Scientific) utilizada nas reações de PCR, conforme recomendações do fabricante.

5.3. Pfu Polimerase

Enzima Pfu Polimerase (Thermo Scientific) utilizada nas reações de PCR, conforme recomendações do fabricante.

5.4. T4 DNA Ligase

Enzima T4 DNA Ligase (Thermo Scientific) utilizada nas ligações de fragmentos de DNA, conforme recomendações descritas pelo fabricante.

5.5. RNase A

Enzima RNase A, DNase *and protease-free* (10 mg/mL) (Thermo Scientific) utilizada conforme recomendações descritas pelo fabricante.

6. Marcador molecular

Em géis de agarose foi utilizado o marcador molecular GeneRuler DNA Ladder Mix 0,5 µg/µL (Thermo Scientific) como referência de peso molecular e concentração de DNA.

7. Soluções

As soluções utilizadas são descritas abaixo.

7.1. Antibióticos

Ampicilina

Ampicilina dissolvida em água Milli-Q (concentração final 50 mg/mL) e esterilizada por filtração com membrana Millipore 0,22 µm. Concentração final de uso: 50 µg/mL.

7.2. Análise em gel de agarose

Tampão SB

NaOH	0,8% (p/v)
Ácido Bórico	4,5% (p/v)

pH ajustado com ácido bórico até atingir 8,0.

Brometo de etídio (EtBr)

Brometo de etídio foi diluído em água Milli-Q (concentração final 62,5 µg/mL).
Concentração final de uso: 5µg/mL

7.3. Solução de aminoácidos

Triptofano (Trp)

L-triptofano	1,0% (p/v)
--------------	------------

Dissolvido em água Milli-Q, esterilizado por filtração com membrana Millipore 0,22 µm.

7.4. Solução para Análise em HPLC (Cromatografia líquida de alta performance)

Ácido Sulfúrico (H₂SO₄) 5mM

H ₂ SO ₄	0,049%
--------------------------------	--------

Completar com água Milli-Q.

7.5. Solução de Sais (10X)

Sulfato de amônio ((NH ₄) ₂ SO ₄)	50 g/L
Sulfato de magnésio (MgSO ₄ ·7H ₂ O)	5 g/L
Fosfato de potássio monobásico (KH ₂ PO ₄)	30 g/L

7.6. Solução de Vitaminas (1000X)

Dissolver 0,005g de biotina em 1ml de NaOH 0,1M (hidróxido de sódio) e adicionar 80mL de H₂O. Ajustar pH para 6,5 com HCl 1M/ NaOH 1M. Dissolver as seguintes vitaminas nas soluções de biotina, uma de cada vez. O pH é ajustado para 6,5 após cada adição:

Pantotenato de cálcio ((C ₉ H ₁₆ NO ₅) ₂ Ca)	0,1 g
Niacina (C ₆ H ₅ NO ₂)	0,1 g
Inositol (C ₆ H ₁₂ O ₆)	2,5 g
Cloridrato de tiamina (C ₁₂ H ₁₇ ClN ₄ O ₅)	0,1 g
Cloridrato de piridoxina (C ₈ H ₁₁ NO ₃)	0,1 g
Ácido papa-aminobenzóico (C ₇ H ₇ NO ₂)	0,02 g
Riboflavina (C ₁₇ H ₂₀ N ₄ O ₆)	0,02 g
Ácido fólico (C ₁₉ H ₁₉ N ₇ O ₆)	0,0002 g

Ajustar volume para 100mL com água e pH = 6,5. Esterilizar por filtração com membrana Millipore 0,22 µm, e dividir o volume em tubos de 50mL. Armazenar na geladeira.

7.7. Solução de Elementos Traço (1000x)

Dissolver 1,5 g de EDTA dissódico (etilenodiamino tetracético) em 50mL de H₂O. Adicionar 0,45 g de sulfato de zinco heptahidratado (ZnSO₄·7H₂O). Ajustar pH para 6,0 e adicionar os seguintes componentes, ajustando pH após cada adição:

Cloreto de manganês dihidratado (MnCl ₂ ·2H ₂ O)	0,1 g
Cloreto de cobalto hexahidratado (CoCl ₂ ·6H ₂ O)	0,03 g
Sulfato de cobre pentahidratado (CuSO ₄ ·5H ₂ O)	0,03 g
Molibdato de sódio hidratado (Na ₂ MoO ₄ ·H ₂ O)	0,04 g
Cloreto de cálcio dihidratado (CaCl ₂ ·2H ₂ O)	0,45 g
Sulfato de ferro heptahidratado (FeSO ₄ ·7H ₂ O)	0,3g
Ácido bórico (H ₃ BO ₃)	0,1 g
Iodeto de potássio (KI)	0,01 g

Ajustar pH para 4,0 e o volume para 100mL. Com filtro estéril (Millipore 0,22 µm), dividir em tubos de 50mL e armazenar a solução na geladeira.

7.8. Ergosterol/Tween 80

Dissolver 1,6 g de ergosterol em 64mL de etanol puro em banho-maria à 70°C, adicionar 67,2 g de Tween 80 e ajustar o volume para 200mL com etanol puro. Esterilizar por filtração com membrana Millipore 0,22 µm.

8. Meios de cultura

Os meios de cultura utilizados são descritos abaixo. Todos foram esterilizados por calor úmido a 120°C por 15 min em autoclave.

8.1. Meios de cultura para bactéria

LB (Luria-Bertani)

Peptona	1% (p/v)
Extrato de levedura	0,5% (p/v)
NaCl	1% (p/v)

pH ajustado para 7,2 com solução de NaOH

Esterilizado por autoclave.

Meio LB-Ágar

Meio LB adicionado de ágar 2% (p/v) antes de ser autoclavado.

8.2. Meios de cultura para levedura

Meio YPD (Meio extrato de levedura peptona glicose)

Extrato de levedura	1% (p/v)
Peptona	2% (p/v)
Glicose	2% (p/v)

Esterilizado por autoclave.

Meio YPD-ágar

Meio YPD adicionado de ágar 2% (p/v) antes de ser autoclavado.

Meio YPX (Meio extrato de levedura peptona xilose)

Extrato de levedura	1% (p/v)
Peptona	2% (p/v)
Xilose	2% (p/v)

Esterilizado por autoclave.

Meio YPX-ágar

Meio YPX adicionado de ágar 2% (p/v) antes de ser autoclavado.

Meio YNB 10X (estoque)

YNB: meio sintético

YNB	1,7% (p/v)
Sulfato de amônia	5% (p/v)

Meio YG20 (YNB 1X + Glicose 20g/L)

YNB 10X	10%
Glicose	2% (p/v)

Meio YG20 ágar

Meio YG20 adicionado de ágar 2% (p/v) antes de ser autoclavado.

Meio YX40 (YNB 2X + Xilose 40g/L)

YNB 10X	20%
Xilose	4% (p/v)

Meio YX40 ágar

Meio YX40 adicionado de ágar 2% (p/v) antes de ser autoclavado.

Meio YG20/YX40 (YNB 2X + Glicose 20g/L + Xilose 40g/L)

YNB 10X	20%
Glicose	2% (p/v)

Xilose 4% (p/v)

Meio YG20/X40 ágar

Meio YG20/X40 adicionado de ágar 2% (p/v) antes de ser autoclavado.

Meio mínimo para fermentação em biorreator

Solução de Sais	25%
Solução de Vitaminas	0,25%
Solução de Elementos Traço	0,25%
Ergosterol/Tween 80®	0,125%
Glicose	20 g/L
Xilose	40 g/L

9. Protocolos

9.1. PCR (Polimerase Chain Reaction)

As PCRs foram feitas de acordo com as especificações do fabricante da enzima (Thermo Scientific).

Cada reação de PCR com volume final de 50 µL continha: Tampão de PCR 10X (Thermo Scientific) concentração final 1X, MgCl₂ 50 mM (Thermo Scientific) concentração final 1,5 mM, dNTPs (Thermo Scientific) concentração final 0,2 mM, oligonucleotídeos (Tabela 3) concentração final 0,2 µM, enzima Taq 5U/µL (Thermo Scientific) concentração final 1,25 U/ml, 1 a 3 uL de DNA molde, que quando purificado, variou de concentrações entre 10 e 100 ng por reação, e água Milli-Q completando ao volume final da reação.

No caso da PCR de colônia de bactéria para confirmação de transformante, a quantidade equivalente à uma colônia de células foi diluída em 10 µL de água destilada estéril, em tubos de 0,2mL. Para a cada reação foram utilizados, 2 µL das células em suspensão como DNA molde.

No caso da PCR de colônia de levedura para confirmação dos transformantes, a quantidade equivalente à uma colônia de células foi misturada a 10 µL de água destilada estéril, ou 10 µL da cultura líquida foi centrifugada e ressuspensa em 100 µL de água destilada estéril, em microtubos de 1,5mL. O conteúdo celular foi aquecido a 94 °C por seis

minutos e em seguida resfriado em freezer -80 °C por 15 minutos. Essa variação de temperatura tem por objetivo lisar as células, liberando seu conteúdo celular, incluindo DNA. Posteriormente os tubos foram centrifugados à 10.000 g por 3 minutos para precipitação de componentes celulares, e do sobrenadante, 2 µL foram utilizados como molde para reações de PCR.

As PCRs foram realizadas em termociclador Veriti™ Thermal Cycler (Applied Biosystems) com o seguinte programa: “1ª fase - desnaturação inicial: 95 °C por 5 minutos, 2ª fase – desnaturação: 95 °C por 30 segundos, 3ª fase – anelamento: T_m do oligonucleotídeo por 30 segundos, 4ª fase – extensão: 72° C por 4 minutos, 5ª fase – extensão final: 72 °C por 10 minutos. As etapas 2, 3 e 4 foram repetidas por trinta ciclos, antes da 5ª etapa.

A verificação do funcionamento das PCRs foi feita pela aplicação dos produtos finais da reação e análise por eletroforese em géis de agarose.

9.2. Eletroforese em gel de agarose

Verificações de integridade e quantificação de DNA, funcionamento de PCR, e extração de DNA foram feitos por eletroforese em gel de agarose 1% contendo brometo de etídio. As corridas foram feitas em cubas de eletroforese Thermo Scientific, contendo tampão SB 1X. Os resultados dos géis foram visualizados e fotografados em foto documentador modelo L-PIX Chemi com auxílio do programa L-Pix Image.

9.3. Restrições

As reações de restrição foram feitas com as enzimas de restrição Thermo Scientific utilizando 0,2 µg a 5 µg de DNA. As reações foram feitas em termociclador Veriti™ Thermal Cycler (Applied Biosystems) seguindo tempo definido pelo fabricante para cada enzima.

9.4. Ligação

As reações de ligação inserto com vetor foram feitas com proporção 3:1 (inserto:vetor), utilizando a enzima T4 DNA Ligase (Thermo Scientific) segundo as especificações do fabricante.

9.5. Purificação de fragmento de DNA em gel de agarose

As purificações de DNA das bandas de gel de agarose foram feitas com o Kit *Nucleospin Gel and PCR cleanup* (Macherey-Nagel) segundo as especificações do fabricante.

9.6. Purificação de plasmídeos e PCR

As purificações de DNA de PCR e também de plasmídeos extraídos por midipreparação caseira foram feitos com o kit *GeneJET PCR purification kit* da Thermo Scientific, segundo especificações do fabricante.

9.7. Preparo de células eletrocompetentes

O preparo de células eletrocompetentes foi feita de acordo com protocolo “*High-Efficiency Transformation by Electroporation*” encontrado no manual do eletroporador da Bio-Rad “*MicroPulser™ Electroporation Apparatus Operating Instructions and Applications Guide*,” 2000.

9.8. Preparo e transformação de Levedura

O preparo e transformação de levedura (*S. cerevisiae*) para choque térmico foi feito segundo protocolo “*Large-scale high-efficiency yeast transformation using the LiAc/SS carrier DNA/PEG method*” descrito por GIETZ; SCHIESTL (2007).

9.9. Transformação de Bactéria por eletroporação (*E. coli*)

A transformação por eletroporação foi realizada em *Electroporator 2510* (Eppendorf). Foram adicionados entre 1 e 5 µL do plasmídeo à 50 µL de células eletrocompetentes retiradas do freezer -80 °C e descongeladas no gelo. As células com o DNA foram transferidos para cuvetas de eletroporação de 0,1 cm *Gene Pulser Cuvette* (Bio-Rad) estéril e previamente resfriada. No eletroporador, a cuvetas com células foi submetida à um pulso de 1,8 kV. Após o pulso foi imediatamente adicionado 1mL de meio LB para recuperação das células, e este, transferido para tubo (1,5mL), e incubado à 37 °C por uma hora. Alíquotas de 100 µL, 200 µL e todo o restante do meio foram plaqueados em meio LB sólido contendo o antibiótico adequado. As placas foram incubadas em estufa a 37 °C durante a noite.

9.10. Extração de DNA plasmidial por lise alcalina (Midipreparação de Bactéria)

A extração de DNA plasmidial por lise alcalina de *E. coli* foi feita segundo protocolo descrito no *Protocol 2: Preparation of plasmid DNA by alkaline lysis with SDS: Midipreparation*, encontrado em *Molecular Cloning - A Laboratory Manual* (“Molecular

Cloning - Sambrook & Russel”, 2001). Os plasmídeos foram purificados com RNase A (concentração final 2 µg/µL).

9.11. Extração de DNA plasmidial (Minipreparação de Levedura)

A extração de DNA plasmidial de levedura foi feito segundo o protocolo adaptado “*A simple and highly eficiente procedure for rescuing autonomous plasmids from yeast*” descrito em ROBZYK; KASSIR, (1992).

O cultivo da cultura de levedura foi feito em 5mL de meio, e nas seguintes etapas, foi seguido protocolo conforme descrito pelos autores supracitados. Na etapa de precipitação, após adicionar o etanol gelado, o DNA foi incubado 30 minutos a 20 °C antes de ser centrifugado, lavado e ressuspendido.

10. Curva de crescimento em tubo de ensaio

O teste de crescimento de colônias isoladas das linhagens de transformantes foi feito por fermentação única em meio mínimo com xilose liquido, em tubos de ensaio de 50mL.

As colônias foram plaqueadas em meio YX40 ágar a partir de estoque de glicerol e incubadas em estufa bacteriológica a 30 °C por 144 horas. Colônias aleatórias foram escolhidas e replicadas em placa de meio YG20 ágar, e crescidas durante a noite em estufa a 30 °C. A partir das placas, foi feito o mesmo procedimento de tratamento de inóculo utilizado nas fermentações em erlenmeyer. As seis colônias de cada uma das linhagens de transformante foram inoculadas em meio YG20 e crescidas por 48 horas a 28 °C em shaker rotativo à 180 rpm (MAX Q8000 Thermo Scientific). Após o crescimento, as células foram centrifugadas (1200 g por 5 minutos), o sobrenadante de meio de glicose descartado, e as células ressuspendidas em YX40, incubado a 28 °C por a 180 rpm em shaker rotativo.

A fermentação foi feita em tubos de ensaio de 50 mL, com OD₆₀₀ inicial igual a 0,5 e contendo 7,5 mL de meio YX40, a 28° C em shaker rotativo por 200 horas. Diversos pontos de 200ul foram retirados em diferentes tempos de crescimento, e a densidade celular foi lida em placas de 96 poços (ELISA) por OD₆₀₀ em espectrofotômetro Spectramax 3 (Molecular Devices).

11. Fermentação em erlenmeyer

Os testes de crescimento das linhagens foram realizados por fermentações em meio mínimo com xilose líquido YX40, para análise do perfil de crescimento e produção de metabólitos.

As linhagens foram retiradas de estoques de glicerol em freezer -80°C, plaqueadas em meio YG20 ágar e incubadas a 28 °C por 48h em estufa bacteriológica. Posteriormente, as placas foram utilizadas como fonte para o pré-inóculo líquido, onde as leveduras foram inoculadas em 5 mL de meio YG20 e crescidas por 48h a 28 °C em shaker rotativo a 180 rpm (MAX Q8000 Thermo Scientific). Após este crescimento, as células foram centrifugadas (1200 g por 5 minutos), o sobrenadante foi descartado e lavado com água destilada estéril, e às células foram adicionados 5 mL de YX40, incubado a 28 °C por à 180 rpm em shaker rotativo.

As fermentações foram realizadas em triplicata, em frascos erlenmeyers contendo 50 mL de meio YX40, a 28° C em shaker rotativo por 120 horas, em que a cada 24h uma amostra (600 µl) da cultura foi retirada e guardada em freezer -20 °C para futuras análises. A OD₆₀₀ do inóculo de xilose foi medida e calculada forma que OD₆₀₀ inicial das amostras da fermentação fossem 0,5.

A densidade celular foi medida por OD₆₀₀ em espectrofotômetro Spectramax 3 (Molecular Devices) em cuvetas de 1 mL.

12. Fermentação em Biorreator

As cofermentações foram feitas em biorreator New Brunswick™ BioFlo® 115, em 900 mL de meio mínimo de sais suplementado com vitaminas, elementos traço e ergosterol, contendo 40 g/L de Xilose e 20 g/L de glicose.

As amostras foram retiradas de estoque de glicerol em freezer -80 °C e plaqueadas em meio YG20 ágar, incubadas a 28 °C por 48h em estufa bacteriológica. Posteriormente as placas foram transferidas para 5 mL de meio YG20 e incubadas durante a noite a 28 °C em shaker rotativo (180 rpm). Três mililitros deste pré-inóculo foram então inoculados em 100 mL de meio YG20/X40, crescidos também durante a noite a 28°C em shaker rotativo 180 rpm.

A OD₆₀₀ do inóculo foi medida e calculada de forma que a OD₆₀₀ inicial no biorreator fosse igual a 0,5. O crescimento foi feito por 120 horas, a 28° C, 200 rpm e pH igual a 5,5

mantido por adição de base (KOH 3M) quando necessário. Não houve oxigenação durante a fermentação (fermentação anaeróbia). As fermentações foram feitas em duplicatas, e a densidade celular medida por OD₆₀₀ de amostras retiradas em diferentes tempos de cultura e congeladas para futuras análises. As ODs foram medidas em espectrofotômetro Spectramax 3 (Molecular Devices) em cuvetas de 1 mL.

13. Condicionamento de Leveduras

O condicionamento das leveduras transformantes foi feito por transferências sucessivas das leveduras em meio mínimo seletivo (YX40). Inicialmente, cada vez que a levedura atingia OD₆₀₀ igual a três, 1ml do crescimento era transferido para novo meio. Após dez ciclos, a cada vez que a levedura atingia crescimento de OD₆₀₀ igual a três, era transferida para novo meio com OD₆₀₀ final igual a 0,2. O processo de condicionamento foi executado por aproximadamente nove meses em quarenta e três ciclos de transferência. Nos últimos dez ciclos, a levedura era transferida para novo meio a cada 24 horas. Ao final, a linhagem gerada foi denominada “condicionada”.

14. Cura de Leveduras

A cura dos plasmídeos presentes no citoplasma das leveduras transformantes foi realizada através de transferências sucessivas das leveduras transformantes crescidas em meio completo suplementado com aminoácido de seleção.

Os transformantes condicionados foram inoculados em tubos de centrífuga de 50 mL contendo 5 mL de YPD suplementado com L-triptofano (concentração final 60 mg/L) e crescidos a 28 °C durante a noite em shaker rotativo (180 rpm). No dia seguinte, 100 µL do crescimento foram transferidos para novo tubo contendo meio suplementado. Após 10 ciclos de transferência, as leveduras foram plaqueadas em YPD para isolamento de colônia e incubadas durante a noite em estufa a 28 °C. No dia seguinte, com as colônias crescidas, 52 colônias de cada levedura transformante foram escolhidas e isoladas no teste de cura.

14.1. Teste de Cura

O teste da cura foi feito em placas de meio YPD e YG20 ágar, utilizando mapa de placa de Petri quadriculado e numerado. Cada colônia isolada da placa de YPD foi resgatada com palito e plaqueada em um mesmo espaço numerado tanto em meio YG20 quanto em

YPD, nesta ordem. As placas com o mapa foram incubadas em estufa a 28 °C até que as colônias crescessem.

14.2. Teste fisiológico de confirmação da cura

As linhagens curadas foram submetidas a um teste fisiológico para confirmar a perda de capacidade de crescer em meio mínimo e de utilizar xilose como fonte de carbono.

As amostras das três linhagens condicionadas e curadas foram plaqueadas em meio YG20 e incubadas em estufa bacteriológica a 30 °C durante a noite. A partir das placas, uma quantidade equivalente a uma colônia de cada uma das linhagens foi inoculada em três tubos, cada um contendo 5 mL de meio YPX, YG20 ou YX40.

Amostras de 200 µL foram retiradas a cada 24 horas, e a densidade celular foi lida em placas de 96 poços (ELISA) por OD₆₀₀ em espectrofotômetro Spectramax 3 (Molecular Devices).

15. Análise de metabólitos – HPLC

A análise quantitativa dos metabólitos produzidos (etanol, glicerol, ácido acético e xilitol) e consumo de substrato (glicose e/ou xilose) nas fermentações foi feita por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). As amostras retiradas nos diferentes tempos das fermentações foram centrifugadas, diluídas duas vezes em água Milli-Q e injetadas em cromatógrafo Agilent 1260 Infinity utilizando coluna Aminex HPX-87H (Bio-Rad) aquecido a 45°C, como fase móvel 5 mM H₂SO₄, fluxo de 0,6 mL/minuto. A detecção dos compostos foi efetuada por detector de índice de refração. O *software* utilizado foi o Agilent Openlab Control Panel para análise dos cromatogramas. A quantificação dos compostos foi realizada ao comparar os mapas gerados com mapas de padrões com concentrações definidas dos compostos de interesse.

16. Atividade enzimática

16.1. Preparo de extrato celular

As amostras foram plaqueadas em meio YG20 e incubadas em estufa bacteriológica a 30 °C por 48 horas. A partir das placas foi feito um inóculo em 20 mL de meio YG20 em erlenmeyers de 100 mL, incubados por 48 horas a 28 °C em shaker rotativo a 180 rpm (MAX Q8000 Thermo Scientific). As células foram então centrifugadas, lavadas com água destilada estéril e inoculadas em 20 mL de YX40 nas mesmas condições por 24 horas. Após incubação,

as células foram centrifugadas (10.000 X g por 5 minutos) e lavadas com água destilada estéril. As células foram ressuspensas em 500 µL de Y-PER™ (Yeast Protein Extraction Reagent – Life Technologies) e incubadas por 30 minutos em plataforma oscilante à temperatura ambiente. As amostras foram então centrifugadas a 10.000 g por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo, mantido em gelo, e utilizado como substrato do ensaio enzimático.

16.2. Atividade enzimática

O ensaio de atividade enzimática de XK foi feito segundo protocolo descrito em LUCCIO *et al.* (2007).

O ensaio foi realizado à temperatura ambiente, em tampão Hepes 50mM contendo 10mM MgCl₂, 50mM KCl e BSA 1mg/mL. Ao tampão, foram adicionados os seguintes reagentes, (com suas respectivas concentrações finais na reação) NADH 0,3mM, Fosfoenolpiruvato 1mM, ATP 5mM, D-xilulose 4,3mM, Piruvato quinase 3U/mL, Lactato desidrogenase 5,4U/mL. Ao final foi adicionado 50 µL, 75 µL ou 100 µL de extrato celular para os ensaios. O volume final da reação foi de 1mL.

