

Gabriela Farias Gubert

Clonagem e expressão das enzimas heterólogas xilose redutase e xilitol desidrogenase em *Saccharomyces cerevisiae* e análise do consumo de xilose por linhagens recombinantes

Trabalho de Conclusão de Curso
submetido(a) ao Curso de Ciências
Biológicas da Universidade Federal de
Santa Catarina para a obtenção do
Grau de Bacharela em Ciências
Biológicas
Orientador: Prof. Dr. Boris Juan Carlos
Ugarte Stambuk
Coorientador: Ma. Angela Alves dos
Santos

Florianópolis
2017

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Gubert, Gabriela Farias
Clonagem e expressão das enzimas heterólogas
xilose redutase e xilitol desidrogenase em
Saccharomyces cerevisiae e análise do consumo de
xilose por linhagens recombinantes / Gabriela
Farias Gubert ; orientador, Boris Juan Carlos
Ugarte Stambuk, coorientador, Angela Alves dos
Santos , 2017.
40 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de
Pós-Graduação em , Florianópolis, 2017.

Inclui referências.

1. . 2. biotecnologia. 3. levedura. 4. etanol.
I. Stambuk, Boris Juan Carlos Ugarte . II. dos
Santos , Angela Alves . III. Universidade Federal
de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em . IV.
Titulo.

Este trabalho é dedicado aos
maravilhosos seres com os quais pude
compartilhar desse espaço-tempo.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente aos meus pais, Silvio Luiz Gubert e Ivana Farias Gubert, por sempre terem acreditado nos meus objetivos, me incentivando dentro de suas possibilidades. Vocês estão a 23 possibilitando minha formação como ser humano, mulher, cientista, forte e independente.

Agradeço também ao Prof. Dr. Boris Stambuk pela oportunidade, como também a todo o LBMBL pelos momentos de colaboração, pelos ensinamentos e também por criar um ambiente de trabalho mais parecido com uma família. Obrigada Marília Knychala, Eduardo Zanella, Leonardo Kretzer, Bruna de Souza, Cristina Rios, Theo Brascher, João Viana, e em especial a Adriane Mouro, Wallace Pereira e Angela dos Santos pela divisão de bancada e orientação, vocês possibilitaram um desenvolvimento acadêmico e pessoal muito maior.

Às pessoas que dividiram seu conhecimento e vida comigo ao longo dessa graduação. Os professores que dedicaram horas afim de formar mais que profissionais, destaque para Tania Tarabini Castellani e Renato Freitas pela orientação com uma formação mais completa dentro do PET Biologia. Aos alunos que dividiram essa jornada comigo, os petianos, como também meus colegas de graduação, minha sala 2012.2 e seus agregados.

Às minhas panteras, Kelly Inagaki, Fabiola Eckert e Maria Eduarda Borges, e a minha dupla favorita, Leonardo Kretzer e Theo Brascher, eles me ensinaram que a vida é mais que um currículo e o conteudismo acadêmico. Juntos aprendemos que a academia pode ser extrapolada para uma mesa de bar, aprendemos a questionar o sistema estabelecido e a nos aprimorarmos como seres humanos.

Às amigas que Florianópolis me trouxe. Bianca por ter se transformado comigo ao longo desses 12 anos. Mariana Thomé, Gabriel Weinsberg, Pedro Aguiar, Xochilt Ibarra e Fernando Scheneider por impossibilitarem que eu me sentisse sozinha, mesmo quando eles não puderam estar fisicamente presente. Somos uma espécie social, então são essas as relações que alimentam a alma e justificam a vida. Agradeço.

Por fim, ao CNPQ e a UFSC pela possibilidade dessa realização.

“O universo não tem nenhuma obrigação em fazer sentido para você.”
(Neil deGrasse Tyson)

RESUMO

O biocombustível tornou-se uma alternativa ao uso do petróleo. Nesse cenário o Brasil apostou no etanol. Industrialmente, sua produção acontece através do processo de fermentação alcoólica pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* em matéria vegetal, como a cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.). Porém, a levedura não apresenta o metabolismo necessário para fermentar pentoses, como a xilose, um dos carboidratos mais abundantes em matéria lignocelulósica. Investigando leveduras que fermentam xilose, encontramos um processo de redução e oxidação mediado pelas enzimas Xilose Redutase (XR) e Xilitol Desidrogenase (XDH). Portanto, uma maneira de aumentar a produção de etanol no país, sem aumentar a área plantada de cana-de-açúcar, é a criação de linhagens de *S. cerevisiae* transformantes com as enzimas supracitadas. Para isso, buscamos as enzimas com maior atividade entre as espécies fermentadoras de xilose, chegando as seguintes duas espécies: *Spathaspora arborarie* e *Spathaspora passalidarum*. Sendo que a enzima XR de *S. arborarie*, além de apresentar alta atividade, apresenta atividade com dois cosubstratos, NADPH e NADH. Já a enzima XDH de *S. passalidarum* apresentou a maior atividade entre as enzimas XDH já descritas, e uma dependência do cosubstrato NAD⁺. O uso conjunto das enzimas é interessante pela reciclagem dos cosubstratos. Portanto, nesse trabalho, buscamos criar um plasmídeo com um forte promotor constitutivo PGK para XR e TEF para XDH com a intenção de transformar o organismo *S. cerevisiae* para futura produção de etanol a partir de xilose. Além disso, estudos de engenharia genética demonstraram um efeito positivo da deleção do gene *PHO13* de *S. cerevisiae*, já que essa mudança parece aumentar a expressão de enzimas da Via Glicolítica e da Via das Pentoses Fosfato. Por isso, utilizamos linhagens recombinantes *pho13Δ* com expressão das enzimas heterólogas supracitadas e comparamos seu perfil fermentativo com linhagens com a mesma expressão de enzimas, porém não *pho13Δ*. Como resultado, percebemos que a expressão das enzimas permite o consumo de xilose, porém percebemos pouca produção de etanol. A linhagem *pho13Δ* se torna vantajosa em fermentação com alta densidade de xilose, 10%, produzindo o dobro de etanol da linhagem não *pho13Δ*.

Palavras-chave: Etanol 2^a Geração. Gene *PHO13*. Gene *XYL1*. Gene *XYL2*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação esquemática da produção de etanol a partir da biomassa lignocelulósica.....	12
Figura 2 - Via metabólica inicial para a utilização da xilose.....	13
Figura 3 - Amplificação por PCR do gene <i>XYL1</i> a partir do genoma de <i>S. arborarie</i>	25
Figura 4 - Amplificação por PCR do gene <i>XYL2</i> a partir do genoma de <i>S. passalidarum</i>	26
Figura 5 - Digestão enzimática dos plasmídeos pPGK- <i>XYL1</i> e TEF-423- <i>XYL2</i> pelas enzimas <i>EcoRI</i> e <i>BamHI</i>	27
Figura 6 - Crescimento aeróbico da linhagem ASY-2-xr-xdh em meio sintético sem uracila e sem histidina com 20 g.L ⁻¹ de xilose como fonte de carbono por 100 horas.....	29
Figura 7 - Fermentação em batelada com meio sintético sem uracila e histidina contendo 20 g.L ⁻¹ de xilose como fonte de carbono pelas linhagens ASY-1-xr-xdh e ASY-2-xr-xdh.....	30
Figura 8 - Fermentação em batelada com meio sintético sem uracila e histidina contendo 100g.L ⁻¹ de xilose como fonte de carbono pelas linhagens ASY-1-xr-xdh e ASY-2-xr-xdh.....	31

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Leveduras utilizados nesse trabalho.....	18
Tabela 2 - Plasmídeos utilizados nesse trabalho.....	19
Tabela 3 - Tabela de iniciadores usados na amplificação dos genes <i>XYL1</i> e <i>XYL 2</i>	20
Tabela 4 - Atividade específica das enzimas xilose redutase e xilitol desidrogenase em leveduras portando os plasmídeos pPGK-XYL1 e TEF-423-XYL2.....	28

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 OBJETIVOS.....	17
2.1 OBJETIVO GERAL.....	17
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	17
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	18
3.1 LINHAGENS E PLASMÍDEOS.....	18
3.2 MEIOS DE CULTURA.....	19
3.3 AMPLIFICAÇÃO DOS GENES.....	20
3.3.1 XYL1 de <i>S. arborariae</i>.....	20
3.3.2 XYL2 de <i>S. passalidarum</i>.....	21
3.4 ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE.....	21
3.5 PURIFICAÇÃO DOS PRODUTOS DE PCR.....	21
3.6 REAÇÃO DE DIGESTÃO.....	21
3.7 REAÇÃO DE LIGAÇÃO.....	22
3.8 TRANSFORMAÇÃO DE BACTÉRIA.....	22
3.9 TRANSFORMAÇÃO DE LEVEDURAS.....	22
3.10 CRESCIMENTO CELULAR.....	23
3.11 ENSAIO FERMENTATIVO.....	23
3.12 DETERMINAÇÃO DOS SUBSTRATOS E PRODUTOS DOS CRESCIMENTOS E FERMENTAÇÕES.....	24
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	25
4.1 CLONAGEM DE XYL1 E XYL2 EM PLASMÍDEOS DE EXPRESSÃO.....	25
4.2 PERFIL FERMENTATIVO DE LINHAGENS DE <i>S.</i> CEREVISIAE RECOMBINANTES CONTENDO OS PLASMÍDEOS CONSTRUÍDOS.....	28
5 CONCLUSÃO.....	34
REFERÊNCIAS.....	35

1 INTRODUÇÃO

O uso do petróleo tornou-se tão multifacetado, de matriz energética a cosméticos, que como consequência observamos uma dependência global bastante significativa. No cenário atual, controlar sua extração e distribuição significa mais que tratar de relações de mercado, pois a influência do composto tornou-se tanta que sua abundância intervém na cotação do dólar e flutuação das bolsas de valor ao redor do globo. Por isso, o objeto petróleo tange temas maiores como a soberania nacional. Isso é explicitado pela Primeira Crise do Petróleo que elevou o preço do barril em 400% no período de cinco meses (outubro de 1973 a março de 1974) (SARKIS, 2006), obrigando o ocidente a pensar em alternativas. Com essa motivação foi criado em 75, durante o governo Geisel, o Programa Nacional do Alcool - Proálcool. A decisão de produzir etanol a partir da cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*) por via fermentativa estava relacionada à diversificação da indústria açucareira, visto a baixa nos preços do açúcar em 1974 (KOHLHEPP, 2010).

