



ALESSANDRO LUIS VENEGA CORADINI

**“DOMESTICAÇÃO GENÉTICA DA LEVEDURA
OLEAGINOSA *LIPOMYCES STARKEYI* E ESTUDO DA
EXPRESSÃO DE GENES LIGADOS AO METABOLISMO
DE XILOSE E LIPÍDEOS DURANTE FERMENTAÇÃO EM
FRASCOS AGITADOS”.**

CAMPINAS

2014



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA

ALESSANDRO LUIS VENEGA CORADINI

**“DOMESTICAÇÃO GENÉTICA DA LEVEDURA OLEAGINOSA
LIPOMYCES STARKEYI E ESTUDO DA EXPRESSÃO DE GENES
LIGADOS AO METABOLISMO DE XILOSE E LIPÍDEOS
DURANTE FERMENTAÇÃO EM FRASCOS AGITADOS”.**

Orientador(a): Profa. Dra. Telma Teixeira Franco

Co-Orientador(a) Dra Ana Carolina Deckmann

Tese de Mestrado apresentada ao Programa de Pós Graduação em
Engenharia Química da Faculdade de Engenharia Química da Universidade
Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestre em Engenharia
Química

**ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE
DEFENDIDA PELO ALUNO ALESSANDRO LUIS VENEGA CORADINI E
ORIENTADA PELA PROFA. DRA. TELMA TEIXEIRA FRANCO.**

Assinatura do Orientador

CAMPINAS 2014

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Área de Engenharia e Arquitetura
Elizangela Aparecida dos Santos Souza - CRB 8/8098

C810d Coradini, Alessandro Luis Venega, 1988-
Domesticação genética da levedura oleaginosa *Lipomyces starkeyi* e estudo da expressão de genes ligados ao metabolismo de xilose e lipídeos durante cultivo em frascos agitados / Alessandro Luis Venega Coradini. – Campinas, SP : [s.n.], 2014.

Orientador: Telma Teixeira Franco.
Coorientador: Ana Carolina Deckmann.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

1. Levedura. 2. Engenharia genética. 3. Xilose. 4. Lipídeos. 5. Transcriptoma.
I. Franco, Telma Teixeira, 1957-. II. Deckmann, Ana Carolina. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Química. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Genetic domestication of oleaginous yeast *Lipomyces starkeyi* and study of expression in genes related to xylose and lipids metabolism during cultivation in shake flasks

Palavras-chave em inglês:

Yeast

Genetic engineering

Xylose

Lipids

Transcriptome

Área de concentração: Engenharia de Processos

Titulação: Mestre em Engenharia Química

Banca examinadora:

Telma Teixeira Franco [Orientador]

Anderson Ferreira da Cunha

Jaciane Lutz Ienczak

Data de defesa: 25-06-2014

Programa de Pós-Graduação: Engenharia Química

Dissertação de Mestrado defendida por Alessandro Luis Venega Coradini e aprovada em 25 de junho de 2014 pela banca examinadora constituída pelos doutores (as)



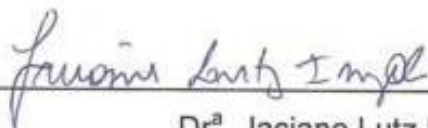
Prof.ª. Dr.ª. Telma Teixeira Franco (Orientadora)

UNICAMP



Dr. Anderson Ferreira da Cunha

UFSCAR



Dr.ª. Jaciane Lutz Ienczak

CTBE

AGRADECIMENTO

Primeiramente agradeço a Deus pelo dom da vida e principalmente por ter colocado em meu caminho pessoas tão especiais que de maneira direta ou indireta tiveram papel importantíssimo em minha caminhada até este momento.

Agradeço aos meus pais Luis Fernando Coradini e Silzeli Venega Coradini, pelo amor incondicional a mim dedicado durante todos esses anos, pela dedicação e esforço em minha educação, pelo apoio irrestrito e pela motivação para trilhar meu caminho. Vocês são e sempre serão minha maior referência, como pessoas, profissionais e acima de tudo pais. Obrigado por tudo, amo vocês.

Agradeço também a minha noiva Keylla Guiguer Silva, pelo companheirismo, cumplicidade, paciência, dedicação e amor com que tem me tratado durante todos esses anos. Este amor só me dá forças para continuar batalhando e superando as adversidades de todos os dias. Está e as outras vitórias que estão por vir também são suas. Amo você.

Agradeço ao meu irmão Allyson Fernando Venega Coradini, pela amizade, confiança e por junto a meus pais ter feito parte de minha formação e educação.

Agradeço também aos meus demais familiares por proverem um grande alicerce familiar ao qual cresci e que serviu como formador de meu caráter.

Agradeço a minha orientadora Telma Teixeira Franco, por ter me aceito como seu orientado, por ter acreditado em minhas qualidades como pessoa e profissional, pela grande oportunidade e ensinamentos valiosos a mim dirigidos. Serei eternamente grato.

Agradeço em especial a minha coorientadora Ana Carolina Deckmann, sem a qual nada disso teria sido possível, a qual eu atribuo o sucesso de grande parte deste trabalho. Uma profissional exemplar, que com certeza será sempre, para mim, um grande exemplo de dedicação e amor a profissão. Que me tratou sempre com paciência, carinho e dedicação e nunca mediu esforços para que tudo desse certo. Obrigado por tudo.

Agradeço também ao amigo Gleidson Silva Teixeira pelo auxílio na reta final dos experimentos, sua dedicação e ajuda foram essenciais para realização deste trabalho.

Agradeço a meus colegas de laboratório e grupo de pesquisa pela amizade e companheirismo, por estarem sempre dispostos a ajudar, trabalhar, ou apenas tomar um café e jogar conversa fora. Esta convivência transformou tudo mais fácil e prazeroso.

Por fim, agradeço a todos que de uma forma ou outra contribuíram para a realização de mais esta etapa em minha vida. Obrigado.

RESUMO

A crise energética mundial aliada aos problemas ambientais tem despertado grande preocupação mundial, aumentando assim a busca por combustíveis mais “limpos” que possam substituir os já existentes. Dentre estes substitutos podemos destacar os chamados biocombustíveis, como o etanol e o biodiesel.

O uso de microrganismos oleaginosos foi apresentado como uma fonte alternativa de óleos e gorduras de baixo custo (Meng et al., 2009). O óleo produzido por microrganismos pode ter como substrato qualquer fonte de carbono, incluindo bagaços e resíduos agrícolas em geral, evitando tanto a competição por áreas de plantio como agregando valor a dejetos de outros setores agrícolas. A esta abordagem dá-se o nome de “biocombustíveis de segunda geração”.

Neste contexto, as leveduras surgem como fortes candidatas à produção de biodiesel, uma vez que diversas ferramentas de cultivo e manipulação já foram implantadas especialmente para o uso de leveduras em processos industriais e biotecnológicos.

Entretanto, o emprego de microrganismos selvagens (i.e., não domesticados) limita o controle dos parâmetros que afetam o processo produtivo, uma vez que as bioconversões de interesse dependem de ajustes metabólicos desconhecidos, e a falta de conhecimento genético destes microrganismos dificulta a aplicação de técnicas de manipulação genética. Assim, o presente estudo teve como objetivo “domesticar” a linhagem DSM70826 da levedura *Lipomyces starkeyi* tornando-a de fácil manipulação genética e tornando-a uma plataforma para posterior introdução de características que possam melhorar o seu desempenho quanto ao acúmulo de lipídeos para produção de biodiesel. Uma vez que foi realizado o sequenciamento do genoma desta levedura durante trabalho anterior conduzido em nosso laboratório, também objetivamos utilizar este banco de dados para identificar e estudar alguns genes considerados relevantes aos processos fermentativos de xilose e também ao acúmulo de lipídeos, auxiliando a elucidar as principais rotas metabólicas envolvidas nestes processos.

Palavras-chave: Levedura, Engenharia genética, Xilose, Lipídeos, Transcriptoma

ABSTRACT

The global energy crisis combined with environmental problems has aroused great worldwide concern, increasing the search for "cleaner" fuels that can replace existing ones. Among these substitutes the so-called biofuels, such as ethanol and biodiesel can be highlighted. In the case of biodiesel, different fat sources are considered, including vegetable oils, animal fats and recycled oils.

The use of oleaginous microorganisms was presented as an alternative source of low cost oils and fat (Meng et al., 2009). The oil produced by microorganisms can use any substrate as carbon source, including bagasse and agricultural waste in general, avoiding the competition for growing areas and adding value to waste of other agricultural sectors. This approach is called "second generation biofuels".

In this context, yeasts appear as strong candidates for biodiesel production, since many manipulation and cultivation tools have been implemented especially for the use of yeast in industrial and biotechnological processes.

However, the use of wild microorganisms (i.e., non-domesticated) limits the control parameters that affect the production process, since bioconversions of interest depend of unknown metabolic adjustments, and lack of genetic knowledge of these microorganisms hinders the application of genetic manipulation techniques. Therefore, the present study aimed to "domesticate" the yeast strain *Lipomyces starkeyi* DSM70826 making it easy genetic manipulation and making it a platform for subsequent introduction of features that can improve your performance on lipid accumulation for production of biodiesel. Since the genome sequencing of this yeast was performed during previous work conducted in our laboratory, we also aim to use this database to identify and study some genes considered relevant to xylose fermentation processes and also to lipid accumulation, helping to elucidate the main metabolic pathways involved in these processes.

Keywords: Yeast, Genetic Engineering, Xilose, Lipids, Transcriptome.

Sumário

RESUMO	IX
ABSTRACT	XI
ÍNDICE DE FIGURAS	XV
ÍNDICE DE TABELAS	XVI
OBJETIVO GERAL	XIX
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	XIX
1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	21
1.1. A CRISE ENERGÉTICA MUNDIAL	21
1.2. COMBUSTÍVEIS ALTERNATIVOS	22
1.3. O AVANÇO DO BIODIESEL.....	23
1.4. UTILIZAÇÃO DE MICRORGANISMOS NA PRODUÇÃO DE BIODIESEL	24
1.5. METABOLISMO DE XILOSE POR LEVEDURAS.....	29
1.6. SÍNTESE DE LIPÍDEOS EM LEVEDURAS	34
JUSTIFICATIVA.....	38
2. CAPÍTULO I: ENGENHARIA GENÉTICA E TRANSFORMAÇÃO DA LEVEDURA <i>LIPOMYCES STARKEYI</i>	41
2.1. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	41
2.2. MATERIAL E MÉTODOS:	44
2.2.1. MATERIAL BIOLÓGICO	44
2.2.2. MEIOS DE CULTURA	45
2.2.3. EXTRAÇÃO DE DNA DA LEVEDURA OLEAGINOSA.....	45
2.2.4. CONSTRUÇÃO DO CASSETE INTEGRATIVO Δ URA3.....	46
2.2.5. PCR DE MONTAGEM DO CASSETE	47
2.2.6. CLONAGEM DO CASSETE Δ URA3 EM BACTÉRIAS <i>E. COLI</i>	48
2.2.7. TRANSFORMAÇÃO DA LEVEDURA	49
2.2.8. TRANSFORMAÇÃO POR ACETATO DE LÍTIO (LIAC).....	49
2.2.9. TRANSFORMAÇÃO POR ELETROPORAÇÃO	49
2.2.10. TRANSFORMAÇÃO DE ESFEROPLASTOS	50
2.2.11. TRANSFORMAÇÃO DA LEVEDURA <i>LIPOMYCES STARKEYI</i> COM O PLASMÍDEO YEP352 CONTENDO O FRAGMENTO DE ORIGEM DE REPLICAÇÃO DE LEVEDURA (2 μ M).	50
2.2.12. CONSTRUÇÃO DO PLASMÍDEO YEP352 MODIFICADO	50
2.2.13. TRANSFORMAÇÃO DAS BACTÉRIAS COM O PLASMÍDEO YEP352 MODIFICADO E EXTRAÇÃO PLASMIDIAL (MINIPREP)	53
2.2.14. TRANSFORMAÇÃO DA LEVEDURA GENETICAMENTE MODIFICADA CEPA FGY DA ESPÉCIE <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i>	53

2.3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO:	54
2.3.1.	EXTRAÇÃO DE DNA DA LEVEDURA OLEAGINOSA.....	54
2.3.2.	OBTENÇÃO DOS FRAGMENTOS DA REGIÃO UPSTREAM E DOWNSTREAM DO GENE URA3 E O GENE KAN ^R DE RESISTÊNCIA A GENETICINA (G418).....	54
2.3.3.	PCR DE MONTAGEM DO CASSETE.....	55
2.3.4.	CLONAGEM DO CASSETE ΔURA3 EM BACTÉRIAS <i>E. COLI</i>	55
2.3.5.	TRANSFORMAÇÃO DA LEVEDURA	57
2.3.6.	TRANSFORMAÇÃO DA LEVEDURA LIPOMYCES STARKEYI COM O PLASMÍDEO YEP352 CONTENDO O FRAGMENTO DE ORIGEM DE REPLICAÇÃO DE LEVEDURA (2 μM)	58
3.	CAPÍTULO II: UTILIZAÇÃO DA TÉCNICA DE RT-PCR (REAL TIME-PCR) PARA ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE GENES DE INTERESSE, VISANDO COMPLEMENTAR AS INFORMAÇÕES OBTIDAS PELA ANÁLISE DO GENOMA DA LEVEDURA LIPOMYCES STARKEYI.....	62
3.1.	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	62
3.2.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	63
3.2.1.	MATERIAL BIOLÓGICO	63
3.2.2.	MEIO DE CULTIVO E PREPARO DO INÓCULO	63
3.2.3.	CONDIÇÕES PARA FERMENTAÇÃO EM FRASCOS AGITADOS	64
3.2.4.	METODOLOGIA ANALÍTICA.....	65
3.2.4.1.	BIOMASSA	65
3.2.4.2.	CARBOIDRATOS	65
3.2.4.3.	LIPÍDEOS.....	66
3.2.4.4.	NITROGÊNIO	66
3.2.5.	BIOMASSA PARA EXTRAÇÃO DE RNA.....	67
3.2.6.	EXTRAÇÃO DE RNA COM FENOL ÁCIDO E REAÇÃO DE cDNA.....	67
3.2.7.	REAÇÃO DE REAL-TIME PCR	69
3.2.8.	ESCOLHA DOS GENES CANDIDATOS E DESENHO DOS PRIMERS PARA RT-PCR....	70
3.3.	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	74
3.3.1.	CULTIVO EM GLICOSE.....	74
3.3.2.	CULTIVO EM XILOSE	77
3.3.2.	CULTIVO SIMULTÂNEO EM MEIO CONTENDO MISTURA DE XILOSE/GLICOSE NA PROPORÇÃO 70/30 (XIL:GLI).	79
4.	CONCLUSÃO	90
5.	TRABALHOS FUTUROS	91
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	92
7.	ANEXOS.....	104

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Rota do metabolismo de pentoses em leveduras.....	31
Figura 2: Rota alternativa de metabolismo de xilose, mostrando seus subprodutos e destacando em vermelho os genes que codificam as enzimas necessárias às reações da via.	33
Figura 3: Representação do metabolismo intermediário para produção de Acetil-CoA , em meio pobre em nitrogênio, a partir de metabolismo de xilose, passando pela via das pentoses fosfato (PPP).	37
Figura 4: Síntese da molécula de TAG a partir da molécula de Acetil-CoA.....	38
Figura 5: Esquema de amplificação dos fragmentos upURA (upstream) e dwURA (downstream), a partir do genoma de <i>L. starkeyi</i> , e do gene KanR, a partir do plasmídeo pFA6aKanMX4.	42
Figura 6: Mapa e sítos de restrição dos plasmídeos Yep352 e Pfa6a-KanMX6 utilizados na montagem do cassete modificado YEp352.....	52
Figura 7: Eletroforese dos fragmentos (upURA, dwURA e KanR) e do cassete integrativo.....	55
Figura 8: Análise do produto da digestão através de corrida em gel de agarose 1%..	57
Figura 9: Resultado da digestão dos plasmídeos pFA6a-KanMX6 e Yep352.....	59
Figura 10: Resultado da extração plasmidial das bactérias contendo o plasmídeo modificado Yep352.60	
Figura 11: Esquema representativo do cultivo em frascos agitados durante 96 horas, tendo como fonte de carbono os açúcares xilose (XSM), glicose (GSM) e uma mistura de ambos (Xil:Gli).	63
Figura 12: Parâmetros de concentração de biomassa e lipídeos, além de consumo de nutrientes (glicose e nitrogênio) para fermentação em glicose.....	75
Figura 13: Extração de RNA do cultivo realizado em glicose	76
Figura 14: Parâmetros de concentração de biomassa e lipídeos, além de consumo de nutrientes (Xilose e nitrogênio) para fermentação em Xilose	77
Figura 15: Extração de RNA do cultivo realizado em xilose.	79
Figura 16: Parâmetros de concentração de biomassa e lipídeos, além de consumo de nutrientes (Xilose, glicose e nitrogênio) para fermentação em meio simulando o conteúdo de carboidratos do hidrolisado hemicelulósico na proporção 70% de xilose e 30% de glicose.	80
Figura 17: Extração de RNA do cultivo realizado em mistura de xilose/glicose.	81
Figura 18: Esquema representado a oxidação/redução durante a assimilação de xilose.....	83

Figura 19: Expressão relativa dos genes ligados á via principal (XYL1) e alternativa (XylB, XylC e XylD) do metabolismo de xilose. 86

Figura 20: Esquema representativo do fluxo metabólico ligado ao acúmulo de lipídeos na levedura *Lipomyces starkeyi*. 88

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Conteúdo lipídico das principais espécies oleaginosas com potencial na indústria de biocombustíveis. 25

Tabela 2: Composição lipídica das principais leveduras oleaginosas..... 26

Tabela 3: Dados do genoma de microrganismos oleaginosos de interesse industrial. 28

Tabela 4: Resultados das técnicas de transformação por Acetato de lítio (LiAc), Eletroporação e esferoplastos. 58

Tabela 5: Desenho dos primers de genes ligados à síntese de lipídeos em leveduras. 71

Tabela 6: Desenho dos primers de genes ligados ao metabolismo de xilose em leveduras. 72

Tabela 7: Genes escolhidos para teste de normalização. 74

Tabela 8: Resultados do cultivo em meio contendo glicose como fonte de carbono. 76

Tabela 9: Resultados do cultivo em meio contendo xilose como fonte de carbono. 78

Tabela 10: Resultados do cultivo em meio contendo xilose e glicose como fonte de carbono. 81

Tabela 11: Resultados da expressão relativa dos genes durante a fermentação em xilose..... 82

Tabela 12: Resultados da expressão relativa dos genes durante a fermentação em meio contendo Xilose/Glicose (Xil:Gli). 85

Tabela 13: Resultados da expressão relativa dos genes durante a transição para fase do acúmulo de lipídeos (48h)..... 87

INTRODUÇÃO

As preocupações com a sustentabilidade, escassez de combustíveis fósseis e aquecimento global, têm proporcionado recentemente um forte incentivo para pesquisa e desenvolvimento de alternativas mais limpas e renováveis, incluindo os biocombustíveis de próxima geração (Dugar and Stephanopoulos 2011).

Uma das mais importantes fontes de energia renovável é o biodiesel, sua produção tem recebido muita atenção devido às suas características biodegradáveis e baixos níveis de emissões de produtos de combustão (Chen et al., 2012). O Biodiesel é produzido a partir de óleos, gordura animal e biomassa vegetal, onde os triglicerídeos são convertidos em ésteres monoalquílicos de ácidos graxos de cadeia longa (Lang et al., 2001, Vicente et al., 2004, Meng et al., 2009).

No entanto, todos estes recursos requerem energia e áreas de cultivo para sua produção em larga escala, competindo diretamente por áreas de plantio e por recursos energéticos com as culturas agropecuárias (Meng et al., 2009, Vicente et al., 2009). Assim, apesar dos impactos favoráveis que sua comercialização pode oferecer, os aspectos econômicos envolvidos na produção do biodiesel de primeira geração têm sido um fator limitante a sua ampla utilização. Sendo assim, têm-se buscado fontes renováveis que não concorram por áreas de plantio com outros setores: são estes os chamados 'biocombustíveis de segunda geração'.

Dentre os principais recursos disponíveis para a produção de biocombustíveis da segunda geração, destaca-se a biomassa lignocelulósica por ser abundante e material de resíduo presente em diversos setores da indústria. No caso da biomassa vegetal, apontam-se ainda vantagens ecológicas dado que seu uso contribui com o balanço de carbono: o CO₂ emitido pela indústria é recapturado via fotossíntese pelas plantas que lhe servem de matéria-prima. O desafio atual é o desenvolvimento de processos competitivos para a obtenção de biocombustíveis a partir desta biomassa, viabilizando a produção em larga escala e a custos acessíveis de forma a permitir a substituição dos combustíveis fósseis pelos biocombustíveis.

Porém para a conversão dessa biomassa lignocelulósica em lipídeos, faz-se necessária a utilização de microrganismos capazes de fermentar os açúcares encontrados nestes resíduos (celulose, hemicelulose) e transformá-los em lipídeos. Neste cenário surgem os chamados *Single cell oils* (SCO), microrganismos oleaginosos capazes de acumular grandes quantidades de lipídeos, sendo que algumas espécies de bactérias, fungos, leveduras dentre outros, também se mostram capazes de fermentar os açúcares mais complexos presentes nestes materiais lignocelulósicos. Porém muitas vezes a bioconversão deste material pelos microrganismos citados não alcança a produtividade desejada. Neste sentido, é fundamental o desenvolvimento de novas estratégias que permitam aumentar a produtividade do processo de transformação da biomassa lignocelulósica. Neste contexto ferramentas de Biologia molecular, além da Engenharia genética e Metabólica surgem como importantes ferramentas no direcionamento do metabolismo destes microrganismos, visando melhorar suas características naturais e até mesmo introduzindo novas, que tornem viável sua utilização industrial.