A reação ocorre uma vez que o substrato (D-xilulose) é convertido a D-xilulose-5-fosfato pela XK presente no extrato celular, ao custo de um ATP. O ADP liberado é utilizado pela piruvato quinase para converter o fosfoenolpiruvato à piruvato, e este é reduzido a D-lactato pela lactato desidrogenase, ao custo de um NADH. A depleção do NADH é medida a 340 nm por 10 minutos.

O controle da atividade enzimática foi feito ao adicionar todos os componentes da reação exceto o extrato celular, em que não deve haver depleção do NADH.

16.3. Normalização por curva de Bradford

O ensaio foi normalizado pela quantidade de proteína presente no substrato, através de curva de Bradford (Sigma – Aldrich) feita com BSA, medido a 595nm com espectrofotômetro, de acordo com as instruções do fabricante.

16.4. Análise estatística

Foi aplicado um teste estatístico One-Way ANOVA com pós teste Tukey para comparar se as diferenças entre as atividades de XK das diferentes linhagem eram

estatisticamente significativas. O nível de significância adotado para as análises foi de 5%. O teste foi realizado em plataforma online (VASAVADA, 2014).

17. Sequenciamento da XI_{Piro} condicionada

As amostras foram sequenciadas através de metodologia Sanger (SANGER; COULSON, 1975) pela empresa Eurofins Genomics, utilizando o par de oligonucleotídeos 11/12 (Tabela 3) para amplificação de XI.

O *software* utilizado para análise do sequenciamento foi o Geneious 8.1 (disponível em Geneious website - <http://www.geneious.com/>) (KEARSE et al., 2012).

No Geneious as sequências foram visualizadas e as extremidades de baixa qualidade foram removidas. Para os plasmídeos das linhagens L7XIΦ e L7XIXK foram gerados *contigs* a partir dos dez fragmentos (cinco 5' terminal e cinco 3' terminal) sequenciados. Para o plasmídeo da linhagem L2XI e p424-XI foi montado um *contig* a partir dos fragmentos (5' terminal e 3' terminal) sequenciados. Os *contigs* foram alinhados utilizando a ferramenta MUSCLE.

Foi feito um BLASTx da sequência consenso formada pelo alinhamento dos quatro *contigs* (p424, L2XI, L7XIΦ, L7XIXK) contra banco de dados de proteína (nr).

17.1. Preparação de amostras para sequenciamento

Os plasmídeos das leveduras condicionadas a serem sequenciados foram extraídos através do protocolo de extração de DNA plasmidial de levedura. O DNA extraído foi utilizado para transformar a *E. coli* por eletroporação, e, a partir das placas da transformação, foram selecionadas colônias de cada grupo transformado.

Para análise do gene da amostra de L2XI condicionado, DNA foi extraído da levedura e amplificado por PCR com par de oligonucleotídeos 11/12 (Tabela 3) para XI.

Todas as amostras de DNA sequenciadas foram previamente purificadas com kit GeneJET PCR purification Kit (Thermo Scientific).

RESULTADOS

1. Construção de linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* capazes de consumir xilose

1.1. Clonagem dos genes *XKSI* e *XylA*

Para construção de linhagens recombinantes de *S. cerevisiae* capazes de consumir xilose, foi escolhida a via da xilose isomerase. Além disso, o efeito da superexpressão da enzima xiluloquinase foi avaliado. Os genes *XylA* e *XKSI* foram clonados nos vetores p424 e p426, respectivamente. Para tanto, o gene *XylA* de *Piromyces* sp. (*XIPiro*), previamente descrito foi amplificado por PCR com os oligonucleotídeos para amplificação de *XIPiro* (7/8 - Tabela 3) utilizando plasmídeo pRH218 (Tabela 4) como molde. O gene *XKSI* que codifica XK de *S. cerevisiae* também foi amplificado por PCR com o par de oligonucleotídeos para amplificação de XK (9/10 - Tabela 3), utilizando o plasmídeo pRH195, como molde (Tabela 4). Para ambos os genes, os sítios de restrição para *SpeI* e *Sall* foram inseridos nas extremidades 5' e 3', respectivamente. A banda XI de *Piromyces* de aproximadamente 1,4 kb referente ao gene *XIPiro* e a banda de aproximadamente 1,8 kb referente ao gene de XK (Figura 3).

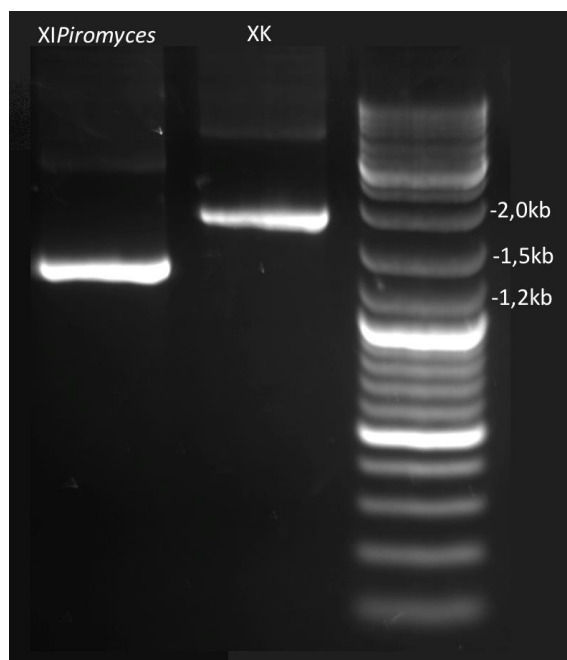


Figura 3: Confirmação da amplificação dos genes *XIPiro* (1,4kb) e *XK* (1,8kb). Análise eletroforética em gel de agarose 1%. Marcador de massa molecular Gene Ruler DNA Ladder Mix (Thermo).

Posteriormente plasmídeos episossomais para a expressão dos genes de interesse na levedura foram construídos (Figuras 4 e 5). O gene de *XIPiro* foi clonado no plasmídeo p424 (Tabela 4) linearizado previamente nos sítios de restrição *Sall/SpeI*, sob controle do promotor GPD, terminador *Cyc* e marca de seleção para TRP. O gene *XK* foi clonado no plasmídeo p426 (Tabela 4) linearizado previamente em *SpeI/Sall* sob controle do promotor TEF, terminador *Cyc* e marca de seleção para URA (Figura 5).

Os sistemas de ligação de p424-XI e p426-XK foram transformados por eletroporação em *E. coli* e plaqueados em LB com ampicilina. A confirmação da clonagem foi realizada por restrição dos mesmos com o par de enzimas *Sall* e *SpeI* utilizados na construção e análise eletroforética em gel de agarose.

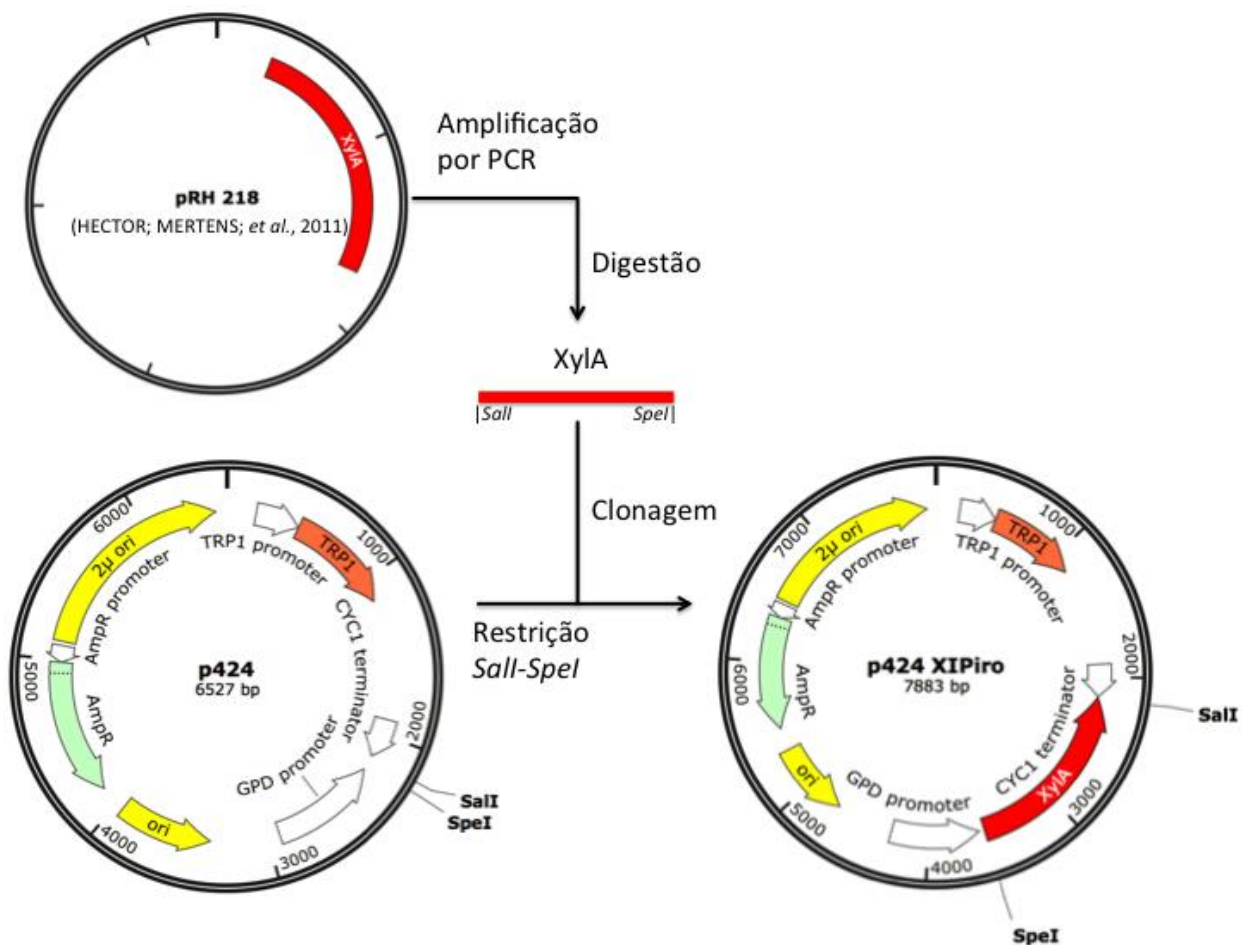


Figura 4: Estratégia de construção do plasmídeo p424-XI. O plasmídeo p42a apresenta 6,5 kb e o gene XKS1 1,4 kb. O plasmídeo gerado (p424-XI*Piro*) tem 7,8 kb.

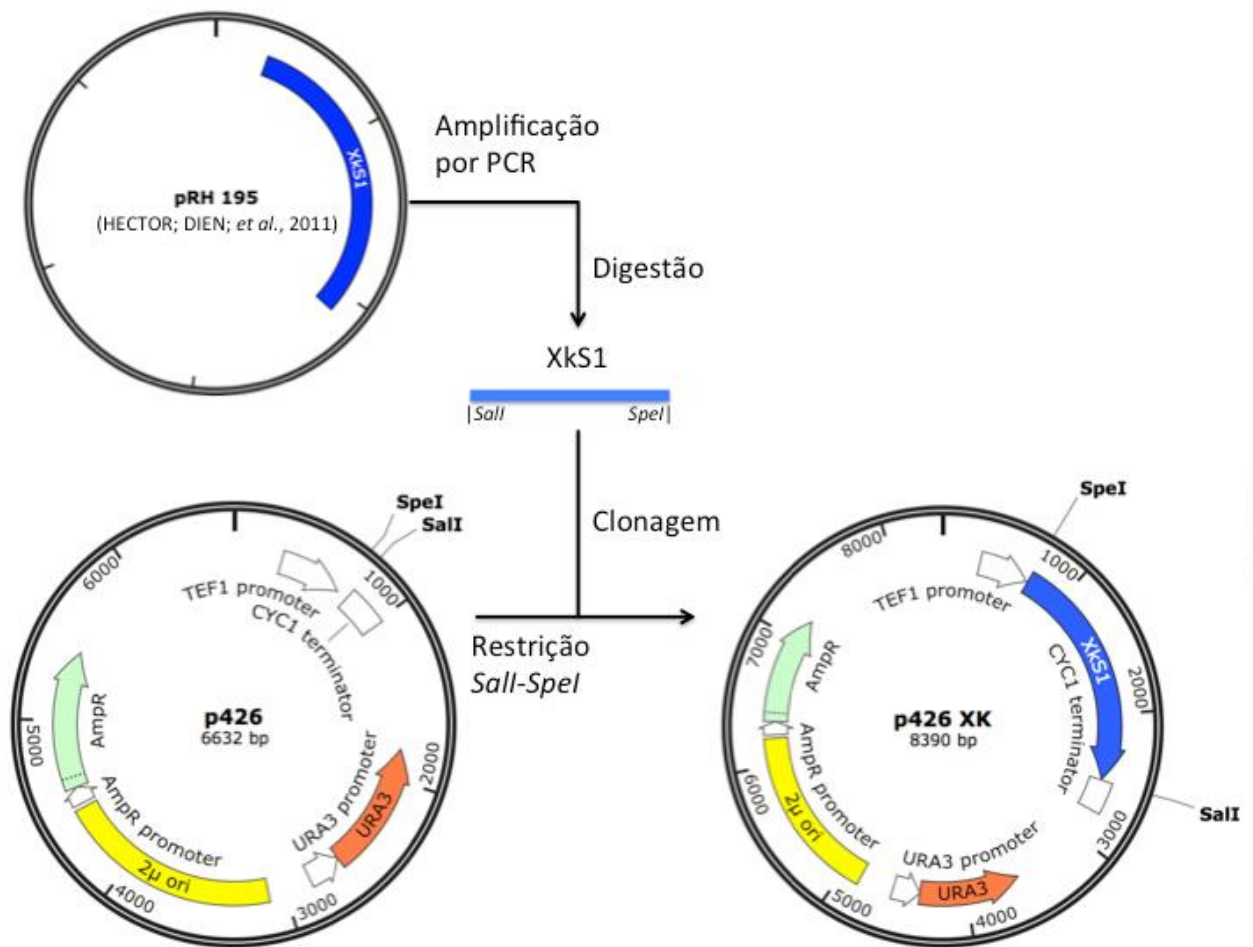


Figura 5 Estratégia de clonagem para a construção do plasmídeo p426-XK. O plasmídeo p426 apresenta 6,6 kb e o gene XKS1 1,8 kb. O plasmídeo gerado (p426-XK) tem 8,3kb.

1.2. Transformação em de Levedura

Os vetores de expressão construídos foram utilizados para transformar duas linhagens isogênicas de *S. cerevisiae*, CEN.PK 113-3C (Levedura 2) e CEN.PK 113-14A (Levedura 7) conforme Tabela 2. Os transformantes obtidos foram selecionados por sua capacidade de crescer em meio mínimo sem aminoácidos (YNB) contendo glicose como única fonte de carbono. As linhagens construídas estão descritas na Tabela 5.

Também foram gerados dois controles negativos, através da transformação das mesmas linhagens, com os vetores de expressão p424, e p424 combinado com p426, porém sem os genes para XI e XK (L2Φ e L7Φ, Tabela 5).

Tabela 5: Linhagens de *S. cerevisiae* transformantes geradas no trabalho, pela inserção dos vetores construídos.

Linhagem	Linhagem original	Genótipo
L2Φ	CEN.PK 113.C	CEN.PK113.C MATa, <i>trp1-289</i> , <i>MAL2-8C</i> , <i>SUC2</i> , p424::TRP
L2XI	CEN.PK 113.C	CEN.PK113.C , MATa, <i>trp1-289</i> , <i>MAL2-8C</i> , <i>SUC2</i> , p424- <i>XylA</i> ::TRP
L7Φ	CEN.PK 113.14A	CEN.PK113.14A MATa, <i>ura3-52</i> , <i>trp1-289</i> , <i>MAL2-8C</i> , <i>SUC2</i> p424::TRP p426::URA
L7XIΦ	CEN.PK 113.14A	CEN.PK113.14A MATa, <i>ura3-52</i> , <i>trp1-289</i> , <i>MAL2-8C</i> , <i>SUC2</i> p424- <i>XylA</i> ::TRP p426::URA
L7XIXK	CEN.PK 113.14A	CEN.PK113.14A MATa, <i>ura3-52</i> , <i>trp1-289</i> , <i>MAL2-8C</i> , <i>SUC2</i> p424 - <i>XylA</i> ::TRP p426 - <i>XKS1</i> ::URA

Os transformantes, contendo o plasmídeo com o gene responsável por complementar a marca auxotrófica, foram capazes de crescer em glicose. Os controles (L2Φ e L7Φ) não cresceram em meio mínimo com xilose como a única fonte de carbono. A seguir foi feito um teste de crescimento com as cinco linhagens em meio mínimo (YNB) com xilose (40 g/L) como única fonte de carbono (Figura 6).

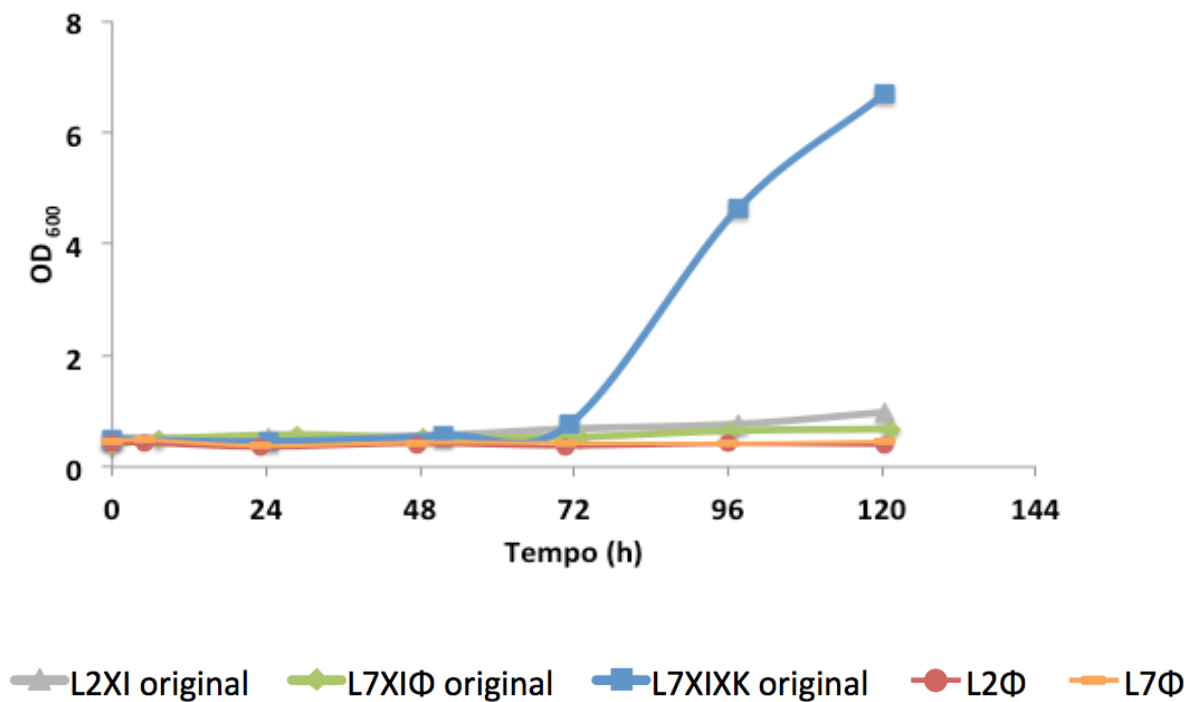


Figura 6: Teste de crescimento das leveduras transformantes geradas. Transformantes L2Φ (vermelho) e L7Φ (laranja) contendo respectivamente os plasmídeos p424 e p424/p426, vazios e as amostras transformantes L2XI (cinza) L7XIΦ (verde) e L7XIXK (azul) expressando genes do catabolismo de xilose. Cada gráfico é um exemplo representativo de fermentação aeróbica feito em duplicata por 120 horas.

Como esperado, não houve crescimento para as amostras controle L2Φ e L7Φ. A linhagem a L7XIXK iniciou crescimento exponencial por volta de 72 horas (Figura 6), enquanto o crescimento das linhagens L2XI e L7XI Φ, só iniciou após 120 horas de crescimento (dados não mostrados).

1.3. Melhoramento genético por evolução adaptativa

As linhagens obtidas após as transformações foram submetidas a processo de evolução adaptativa (condicionamento), em meio mínimo com xilose como única fonte de carbono, como estratégia de melhoramento genético para o consumo de xilose. O condicionamento consistiu de sucessivas transferências da levedura crescida para um novo frasco contendo o mesmo meio.

Inicialmente, 1 mL do crescimento foi transferido cada vez que atingiu OD₆₀₀ igual a

três. Após dez ciclos com esta abordagem, as transferências foram feitas para que a OD₆₀₀ inicial no novo frasco fosse de 0,2 para todos.

Nos últimos dez ciclos de condicionamento, foi adotada a estratégia de transferir a levedura para novo meio a cada 24 horas, com a pressão seletiva voltada para àquelas que começassem a crescer mais rapidamente. No total, o processo de condicionamento foi feito por aproximadamente nove meses. Ao final foram obtidas as linhagens condicionadas dos três transformantes L2XI, L7XIΦ e L7XIXK condicionados.

Um teste de crescimento foi realizado para comparar as três populações de leveduras condicionadas, com os três transformantes originais de L2XI, L7XIΦ e L7XIXK e avaliar os efeitos do processo adaptativo (Figura 7).

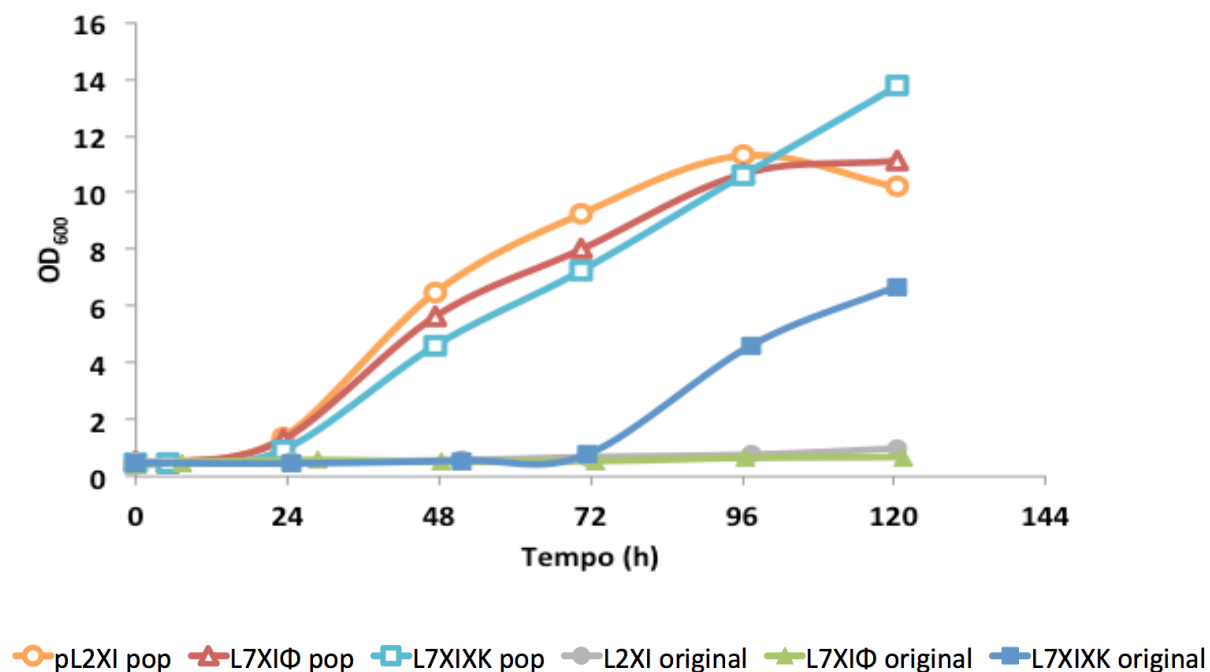


Figura 7: Teste de crescimento entre transformantes isolados originais L2XI (cinza) L7XIΦ (verde) e L7XIXK (azul) e população de transformantes condicionados L2XI (laranja) L7XIΦ (vermelho) e L7XIXK (turquesa). Cada linha é um exemplo representativo de fermentação aeróbica (50 mL YX40 em frasco de 100 mL, OD₆₀₀ inicial: 0,5) feito em duplicata por 120 horas.