Neste processo, conhecido como fermentação alcoólica, leveduras como *Saccharomyces cerevisiae* utilizam o carboidrato presente no meio para a produção de adenosina trifosfato (ATP) que permitirá o crescimento celular. Isso se dá através da glicólise, uma cadeia de reações metabólicas, que, em suma, oxida a glicose em duas moléculas de piruvato e duas moléculas de ATP. Cada piruvato é descarboxilado para um aldeído acético que quando reduzido forma, por fim, o etanol (NELSON; COX, 2014).

Portanto, além do seu uso histórico na produção de bebidas fermentadas, como vinho e cerveja, a levedura, *S. cerevisiae*, passou a ser utilizada para produção de biocombustível, etanol, a partir da cana-de-açúcar. Esse uso industrial decorre tanto pela espécie ser uma fermentadora preferencial, utilizando a via fermentativa mesmo na presença de oxigênio (LANDRY et al., 2006), como pela sua robustez celular. Diferentemente de vários outros micro-organismos, a *S. cerevisiae* tolera grandes concentrações de etanol, baixos níveis de pH e alta pressão osmótica, e por essas características o organismo passou a ser altamente explorado para uso científico e industrial.

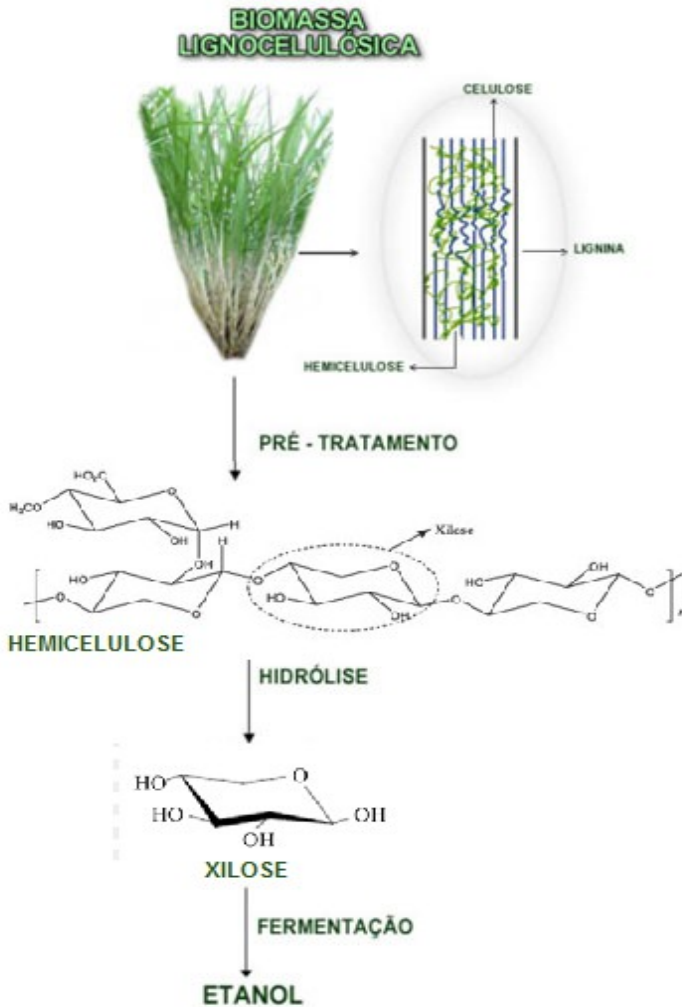
Desde o surgimento do Proálcool vários investimentos governamentais foram realizados para que houvesse aceitação, industrial e comercial, do etanol, e, segundo a última Análise de Conjuntura dos Biocombustíveis (2016), é visível uma tendência de crescimento na

produção de etanol nacional, com um aumento de 7,8 bilhões de litros em 16 anos. Segundo esse mesmo relatório, 71% dos veículos leves licenciados em 2016 eram do modelo flex fuel, ou seja, que utilizam tanto a gasolina quanto o álcool como combustível. Pode-se considerar como bem-sucedida a inclusão do etanol no mercado de combustíveis automotores nacional.

A evolução tecnológica que acompanhou a produção nessas quatro décadas permitiu que não só o caldo da cana-de-açúcar fosse utilizado, conhecido como etanol de 1ª Geração (1G), como também o bagaço da cana, etanol de 2ª Geração (2G). É estimado que o aproveitamento do bagaço e parte das palhas e pontas da cana-de-açúcar possa elevar a produção de álcool em 30 a 40%, para uma mesma área plantada (PACHECO, 2011). Isso se deve a constituição do bagaço, pois é composto de celulose (monômero de glicose), de hemicelulose (heteropolímero de pentoses e hexoses) e lignina (polímero heterogêneo). Essa matriz amorfa formada por polioses e lignina torna a estrutura rígida e pouco reativa, e por isso, age como uma barreira natural ao ataque de micro-organismos (FENGEL, D; WEGENER, G. 1983) por isso há a necessidade de um pré-tratamento para liberação das polioses no uso industrial. Um dos tipos de hemicelulose que pode ocorrer em grandes quantidades na cana-de-açúcar é a xilana, polímero de xilose, que após uma hidrólise libera o carboidrato para que esse possa ser fermentado (Figura 1).

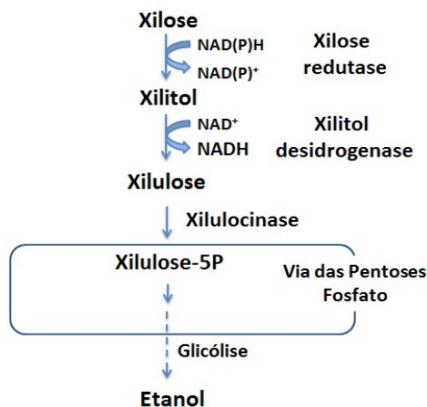
Essa abundância de xilose na xilana garantiria um aumento na produção de etanol caso a pentose fosse fermentada pela *S. cerevisiae*, porém a levedura não é capaz de consumir o carboidrato. Em leveduras, fungos filamentosos e outros eucariontes fermentadores de xilose, a metabolização procede através de dois passos de redução e oxidação (Figura 2), que são realizados pelas enzimas xilose redutase (XR) e xilitol desidrogenase (XDH), primeiramente reduzindo a xilose em xilitol e posteriormente oxidando esse em xilulose. Assim a xilose entra para a fase não oxidativa da Via das Pentoses-Fosfato (KIM et al., 2013), como xilulose-5-fosfato, seguindo uma série de reações metabólicas que terminam por gerar gliceraldeído-3-fosfato e frutose-6-fosfato (NELSON; COX, 2014), intermediários da via glicolítica que permitirão a produção de etanol (HAHN-HAGERDAL et al., 1994; PITKÄNEN et al., 2003; WOHLBACH, 2011). Além de inserir a xilose no anabolismo do etanol, a Via das Pentoses-Fosfato também oxida o NAD^+ regenerando o cosubstrato NADH, posteriormente reduzido pela enzima XR.

Figura 1. Representação esquemática da produção de etanol a partir da biomassa lignocelulósica. Com as respectivas etapas de pré-tratamento, hidrólise e fermentação.



Fonte: Adaptado de Santos et al. (2012)

Figura 2. Via metabólica inicial para a utilização da xilose. Via XR-XDH (xilose redutase e xilitol desidrogenase), encontrada em leveduras, fungos filamentosos e outros eucariontes fermentadores de xilose.



Fonte: Adaptado de Kim et al. (2013)

A *S. cerevisiae* apresenta genes para metabolizar a xilose, como o *GRE3*, que codifica para uma xilose redutase endógena, e *XYL2*, que codifica uma xilitol desidrogenase endógena (RICHARD et al., 2000), porém a expressão destes genes é tão baixa que não possibilita o crescimento em xilose (HAHN-HAGERDAL et al. 2007), não possibilitando o uso industrial desta pentose. A sobre-expressão desses genes já foi realizada (TOIVARI et al., 2004; ATTFIELD, BELL, 2006), no entanto não foi bem sucedida uma vez que a fermentação de xilose continua ineficiente. Porém, a levedura *S. cerevisiae* se mostra capaz de crescer em meios com apenas xilulose (RICHARD, TOIVARI, PENTTILA, 2000), bastando a sobre-expressão do gene *XKS1*, que codifica a enzima xilulocinase, para um desempenho eficiente. Portanto, um caminho para a possível metabolização de xilose em *S. cerevisiae* seria a criação de uma linhagem com expressão de genes de enzimas heterólogas XR e XDH obtidas de leveduras fermentadoras de xilose.