Sendo assim o presente trabalho, propõe a manipulação genética da levedura oleaginosa *Lipomyces starkeyi*, através de técnicas já conhecidas de transformação genética, bem como um estudo transcriptômico de genes ligados a síntese de lipídeos e metabolismo de xilose, duas das principais características apresentadas pela levedura.

OBJETIVO GERAL

Realizar a domesticação genética da levedura oleaginosa *Lipomyces starkeyi*, de forma a torná-la uma plataforma viável para uso de ferramentas da engenharia genética, e realizar um estudo da expressão de genes relevantes aos processos fermentativos e de produção de lipídeos, identificando aqueles que possam servir como alvos de futuras modificações genéticas e metabólicas.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Desenho de primers para o isolamento e manipulação das seqüências de DNA dos genes-alvo para a domesticação genética de *L. starkeyi*, através da consulta a bancos de dados de seqüências nucleotídicas de seu genoma;
2. A partir das seqüências dos genes-alvo, e utilizando combinações com genes de resistência a antibióticos, construir cassetes integrativos de DNA para nocautear os genes-alvo de *L. starkeyi*;
3. Emprego de protocolos para a transformação genética de *L. starkeyi*;
4. Seleção de genes de *L. starkeyi* através da análise de sequências nucleotídicas presentes em nosso banco de dados genômicos, visando analisar e quantificar a expressão de genes relacionados aos metabolismos de interesse durante crescimento em xilose, glicose e em meio simulando o conteúdo de carboidratos do hidrolisado hemicelulósico na proporção de 70% de xilose para 30% de glicose, através da técnica de RT-PCR.

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1.A CRISE ENERGÉTICA MUNDIAL

O consumo de energia tem aumentado exponencialmente nas últimas décadas, tendo em vista que as necessidades energéticas são cada vez maiores para a produção de alimentos, bens de consumo, bens de serviço e de produção, lazer e transporte. Nos países em franco desenvolvimento econômico o aumento do consumo de energia é ainda mais acelerado, uma vez que estes países necessitam de energia para continuar desenvolvendo seus parques industriais, modernizando sua agricultura e melhorando a qualidade de vida da população (Murray and King 2012).

Atualmente o petróleo e outros combustíveis fósseis ainda são a principal matriz energética mundial, mas desde a década de 70 e 80, com a primeira crise mundial do petróleo, o modelo energético mundial vem sofrendo duros golpes. A eminente escassez destes combustíveis de origem não renovável e a adoção de medidas ambientais que possam diminuir a emissão de gases poluentes na atmosfera assinada e ratificada por diversos países na assinatura do protocolo de Kyoto acenderam a busca por novas fontes de energia que pudessem suprir a demanda deixada pelos combustíveis fósseis de maneira sustentável e “limpa”(O'Neill and Oppenheimer 2002).

A mudança na matriz energética mundial é indispensável, principalmente, para o setor automobilístico, consumidor potencial da energia proveniente dos recursos fósseis e maior causador de danos ao meio ambiente. Por este fato, torna-se evidente que o desenvolvimento de novas tecnologias limpas de combustíveis, como os biocombustíveis, tem a capacidade de substituir, em partes, a demanda mundial de combustíveis fósseis no atual mercado energético.

1.2.COMBUSTÍVEIS ALTERNATIVOS

Desde o ano de 2004 o preço do barril de petróleo deixou de ser flexível e hoje em dia sua oferta não atende a demanda mundial a preços em que a economia global esteja acostumada (Murray and King 2012). Outras fontes renováveis que podem ser convertidas em combustíveis de transporte, tais como, óleo de xisto, gás de xisto, gás natural (gás-liquido) e carvão (carvão-liquido), não podem substituir o petróleo convencional por causa de suas reservas limitadas (Murray and King 2012), e problemas com grandes emissões de gases causadores do efeito estufa produzidos durante sua conversão (Caspeta and Nielsen 2013). Tecnologias alternativas como, por exemplo, células de combustível, hidrogênio e eletricidade provavelmente não terão um papel importante em veículos pesados de serviço, transporte, aviação e por causa de sua capacidade limitada ou densidade de energia inferior em relação aos derivados de petróleo (IEA, 2010). Os biocombustíveis podem ser usados em motores de combustão interna de corrente e, portanto, servir como *drop-in* dos atuais combustíveis fósseis, além da compatibilidade com a infraestrutura atual, o que os torna atraentes para substituição dos combustíveis fósseis de transportes.

Boyle et al. (1998) afirmam que as energias renováveis têm maior potencial de utilização frente às formas convencionais de energia, como petróleo, carvão e gás natural, tendo capacidade de substituí-las futuramente. Este fato justifica-se por tais fontes serem seguras e inesgotáveis, fomentarem o desenvolvimento de pequenos produtores e a competitividade entre as grandes concessionárias, além de reduzirem impactos ambientais ocasionados pelos combustíveis fósseis.

De acordo com Grimoni et al. (2004), esta substituição também adiciona diversidade ao fornecimento de energia, principalmente para o setor automobilístico, que atualmente utiliza metade da produção mundial dos derivados de petróleo. Os autores projetam que, caso o aumento anual da frota de automóveis, ônibus e caminhões continue, cerca de um bilhão de veículos estarão circulando pelas ruas e estradas mundiais no ano de 2030. Albadó (2002) acrescenta que o uso das fontes de energia renováveis surgiu com a conscientização da humanidade em preservar o

ambiente e ao mesmo tempo gerar energias alternativas que supram a demanda global. Dentre os principais combustíveis alternativos ao uso da gasolina estão o álcool e o biodiesel.

1.3.O AVANÇO DO BIODIESEL

O biodiesel tem um papel importante no equacionamento das crises energéticas, uma vez que pode ser aproveitado em sua forma pura ou em mistura com o diesel de petróleo, para o transporte de carga ou de passageiros (Goldemberg and Guardabassi 2009).

O biodiesel é um combustível biodegradável derivado de fontes renováveis, que pode ser obtido por processos como o craqueamento, a esterificação ou pela transesterificação. Produzido a partir de gorduras animais (sebo bovino, óleos de peixes, banha de porco e óleo de mocotó), óleos vegetais (algodão, amendoim, babaçu, canola, dendê, girassol, mamona e soja), óleos e gorduras residuais (originários do processamento doméstico, comercial e industrial) ou de outras fontes oleaginosas (microrganismos oleaginosos), substitui total ou parcialmente o óleo diesel de petróleo em motores automotivos ou estacionários. Além disso, pode ser utilizado puro ou misturado ao diesel de petróleo, tendo denominações diferentes para cada proporção de mistura: 2% de Biodiesel ao diesel de petróleo denomina-se B2 e assim sucessivamente, até o Biodiesel puro, denominado B100 (www.biodiesel.gov.br). No Brasil o percentual de biodiesel adicionado ao diesel de petróleo tem aumentado consideravelmente ano após ano. Inicialmente em 2008 a legislação previa a mistura de 2% de Biodiesel ao diesel de petróleo, passando para 5% em 2010, e atualmente, segundo medida provisória de maio de 2014, os valores chegaram a 6%, passando a 7% a partir de novembro do mesmo ano.

A viabilidade do uso do biodiesel depende, no entanto, da sua competitividade econômica. Do ponto de vista do usuário, significa que o preço do

biodiesel na bomba deve ser menor que o do diesel de petróleo. E, para isso, devem ser utilizados processos e matérias-primas que barateiem os custos de produção.

No entanto, o processo produtivo do biodiesel derivado de plantas oleaginosas sustenta-se, atualmente, no processamento de partes nobres de vegetais, tubérculos e raízes, requerendo grandes extensões de terra arável para sua produção em larga escala. Da mesma forma, o biodiesel derivado de gordura animal requer grandes investimentos para a alimentação, manejo e pastagens de animais. Assim, o biodiesel produzido atualmente não pode atender à demanda real do mercado, podendo ser utilizado para suprir apenas uma pequena fração do setor de combustíveis para transportes. A fim de atender a demanda crescente de produção de biodiesel, outras fontes de produção de óleo foram exploradas. Recentemente, o desenvolvimento de processos para a produção de óleo em microrganismos oleaginosos heterotróficos, denominado “single cell oil” (SCO), provocou uma atenção significativa (Azocar et al., 2010). Assim, estes microrganismos surgem como uma importante alternativa para a produção de biodiesel, introduzindo novos substratos para a obtenção do óleo, reduzindo a necessidade de áreas cultiváveis e, assim, barateando o custo final.

1.4. UTILIZAÇÃO DE MICRORGANISMOS NA PRODUÇÃO DE BIODIESEL

Microrganismos oleaginosos são definidos como aqueles capazes de acumular mais de 20% de seu peso corporal seco na forma de lipídeos (He et al., 2010). Estes organismos têm sido freqüentemente estudados e caracterizados para a produção de óleos e gorduras como uma alternativa à origem agrícola e animal (Zhao et al., 2008).

Estes microrganismos possuem principalmente a capacidade de acumular lipídeos na forma de triacilgliceróis (TAG). A ocorrência de TAG é comum a todos os organismos eucarióticos, tais como fungos, plantas e animais, considerando que foi raramente descrito em bactérias (Meng et al., 2009).

A Tabela 1 apresenta algumas das principais espécies oleaginosas e respectivos conteúdos de lipídeo, conforme originalmente apresentado por Meng et al. (2009).

Tabela 1: Conteúdo lipídico das principais espécies oleaginosas com potencial na indústria de biocombustíveis.

<u>Espécies</u>	<u>Conteúdo lipídico (% peso seco)</u>	<u>Espécies</u>	<u>Conteúdo lipídico (% peso seco)</u>
<u>Microalgas</u>		<u>Leveduras</u>	
<i>Botryococcus braunii</i>	<u>25-75</u>	<i>Candida curvata</i>	<u>58</u>
<i>Cylindrotheca sp.</i>	<u>16-37</u>	<i>Cryptococcus albidus</i>	<u>65</u>
<i>Nitzschia sp.</i>	<u>45-47</u>	<i>Lipomyces starkeyi</i>	<u>64</u>
<i>Schizochytrium sp.</i>	<u>50-77</u>	<i>Rhodotorula glutinis</i>	<u>72</u>
<u>Bactérias</u>		<u>Fungos</u>	
<i>Arthrobacter sp.</i>	<u>>40</u>	<i>Aspergillus oryzae</i>	<u>57</u>
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	<u>27-38</u>	<i>Mortierella isabellina</i>	<u>86</u>
<i>Rhodococcus opacus</i>	<u>24-35</u>	<i>Humicola lanuginosa</i>	<u>75</u>
<i>Bacillus alcalophilus</i>	<u>18-24</u>	<i>Mortierella vinacea</i>	<u>66</u>

Fonte: Meng et al., 2009.

Apesar de existirem diversos tipos de microrganismos oleaginosos, nem todos estão disponíveis para produção de biodiesel principalmente pela composição dos ácidos graxos encontrados nestes organismos (Meng et al., 2009).

Dentre os microrganismos oleaginosos, os que têm sido alvo constante de estudos são as leveduras oleaginosas, devido a sua capacidade de acumular grandes

quantidades de lipídeos e suas elevadas taxas de crescimento (Hassam.,et al., 1996). Alguns gêneros como, *Rhodosporidium*, *Rhodotorula* e *Lipomyces*, podem acumular lipídios intracelulares que atingem até 70% do peso de sua biomassa seca (Meng et al., 2009). As leveduras oleaginosas conseguem acumular triacilgliceróis ricos em ácidos graxos poliinsaturados, como oléico (18:1) e linoléico (18:2), juntamente com ácidos palmítico (16:0) ou palmitoléico (C16: 1) são os ácidos graxos mais freqüentes (Meng et al., 2009). A Tabela 2 apresenta o perfil lipídico de algumas leveduras oleaginosas.

Tabela 2: Composição lipídica das principais leveduras oleaginosas.

Porcentagem relativa dos principais resíduos de ácidos graxos (%)					
Levedura	Ácido palmítico (C16:0)	ácidos palmitoléico (C16:1)	Ácido esteárico (C18:0)	Acido oléico (C18:1)	Acido linoléico (18:2)
<i>Lipomyces starkeyi</i>	33	4.8	4.7	55.1	1.6
<i>Rhodotorula glutinis</i>	18	1	6	60	12
<i>Rhodotorula toruloides</i>	24.3	1.1	7.7	54.6	2.1
<i>Cryptococcus albidus</i>	16	1	3	56	nd
<i>Yarrowia lipolytica</i>	11	6	1	28	51

Fonte: Li et al., (2008).

As leveduras oleaginosas mais profundamente investigadas pertencem aos gêneros *Yarrowia*, *Candida*, *Rhodotorula*, *Rhodosporidium*, *Cryptococcus* e *Lipomyces* (Li et al., 2008, Rossi et al., 2009, Ageitos et al., 2011).

As diferentes espécies de *Lipomyces* apresentam uma grande propensão ao acúmulo de triacilgliceróis. Este gênero pertence à ordem e Saccharomycetales e

representa um ramo único na evolução dos Ascomycotas (Vanderwalt 1992). São habitantes exclusivos de solo e possuem uma distribuição mundial. Sua capacidade de produzir lípideos utilizando diferentes fontes de carbono, tais como, xilose, etanol, e a L-arabinose, ou usando uma mistura de glicose/xilose (Zhao et al., 2008, Tapia et al., 2012, Anschau et al., 2014) e xilose/celobiose (Gong et al., 2012), bem como outros resíduos (Angerbauer et al., 2008) tornaram a levedura *Lipomyces starkeyi* um potencial alvo para produção de óleos microbianos.

O recente desenvolvimento de potentes ferramentas biotecnológicas tais como processos fermentativos em larga escala, engenharia genética e metabólica aplicados a microrganismos, acabou impulsionando ainda mais a utilização dos chamados óleos microbianos.

A engenharia genética tornou-se uma importante ferramenta de auxílio na produção de óleo a partir de microrganismos. De acordo com Meng et al., (2009), o avanço da engenharia genética e suas técnicas (recombinação de DNA, mutação sítio dirigida, entre outras), abriram a possibilidade para que determinados componentes de certos óleos se tornassem *commodities* comercializáveis, sobretudo devido a modificações no genoma destes microrganismos que permitem manipular a síntese ou inibição das mais variadas moléculas.

Diversos estudos já têm utilizado a engenharia genética e metabólica a fim de obter microrganismos oleaginosos com características favoráveis, que possam servir como verdadeiras “fábricas celulares”, produzindo e estocando composto de interesse industrial. Dentre as leveduras, vale destacar os trabalhos conduzidos com *Yarrowia lipolytica* (Groguenin et al., 2004, Beopoulos et al., 2008, Dulermo and Nicaud 2011, Fan et al., 2013, Xue et al., 2013, Zhang et al., 2013, Blazeck et al., 2014), que possui grande capacidade de acumular lipídeo (>50%), e *Saccharomyces cerevisiae* (Froissard et al., 2009, Hong and Nielsen 2012, Tang et al., 2013, Runguphan and Keasling 2014) uma espécie convencional de levedura amplamente caracterizada e utilizada em processos fermentativos. Ambas as espécies citadas são as principais fontes de estudo bioquímico sobre o acúmulo de lípideos em leveduras (Beopoulos et al., 2008, Kohlwein 2010).

Demais organismos oleaginosos como os fungos do gênero *Mortierella sp*, *Aspergillus sp.*, as bactérias da espécie *Escherichia coli*, além das algas do gênero *Chlamydomonas sp.* também são alvos da engenharia genética e metabólica (Liang and Jiang 2013).

Porém para a utilização de ferramentas de engenharia genética e metabólica, faz-se necessário um conhecimento prévio do genoma do organismo. Para tanto diversos organismos oleaginosos tiveram seu genoma parcialmente ou completamente sequenciados.

Á seguir, a Tabela 3 mostra os principais microrganismos oleaginosos que possuem seu genoma parcialmente ou totalmente seqüenciado, conforme disponibilizado no GenBank/ NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/>).

Tabela 3: Dados do genoma de microrganismos oleaginosos de interesse industrial.

Dados de publicação do genoma			
Microorganismo	Status	Data	Consórcio/Centro de pesquisa
Levedura			
<i>Yarrowia lypolitica</i>	Completo	02/07/2004	Genolevures,França
<i>Rhodoturula glutinis</i>	Completo	13/02/2014	Mississippi state university,USA
<i>Rhodoturula graminis</i>	em progresso	-	DOE joint genome institute,USA
Microalgas			
<i>Botryococcus brauni</i>	em progresso	-	DOE joint genome institute,USA
<i>Chlorella vulgaris</i>	Completo	16/09/2010	DOE joint genome institute,USA
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Completo	06/02/2006	DOE joint genome institute,USA
Fungo			
<i>Aspergillus oryzae</i>	Completo	20/12/2005	NITE,Japão
Bactérias			

<i>Arthrobacter sp</i>	Completo	13/08/2004	DOE joint genome institute,USA
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	Completo	05/08/2010	Biotechnology Research Institute, China
<i>Rhodococcus opacus</i>	Completo	12/03/2009	NITE,Japão

Fonte: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/>. Consulta feita em 17/03/2014.

1.5. METABOLISMO DE XILOSE POR LEVEDURAS

Materiais lignocelulósicos contendo celulose, hemicelulose e lignina são recursos orgânicos renováveis abundantes, que podem ser utilizados para a produção de energia e produtos bioquímicos (Weber et al., 2010). A conversão de ambas as frações de hemicelulose e celulose para produção de compostos bioquímicos estão sendo intensamente estudada nos últimos anos. Entre 23% e 40% da biomassa lignocelulósica é constituída de hemicelulose, sendo seu principal componente a xilose (Jin et al., 2003). A xilose é o segundo carboidrato mais abundante na natureza, e sua fermentação visando a produção de biocombustíveis pode se tornar uma alternativa de combustíveis futuros.

Os microrganismos, tais como leveduras e bactérias, são essenciais para fermentação de xilose. Os tamanhos maiores das células, paredes mais espessas, melhor crescimento em baixo pH, requisitos nutricionais menos rigorosos, e maior resistência à contaminação, dão vantagem as leveduras em relação as bactérias em se tratando de processos fermentativos comerciais (Jeffries and Jin 2004).

Entretanto, enquanto os processos fermentativos envolvendo glicose ocorrem normalmente utilizando leveduras convencionais como *Saccharomyces cerevisiae*, a utilização de xilose para este tipo de bioconversão apresenta grandes desafios, uma vez que não pode ser metabolizada pela grande maioria destas espécies, bem como pela maioria das leveduras de uso industrial. O mesmo ocorre para as principais leveduras oleaginosas que em sua maioria não possuem a capacidade de assimilar a Xilose como fonte de carbono, característica esta relatada na

literatura nos gêneros *Lipomyces* sp., *Candida* sp., *Rhodotorula* sp. (Anschau et al., 2014).

Várias abordagens de engenharia metabólica têm sido utilizadas para a construção de linhagens recombinantes capazes de fermentar xilose, como a introdução de genes heterólogos capazes de assimilar prontamente a xilose, tais como xilose redutase (XYL1) e xilitol desidrogenase (XYL2) provenientes da levedura *Pichia stipitis*, na levedura fermentativa convencional *Saccharomyces cerevisiae* (Jeppsson et al., 2006). No entanto, a eficiência da fermentação da xilose pelas linhagens recombinantes de *S. cerevisiae* é relativamente baixo em comparação com a de glicose. Foi proposto que vários fatores (Salusjarvi et al., 2008), tais como o equilíbrio de co-fatores redox, o nível de absorção de xilose, a capacidade das vias metabólicas, e a regulação da expressão de determinados genes estão envolvidos na limitação do metabolismo de xilose das leveduras *S. cerevisiae* geneticamente modificadas. Assim, estudos recentes têm-se centrado na análise genômica e funcionais de linhagens reconhecidamente fermentadoras de xilose em comparação com as linhagens não fermentadoras para identificar e utilizar os genes envolvidos no metabolismo de xilose (Jeffries et al., 2007, Agbogbo and Coward-Kelly 2008, Wohlbach et al., 2011).

A via da pentose fosfato (PPP) é a rota bioquímica para o metabolismo de xilose, sendo encontrada em virtualmente todos os organismos celulares. Sua principal função é fornecer D-ribose para a biossíntese de ácidos nucleicos, D-eritrose 4-fosfato para a síntese de aminoácidos aromáticos e NADPH para reações anabólicas. A via da pentose fosfato é dividida em duas etapas. A primeira, conhecida como fase oxidativa, consiste na conversão de glicose-6P em ribulose-5P. A segunda fase, conhecida como fase não-oxidativa, consiste na conversão de ribulose 5P em ribose 5P, xilulose 5P, sedoheptulose 7P, eritrose 4P, frutose 6P e gliceraldeído 3P (Kruger and von Schaewen 2003, Jeffries and Jin 2004).

Em leveduras, fungos filamentosos e outros eucariotos, a conversão de xilose em xilose 5P acontece em dois passos, via uma redução e posterior oxidação, que são mediadas pelas enzimas xilose redutase (XYL1, Xyl1p) e xilitol desidrogenase

(XYL2, Xyl2p), respectivamente (Jeffries et al., 2007). A Figura 1 sintetiza o metabolismo de xilose, glicose e a via da pentose-fosfato em leveduras.