Foram observadas duas principais diferenças no padrão de crescimento entre os isolados de transformantes originais e as populações de transformantes condicionadas.

Para todas as linhagens condicionadas, o crescimento em xilose começou após 24

horas de incubação, enquanto o crescimento de L7XIXK original começou após 72 horas, e L2XI e L7XIΦ tiveram crescimento, ainda muito lento, após 120 horas.

A segunda diferença marcante, também para todas as linhagens, se refere à densidade celular final alcançada. Todas as linhagens condicionadas atingiram OD₆₀₀ final igual ou maior que 10. L2XI e L7XIΦ entraram em fase estacionária por volta de 96 horas, enquanto L7XIXK continuou em fase exponencial até 120 horas. A linhagem original L7XIXK, que teve maior crescimento dentre todas, chegou à OD₆₀₀ máxima igual a $7,3 \pm 1,2$ em 120 horas. As linhagens L2XI e L7XIΦ originais atingiram OD₆₀₀ igual a $0,62 \pm 0,1$ e $0,77 \pm 0,05$, respectivamente.

Considerando que as populações condicionadas apresentam variabilidade genética, procedeu-se com o isolamento de clones que representassem o perfil melhorado da população. As amostras condicionadas foram plaqueadas em meio mínimo YX40, e seis colônias de cada uma das linhagens foram selecionadas baseado na sua capacidade de crescer em xilose após incubação de 48 horas.

Posteriormente, o perfil de crescimento em xilose das colônias isoladas de cada uma das populações foi analisado (Figura 8). As colônias não tiveram aparente diferença significativa no perfil de crescimento em nenhum dos três grupos. Entretanto, a colônia de número seis, nos três crescimentos, foi a última a atingir fase estacionária. Portanto, de cada linhagem (L2, L7XIΦ e L7XIXK), a colônia isolada de número seis foi escolhida como fenótipo representativa da população para desenvolvimento das etapas posteriores do trabalho.

A confirmação de que os isolados selecionados apresentavam o gene de *XIPiro* foi feita por PCR de colônia, pela amplificação de XI com par de oligonucleotídeos 11/12 (Tabela 3, Figura 9).

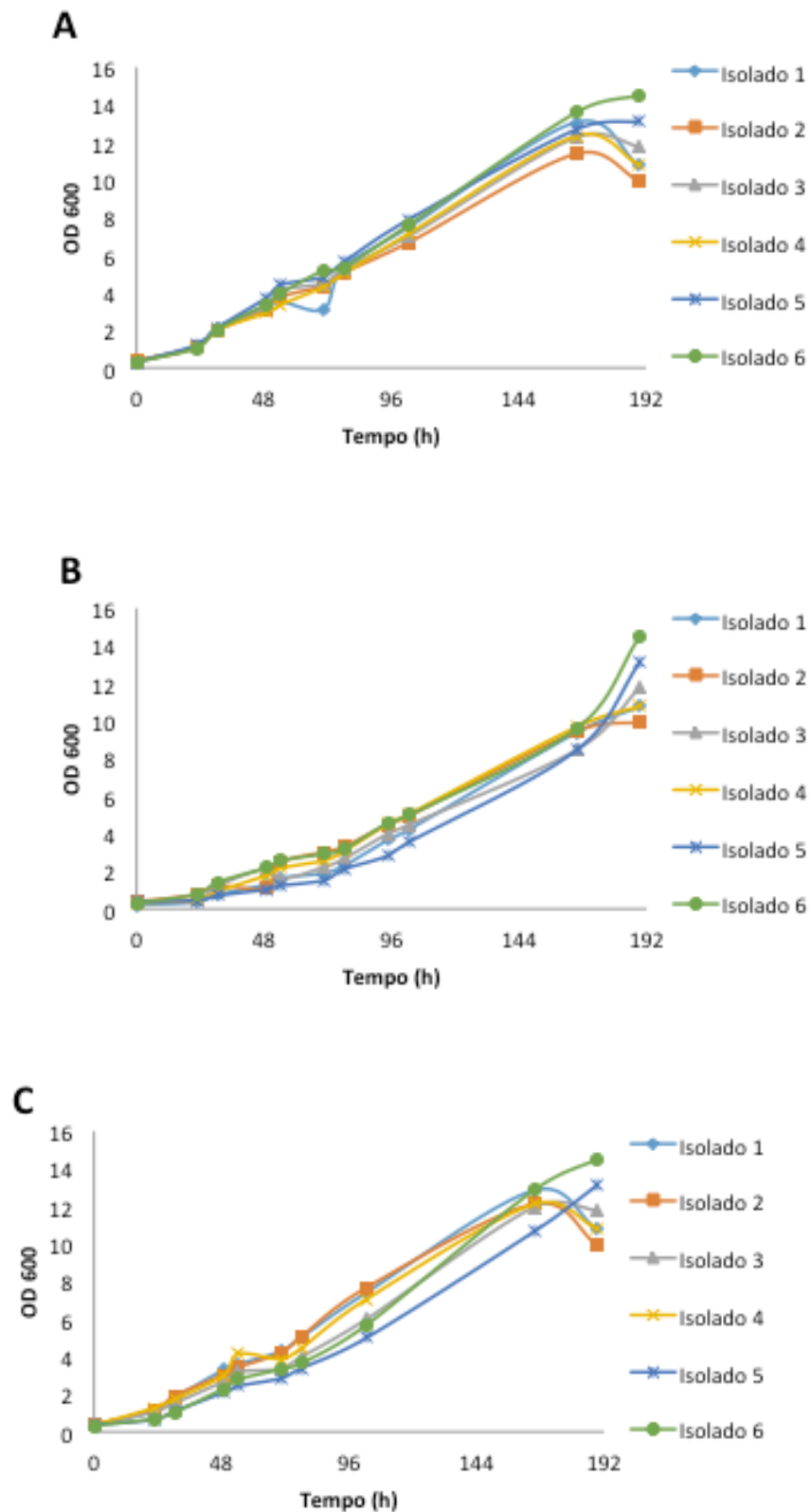


Figura 8: Curva de crescimento de seis colônias isoladas das linhagens obtidas a partir de cada população de condicionadas: L2XI Condicionada (A), L7XI Φ Condicionada (B) e L7XIXK Condicionada (C).

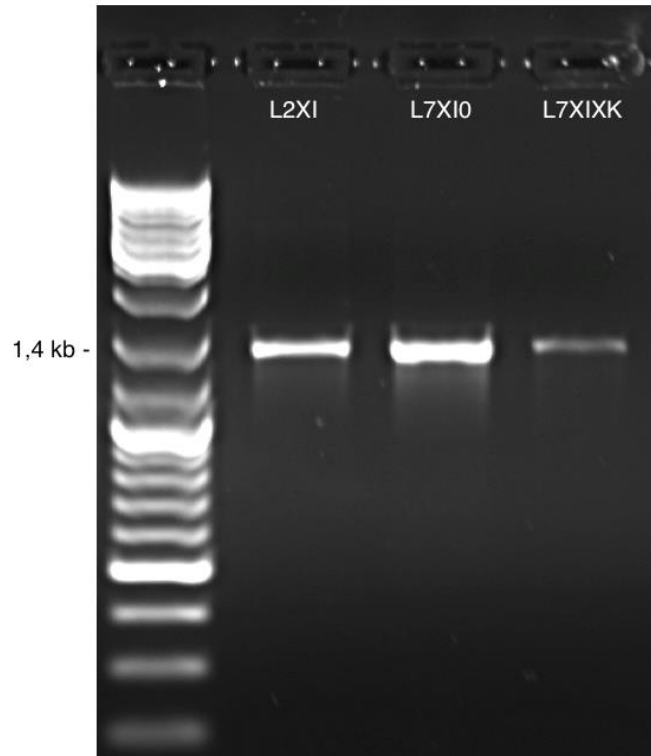


Figura 9: Confirmação da presença do gene *XIPiro* nos isolados condicionados. Análise eletroforética em gel de agarose 1%. PCR de colônia das amostras condicionadas de L2XI, L7XI Φ e L7XIXK, com oligonucleotídeos 11/12. As bandas de aproximadamente 1,4kb são referentes ao gene *XIPiro*. Marcador de massa molecular Gene Ruler DNA Ladder Mix (Thermo).

As PCRs confirmaram a presença dos genes para XI nas leveduras condicionadas. Para verificar a presença de XK nos isolados L7XI Φ e L7XIXK, foi feita uma PCR com par de oligonucleotídeos 3/2 (Tabela 3). Neste caso, foi feita tanto a PCR de colônia, como a PCR do plasmídeo extraído da levedura (Figura 10).

A PCR de colônia apresentou banda de aproximadamente 750 bp referente à amplificação do promotor, sítio de clonagem múltipla (MCS) e terminador, para ambas linhagens L7XI Φ (L7XI0b) e L7XIXK (L7XIXKb), mas nenhuma banda indicando a presença do gene de XK. Entretanto, a PCR do plasmídeo extraído da levedura condicionada L7XIXK, revelou banda de aproximadamente 2,5 kb, referente ao gene para XK (1,8 kb), o promotor, MCS e terminador (L7XIXKa). A mesma banda de 750bp foi encontrada na PCR do plasmídeo extraído de L7XI Φ , indicando que este possui o plasmídeo, entretanto sem o gene para XK, enquanto a L7XIXK apresenta o plasmídeo construído com XK (L7XI0a).

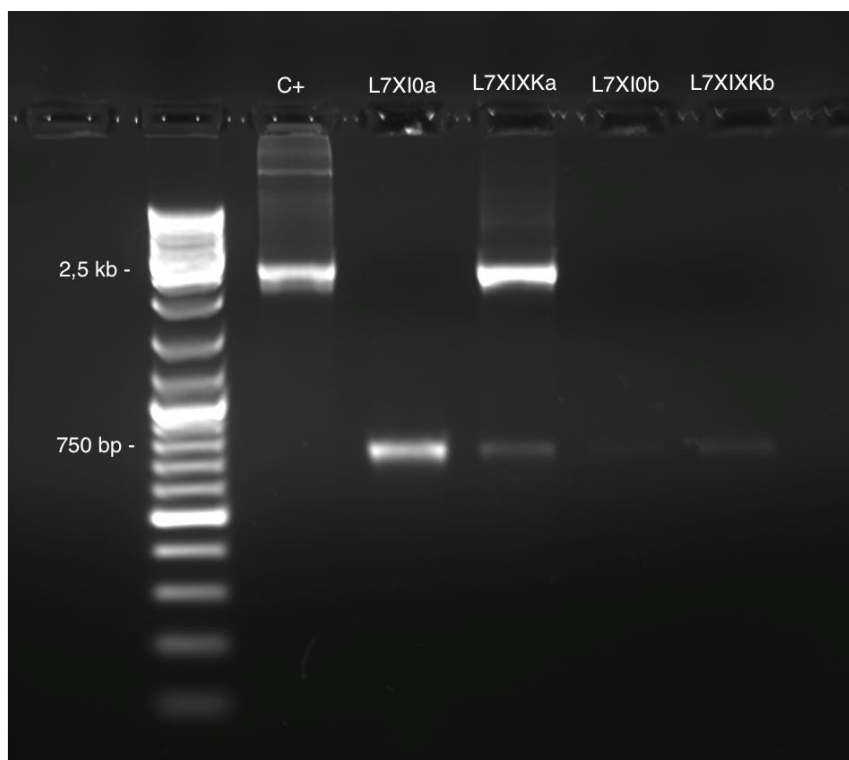


Figura 10: Confirmação da presença do gene XK nos isolados condicionados. Análise eletroforética em gel de agarose 1% para verificação da presença do gene de XK (2,5 kb) nos isolados condicionados L7XI Φ (“a” e “b”) e L7XIXK (“a” e “b”) com oligonucleotídeos 2/3. As amostras “a” são referentes aos plasmídeos extraídos da levedura por mini-preparação como molde para PCR. As amostras “b” são referentes à PCR de colônia. O controle da PCR (C+) é referente à amplificação do gene no plasmídeo construído p426-XK como molde. Marcador de massa molecular Gene Ruler DNA Ladder Mix (Thermo).

A amostra L7XIXKb, em que não houve amplificação do gene de XK em L7XIXK observada na amostra L7XIXKa, pode ser devido a um problema na preparação das células para a PCR de colônia. Precisamente por ter tido problemas na PCR de colônia em eventos anteriores, foram adotadas duas estratégias para análise da presença do gene.

1.4. Avaliação do perfil de crescimento e capacidade fermentativa das linhagens construídas

Após a seleção do isolado de cada linhagem condicionada, foram realizadas fermentações para avaliar o perfil de crescimento e produção de metabólitos das linhagens originais e condicionadas (Figura 11).

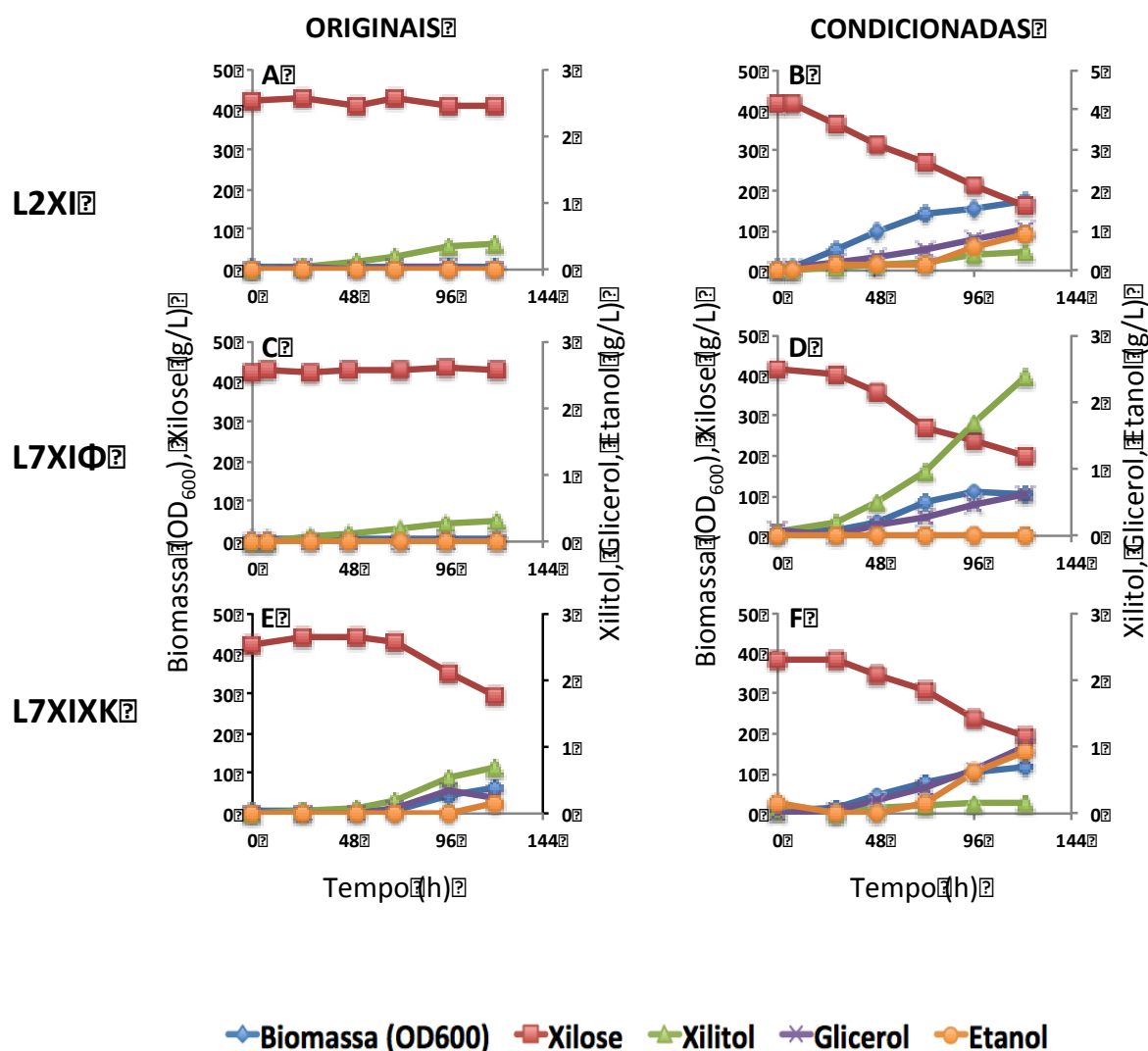


Figura 11: Teste de crescimento das linhagens transformantes originais (A, C, E) e condicionadas (B, D, G). Consumo de xilose (vermelho), formação de biomassa (azul), xilitol (verde), etanol (laranja), e glicerol (roxo), durante fermentação aeróbica das linhagens L2XI Original e Condicionada (A, B), L7XIΦ Original e Condicionada (C, D), e L7XIXK Original e Condicionada (E, F). Não houve produção de ácido acético em nenhuma das linhagens. Cada gráfico é um exemplo representativo de fermentação aeróbica com OD₆₀₀ inicial de 0,5 feito em triplicata.

A principal diferença observada entre as linhagens originais e condicionadas foi o consumo da xilose. Enquanto as linhagens condicionadas utilizam xilose, e tem crescimento de biomassa (OD_{600}) iniciado por volta de 24 horas, as leveduras originais levaram pelo menos 72 horas para começar a consumir xilose e crescer. Esta diminuição da fase *Lag* de crescimento é observado nas três linhagens do grupo de condicionadas quando comparadas com as originais. É importante notar que o crescimento final foi maior para todas as linhagens condicionadas, com maior diferença na densidade celular (OD_{600}) entre as linhagens L2XI condicionada ($19,3 \pm 2,3$) e original ($0,84 \pm 0,1$).

Nenhum dos dois grupos consome totalmente os 40 g/L de xilose disponíveis no meio ao final das 120 horas, entretanto, enquanto as linhagens condicionadas consumiram entre 50% e 60% do total de xilose, as linhagens originais consumiram 2,97% (L2XI), 6,06 (L7XIΦ) e 32,23% (L7XIXK).

A linhagem L7XIΦ foi a única do grupo de condicionadas a não produzir etanol. Entretanto, sua produção de xilitol foi maior que todas as outras linhagens, chegando a concentração final de $2,12 \pm 0,86$ g/L. O rendimento de xilitol da linhagem condicionada reduziu 12 vezes quando comparado com a original.

As concentrações finais de produtos, rendimentos, produtividade e taxa de consumo de substrato estão resumidos nas Tabelas 6 e 7.

Com o intuito de investigar melhor os metabólitos produzidos por cada uma das linhagens, fermentações anaeróbicas com alta densidade celular foram realizadas (OD_{600} inicial igual a 10, Figura 12).

Nenhuma das linhagens consome totalmente xilose, entretanto as linhagens originais têm consumo entre 27,9% e 46,24% enquanto as condicionadas têm consumo entre 53,4% e 78,7%, sendo que a linhagem L7XIΦ foi novamente a que menos consumiu.

Tabela 6: Concentração final de xilose consumida e de produtos formados.

Linhagem	Xilose consumida g/L		Etanol g/L		Ácido acético g/L		Glicerol g/L		Xilitol g/L		Biomassa g/L	
	Média	Desv Pad	Média	Desv Pad	Média	Desv Pad	Média	Desv Pad	Média	Desv Pad	Média	Desv Pad
L2XI Original	1,19	0,35	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,01	0,38	0,05	0,18	0,05
L2XI Condicionada	22,07	3,19	0,60	0,41	0,02	0,03	0,70	0,37	0,85	0,73	11,91	4,03
L7XIΦ Original	2,43	2,25	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00	0,27	0,03	0,11	0,01
L7XIΦ Condicionada	19,93	3,75	0,21	0,37	0,03	0,06	0,55	0,12	2,12	0,86	5,11	0,53
L7XIXK Original	12,89	5,45	0,49	0,57	0,01	0,02	0,37	0,16	0,76	0,13	3,24	0,56
L7XIXK Condicionada	24,21	5,29	1,18	0,64	0,03	0,05	1,24	0,67	0,13	0,03	5,32	0,40

Médias referentes a triplicatas biológicas. “Desv Pad” é referente a desvio padrão.

Tabela 7: Taxa de crescimento e rendimento em gramas de produto formado por grama de substrato (xilose) consumido em fermentação aeróbia de baixa OD₆₀₀ inicial.

Linhagem	Taxa de crescimento (h ⁻¹)		Rendimento (g. g ⁻¹)								Taxa de consumo específico de xilose (g.g ⁻¹ .h ⁻¹)	
			Etanol		Glicerol		Xilitol		Biomassa			
	Média	Desv Pad	Média	Desv Pad	Média	Desv Pad	Média	Desv Pad	Média	Desv Pad	Média	Desv Pad
L2XI Original	0,02**	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00	0,34	0,11	0,15	0,05	0,05	0,01
L2XI Condicionada	0,03	0,02	0,03	0,02	0,03	0,01	0,04	0,04	0,53	0,10	0,02	0,00
L7XIΦ Original	n.c.	n.c.	0,00	0,00	0,03	0,04	1,27	2,06	0,46	0,73	0,19	0,19
L7XIΦ Condicionada	0,01**	0,00	0,01	0,02	0,03	0,00	0,10	0,03	0,26	0,04	0,03	0,01
L7XIXK Original	0,01	0,00	0,03	0,03	0,03	0,01	0,06	0,02	0,27	0,09	0,03	0,01
L7XIXK Condicionada	0,03	0,00	0,05	0,02	0,05	0,02	0,01	0,00	0,23	0,05	0,04	0,01

Médias referentes a triplicatas biológicas. “Desv Pad” é referente a desvio padrão.

n.c.: taxa não calculada

*O rendimento de ácido acético, produtividade de ácido acético, etanol, glicerol e xilitol não foram detectados.