Leveduras fermentadoras de xilose não são novidade na literatura, por exemplo, du Preez e Walt em 1983 descreveram a *Candida shehatae* como sendo uma espécie fermentadora desta pentose. Desde então diversas leveduras fermentadoras de xilose foram identificadas, e isso tem ajudado a elucidar não só a via metabólica envolvida, mas também identificar possíveis genes para expressão em *S. cerevisiae*. Visto que leveduras fermentadores xilose, até então

descritas, demonstram baixa tolerância ao etanol, à pressão osmótica, a valores baixos de pH e, em sua maioria, requerem condições controladas de oxigenação para uma fermentação eficiente (HAHNHAGERDAL et al., 2001), inviabilizando seu uso industrial. A ideia de uma *S. cerevisiae* recombinante também não é recente, sendo que dois grupos independentes (KÖTTER; CIRIACY, 1993; TANTIRUNGKIJ et al., 1993) inseriram os genes *XYL1* e *XYL2* (que codificam, respectivamente, XR e XDH) de *Scheffersomyces stipitis* em *S. cerevisiae*. Apesar da levedura recombinante fermentar xilose, pouco etanol foi gerado e o principal produto da fermentação foi xilitol.

A alta produção de xilitol se deve possivelmente a um problema de desbalanço dos cosubstratos usados pelas enzimas. A enzima XR pode utilizar como co-substrato tanto o NADPH, quanto o NADH, mas em organismos que apresentam o uso restrito ou preferencial de NADPH, passa a haver um desbalanço, visto que a XDH utiliza o NAD⁺ como co-substrato, e, portanto, não há reciclagem do mesmo, acabando por interromper a metabolização de xilose, o que ocasiona um acúmulo de xilitol (STAMBUK et al., 2008). Uma alternativa é a busca por XR com afinidade por ambos os co-substratos (NADH e NADPH) ou com afinidade maior pelo NADH, o que poderia evitar ou diminuir o desbalanço de co-substratos (HAHNHÄNGERDAL et al. 1994; JEFFRIES, 2006).

A enzima XR da levedura *Candida parapsilosis* é a primeira relatada com preferência pelo NADH (LEE et al., 2003). Mais recentemente, a atenção voltou-se para o clado *Spathaspora*, com a descrição de várias novas espécies, como *Spathaspora passalidarum*, *S. arborariae*, *S. allomyrinae*, *S. brasiliensis*, *S. suhii*, *S. roraimanensis*, *S. xylofermentans*, entre outras, que são capazes de produzir etanol a partir de xilose (NGUYEN, et al, 2006; CADETE et al, 2009; CADETE et al. 2013; WANG et al., 2016). Com destaque para as leveduras *S. passalidarum* e *S. arborarie*, sendo essas as duas maiores produtoras de etanol quando comparadas às outras leveduras *Spathaspora*. A alta produção de etanol acontece pois nelas a enzima XR é capaz de utilizar ambos os co-substratos, enquanto a XDH é NAD⁺ dependente, diminuindo o desequilíbrio dos co-substratos (CADETE et al., 2016).

Com um esforço de explorar mais a eficiência dessas enzimas na produção de biocombustível, um estudo previamente realizado pelo nosso grupo de pesquisa clonou a enzima XR de *S. passalidarum* e ela se mostrou completamente dependente do co-substrato NADPH quando expressa em *S. cerevisiae* (MOURO, 2016). Isso pode ter ocorrido pelo

fato da espécie *S. passalidarum* ter duas sequências para XR (CADETE et al., 2016), e uma delas ser dependente do co-substrato NADPH. Outra enzima XR interessante é a presente em *S. arborarie*, que também apresenta uma alta atividade específica além de utilizar os dois co-substratos. Em relação à enzima XDH, ainda é observada maior atividade específica na levedura *S. passalidarum* quando comparada a outras do clado, como *S. arborariae*, *S. brasiliensis*, *S. roraimanensis*, *S. suhii*, e *S. xylofermentans* (CADETE et al., 2016).

Aliado a expressão de enzimas heterólogas, diferentes grupos tem abordado o problema da fermentação de xilose pela *S. cerevisiae* através do método de engenharia evolutiva e mutagênese. Em um desses experimentos, através do uso da técnica de mutagênese por transpóson, identificou-se que linhagens de *S. cerevisiae* que apresentavam mutações com o consequente silenciamento do gene *PHO13* apresentavam maior desempenho no consumo de xilose (NI et al. 2007). Como consequência, estudos foram realizados com linhagens de *S. cerevisiae* recombinantes com as enzimas XR e XDH heterólogas e *pho13Δ* (VAN VLEET et al. 2008), e esses tiveram como resultado o aumento do consumo de xilose e produção de etanol. Considerando isso, um trabalho do nosso grupo (DOS SANTOS, 2017) criou linhagens de *S. cerevisiae pho13Δ* para serem utilizadas como plataformas de expressão de enzimas heterólogas XR e XDH em *S. cerevisiae*.

Para criar alternativas ao uso do petróleo o governo brasileiro decidiu apostar no etanol como matriz energética automotiva, o que foi bem aceito pelo mercado. Porém, para que não haja um aumento na área dedica a plantação de cana-de-açúcar, busca-se melhorar a eficiência da fermentação de carboidratos provenientes da biomassa vegetal pela levedura *S. cerevisiae*. A criação de linhagens que expressem as enzimas XR e XDH provindas de leveduras naturalmente fermentadoras de xilose tem se mostrado como uma opção viável para essa questão, visto que este tipo de matéria vegetal é abundante em xilose. Sendo assim, este trabalho, que está inserido em dois trabalhos maiores, uma tese (MOURO, 2016) e uma dissertação (DOS SANTOS, 2017), buscou desenvolver plasmídeos de expressão com os genes que codificam as enzimas XR e XDH de leveduras *Spathaspora*, tendo como finalidade a transformação de linhagens de *S. cerevisiae*, como também analisar o padrão de consumo das transformantes durante a fermentação de xilose como única fonte de carbono. De fato, os resultados obtidos fazem parte de um manuscrito submetido para publicação (MOURO et al., 2017).

Com isso, espera-se contribuir para o melhoramento da produção de etanol 2G.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Construção de plasmídeos para a expressão de genes que codificam as enzimas xilose redutase e xilitol desidrogenase de *Spathaspora arborariae* e *Spathaspora passalidarum*, respectivamente, com vistas à utilização desses plasmídeos em linhagem recombinante de *S. cerevisiae*, e análise do perfil de consumo de xilose pelas linhagens recombinantes em aerobiose e microaerobiose.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Amplificar por PCR os genes *XYL1* e *XYL2*, que codificam as enzimas xilose redutase (XR) e xilitol desidrogenase (XDH) das leveduras *S. arborariae*, respectivamente, inserindo sítios de restrição para as enzimas EcoRI e BamHI.
- Purificar os fragmentos amplificados e, posteriormente, digerirlos com as enzimas de restrição para ligar os fragmentos amplificados contendo os genes *XYL1* e *XYL2* nos plasmídeos pPGK e pTEF, respectivamente.
- Transformar os plasmídeos em *Escherichia coli* para a propagação dos mesmos, e após extração dos mesmos da bactéria, transformar uma linhagem de *S. cerevisiae pho13Δ* que sobre-expressa o gene *XKS1* endógeno, gene que codifica para a enzima xilulocinase.
- Analisar crescimento e fermentação de xilose pelas linhagens recombinantes de *S. cerevisiae* portando os plasmídeos construídos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 LINHAGENS E PLASMÍDEOS

A linhagem de *E. coli* DH5 α , desenvolvida por Hanahan (1985) é não patogênica e amplamente utilizada na pesquisa científica para transformação e processos de clonagem. Aqui, utilizamos essa linhagem para clonagem e propagação dos plasmídeos.

As linhagens de leveduras utilizadas se encontram relacionadas na Tabela 1. A linhagem *S. arborariae* UFMG-HM-19.1A (CADETE et al., 2009) e *S. passalidarum* UFMG-HMD-16.2 (CADETE et al., 2013) foram utilizadas para amplificação dos genes *XYL1* e *XYL2*, respectivamente. As linhagens de *S. cerevisiae* tiveram como ponto de origem a linhagem CEN.PK2-1C (ENTIAN; KÖTTER, 1998). Essa teve o seu gene *XKSI* sobreexpresso, que codifica a enzima xilulocinase, dando origem a linhagem ASY-1 (DOS SANTOS, 2017). Essa última linhagem teve a deleção por recombinação homóloga do gene *PHO13*, que codifica uma fosfatase alcalina, originando a linhagem ASY-2 (DOS SANTOS, 2017).

Tabela 1. Leveduras utilizados nesse trabalho.