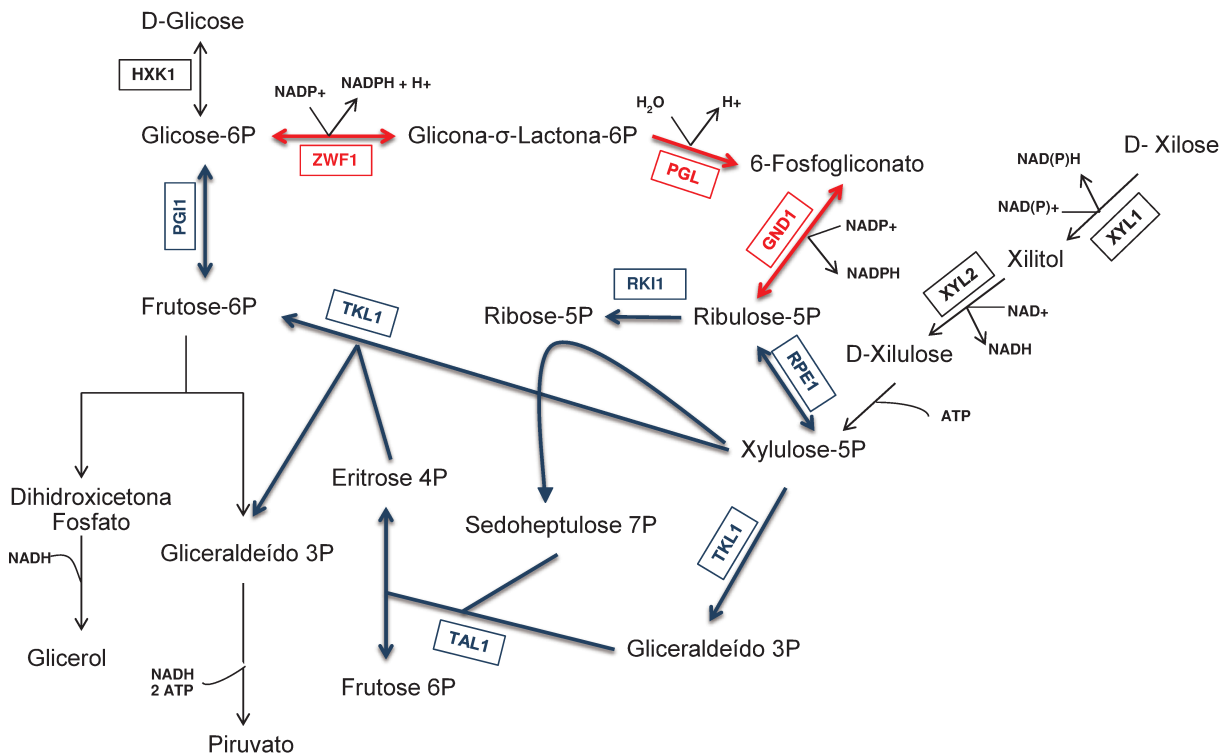


Figura 1: Rota do metabolismo de pentoses em leveduras. A via das pentoses fosfatos (PPP) possui 2 fases, sendo a oxidativa, representada pelas setas vermelhas, e constituída pelas enzimas Glicose-6-fosfato desidrogenase (ZWF1), Gluconolactanase (PGI1), 6-fosfogliconato desidrogenase (GND1). A fase não oxidativa é representada pelas setas de cor azul, sendo constituída por D-ribulose-5-fosfato 3-epimerase (RPE1), ribose-5-fosfato ketol-isomerase (RKI1), transketolase (TKL1) e transaldolase (TAL1). Em leveduras que degradam D-Xilose, sua conversão em Xilulose 5P, se dá através da rota representada pelas enzimas D-xilose redutase (XYL1) e Xilitol desidrogenase (XYL2). Adaptado de Jeffries et al., (2007).

Porém essa via de metabolismo de xilose, por apresentar 2 reações oxiredutases, apresenta um conhecido problema de desbalanço energético quando em anaerobiose, uma vez que não há possibilidades de regeneração dos cofatores NAD+ e NADPH, o que gera um acúmulo de xilitol na célula e redução na assimilação de xilose.

Enquanto a enzima Xyl1 aceita tanto NADH ou NADPH como cofator, a segunda enzima desta via, xilitol desidrogenase ou Xyl2, aceita apenas NAD⁺. No entanto, Xyl1 possui uma maior afinidade ao NADPH em relação ao NADH, utilizando-o preferencialmente. O acoplamento das atividades de Xyl1 e Xyl2, por conseguinte, tende a provocar o consumo de NADPH e acúmulo de NADH (Jeffries et al., 2007).

Existem pelo menos duas outras vias para o catabolismo de xilose que foram descritas apenas em procariotos (Weimberg 1961, Dahms 1974, Stephens et al., 2007). Comum nestas duas vias é o fato da xilose ser oxidada pela enzima xilose desidrogenase (XylB). A enzima XylB oxida xilose a Xilonolactona (xilono-1,4-lactona) () utilizando NAD⁺ ou NADP⁺ como co-fator. A xilonolactona é então hidrolisada a ácido xilônico (xilonato) por uma xilonolactanase (XylC). Na próxima etapa, uma desidratase (XylD) converte o ácido xilônico a 2-ceto-3-desoxi-Xilonato. Para a continuação da conversão de 2-ceto-3-desoxi-xilonato, dois caminhos diferentes são possíveis. No primeiro caminho, uma aldolase (KDXA) divide o substrato em gliceraldeído e piruvato (Dahms 1974). No segundo caminho, uma desidratase converte a molécula de 2-ceto-3-desoxi-xilonato em uma molécula de α -cetogluturato semialdeído, o qual é subsequentemente oxidado por uma desidrogenase NAD⁺ dependente, à uma molécula de α -cetogluturato (Weimberg 1961).

Porém, esta rota que parece atípica de fungos e outros eucariotos, está presente em espécies de bactérias como *Pseudomonas* (Dagley and Trudgill 1965), *Gluconobacter* ssp, *Caulobacter crescentus* e *Haloarcula marismortui* (Toivari et al., 2010). Em bactérias, esta rota é estudada devido a sua utilização industrial visando a produção de D-xilonato, conhecido industrialmente como ácido xilônico, que possui potencial utilização como agente quelante na dispersão de concreto, precursor para compostos tais como os co-poliâmidas, poliésteres, hidrogéis, e 1,2,4-butanotriol, e também uma alternativa barata ao ácido glucônico, extensamente utilizado (80 kton/ano) em indústrias farmacêuticas, alimentícias, adesivas, pinturas e corantes (Toivari et al., 2012).

Esta rota alternativa para o metabolismo de xilose é apresentada na Figura 2.

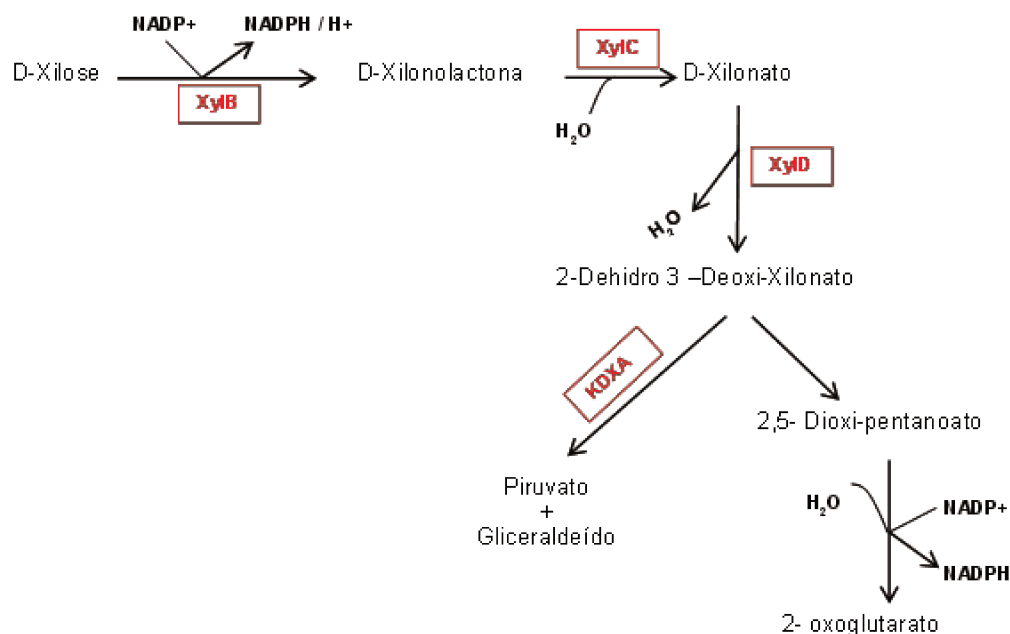


Figura 2: Rota alternativa de metabolismo de xilose, mostrando seus subprodutos e destacando em vermelho os genes que codificam as enzimas necessárias às reações da via. Na primeira etapa da via, mediada pela enzima xilose desidrogenase (XylB), ocorre a oxidação da molécula de D-Xilose convertida em D-Xilonolactona, utilizando NADP+ como acceptor de elétrons. Posteriormente a molécula de D-Xilonolactona é convertida em D-Xilonato pela enzima xilonolactanse (XylC). Na terceira etapa D-Xilonato é metabolizado, pela enzima xilose desidratase (XylD), em 2-Dehidro-3-Deoxi-Xilonato. Esta molécula pode seguir duas vias distintas, na primeira conhecida como via de Dahm, a molécula é metabolizada em Piruvato e Gliceraldeído pela enzima 2-Dehidro-3-Deoxi-Xilonato aldolase (KDXA), enquanto na outra via a mesma molécula é convertida em 2-oxoglutarato e redirecionada para o Ciclo do Ácido Cítrico. Adaptado de Stephens et al. (2006).

Recentemente, leveduras como *Saccharomyces cerevisiae* e *Kluyveromyces lactis*, foram geneticamente modificadas para a produção de Ácido Xilônico, através da inserção de genes que codificam a enzima XylB obtida do fungo *Trichoderma reesei* (Toivari et al., 2012). Segundo o mesmo autor, a levedura *Kluyveromyces lactis* apresentou vantagens em relação à produção de ácido xilônico, quando comparado à espécie *Saccharomyces cerevisiae*. Porém, este estudo salienta que *S. cerevisiae* não possui robustez para tolerar os hidrolisados hemicelulósicos, o que abre espaço para

estudos de linhagens de leveduras que, além de naturalmente consumirem xilose, também são capazes de tolerar os compostos provenientes de hidrolisado hemicelulósico, visando à produção de ácido xilônico.

Sequências de genes de várias possíveis enzimas D-Xilonolactanasas foram identificadas recentemente (Johnsen and Schonheit 2004, Brouns et al., 2006, Stephens et al., 2007), mas as enzimas ainda não foram profundamente estudadas. O mecanismo de transporte, bem como a forma linear ou lactona do ácido xilônico (D-Xilonato) em linhagens de produção intracelular, ainda é desconhecida (Toivari et al., 2012).

1.6. SÍNTESE DE LIPÍDEOS EM LEVEDURAS

O acúmulo de lipídios em microrganismos oleaginosos começa a partir da exaustão de determinado nutriente no meio, geralmente nitrogênio, e um excesso de carbono, que passa então a ser assimilado e convertido em triacilgliceróis (TAG) pelas células.

Nas leveduras, o acúmulo de lipídeos é um processo conhecido como síntese “de novo”, em que uma série de reações de β -oxidação “quase invertida” levam a transformação de acetil-CoA, produzido por metabolismos intermediários, em ácidos graxos intracelulares, onde estes são esterificados com glicerol, produzindo lipídeos estruturais (fosfolipídeos e esfingolipídeos) ou de reserva (TAG) (Papanikolaou and Aggelis 2011).

Diversos tipos de carboidratos, além da glicose, vêm sendo utilizados como substrato para a biossíntese “de novo” de lipídeos em microrganismos oleaginosos. Dentre estes substratos vale destacar o crescente uso da xilose devido, principalmente, à sua abundância em materiais lignocelulósicos, e também às perspectivas quanto a utilização deste substrato como base para geração de biocombustíveis de 2º geração (Zhao et al., 2008, Fakas et al., 2009, Huang et al., 2009, Shuai and Pan 2010).

Fazendo uma análise estequiométrica da produção de acetil-CoA (unidade básica para síntese de lipídeos), verifica-se uma aproximação entre a utilização de glicose e xilose, sendo que a utilização de 100g (0,56 mols) de glicose como substrato gera aproximadamente 1,1 mols de acetil-CoA, enquanto a utilização de 100g (0,66 mols) de xilose, pela via das pentoses fosfato, gera cerca de 1,0 mol de acetil-CoA (Papanikolaou and Aggelis 2011).

A análise bioquímica da síntese “de novo” de lipídeos deve ser realizada a partir da investigação de dois processos distintos dentro do microrganismo oleaginoso. Primeiramente é necessário investigar o metabolismo intermediário capaz de produzir acetil-CoA, uma vez que estudos demonstraram que a capacidade das leveduras oleaginosas acumularem grandes reservas de lipídeos reside na sua capacidade de produzir grandes quantidades de acetil-CoA (Ratledge 2004). Assim, juntamente à elucidação destes metabolismos intermediários, segue-se a investigação da biossíntese de TAG.

A mudança de concentração intracelular de metabólitos, como o nitrogênio, aparece como o elemento chave do desencadeamento do processo de acúmulo de lipídeos em leveduras oleaginosas. Na maioria dos estudos, a depleção de nitrogênio do meio de cultura têm demonstrado excelentes resultados em relação ao aumento da quantidade de lipídeos acumulados, sendo estas rotas de acúmulo a partir da depleção de nitrogênio já completamente elucidadas (Papanikolaou and Aggelis 2011).

A exaustão de nitrogênio no meio de cultura e, conseqüentemente, dentro da célula causa uma diminuição na concentração de AMP (adenosina monofosfato), uma vez que esta molécula é clivada em IMP (inosina monofosfato), liberando um íon NH_4^+ que será utilizado como fonte de nitrogênio para síntese de materiais indispensáveis a célula. Segundo Papanikolaou and Aggelis (2011), a queda nas quantidades de AMP intracelular tem como conseqüência uma alteração funcional no ciclo de Krebs, uma vez que a molécula de AMP funciona como ativador alostérico da enzima NAD(P)⁺ isocitrato desidrogenase (ICDH), responsável pela conversão de isocitrato em α -cetoglutarato, um dos componentes do Ciclo de Krebs (Evans and Ratledge 1985, Wynn et al., 2001, Papanikolaou et al., 2004).

Sendo assim, o isocitrato se acumula nas mitocôndrias, sendo convertido em citrato pela enzima aconitato citrase (ACO1). O citrato acumulado nas mitocôndrias atinge um nível crítico, sendo então transportado para fora da mesma através de uma troca que permite a entrada de malato nas mitocôndrias (Evans et al., 1983). Finalmente, fora da mitocôndria, o citrato é clivado pela enzima ATP-citrato liase (ATP-CL) em acetil-CoA e oxaloacetato.

Segundo Boulton and Ratledge (1981), a enzima ATP-citrato liase (ATP-CL) é a enzima-chave no acúmulo de lipídeos em leveduras oleaginosas, uma vez que é responsável pela conversão do citrato presente no citoplasma em acetil-CoA. A possibilidade da molécula de acetil-CoA ser sintetizada a partir do piruvato citosólico pela ação da enzima piruvato desidrogenase (PDH1) foi descartada pelos autores após verificarem que esta enzima é essencialmente mitocondrial. O esquema das vias metabólicas descritas acima pode ser visualizado na Figura 3.

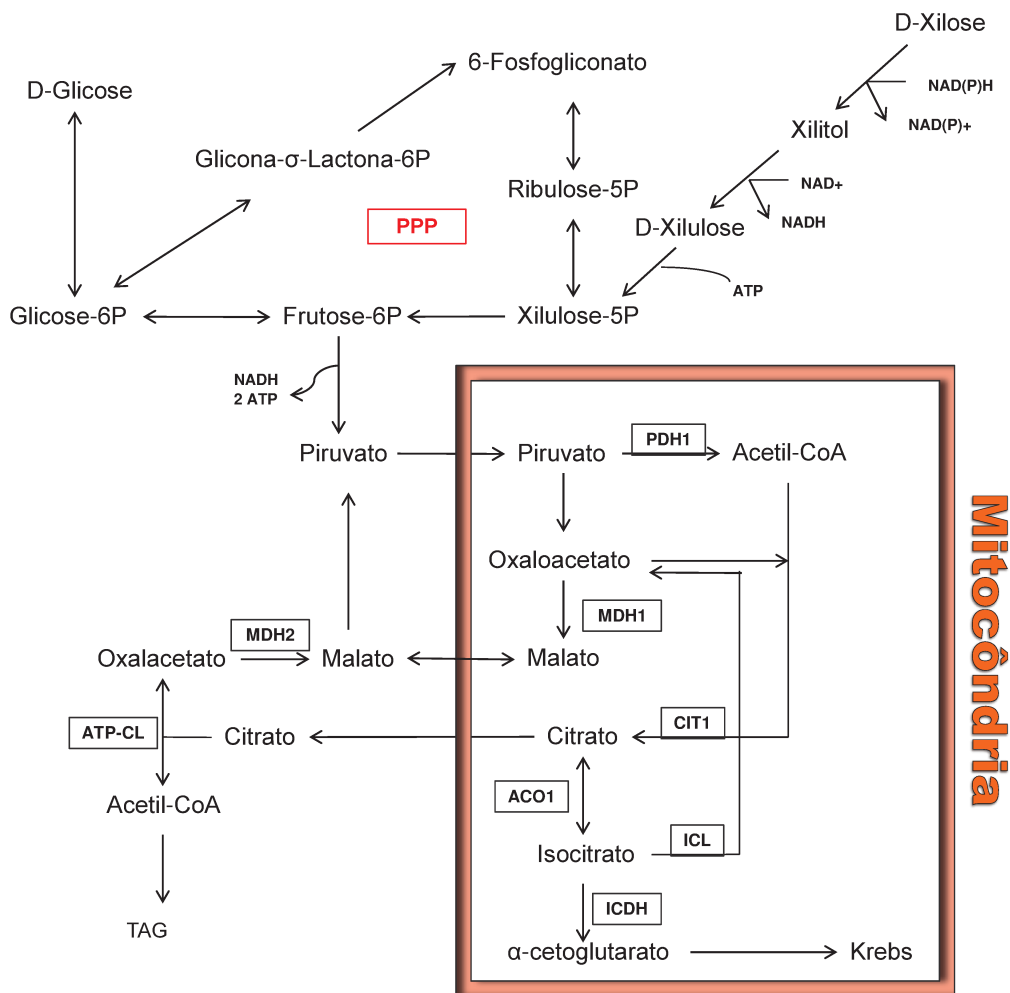


Figura 3: Representação do metabolismo intermediário para produção de Acetil-CoA, em meio pobre em nitrogênio, a partir de metabolismo de xilose, passando pela via das pentoses fosfato (PPP). Adaptado de (Papanikolaou and Aggelis (2011)).

Uma vez produzida, a molécula de acetil-CoA é utilizada para biossíntese de lipídeos intracelulares. A primeira reação é a conversão de acetil-CoA em malonil-CoA, em uma reação catalisada pela enzima acetil-CoA dependente de biotina (Ratledge and Wynn 2002). Esta enzima mostrou-se ativada pelo acúmulo de citrato em leveduras oleaginosas da espécie *Candida sp 107* (Gill et al., 1977).

A molécula de malonil-CoA sofre um ciclo de alongação, sendo convertida em acil-CoA, que é utilizado na síntese de diacilglicerol (DAG) e posteriormente triacilglicerol (TAG) pela via de α -acetilação do glicerol fosfato, como ilustrado abaixo

(Beopoulos et al., 2008). As reações de síntese de lipídeos podem ser visualizadas na Figura 4.

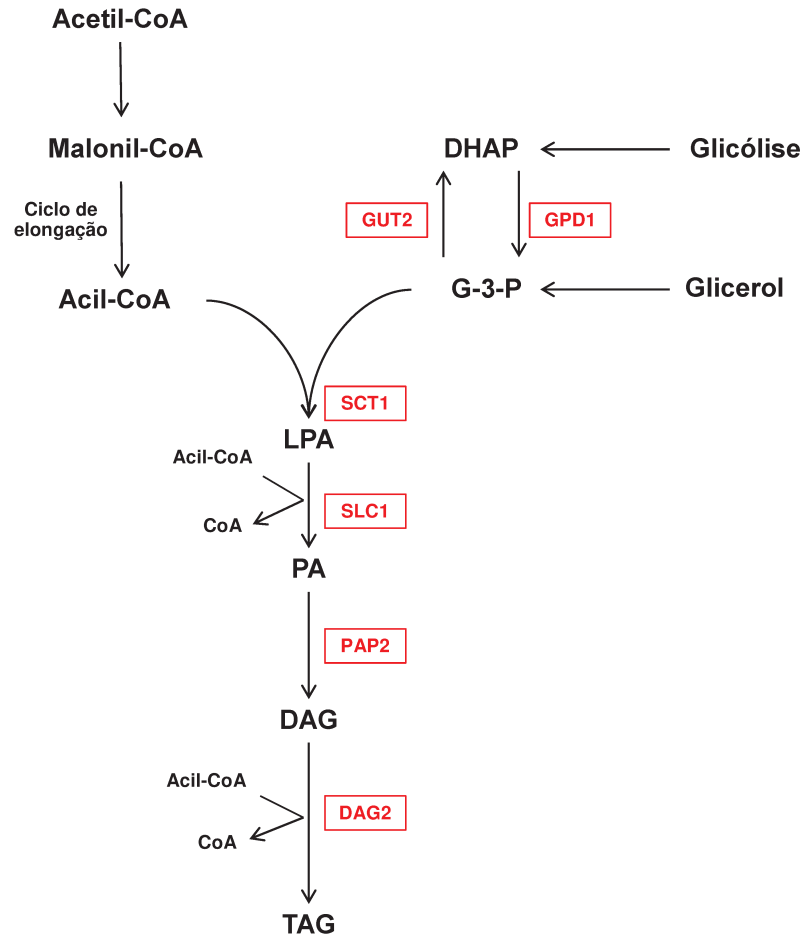


Figura 4: Síntese da molécula de TAG a partir da molécula de Acetil-CoA. A síntese de TAG necessita das moléculas de Acil-CoA e G-3-P (Glicerol-3-Fosfato), sendo esta molécula oriunda de moléculas de glicerol, através da ação de uma enzima glicerol kinase (GUT1), ou sintetizado diretamente pela molécula de DHAP (dihidroxicetona fosfato) através da enzima G3P desidrogenase (GPD1), essa reação é reversível e comandada por outra G3P desidrogenase (GUT2). Três moléculas de Acil são adicionadas a molécula de G-3-P até o processo final de síntese de TAG, através de 4 passos enzimáticos. Primeiramente uma molécula de Acil é adicionada a posição sn1 da estrutura da G-3-P, pela enzima G-3-P aciltransferase (SCT1), formando LPA (ácido lipofosfatídico). No segundo passo outra molécula de Acil é adicionada agora ao LPA, pela 1-Acil G3P Aciltransferase (SLC), gerando a molécula de ácido fosfatídico (PA), que é então fosforilado a molécula de diacilglicerol (DAG), pela PAP (PA fosfohidrolase). Finalmente na última etapa mais uma molécula de Acil é adicionada na posição sn3 da DAG, pela enzima DAG acil transferase (DGA2), gerando a molécula de Triacilglicerol (TAG). Adaptado de Beopoulos et al., (2008).