** Taxa de crescimento calculado a partir de duplicata de fermentações.

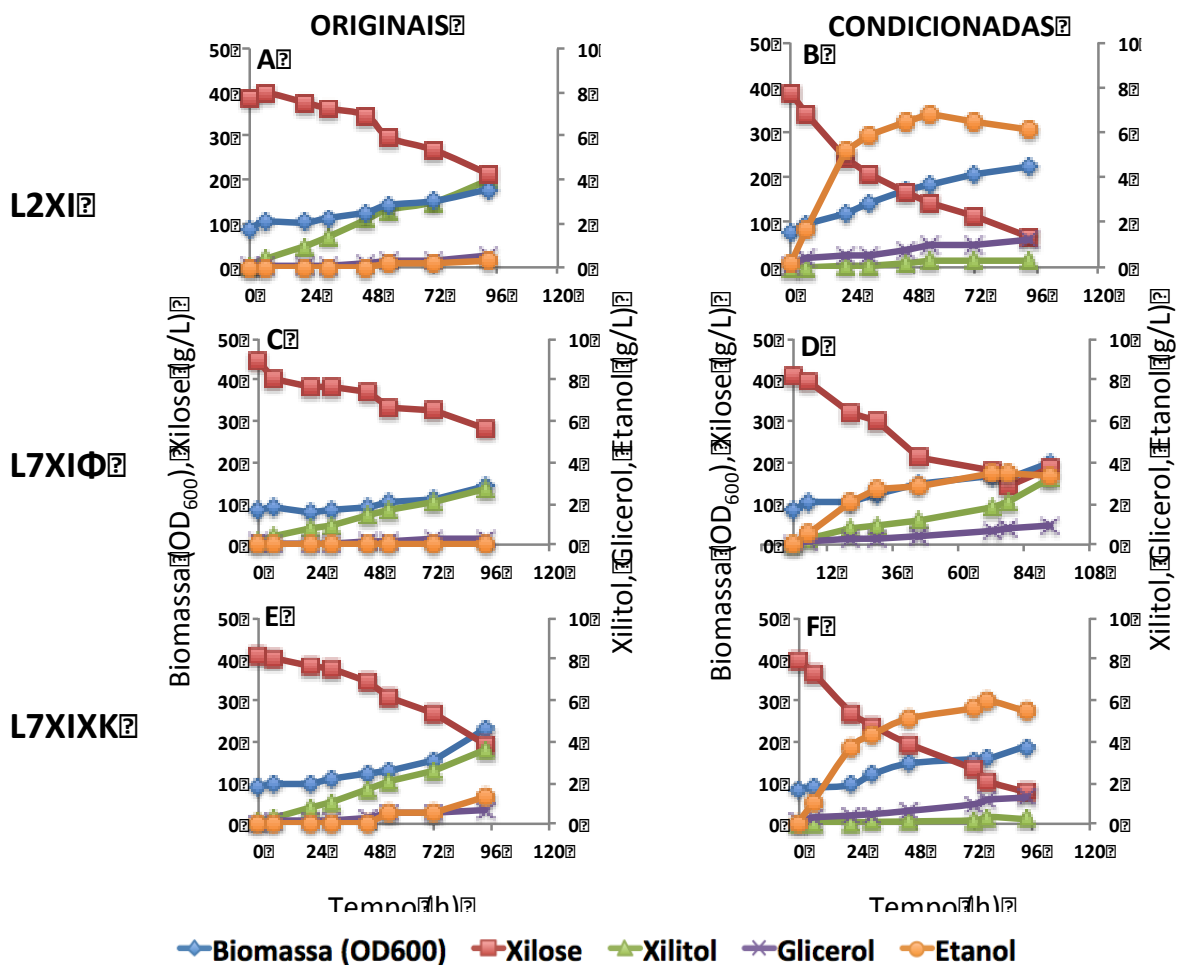


Figura 12: Teste de crescimento com inóculo inicial alto das linhagens transformantes Originais (A, C, E) e Condicionadas (B, D, G). Consumo de xilose (vermelho), e formação de biomassa (azul), xilitol (verde), etanol (laranja) e glicerol (roxo), durante fermentação aeróbica das linhagens L2XI Original e Condicionada (A, B) L7XIΦ Original e Condicionada (C, D), e L7XIXK Original e Condicionada (E, F). Não houve produção de ácido acético em nenhuma das linhagens. Cada gráfico é um exemplo representativo de fermentação aeróbica, 96 horas, com OD₆₀₀ inicial igual a 10, feito em duplicata.

Uma vez tendo começado com a densidade celular maior, não há tanto crescimento celular, e o grande número de células utilizam a xilose e produzem metabólitos mais rapidamente.

Um dos principais produtos das linhagens condicionadas foi o etanol. Enquanto para L2XI e L7XIXK a quantidade final de etanol produzida foi de $4,40 \pm 1,4$ g/L e $6,05 \pm 0,12$ g/L e o rendimento igual a $0,19 \pm 0,01$ g/g e $0,15 \pm 0,03$ g/g respectivamente, a linhagem L7XIΦ teve o menor rendimento ($0,016 \pm 0,023$ g/g) e concentração final de etanol ($0,37 \pm 0,052$ g/L). Entretanto, novamente a quantidade de xilitol produzida foi maior que todas as linhagens ($3,62 \pm 0,62$ g/L) e o rendimento comparável ao das linhagens originais.

As linhagens originais tiveram rendimento mínimo de etanol, chegando ao máximo de $0,03 \pm 0,04$ g/g na linhagem L7XIXK. Os rendimentos de glicerol aumentaram para todas as linhagens condicionadas, entre duas (L7XIXK) e sete vezes (L7XIΦ). Os dados referentes à concentração final de produto, produtividade, consumo de substrato e rendimento das leveduras transformantes, no crescimento de alta densidade celular estão resumidos nas Tabelas 8, 9 e 10.

Visando uma análise mais minuciosa das linhagens L2XI original e condicionadas, foram realizadas fermentações anaeróbicas em biorreator (Figura 13). Também para avaliar o efeito da cofermentação, a levedura dispôs tanto de glicose (20 g/L) quanto de xilose (40 g/L) como fontes de carbono.

Era esperado que o investimento da levedura em anaerobiose fosse menos voltado para crescimento, e houvesse maior produção de metabólitos secundários. De fato, isto foi observado na fermentação feita no biorreator. Como observado, ambas as linhagens apresentaram capacidades idênticas de metabolizar glicose, resultando em concentrações de biomassa semelhantes. As duas linhagens consumiram completamente a glicose. A linhagem original consumiu $3,62 \pm 2,27$ g/L xilose, enquanto a linhagem condicionada consumiu $7,04 \pm 1,07$ g/L deste açúcar (Figura 13 e Tabela 11), o que resultou no aumento da produção de etanol de $6,98 \pm 0,41$ para $9,58 \pm 0,09$. Também observou que a produção de xilitol diminuiu 72% quando comparado com a linhagem original. Desta forma, enquanto o rendimento de etanol aumentou a de xilitol diminuiu. (Figura 13 e Tabela 13).

Para ambas as linhagens, foram produzidas aproximadamente 6,6 g/L de etanol a partir da glicose. O rendimento de glicerol aumentou apenas 0,29 vezes. Para ambas as linhagens, os rendimentos de ácido acético permaneceram próximos (0,038

g/g e 0,048 g/g), entretanto, a concentração final de ácido acético produzida pela linhagem condicionada foi 40% maior.

As Tabelas 11, 12 e 13 resumem os valores de rendimento, produtividade específica, taxa de crescimento, taxa de consumo de substrato e balanço de carbono das fermentações feitas no biorreator.

Tabela 8: Concentração final de xilose consumida e produtos formados, em fermentação em xilose com alta OD₆₀₀ inicial.

Linhagem	Xilose consumida g/L		Etanol g/L		Acetato g/L		Glicerol g/L		Xilitol g/L		Biomassa g/L	
	Média	Desv Pad	Média	Desv Pad	Média	Desv Pad	Média	Desv Pad	Média	Desv Pad	Média	Desv Pad
L2XI Original	15,38	2,95	0,17	0,24	0,00	0,00	0,26	0,37	3,87	0,03	3,44	1,34
L2XI Condicionado	31,41	0,98	6,05	0,12	0,01	0,01	1,19	0,10	0,34	0,00	10,48	4,84
L7XIΦ Original	11,17	7,18	0,00	0,00	0,00	0,00	0,11	0,16	2,86	0,41	1,46	1,66
L7XIΦ Condicionada	21,37	1,65	0,37	0,52	0,00	0,00	0,79	0,11	3,62	0,62	4,81	0,97
L7XIXK Original	18,50	4,20	0,66	0,94	0,05	0,02	0,58	0,03	3,42	0,10	5,11	2,20
L7XIXK Condicionada	30,03	2,83	4,40	1,40	0,00	0,00	1,21	0,04	0,19	0,04	4,81	0,09

Médias referentes a duplicatas biológicas. “Desv Pad” é referente a desvio padrão.

Tabela 9: Rendimento em gramas de produto formado por grama de substrato (xilose) consumido em fermentação aeróbia de alta OD₆₀₀ inicial.

Linhagem	Rendimento (g. g ⁻¹)							
	Etanol		Glicerol		Xilitol		Biomassa	
	Média	Desv Pad	Média	Desv Pad	Média	Desv Pad	Média	Desv Pad
L2XI Original	0,010	0,014	0,015	0,021	0,256	0,047	0,219	0,045
L2XI Condicionado	0,193	0,010	0,038	0,004	0,011	0,000	0,336	0,165
L7XIΦ Original	0,000	0,000	0,007	0,010	0,338	0,254	0,105	0,081
L7XIΦ Condicionada	0,016	0,023	0,037	0,002	0,171	0,042	0,224	0,028
L7XIXK Original	0,031	0,044	0,032	0,005	0,189	0,038	0,270	0,058
L7XIXK Condicionada	0,145	0,033	0,040	0,005	0,006	0,001	0,161	0,012

*O rendimento de ácido acético não foi mensurável.

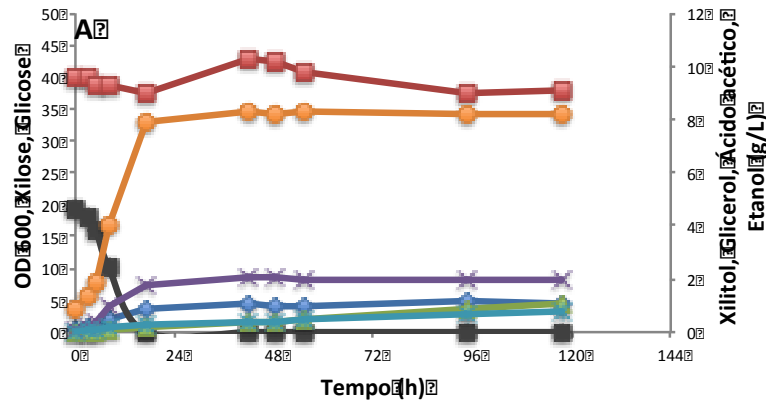
Médias referentes a duplicatas biológicas. “Desv Pad” é referente a desvio padrão.

Tabela 10: Produtividade específica de produto em fermentação de xilose com alta OD₆₀₀ inicial.

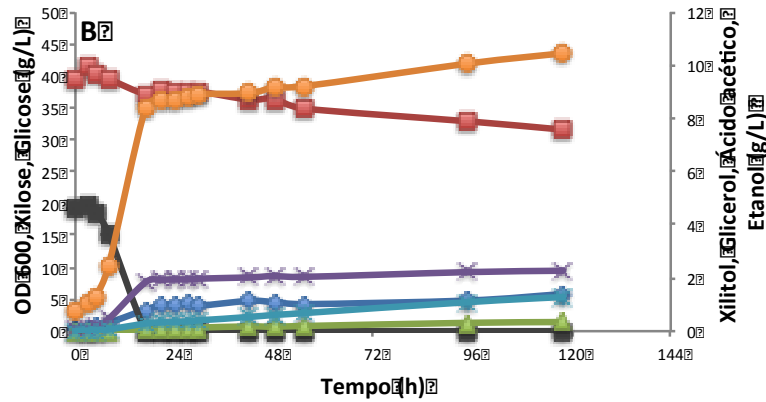
Linhagem	Taxa de consumo específico de xilose (g.g ⁻¹ .h ⁻¹)		Produtividade (g.g ⁻¹ .h ⁻¹)					
			Etanol		Glicerol		Xilitol	
	Média	Desv Pad	Média	Desv Pad	Média	Desv Pad	Média	Desv Pad
L2XI Original	0,050	0,011	0,000	0,001	0,001	0,001	0,013	0,005
L2XI Condicionada	0,036	0,017	0,007	0,003	0,001	0,001	0,000	0,000
L7XI0 Original	0,148	0,116	0,000	0,000	0,000	0,001	0,065	0,077
L7XIΦ Condicionada	0,049	0,007	0,001	0,001	0,002	0,000	0,008	0,003
L7XIXK Original	0,041	0,009	0,001	0,002	0,001	0,001	0,008	0,003
L7XIXK Condicionada	0,067	0,004	0,010	0,003	0,003	0,000	0,000	0,000

* A produtividade de ácido acético não foi mensurável
Médias referentes a duplicatas biológicas. “Desv Pad” é referente a desvio padrão.

L2XI
Original



L2XI
Condicionada



■ Glicose ◆ Biomassa (OD600) ■ Xilose ▲ Xilitol ✖ Glicerol ✖ Ac Acet ● Etanol

Figura 13: Cofermentação de glicose e xilose pelas linhagens L2XI Original e Condicionada (A, B) em biorreator em anaerobiose. **Consumo de glicose (preto) e xilose (vermelho), formação de biomassa (azul), glicerol (roxo), ácido acético (turquesa), xilitol (verde) e etanol (laranja) durante fermentação anaeróbica em biorreator. Cada gráfico é um exemplo representativo de uma fermentação anaeróbica (900 mL de solução de sais + Xilose 40 g/L + Glicose 20g/L) em reator de 1 L, OD₆₀₀ inicial: 0,5) feito em duplicata.**

Tabela 11: Concentração final de açúcares consumidos e produtos formados por cofermentação em biorreator.

Linhagem	Glicose consumida		Xilose consumida g/L		Etanol g/L		Acetato g/L		Glicerol g/L		Xilitol g/L		Biomassa g/L	
	Média	Desv Pad	Média	Desv Pad	Média	Desv Pad	Média	Desv Pad	Média	Desv Pad	Média	Desv Pad	Média	Desv Pad
L2XI Original	19,76	0,65	3,62	2,27	6,98	0,41	0,90	0,21	1,75	0,26	1,21	0,13	1,98	0,02
L2XI Condicionado	19,50	0,23	7,04	1,07	9,58	0,09	1,26	0,03	2,28	0,09	0,33	0,01	2,50	0,09

Médias referentes a duplicatas biológicas. “Desv Pad” é referente a desvio padrão.

Tabela 12: Taxa de crescimento, balanço de carbono e rendimento em gramas de produto formado por grama de açúcar consumido de cofermentação em biorreator.

Linhagem	Taxa de crescimento (h ⁻¹)				Rendimento (g. g ⁻¹)										Balanço de carbono	
	Glicose		Xilose		Etanol		Ácido Acético		Glicerol		Xilitol		Biomassa		Média	%
	Média	Desv Pad	Média	Desv Pad	Média	Desv Pad	Média	Desv Pad	Média	Desv Pad	Média	Desv Pad	Média	Desv Pad		
L2XI Original	0,145	0,039	0,002	0,000	0,302	0,055	0,038	0,004	0,076	0,021	0,052	0,001	0,086	0,011	0,860	85,99
L2XI Condicionado	0,148	0,048	0,003	0,000	0,361	0,008	0,048	0,000	0,086	0,006	0,013	0,000	0,094	0,000	0,965	96,54

Médias referentes a duplicatas biológicas. “Desv Pad” é referente a desvio padrão.

Tabela 13: Produtividade específica de produtos formados por cofermentação em biorreator.

Linhagem	Taxa de consumo específico de glicose (g.g ⁻¹ .h ⁻¹)		Taxa de consumo específico de xilose (g.g ⁻¹ .h ⁻¹)		Produtividade (g.g ⁻¹ .h ⁻¹)							
					Etanol		Ácido Acético		Glicerol		Xilitol	
	Média	Desv Pad	Média	Desv Pad	Média	Desv Pad	Média	Desv Pad	Média	Desv Pad	Média	Desv Pad
L2XI Original	0,089	0,010	0,017	0,012	0,031	0,001	0,004	0,001	0,008	0,001	0,005	0,001
L2XI Condicionado	0,070	0,008	0,025	0,001	0,034	0,003	0,005	0,000	0,008	0,001	0,001	0,000

Médias referentes a duplicatas biológicas. “Desv Pad” é referente a desvio padrão.

1.5. Teste de atividade enzimática

A atividade da xiluloquinase é fundamental no metabolismo da xilose uma vez que permitiriam a entrada da xilulose fosforilada na via da pentose fosfato. Os níveis da atividade enzimática de XK foram determinados, utilizando extrato celular das três linhagens originais, e três condicionadas (Figura 14).

Os resultados demonstram que todas as seis linhagens apresentaram atividade específica em torno de 30 U/mg, com exceção da linhagem L2XI original que apresentou atividade cerca de duas vezes maior (Figura 14). O teste estatístico confirmou que a única amostra com diferença significativa, foi a linhagem L2XI, quando comparada com sua respectiva condicionada ou outras linhagens. As outras linhagens não tiveram diferenças significativas na atividade enzimática entre si.

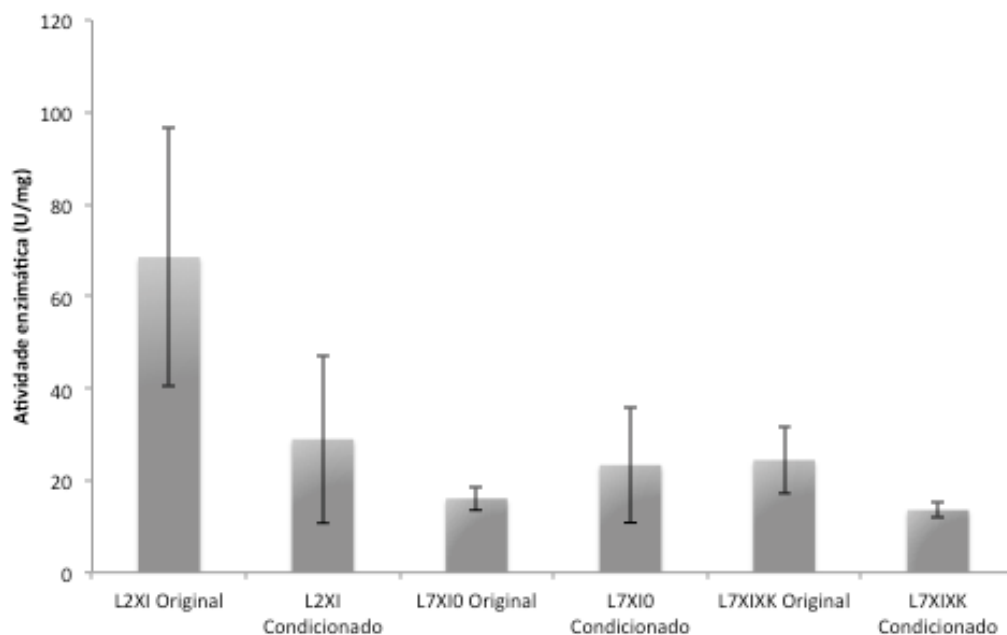


Figura 14: Atividade enzimática de xiluloquinase das linhagens transformantes Originais e Condicionadas. As barras indicam o desvio padrão das amostras. A unidade de atividade enzimática é definida como a quantidade de enzimas necessária para converter um micromol de NADH à NAD⁺ no intervalo de tempo de dez minutos. A unidade internacional de atividade enzimática (U) representa a atividade específica da enzima.

2. Sequenciamento da *XIPiro* Condicionada

2.1. Preparação de amostras para sequenciamento

Afim de investigar possíveis mutações que possam ter ocorrido na XI transformada durante o processo de condicionamento, as amostras foram sequenciadas através da metodologia Sanger (SANGER; COULSON, 1975). Para tanto, os plasmídeos das linhagens L7XIΦ e L7XIXK foram extraídos de levedura, e transformados por eletroporação em *E. coli* HB101. Seis colônias (A; B; C; D; E; F) foram selecionadas de cada uma das placas da transformação. Para confirmar a presença do gene de XI nas colônias escolhidas, foi feita uma PCR com par de oligonucleotídeos 11/12 (Tabela 3) para amplificação de XI, utilizando o plasmídeo das colônias de bactéria transformada com plasmídeo extraído de levedura como molde (Figura 15).

O plasmídeo extraído da L2XI condicionada não foi transformado com sucesso em *E. coli*, portanto, foi feita uma PCR para amplificação do gene de XI utilizando o plasmídeo extraído da levedura condicionada como molde.

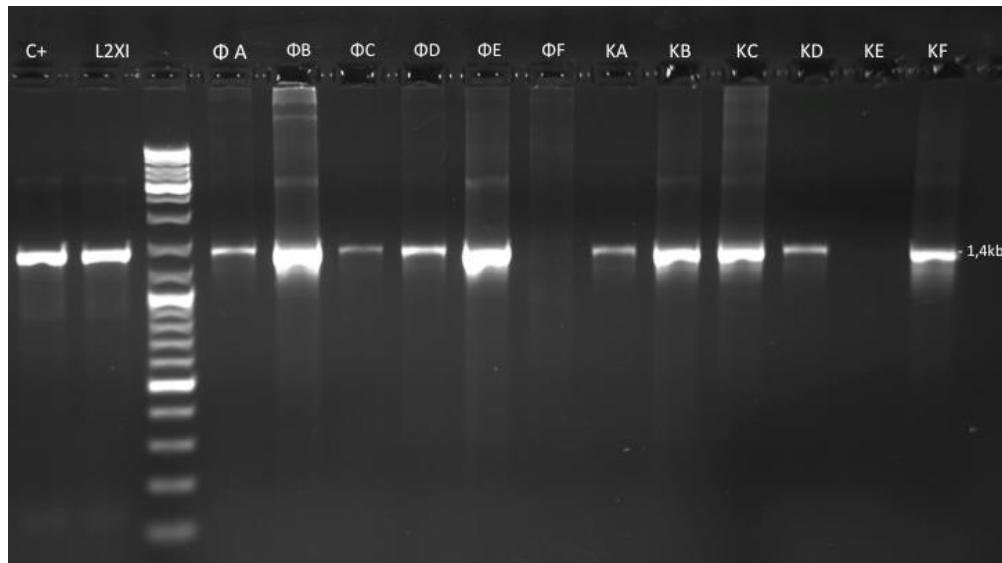


Figura 15: PCR de confirmação da presença do gene *XIPiro* das colônias de bactéria transformada com DNA extraído das leveduras. Análise eletroforética em gel de agarose. L7XIΦ (ΦA; ΦB; ΦC; ΦD; ΦE; ΦF) e L7XIXK (KA; KB; KC; KD; KE; KF). A

banda L2XI é referente à PCR feita a partir da minipreparação de DNA da levedura L2XI. A banda C+ é referente à amplificação do gene XI do plasmídeo p424-XI originalmente construído. Marcador de massa molecular Gene Ruler DNA Ladder Mix (Thermo).

A PCR dos plasmídeos indicou presença dos gene *XIPiro* nas colônias A, B, C, D e E na levedura L7XIΦ e nas colônias A, B, C, D, e F na levedura L7XIXK (Figura 15). As amostras positivas para o gene foram purificadas e enviadas para sequenciamento.