Espécie	Linhagem	Genótipo relevante ou descrição	Fonte
<i>Spathaspora arborariae</i>	UFMG-HM-19.1A	Isolados da madeira em decomposição	Cadete et al. (2009)
<i>Spathaspora passalidarum</i>	UFMG-HMD-16.2	Isolados da madeira em decomposição	Cadete et al. (2013)
<i>Saccharomyce cerevisiae</i>	CEN.PK2-1C	<i>MATa MAL2-8c ura3-52 his3Δ1 leu2-3/112 trp1-289</i>	Entian; Kötter (1998)
<i>Saccharomyce cerevisiae</i>	ASY-1	Isogênica à CEN.PK2.1C, mas <i>loxP KanMX-loxP-PADH1::XKSI</i>	dos Santos (2017)
<i>Saccharomyce cerevisiae</i>	ASY-2	Isogênica à ASY-1, mas <i>pho13Δ::LoxP-Ble^r-LoxP</i>	dos Santos (2017)
<i>Saccharomyce cerevisiae</i>	ASY-1-xr xdh	Isogênica à ASY-1 + pPGK-XR + pTEF-XDH	Mouro (2016)
<i>Saccharomyce cerevisiae</i>	ASY-2-xr-xdh	Isogênica à ASY-2 + pPGK-XR + pTEF-XDH	dos Santos (2017)

Quando os plasmídeos desse estudo (Tabela 1) foram inseridos nas linhagens, deram origem as linhagens ASY-1-xr-xdh (MOURO, 2016) e ASY-2-xr-xdh (DOS SANTOS, 2017). Os plasmídeos inseridos (Tabela 1) foram: pPGK-XYL1, onde o gene XYL1 de *S. arborarie* foi inserida em um plasmídeo pPGK (WATANABE et al., 2007) , que contém um promotor forte PGK e marcação auxotrófica URA3 (gene responsável pela síntese de uracila), e TEF-423-XYL2, onde o gene XYL2 de *S. passalidarum* foi inserida em um plasmídeo TEF-423 (ATCC®), com promotor forte TEF e marcação auxotrófica HIS3 (gene que codifica a enzima responsável pela síntese de histidina).

Tabela 2. Plasmídeos utilizados nesse trabalho.

Plasmídeos	Genótipo relevante	Fonte
pPGK	URA3 PGK1p-PGK1	Watanabe et al. 2007
pPGK-XR4	PGK1p-XR(Sa19.1a)-PGK1	Este estudo
TEF-423	HIS3 TEFp-CYC1	ATCC®
TEF-423-XDH1	TEFp-XDH(Sp16.2)-CYC1	Este estudo

3.2 MEIOS DE CULTURA

Para cultura da linhagem DH5 α de *E. coli*, foi utilizado o meio LB (Luria-Bertani) com os seguintes componentes e concentrações: triptona (10 g.L⁻¹) extrato de levedura (5 g.L⁻¹) e NaCl (5 g.L⁻¹). Quando necessária a presença de antibiótico foi acrescido 100 μ g/mL de ampicilina. O pH do meio foi ajustado para 7,0 utilizando-se de NaOH. Para meio sólido, foi acrescentado também 20 g.L⁻¹ de bacto-ágar. Para cultura de leveduras foi utilizado meio sintético YNB (0,67% base de nitrogênio sem aminoácidos, suplementado com requirements auxotróficos adequados (Sigma Aldrich), sem uracila e sem histidina, e contendo 20 ou 100 g.L⁻¹ de xilose. Os meios tiveram seu pH ajustado para 5 com HCl ou NaOH.

3.3 AMPLIFICAÇÃO DOS GENES

3.3.1 *XYL1* de *S. arborariae*

Com base na anotação genômica (LOBO et al., 2014) de *S. arborariae* UFMG-HM- 19.1A, Mouro (2016), identificou um gene com homologia ao gene responsável pela enzima XR em outros micro-organismos. Com base nisso foram desenhados os iniciadores XR-Sa-F e XR-Sa-R (Tabela 3) para amplificação do gene, contendo os sítios de enzimas de restrição *EcoRI* e *BamHI* para a posterior clonagem no plasmídeo pPGK (WATANABE et al. 2007).

Tabela 3. Tabela de iniciadores usados na amplificação dos genes *XYL 1* e *XYL 2*.

Iniciador	Sequência (5' – 3')	Fonte
XR-Sa-F	ATGAATTCATGGCTACTATTAAATTATCCT CAGGT	Mouro, 2016
XR-Sa-R	TTGGATCCTTAAACAAAGATTGGAATGTT GTCC	Mouro, 2016
XDH-Sp-F	ATGAATTCATGGTTGCTAATCCCTCTTTAG TG	Mouro, 2016
XDH-Sp-R	CTGGATCCCTACTCTGGTCCATCAATTAAA CACTT	Mouro, 2016

A sequência dos sítios de restrição estão sublinhadas.

Com o auxílio de Mouro (2016), este trabalho realizou as amplificações com os iniciadores descritos na Tabela 2, que foram realizadas utilizando reações de PCR (Polymerase Chain Reaction). Para isso, utilizou-se a enzima de alta fidelidade Phusion® High Fidelity DNA Polymerase (Thermo Scientific) e o termociclador Mastercycler Gradient® (Eppendorf). As condições do PCR foram: 1 ciclo a 98°C por 30 segundos, seguido de 29 ciclos de 98°C por 10 segundos, 51°C por 20 segundos, e 72°C por 30 segundos, e uma extensão final a 72°C por 5 min em 1 ciclo, com 1 unidade da enzima Phusion®.

3.3.2 *XYL2* de *S. passalidarum*

Com base nas anotações do genoma (WOHLBACH et al., 2011) de *S. passalidarum* UFMG-HMD-16.2 buscou-se regiões homólogas ao gene *XYL2* já descrito em outras leveduras, com isso, pode-se desenhar os iniciadores XDH-Sp-F e XDH-Sp-R (Tabela 3), para mais uma vez criar amplificadores com sítios de restrição para as enzimas *EcoRI* e *BamHI* para a clonagem no plasmídeo TEF-423 (MUMBERG et al., 1995).

Para a amplificação com os iniciadores (Tabela 3), foram utilizadas as seguintes condições de PCR: 1 ciclo a 98°C por 30 segundos, seguido de 29 ciclos de 98°C por 10 segundos, 53°C por 30 segundos, e 72°C por 30 segundos, e uma extensão final a 72°C por 5 min, com 1 unidade da enzima Phusion®.

3.4 ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE

Os fragmentos de DNA amplificados por PCR foram submetidos a uma eletroforese em gel de 1% de agarose em tampão TBE (45 mM Tris-borato, 1 mM EDTA em pH 8,0) com 90 volt/cm por 40 minutos, e corados com brometo de etídio 2,5 µg.mL. O gel foi analisado e fotografado sob luz ultravioleta em fotodocumentador Molecular Imager® Gel Doc™ XR+ System (BioRad).

3.5 PURIFICAÇÃO DOS PRODUTOS DE PCR

A purificação do amplificado após confirmação em gel de agarose se deu através do kit GFX PCR DNA and Gel Band Purification kit (GE Healthcare), conforme instruções do fabricante.

3.6 REAÇÃO DE DIGESTÃO

Tanto os amplificadores quanto os plasmídeos pPGK e TEF-423 foram digeridos com 30 unidades das enzimas *EcoRI* e *BamHI* durante 4 horas à temperatura de 37°C.

3.7 REAÇÃO DE LIGAÇÃO

Após a digestão, para a reação de ligação do produto amplificado com o plasmídeo foi utilizada a enzima T4 ligase (Thermo Scientific) sendo a reação incubada a uma temperatura de 22°C pelo período de 1 hora.

3.8 TRANSFORMAÇÃO DE BACTÉRIA

Para inserção do plasmídeo em *E. coli* DH5 α foi utilizado o método do cloreto de cálcio (SAMBROOK et al., 1989; AUSUBEL et al., 1992), onde células eletrocompetentes de *E. coli* armazenadas em ultrafreezer de -80° sofrem choque térmico afim de desestabilizar a membrana facilitando a entrada do plasmídeo. Para a transformação das bactérias, 1-5 μ g de plasmídeo foi adicionado a 80 μ L de células competentes (previamente tratadas com CaCl₂ 60 mM contendo 15% glicerol em tampão Pipes 10 mM, pH 7,0) e mantidas no gelo por 10 min. Após, as células foram incubadas a uma temperatura de 42°C por um período de 2 min, seguido de um resfriamento em gelo por 1 min, adicionado 500 μ L de meio LB e incubados a 37°C por 1 hora a 160 rpm. Após a incubação, as células foram centrifugadas e ressuspensas em 200 μ L de meio LB e plaqueadas em placas de meio LB contendo 100 μ g/mL de ampicilina. Com os plasmídeos clonados, estes foram purificados através extração de DNA plasmidial em bactérias por lise alcalina (AUSUBEL et al., 1992).