JUSTIFICATIVA

Diante da crescente busca por reduzir a dependência mundial dos combustíveis fósseis e seus derivados, diversos estudos apontam para a utilização de biocombustíveis renováveis, uma vez que constituem alternativas limpas e economicamente viáveis. Dentre estes biocombustíveis, podemos destacar a utilização de biomassa como substrato para a produção dos chamados combustíveis de segunda geração.

Entre as fontes de biomassa para uso em substituição parcial das fontes fósseis, as de origem vegetal sobressaem-se uma vez que são abundantes e permitem equilibrar o balanço da emissão de carbono. Porém, a utilização de partes nobres da biomassa vegetal para produção de biocombustíveis concorre com sua utilização por outros setores industriais, como a indústria alimentícia, causando problemas de ordem econômica e ética que inviabilizariam o processo.

Sendo assim, a utilização de resíduos vegetais, como bagaço e palha, tem se mostrado uma alternativa interessante ao uso de biomassa para produção de moléculas importantes para a indústria energética. Para conversão desta biomassa em moléculas de interesse, a utilização de microrganismos oleaginosos tem se mostrado uma estratégia promissora, uma vez que constitui um processo limpo, renovável e amplamente utilizado industrialmente.

Neste contexto, a engenharia genética é uma importante ferramenta para adequar estes microrganismos ao processo industrial e também aumentar sua produtividade e rentabilidade, seja através da inserção ou deleção de genes, ou pela elucidação de vias metabólicas. Entretanto, o emprego de microrganismos selvagens (i.e., não domesticados) limita o controle dos parâmetros que afetam o processo produtivo, uma vez que as bioconversões de interesse dependem de ajustes metabólicos desconhecidos, e a falta de conhecimento genético destes microrganismos dificulta a aplicação de técnicas de manipulação genética. Assim, dado o potencial uso da levedura *Lipomyces starkeyi* para uso na conversão de biomassa vegetal em lipídeos para a produção de biodiesel, este trabalho tem como objetivo principal a

utilização de técnicas de engenharia genética para sua domesticação, buscando obter uma levedura com uma marca seletiva auxotrófica capaz de facilitar sua manipulação laboratorial e, assim, melhorar o seu desempenho quanto ao acúmulo de lipídeos e metabolismo de xilose, além de obter também um conhecimento do funcionamento das vias de metabolismo de xilose e acúmulo de lipídeo através da análise transcriptômica dos principais genes ligados a estes processos na levedura *Lipomyces starkeyi*.

2. CAPÍTULO I: ENGENHARIA GENÉTICA E TRANSFORMAÇÃO DA LEVEDURA *LIPOMYCES STARKEYI*

2.1. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Os esforços para a engenharia genética da levedura de interesse ao presente projeto foram conduzidos visando sua domesticação. Para isto, montamos uma estratégia visando realizar a deleção do gene *URA3* (que codifica a enzima orotidine 5-P descarboxilase) presente no genoma da levedura, de forma a obter um mutante auxotrófico para a uracila. A auxotrofia neste caso pode ser definida como a incapacidade da levedura em produzir um composto necessário a sua sobrevivência, no caso o aminoácido uracila.

Para a deleção deste gene foi montado um cassete integrativo, ou seja, um DNA exógeno que contém uma sequência de nucleotídeos com similaridade ao gene alvo que se deseja modificar no genoma da levedura selvagem. O cassete integrativo é composto por 3 fragmentos: (1) a sequência do gene *KanR* (que codifica a enzima kanamicina nucleotidiltransferase) obtido a partir do plasmídeo comercial *pFA6aKanMX4*; (2) a região *upstream* do gene *ura3* e (3) a região *downstream* do gene *ura3*.

Estes últimos fragmentos foram obtidos do genoma da levedura *Lipomyces starkeyi*, pois são eles que carregam a similaridade às regiões do gene a ser deletado. Esta similaridade permite que o cassete seja integrado no local do gene-alvo, deletando-o do genoma por recombinação homóloga. Os fragmentos obtidos possuem uma longa região de similaridade (1000pb), pois além de garantir a especificidade, inclui regiões importantes como promotores e reguladores de expressão do gene.

A Figura 5 apresenta um esquema da montagem do cassete e respectivos primers utilizados.

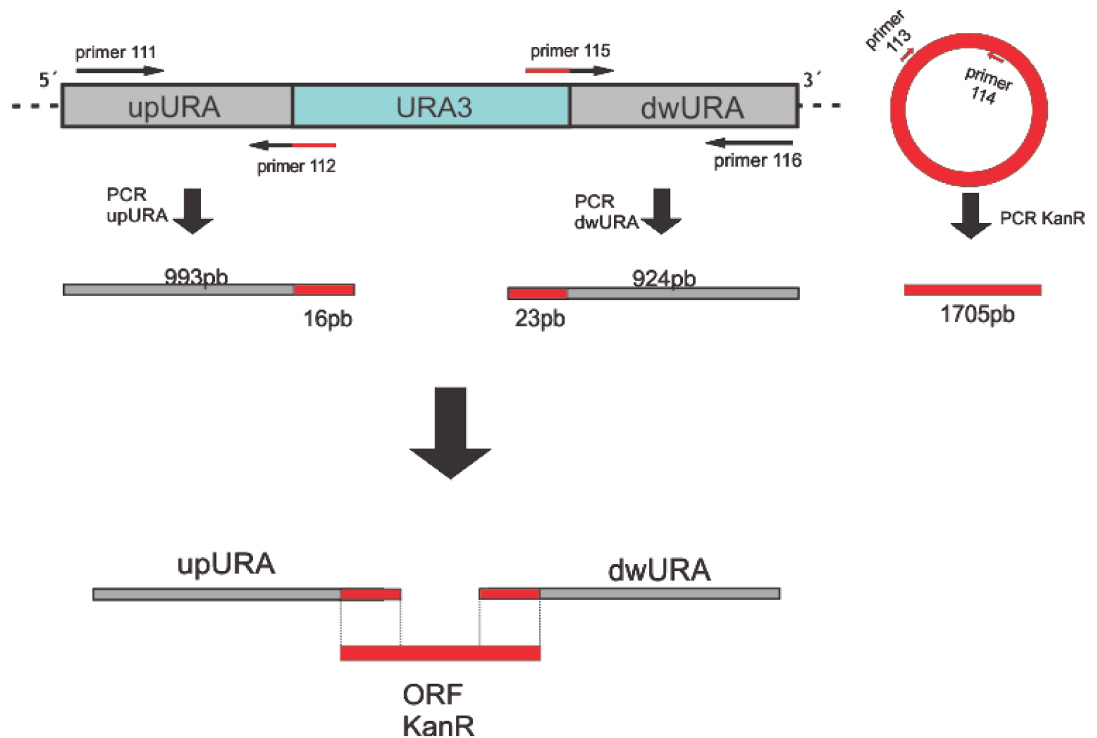


Figura 5: Esquema de amplificação dos fragmentos upURA (upstream) e dwURA (downstream), a partir do genoma de *L. starkeyi*, e do gene KanR, a partir do plasmídeo pFA6aKanMX4. É possível visualizar também a montagem do cassete integrativo (Δ ura3). Os primers 112 e 115 possuem uma região mais extensa que possui similaridade aos primers que amplificaram a Região ORF do gene KanR, o que facilita a posterior montagem do cassete.

Conforme ilustrado na Figura 5, os primers foram desenhados de maneira a terem uma região complementar entre eles, para permitir que os fragmentos upURA e dwURA possam anelar às extremidades do fragmento KanR. A complementaridade entre upURA e kanR é dada pelos primers 112 e 113, e entre dwURA e kanR pelos primers 114 e 115. Essa complementaridade permite que os próprios fragmentos sirvam como primers durante o início da reação de *Assembly PCR*.

A estratégia de substituição da região codificante do gene *ura3* pelo gene *kanR* nos permite ter uma seleção dupla dos possíveis transformantes: a primeira seleção se dá pela resistência dos mutantes Δ ura3 ao antibiótico geneticina (G418), a qual se deve à presença do gene de resistência KanR no cassete. Assim, sua integração no genoma da levedura confere resistência à geneticina.

A segunda seleção acontece pela própria deleção do gene URA3, conferindo-lhes uma marca auxotrófica para uracila. Neste caso, é possível selecionar os mutantes Δ ura3 através de crescimento em meio 5-FOA (5-Fluorouracil-4-ácido carboxílico). Este meio é um agente seletivo no qual os microrganismos “ura+” (que possuem o gene URA3 intacto) não são capazes de crescer, pois, a atividade da enzima orotidina 5-fosfato descarboxilase converte o 5-FOA no composto tóxico 5-fluororacil, causando a morte das células. Assim, apenas os transformantes “ura-“ serão capazes de crescer neste meio de cultura.

Porém, esta segunda forma de seleção contém um problema associado à manifestação do fenótipo: em organismos diplóides a mutação deve ocorrer simultaneamente em ambas as cópias do gene alvo, caso contrário a transformação não é detectada pelo fenótipo. Em certas leveduras, como *S. cerevisiae*, é possível contornar este problema realizando a transformação na fase haplóide, uma vez que essa fase é estável em meio de cultura apropriado. Porém, muitas leveduras não possuem fase haplóide estável, ocorrendo rápida fusão de esporos para formar o diplóide. Neste caso, torna-se mais difícil realizar as transformações genéticas, sendo normalmente necessária a construção de dois cassetes contendo marcas de seleção distintas, de forma a acompanhar a integração nas duas cópias do gene através da resistência a dois antibióticos, simultaneamente.

Outra estratégia de transformação a ser testada consistia na utilização de um plasmídeo contendo uma origem de replicação (2 μ m) e a região codante de um gene que confira uma marca de resistência a geneticina (KanR). Sendo assim a correta transformação da levedura com o plasmídeo modificado, tornaria a mesma resistente ao antibiótico geneticina, atuando assim como uma marca de seleção.

A estratégia de inserção de um plasmídeo contendo fragmento de origem de replicação em leveduras (2 μ m) foi sugerida pelo Prof. Dr. Juan Lucas Argueso, Duke University-EUA. Este fragmento confere uma capacidade replicativa ao plasmídeo no interior da levedura. Esta estratégia foi usada para testar alguns parâmetros, tais como a captação de DNA pela célula, expressão fenotípica e recombinação homóloga, que podem estar interferindo na transformação.

A possível transformação da levedura com o plasmídeo 2µm indicaria que o problema encontra-se na recombinação homóloga entre o cassete e o gene alvo.

O experimento foi conduzido primeiramente visando a montagem do plasmídeo YEp352, através da utilização de enzimas de restrição e posterior ligação dos fragmentos que constituirão o plasmídeo modificado. Em seguida esse plasmídeo foi utilizado para transformação de bactérias da linhagem DH10B de *E.coli*, tanto para confirmação da montagem como para facilitar os esforços de preparação de grandes quantidades de plasmídeo antes dos procedimentos de transformação. Obtida a confirmação da correta montagem do plasmídeo modificado YEp352, prosseguimos com a transformação da levedura oleaginosa *Lipomyces starkeyi*.

2.2. MATERIAL E MÉTODOS:

2.2.1. MATERIAL BIOLÓGICO

Linhagem de levedura oleaginosa *Lipomyces starkeyi* DSM70826 utilizada para a produção de lipídeos no projeto desenvolvido no convênio Shell-Unicamp. Foi usada para a aplicação das técnicas de domesticação e fermentação.

Linhagem Dh10b de bactéria *Escherichia coli* utilizada na clonagem e multiplicação dos plasmídeos. Genótipo: F⁻ mcrA Δ(*mrr-hsdRMS-mcrBC*) Φ80d/*lacZ*ΔM15 Δ*lacX74 endA1 recA1 deoR* Δ(*ara,leu*)7697 *araD139 galU galK nupG rpsL* λ⁻.

As cepas de leveduras encontravam-se preservadas em meio YPD sólido a 4°C. E as bactérias preservadas em glicerol 10% a -80°C.

2.2.2. MEIOS DE CULTURA

- YPD: Meio completo composto por extrato de levedura (3g/L), peptona (5,0g/L) e glicose (10g/L). Para a seleção dos transformantes integrativos o meio foi suplementado com antibióticos apropriados e geneticina (0,2mg/ml).

- YPD/Sorbitol: Meio YPD adicionado de sorbitol, utilizado como estabilizante osmótico. Obtido através da adição de sorbitol em meio YPD sólido, para uma concentração final de 1M.

- YPX: Meio completo composto por extrato de levedura (3g/L), peptona (5,0g/L) e glicose (10g/L).

- LB: Meio completo para crescimento de bactérias, composto por Triptona (10g/L), Extrato de levedura (5g/L), Cloreto de sódio (5g/L). Para seleção dos transformantes o meio foi suplementado com ampicilina (50ug/ml). Todos os meios foram colocados em frascos devidamente vedados e esterilizados em autoclave durante 20 minutos a pressão de 1 atm.

2.2.3. EXTRAÇÃO DE DNA DA LEVEDURA OLEAGINOSA

O experimento teve início a partir da extração do DNA genômico da cepa de levedura selvagem. Antes da extração foi feito o inóculo da linhagem selvagem da levedura a partir de matrizes preservadas em meio sólido e armazenadas a 4°C. O inóculo foi feito em 50 mL de meio YPD, em 2 frascos tipo erlenmeyer (volume de trabalho 250ml). Os frascos foram incubados em shaker orbital (Shel Lab, USA) a 200rpm e temperatura constante de 28°C. Leituras espectrofotométricas foram realizadas a fim de coletar as células na fase log de crescimento, após aproximadamente 48hr e uma $OD_{600} = 1,5$.

O protocolo de extração de DNA adotado baseou-se no protocolo descrito por Ausubel, 1992.

O DNA obtido foi quantificado em aparelho Nanodrop (Implen, Ger) e posteriormente submetido à eletroforese em gel de agarose 0,8% para confirmação da integridade do DNA genômico obtido, além de verificar a presença de interferentes, como RNA e proteínas.

2.2.4. CONSTRUÇÃO DO CASSETE INTEGRATIVO Δ URA3

Para a construção do cassete integrativo Δ ura3, foi necessário anteriormente amplificar as regiões *Upstream* e *downstream* do gene URA3 presente no genoma da levedura e também a ORF do gene KanR localizada no plasmídeo pFa6a-KanMX4.

A técnica utilizada para junção dos 3 fragmentos que darão origem ao cassete é a “*Assembly PCR*” (PCR de montagem), descrita por Stemmer et al. (1995), que consiste na sobreposição de fragmentos contendo extremidades complementares e extensão da fita dupla através da atividade da DNA polimerase. Por isso os fragmentos foram obtidos de maneira a haver pequenas regiões de complementaridade entre eles.

Para isto, foram sintetizados pares de primers contendo “caudas”, de forma a criar a região de complementariedade entre as sequências. Abaixo estão as sequências (as regiões coloridas indicam sequências complementares entre si):

111: *Upstream* sense: 5'-CACGCTATGATGCAGCAACT-3'
112: *Upstream* antisense: 5'-CAAGAACTGAGGTGAGTGATG-3'
113: KanR sense: 5'-CGTAACATCACTCGACCTCAGTTCTTGCGTTAGAACG
CGGCTACAAT-3'
114: KanR antisense: 5'-ACTCACTATAGGGAGAC-3'
115: *Downstream* sense: 5' CGGTCTCCCTATAGTGAGTCGTGGTAATTGATG
AGTGAAGGGCAG-3'

116: *Downstream* antisense: 5'-GCAGAGGTCGTTGTTTCATC-3'

As amplificações das regiões que compõem os fragmentos foram feitas através da técnica de *Touchdown* PCR, descrita por Don et al. (1991). A técnica consiste em uma redução da temperatura de anelamento (T_m) dos primers a cada ciclo da PCR, ou seja, a T_m começa acima do indicado para os primers em questão e vai sendo reduzida a cada ciclo, com um Δ fixo de variação, até atingir temperaturas abaixo da T_m específica do primer.

Partindo de temperaturas mais altas garantimos a amplificação das regiões de alta complementaridade, ou seja, aquelas de maior especificidade. Nos ciclos posteriores, com temperatura mais baixa, a diferença de representação dos moldes específicos garante a maior amplificação da região específica.

Após o término das reações, foi realizada eletroforese em gel de agarose 1%, para verificar a correta amplificação dos fragmentos.

Na análise eletroforética foi utilizado o marcador de peso molecular 1 Kb plus DNA Ladder (Invitrogen, USA) e o corante sem adição de Brometo de Etídio. A purificação seguiu o protocolo indicado pelo fabricante do kit Pure link PCR reaction clean-up/GFX PCR DNA gel band purification (Invitrogen, USA).

Após confirmação da correta amplificação dos fragmentos, as bandas específicas presentes no gel de agarose foram cortadas e purificadas utilizando o kit de purificação Illustra (GE Healthcare, USA). Prosseguimos para a montagem do cassete integrativo, utilizando apenas o produto purificado das bandas de interesse.

2.2.5. PCR DE MONTAGEM DO CASSETE

A técnica utilizada para junção dos 3 fragmentos que darão origem ao cassete é a "*Assembly PCR*" (PCR de montagem), descrita por Stemmer et al. (1995), que consiste na sobreposição de fragmentos contendo extremidades complementares e

extensão da fita dupla através da atividade da DNA polimerase. Por isso os fragmentos foram obtidos de maneira a haver pequenas regiões de complementaridade entre eles.

A reação é conduzida em 2 etapas. Na primeira etapa, a reação de PCR procede sem primers, de forma que os três fragmentos-molde (upURA/dwURA/KanR) servem como primers entre si, gerando um fragmento contíguo que servirá como molde na segunda etapa da reação. Nesta segunda etapa, são adicionados os primers das regiões mais externas ao cassete, gerando como produto diversas cópias do cassete já montado.

Após o término da reação, foi realizada eletroforese em gel de agarose 1%, para verificar a correta montagem dos fragmentos. Novamente, foi aplicado todo o volume da reação de forma a permitir que, uma vez confirmada sua correta montagem, o fragmento presente na altura esperada (em Kb) fosse purificado através do kit de purificação.

2.2.6. CLONAGEM DO CASSETE Δ URA3 EM BACTÉRIAS *E. COLI*

Com o cassete já montado, optamos por realizar a técnica de clonagem em bactérias *E.coli* linhagem DH10b, cedidas pelo Laboratório de Genômica e Expressão do Instituto de Biologia da Unicamp. A técnica de clonagem permite uma amplificação dos cassetes através da geração de bactérias transformadas com o mesmo e a possibilidade de se criar uma cultura permanente contendo o cassete alvo.

Para a transformação, foram utilizadas bactérias eletrocompetentes da espécie *Escherichia coli* linhagem DH10b, cedidas pelo Prof. Dr. Gonçalo A. G. Pereira, do Laboratório de Genômica e Expressão do Instituto de Biologia da Unicamp. As bactérias eletrocompetentes estavam armazenadas em ultrafreezer (-80°C).

A transformação de *E. coli* foi realizada através do método de eletroporação, seguindo o protocolo descrito abaixo (adaptado de Delorme, 1989).

Após a obtenção dos plasmídeos, estes foram submetidos à digestão enzimática a fim de confirmar sua correta extração. Foram realizadas 2 digestões. A primeira utilizou a enzima EcoRI (Invitrogen,USA), e sem a análise do sítio de corte das enzimas. A segunda digestão foi feita com as enzimas PstI (Fermentas FastDigest®) e NcoI (Fermentas FastDigest®), após análise do sítio de corte através do site NEBCutter (<http://tools.neb.com/NEBcutter2/>) .

Todas as digestões foram analisadas através de corrida em cuba de eletroforese, em gel de agarose 1%.

2.2.7. TRANSFORMAÇÃO DA LEVEDURA

Para a transformação da levedura de interesse foram realizadas três diferentes técnicas de transformação: Eletroporação, Transformação por Acetato de Lítio/PEG e Transformação de esferoplastos.

2.2.8. TRANSFORMAÇÃO POR ACETATO DE LÍTIO (LIAC)

O protocolo seguido inicialmente foi aquele descrito por Ausubel (1992), porém foram realizadas modificações para adaptá-lo à levedura de interesse, uma vez que tal protocolo foi padronizado para leveduras da espécie *Saccharomyces cerevisiae*. O protocolo detalhado está descrito no Anexo 1.

2.2.9. TRANSFORMAÇÃO POR ELETROPORAÇÃO

Assim como na transformação por acetato de lítio, a transformação por eletroporação seguiu a metodologia descrita por Ausubel (1992), conforme descrito no Anexo 2.

2.2.10. TRANSFORMAÇÃO DE ESFEROPLASTOS

O método de transformação de esferoplastos baseia-se na retirada da parede celular da levedura, obtendo o que chamamos de esferoplasto (ou protoplasto), ou seja, a célula desprovida de parede celular.

Estes esferoplastos foram obtidos tendo como base a metodologia descrita por Browne et al (1987), seguida de algumas modificações, conforme pode ser visualizado no Anexo 3.

Esta etapa foi realizada para verificarmos se era possível recuperar os protoplastos através de plaqueamento em placas YPD/Sorbitol, sem necessidade de utilização de meio apropriado (top agar), e também para verificar a possibilidade da maioria dos protoplastos ficarem suspensos no sobrenadante e não pelletarem.