A PCR de L2XI indicou a presença do gene no plasmídeo extraído da levedura. Foi então realizada uma PCR com a enzima *Pfu*, utilizando o mesmo DNA extraído da levedura como molde, que foi purificada e enviada para sequenciamento.

E também foi enviada, a amostra do plasmídeo p424-XI originalmente construído e utilizado para a transformação das leveduras laboratoriais.

2.2. Sequenciamento das amostras

O alinhamento das sequências de XI das leveduras condicionadas e o plasmídeo original p424-XI como controle, analisadas no programa Geneious 8.1, mostrada na Figura 16, não indicaram nenhuma diferença entre as amostras L2XI, L7XIΦ e L7XIXK quando comparadas com a sequência do plasmídeo original (p424-XI controle). As sequências completas e a montagem dos *contigs* se encontra no anexo 1.

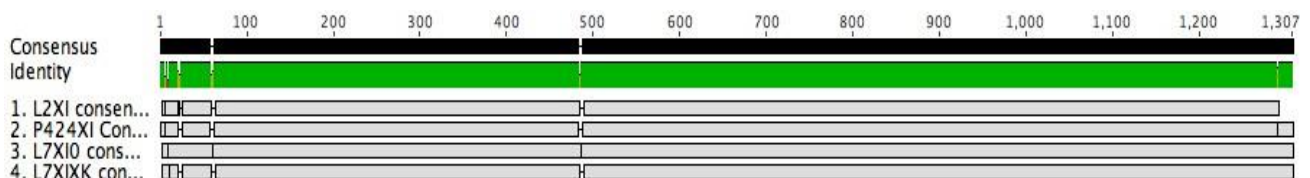


Figura 16: Alinhamento entre as sequencias de *XIPiro* das leveduras condicionadas L2XI, L7XIΦ, L7XIXK.

3. Investigação da melhoria das linhagens condicionadas e geração de linhagens de seleção

3.1. Obtenção de linhagens curadas

O condicionamento gerou linhagens com melhor capacidade de fermentar xilose aerobicamente que as originalmente obtidas sem condicionamento (Figuras 7, 11 e 12). A melhor capacidade fermentativa pode ser resultado de mudanças no genoma da levedura ou a mudanças relacionadas ao número de cópias dos plasmídeos ou mutações nos genes inseridos nos mesmos. Foi então iniciado um processo de cura das leveduras como estratégia para investigar os possíveis motivadores desta diferença observada.

A cura consiste na retirada dos plasmídeos do citoplasma das leveduras transformantes, através de sucessivos cultivos destas linhagens em meio não seletivo. Na eventualidade de obtermos uma linhagem curada, esta pode ser aplicada como linhagem de seleção.

Linhagens de seleção são linhagens modelo que se destacam como ideais para pesquisa de prospecção de novos genes. No caso, as linhagens curadas se tornariam ideais para pesquisas para expressão de novos possíveis genes codificadores de xilose isomerase, uma vez que as linhagens condicionadas reduzem seu tempo de fase lag, quando comparadas com as linhagens de CEN.PK originais, e os resultados podem ser obtidos com maior rapidez.

Neste trabalho as três linhagens condicionadas, as quais possuem plasmídeos episomais com marcas de seleção auxotróficas, foram cultivadas, em ciclos sucessivos, em meio não seletivo (YPD) suplementado com Triptofano. Após dez ciclos de cultivo em meio rico suplementado para L7XIXK e vinte ciclos de cultivo para L2XI e L7XIΦ foi feito um teste de cura, em que 52 colônias do cultivo isolado em placa foram repicadas em meio YG20 ágar (meio mínimo), e YPD ágar (meio completo). A Figura 17 mostra o resultado do teste de cura, em que é possível visualizar as colônias condicionadas curadas, crescidas em YPD, mas sem crescimento aparente em YG20.

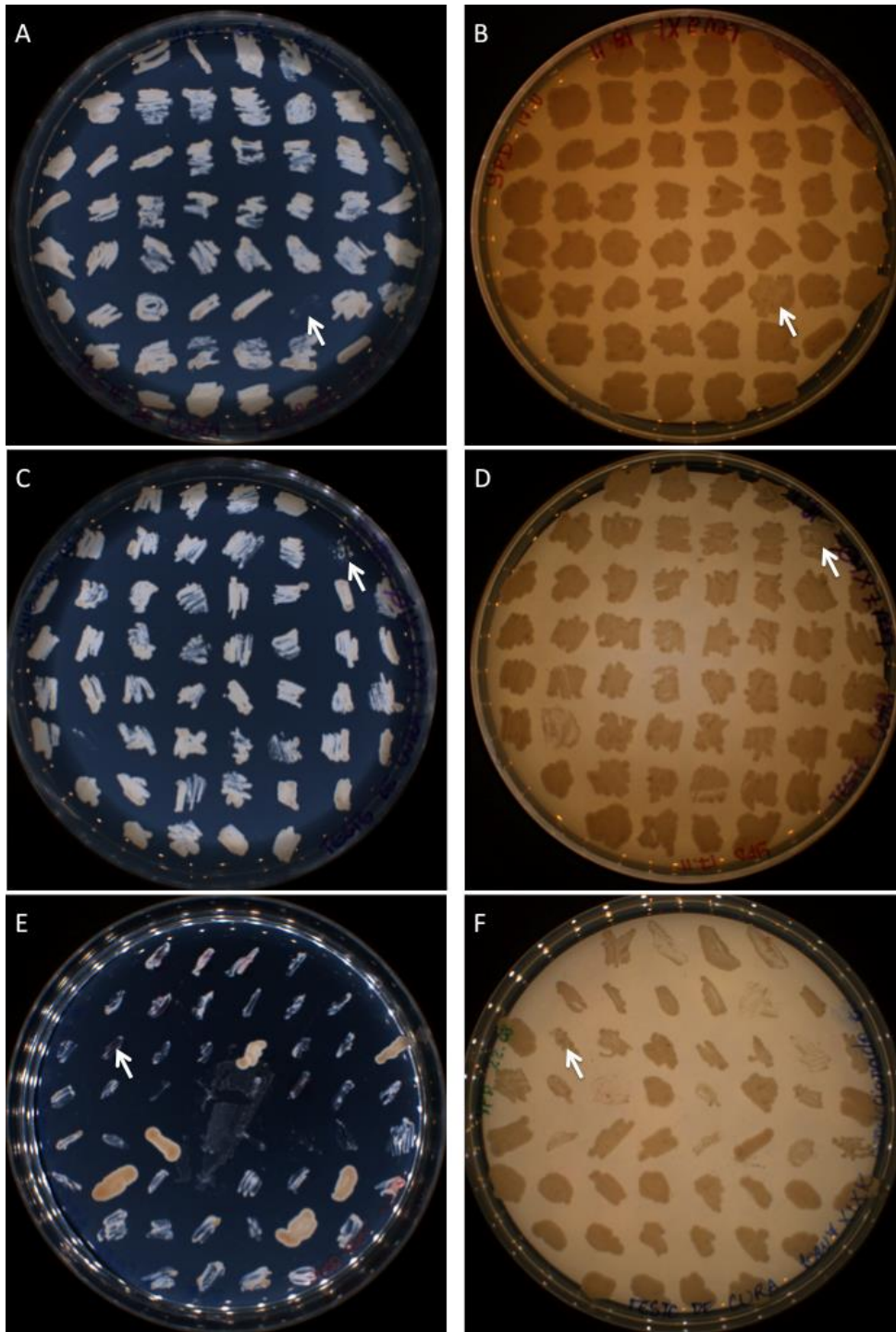


Figura 17: Teste de crescimento das leveduras condicionadas curadas L2XI (A; B) L7XI Φ (C; D) e L7XIXK (E; F) em meio YG20 (A; C; E) e YPD (B; D; F). As setas brancas apontam as colônias escolhidas como curadas.

Ao final, foi escolhida uma colônia com crescimento positivo em YPD e negativo em YNB, para cada uma das três linhagens de leveduras condicionadas, sendo elas LC2 (L2XI colônia curada #37) LC7 Φ (L7XI Φ colônia curada #9) e LC7 (L7XIXK colônia curada #12).

3.2. Confirmação da cura por teste fisiológico e PCR

As colônias selecionadas foram plaqueadas novamente em meio YG20 ágar para uma segunda confirmação de que não haveria crescimento em meio mínimo. Após 72 horas de incubação, nenhuma das leveduras selecionadas apresentaram crescimento.

Também foi realizado um teste fisiológico da cura (Figura 18), em que as colônias escolhidas foram inoculadas em YPX, YG20 e YX40, para confirmar a cura em meio mínimo, seja ele suplementado com glicose ou xilose, e em meio rico, se a única fonte de carbono disponível for xilose. Como controle, foram inoculadas nos mesmos meios as leveduras condicionadas L2XI, L7XI Φ e L7XIXK. O resultado do teste fisiológico indicou crescimento das três linhagens curadas em YPX, porém, pouco menor que o crescimento das condicionadas (Figura 17). Em meio YX40, nenhuma das três linhagens curadas cresceu, enquanto as três condicionadas apresentaram crescimento. Em meio YG20, a levedura curada LC2 apresentou crescimento, ainda que significativamente menor que as condicionadas e LC Φ teve um lento início de crescimento após 72h, enquanto a LC7 não apresentou nenhum crescimento.

O crescimento nos meios seletivos das linhagens LC2 e LC Φ indicam que estas não perderam os plasmídeos ou os genes, uma vez que a perda do plasmídeo impossibilitaria o crescimento em meio mínimo (YNB) e a perda do gene *XIPiro* impossibilitaria crescimento em meios cuja a única fonte de carbono é xilose. Entretanto, para a LC7, houve crescimento em YPX, ou seja, meio rico com xilose como fonte de carbono, enquanto não houve crescimento em nenhum dos dois meios mínimos.

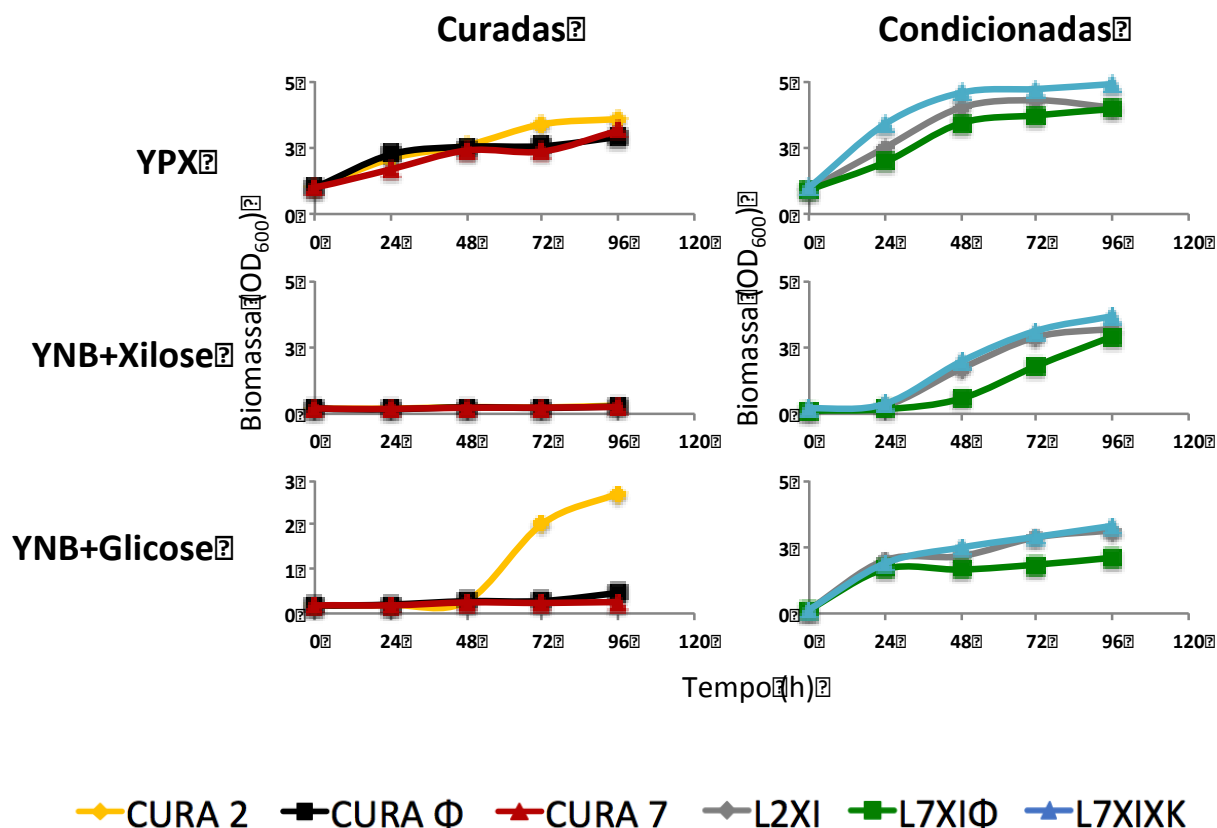


Figura 18: Avaliação do crescimento das leveduras curadas, em diferentes meios YPX (A ; B), YX40 (B; C) e YG20 (D; E) para as leveduras curadas LC2 (amarelo), LCΦ (preto), LC7 (vermelho) e as Condicionadas como controle L2XI (cinza), L7XIΦ (verde) e L7XIXK (azul). Cada gráfico é um exemplo representativo de um teste feito em duplicata (em tubo de 50 mL contendo 5 mL de meio, OD₆₀₀ inicial = 0,2) por 96 horas. A escala de E difere dos demais gráficos a fim de evidenciar o crescimento das leveduras.

Uma vez que havia a suspeita da presença do gene nas linhagens submetidas a cura, inclusive LC7 que não cresceu em YNB, foi feita PCR de colônia das três linhagens, utilizando oligonucleotídeos 11/12 (Tabela 3) para amplificação de XI (Figura 19).

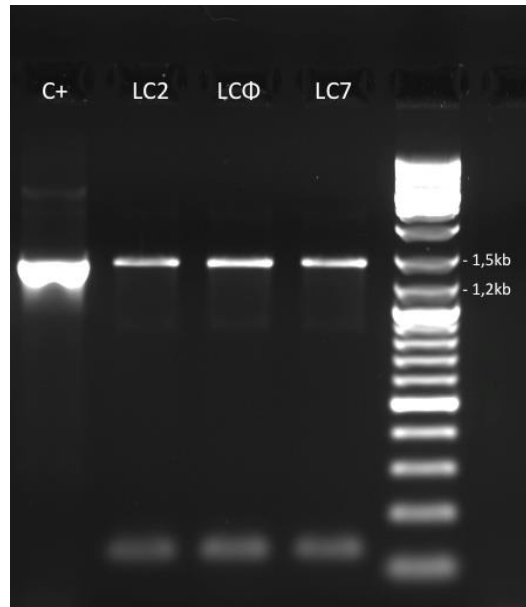


Figura 19: PCR de colônia das leveduras curadas LC2, LCΦ e L7XIXK. Análise eletroforética em gel de agarose 1%. O controle da PCR (C+) foi feito utilizando plasmídeo p424-*XIPiro* como molde. Marcador de massa molecular Gene Ruler DNA Ladder Mix (Thermo).

Todas as linhagens apresentaram banda de aproximadamente 1,4 kb na PCR de colônia, indicando ainda a presença do gene *XIPiro* ainda nas leveduras. O crescimento das linhagens LC2 e LCΦ em meio seletivo, indica que não houve perda dos plasmídeos do citoplasma, o que é compatível com a presença do gene na PCR. Entretanto, para a linhagem LC7, em que a levedura não cresceu em meio seletivo, indicando a perda dos plasmídeos, a presença do gene pode ser justificada pela integração do gene no genoma da levedura.

Se assumirmos que as modificações observadas nas linhagens condicionadas (quando comparadas com as originais) serão conservadas nas linhagens curadas correspondentes, temos então possíveis novas linhagens de seleção .

3.3. Retransformação da linhagem LC7

Mesmo sabendo que a LC7 ainda mantém *XIPiro*, mas aparentemente perdeu o plasmídeo uma vez que perdeu a capacidade de crescer em meio mínimo, para testar a possível conservação das características observadas na linhagem condicionada L7XIXK, a LC7 foi transformada novamente com os mesmos plasmídeos originalmente inseridos (p424XI e P426XK que não passaram por processo de condicionamento), gerando a linhagem curada e retransformada LC-RT7.

Após a nova transformação da linhagem LC7 curada, foram escolhidas cinco colônias isoladas (A-E) da placa resultante da transformação. Estas foram inoculadas em 5 mL YX40, para testar se iriam readquirir a capacidade de crescer em xilose. Após 144 horas foi constatado que as cinco colônias para LC-RT7 readquiriram a capacidade de crescer em xilose. Foi escolhida aleatoriamente uma colônia (colônia B) como isolado representativo da população LC-RT7.

O padrão de crescimento da LC-RT7 foi testado por curva de crescimento (Figura 20), uma vez que era preciso analisar se as características diferenciadas da linhagem condicionada, eram conservadas mesmo após o processo de cura e nova transformação.

Pode ser observado que o perfil da levedura transformada, tanto em crescimento, quanto em formação de metabólitos, foi mantido quando comparado com a linhagem condicionada da qual derivou.

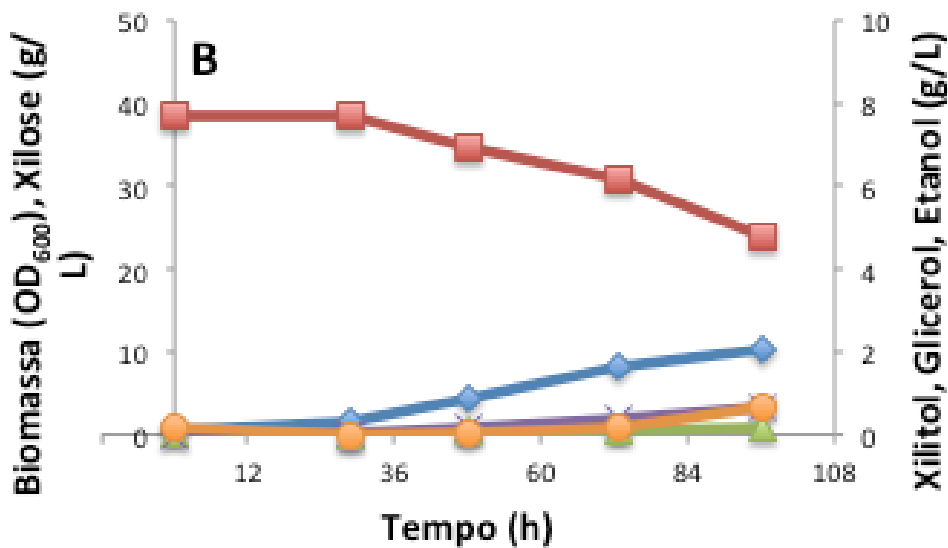
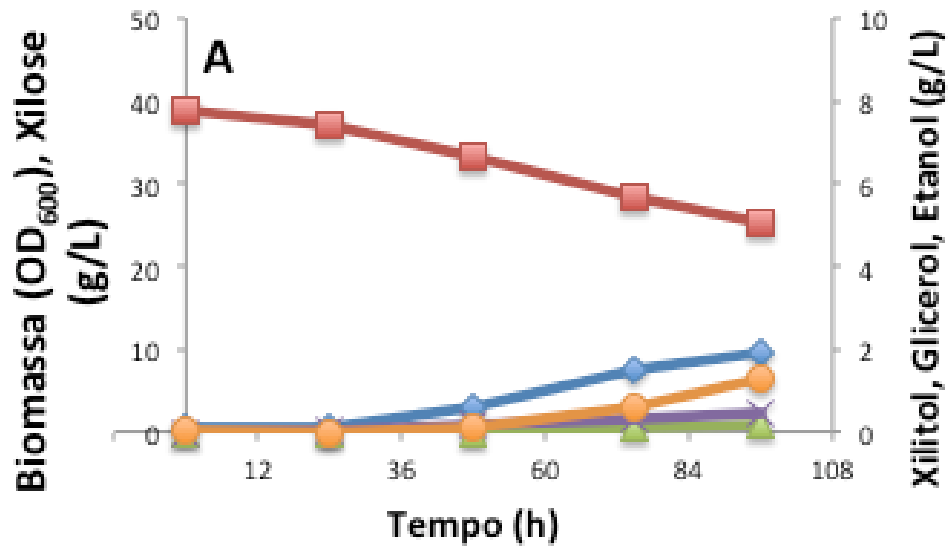


Figura 20: Comparação entre teste de crescimento da linhagem retransformada LC-RT7 (A) e a condicionada L7XIXK (B). Consumo de xilose (vermelho), formação de biomassa (azul), glicerol (roxo), xilitol (verde) e etanol (laranja). Não houve produção de ácido acético em nenhuma das linhagens. Cada gráfico é um exemplo representativo de fermentação aeróbica, 96 horas, com OD₆₀₀ inicial igual a 0,5, feito em duplicata.

DISCUSSÃO

A conversão eficiente de xilose à etanol é essencial para o aumento da produção de etanol de segunda geração (STAMBUK et al., 2008), uma vez que é o segundo açúcar mais abundante em biomassas lignocelulósicas (HAHN-HÄGERDAL et al., 2006). Para isso, estratégias de melhoramento genético de microrganismos para fermentação eficiente de xilose tem sido amplamente exploradas.

Duas principais vias têm sido utilizadas para construir linhagens recombinantes de *S. cerevisiae* capazes de utilizar xilose: a via da isomerização e da oxirredução (CAI; ZHANG; LI, 2012). Ao comparar a expressão das duas vias em linhagens isogênicas de *S. cerevisiae*, Karhumaa e colaboradores demonstraram diferenças importantes. Enquanto a linhagem expressando XI produz etanol com rendimento de 0,43 g g⁻¹ próximo ao máximo teórico (0,51 g/g), a linhagem expressando a via de oxirredução apresentou produtividade duas vezes maior (KARHUMAA et al., 2007). Neste trabalho, a via da isomerização da xilose foi escolhida como alternativa à via de oxirredução da xilose para construção de linhagens recombinantes, a fim de evitar os problemas envolvendo o desbalanço dos cofatores NADPH e NAD⁺, os quais são usados preferencialmente pelas enzimas XR e XDH, respectivamente (BRUINENBERG et al., 1983).

Linhagens recombinantes de *S. cerevisiae* foram construídas pela expressão da via de XI de *Piromyces sp.* Além disso, o efeito da superexpressão da xiluloquinase (*XKSI*) endógena de *S. cerevisiae* foi avaliado. As três linhagens obtidas foram: L2XI (expressa XI), L7XIΦ (expressa XI e contém plasmídeo vazio) e L7XIXK (expressa XI e XK). Apesar de L2 e L7Φ expressarem somente XI, a primeira linhagem demonstrou maior taxa de crescimento em xilose. Isso pode ser explicado porque L2XI é regulado por uma marca de seleção, enquanto a levedura L7XIΦ é regulada por duas, o que pode influenciar o padrão metabólico da levedura (PRONK, 2002). Desta forma, a dependência de dois plasmídeos, ao invés de um claramente influencia negativamente a levedura (KARIM; CURRAN; ALPER, 2013).