3.9 TRANSFORMAÇÃO DE LEVEDURAS

As linhagens ASY-1 e ASY-2 foram mutuamente transformadas com os dois plasmídeos pPGK-XYL1 e TEF-423-XYL2 através do método com acetato de lítio (GIETZ et al., 1992), onde células são expostas a solução TE/AcLi (110 μ L de solução de EDTA 53 mM e tampão Tris-HCl 10 mM pH 7,5, 110 μ L acetato de lítio 1 M e 780 μ L H₂O miliQ estéril) auxiliando a interiorização dos plasmídeos de interesse. As linhagens transformantes foram selecionadas em meio sólido YNB sem uracila e histidina afim de comprovar o fenótipo da transformação.

3.10 CRESCIMENTO CELULAR

Para o ensaio de crescimento celular, foram realizados pré-inóculos em frascos erlenmeyers com volume 50 mL, com apenas $\frac{1}{3}$ de seu volume preenchido com meio sintético YNB sem uracila e histidina, com 20 g.L^{-1} de xilose e incubados sob agitação a 28°C . Após 3 dias, estes apresentaram densidade óptica de aproximadamente 7 em uma leitura de 600 nm. Com base na densidade óptica e na fórmula $c1.v1=c2.v2$ foi calculado o volume necessário para inocular nos erlenmeyers onde ocorreram o crescimento (frascos de 125 mL com $\frac{1}{3}$ do seu volume preenchido pelo mesmo meio sintético do pré-inóculo). Esses foram incubados sob as mesmas condições do pré-inóculo por um período de 100 h. Nos tempos pré-determinados foram tiradas amostras de $400 \mu\text{L}$, para quantificação de absorbância e determinar substratos e produtos através da medição em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.

3.11 ENSAIO FERMENTATIVO

As linhagens de leveduras foram submetidas à fermentação em batelada. Para esse fim as células foram crescidas em frascos erlenmeyers com volume de 500 mL com apenas 100 mL preenchidos de meio sintético YNB sem uracila e histidina com 20 g.L^{-1} de xilose. Esse crescimento foi acompanhado medindo a absorbância a 600 nm em um espectrofotômetro Agilent Technologies Cary 60 UV-VIS. O valor da absorbância multiplicado pelo fator 0,27 para *S. cerevisiae* (DÁRIO, 2012) foi convertido em massa seca em g.L^{-1} , com o objetivo de iniciar a fermentação com uma concentração de 10 g.L^{-1} de células de levedura.

Em tubos de volume total de 20 mL com barras magnéticas no seu interior foi acrescentado 10 mL das células e 10 mL de meio YNB sem uracila e histidina com 20 g.L^{-1} ou 100 g.L^{-1} de xilose (duas vezes concentrado). Esses tubos foram incubados à temperatura de 28°C sob agitação garantindo um ambiente de microaerobiose. Nos tempos pré-determinados, amostras de $400 \mu\text{L}$ foram retiradas dos frascos afim de se medir a absorbância, como também, determinar os substratos e produtos através da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.

3.12 DETERMINAÇÃO DOS SUBSTRATOS E PRODUTOS DOS CRESCIMENTOS E FERMENTAÇÕES

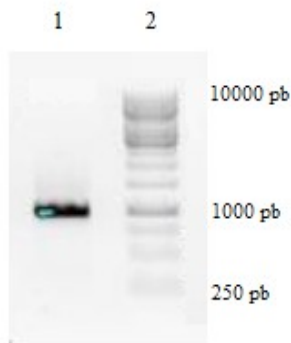
A partir das amostras retiradas durante os cultivos, foram efetuadas as dosagens de açúcares e metabólitos utilizando Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC), nas seguintes condições: coluna HyperREZ XP ácido orgânico (Thermo Scientific), fase móvel com ácido sulfúrico 5 mM, fluxo de $0,6 \text{ mL min}^{-1}$ durante 30 min, temperatura da coluna de 50°C e detecção por índice de refração (IR-2031 plus, Jasco). As curvas de calibração foram estabelecidas utilizando quatro concentrações diferentes de açúcares e metabólitos

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 CLONAGEM DE XYL1 E XYL2 EM PLASMÍDEOS DE EXPRESSÃO

Visando clonar o gene que codifica a enzima XR da levedura *S. arborarie*, Mouro (2016) utilizou o genoma anotado *S. arborariae* por Lobo et al. (2014) e, a partir de técnicas de bioinformática, identificou uma região de 899 nucleotídeos com homologia a genes codificantes para XR em microrganismos já caracterizados. Com base nessa sequência e utilizando os iniciadores XR-Sa-F e XR-Sa-R (Tabela 2) o gene foi amplificado por PCR, conforme sessão 3.3.1 desse trabalho, tendo como produto de reação um amplificado de aproximadamente 1 kb. Essa reação foi analisada em gel de agarose, descrito na sessão 3.4 (Figura 3). A presença de uma banda de ~1000 pares de base indica a correta amplificação do gene *XYL1* com os sítios de restrição para as enzimas.

Figura 3. Amplificação por PCR do gene *XYL1* a partir do genoma de *S. arborarie*. Na raia 1 encontra-se o produto de PCR, na raia 2 o padrão de tamanho molecular 1 kb.

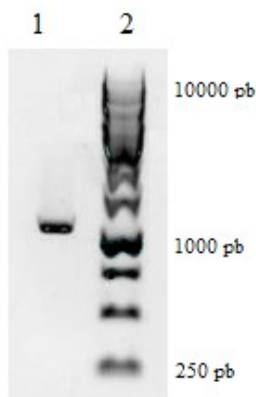


Fonte: MOURO, 2016

Para amplificação do gene *XYL2*, Mouro (2016) utilizou o genoma de *S. passalidarum* anotado por Wohlbach et al. (2011) e identificou uma sequência de 1086 nucleotídeos com homologia para o gene em outro organismos. Utilizando os iniciadores XDH-Sp-F e XDH-Sp-R (Tabela 2), o gene foi amplificado conforme sessão 3.3.2. O

resultado da amplificação dos genes a partir do genoma de *S. passalidarum*, com os iniciadores supracitados foi analisado em eletroforese com gel de agarose (Figura 4). Foi obtido um amplificado de ~1,1 kb, condizente com o esperado. Os plasmídeos foram também sequenciados para confirmar a correta inserção dos genes, o sequenciamento foi realizado pelo método de Sanger, utilizando ABI 3730XL (Applied Biosystems, USA) na empresa STABVIDA, Lisboa, Portugal e as sequências foram analisadas pelo programa Bio Edit Sequence Alignment Editor (Hall, 1999).

Figura 4. Amplificação por PCR do gene *XYL2* a partir do genoma de *S. passalidarum*. Na raia 1 encontra-se o produto de PCR, na raia 2 o padrão de tamanho molecular 1 kb.

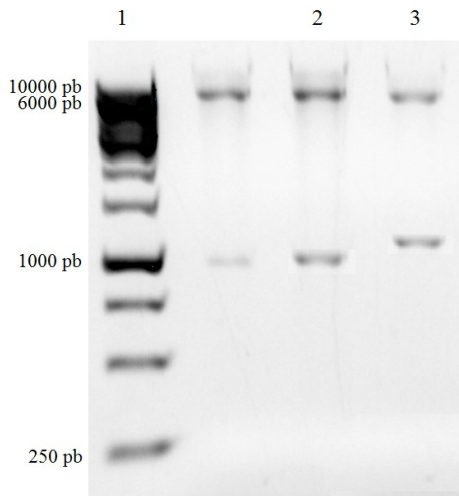


Fonte: Autor

Após a confirmação da correta amplificação dos genes, esses foram digeridos com as enzimas de restrição conforme a sessão 3.6, purificados, e passaram por uma reação de ligação com os plasmídeos previamente digeridos. O produto da ligação foi transformado em *E. coli* e os plasmídeos contendo o fragmento esperado foram selecionados, como descrito em 3.8 tiveram seus plasmídeos extraídos. Os plasmídeos extraídos por MiniPrep de bactéria foram digeridos com as enzimas de restrição *EcoRI* e *BamHI*, para confirmar a correta inserção dos genes nos plasmídeos, o produto dessa reação de digestão

foi submetido a uma eletroforese (Figura 5). Observamos a presença de duas bandas para cada linhagem. A reação de digestão do plasmídeo pPGK-XYL1 identificado pela linha 2 apresenta uma banda de ~1 kb, esperado para o tamanho do gene *XYL1*, como também uma de ~6060 kb correspondente ao plasmídeo pPGK linearizado. Já a reação de digestão do plasmídeo TEF-423-XYL2 identificado como pela linha 3 apresenta uma banda de ~1,1 kb, correspondente ao gene *XYL2*, e também uma banda de ~6400 kb, o plasmídeo TEF-423 linearizado. Portanto, nossos resultados confirmam a correta inserção dos genes nos seus respectivos plasmídeos.

Figura 5. Digestão enzimática dos plasmídeos pPGK-XYL1 e TEF-423-XYL2 pelas enzimas de restrição *EcoRI* e *BamHI*. Observa-se o produto de reação de digestão do plasmídeo pPGK-XYL1 (raia 2), produto de reação de digestão do plasmídeo TEF-423-XYL2 (raia 3) e marcador de tamanho molecular 1kb (raia 1), analisados em gel de agarose.