Optamos por utilizar dois diferentes métodos para transformação da levedura. O primeiro consiste na própria transformação por esferoplastos descrita por Ausubel (1992), sendo o outro método a transformação por LiAc/PEG, porém desta vez realizada em esferoplastos e não em células integras, como descrito anteriormente. O protocolo utilizado está descrito no Anexo 4.

2.2.11. TRANSFORMAÇÃO DA LEVEDURA LIPOMYCES STARKEYI COM O PLASMÍDEO YEP352 CONTENDO O FRAGMENTO DE ORIGEM DE REPLICAÇÃO DE LEVEDURA (2 μ M)

2.2.12. CONSTRUÇÃO DO PLASMÍDEO YEP352 MODIFICADO

O plasmídeo modificado foi construído usando o plasmídeo YEp352, contendo o fragmento de origem de replicação 2 μ m, fornecido pelo Dr. Osmar Carvalho (LGE-IB/UNICAMP), e a sequência do gene KanR (kanR ORF) foi obtida por meio do plasmídeo pFA6a-kanMX6. Foram usadas as mesmas enzimas de restrição, EcoRV

(Fermentas,USA) e BamHI (Fermentas,USA), para cortar ambos os plasmídeos, criando dois fragmentos alvos de tamanho 4239pb (fragmento do plasmídeo YEp352 contendo o fragmento 2 μ m) e 1450pb (fragmento do plasmídeo pFa6a-KanMX6 contendo KanR ORF). O mapa genético dos plasmídeos, bem como os sítios de restrições para as enzimas podem ser visualizados na Figura 6.

Para verificar a correta digestão dos plasmídeos, estes foram submetidos a corrida eletroforética em gel de agarose 0,8%. Sendo em seguida purificados os fragmentos corretos através do kit de purificação Wizard® (Promega,USA). Os fragmentos então foram ligados usando a enzima T4 DNA ligase (Promega,USA).

Após a correta ligação dos fragmentos, dando origem ao plasmídeo YEp352 modificado, agora contendo não apenas a região de replicação 2 μ m, mas também a ORF do gene KanR, este foi utilizado na transformação de linhagens de bactérias DH10B *E.coli*.

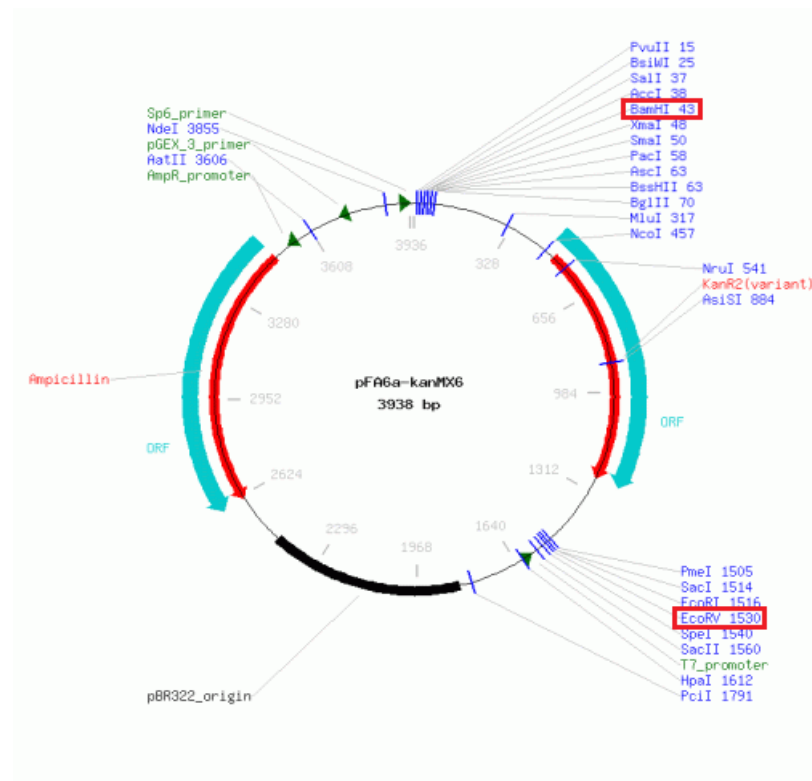
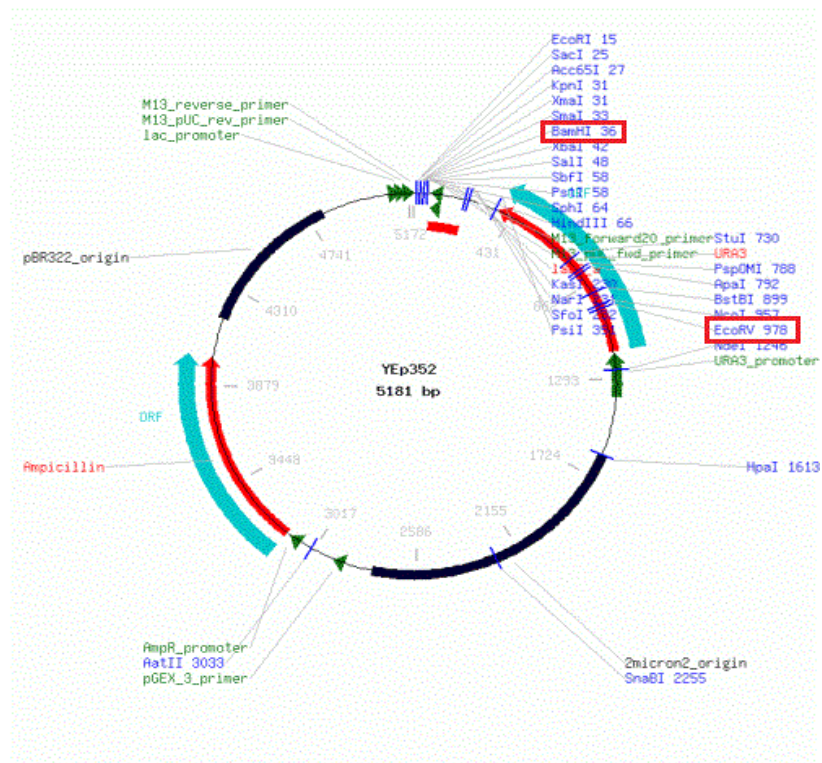


Figura 6: Mapa e sítos de restrição dos plasmídeos Yep352 e Pfa6a-KanMX6 utilizados na montagem do cassete modificado YEp352.

2.2.13. TRANSFORMAÇÃO DAS BACTÉRIAS COM O PLASMÍDEO YEP352 MODIFICADO E EXTRAÇÃO PLASMIDIAL (MINIPREP)

Para a etapa de transformação das bactérias com o plasmídeo modificado, foi utilizada a mesma metodologia descrita no capítulo anterior para transformações em bactérias (Ausubel,1992), sendo ao final os possíveis transformantes plaqueados em meio sólido LB/Ampicilina.

As colônias brancas que supostamente contêm a montagem correta do plasmídeo foram selecionadas e cultivadas em meio líquido LB/Ampicilina a 37°C e 200 rpm por um período de 16h, para que posteriormente fosse realizado a extração plasmidial. A metodologia de extração plasmidial realizada foi a mesma descrita no capítulo anterior (seção 1.2.6).

Estas extrações plasmidiais foram submetidas a reação de PCR e posterior corrida em gel de agarose, para confirmar a construção correta do plasmídeo YEp352 modificado. Na reação de PCR usamos os primers 113 e 114 utilizados anteriormente para se obter o fragmento KanR ORF na construção do cassete Δ ura3.

2.2.14. TRANSFORMAÇÃO DA LEVEDURA GENETICAMENTE MODIFICADA CEPA FGY DA ESPÉCIE SACCHAROMYCES CEREVISIAE

A transformação da levedura *Saccharomyces cerevisiae* cepa FGY, foi necessário para confirmar a correta montagem do plasmídeo, uma vez que está não foi confirmada pela transformação em Bactérias DH10B E.coli.

Portanto para confirmar a montagem correta do plasmídeo modificado YEp352, decidimos transformar a cepa FGY da espécie *Saccharomyces cerevisiae*, cortesia dos pesquisadores Osmar V.C Netto e Felipe Galzerani do laboratório LGE / UNICAMP. Esta estratégia serve à confirmação porque a transformação da cepa com o

plasmídeo YEp352 modificado confere a levedura a resistência ao antibiótico geneticina (G418), propiciado pela presença da ORF do gene KanR inserido no plasmídeo.

Para a transformação da cepa FGY foi utilizado o protocolo de transformação por Acetato de Lítio descrito por Ausubel 1992 e já descrito no capítulo anterior (seção I.2.8). Ao final da transformação as leveduras foram plaqueadas em meio sólido YPD + geneticina para seleção dos transformantes.

2.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO:

2.3.1. EXTRAÇÃO DE DNA DA LEVEDURA OLEAGINOSA

Ao final da extração foi realizada a quantificação de ácidos nucleicos na amostra perfazendo o total de 4,9 µg/µl. Além da quantificação, foi realizada também uma corrida em gel de agarose 0,8%, que confirmou a presença do DNA genômico através do aparecimento de uma banda acima da banda superior do marcador de peso molecular (12kb).

2.3.2. OBTENÇÃO DOS FRAGMENTOS DA REGIÃO UPSTREAM E DOWNSTREAM DO GENE URA3 E O GENE KANR DE RESISTÊNCIA A GENETICINA (G418)

Os resultados da PCR foram observados através de corrida em gel de agarose 1,0%, conforme apresentado pela Figura 6 (próxima seção). As amplificações ficaram dentro do resultado esperado, pois obtivemos as bandas específicas para cada um dos fragmentos upURA = 1009bp (poço 1); dwURA = 967bp (poço 2); KanR = 1689bp (poço 3).

2.3.3. PCR DE MONTAGEM DO CASSETE

Após confirmação da correta amplificação dos fragmentos, as bandas específicas presentes no gel de agarose foram cortadas e purificadas utilizando o kit de purificação Illustra (GE Healthcare, USA). Prosseguimos para a montagem do cassete integrativo, utilizando apenas o produto purificado das bandas de interesse.

A Figura 7 apresenta o resultado das amplificações dos fragmentos e também da montagem do cassete integrativo $\Delta ura3$.

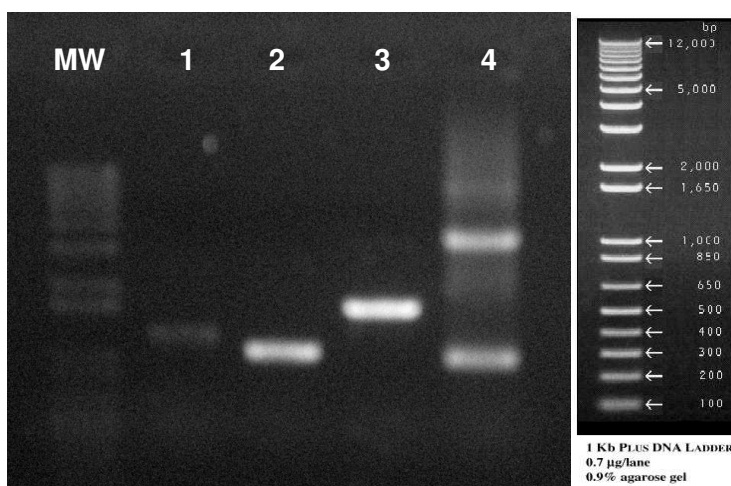


Figura 7: Eletroforese dos fragmentos (upURA, dwURA e KanR) e do cassete integrativo. MW: Marcador 1Kb plus DNA Ladder; Poço 1: Amplificação região downstream (1009bp); Poço 2: Amplificação da região upstream (967bp); Poço 3: Amplificação da ORF KanR (1689bp); Poço 4: Montagem do cassete integrativo (3599bp).

Conforme apresentado na Figura 2, obtivemos a correta montagem do cassete (tamanho esperado 3599bp). A figura mostra além da banda correspondente ao cassete (poço 4), as bandas correspondentes as amplificações da região *upstream* (poço 1), região *downstream* (poço 2) e KanR (poço 3).

2.3.4. CLONAGEM DO CASSETE $\Delta URA3$ EM BACTÉRIAS *E. COLI*

O cassete integrativo foi ligado ao plasmídeo comercial linearizado pGEM[®]-T, conforme descrito na seção materiais e métodos.

As bactérias foram transformadas por eletroporação e plaqueadas em meio seletivo. Após a seleção das colônias brancas, obtivemos 6 transformantes carregando o plasmídeo ligado ao cassete. Estas 6 colônias foram utilizadas para a recuperação dos plasmídeos através de minipreparação de DNA plasmidial.

Para esta digestão foram usadas as amostras 1 e 6 das minipreps e as enzimas NcoI e PstI, como já descrito anteriormente. A análise dos sítios de corte no site NEBCutter, gerou 5 possíveis padrões de banda.

Os produtos da digestão foram analisados através de eletroforese em gel de agarose 1%, como descrito na Figura 8, que também contém os padrões de banda gerados pelo site NEBCutter.

Através da comparação do padrão obtido a partir da eletroforese das amostras, com o padrão obtido através da análise no site, podemos inferir que houve a correta integração do cassete *Δura3* ao plasmídeo utilizado na transformação das bactérias identificadas como colônias 1 e 6.

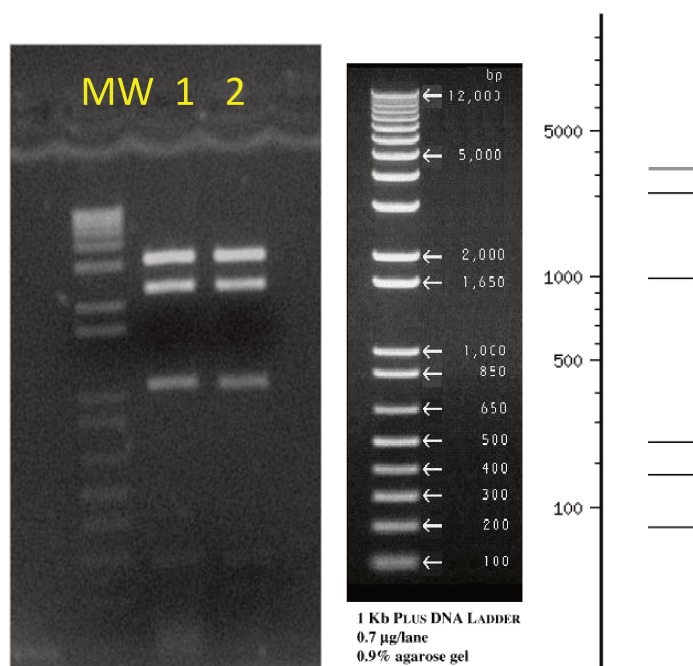


Figura 8: Análise do produto da digestão através de corrida em gel de agarose 1%. MW: Marcador molecular 1Kb Ladder plus; Poço 1: Digestão da amostra 1; Poço 2: Digestão da amostra 2. À direita é possível visualizar o padrão de bandas fornecidos pela análise dos sítios de restrição através de ferramentas do site NEBCutter (<http://tools.neb.com/NEBcutter2/>).

2.3.5. TRANSFORMAÇÃO DA LEVEDURA

Nenhuma das técnicas de transformação produziu transformantes *ura3⁻* de *Lipomyces starkeyi*.

Diversos parâmetros podem estar associados ao insucesso da transformação, principalmente mecanismos próprios da levedura que diminuem o processo de recombinação homóloga e inibem a entrada de DNA exógeno na célula de *L. starkeyi*, sendo necessário elucidar os mecanismos e genes que possam estar envolvidos em ambos os eventos. Além disso, a própria diversidade de espécies de leveduras faz com que este grupo apresente espécies muito distintas entre si,

morfologicamente, estruturalmente e metabolicamente, o que influencia diretamente em parâmetros-chave da metodologia de transformação.

A tabela 4 traz uma compilação das técnicas usadas e os resultados obtidos.

Tabela 4: Resultados das técnicas de transformação por Acetato de lítio (LiAc), Eletroporação e esferoplastos.

Técnica de transformação	Quantidade de DNA utilizado	Resultado	Dificuldades
Acetato de lítio (LiAc)	5ug; 10ug; 20ug	Não houve transformantes	Tempo de fase log; Quantidade de DNA; Temperatura do choque térmico.
Eletroporação	0,1ug; 0,5ug; 1,0ug; 1,5ug	Não houve transformantes	Quantidade de DNA; Pulso elétrico.
Esferoplasto + LiAc	10 ug	Não houve transformantes	
Esferoplastos	10 ug	Não houve transformantes	Sensibilidade á enzima/método utilizado.

2.3.6. TRANSFORMAÇÃO DA LEVEDURA *LIPOMYCES STARKEYI* COM O PLASMÍDEO YEp352 CONTENDO O FRAGMENTO DE ORIGEM DE REPLICAÇÃO DE LEVEDURA (2 μ M)

O objetivo desta nova estratégia foi a transformação de *L. starkeyi* utilizando o plasmídeo YEp352, que contém um fragmento correspondente à origem de replicação de levedura (2 μ m). Este plasmídeo foi modificado com o gene KanR que confere resistência ao antibiótico geneticina, criando uma marca seletiva para identificar o transformante correto.

O resultado da digestão, com destaque para os fragmentos que foram utilizados para criação do plasmídeo recombinante, podem ser visualizados na Figura 9.

Após a digestão, os dois fragmentos foram purificados utilizando o kit de purificação em gel *Wizard*® (Promega, EUA) e, subsequentemente, ligados, usando a enzima T4 DNA ligase (Promega, EUA), de acordo com o protocolo do fabricante, para se obter o plasmídeo YEp352 modificado por inserção do gene KanR (comprimento esperado: 5689bp).

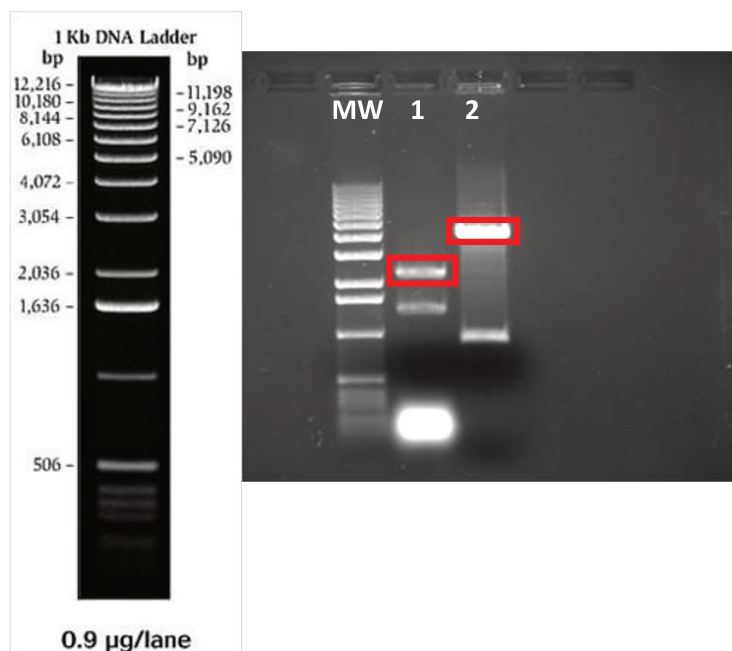


Figura 9: Resultado da digestão dos plasmídeos pFa6a-KanMX6 e Yep352. MW = Marcador molecular 1Kb DNA ladder; Poço 1 = Digestão do plasmídeo pFa6a-KanMX6 destacando o fragmento correto de 1450pb; Poço 2 = Digestão do plasmídeo Yep352 destacando o fragmento correto de 4239pb.

Após a ligação o plasmídeo modificado passou a conter os genes que proporcionaram resistência à ampicilina (presente no próprio plasmídeo YEp352) e geneticina (dada pelo fragmento do plasmídeo pFa6a-MX6), além do fragmento de origem de replicação em leveduras 2 µm .

O plasmídeo foi usado para transformar a linhagem DH10B de *E. coli*, a fim de facilitar os esforços de preparação de grandes quantidades de plasmídeo antes dos procedimentos de transformação. Os transformantes bacterianos foram selecionados por resistência à ampicilina (dado pelo plasmídeo), e a inserção correta do plasmídeo foi verificada por seleção de colônias brancas/azuis.

Foram selecionados 12 transformantes brancos, posteriormente inoculados em meio líquido LB/ampicilina e cultivados durante a noite (37 ° C, 200 rpm) para os procedimentos de recuperação de plasmídeo (miniprep).

Os resultados da extração plasmidial são mostrados na figura 10 a seguir.

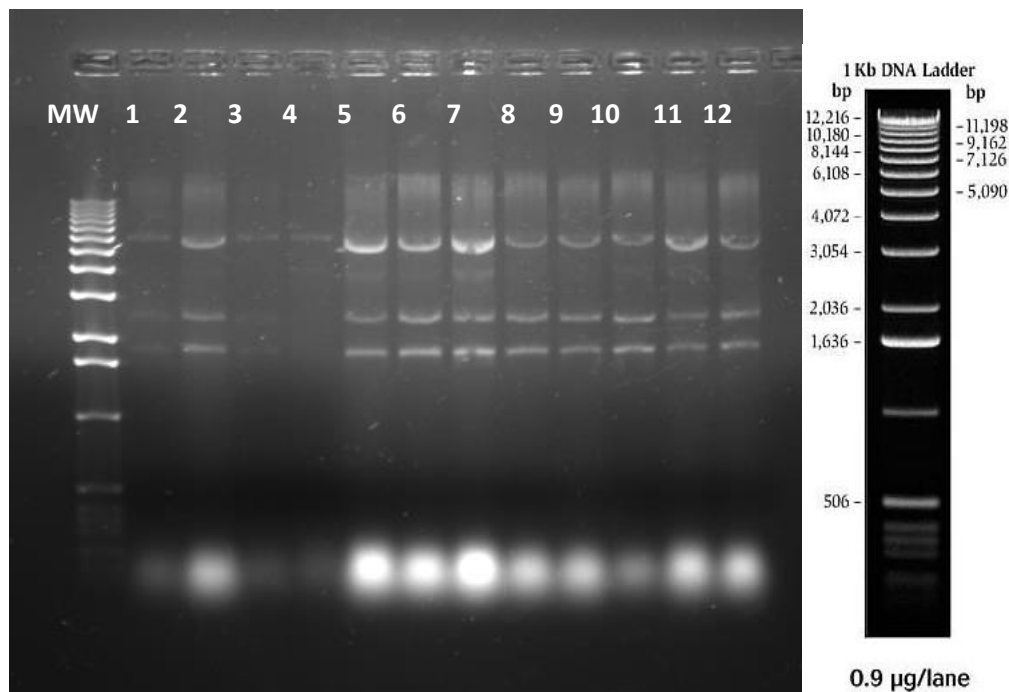


Figura 10: Resultado da extração plasmidial das bactérias contendo o plasmídeo modificado Yep352. MW = Marcador molecular (1kb DNA ladder); 1°-12°Poço = Extração plasmidial (miniprep).