As linhagens L2XI e L7XIXIXK originais contendo apenas o gene de *XIPiro* apresentaram baixas taxas de crescimento aeróbico (0,023h⁻¹ ± 0,004 e 0,012 h⁻¹ ± 0,003 respectivamente), porém ainda maiores que em KUYPER et al., 2003 (Tabela 14). Como

as leveduras apresentam o mesmo *background* (ENTIAN; KOTTER, 2007), o melhor desempenho das linhagens deste estudo possivelmente deve-se ao promotor utilizado para expressão de XI (FLAGFELDT et al., 2009). Enquanto Kuyper e colaboradores utilizaram o promotor TPII (triosefosfato isomerase) para expressão da isomerase, neste trabalho foi utilizado o promotor GPD (gliceraldeído-3-fosfato dehidrogenase) (BITTER; EGAN, 1984). Em glicose, GPD tem maior atividade que TPII, e o contrário ocorre quando o etanol é utilizado como fonte de carbono (FLAGFELDT et al., 2009).

A linhagem original L7XIΦ não teve sua taxa de crescimento calculada, uma vez que o início da fase exponencial de crescimento não foi atingido no tempo de monitoramento da fermentação.

A linhagem L7XIXK original apresentou metade da taxa de crescimento de L2XI original, entretanto, suas taxas de produção de etanol e OD₆₀₀ final foram muito superiores. Isto ocorreu devido ao início antecipado da fase exponencial de crescimento, em aproximadamente 72 horas, enquanto a L2XI só iniciou crescimento após 120 horas. Como demonstrado anteriormente, a superexpressão de XKS1 favorece o crescimento em xilose e produção de etanol (JOHANSSON et al., 2001; RICHARD; TOIVARI; PENTTILÄ, 2000).

Linhagens melhoradas de L2XI, L7XIΦ e L7XIXK foram obtidas por condicionamento em xilose. Uma das vantagens de utilizar esta estratégia de melhoramento genético, é a regulação da expressão gênica a níveis ótimos feita pela própria levedura, evitando os efeitos não esperados da intervenção por engenharia genética (RODRIGUEZ-PEÑA et al., 1998; SAUER, 2001).

A taxa de crescimento da linhagem L2XI permaneceu praticamente a mesma, enquanto a de L7XIXK duplicou para $0,027 \text{ h}^{-1} \pm 0,002$. A linhagem L7XIΦ apresentou taxa de crescimento de $0,012 \text{ h}^{-1} \pm 0,001$.

Em contrapartida, em condição aeróbica todas as linhagens condicionada apresentaram maior produção de etanol e consumo de xilose, além da redução da produção de xilitol. Isto pode ser reflexo de uma mudança metabólica, em que menos energia é investida no crescimento da levedura, e mais, na formação dos coprodutos (CORNISHBOWDEN; HOFMEYR; CARDENAS, 1995).

O consumo de xilose nas linhagens condicionadas aumentou 1,8, 8,2, 18,7 vezes para L7XIXK, L7XIΦ e L2XI, respectivamente. A xilose consumida refletiu em uma maior quantidade de formação de coprodutos, especialmente etanol para as linhagens L2XI e L7XIXK. A linhagem L7XIΦ produziu grandes quantidades de xilitol, indicando que talvez, os genes endógenos envolvidos no catabolismo da xilose estejam sendo expressos, como o *GRE3*, uma aldose-redutase endógena, envolvida na formação de xilitol (TRÄFF- BJERRE; JEPPSSON, 2004).

O condicionamento de linhagens utilizando bateladas repetitivas já demonstrou resultados semelhantes de aumento de produção de etanol e redução de xilitol, para linhagens capazes de fermentar pentoses (KUYPER et al., 2004, 2005; PARREIRAS et al., 2014).

Além das diferenças nas taxas de crescimento (Tabela 14), as linhagens melhoradas demonstraram uma forte redução na fase lag de crescimento, isto pode estar relacionado ao aumento da atividade de conversão de xilose a xilulose e mudanças no fluxo de carbono (HECTOR et al., 2011a).

Utilizando estratégia de condicionamento semelhante a aplicada neste estudo, Kuyper e colaboradores obtiveram a linhagem RWB 202-AFX, a qual apresentou crescimento $0,18 \text{ Tabela}^{-1}$ (Tabela 14)(KUYPER et al., 2004). As três linhagens condicionadas geradas neste trabalho apresentaram taxa de crescimento entre 5 e 15 menor que RWB 202-AFX. Esta diferença é possivelmente devido às diferentes pressões seletivas à que as linhagens foram submetidas.

De forma geral, em condições anaeróbicas as taxas e produtividade de etanol aumentaram para todas as linhagens condicionadas, enquanto o xilitol sofreu a maior redução das mesmas.

Tabela 14: Comparação entre taxas de crescimento de *Saccharomyces cerevisiae* (linhagens isogênicas de CEN.PK) expressando XI de *Piromyces sp* em fermentação aeróbica de xilose como fonte de carbono.

Linhagem	Taxa crescimento (aeróbio)	Modificações			Referência
L2 XI Original	0,023 h ⁻¹ ± 0,004	Expressão	heteróloga	de	Este trabalho
		<i>Piromyces sp.</i> XI			
L7XIΦ Original	n.c.	Expressão	heteróloga	de	Este trabalho
		<i>Piromyces sp.</i> XI			
L7XIXK Original	0,012 h ⁻¹ ±0,003	Expressão	heteróloga	de	Este trabalho
		<i>Piromyces</i> XI,	superexpressão		
		<i>XKSI</i>			
L2 XI Condicionada	0,033 h ⁻¹ ±0,021	Expressão	heteróloga	de	Este trabalho
		<i>Piromyces sp.</i> XI		e	
		condicionamento em meio mínimo com xilose.			
L7XIΦ Condicionada	0,012 h ⁻¹ ± 0,001	Expressão	heteróloga	de	Este trabalho
		<i>Piromyces sp.</i> XI		e	
		condicionamento em meio mínimo com xilose.			
L7XIXK Condicionada	0,027 h ⁻¹ ±0,002	Expressão	heteróloga	de	Este trabalho
		<i>Piromyces sp.</i> XI		e	
		condicionamento em meio mínimo com xilose.			
RWB 202	0,005h ⁻¹	Expressão	heteróloga	de	(KUYPER et al., 2003)
		<i>Piromyces sp.</i> XI			
RWB202-AFX	0,18 h ⁻¹	Linhagem	RWB-202	pós	(KUYPER et al., 2004)
		condicionamento (158 dias/ 50 ciclos em meio com xilose)			
TMB 3066	0,02 h ⁻¹	Expressão	heteróloga	de	(KARHUMAA et al., 2007)
		<i>Piromyces sp.</i> XI,			

		superexpressando <i>XKSI</i> , <i>TKLI</i> , <i>RPE1</i> , <i>RKII</i> , <i>HXT7</i> e deleção <i>gre3</i>
RWB217	0,22 h ⁻¹ ±0,01	Expressão heteróloga de (KUYPER, <i>Piromyces sp.</i> XI, superexpressão MARKO <i>et al.</i> , <i>XKSI</i> , <i>TKLI</i> , <i>RPE1</i> , <i>RKII</i> e 2005) deleção de <i>gre3</i>

Anaerobicamente, as linhagens originais e condicionadas mantiveram taxa de crescimento parecidas tanto na fase de consumo da glicose quanto na fase de consumo de xilose (Tabela 12). As linhagens original e condicionada de L2XI no fermentador, tiveram taxas parecidas de produção de etanol, ácido acético e glicerol, entretanto, houve uma redução na quantidade de xilitol produzida de 72,4% e o aumento de 49,8% na taxa de consumo específico de xilose.

Lee e colaboradores mostraram que diversas mutações na XI resultam em um aumento de 71% na atividade da enzima, além de aumentar taxa de crescimento e consumo de xilose (LEE; JELLISON; ALPER, 2012). Também foi demonstrado que o aumento da atividade de XK resulta em menor produção de xilitol (JOHANSSON et al., 2001). Estas duas principais hipóteses foram testadas como possíveis justificativas as melhorias observadas nas leveduras condicionadas.

Inicialmente foi investigado se houve alteração nos níveis de atividade de XK. Os resultados do ensaio da atividade enzimática indicam que não houve diferença relevante nos níveis de expressão de XK para as linhagens condicionadas e originais, à exceção da linhagem L2XI original, que teve maior atividade que todas as outras. A baixa atividade de XK pode ser um gargalo para a utilização eficiente de xilose por linhagens expressando a via da isomerização ou da oxirredução (TOIVARI et al., 2001). Entretanto, uma vez que linhagens selvagens são capazes de fermentar D-xilulose, significaria que a *XKSI* endógena de *S. cerevisiae* pode ter expressão suficiente para viabilizar o crescimento de linhagens sem superexpressão de XK nas condições avaliadas neste estudo (KUYPER et al., 2003).

É sabido portanto, que a baixa atividade de XK é um fator limitante do metabolismo de xilulose em *S. cerevisiae*, e que a sua superexpressão pode aumentar a utilização de xilose (TOIVARI et al., 2001) e produção de etanol em fermentação anaeróbica (HO; CHEN; BRAINARD, 1998). Entretanto, a superexpressão da XK também pode resultar em níveis tóxicos de atividade da enzima que inibem o meta de produção de etanol (JIN; JEFFRIES, 2003). Por isso, é necessário compreender profundamente os efeitos das modificações genéticas pontuais nas vias metabólicas (JOHANSSON et al., 2001)

Outra hipótese investigada para explicar os melhoramentos observados, foi a de possíveis mutações terem ocorrido na sequência da *XIPiro*, as quais favoreceram o desempenho da levedura. Lee e colaboradores demonstraram que a mutações provocadas na sequência de *XylA* de *Piromyces sp.* podem levar ao aumento da atividade da enzima, crescimento, consumo de xilose e produção de etanol (LEE; JELLISON; ALPER, 2012).

Contudo, o resultado do sequenciamento neste estudo indicou que não ocorreram mutações nas sequências de XI contidas nas leveduras condicionadas. Porém, as extremidades das sequências do gene tiveram baixa cobertura e precisarão ser resequenciadas para reconfirmação deste resultado. Apesar dos níveis de atividade de XI não terem sido investigados sabe-se que esse tem grande impacto no desempenho de linhagens expressando tal enzima (LEE; JELLISON; ALPER, 2012).

Uma vez que não houve mutações no gene de XI das linhagens condicionadas, o melhor desempenho pode ter ocorrido por modificações fora do plasmídeo. Afim de investigar essa possibilidade, foram feitos experimentos para cura das leveduras. Se de fato, as modificações ocorreram fora do plasmídeo (como por exemplo, a nível genômico), a levedura curada perderia a capacidade de crescer em xilose pela ausência dos plasmídeos, mas quando retransformada com estes, readquiriria esta capacidade, mantendo as características da linhagem condicionada.

Os resultados da cura não foram conclusivos. Haja vista, o fato que as leveduras LC2 e LCΦ perderam a capacidade de crescer em meio mínimo quer em presença de glicose como de xilose como única fonte de carbono (Figura 18). Entretanto, foram capazes de demonstrar crescimento em meios YPX e YG20 ainda que o crescimento de

LCΦ tenha sido muito lento (Figura 18) indicando que as leveduras ainda possuem a capacidade de crescer em xilose. Podemos assumir que os plasmídeos não foram completamente removidos da levedura, mas o número de cópias foi reduzido, interferindo na capacidade de crescimento destes em meio seletivo. Esta hipótese é reforçada pela presença do gene *XylA* nas três linhagens resultantes da cura.

No caso de LC7 (Figura 18), a ausência de crescimento em meio mínimo quer suplementado com glicose ou com xilose, sugere que a levedura perdeu a marca de seleção. Porém, o crescimento observado em meio YPX, e a presença do gene identificada pela PCR, indicam que o gene continua sendo expresso. É preciso investigar a possibilidade do gene de *XIPiro* ter sido integrado no genoma das leveduras.

Com a eventual obtenção de uma linhagem curada e condicionada ao crescimento em xilose, podemos utilizar esta linhagem como modelo para caracterização de novas enzimas da via catabólica da xilose, como por exemplo, na investigação de potenciais novas xiloses isomerases. Com a linhagem condicionada e bem descrita, podemos transformá-las com os novos genes, e obter resultados mais rapidamente que as linhagens originalmente utilizadas, CEN.PK 113.C ou CEN.PK 14.A.

Mesmo com o gene de *XIPiro* presente na linhagem LC7, após a retransformação desta com os plasmídeos p424-XI e p426-XK, foi observado perfil de crescimento e produção de metabólitos se manteve muito próximo da levedura condicionada. Isto pode indicar que as diferenças encontradas na levedura podem ter ocorrido a nível genômico, e foram conservadas através da cura.

Sabe-se que a superexpressão de genes da via não oxidativa das pentoses fosfato, favorece o metabolismo de xilose. De fato, isto pode explicar o melhor desempenho da linhagem retransformada e das obtidas por condicionamento (KARHUMAA et al., 2007). Adicionalmente, outros fatores que limitam o metabolismo de xilose devem ser avaliados para compreensão dos fatores que influenciam as melhorias observadas neste trabalho, tais como transportadores de açúcares.

As principais hipóteses de que diferenças observadas nas linhagens condicionadas tenham ocorrido por: mutações na XI, ou mudanças nos níveis de atividade de XK foram eliminadas. Sendo assim, os principais alvos para futuras investigações se tornam eventos anteriores ou posteriores a XI. Anteriormente à isomerase na via de catabolismo da

xilose, pode-se investigar a afinidade dos transportadores de açúcares, uma vez que a xilose utiliza transportadores de glicose para ser internalizada (KOTTER; CIRIACY, 1993; SEDLAK; HO, 2004). Posteriormente à XK na vida de catabolismo de xilose, temos a via da pentose fosfato. Os efeitos das modificações nas enzimas da via da pentose fosfato já foram amplamente investigados com efeitos positivos na fermentação de xilose (DIAO et al., 2013; KARHUMAA et al., 2007; KUYPER et al., 2005; SHEN et al., 2012).

CONCLUSÕES

Neste trabalho, foram construídas três linhagens de *S. cerevisiae* expressando somente XI (L2XI), a combinação de XI com XK (L7XIXK) e XI com plasmídeo vazio (L7XIΦ). Diante dos resultados apresentados, fica claro que a expressão de XK resultou em linhagem com melhor capacidade de fermentar xilose, tendo em vista que houve maior o consumo do açúcar e formação de etanol.

As três linhagens L2XI, L7XIΦ, L7XIXK foram submetidas a processo de condicionamento em xilose e três linhagens melhoradas geneticamente de cada subpopulação foram obtidas. As linhagens condicionadas tiveram melhor desempenho na conversão de xilose a etanol, tanto aerobicamente quanto anaerobicamente. Quando comparadas com as linhagens originais, as linhagens L2XI, L7XIΦ, L7XIXK condicionadas demonstraram taxas mais altas de consumo de xilose e de produção de etanol, enquanto a produção de xilitol foi reduzida. Além disso, observou-se redução na fase lag de crescimento e aumento nas taxas de crescimento aeróbico para as três linhagens condicionadas. Dentre as três linhagens condicionadas, a linhagem expressando *XylA* e superexpressando *XKSI* demonstrou maior taxa de consumo específico de xilose e produção de etanol.

As melhorias observadas nas linhagens condicionadas não estão relacionadas a mudanças nos níveis de atividade de xiluloquinase e nem a mutações na sequência gênica da xilose isomerase. Possíveis mudanças a nível de transporte de xilose, e níveis de atividade de xilose isomerase não foram investigados nesse estudo.

Após processo de cura concluiu-se que as mutações resultantes na melhoria da linhagem curada 7, derivada (L7XIXK) provavelmente não ocorreram nível plasmidial. A retransformação desta levedura com os plasmídeos expressando *XylA* e *XKSI* permitiu que a levedura apresentasse padrão similar a condicionada. Portanto, a linhagem obtida demonstra-se como uma excelente ferramenta para a avaliação de novas enzimas relacionadas ao metabolismo de xilose.

PERSPECTIVAS

Para as próximas etapas do trabalho, o primeiro ponto a ser investigado são os alvos das possíveis modificações que ocorreram nas linhagens condicionadas. O sequenciamento total das linhagens condicionadas pode ser feito para avaliar se houve alguma modificação na sequência genômica que explique estas diferenças. Além disso, os principais alvos de futuras investigações são modificações nos transportadores de açúcares, e nas enzimas da via da pentose fosfato. Além disso, as replicatas biológicas da atividade enzimática devem ser feitas para confirmar os dados obtidos.

É necessário repetir o sequenciamento das XI dos plasmídeos das leveduras condicionadas para confirmar que não houve mutações nas regiões de baixa qualidade.

Nas linhagens condicionadas, um novo processo de condicionamento pode ser feito sob diferentes condições, incluindo seleção anaeróbia.

O próximo desafio é transportar os genes e avaliar seu efeito em linhagens industriais. Vetores integrativos de *XIPiro* e *XK* já foram construídos.

O processo de cura para as linhagens L2XI, L7XIΦ será continuado, enquanto novas colônias de L7XIXK serão avaliadas para a perda dos plasmídeos. Caso seja encontrada uma linhagem curada, esta seria idealmente uma linhagem de seleção para possíveis novas xiloses isomerases. Sequências codificadoras de possíveis novas XI já foram identificadas, sintetizadas e transformadas em CEN.PK 113.14A. Serão feitas avaliações comparando a atividade destes novos genes à linhagem original, e à condicionada de L2XI.

A linhagem LC7 será investigada quanto a nossa suspeita de integração de *XIPiro* e perda do plasmídeo. Também seria interessante investigar a atividade enzimática da XI inserida na linhagem LC7, e compará-la com as linhagens L7XIXK original e condicionada, para avaliar os níveis da enzima.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, J. R. et al. Increased tolerance and conversion of inhibitors in lignocellulosic hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 82, n. 4, p. 340–349, abr. 2007.

ALMEIDA, J. R. M. et al. Stress-related challenges in pentose fermentation to ethanol by the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology journal**, v. 6, n. 3, p. 286–99, mar. 2011.

ANP - Agência Nacional de Petróleo. **Boletim anual de preços 2014**. Disponível em: <<http://www.anp.gov.br/?pg=65870&m=&t1=&t2=&t3=&t4=&ar=&ps=&cachebust=1368609471895>>.

BATT, C. A et al. Direct evidence for a xylose metabolic pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology and bioengineering**, v. 28, p. 549–553, 1986.

BHOSALE, S. H.; RAO, M. B.; DESHPANDE, V. V. Molecular and industrial aspects of glucose isomerase. **Microbiological reviews**, v. 60, n. 2, p. 280–300, 1996.

BITTER, G. A; EGAN, K. M. Expression of heterologous genes in *Saccharomyces cerevisiae* from vectors utilizing the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene promoter. **Gene**, v. 32, p. 263–274, 1984.

BRUINENBERG, P. M. et al. The role of redox balances in the anaerobic fermentation of xylose by yeasts. **European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 18, p. 287–292, 1983.

CAI, Z.; ZHANG, B.; LI, Y. Engineering *Saccharomyces cerevisiae* for efficient anaerobic xylose fermentation: reflections and perspectives. **Biotechnology journal**, v. 7, n. 1, p. 34–46, jan. 2012.

CARRASCO, C. et al. SO₂-catalyzed steam pretreatment and fermentation of enzymatically hydrolyzed sugarcane bagasse. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 46, p. 64–73, 2010.

CHERUBINI, F. The biorefinery concept: Using biomass instead of oil for producing energy and chemicals. **Energy Conversion and Management**, v. 51, n. 7, p. 1412–1421, 2010.

CLARK, J. H.; LUQUE, R.; MATHARU, A. S. Green chemistry, biofuels, and biorefinery. **Annual review of chemical and biomolecular engineering**, v. 3, p. 183–207, jan. 2012.

CORNISHBOWDEN, A.; HOFMEYR, J. H. S.; CARDENAS, M. L. Strategies for Manipulating Metabolic Fluxes in Biotechnology. **Bioorganic Chemistry**, v. 23, p. 439–449, 1995.

COTTRELLE, P. et al. Cloning, nucleotide sequence, and expression of one of two genes coding for yeast elongation factor 1a. **Journal of biological chemistry**, v. 260, n. 84, p. 3090–3096, 1985.

DELLA-BIANCA, B. E.; GOMBERT, A. K. Stress tolerance and growth physiology of yeast strains from the Brazilian fuel ethanol industry. **Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology**, v. 104, p. 1083–1095, 2013.

DEMIRBAS, A. Biofuels sources, biofuel policy, biofuel economy and global biofuel projections. **Energy Conversion and Management**, v. 49, p. 2106–2116, 2008.

DEMIRBAS, A. Political, economic and environmental impacts of biofuels: A review. **Applied Energy**, v. 86, p. S108–S117, 2009.

DIAO, L. et al. Construction of fast xylose-fermenting yeast based on industrial ethanol-producing diploid *Saccharomyces cerevisiae* by rational design and adaptive evolution. **BMC biotechnology**, v. 13, p. 110, 2013.

DING, M. et al. Identification, expression, and characterization of the highly conserved D-xylose isomerase in animals. **Acta Biochimica et Biophysica Hungarica**, v. 41, n. 2, p. 116–122, 2009.

EIA - U.S. Energy Information Administration. **International Energy Statistics - U.S. Energy Information Administration**. Disponível em: <<http://www.eia.gov/cfapps/ipdbproject/IEDIndex3.cfm?tid=5&pid=53&aid=1>>. Acesso em: 20 mar. 2015a.

EIA - U.S. Energy Information Administration. **Brazil Analysis**. Disponível em: <<http://www.eia.gov/countries/cab.cfm?fips=BR>>. Acesso em: 20 mar. 2015b.

ENTIAN, K.; KOTTER, P. Yeast Gene Analysis - Second Edition. In: **Methods in Microbiology**. Methods in Microbiology. [s.l.] Elsevier, 2007. v. 36p. 629–666.

FAB - Força Aérea Brasileira. **Brasil lança com sucesso primeiro foguete nacional com combustível líquido**. Disponível em: <<http://www.fab.mil.br/noticias/mostra/19799/ESPA%20---Brasil-lan%20A7a-com-sucesso-primeiro-foguete-nacional-com-combust%20ADvel-1%20ADquido>>. Acesso em: 13 mar. 2015.

FERREIRA-LEITÃO, V. et al. An approach to the utilisation of CO₂ as impregnating agent in steam pretreatment of sugar cane bagasse and leaves for ethanol production. **Biotechnology for biofuels**, v. 3, n. 1, p. 7, jan. 2010.

FLAGFELDT, D. B. et al. Characterization of chromosomal integration sites for heterologous gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast (Chichester, England)**, v. 26, n. July, p. 545–551, 2009.

GÁRDONYI, M.; HAHN-HÄGERDAL, B. The *Streptomyces rubiginosus* xylose isomerase is misfolded when expressed in *Saccharomyces cerevisiae*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 32, p. 252–259, 2003.

Geneious. Disponível em: <<http://www.geneious.com/>>. Acesso em: 17 mar. 2015.

GIETZ, R. D.; SCHIESTL, R. H. Large-scale high-efficiency yeast transformation using the LiAc/SS carrier DNA/PEG method. **Nature Protocols**, v. 2, n. 1, p. 38–41, jan. 2007.