Fonte: Autor

4.2 PERFIL FERMENTATIVO DE LINHAGENS DE *S. CEREVISIAE* RECOMBINANTES CONTENDO OS PLASMÍDEOS CONSTRUÍDOS

Foram realizadas análises enzimáticas de dos Santos (2017) (Tabela 3) nas linhagens transformadas com os plasmídeos, e, observou-se uma diferença na atividade específica das enzimas XR e XDH clonadas. Diferença essa provavelmente causada pela expressão dos vetores utilizados para a clonagem, visto que plasmídeos que possuem promotores da via glicolítica, como pPGK, tem expressão superior a outros (MUMBERG et al., 1995). Além disso, alguns trabalhos vêm demonstrando que, em linhagens recombinantes, a atividade de XDH deve ser maior que a de XR para o aumento da produção de etanol a partir de xilose (ELIASSON et al., 2001; TAMAKAWA et al., 2013) e, como é apresentado na Tabela 3 os plasmídeos nesse trabalho criados apresentam uma relação inversa, com a atividade de XR sendo em média 40% maior que XDH, portanto, provavelmente persiste o desbalanço dos cosubstratos nas linhagens transformadas com esses plasmídeos.

Tabela 3. Atividade específica das enzimas xilose redutase e xilitol desidrogenase em leveduras portando os plasmídeos pPGK-XYL1 e TEF-423-XYL2

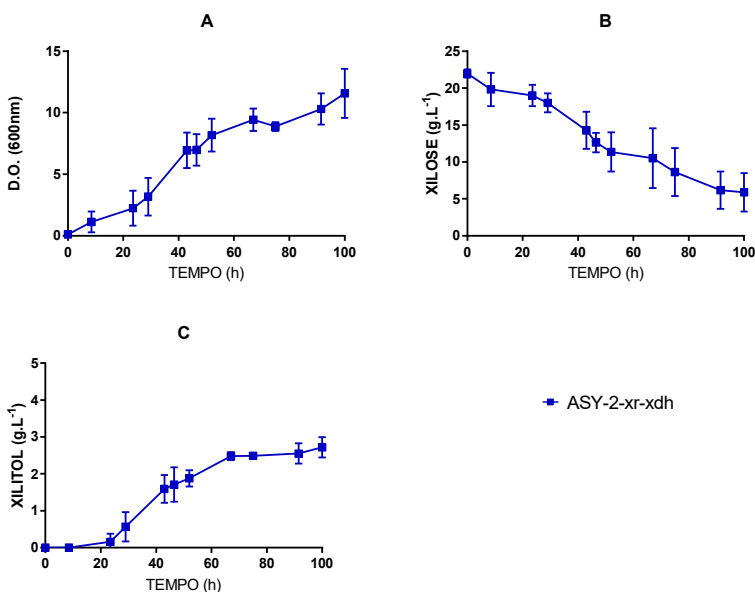
Levedura	Plasmídeo	Atividade específica (U.mg ⁻¹ proteína)		
		Xilose redutase		Xilitol desidrogenase
		NADPH	NADH	NAD ⁺
ASY-1-xr-xdh	pPGK-XYL1; TEF-423-XYL2	2,41 ± 0,25	0,89 ± 0,23	0,48 ± 0,03
ASY-2-xr-xdh	pPGK-XYL1; TEF-423-XYL2	2,37 ± 0,22	0,81 ± 0,22	0,48 ± 0,07

Fonte: dos Santos, 2017.

Mesmo com a diferença na atividade específica das enzimas, foi realizado um ensaio de crescimento e fermentação das linhagens transformantes, ASY-1-xr-xdh e ASY-2-xr-xdh. O crescimento, só realizado com esta última, teve como fonte de carbono 20 g.L⁻¹ de xilose

em meio sintético sem uracila e sem histidina (Figura 6). Observa-se um alto consumo de xilose, e uma alta densidade óptica, indicando o crescimento celular de *S. cerevisiae* em um meio que só apresenta a xilose como fonte de carbono, portanto conclui-se o sucesso na inserção dos plasmídeo nas linhagens, bem como, a expressão das enzimas clonadas nestes. A produção de 2g.L^{-1} de xilitol e a ausência de etanol indicam, novamente, o desbalanço na atividade das enzimas e reciclagem do co-substrato. Eliasson et al. (2001) sugere que a atividade de XDH deve ser cerca de 10 vezes maior do que a atividade de XR para diminuir o acúmulo de xilitol e aumentar a produção de etanol. Portanto, dificilmente a inserção dos plasmídeos criados conseguirá produzir uma grande quantidade de etanol.

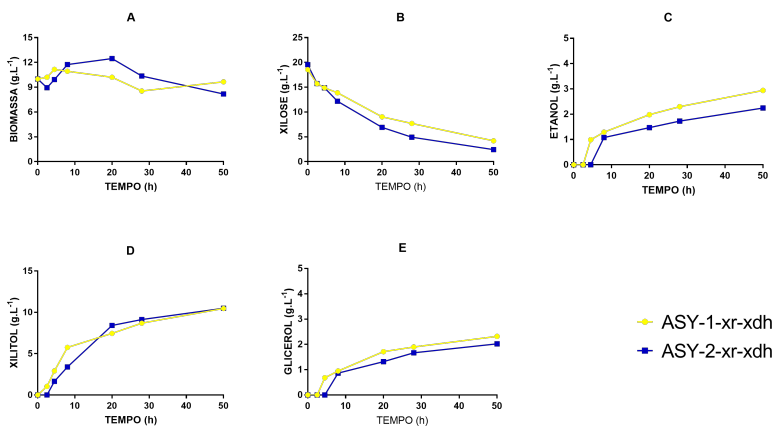
Figura 6. Crescimento aeróbico da linhagem ASY-2-xr-xdh (quadrado azul) em meio sintético sem uracila e sem histidina com 20 g.L^{-1} de xilose como fonte de carbono por 100 horas. Na figura é apresentada a média dos pontos (realizados em duplicata) com o desvio da média para crescimento celular (A), consumo de xilose (B) e produção de xilitol (C).



Buscando verificar o papel da deleção do gene *PHO13* em linhagens contendo os plasmídeos desenvolvidos pelo presente trabalho, as linhagens ASY-1-xr-xdh e ASY-2-xr-xdh (*pho13Δ*) passaram por um ensaio de fermentação em batelada com 20 g.L⁻¹ de xilose como fonte de carbono. Como pode ser visto na Figura 7, a deleção do gene em questão não mostra-se vantajosa no ensaio fermentativo, visto que as duas linhagens apresentam perfis bastante similares. O que observa-se da linhagem deletada é um consumo maior e mais rápido de xilose, mas uma produção menor de etanol em relação a linhagem não deletada, ASY-1-xr-xdh.

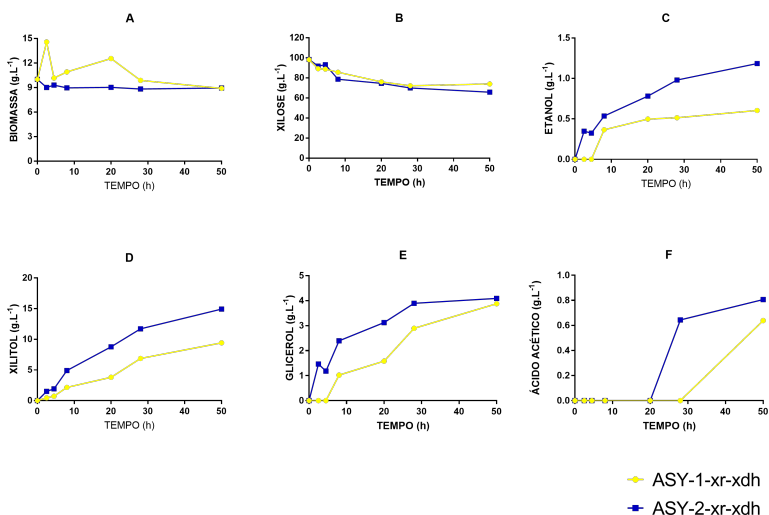
Há também no ensaio a produção de glicerol, um subproduto da fermentação ligado a manutenção do balanço redox intracelular em situações anaeróbicas, compensando a produção de NADPH, reciclando NAD⁺ (VANDIJKEN; SCHEFFERS, 1986), além disso o intermediário na formação de glicerol, glicerol 3-fosfato é uma molécula chave na formação de lípidios, um indicativo da importância da produção de glicerol na estabilidade da membrana plasmática (PALTAUF et al., 1992) portanto, sua produção pode ser interpretada como estresse celular.

Figura 7. Fermentação em batelada com meio sintético sem uracila e histidina contendo 20 g.L⁻¹ de xilose como fonte de carbono pelas linhagens ASY-1-xr-xdh (círculo amarelo) e ASY-2-xr-xdh (quadrado azul). Na figura está apresentada a biomassa (A), consumo de xilose (B), produção de etanol (C), xilitol (D) e glicerol (E).