Estas extrações plasmidiais foram submetidas a reação de PCR para confirmar a presença do gene *kanR*, utilizando o par de primers 113/114, os mesmos utilizados anteriormente para se obter o fragmento *KanR* ORF na construção do cassete Δ ura3.

No entanto, não foi possível confirmar a presença da correta montagem do plasmídeo YEp352 modificado por PCR. Este resultado negativo pode ter ocorrido pela perda do sítio de amplificação deste par de primers durante a digestão do cassete utilizando as enzimas de restrição.

Paralelamente, a análise do genoma de *L. starkeyi* realizado pelo Dr. Marcelo Carazzolle da Bioinformática (LGE-IB/UNICAMP) nos revelou a falta de plasmídeos naturais presentes na levedura *Lipomyces starkeyi*. Este resultado nos indicou que, ainda que conseguíssemos um plasmídeo modificado contendo os genes de seleção, seria bastante provável a baixa eficiência na transformação, uma vez que a levedura parece não possuir os mecanismos responsáveis pela replicação e expressão do DNA plasmidial.

Assim, dadas as dificuldades enfrentadas em sua transformação, interrompemos os esforços para construção do plasmídeo modificado YEp352.

Decorrido todo o período de mestrado, não houve menções na literatura de possíveis transformantes de *L. starkeyi*, cabe ressaltar que a única evidencia de tal fato remete a um trabalho publicado no “33rd Symposium on Biotechnology for fuels and chemicals”, realizado em maio de 2011, que apresentou dados da obtenção de uma levedura ura⁻ por seleção em meio 5-FOA e posterior restauração do fenótipo utilizando as técnicas de acetato de lítio e eletroporação (Calvey and Jeffries, 2011). Porém passados 3 anos estes dados mostrados no congresso não foram publicados e nenhum outro trabalho de engenharia genética de *L. starkeyi* foi apresentado. Estes fatos, somados as dificuldades encontradas por nosso grupo no processo de transformação genética da levedura, nos levam a crer que sua transformação é de fato um processo laborioso e que pode ser inviável ou apresentar baixíssima reprodutividade.

Tendo em vista estes fatos, partiu-se para uma abordagem a cerca do perfil transcriptômico da levedura, embasado em observações do genoma da levedura *L. starkeyi*, previamente sequenciado pela Dr. Ana Carolina Deckmann.

3. CAPÍTULO II: UTILIZAÇÃO DA TÉCNICA DE RT-PCR (REAL TIME-PCR) PARA ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE GENES DE INTERESSE, VISANDO COMPLEMENTAR AS INFORMAÇÕES OBTIDAS PELA ANÁLISE DO GENOMA DA LEVEDURA *LIPOMYCES STARKEYI*

3.1. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Essa parte do trabalho foi conduzida de forma a analisar genes de interesse e sua respectiva taxa de expressão gênica através da técnica de RT-PCR (*Real Time-PCR*). A técnica de PCR em tempo real permite a detecção, ciclo a ciclo, da fluorescência emitida pelo produto de amplificação da sequência de DNA-alvo, com elevada sensibilidade e especificidade, possibilitando a análise comparativa da expressão de genes de interesse nas amostras de estudo (Teste et al., 2009).

Foram realizados três cultivos em frascos agitados, um utilizando xilose como fonte de carbono, o segundo utilizando glicose e um terceiro simulando a concentração de carboidratos do hidrolisado hemicelulósico, com xilose e glicose (Xil:Gli) na proporção 70/30% respectivamente (Anschau et al., 2014). Em todos os casos, a fermentação teve uma duração total de 96 horas, sendo as amostras recolhidas a cada 24 horas, em triplicata, para análise de crescimento celular (OD600), acúmulo de lipídeos (Bligh-Dyer), consumo de nitrogênio amoniacal e açúcares (HPLC), bem como para obter amostras para extração de RNA. Desta forma esperou-se obter um perfil de expressão gênica ao longo das principais fases de crescimento e acúmulo de lipídeo pela *L. starkeyi* utilizando diferentes fontes de carbono e, assim, auxiliar na compreensão das vias metabólicas envolvidas na fermentação.

A figura 11 demonstra o esquema de fermentação proposto.

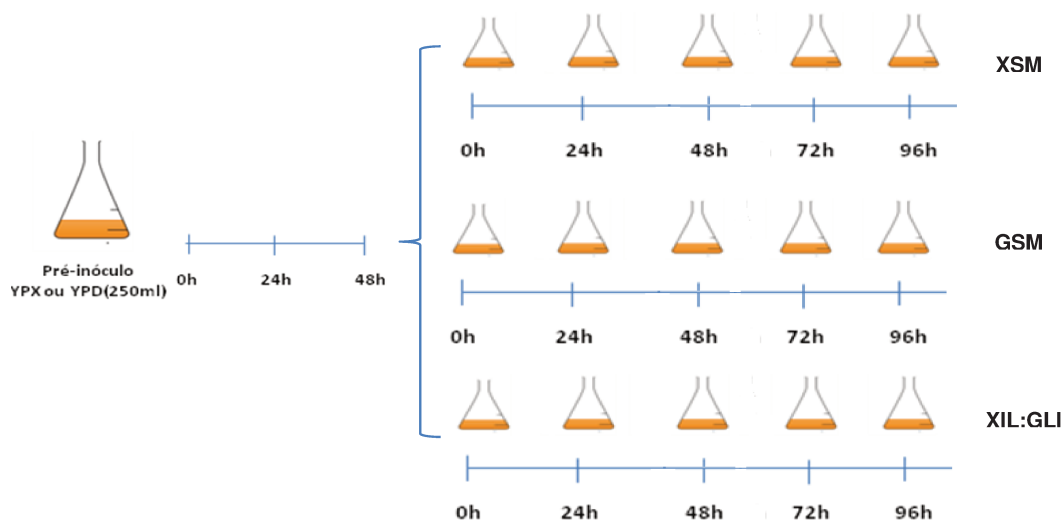


Figura 11: Esquema representativo do cultivo em frascos agitados durante 96 horas, tendo como fonte de carbono os açúcares xilose (XSM), glicose (GSM) e uma mistura de ambos (Xil:Gli).

Os genes escolhidos para análise foram selecionados com base nos estudos já detalhados na revisão bibliográfica deste trabalho, e também mediante análise do genoma de *L. starkeyi* realizados pela Dr. Ana Carolina Deckmann e a equipe de Bioinformática do Laboratório de Genômica e Proteômica (IB-Unicamp) liderado pelo Prof.Dr.Gonçalo Amarante Guimarães Pereira.

3.2. MATERIAIS E MÉTODOS

3.2.1. MATERIAL BIOLÓGICO

A linhagem de levedura oleaginosa *Lipomyces starkeyi* DSM70826 foi utilizada para a produção de lipídeos no projeto desenvolvido no convênio Shell-Unicamp.

3.2.2. MEIO DE CULTIVO E PREPARO DO INÓCULO

Para o pré-inóculo foram utilizados o meio YPD (extrato de levedura 3g/L, peptona 5g/L, glicose 10g/L), para posterior fermentação em Glicose, e o meio YPX (extrato de levedura 3g/L, peptona 5g/L, xilose 10g/L) para posterior fermentação em Xilose e na fermentação onde foi utilizada a mistura Xilose/Glicose (70/30%). Duas alçadas foram transferidas asépticamente aos meios contendo pré-inóculo e incubadas em shaker orbital (Shell Lab, USA) a 28°C e 250rpm até atingirem a OD = 0,4 numa diluição de 50x. A leitura óptica foi realizada em aparelho Multilabel plate Reader X4.

O meio de inóculo foi preparado contendo 30g/L de carboidrato, sendo Glicose para o meio GSM e Xilose para o meio XSM, e uma mistura de ambos numa proporção de 70% de Xilose para 30% de Glicose na fermentação que simulava a concentração de açúcares em hidrolisado hemicelulósico, além de 0,4 g/L de MgSO₄, 0,7g/L de NH₄SO₄, 3,5g/L de KH₂PO₄, 1,0g/L de Na₂HPO₄, 0,04g/L de CaCl₂, 0,08g/L de ZnSO₄, 0,001g/L de CuSO₄, 0,001g/L de CoCl₂, 0,001g/L de molibdato de amônio e 0,005 g/L de MnSO₄.

O cultivo foi feito com relação de C/N=50 e as soluções de açúcares foram esterilizadas separadamente dos demais reagentes para evitar reações de caramelização e Maillard dos carboidratos. Todos os reagentes utilizados foram de grau P.A, sendo o meio esterelizado em autoclave a 121°C durante 20 min.

3.2.3. CONDIÇÕES PARA FERMENTAÇÃO EM FRASCOS AGITADOS

Os cultivos de pré-inóculo foram realizados em frascos *erlenmeyer* de 500ml utilizando metade de sua capacidade total (250ml), e as cepas foram cultivadas durante aproximadamente 48h a 28°C e 200rpm de agitação até atingirem a OD desejada (0,4).

Em todos os ensaios foram utilizados frascos *erlenmeyer* de 250ml, os quais foram preenchidos com 100ml de líquido, contendo 90ml de meio de cultivo e 10 ml do pré-inóculo, sendo posteriormente colocados em agitador orbital a 28°C e 200rpm de agitação. Cabe salientar que os ensaios foram realizados em duplicata, ou seja, para

cada tempo de coleta (0h-96h) foram feitas duas amostras de 100ml cada. Isto foi necessário devido ao requerimento de grandes quantidades de amostra para a extração de RNA e para a determinação de lipídeos.

As amostras foram coletadas periodicamente, em intervalos de 24h, iniciando no tempo 0h até o tempo 96h. Para cada ponto, foi retirado de um dos *erlenmeyers* contendo 100ml de amostra: 70ml de amostra foram utilizados para posterior extração de RNA e 30ml para determinação da concentração de açúcares e nitrogênio; o segundo *erlenmeyer* referente a este ponto, que corresponde a duplicata, teve os 100ml utilizados em sua totalidade para a análise de acúmulo de lipídeos totais.

3.2.4. METODOLOGIA ANALÍTICA

3.2.4.1. BIOMASSA

Uma curva de crescimento de microrganismo foi construída relacionando leituras de diluição de biomassa e concentração por absorvância a 600nm numa faixa de 0.1 a 0.6 utilizando leitora de placas (Multilabel Plate Reader VICTOR X4). Uma curva padrão foi construída utilizando concentrações conhecidas de biomassa. Todas as leituras de absorvância foram realizadas em triplicata.

3.2.4.2. CARBOIDRATOS

O consumo de açúcar no meio de cultura foi analisado por cromatografia de íons em um sistema Metrohm (coluna: poliestireno/divinilbenzeno; eluente: NaOH 0,1mM/L; vazão: 1mL/min; temperatura do detector: 30°C). Durante a fermentação, a concentração de açúcar foi acompanhada pelo método colorimétrico de Somogy-Nelson (Nelson 1944, Somogyi 1945).

3.2.4.3. LIPÍDEOS

A extração de lipídeos foi baseada no método gravimétrico de Bligh & Dyer, (1959) modificado por Manirakiza e colaboradores (Manirakiza et al., 2001), que extrai os lipídios polares e não-polares da biomassa liofilizada utilizando a mistura de metanol e clorofórmio.

A extração foi realizada a partir de aproximadamente 300 mg de biomassa liofilizada, adicionada de 6 mL de uma solução metanol:clorofórmio (2:1 v/v). A suspensão foi homogeneizada em agitador vórtex por 2 minutos. A seguir, foram adicionados 2 mL de clorofórmio e agitado por 2 min. Para gerar um sistema de duas fases líquidas, 3,6 mL de água foram adicionados e o sistema foi agitado novamente por 2 min. As fases foram separadas por centrifugação por 10 min a 2000 rpm. A fase inferior foi transferida a um balão de 25 mL usando seringa ou pipeta Pasteur. Uma segunda extração foi realizada utilizando 4 mL de uma solução 10% (v/v) de metanol em clorofórmio em agitador vórtex por 2 min. Após centrifugação, a fase de clorofórmio foi adicionada ao primeiro extrato. O clorofórmio foi evaporado em rota-evaporador e a amostra então foi mantida em estufa a 60°C por 24h. O lipídeo obtido foi estimado gravimetricamente.

3.2.4.4. NITROGÊNIO

O consumo de nitrogênio durante a fermentação foi determinado pela reação de Berthelot, de acordo com o descrito por Srienc e colaboradores (Srienc et al., 1984). Neste método, 50µl de amostra previamente diluída em água deionizada foi misturada com 1 mL de solução A (10 g/L fenol, 10 mg/L nitroprussiato de sódio) e 1 mL de solução B (35.7 g/L Na₂HPO₄, 6 g/L NaOH e 10 mg/L NaOCl). Esta solução foi incubada por 30 min a 37°C, e a absorbância lida a 630nm lida na leitora de placas (Multilabel Plate Reader VICTOR X4). A curva padrão foi preparada utilizando soluções com diferentes concentrações de sulfato de amônio (0-20 mg/L).

3.2.5. BIOMASSA PARA EXTRAÇÃO DE RNA

Para extração de RNA, a biomassa foi coletada mediante centrifugação a 4000rpm e 25°C por 5 min. Em seguida o sobrenadante foi retirado e a biomassa congelada imediatamente em nitrogênio líquido e posteriormente acondicionada em biofreezer a -80°C até o momento da extração.

3.2.6. EXTRAÇÃO DE RNA COM FENOL ÁCIDO E REAÇÃO DE CDNA

A separação de ácidos nucleicos por fenóis é pH dependente, ou seja em pH > 7,0, a fase aquosa possui DNA em solução, enquanto em pH < 7,0 o RNA fica preferencialmente na fase aquosa. Por isso a utilização de fenol ácido para extração de RNA.

Para tanto o fenol é tratado com Acetato de sódio até pH = 4,5, na proporção de 65 µl de acetato de sódio para cada 1ml de fenol saturado com água

O protocolo de extração de RNA utilizado está descrito no Anexo 5, detalhadamente.

Para elucidação da correta extração das amostras de RNA, as mesmas foram submetidas à quantificação em aparelho Nanodrop (*Thermo scientific, USA*) e corrida eletroforética em gel de agarose.

Para a eletroforese, foi necessária a preparação de gel, mix de reação e tampão de corrida específicos para eletroforese de RNA. Estas soluções, bem como a solução de TES utilizada na extração são descritas a seguir.

Solução TES (25ml)	
Tris-Cl 1M -----	250µl
EDTA 0,5M -----	500 µl
SDS 10% -----	1,25ml
H ₂ O -----	23ml

MOPS (10x)	
MOPS -----	41,86 g
Acetato de sódio -----	6,8 g
0,1 M EDTA, pH 8,0 -----	100 mL
ddH ₂ O -----	1L
DEPC-----	1 mL

Gel para RNA (50ml)	
Agarose ultrapura -----	0,6g
H ₂ O DEPC -----	41,5ml
MOPS 10X -----	5 ml
Formaldeído -----	3,5ml

Tampão para Reação (1 reação)	
10X estoque de MOPS -----	3,0µl
Formaldeído -----	5,0µl
RNA -----	2,5µl
Formamida -----	12,5µl
Brometo + LB -----	2,5µl

Após a extração do RNA, as amostras passaram por um tratamento com enzima DNase afim de eliminar as moléculas de RNA que invariavelmente podem ter sido extraídas junto ao RNA, e que devem ser eliminadas para que não prejudiquem a reação de PCR. Para tal, foi utilizado o kit RQ1 RNase- Free DNase (Promega, USA) assim como o protocolo fornecido pelo fabricante.

Em seguida, procedeu-se a síntese do cDNA. Para tanto, o RNA foi quantificado e diluído até que todas as amostras atingissem a concentração de 1,0 µg/µl.

Após a reação com a enzima DNase, são adicionados a amostra 0,5 ul de Random primer hexamer (Invitrogen, USA) e 0,5 ul de água RNase free (Invitrogen, USA), sendo a amostra colocada a 70°C durante 10 minutos e em seguida resfriada em gelo durante mais 10 minutos, para que então se proceda a reação de obtenção do cDNA.

Para cada amostra de RNA, partindo de 1ug/ul, são utilizados os seguintes reagentes para a reação de cDNA:

Reação de cDNA	
5x First strand buffer -----	5 ul
H ₂ O DEPC -----	1,55 ul
RNAse OUT -----	0,5 ul
DTT -----	2,5 ul
Transcriptase reversa SSII -----	0,2ul
DNTP -----	1,25ul

A reação é conduzida em termociclador, onde as amostras são submetidas a 3 diferentes temperaturas, iniciando com 25°C durante 10', depois 50' á 42°C e por fim 70°C durante 15'. Ao final da reação as amostras foram acondicionadas em biofreezer (-80°C) para posterior utilização na reação de Real-Time PCR.

3.2.7. REAÇÃO DE REAL-TIME PCR

Visando minimizar os erros causados durante o manuseio e pipetagem das amostras e reagentes, a correta montagem das reações foi realizada de forma automatizada pelo equipamento MICROLAB® STAR Liquid Handling Workstations (Hamilton, USA). Para tanto, foram utilizados 2 tubos plástico de 1,5 ml, um deles contendo água DEPC e outro contendo a mistura de SYBR green e os primers referentes ao gene que seria analisado, na proporção de 6 ul de SYBR e 2 ul de primers para cada reação a ser analisada. O robô automaticamente retira 8ul da

solução SYBR + primers do tubo e transfere para um dos 96 poços presentes na placa, o qual já possuía 4 ul de cDNA pipetado manualmente. O equipamento também foi responsável por fazer automaticamente as diluições da curva de eficiência dos primers, utilizando para tal volumes seriados de água DEPC adicionada aos poços da placa que já continham o cDNA, perfazendo inicialmente uma diluição de 2x.

Para cada gene analisado foram geradas duas placas de 96 poços para análise. A primeira placa continha as amostras necessárias para a análise do gene nas condições de fermentação em Xilose e na mistura Xilose/Glicose, todas em triplicata, enquanto a segunda placa continha a condição de fermentação em glicose, juntamente com a curva de eficiência do primer a ser testado para o gene proposto. A reação procedeu-se em termociclador StepOnePlus™ Real-Time PCR (Applied Biosystem®, USA).

A análise dos dados obtidos, bem como as análises estatísticas, foram feitas utilizando o software REST ®: Relative Expression Software Tool (Pfaffl et al., 2001), sendo que as análises estatísticas foram realizadas com um intervalo de confiança $p < 0,1$ ao invés de $p < 0,05$, uma vez que o pequeno número de amostras ($n=3$) poderia induzir um erro maior, levando a excluir dados que poderiam ser significativamente estatísticos. A análise estatística foi conduzida para demonstrar se a expressão diferencial dos genes em relação ao controle observado é estatisticamente significativa e poderia ser utilizada para fins de comparação.

3.2.8. ESCOLHA DOS GENES CANDIDATOS E DESENHO DOS PRIMERS PARA RT-PCR

Os genes candidatos foram selecionados de acordo com sua função em rotas metabólicas consideradas essenciais tanto para o acúmulo de lipídeos quanto para o metabolismo de xilose em leveduras, segundo estudos presentes na literatura (Boulton and Ratledge 1981, Ratledge 1988, Kruger and von Schaewen 2003, Jeffries et al., 2007, Stephens et al., 2007, Beopoulos et al., 2008, Liu et al., 2011, Morin et al., 2011, Papanikolaou and Aggelis 2011, Toivari et al., 2012).

Uma vez selecionado os genes, o próximo passo foi pesquisar a sequência de nucleotídeos destes genes em banco de dados de leveduras. Para isto foram utilizados os bancos de dados *Saccharomyces Database Genome* (<http://www.yeastgenome.org>) e *National Center for Biotechnology Information* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Em posse das sequências, estas foram utilizadas para busca de sequências similares no genoma de *L. starkeyi*, presente no endereço eletrônico (<http://bioinfo03.ibi.unicamp.br/microbianoil/>), através da ferramenta de bioinformática BLAST® (*Basic Local Alignment Tool*). Com o auxílio desta ferramenta foram identificados os genes candidatos no genoma de *L. starkeyi*. Para o desenho dos primers foi utilizada a ferramenta específica Primer3® presente no site <http://primer3.wi.mit.edu/>.

As Tabelas 5 e 6 apresentam os genes, suas funções e os primers desenhados para utilização na técnica de RT-PCR. A Tabela 5 exibe os genes que possuem importante função no metabolismo intermediário da síntese de lipídeos, ou seja, aqueles genes ligados a produção de acetil-CoA, molécula primordial na geração de lipídeos, além de genes que participam de metabolismos intermediários, como a glicólise, gliconeogênese e metabolismo de aminoácidos. A Tabela 6 exibe genes envolvidos na via comum de metabolismo de xilose em leveduras, o que inclui a via das pentoses fosfato e genes da via alternativa de metabolismo de xilose.

Tabela 5: Desenho dos primers de genes ligados à síntese de lipídeos em leveduras.