GOFFEAU, A. et al. Life with 6000 Genes. **Science**, v. 274, n. 5287, p. 546–567, 25 out. 1996.

GONG, C. S. et al. Conversion of pentoses by yeasts. **Biotechnology and bioengineering**, v. 25, p. 85–102, 1983.

GORDINHO, M. C. **Do álcool ao etanol: trajetória única**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<http://sugarcane.org/resource-library/books/>>.

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

HAHN-HÄGERDAL, B. et al. Metabolic engineering for pentose utilization in *Saccharomyces cerevisiae*. **Advances in biochemical engineering/biotechnology**, v. 108, n. May, p. 147–77, jan. 2007.

HAMACHER, T. et al. Characterization of the xylose-transporting properties of yeast hexose transporters and their influence on xylose utilization. **Microbiology**, v. 148, p. 2783–2788, 2002.

HE, Y.; WANG, S.; LAI, K. K. Global economic activity and crude oil prices: A cointegration analysis. **Energy Economics**, v. 32, n. 4, p. 868–876, 2010.

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

HECTOR, R. E. et al. Engineering industrial *Saccharomyces cerevisiae* strains for xylose fermentation and comparison for switchgrass conversion. **Journal of industrial microbiology & biotechnology**, v. 38, n. 9, p. 1193–202, set. 2011b.

HO, N. W. Y.; CHEN, Z.; BRAINARD, A. P. Genetically engineered *Saccharomyces* yeast capable of effective cofermentation of glucose and xylose. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 5, p. 1852–1859, 1998.

HÖÖK, M.; TANG, X. Depletion of fossil fuels and anthropogenic climate change-A review. **Energy Policy**, v. 52, p. 797–809, 2013.

HSU, T.-C. et al. Effect of dilute acid pretreatment of rice straw on structural properties and enzymatic hydrolysis. **Bioresource technology**, v. 101, n. 13, p. 4907–4913, 2010.

HUNTER, S. et al. InterPro in 2011: New developments in the family and domain prediction database. **Nucleic Acids Research**, v. 40, n. November 2011, p. 306–312, 2012.

IEA - International Energy Agency. **World Energy Outlook. Executive Summary**. Disponível em: <<http://www.iea.org/Textbase/npsum/WEO2013SUM.pdf>>. Acesso em: 6 mar. 2015.

IEA - International Energy Agency. **IEA Bioenergy Task 39 – Commercializing Liquid Biofuels**. Disponível em: <<http://task39.org/about/definitions/>>. Acesso em: 6 mar. 2015.

INTERPRO - Protein sequence analysis and classification. **Species: Xylose isomerase (IPR001998)** < **InterPro** < **EMBL-EBI**. Disponível em: <<http://www.ebi.ac.uk/interpro/entry/IPR001998/taxonomy>>. Acesso em: 26 mar. 2015.

JANK, M. S. **Opinião - Palavra da Presidência - Unica**. Disponível em: <<http://www.unica.com.br/palavra-do-presidente/4303397592039673243/etanol-beneficios-por-cento2C-riscos-e-desafios/>>. Acesso em: 22 mar. 2015.

JIN, Y.-S.; JEFFRIES, T. W. Changing flux of xylose metabolites by altering expression of xylose reductase and xylitol dehydrogenase in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 105 -108, p. 277–286, 2003.

JOHANSSON, B. et al. Xylulokinase Overexpression in Two Strains of *Saccharomyces cerevisiae* Also Expressing Xylose Reductase and Xylitol Dehydrogenase and Its Effect on Fermentation of Xylose and Lignocellulosic Hydrolysate. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 9, p. 4249–4255, 2001.

JOHNSEN, U. et al. D-xylose degradation pathway in the halophilic archaeon *Haloferax volcanii*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 40, p. 27290–27303, 2009.

JOHNSEN, U.; SCHÖNHEIT, P. Novel xylose dehydrogenase in the halophilic archaeon *Haloarcula marismortui*. **Journal of Bacteriology**, v. 186, n. 18, p. 6198–6207, 2004.

KAMP, A. F.; LARIVIERE, J. W. M.; VERHOEVEN, W. (EDS.). **Albert Jan Kluyver, his life and work**. [s.l.] Amsterdam, North-Holland Pub. Co.; New York, Interscience Publishers, 1959. p. 604

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

KARIM, A. S.; CURRAN, K. A.; ALPER, H. S. Characterization of plasmid burden and copy number in *Saccharomyces cerevisiae* for optimization of metabolic engineering applications. **FEMS Yeast Research**, v. 13, p. 107–116, 2013.

KEARSE, M. et al. Geneious Basic: An integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. **Bioinformatics**, v. 28, n. 12, p. 1647–1649, 2012.

KIM, S. R. et al. Simultaneous co-fermentation of mixed sugars: a promising strategy for producing cellulosic ethanol. **Trends in biotechnology**, v. 30, n. 5, p. 274–82, maio 2012.

KOTTER, P.; CIRIACY, M. Xylose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 38, p. 776–783, 1993.

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

KUYPER, M. et al. Minimal metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for efficient anaerobic xylose fermentation: A proof of principle. **FEMS Yeast Research**, v. 4, p. 655–664, 2004.

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

LEE, S. M.; JELLISON, T.; ALPER, H. S. Directed evolution of xylose isomerase for improved xylose catabolism and fermentation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. June, p. 5708–5716, 2012.

LENNARTSSON, P. R.; ERLANDSSON, P.; TAHERZADEH, M. J. Integration of the first and second generation bioethanol processes and the importance of by-products. **Bioresource Technology**, v. 165, p. 3–8, 2014.

LINDE, M.; GALBE, M.; ZACCHI, G. Simultaneous saccharification and fermentation of steam-pretreated barley straw at low enzyme loadings and low yeast concentration. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, p. 1100–1107, 2007.

LUCCIO, E. D. I. et al. STRUCTURAL AND KINETIC STUDIES OF INDUCED FIT IN XYLULOSE KINASE FROM E. COLI. **J Mol Biol.**, v. 365, n. 3, p. 783–798, 2007.

MACHADO, C. M. M. **Microrganismos na Produção de Biocombustíveis Líquidos**. 1a edição ed. Brasília: EMBRAPA, 2013. p. 319

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

MENON, V.; RAO, M. Trends in bioconversion of lignocellulose: Biofuels, platform chemicals & biorefinery concept. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 38, n. 4, p. 522–550, ago. 2012.

MicroPulser™ Electroporation Apparatus Operating Instructions and Applications Guide , 2000. Disponível em: <papers://89d36d58-78ed-4e44-9192-508166ce5564/Paper/p184>

MOES, C.; PRETORIUS, I.; ZYL, W. Cloning and expression of the *Clostridium thermosulfurogenes* D-xylose isomerase gene (xyLA) in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology Letters**, v. 18, n. 3, p. 269–274, 1996.

MOREIRA, J. R.; GOLDEMBERG, J. The alcohol program. **Energy Policy**, v. 27, p. 229–245, 1999.

MUMBERG, D.; MULIER, R.; FUNK, M. Regulatable promoters of *Saccharomyces cerevisiae*: comparison of transcriptional activity and their use for heterologous expression. **Nucleic Acids Research**, v. 22, n. 25, p. 5767–5768, 1994.

NEVOIGT, E. Progress in metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiology and molecular biology reviews : MMBR**, v. 72, n. 3, p. 379–412, 2008.

NIELSEN, J. et al. Metabolic engineering of yeast for production of fuels and chemicals. **Current opinion in biotechnology**, v. 24, n. 3, p. 398–404, jun. 2013.

NIGAM, P. S.; SINGH, A. Production of liquid biofuels from renewable resources. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 37, p. 52–68, 2011.

NYLUND, N.-O.; AAKKO-SAKSA, P.; SIPILÄ, K. Status and outlook for biofuels, other alternative fuels and new vehicles, 2008. Disponível em: <<http://www.ieabioenergy.com/wp-content/uploads/2013/10/Status-and-outlook-for-biofuels-other-alternative-fuels-and-new-vehicles.pdf>>. Acesso em: 6 mar. 2015.

ÖHGREN, K. et al. Effect of hemicellulose and lignin removal on enzymatic hydrolysis of steam pretreated corn stover. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 2503–2510, 2007.

OLSSON, L.; HAHN-HÄGERDAL, B. Fermentative performance of bacteria and yeasts in lignocellulose hydrolysates. **Process Biochemistry**, v. 28, p. 249–257, 1993.

PAES, B. G.; ALMEIDA, J. R. M. Genetic improvement of microorganisms for applications in biorefineries. n. Figure 1, p. 1–10, 2014.

PARACHIN, N. S.; ALMEIDA, J. R. M. MICRORGANISMOS PARA A PRODUÇÃO DE ETANOL: FERMENTAÇÃO DE PENTOSSES E HEXOSSES. In: **Microrganismos na Produção de B combustíveis Líquidos**. Brasília: EMBRAPA, 2013. p. 189–204.

PARREIRAS, L. S. et al. Engineering and Two-Stage Evolution of a Lignocellulosic Hydrolysate-Tolerant *Saccharomyces cerevisiae* Strain for Anaerobic Fermentation of Xylose from AFEX Pretreated Corn Stover. **PLoS One**. v. 9, n. 9, 2014.

PETERSON, T. C.; CONNOLLEY, W. M.; FLECK, J. The myth of the 1970s global cooling scientific consensus. **Bulletin of the American Meteorological Society**, v. 89, n. February, p. 1325–1337, 2008.

PRONK, J. T. Auxotrophic Yeast Strains in Fundamental and Applied Research. **Applied and environmental microbiology**, v. 68, n. 5, p. 2095–2100, 2002.

PUPPÁN, D. Environmental evaluation of biofuels. **Periodica Polytechnica, Social and Management Sciences**, v. 10, n. 1, p. 95–116, 2002.

RÉMOND, C. et al. Combination of ammonia and xylanase pretreatments: Impact on enzymatic xylan and cellulose recovery from wheat straw. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 17, p. 6712–6717, 2010.

RICHARD, P.; TOIVARI, M. H.; PENTTILÄ, M. The role of xylulokinase in *Saccharomyces cerevisiae* xylulose catabolism. **FEMS Microbiology Letters**, v. 190, p. 39–43, 2000.

ROBZYK, K.; KASSIR, Y. A simple and highly efficient procedure for rescuing autonomous plasmids from yeast. **Nucleic acids research**, v. 20, n. 14, p. 3790, 1992.

RODRIGUEZ-PEÑA, J. M. et al. The YGR194c (XKS1) gene encodes the xylulokinase from the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 162, p. 155–160, 1998.

ROTHEN, S. A. et al. Growth characteristics of *Escherichia coli* HB101[pGEc47] on defined medium. **Biotechnology and bioengineering**, v. 58, n. 1, p. 92–100, 5 abr. 1998.

SAHA, B. C. Lignocellulose Biodegradation and Applications in Biotechnology Structure and Composition of Lignocellulosic Biomass. **American Chemical Society**, p. 2–33, 2004.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. **Molecular Cloning: A laboratory Manual**. Third Edit ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

SANGER, F.; COULSON, A R. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. **Journal of molecular biology**, v. 94, p. 441–448, 1975.

SARTHIY, A. V et al. Expression of the Escherichia coli Xylose Isomerase Gene in Saccharomyces cerevisiae S1. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 53, n. 9, p. 1996–2000, 1987.

SAUER, U. Evolutionary engineering of industrially important microbial phenotypes. **Advances in biochemical engineering/biotechnology**, v. 73, p. 129–169, 2001.

SEDLAK, M.; HO, N. W. Y. Characterization of the effectiveness of hexose transporters for transporting xylose during glucose and xylose co-fermentation by a recombinant Saccharomyces yeast. **Yeast**, v. 21, p. 671–684, 2004.

SHEN, Y. et al. An efficient xylose-fermenting recombinant Saccharomyces cerevisiae strain obtained through adaptive evolution and its global transcription profile. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 96, p. 1079–1091, 2012.

SLUITER, J. B. et al. Compositional analysis of lignocellulosic feedstocks. 1. Review and description of methods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 9043–9053, 2010.

STAMBUK, B. U. et al. Brazilian potential for biomass ethanol: Challenge of using hexose and pentose co-fermenting yeast strains. **Journal of Scientific & Industrial Research**. v. 67, n. November, p. 918–926, 2008.

SUBTIL, T.; BOLES, E. Competition between pentoses and glucose during uptake and catabolism in recombinant Saccharomyces cerevisiae. **Biotechnology for Biofuels**, v. 5, n. 1, p. 14, 2012.

TAYLOR, G. Biofuels and the biorefinery concept. **Energy Policy**, v. 36, n. 12, p. 4406–4409, dez. 2008.

TOIVARI, M. H. et al. Conversion of xylose to ethanol by recombinant Saccharomyces cerevisiae: importance of xylulokinase (XKS1) and oxygen availability. **Metabolic engineering**, v. 3, p. 236–249, 2001.

TOIVARI, M. H. et al. Endogenous Xylose Pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied And Environmental Microbiology**, V. 70, N. 6, P. 3681–3686, 2004.

TRÄFF- BJERRE, K.; JEPPSSON, M. Endogenous NADPH- dependent aldose reductase activity influences product formation during xylose consumption in recombinant *Saccharomyces*. **Yeast**, p. 141–150, 2004.

UENG, P. P. et al. D-XYLULOSE FERMENTATION IN YEASTS. **Biotechnology letters**, v. 3, n. 6, p. 315–320, 1981.

UNICA - UNIÃO DA INDÚSTRIA DE CANA-DE-AÇÚCAR -. Disponível em: <<http://www.unicadata.com.br/>>. Acesso em: 7 maio. 2015.

UNICA – UNIÃO DA INDÚSTRIA DA CANA DE AÇÚCAR. **Carro flex com etanol : uma atitude inteligente** ., 2010. Disponível em: <<http://www.unica.com.br/documentos/publicacoes/>>

UNICA – UNIÃO DA INDÚSTRIA DA CANA DE AÇÚCAR. **Cartilha Movimento Mais Etanol**, 2011a. Disponível em: <<http://www.unica.com.br/documentos/publicacoes/>>

UNICA – UNIÃO DA INDÚSTRIA DA CANA DE AÇÚCAR. **Bagaço de cana pode ganhar valor substituindo areia na construção civil - Unica**. Disponível em: <<http://www.unica.com.br/noticia/33630022920327850689/bagaco-de-cana-pode-ganhar-valor-substituindo-areia-na-construcao-civil/>>. Acesso em: 7 maio. 2015b.

VAN MARIS, A. J. A et al. Alcoholic fermentation of carbon sources in biomass hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*: current status. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 90, n. 4, p. 391–418, nov. 2006.

VAN MARIS, A. J. A et al. Development of efficient xylose fermentation in *Saccharomyces cerevisiae*: xylose isomerase as a key component. **Advances in biochemical engineering/biotechnology**, v. 108, n. April, p. 179–204, jan. 2007.

VAN VLEET, J. H.; JEFFRIES, T. W. Yeast metabolic engineering for hemicellulosic ethanol production. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 20, n. Figure 1, p. 300–306, 2009.

VASAVADA, N. **One-way ANOVA with post-hoc Tukey HSD Calculator**. Disponível em: <<http://statistica.moood.com/>>. Acesso em: 17 mar. 2015.

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

ANEXOS

```
1      10      20      30      40      50      60      70
GA AAT TCC CAC A A T T C A A A A G A T T A A G T T C G A A G G T A A G G A T T C T A A G A A T C C A T T A G C C T T C C A C T A C T A
80      90      100     110     120     130     140
CG A T G C T G A A A A G G A A G T C A T G G G T A A G A A A T G A A G G A T T G G T T A C G T T T C G C C A T G G C C T G G T G G C A C A C T
150     160     170     180     190     200     210
C T T T G C G C C G A A G G T G C T G A C C A A T T C G G T G G A G G T A C A A A G T C T T T C C C A T G G A A C G A A G G T A C T G A T G C T A
220     230     240     250     260     270     280     290
T T G A A A T T G C C A A G C A A A A G G T T G A T G C T G G T T T C G A A A T C A T G C A A A A G C T T G G T A T T C C A T A C T A C T G T T T
300     310     320     330     340     350     360
C C A C G A T G T T G A T C T T T T T C C G A A G G T A A C T C T A T T G A A G A A T A C G A A T C C A A C C T T A A G G C T G T C G T T G C T
370     380     390     400     410     420     430
T A C C T C A A G G A A A A G C A A A A G G A A A C C G G T A T T A A G C T T C T C T G G A G T A C T G C T A A C G T C T T C G G T C A C A A G C
440     450     460     470     480     490     500     510
G T T A C A T G A A C G G T G C C T C C A C T A A C C C A G A C T T T G A T G T T G T C G C C C G T G C T A T T G T T C A A A T T A A G A A C G C
520     530     540     550     560     570     580
C A T A G A C G C C G G T A T T G A A C T T G G T G C T G A A A C T A C G T C T T C T G G G G T G G T C G T G A A G G T T A C A T G A G T C T C
590     600     610     620     630     640     650
C T T A A C A C T G A C C A A A A G C G T G A A A A G G A A C A C A T G G C C A C T A T G C T T A C C A T G G C T C G T G A C T A C G C T C G T T
660     670     680     690     700     710     720     730
C C A A G G G A T T C A A G G G T A C T T T C C T C A T T G A A C C A A A G C C A A T G G A A C C A A C C A A G C A C C A A T A C G A T G T T G A
740     750     760     770     780     790     800
C A C T G A A A C C G C T A T T G G T T T C C T T A A G G C C A C A A C T T A G A C A A G G A C T T C A A G G T C A A C A T T G A A G T T A A C
810     820     830     840     850     860     870
C A C G C T A C T C T T G C T G G T C A C A C T T T C G A A C A C G A A C T T G C C T G T G C T G T T G A T G C T G G T A T G C T C G G T T C C A
880     890     900     910     920     930     940
T T G A T G C T A A C C G T G G T G A C T A C C A A A A C G G T T G G G A T A C T G A T C A A T T C C C A A T T G A T C A A T A C G A A C T C G T
950     960     970     980     990     1,000  1,010  1,020
C C A A G C T T G G A T G G A A T C A T C C G T G G T G G T G G T T T C G T T A C T G G T G G T A C C A A C T T C G A T G C C A A G A C T C G T
1,030  1,040  1,050  1,060  1,070  1,080  1,090
C G T A A C T C T A C T G A C C T C G A A G A C A T C A T C A T T G C C C A C G T T T C T G G T A T G G A T G C T A T G G C T C G T G C T C T T G
1,100  1,110  1,120  1,130  1,140  1,150  1,160
A A A A C G C T G C C A A G C T C C T C C A A G A A T C T C C A T A C C A A G A T G A A G A A G G A A C G T T A C G C T T C C T T C G A C A G
1,170  1,180  1,190  1,200  1,210  1,220  1,230  1,240
T G G T A T T G G T A A G G A C T T T G A A G A T G G T A A G C T A C C C C T C G A A C A A G T T A C G A A T A C G G T A A G A A G A A C G G T
1,250  1,260  1,270  1,280  1,290  1,300  1,304
G A A C C A A A G C A A A C T T C T G G T A A G C A A G A A C T C T A C G A A G C T A T T G N G C C A M G T A C C A A T A A
```

Figura 21: Sequência gerada a partir da montagem de *contigs* do sequenciamento do plasmídeo p424-XI originalmente construído para transformação de linhagens, com par de oligonucleotídeos 11/12.


```

1      10      20      30      40      50      60      70
AATATTTCCCACAAATTAAAAGATAAGTTCGAAGGTAAGGATTCTAAGAATCCATTAGCCTTCCACTACTA
80      90      100     110     120     130     140
CGATGCTGAAAGGAAGTCATGGGTAAGAAAATGAAGGATTGGTTACGTTTCGCCATGGCCTGGTGGCACAC
150     160     170     180     190     200     210
TCTTTGGCGCCGAAGGTGCTGACCAATTCGGTGGAGGTACAAAGTCTTTCCCATGGAACGAAGGTACTGATGC
220     230     240     250     260     270     280
TATTGAAATTGCCAAGCAAAAGTTGATGCTGGTTTCGAAATCATGCAAAAGCTTGGTATTCCATACTACTG
290     300     310     320     330     340     350     360
TTCCACGATGTTGATCTTGTTCCGAAGGTAACTCTATTTGAAGAATACGAATCCAACCTTAAGGCTGTCGT
370     380     390     400     410     420     430
TGCTTACCTCAAGGAAAAGCAAAAGGAAAACCGGTATTAAGCTTCTCTGGAGTACTGCTAACGTCTTCGGTCA
440     450     460     470     480     490     500
CAAGCGTTACATGAACGGTGCCTCCACTAACCCAGACTTTGATGTGTCGCCCGTGCTATTGTTCAAATTAA
510     520     530     540     550     560     570
GAACGCCATAGACGCGCGGTATTGAACTTGGTGCTGAAAACTACCGTCTTCTGGGGTGGTCGTGAAAGGTTACAT
580     590     600     610     620     630     640
GAGTCTCCTTAACACTGACCAAAAGCGTGAAAAGGAACCACATGGCCACTATGCTTACCATGGCTCGTGACTA
650     660     670     680     690     700     710     720
CGCTCGTTCCAAGGGATTCAAGGGTACTTTCCTCATTGAACCAAAGCCAATGGAACCAACCAAGCACCAATA
730     740     750     760     770     780     790
CGATGTTGACACTGAAACCGCTATTGGTTTCCTTAAAGGCCCACAACTTAGACAAGGACTTCAAGGTCACAAT
800     810     820     830     840     850     860
TGAAGTTAACCACGCTACTCTTGGTGGTCACACTTTCGAAACCAACTTGCCTGTGCTGTTGATGCTGGTAT
870     880     890     900     910     920     930
GCTCGGTTCCATTGATGCTAACCGTGGTGACTACCAAAACCGTTGGGATACTGATCAATTCCCAATTGATCA
940     950     960     970     980     990     1,000
ATACGAACTCGTCCAAGCTTGGATGGAAATCATCCGTGGTGGTGGTTTCGTTACTGGTGGTACCAACTTCGA
1,010  1,020  1,030  1,040  1,050  1,060  1,070  1,080
TGCCAAGACTCGTCGTAACTCTACTGACCTCGAAGACATCATCATTGCCCACGTTTCTGGTATGGATGCTAT
1,090  1,100  1,110  1,120  1,130  1,140  1,150
GGCTCGTGCTCTTTGAAAACGCTGCCAAGCTCCTCCAGAATCTCCATACCAAGATTGAAGAAGGAACGTTA
1,160  1,170  1,180  1,190  1,200  1,210  1,220
CGCTTCCTTCGACAGTGGTATTGGTAAGGACTTTGAAGATGGTAAGCTCACCCTCGAACAAGTTTACGAATA
1,230  1,240  1,250  1,260  1,270  1,280  1,286
CGGTAAGAAGAACGGTGAACCAAAGCAAACTTCTGGTAAGCAAGAACTCTACGAAGCTATTC