Foi realizado um segundo ensaio de fermentação em batelada com a mesma fonte de carbono, xilose, mas em maior concentração, 100 g.L^{-1} do carboidrato (Figura 8). Altas concentrações de xilose no meio foram descritas como inibindo o crescimento celular e muito provavelmente tóxicas para os organismos (VAN VLEER; JEFFRIES; OLSSON, 2008; KIM et al, 2013), porém experimentos com engenharia evolutiva demonstram que o silenciamento do gene *PHO13* parece permitir o crescimento do organismo em ambientes com alta concentração de carboidrato (DALL AGNOLO, 2015; KIM et al., 2015; BAMBA; HASUNUMA; KONDO, 2016) aumentando assim a produção de etanol. Nessa segunda fermentação, a linhagem *pho13Δ* consumiu 8 g.L^{-1} a mais de xilose em relação a linhagem não deletada. Como consequência desse maior consumo observa-se uma grande diferença na produção de etanol entre as linhagens ASY-1-xr-xdh e ASY-2-xr-xdh, com a última produzindo o dobro em relação a primeira. Sendo a diferença entre elas a deleção do gene *PHO13*, atribui-se a isso o melhor consumo e produção de etanol, o que também foi observada por Santos (2017).

Figura 8. Fermentação em batelada com meio sintético sem uracila e histidina contendo 100 g.L^{-1} de xilose como fonte de carbono pelas linhagens ASY-1-xr-xdh (circulo amarelo) e ASY-2-xr-xdh (quadrado azul). Na figura está apresentada a biomassa (A), consumo de xilose (B), produção de etanol (C), xilitol (D), glicerol (E) e ácido acético (F).



A maioria dos estudos com linhagens *pho13Δ* apresentam ensaios sob altas concentrações de xilose (NI et al. 2007; FUJITOMI et al., 2012; KIM et al., 2013; DALL AGNOLO, 2015; KIM et al., 2015; BAMBA et al., 2016), pois parece ser sob essas condições que os efeitos benéficos da deleção são observados. Essas vantagens no consumo de xilose em linhagens *pho13Δ* em condições de alta concentração de carboidrato podem estar relacionadas ao fato de que, como alguns trabalhos recentes demonstram, a deleção do gene *PHO13* parece regular positivamente alguns genes da Via das Pentoses-Fosfato e genes da Via Glicolítica, aumentando o fluxo de consumo da xilose pela levedura possivelmente nessas condições (KIM et al. 2015; BAMBA et al., 2016). Além disso, é observado que a enzima Pho13p tem atividade de desfosforilação sobre a xilulose-5-fosfato, e é possível que a sobre-expressão da enzima xilulocinase (formando xilulose-5-fosfato) juntamente com a atividade da enzima Pho13p (desfosforilando a xilulose-5-fosfato) forme um ciclo fútil de atividade enzimática que leva a depleção nos níveis de ATP e inibição do consumo de xilose (KIM et al., 2013).

A produção de xilitol também foi mais elevada na linhagem deletada no gene *PHO13*, a alta produção de xilitol nessas condições é observada outros trabalhos, (DALL AGNOLO, 2015; DOS SANTOS, 2017) provavelmente, a preferência da enzima XR pelo co-substrato NADPH interfira na reciclagem do NAD, limitando a enzima XDH, e, portanto, acumulando xilitol. A produção de glicerol é bastante semelhante entre as duas linhagens, mas é possível perceber que essa produção de glicerol dobrou quando comparado com a fermentação em batelada com 20 g.L⁻¹ de xilose, o que corrobora a ideia da produção de glicerol como uma proteção osmótica, já que o meio fermentação se encontra mais hipertônico em relação a fermentação anterior. Um quarto metabólito é formado na fermentação em 100 g.L⁻¹ de xilose, o qual não havia sido observado antes, o ácido acético. A conversão de acetaldeído a ácido acético pela enzima acetaldeído desidrogenase, que utiliza NADP⁺ como co-substrato, é uma outra possível estratégia para o organismo regenerar o co-substrato NADPH (MEADEN et al., 1997; GRABOWSKA; CHELSTOWSKAUMA, 2003), e como a enzima XR clonada também utiliza esse cosubstrato, a produção de ácido acético é um possível indicador da necessidade de regeneração do co-substrato.

Em suma, é observado o potencial da deleção do gene *PHO13* em fermentações com alta concentração de xilose, porém esse efeito pode ser potencializado com uma relação de expressão superior do gene

XYL2 em relação ao *XYL1*, como indica a literatura, uma atividade até 10 vezes maior de XDH pode garantir a produção de etanol, impedindo o afinilamento do processo no estágio de xilitol, e seu consequente acúmulo, como também a identificação de uma enzima XR com maior preferência por NADH. Por isso, como perspectiva futura para a produção de etanol 2G imagino o aprimoramento da expressão das enzimas heterólogas XR e XDH em linhagens de *S. cerevisiae* com modificações gênicas como a deleção do gene *PHO13*.

5 CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos nesse trabalho pode-se concluir:

1. A criação dos plasmídeos pPGK-XYL1 e TEF-423-XYL2, contendo os genes *XYL1* e *XYL2*, provenientes de *S. arborarie* e *S. passalidarum*, respectivamente se mostrou eficaz na inserção em linhagens de *S. cerevisiae* recombinantes, realizando o consumo de xilose e até um pequena produção de etanol.
2. Em fermentação microaeróbica com 100 g.L⁻¹ de xilose a linhagem ASY-2-xr-xdh, deletada no gene *PHO13* apresentou um maior e mais rápido consumo de xilose, em relação a linhagem não deletada, confirmando que a deleção só se mostra positiva em fermentações com uma grande quantidade do carboidrato.
3. A produção de etanol pelas linhagens continua sendo limitada possivelmente pelo desbalanço das atividades das enzimas XR e XDH, e pela preferência da enzima XR pelo co-substrato NADPH, que como consequência gera uma grande quantidade de xilitol.

REFERÊNCIAS

- ATTFIELD, P. V; BELL, P. J. Use of population genetics to derive nonrecombinant *Saccharomyces cerevisiae* strains that grow using xylose as a sole carbon source. **FEMS Yeast Research**. v.6, p.862-868, 2006.
- AUSUBEL, F; BRENT, R; KINGSTON, R. **Short Protocols in Molecular Biology**. 2. ed. Green Publishing Association And John And Willy And Sons., 1992. 1512 p.
- BAMBA, T; HASUNUMA, T; KONDO, A. Disruption of PHO13 improves ethanol production via the xylose isomerase pathway. **AMB Express**. v.6, p.4, 2016.
- BRASIL. Ministério de Minas e Energia. **Empresa de Pesquisa Energética. Análise de Conjuntura dos Biocombustíveis Ano 2015**. Brasília: Governo Federal, 2016. 70 p.
- CADETE, R; SANTOS, R; MELO, M; MOURO, A; GONÇALVES, D; STAMBUK, B; GOMES, F; LACHANCE, M; ROSA, C. *Spathaspora arborariae* sp. nov., a d-xylosefermenting yeast species isolated from rotting wood in Brazil. **FEMS Yeast Research**, v. 9, p.1338-1342, 2009.
- CADETE, R. M; MELO, M. A; ZILLI, J. E; VITAL, M. J. S; MOURO, A; PROMPT, A. H; GOMES, F. C. O; STAMBUK, B. U; LACHANCE, M. A; ROSA, C. A. *Spathaspora brasilienses* sp. nov., *Spathaspora suhii* sp. nov., *Spathaspora roraimanensis* sp. nov., *Spathaspora xylofermentans* sp. nov, four novel D-xylose-fermenting yeast species from Brazilian Amazonian forest. **Antonie van Leeuwenhouek**. v. 103, p. 421-23, 2013.
- CADETE, R. M; DE LAS HERAS, A. M; SANDSTRÖM, A.G; FERREIRA, C; GÍRIO, F; GORWA-GRAUSLUND, M. F; ROSA, C. A; FONSECA, C. Exploring xylose metabolism in *Spathaspora* species: XYL1.2 from *Spathaspora passalidarum* as the key for efficient anaerobic xylose fermentation in metabolic engineered *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnol. Biofuels**, v. 9, p.1-14, 2016.
- DALL AGNOLO, D. **Análise de Supressores da Fermentação de Xilose em *Saccharomyces cerevisiae***. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia e Biociências) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2014.

DARIO, M.G. **Efeito da alteração na captação de sacarose ao metabolismo de *Saccharomyces cerevisiae***. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Programa de Pós-graduação Interunidades em Biotecnologia, São Paulo, 2012.

DOS SANTOS, A. A. **Desenvolvimento de linhagens recombinantes de *Saccharomyces cerevisiae* como plataforma de análise de enzimas e transportadores envolvidos na metabolização da xilose**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia e Biociências) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2017.

DU PREEZ, J. C; VAN DER WALT, J. P. Fermentation of D-xylose to ethanol by a strain of *Candida shehatae*. **Biotechnol. Lett.**, v. 5, p.357-362, 1983.

ELIASSON, A; HOFMEYR, J. S; PEDLERA, S; HAHN-HÄGERDAL, B. The xylose reductase/xylytol dehydrogenase/xylylokinase ratio affects product formation in recombinant xylose-utilising *Saccharomyces cerevisiae*. **Enzyme and Microbial Technology**. v.29, p.288-297, 2001.

ENTIAN, K, D; KÖTTER, P. 23 Yeast Mutant and Plasmid Collections. **Methods Microbiology**, p.431-449, 1998.

FENGEL, D; WEGENER, G. (Ed.). **Wood: chemistry, ultrastructure, reactions**. Walter de Gruyter, p. 617. 1983.

FUJITOMI, K.; SANDA, T.; HASUNUMA, T. KONDO, A. Deletion of the *PHO13* gene in *Saccharomyces cerevisiae* improves ethanol production from lignocellulosic hydrolysate in the presence of acetic and formic acids, and furfural. **Bioresour. Technol**, v.111, 2012.