Gene	Primers	Função
CIT1(citrato sintase)	5' TTGAGAAAGGCTAAGGGTTC 3' 5' CCAGACAAGGCCCTTAATAC 3'	Metabolismo intermediário para síntese de lipídeos (Síntese de citrato)
ACO1 (aconitase)	5' TACTTCGGTGAGGGTGTAGA 3' 5' AGGGAAGGTAGAGGTAGTGG 3'	Metabolismo intermediário para síntese de lipídeos (iso-citrato → citrato)
ICL (isocitrate liase)	5' GTGGATGGAGAGCAAGTATC 3' 5' AAGTTATACGCAAGCCATTG 3'	Metabolismo intermediário para síntese de lipídeos (iso-citrato → glioxalato + succinato)

ATP-CL (ATP-citrato liase)	5' CTACCGAGACGCAAACCTTAC 3' 5' AATGAACAGGACCTTACCAC 3'	Metabolismo intermediário para síntese de lipídeos (citrato → Acetil-CoA)
MDH1(mitocondrial malato desidrogenase)	5' GAGTTCTTCTCATCGCAGG 3' 5' GATGAGCTTCTCCTCGTACTC 3'	Metabolismo intermediário para síntese de lipídeos (oxaloacetato → malato)
PGK1(Fosfoglicerato quinase)	5' CACTTTCAAAAAGACCTTGG 3' 5' TGGCCTTTTCTATGACCTC 3'	Participa da glicólise e gliconeogênese
DGA2 (DAG aciltransferase)	5' CCCACTCATACAAGTAACCG 3' 5' ACCGATGAAGAAGCTAAACC 3'	Formação do TAG (DAG → TAG)

Tabela 6: Desenho dos primers de genes ligados ao metabolismo de xilose em leveduras.

Gene	Primers	Função
XYL2(Xilitol desidrogenase)	5' GTGTCCTCAAGCAGTTTAG 3' 5' GCTGGAAACCAATTCGAC 3'	Metabolismo de Xilose em leveduras(Xilitol → D-Xilulose)
XYL1(Xilose redutase)	5' GGATCTTTCATCACGTCC 3' 5' AAGTAGTCGAGACCCAGTC 3'	Metabolismo de Xilose em leveduras(D-Xilose → Xilitol)
NADP:D-xilose desidrogenase	5' TAATGCCTACGGTTCCTATG 3' 5' ATTCTGGTAGTGGTGCAG 3'	Rota alternativa de metabolismo de Xilose. Catalisa a reação: D-xilose + NADP(+) = D-xilono-1,5-lactona + H(+) + NADPH.
NADP:D-xilose desidrogenase	5' ACCGGACAATTATGGTGAC 3' 5' AATAGCTAAACGGACATTGC 3'	Metabolismo de Xilose em leveduras
NADP:D-xilose desidrogenase	5' CAGTTATCACAATGGTGTGG 3' 5' TCACCTTGTACTTTATCGC 3'	Metabolismo de Xilose em leveduras.
NADP:D-xilose desidrogenase	5' TGGTGCATTGTTAGATGTTG 3' 5' AATTGATAACAGATGGACGG 3'	Metabolismo de Xilose em leveduras
D-Xilonolactanase	5' GTGTGAAGACGGTTTACGAC 3' 5' GACTGTCTTTGTTGGCGAG 3'	Rota alternativa de metabolismo de Xilose (D-Xilonolactona → D-Xilonate)

D-xilonato desidratase	5' AAATCTCTCGGTATGGACG 3' 5' GTGCTCCTCAAGCAGTTTAG 3'	Rota alternativa de metabolismo de Xilose (D-Xilonate → 2-Desidro-3-Desoxi-D-Xilonato)
ZWF1 (Glicose-6-fosfato desidrogenase)	5' CACTCCATTCTGCACTACC 3' 5' GAAAGTCATCAAGGAAAGCC 3'	Via da pentose fosfato (Glicose-6P + NADP ⁺ → Glicona-σ-Lactona-6P + NADPH)
GND1 (6-fosfogliconato desidrogenase)	5' AAGGGTGACAAGAAGGAAC 3' 5' CTCTGATCAACATGAAACCC 3'	Via da pentose fosfato (6-Fosfogliconato + NADP ⁺ → Ribulose-5P + NADPH)
PGI1(Gliconolactanase)	5' TAGTGATGGCATCTTGATTG 3' 5' CATTGAGCAGCAAAAGTACAC 3'	Via da pentose fosfato (Glicona-σ-Lactona-6P → 6-Fosfogliconato)
HXK1 (Hexoquinase)	5' ATTACAGTTACGCCCTAATC 3' 5' GAAGATGACACCCATCTGAG 3'	Primeiro passo da glicólise, catalizando a fosforilação da glicose.

Foram testados 3 genes para a condição de genes de referência ou housekeeping, que são considerados genes normalizadores de expressão, ou seja, genes que nas condições propostas não possuem variação no nível de expressão. Para tanto foram escolhidos os genes ACT1 (gene ligado a produção de actina na célula), UBC6 (gene ligado à produção da proteína ubiquitina ligase) e RPS26A (gene ligado à formação de proteína ribossomal).

Estes 3 genes foram escolhidos devido a sua ampla utilização como genes normalizadores em experimentos envolvendo a técnica de Real-time PCR (Tang et al., 2009, Teste et al., 2009). A tabela 7 representa os genes normalizadores, sua função e os primers desenhados.

Tabela 7: Genes escolhidos para teste de normalização.

Gene	Primers	Função
RPS26A - Ribosomal Protein of the Small subunit	5' ACAAGAGCATAAAGCGATTG 3' 5' TTAGGAAGAGCGTACTCAGAG 3'	Proteína componente da porção menor da subunidade ribossomal (40S)
UBC6 - Ubiquitin-Conjugating	5' ACTCGACTGTGTCTTTCAATC 3' 5' GACGTCATGAACTTAACAGG 3'	Enzima utilizada na ancoragem da ubiquitina a outras proteínas (degradação).
ACT1	5' TGAGAAGATGACCCAGATTG 3' 5' CGACCAGAGGCATAGAGAG 3'	Gene responsável pela produção de actina que é um elemento crítico do citoesqueleto celular.

3.3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.3.1. CULTIVO EM GLICOSE

O ensaio de fermentação em glicose foi realizado segundo o esquema demonstrado anteriormente, assim como as análises de quantificação de biomassa, lipídeos e concentração de açúcares e nitrogênio. O acúmulo de lipídeos foi mensurado a partir das 48h, pois utilizando a metodologia Bligh-Dyer para quantificação de lipídeos, é necessária uma quantidade mínima de 200mg de biomassa, não atingida nos tempos anteriores.

A Figura 12 apresenta os resultados das análises.

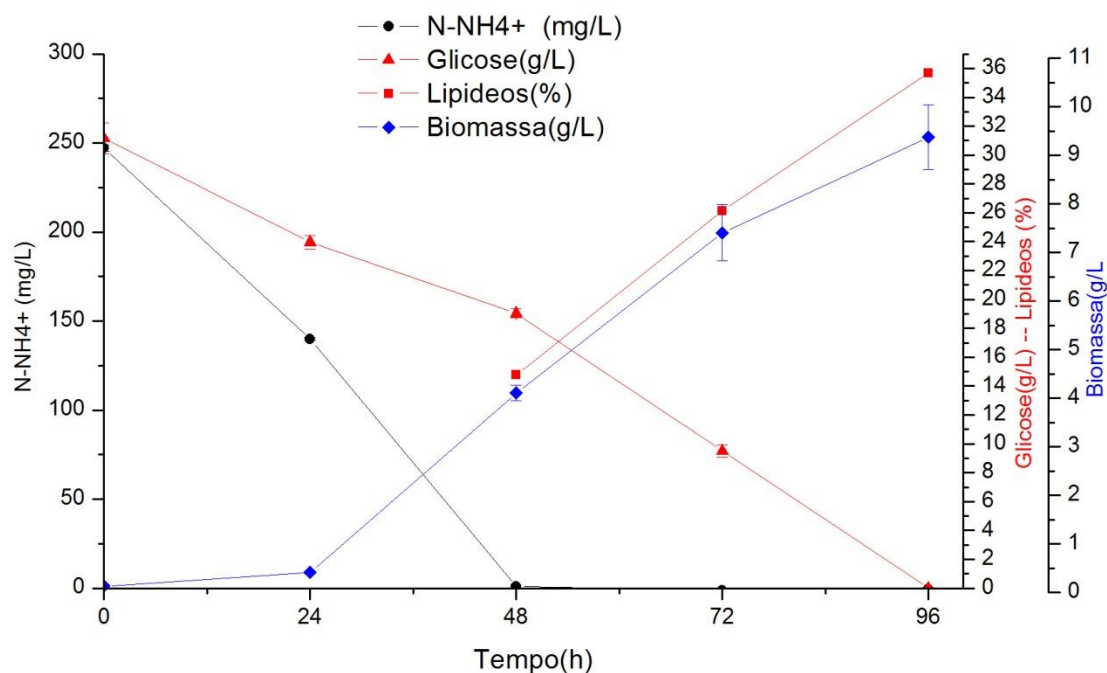


Figura 12: Parâmetros de concentração de biomassa e lipídeos, além de consumo de nutrientes (glicose e nitrogênio) para fermentação em glicose.

Com relação a concentração final de biomassa e lipídeos, observaram-se os valores de 10,860 g/L e 3,88 g/L, respectivamente, sendo que a concentração de lipídeos corresponde a um percentual em massa de 35,69% em relação ao peso seco de biomassa. Os rendimentos $Y_{x/s}$ (calculado a partir da biomassa residual, com desconto dos lipídeos produzidos) e $Y_{l/s}$ calculados foram de 0,2255 e 0,1250 respectivamente. Também é possível observar uma ligeira inflexão na curva de produção de biomassa após as 48h, provavelmente devido à falta de nitrogênio, nutriente essencial à proliferação celular. Os dados podem ser observados na tabela 8 á seguir.

Tabela 8: Resultados do cultivo em meio contendo glicose como fonte de carbono.

Biomassa final (g/L)	Y (x/s)	Lípido final (g/L)	Y (l/s)	Produtividade (g/L.h)	Lípideos(%)
10,860	0,2255	3,88	0,1250	0,040	35,69

x = biomassa(g); s = substrato(g); l = lípido (g)

Com relação à extração de RNA, esta foi realizada de acordo com a técnica de extração Fenol-Ácido e submetida à corrida eletroforética em gel de agarose. A Figura 13 apresenta este resultado.

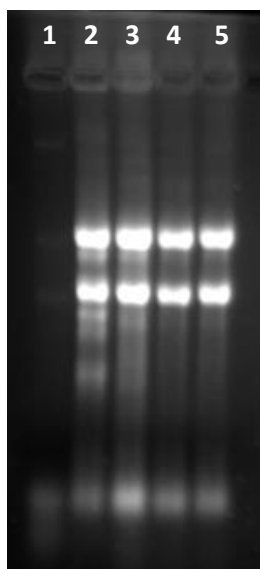


Figura 13: Poço 1 - 5 = Extração de RNA 0, 24, 48, 72 e 96 horas respectivamente.

As duas bandas observadas são típicas do padrão de corrida de RNAs, e correspondem aos RNAs ribossomais 28S e 18S, o que confirma a correta extração do RNA. As bandas correspondentes ao ponto 0h aparecem fracas, pois, como a fermentação estava em fase inicial, havia muito pouca biomassa para a extração.

Vale destacar que o programa utilizado para coletar a imagem também faz uma autocorreção de luz, saturando as bandas mais fortes e isto normalmente prejudica a visualização de bandas mais fracas.

As amostras de RNA foram quantificadas em aparelho Nanodrop, obtendo-se as concentrações de 291 ng/μl, 3,4 μg/μl, 6,6 μg/μl, 4,2 g/μl e 3,9 μg/μl, que correspondem aos tempos de 0, 24, 48, 72 e 96 horas, respectivamente.

3.3.2. CULTIVO EM XILOSE

O ensaio fermentativo em xilose foi realizado e os resultados das análises de quantificação de lipídeos, biomassa, consumo de nitrogênio amoniacal e açucares podem ser visualizados na Figura 14.

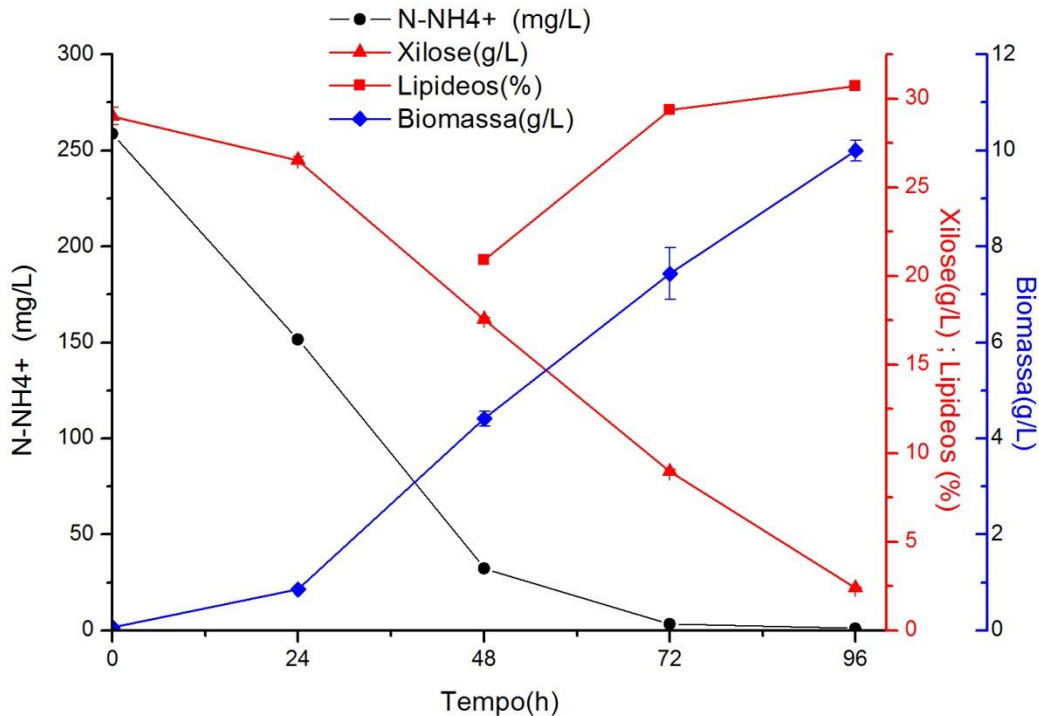


Figura 14: Parâmetros de concentração de biomassa e lipídeos, além de consumo de nutrientes (Xilose e nitrogênio) para fermentação em Xilose .

Assim como na fermentação em glicose, o acúmulo de lipídeo só pôde ser mensurado a partir das 48h, pelos mesmos motivos expostos anteriormente. Observou-

se uma concentração final de biomassa de 10,590 g/L o que correspondeu a um rendimento de $Y_{x/s}=0,2757$, que comparados aos valores da fermentação em glicose mostram um aumento da concentração de biomassa.

Com relação ao acúmulo final de lipídeos observou-se uma concentração final de 3,253 g/L, que corresponde a um percentual de 30,72% do peso total da biomassa seca, e um rendimento de $Y_{l/s}=0,1222$, resultados estes que demonstram uma ligeira redução na concentração de lipídeos, o que pode ser explicado pela lentidão no consumo do carboidrato (xilose), que diferentemente da fermentação em glicose não se esgotou ao longo das 96h, restando xilose em uma concentração de aproximadamente 2,40 g/L. O consumo de nitrogênio também foi mais lento, esgotando-se pouco após às 48h de fermentação. Dados apresentados na tabela 9.

Tabela 9: Resultados do cultivo em meio contendo xilose como fonte de carbono.

Biomassa final (g/L)	Y (x/s)	Lipídeo final (g/L)	Y (l/s)	Produtividade (g/L.h)	Lipídeos(%)
10,590	0,2757	3,253	0,1222	0,034	30,72

x = biomassa(g); s = substrato(g); l = lipídeo (g)

Procedeu-se a extração de RNA e as amostras foram submetidas à análise por corrida eletroforética em gel de agarose, como podemos observar na Figura 15.

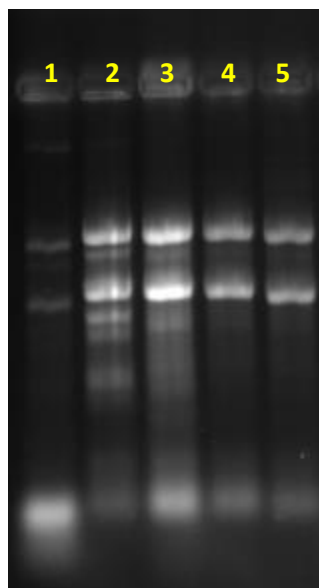


Figura 15: Extração de RNA do cultivo realizado em xilose Poço 1 - 5 = 0, 24, 48, 72, e 96 horas, respectivamente.

As amostras de RNA foram quantificadas em aparelho Nanodrop, obtendo-se as concentrações de 273,2 ng/ μ l, 8,6 μ g/ μ l, 3,0 μ g/ μ l, 3,4 μ g/ μ l e 2,04 μ g/ μ l, que correspondem aos tempos de 0, 24, 48, 72 e 96 horas, respectivamente.

3.3.3. CULTIVO SIMULTÂNEO EM MEIO CONTENDO MISTURA DE XILOSE/GLICOSE NA PROPORÇÃO 70/30 (XIL:GLI)

O ensaio de co-fermentação em meio contendo xilose e glicose, foi realizado visando simular o conteúdo de açúcares de um meio contendo hidrolisado hemicelulósico (na proporção 70% de xilose e 30% de glicose). A fermentação seguiu o mesmo esquema demonstrado anteriormente nos demais ensaios para as análises de quantificação de biomassa, lipídeos e concentração de açúcares e nitrogênio. A Figura 16 apresenta os resultados.

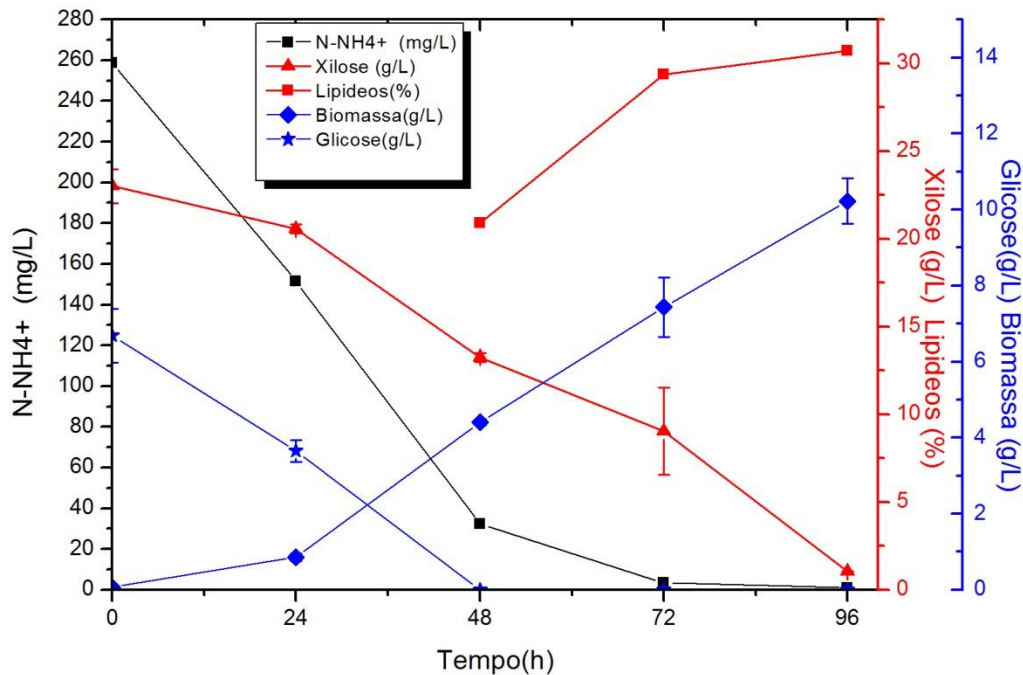


Figura 16: Parâmetros de concentração de biomassa e lipídeos, além de consumo de nutrientes (Xilose, glicose e nitrogênio) para fermentação em meio simulando o conteúdo de carboidratos do hidrolisado hemicelulósico na proporção 70% de xilose e 30% de glicose.

Como esperado o acúmulo de lipídeo só pode ser mensurado a partir das 48h, pelos mesmos motivos expostos anteriormente. Em relação à concentração de biomassa, observou-se ao passar das 96h um total de 10,701 g/L de biomassa, o que correspondeu a um rendimento de $Y_{x/s} = 0,2576$.

Com relação ao acúmulo final de lipídeos observou-se uma concentração final de 3,31 g/L, o que representa um ligeiro aumento em relação ao cultivo em Xilose e uma queda em relação ao cultivo em glicose, sendo o percentual de lipídeos em relação a biomassa seca correspondente à 30,92%, e um rendimento de $Y_{l/s} = 0,1155$.

Pode-se observar também o consumo simultâneo de glicose e xilose pela levedura, característica essa já descrita em outros trabalhos (Anschau et al., 2014; Tapia et al., 2012). Seguindo as mesmas características da fermentação em xilose, este

açúcar também não se esgotou, restando 1,041g/L ao final das 96h, o que demonstra que apesar de consumir simultaneamente as duas fontes de carbono, o consumo em xilose é mais lento do que o em glicose. Os dados podem ser observados na tabela 10.

Tabela 10: Resultados do cultivo em meio contendo xilose e glicose como fonte de carbono.

Biomassa final (g/L)	Y (x/s)	Lipideo final (g/L)	Y (l/s)	Produtividade (g/L.h)	Lipideos(%)
10,701	0,3737	3,312	0,1147	0,034	30,92

Procedeu-se a extração de RNA e posterior análise por corrida eletroforética em gel de agarose, como podemos observar na Figura 17.