```

Figura 22: Sequência gerada a partir montagem de contigs do sequenciamento da PCR de *XIPiro* utilizando plasmídeo extraído da levedura L2XI Condicionada como molde com par de oligonucleotídeos 11/12.

```

1      10      20      30      40      50      60      70
ATA TTTCCCA CAAATTC AAAAGATTA AGTTCG AAGGTA AGGATTC TAAGAA TCCATTA CCTTCCACTACTAC
80      90      100     110     120     130     140
GATGCTGAAAAGGAAGTCA TGGGTAAGAAA TGAAGGATTGGTTACGTTTCGCCATGGCCTGGTGCCACACTC
150     160     170     180     190     200     210
TTTTCGCCCGAAGGTGCTGACCAATTCGGTGGAGGTACAAAGTCTTTCCCATGGAAACGAAGGTACTGATGCTAT
220     230     240     250     260     270     280     290
TGAAATTGCCAAGCAAAGGTTGATGCTGGTTTCGAAATCATGCAAAGCTTGGTATTCCATACTACTGTTTC
300     310     320     330     340     350     360
CACGATGTTGATCTTGTTC CGAAGGTA ACTCTATTGAAGAA TACGAA TCCAACTTAAAGGCTGTCGTGCTT
370     380     390     400     410     420     430
ACCTCAAGGAAAAGCAAAGGAAAACCGGTATTAAGCTTCTCTGGAGTACTGCTAACGCTTTCGGTCACAAGCG
440     450     460     470     480     490     500     510
TTACATGAACGGTGCCTCCACTAACCCAGACTTTGATGTTGTCGCCCGTGC TATTGTTCAAATTAAGAACGCC
520     530     540     550     560     570     580
ATAGACGCCGGTATTGAACTTGGTGCTGAAAAC TACGCTCTTCTGGGGTGGTCGTGAAGGTTACATGAGTCTCC
590     600     610     620     630     640     650
TTAAACTGACCAAAGCGTGAAAAGGAACACATGGCCACTATGCTTACCA TGGCTCGTGACTACGCTCGTTC
660     670     680     690     700     710     720     730
CAAGGGATTCAAGGGTACTTTCCCTCATTGAAACCAAAGCCAATGGAACCAACCAAAGCACC AATACGATGTTGAC
740     750     760     770     780     790     800
ACTGAAACCGCTATTGGTTTCCCTTAAGGCCCACTTA GACAAGGACTTCAAGGTC AACTTGAAGTAAACC
810     820     830     840     850     860     870
ACGCTACTCTTGCTGCTCACACTTTCGAACACGAACTTGCCTGTGCTGTTGATGCTGGTATGCTCGGTTCCAT
880     890     900     910     920     930     940
TGA TGCTAACCGTGGTGACTACCAAAAACGGT TGGGTA TACTGA TCAATTC CCAA TTTGATCAATA CGAACTCGTC
950     960     970     980     990     1,000     1,010     1,020
CAA GCTTGGATGGAAATCATCCGTGGTGGTGGTTTCGTTACTGGTGGTACCAA CTTCGATGCCAAGACTCGTC
1,030     1,040     1,050     1,060     1,070     1,080     1,090
GTA ACTCTACTGACCTCGAAGACATCATCATTGCCCA CGTTTCTGGTATGGATGCTATGGCTCGTGCTCTTGA
1,100     1,110     1,120     1,130     1,140     1,150     1,160
AAA CGCTGCCAAGCTCC TCCAAGAA TCTCCA TACACCAAAGTGAAGAAGGAACGTTACGCTTCCCTTCGACAGT
1,170     1,180     1,190     1,200     1,210     1,220     1,230     1,240
GGTATTGGTAAGGACTTTGAAGATGGTAAGCTCACCCCTCGAA CAAGTTTACGAATACGGTAAGAAAGCAAGGTG
1,250     1,260     1,270     1,280     1,290     1,300     1,303
AACCAAAGCAA ACTTCTGGTAAAGCAAAGAACTCTACGAAGCTATTGTTGCCATGTACCAATAA

```

Figura 23: Sequência gerada a partir montagem de contigs do sequenciamento de *XIPiro* dos plasmídeos A B, C, D e E extraídos das colônias de *E. coli* transformadas com plasmídeo da levedura L7XIΦ Condicionada, com par de oligonucleotídeos 11/12.

```

1      10      20      30      40      50      60      70
A T A T T T C C C A C A A A T T C A A A A G A T T A A G T T C G A A G G T A A G G A T T C T A A G A A T C C A T T A G C C T T C C A C T A C T A C
80      90      100     110     120     130     140
G A T G C T G A A A A G G A A G T C A T G G G T A A G A A A A T G A A G G A T T G G T T A C G T T T C G C C A T G G C C T G G T G G C A C A C T C
150     160     170     180     190     200     210
T T T G C G C C G A A G G T G C T G A C C A A T T C G G T G G A G G T A C A A A G T C T T T C C C A T G G A A C G A A G G T A C T G A T G C T A T
220     230     240     250     260     270     280     290
T G A A A T T G C C A A G C A A A A G G T T G A T G C T G G T T T C G A A A T C A T G C A A A A G C T T G G T A T T C C A T A C T A C T A C T T T C
300     310     320     330     340     350     360
C A C G A T G T T G A T C T T G T T T C C G A A G G T A A C T C T A T T G A A G A A T A C G A A T C C A A C C T T A A G G C T G T C G T T G C T T
370     380     390     400     410     420     430
A C C T C A A G G A A A A G C A A A A G G A A A C C G G T A T T A A G C T T C T C T G G A G T A C T G C T A A C G T C T T C G G T C A C A A G C G
440     450     460     470     480     490     500     510
T T A C A T G A A C G G T G C C T C C A C T A A C C C A G A C T T T G A T G T T G T C G C C C G T G C T A T T G T T C A A A T T A A G A A C G C C
520     530     540     550     560     570     580
A T A G A C G C C G G T A T T G A A C T T G G T G C T G A A A A C T A C G T C T T C T G G G G T G G T C G T G A A G G T T A C A T G A G T C T C C
590     600     610     620     630     640     650
T T A A C A C T G A C C A A A G C G T G A A A A G G A A C A C A T G G C C A C T A T G C T T A C C A T G G C T C G T G A C T A C G C T C G T T C
660     670     680     690     700     710     720     730
C A A G G G A T T C A A G G G T A C T T T C C T C A T T G A A C C A A A G C C A A T G G A A C C A A C C A A G C A C C A A T A C G A T G T T G A C
740     750     760     770     780     790     800
A C T G A A A C C G C T A T T G G T T T C C T T A A G G C C C A C A A C T T A G A C A A G G A C T T C A A G G T C A A C A T T G A A G T T A A C C
810     820     830     840     850     860     870
A C G C T A C T C T T G C T G C T C A C A C T T T C G A A C A C G A A C T T G C C T G T G C T G T T G A T G C T G G T A T G C T C G G T T C C A T
880     890     900     910     920     930     940
T G A T G C T A A C C G T G G T G A C T A C C A A A A C G G T T G G G A T A C T G A T C A A T T C C C A A T T G A T C A A T A C G A A C T C G T C
950     960     970     980     990     1,000     1,010     1,020
C A A G C T T G G A T G G A A A T C A T C C G T G G T G G T G G T T T C G T T A C T G G T G G T A C C A A C T T C G A T G C C A A G A C T C G T C
1,030     1,040     1,050     1,060     1,070     1,080     1,090
G T A A C T C T A C T G A C C T C G A A G A C A T C A T C A T T G C C C A C G T T T C T G G T A T G G A T G C T A T G G C T C G T G C T C T T G A
1,100     1,110     1,120     1,130     1,140     1,150     1,160
A A A C G C T G C C A A G C T C C T C C A A G A A T C T C C A T A C A C C A A G A T G A A G A A G G A A C G T T A C G C T T C C T T C G A C A G T
1,170     1,180     1,190     1,200     1,210     1,220     1,230     1,240
G G T A T T G G T A A G G A C T T T G A A G A T G G T A A G C T C A C C C T C G A A C A A G T T T A C G A A T A C G G T A A G A A G A A C G G T G
1,250     1,260     1,270     1,280     1,290     1,300     1,303
A A C C A A A G C A A A C T T C T G G T A A G C A A G A A C T C T A C G A A G C T A T T G T T G C C A T G T A C C A A T A A

```

Figura 24: Sequência gerada a partir montagem de contigs do sequenciamento de *XIPiro* dos plasmídeos A B, C, D e F extraídos das colônias de *E. coli* transformadas com plasmídeo da levedura L7XIXK Condicionada, com par de oligonucleotídeos 11/12.

			1	10	20	30	40	50	60
	L2XI	consensus	sequence	-ATATTNCCNNCAAATTC	CAAAAN-GATTAAGTT	CGAAGGTAAGGAT	TCTAAGAATCCATTA		
P424XI	Controle	consensus	sequence	GATATTNCCNNCAAATTC	CAAAA-GATTAAGTT	CGAAGGTAAGGAT	TCTAAGAATCCATTA		
	L7XI0	consensus	sequence	-ATATTTCCNCNCAAATTC	AAAAANGATTAAGTT	CGAAGGTAAGGAT	TCTAAGAATCCATTA		
	L7XIXK	consensus	sequence	-ATATTTCCNACAAATTC	AAAA-GATTAAGTT	CGAAGGTAAGGAT	TCTAAGAATCCATTA		
	L2XI	consensus	sequence	-GCCTTCCACTACTACGAT	GCTGAAAAGGAAGT	CATGGGTAAGAAAAT	GAAGGATTGGTT		
P424XI	Controle	consensus	sequence	-GCCTTCCACTACTACGAT	GCTGAAAAGGAAGT	CATGGGTAAGAAAAT	GAAGGATTGGTT		
	L7XI0	consensus	sequence	SNCCTTCCACTACTACGAT	GCTGAAAAGGAAGT	CATGGGTAAGAAAAT	GAAGGATTGGTT		
	L7XIXK	consensus	sequence	-GCCTTCCACTACTACGAT	GCTGAAAAGGAAGT	CATGGGTAAGAAAAT	GAAGGATTGGTT		
	L2XI	consensus	sequence	ACGTTTCGCCATGGCCT	TGGTGGCACACTCTTT	TGCGCCGAAGGTGCT	GACCAATTCGGTGG		
P424XI	Controle	consensus	sequence	ACGTTTCGCCATGGCCT	TGGTGGCACACTCTTT	TGCGCCGAAGGTGCT	GACCAATTCGGTGG		
	L7XI0	consensus	sequence	ACGTTTCGCCATGGCCT	TGGTGGCACACTCTTT	TGCGCCGAAGGTGCT	GACCAATTCGGTGG		
	L7XIXK	consensus	sequence	ACGTTTCGCCATGGCCT	TGGTGGCACACTCTTT	TGCGCCGAAGGTGCT	GACCAATTCGGTGG		
	L2XI	consensus	sequence	AGGTACAAAGTCTTTCC	CATGGAACGAAGGTACT	GATGCTATTGAAAT	TGCCAAGCAAAA		
P424XI	Controle	consensus	sequence	AGGTACAAAGTCTTTCC	CATGGAACGAAGGTACT	GATGCTATTGAAAT	TGCCAAGCAAAA		
	L7XI0	consensus	sequence	AGGTACAAAGTCTTTCC	CATGGAACGAAGGTACT	GATGCTATTGAAAT	TGCCAAGCAAAA		
	L7XIXK	consensus	sequence	AGGTACAAAGTCTTTCC	CATGGAACGAAGGTACT	GATGCTATTGAAAT	TGCCAAGCAAAA		
	L2XI	consensus	sequence	GGTTGATGCTGGTTTC	GAAATCATGCAAAAGCT	TGGTATTCCATACTACT	GTTTCCACGA		
P424XI	Controle	consensus	sequence	GGTTGATGCTGGTTTC	GAAATCATGCAAAAGCT	TGGTATTCCATACTACT	GTTTCCACGA		
	L7XI0	consensus	sequence	GGTTGATGCTGGTTTC	GAAATCATGCAAAAGCT	TGGTATTCCATACTACT	GTTTCCACGA		
	L7XIXK	consensus	sequence	GGTTGATGCTGGTTTC	GAAATCATGCAAAAGCT	TGGTATTCCATACTACT	GTTTCCACGA		
	L2XI	consensus	sequence	TGTTGATCTTGTTTCC	GAAAGTAACTCTATT	GAAAGTAACTCTATT	GAAAGTAACTCTATT		
P424XI	Controle	consensus	sequence	TGTTGATCTTGTTTCC	GAAAGTAACTCTATT	GAAAGTAACTCTATT	GAAAGTAACTCTATT		
	L7XI0	consensus	sequence	TGTTGATCTTGTTTCC	GAAAGTAACTCTATT	GAAAGTAACTCTATT	GAAAGTAACTCTATT		
	L7XIXK	consensus	sequence	TGTTGATCTTGTTTCC	GAAAGTAACTCTATT	GAAAGTAACTCTATT	GAAAGTAACTCTATT		
	L2XI	consensus	sequence	CGTTGCTTACCTCAAG	AAAAGCAAAAGGAAAC	CGGTATTAAAGCTTCT	TGGAGTACTGC		
P424XI	Controle	consensus	sequence	CGTTGCTTACCTCAAG	AAAAGCAAAAGGAAAC	CGGTATTAAAGCTTCT	TGGAGTACTGC		
	L7XI0	consensus	sequence	CGTTGCTTACCTCAAG	AAAAGCAAAAGGAAAC	CGGTATTAAAGCTTCT	TGGAGTACTGC		
	L7XIXK	consensus	sequence	CGTTGCTTACCTCAAG	AAAAGCAAAAGGAAAC	CGGTATTAAAGCTTCT	TGGAGTACTGC		
	L2XI	consensus	sequence	TAACGCTCTTCGGT	CACAAGCGTTACAT	GAAACGGTGCCTCC	ACTAACCCAGACTTT		
P424XI	Controle	consensus	sequence	TAACGCTCTTCGGT	CACAAGCGTTACAT	GAAACGGTGCCTCC	ACTAACCCAGACTTT		
	L7XI0	consensus	sequence	TAACGCTCTTCGGT	CACAAGCGTTACAT	GAAACGGTGCCTCC	ACTAACCCAGACTTT		
	L7XIXK	consensus	sequence	TAACGCTCTTCGGT	CACAAGCGTTACAT	GAAACGGTGCCTCC	ACTAACCCAGACTTT		
	L2XI	consensus	sequence	TGTCG-CCCGT	GCTATTGTTCAAATTA	AAGAACGCCATAGAC	CCCGGATTGAACTTGGTG		
P424XI	Controle	consensus	sequence	TGTCG-CCCGT	GCTATTGTTCAAATTA	AAGAACGCCATAGAC	CCCGGATTGAACTTGGTG		
	L7XI0	consensus	sequence	TGTCGNCCCGT	GCTATTGTTCAAATTA	AAGAACGCCATAGAC	CCCGGATTGAACTTGGTG		
	L7XIXK	consensus	sequence	TGTCG-CCCGT	GCTATTGTTCAAATTA	AAGAACGCCATAGAC	CCCGGATTGAACTTGGTG		
	L2XI	consensus	sequence	CTGAAAAC	TACGCTCTTCTGGGGT	GGTCTGTAAGGTT	TACATGAGTCTCCTTA		
P424XI	Controle	consensus	sequence	CTGAAAAC	TACGCTCTTCTGGGGT	GGTCTGTAAGGTT	TACATGAGTCTCCTTA		
	L7XI0	consensus	sequence	CTGAAAAC	TACGCTCTTCTGGGGT	GGTCTGTAAGGTT	TACATGAGTCTCCTTA		
	L7XIXK	consensus	sequence	CTGAAAAC	TACGCTCTTCTGGGGT	GGTCTGTAAGGTT	TACATGAGTCTCCTTA		
	L2XI	consensus	sequence	AAAAGCGT	GAAAAGGAACACAT	TGGCCACTATGCTT	ACCATGGCTCGTGACT		
P424XI	Controle	consensus	sequence	AAAAGCGT	GAAAAGGAACACAT	TGGCCACTATGCTT	ACCATGGCTCGTGACT		
	L7XI0	consensus	sequence	AAAAGCGT	GAAAAGGAACACAT	TGGCCACTATGCTT	ACCATGGCTCGTGACT		
	L7XIXK	consensus	sequence	AAAAGCGT	GAAAAGGAACACAT	TGGCCACTATGCTT	ACCATGGCTCGTGACT		

	L2XI	consensus	sequence	CCAAGGGATTCAAGGGTACTTTCTCATTGAACCAAAGCCAATGGAACCAACCAAGCACC
P424XI	Controle	consensus	sequence	CCAAGGGATTCAAGGGTACTTTCTCATTGAACCAAAGCCAATGGAACCAACCAAGCACC
	L7XI0	consensus	sequence	CCAAGGGATTCAAGGGTACTTTCTCATTGAACCAAAGCCAATGGAACCAACCAAGCACC
	L7XIXK	consensus	sequence	CCAAGGGATTCAAGGGTACTTTCTCATTGAACCAAAGCCAATGGAACCAACCAAGCACC
	L2XI	consensus	sequence	AATACGATGTTGACACTGAAACCGCTATTGGTTTCCTTAAGGCCACAACTTAGACAAGG
P424XI	Controle	consensus	sequence	AATACGATGTTGACACTGAAACCGCTATTGGTTTCCTTAAGGCCACAACTTAGACAAGG
	L7XI0	consensus	sequence	AATACGATGTTGACACTGAAACCGCTATTGGTTTCCTTAAGGCCACAACTTAGACAAGG
	L7XIXK	consensus	sequence	AATACGATGTTGACACTGAAACCGCTATTGGTTTCCTTAAGGCCACAACTTAGACAAGG
	L2XI	consensus	sequence	ACTTCAAGGTCAACATTGAAGTTAACCACGCTACTCTTGCTGGTCACACTTTTGAACACG
P424XI	Controle	consensus	sequence	ACTTCAAGGTCAACATTGAAGTTAACCACGCTACTCTTGCTGGTCACACTTTTGAACACG
	L7XI0	consensus	sequence	ACTTCAAGGTCAACATTGAAGTTAACCACGCTACTCTTGCTGGTCACACTTTTGAACACG
	L7XIXK	consensus	sequence	ACTTCAAGGTCAACATTGAAGTTAACCACGCTACTCTTGCTGGTCACACTTTTGAACACG
	L2XI	consensus	sequence	AACTTGCCTGTGCTGTTGATGCTGGTATGCTCGGTTCCATTGATGCTAACCGTGGTGACT
P424XI	Controle	consensus	sequence	AACTTGCCTGTGCTGTTGATGCTGGTATGCTCGGTTCCATTGATGCTAACCGTGGTGACT
	L7XI0	consensus	sequence	AACTTGCCTGTGCTGTTGATGCTGGTATGCTCGGTTCCATTGATGCTAACCGTGGTGACT
	L7XIXK	consensus	sequence	AACTTGCCTGTGCTGTTGATGCTGGTATGCTCGGTTCCATTGATGCTAACCGTGGTGACT
	L2XI	consensus	sequence	ACCAAACGGTTGGGATACTGATCAATTCCTCAATTGATCAATACGAACCTCGTCCAAGCTT
P424XI	Controle	consensus	sequence	ACCAAACGGTTGGGATACTGATCAATTCCTCAATTGATCAATACGAACCTCGTCCAAGCTT
	L7XI0	consensus	sequence	ACCAAACGGTTGGGATACTGATCAATTCCTCAATTGATCAATACGAACCTCGTCCAAGCTT
	L7XIXK	consensus	sequence	ACCAAACGGTTGGGATACTGATCAATTCCTCAATTGATCAATACGAACCTCGTCCAAGCTT
	L2XI	consensus	sequence	GGATGGAATCATCCGTGGTGGTGGTTTCGTTACTGGTGGTACCAACTTCGATGCCAAGA
P424XI	Controle	consensus	sequence	GGATGGAATCATCCGTGGTGGTGGTTTCGTTACTGGTGGTACCAACTTCGATGCCAAGA
	L7XI0	consensus	sequence	GGATGGAATCATCCGTGGTGGTGGTTTCGTTACTGGTGGTACCAACTTCGATGCCAAGA
	L7XIXK	consensus	sequence	GGATGGAATCATCCGTGGTGGTGGTTTCGTTACTGGTGGTACCAACTTCGATGCCAAGA
	L2XI	consensus	sequence	CTCGTCGTAACCTACTGACCTCGAAGACATCATCATTGCCACCGTTTCTGGTATGGATG
P424XI	Controle	consensus	sequence	CTCGTCGTAACCTACTGACCTCGAAGACATCATCATTGCCACCGTTTCTGGTATGGATG
	L7XI0	consensus	sequence	CTCGTCGTAACCTACTGACCTCGAAGACATCATCATTGCCACCGTTTCTGGTATGGATG
	L7XIXK	consensus	sequence	CTCGTCGTAACCTACTGACCTCGAAGACATCATCATTGCCACCGTTTCTGGTATGGATG
	L2XI	consensus	sequence	CTATGGCTCGTGCTCTTGAAAACGCTGCCAAGCTCCTCCAAGAATCTCCATACACCAAGA
P424XI	Controle	consensus	sequence	CTATGGCTCGTGCTCTTGAAAACGCTGCCAAGCTCCTCCAAGAATCTCCATACACCAAGA
	L7XI0	consensus	sequence	CTATGGCTCGTGCTCTTGAAAACGCTGCCAAGCTCCTCCAAGAATCTCCATACACCAAGA
	L7XIXK	consensus	sequence	CTATGGCTCGTGCTCTTGAAAACGCTGCCAAGCTCCTCCAAGAATCTCCATACACCAAGA
	L2XI	consensus	sequence	TGAAGAAGGAACGTTACGCTTCCTTCGACAGTGGTATTGGTAAGGACTTTGAAGATGGTA
P424XI	Controle	consensus	sequence	TGAAGAAGGAACGTTACGCTTCCTTCGACAGTGGTATTGGTAAGGACTTTGAAGATGGTA
	L7XI0	consensus	sequence	TGAAGAAGGAACGTTACGCTTCCTTCGACAGTGGTATTGGTAAGGACTTTGAAGATGGTA
	L7XIXK	consensus	sequence	TGAAGAAGGAACGTTACGCTTCCTTCGACAGTGGTATTGGTAAGGACTTTGAAGATGGTA
	L2XI	consensus	sequence	AGCTCACCTCGAACAAGTTTACGAATACGGTAAGAAGAACGGTGAACCAAAGCAAACCTT
P424XI	Controle	consensus	sequence	AGCTCACCTCGAACAAGTTTACGAATACGGTAAGAAGAACGGTGAACCAAAGCAAACCTT
	L7XI0	consensus	sequence	AGCTCACCTCGAACAAGTTTACGAATACGGTAAGAAGAACGGTGAACCAAAGCAAACCTT
	L7XIXK	consensus	sequence	AGCTCACCTCGAACAAGTTTACGAATACGGTAAGAAGAACGGTGAACCAAAGCAAACCTT
	L2XI	consensus	sequence	CTGGTAAGCAAGAACTCTACGAAGCTATTG-----
P424XI	Controle	consensus	sequence	CTGGTAAGCAAGAACTCTACGAAGCTATTGNTGCCATGTACCAATAA
	L7XI0	consensus	sequence	CTGGTAAGCAAGAACTCTACGAAGCTATTGTTGCCATGTACCAATAA
	L7XIXK	consensus	sequence	CTGGTAAGCAAGAACTCTACGAAGCTATTGTTGCCATGTACCAATAA

Figura 25: Alinhamento entre seqüências obtidas, dos plasmídeos p424-XI, L2XI, L7XIΦ e L7XIXK Condicionadas.