GRABOWSKA, D; CHELSTOWSKA, A. The ALD6 gene product is indispensable for providing NADPH in yeast cells lacking glucose-6-phosphate dehydrogenase activity. **J. Biol. Chem.**, v.18, p.13984-13988, 2003.

HAHN-HÄGERDAL, B. JEPSSON, H; SKOOG, K; PRIOR, B. A. Biochemistry and physiology of xylose fermentation by yeasts. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 16, n. 11, p.933-943, nov. 1994.

HAHN-HÄGERDAL, B. WAHLBOM, C.F; GÁRDONYI, M; VAN ZYL, W. H; CORDERO OTERO, R, R; JÖHSSON, L. J. Metabolic

Engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for Xylose Utilization. **Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.** p.53-84, 2001.

HAHN-HÄGERDAL, B.; KARHUMAA, K.; GORWA-GRAUSLUND, M. F.; Metabolic engineering for pentose utilization in *Saccharomyces cerevisiae*. **Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.** v.108, p.147-177, 2007.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. In: **Nucleic acids symposium series**. 1999. p. 95-98.

HANAHAHAN, D. 1985. Techniques for transformation of *E. coli*. **DNA cloning**, v. 1, p. 109-135.

JEFFRIES, T. W. Engineering yeasts for xylose metabolism. **Curr. Opin. Biotechnol.** v. 17, n. 3, p.320-326, jun. 2006. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.copbio.2006.05.008>.

KIM, S. R. SKERKER, J. M; KANG, W; LESMANA, A; WEI, N; ARKIN, A.F; JIN Y. S. Rational and evolutionary engineering approaches uncover a small set of genetic changes efficient for rapid xylose fermentation in *Saccharomyces cerevisiae*. **PLoS One**. v.8, 2013.

KIM, S. R. PARK, Y. C; JIN, Y. S; SEO, J. H. Strain engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for enhanced xylose metabolism. **Biotechnol. Adv.** v. 31, n. 6, p.851-861, nov. 2013.

KIM S. R. XU, H; LESMANA, A; KYZMANOVIC, U; AU, M; FLORENCIA, C; OH, E. J; ZHANG, G; KIM, K. H; JIN, Y. S. Deletion of *PHO13*, encoding haloacid dehalogenase type IIA phosphatase, results in upregulation of the pentose phosphate pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. **Appl. Environ. Microbiol.** v.81, p.1601-1609, 2015.

KOHLHEPP, Gerd. Análise da situação da produção de etanol e biodiesel no Brasil. **Estudos Avançados**, v. 24, p.223-253, 2010.

KÖTTER, P.; CIRIACY, M. Xylose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** v. 38, p.776-783, mar. 1993.

LEE, J.-K.; KOO, B.-S.; KIM, S.-Y. Cloning and Characterization of the *xy11* Gene, Encoding an NADH-Preferring Xylose Reductase from *Candida parapsilosis*, and Its Functional Expression in *Candida tropicalis*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 69, p.6179-6188, 2003

LOBO, F. P. GONÇALVES, D. L.; ALVES, S. L. Jr; GERBER, A. L; DE CASCONCELOS, A. T; BASSO, L. C; FRANCO, G. R; SOARES, M. A; CADETE, R. M; ROSA, C. A; STAMBUK, B. U. Draft Genome Sequence of the D-Xylose-Fermenting Yeast *Spathaspora arborariae* UFMG-HM19.1AT. **Genome Announc.** v. 2, p.1-2, 2014.

MEADEN, P. G; DICKINSON, F. M; MIFSUD, A. The ALD6 gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes a cytosolic, Mg²⁺ activated acetaldehyde dehydrogenase. **Yeast.** v.13, p.1319–1327, 1997.

MOURO, A. **Clonagem e expressão em *Sacharomyces cerevisiae* de xilose redutase e xilitos desidrogenase das leveduras brasileiras *Spathaspora arborariae* e *Spathaspora passalidarum*.** 2016. 113 f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós Graduação em Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2016.

MOURO, A; DOS SANTOS, A. A; AGNOLO, D. D; GUBERT, G. F; BON, E. P. S; ROSA, C. A; FONSECA, C; STAMBUK B. U. Combining xylose reductase from *Spathaspora arborariae* with xylitol dehydrogenase from *Spathaspora passalidarum* to promote xylose fermentation in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biocatalysis Biotransformations** (submetido), 2017.

MUMBERG, D.; MÜLLER, R.; FUNK, M. Yeast vectors for the controlled expression of heterologous proteins in different genetic backgrounds. **Gene**, v. 156, p. 119-122, 1995

NELSON, David L; COX, Michael M.. **Princípios de Bioquímica de Lehninger.** 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014. 1328 p

NGUYEN, N; SUH, S.; MARSHALL, C.J.; BLACKWELL, M. Morphological and ecological similarities: wood-boring beetles associated with novel xylose-fermenting yeasts *Spathaspora passalidarum* gen. sp. nov. and *Candida jeffriesse* sp.nov. **Mycological Research.** 2006.

NI, H.; LAPLAZA, J.M.; JEFFRIES T.W. Transposon Mutagenesis to Improve the Growth of Recombinant *Saccharomyces cerevisiae* on D-Xylose. **Appl. Environ. Microbiol.** v.73, p.2061-2066, 2007.

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

SAMBROOK, J; FRITSCH, e F; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2. ed. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 1546 p.

SANTOS, F. A. et al. Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol. **Química Nova**, v. 35, p.1004-1010, 2012.

SARKIS, N. Opec's influence: The price of oil is rising, and may never fall. **Le Monde Diplomatique**. França. maio 2006.

STAMBUK, B. U; ELEUTHERIO, E. C. A; FLOREZ-PARDO, L. M; SOUTO-MAIOR, A. M; BON, E. P. S. Brazilian potential for biomass ethanol: Challenge of using hexose and pentose cofermenting yeast strains. **JSIR**, v. 67, p.918-926, 2008.

PACHECO, T. F. **Produção de Etanol: Primeira ou Segunda Geração?** Brasília: Embrapa Agroenergia, 2011.

PALTAUF, F; KOHLWEIN, S. D; HENRY, S. A. Regulation and Compartmentalization of Lipid Synthesis in Yeast. In: BROACH, James R.; PRINGLE, John R.; JONES, Elizabeth W.. **The Molecular and Cellular Biology of the Yeast Saccharomyces**: Gene expression. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1992.

PITKÄNEN, J.P; ARISTIDOU, A; SALUSJÄRVI, L; RUOHONEN, L; PENTTILÄ, M. Metabolic flux analysis of xylose metabolism in recombinant *Saccharomyces cerevisiae* using continuous culture. **Metab. Eng.** v.5, p.16-31, 2003.

TAMAKAWA, H; IKUSHIMA, S; YOSHIDA, S. Construction of a *Candida utilis* strain with ratio-optimized expression of xylose-metabolizing enzyme genes by cocktail multicopy integration method. **J. Biosci. Bioeng.**, v. 115, p.532-539, 2013.

TANTIRUNGKIJ, M; NORIYUKI, N; TATSUJI, S; TOSHIOMI, Y. Construction of xylose-assimilating *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Ferment. Bioeng.** v. 75, p.83-88, 1993.

TOIVARI, M.H.; SALUSJÄRVI, L.; RUOHONEN, L.; PENTTILÄ, M. Endogenous Xylose Pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. **Appl. Environ. Microbiol.** v.70, p.3681-3686, 2004.

VAN VLEET, J.H.; JEFFRIES, T.W.; OLSSON, L. Deleting the paranitrophenyl phosphatase (pNPPase), *PHO13*, in recombinant *Saccharomyces cerevisiae* improves growth and ethanol production on D-xylose. **Metab. Eng.** v.10, p.360-369, 2008.

VANDIJKEN, J; SCHEFFERS, W. Redox balances in the metabolism of sugars by yeasts. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 32, p.199-224, 1986.

WANG, Y; REN, Y. C; ZHANG, Z. T; KE, T; HUI, F. L. *Spathaspora allomyrinae* sp. nov., a D-xylose-fermenting yeast species isolated from a scarabeid beetle *Allomyrina dichotoma*. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** 2016.

WATANABE, S; SALEH A. A; PACK, S. P; ANNALURU, N; KODAKI, T; MAKINO, K. Ethanol production from xylose by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* expressing protein engineered NADP⁺ - dependent xylitol dehydrogenase. **J. Biotechnol.** v. 130, p. 316-319, 2007.

WOHLBACH, D. J; KUOC, A; SATOB, T. K; POTTSA, K. M; SALAMOVC, A. A; LABUTTIC, K. M; SUNC, HUI; CLUMC, A; PANGILINANC, J. L; LINDQUISTC, E. A; LUCASC, S; LAPIDUSC, A; JIND ,M; GUNAWAND, C; BALAND, V; DALED, B. E; JEFFRIESB, T. W; ZINKELB, R; BARRYC, K. W; GRIGORIEVC, I. V; GASCHA, A. P. Comparative genomics of xylose-fermenting fungi for enhanced biofuel production. **National Acad Sciences.** v.108, p.13212-13217 , 2011.