As amostras de RNA foram quantificadas, e as concentrações obtidas foram de 254 ng/ μ l, 2,6 μ g/ μ l, 4,4 μ g/ μ l, 6,5 μ g/ μ l e 3,3 μ g/ μ l, que correspondem aos tempos de 0, 24, 48, 72 e 96 horas, respectivamente.

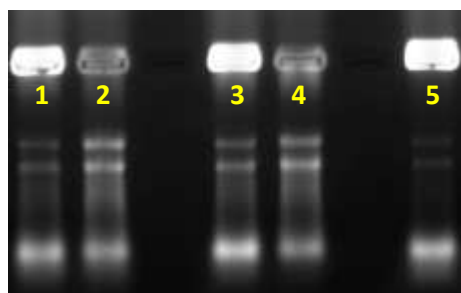


Figura 17: Extração de RNA do cultivo realizado em mistura de xilose/glicose. Poço 1 - 5 = 24, 48, 72,96 e 0 horas, respectivamente.

3.3.4. ANÁLISE DA EXPRESSÃO RELATIVA DOS GENES LIGADOS AO METABOLISMO DE XILOSE

Dos 3 possíveis genes normalizadores testados, aquele que se mostrou mais eficiente e com menor oscilação quanto aos valores de Ct ao longo da fermentação, bem como nas 3 diferentes condições foi o gene ACT1(18,256 ± 0,59). Portanto este gene foi o escolhido como gene de referência para análise dos demais.

Os dados gerados pela técnica de Real-Time PCR, foram utilizadas de maneira a se obter uma quantificação relativa da expressão dos genes durante as fermentações em Xilose e na mistura Xilose/Glicose, tendo como referência os valores gerados durante a fermentação em glicose. Logo os dados apresentados a seguir representam o quanto os genes em questão estão induzidos ou reprimidos em relação ao cultivo feito em glicose.

A tabela 11 mostra os valores relativos de expressão dos genes ligados ao metabolismo de xilose para a fermentação em xilose. Os valores com sinal de negativo demonstram que os genes estão reprimidos enquanto os valores positivos significam que o gene se encontra induzido, além disso, os valores destacados com asterisco são aqueles cujo teste estatístico indicou como diferencialmente expresso em relação ao controle (fermentação em glicose).

Tabela 11: Resultados da expressão relativa dos genes durante a fermentação em xilose.

	Expressão relativa (log)			
	24H	48H	72H	96H
XylC	1,62 ± 0,4	1,13 ± 0,26*	1,89 ± 0,42*	3,29 ± 1,02*
XylD	-0,12 ± 0,03	0,26 ± 0,06	1,07 ± 0,43	1,85 ± 0,65*
XYL1	5,18 ± 1,45*	4,70 ± 1,08*	3,81 ± 1,15*	3,92 ± 1,10*
XylB(1)	5,78 ± 1,53*	4,65 ± 1,43*	4,51 ± 1,18*	4,37 ± 1,21*
XylB(2)	6,17 ± 1,44*	4,53 ± 1,37*	2,93 ± 0,78*	4,90 ± 1,45*
PGK1	1,10 ± 0,52	-1,17 ± 0,02*	0,50 ± 0,06	-0,95 ± 0,02*
GND1	1,64 ± 0,02*	1,96 ± 0,38*	-0,04 ± 0,01	-0,20 ± 0,03
PGI1	0,59 ± 0,20	1,30 ± 0,35*	-0,35 ± 0,16	-0,80 ± 0,18
HXK1	-0,60 ± 0,07	0,11 ± 0,04	0,80 ± 0,34	-0,06 ± 0,03

*Dados estatisticamente significativos P < 0,1

Observando apenas os valores estatisticamente significativos, é possível observar que os genes Xilose redutase (XYL1) e as duas cópias do gene Xylose desidrogenase (XylB) estão induzidos em relação a fermentação em glicose, durante todo o processo fermentativo. Além destes os genes Xilonolactanse (XylC) e Xilonato desidratase (XylD) também aparecem como induzido, sendo o primeiro nos tempo 48h, 72h e 96h e o segundo nos tempos 72h e 96h.

Estes dados corroboram com os dados preditos durante a análise genômica de *L. starkeyi*, demonstrando que os genes preditos como sendo XylB, XylC e XylD estão presentes no genoma da levedura e como proposto participam ativamente do metabolismo de xilose. É interessante observar que os valores de expressão são próximos durante toda a fermentação para os genes XYL1 e XylB, o que indica que eles podem estar sendo co-expressos. As cópias dos genes xilose desidrogenase (XylB) por usarem preferencialmente o co-fator NADP⁺ seriam responsáveis por regenerar o co-fator NADPH utilizado pela enzima xilose redutase (Xyl1p), (Suzuki and Onishi 1973, Berghall et al., 2007, Toivari et al., 2012) conforme demonstrado na figura 18.

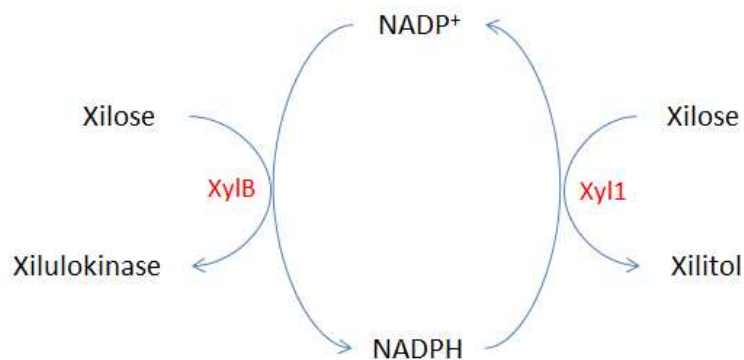


Figura 18: Esquema representado a oxidação/redução durante a assimilação de xilose.

Poucos estudos reportam a presença deste gene em eucariotos (Suzuki and Onishi 1973, Kanauchi and Bamforth 2003). Estudos realizados sobre a espécie de fungo *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*) e o gene Xilose desidrogenase (XylB) presente na espécie, indicaram que este gene não é fundamental para o metabolismo

de xilose e nem representa uma rota alternativa de degradação da mesma, permanecendo como desconhecida sua real função (Berghall et al., 2007). Assim, a presença deste gene expresso na levedura *Lipomyces starkeyi* representa uma importante fonte de estudos futuros, uma vez que são raríssimos os relatos da presença de enzimas capazes de desidrogenar açúcares (Twerdochlib et al., 1994, Tsai et al., 1995, Kim et al., 1998, Elshafei and Abdel-Fatah 2001). Uma vez que essa levedura apresenta comportamentos fermentativos peculiares, como o consumo simultâneo de glicose e xilose e consumo de inibidores tradicionais gerados durante a hidrólise ácida do bagaço (trabalho em andamento em nosso laboratório), é possível que a presença de vias alternativas incomuns como esta estejam por trás destas particularidades da espécie.

Análises mais profundas sobre o mecanismo de ação dos genes XylB, XylC e XylD devem ser feitos, na medida em que se torna importante descobrir se estes genes realmente constituem uma via alternativa de assimilação em xilose para a levedura *Lipomyces starkeyi*.

No caso dos genes ligados à via das pentoses fosfato (PPP), que é conhecidamente mais ativa durante o metabolismo de xilose (Jeffries et al., 2007) foi possível observar que os genes GND1 e PGI1 (Gluconolactanase) também estão induzidos, nos tempos em que a xilose está sendo consumida (24h e 48h). O gene GND1 faz parte da fase oxidativa da via PPP e responsável por um dos principais pontos de regeneração do cofator NADPH, o qual é utilizado pela enzima xilose redutase no 1º passo do metabolismo de xilose. Já a maior expressão relativa do gene PGDL1 possivelmente está ligada à sua função na produção de Frutose-6-Fosfato, que participa no desvio do fluxo da glicólise para via PPP. Em contraste, nos genes HXK1 e ZWF1 não foi possível observar diferenças nos níveis de expressão em relação à fermentação em glicose. O único gene reprimido foi o gene PGK1 (fosfoglicerato kinase), o qual pertence à via da glicólise, o que pode explicar o fato deste gene estar reprimido durante fermentação em xilose.

Em relação à fermentação em meio simulando a composição de açúcares do hidrolisado hemicelulósico (proporção de 70% de xilose para 30% de glicose), a

expressão gênica observada foi bastante semelhante aos resultados obtidos na fermentação em Xilose. Ou seja, também nesse caso os genes XYL1, XylB, XylC e XylD foram todos induzidos durante a fermentação, conforme podemos observar na Tabela 12.

Tabela 12: Resultados da expressão relativa dos genes durante a fermentação em meio contendo Xilose/Glicose (Xil:Gli).

Genes	Expressão relativa (log)			
	24H	48H	72H	96H
XylC	1,44 ± 0,38*	1,58 ± 0,37*	1,96 ± 0,48*	1,86 ± 0,43*
XylD	0,20 ± 0,08	0,80 ± 0,02*	1,85 ± 0,22*	2,13 ± 0,44*
XYL1	2,59 ± 0,63*	5,94 ± 1,18*	4,44 ± 0,85*	2,84 ± 0,59*
XylB(1)	4,42 ± 1,2*	5,62 ± 0,84*	4,0 ± 0,54*	3,59 ± 0,74*
XylB(2)	5,33 ± 1,17*	6,03 ± 1,51*	3,87 ± 0,60*	3,85 ± 0,90*
ZWF1	-0,22 ± 0,04	1,57 ± 0,40*	-1,076 ± 0,06	-1,56 ± 0,04*
PGK1	-1,22 ± 0,02	-0,84 ± 0,07	-1,13 ± 0,04	-2,42 ± 0,01*
GND1	-1,40 ± 0,02	0,93 ± 0,19*	-1,89 ± 0,04*	-2,84 ± 0,01*
PGI1	-0,20 ± 0,038	-0,08 ± 0,02	-0,53 ± 0,04	-1,64 ± 0,03
HXK1	-1,83 ± 0,01	-1,13 ± 0,09	-1,61 ± 0,04*	-2,25 ± 0,02*

*Dados estatisticamente significativos $P < 0,1$

Com relação aos genes ligados à via das pentoses fosfato, os genes GND1, ZWF1 aparecem induzidos 48h após o início da fermentação, enquanto o gene PGI1 não apresentou diferenças na expressão que fossem significativamente estatísticas. A expressão elevada dos genes ligados à via PPP nas duas fermentações, xilose e Xil:Gli, em relação à fermentação em glicose, confirma que, assim como em outras leveduras, como *Pichia stipitis* (Jeffries et al., 2007) e *Saccharomyces cerevisiae* (Jeppsson et al., 2002), esta via tem papel importante durante o metabolismo de xilose de *L. starkeyi*.

A figura 19 a seguir mostra as expressões relativas dos genes XYL1, as duas cópias de XylB, XylB(1) e XylB(2), além de XylC e XylD durante as fermentações em

xilose e Xil:Gli, destacando também as possíveis vias de metabolismo de xilose presentes de *L. starkeyi*.

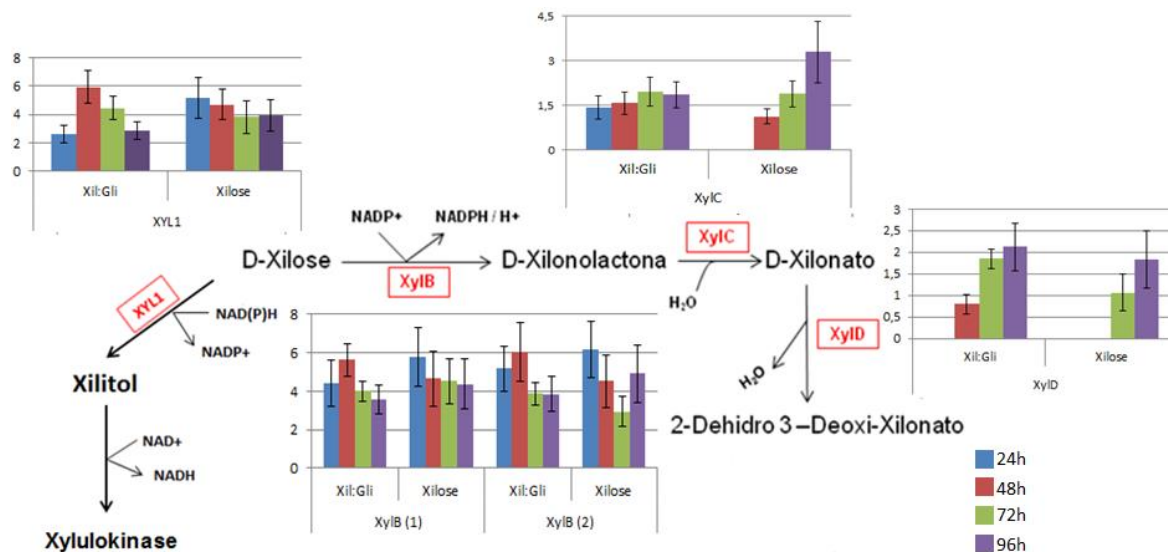


Figura 19: Expressão relativa dos genes ligados á via principal (XYL1) e alternativa (XylB, XylC e XylD) do metabolismo de xilose. Nos gráficos foram omitidos os tempo em que não houve diferenças estatisticamente significativas.

3.3.5. ANÁLISE DA EXPRESSÃO RELATIVA DOS GENES LIGADOS AO ACÚMULO DE LIPÍDEOS

O acúmulo de lipídeos em leveduras oleaginosas tem sido extensamente estudado e parece bem definido quanto aos principais eventos que o desencadeiam. Como já dito na seção 1.7, o acúmulo tem início mediante a limitação de nitrogênio no meio de cultura. Tendo isso em mente, e analisando os gráficos das 3 fermentações (figuras 12, 13 e 14), chega-se a conclusão que o tempo de 48h para as 3 fermentações representa o tempo onde ocorre a limitação de nitrogênio, sendo portanto o tempo onde devem ser focados as análises a fim de descobrir quais o genes estão diferencialmente expressos durante o acúmulo de lipídeos.

As análises foram feitas através da expressão relativa dos genes no tempo 48h, tomando como tempo controle o tempo de 24h, gerando assim um resultado que mostra quais genes sofreram mudança na taxa de expressão (induzidos ou reprimidos) durante o tempo de 48h onde se entende haver limitação de nitrogênio e consequente início do acúmulo de lipídeos. Desta forma, a presença de genes diferencialmente expressos durante esta transição, indicaria a participação destes genes no início da fase de acúmulo de biomassa.

Os dados gerados podem ser visto na tabela 13.

Tabela 13: Resultados da expressão relativa dos genes durante a transição para fase do acúmulo de lipídeos (48h).

Genes	Expressão relativa (log)		
	GLICOSE	XILOSE	XIL:GLI
ACO1	-1,47 ± 0,07	0,40 ± 0,06	-1,27 ± 0,05
ATP-CL	0,53 ± 0,17	0,16 ± 0,03	0,22 ± 0,05
ZWF1	1,38 ± 0,38	1,35 ± 0,34*	3,29 ± 0,81*
DGA2	4,54 ± 1,21*	1,95 ± 0,58*	2,59 ± 0,62*
CIT1	1,54 ± 0,36*	0,55 ± 0,10*	0,80 ± 0,17*
PGK1	-0,03 ± 0,008	-2,31 ± 0,01*	0,34 ± 0,06
GND1	0,03 ± 0,006	-0,15 ± 0,03	1,30 ± 0,37*
PGI1	0,47 ± 0,10	1,18 ± 0,28*	0,59 ± 0,17
MDH1	-9,63 ± 0,00*	-1,23 ± 0,06*	0,17 ± 0,02
ICL	2,54 ± 0,80*	2,41 ± 0,66*	2,29 ± 0,50*
HXK1	-1,57 ± 0,04	-0,86 ± 0,10	-0,84 ± 0,06

*Dados estatisticamente significativos $P < 0,1$

É possível identificar na tabela pelo menos 4 genes que parecem estar diferencialmente expressos na condição de limitação de nitrogênio (48h). São eles CIT1, DGA2, ICL1 e MDH1, sendo os 3 primeiros induzido nas 3 fermentações e o último reprimido nas fermentações em glicose (GSM) e xilose (XSM). Apesar de ser tratado como gene chave do acúmulo de lipídeos nas leveduras oleaginosas, não foi possível observar uma mudança nos níveis de expressão do gene ATP-CL, o que pode indicar que a regulação deste gene seja pós-transcricional.

O comportamento destes genes pode nos dar uma idéia de como funciona o fluxo metabólico de *L. starkeyi* durante a fase inicial do acúmulo de lipídeos, conforme podemos visualizar na figura 20.

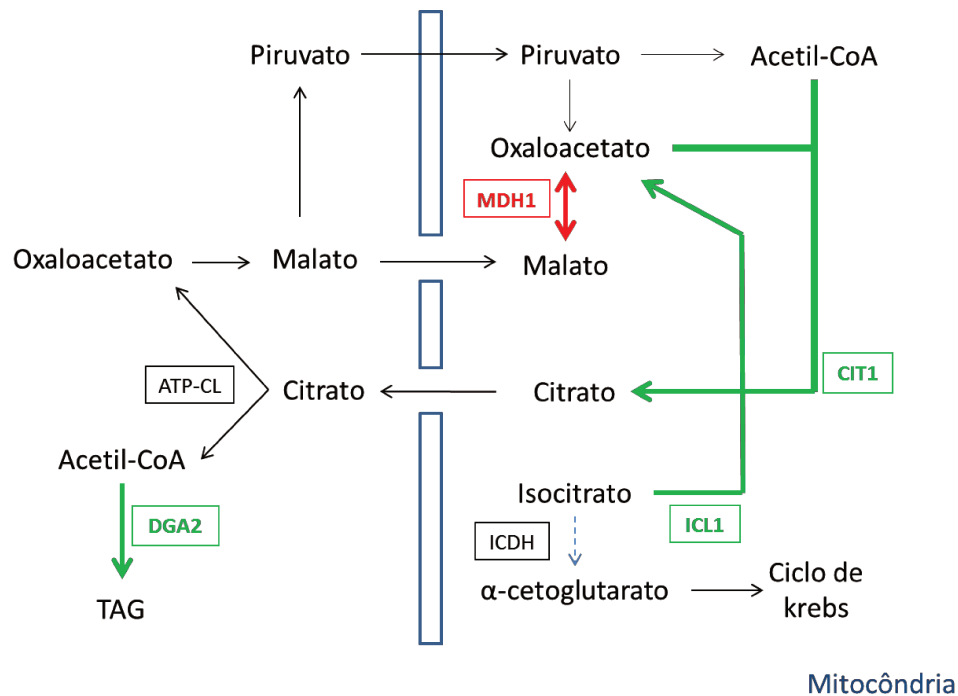


Figura 20: Esquema representativo do fluxo metabólico ligado ao acúmulo de lipídeos na levedura *Lipomyces starkeyi*. Os genes marcados em verde encontram-se induzidos, enquanto o gene em vermelho está reprimido . Adaptado de Papanikolaou and Aggelis (2011).

A escassez de nitrogênio no meio de cultura acarreta uma queda nos níveis de AMP intracelular, principal ativador alostérico da enzima Isocitrato desidrogenase (ICDH). Sendo assim ocorre uma diminuição da atividade da enzima isocitrato desidrogenase e conseqüente acúmulo de isocitrato na mitocôndria (Boulton and Ratledge 1981, Evans and Ratledge 1985, Ratledge 2004). Os dados obtidos demonstram que a molécula de isocitrato é então convertida á oxaloacetato pela enzima isocitratoliase (ICL1p), uma das principais enzimas da via do glicoxalato. Embora

não usual o aumento da expressão do gene ICL1 durante a limitação de nitrogênio já foi descrito em outras leveduras e se mostrou essencial para o acúmulo de lipídeos em fungos da espécie *Mortierella alpina* and *Mucor* sp. (Wynn and Ratledge 2000, Mysiakina and Funtikova 2008, Zhu et al., 2012). A repressão do gene MDH1 e aumento da expressão do gene CIT1, indicam que a molécula de oxaloacetato é combinada a molécula de Acetil-CoA formando a molécula de citrato através da ação da enzima citrato sintase (CIT1). O citrato se acumula na mitocôndria e é então transportado para fora dela através de uma troca com o malato. Uma vez fora da mitocôndria o citrato é convertido em Acetil-CoA e oxaloacetato pela enzima ATP citrato liase. Por fim o aumento na expressão do gene DGA2 demonstra que a síntese de TAG está ativa durante o início da fase de acúmulo de lipídeos.

Os demais genes que se mostraram expressos durante o início do acúmulo de lipídeos foram os genes ligados à via das pentoses fosfato, GND1, PGI1 e ZWF1. A expressão destes genes se mostrou induzidos nas fermentações de xilose e Xil:Gli, e esse fenômeno pode estar ligado apenas à presença de xilose no meio, como já dito anteriormente, e não ligado a limitação de nitrogênio e consequente acúmulo de lipídeo. Porém, estudos anteriores realizados com a *Lipomyces starkeyi* (Naganuma et al., 1985) indicaram que a enzima GND1p mostra-se mais ativa durante a fase de acúmulo de lipídeo do que na fase de proliferação celular, durante cultivo em meio contendo glicose como fonte de carbono. Um estudo proteômico de *L. starkeyi* também demonstrou que as enzimas ligadas aos genes PGI1 e GND1 estavam induzidas durante o acúmulo de lipídeos (Liu et al., 2011). Segundo os autores, tal fato se deve à necessidade da presença do cofator NADPH para o funcionamento do complexo FAS durante a biossíntese de lipídeos, o qual é regenerado pela via das pentoses fosfato (ver figura 1).

Assim, a via das pentoses fosfato pode assumir um papel importante durante o acúmulo de lipídeos na levedura *Lipomyces starkeyi* através da regeneração do cofator NADPH diferentemente da maioria das leveduras oleaginosas, para as quais esse cofator é regenerado através da enzima málica (ME) citosólica na reação de conversão de malato em piruvato (Wynn et al., 2001; Papanikolaou, 2004; Boulton e Ratledge, 1981; Evans and Ratledge, 1985; Papanikolaou and Aggelis, 2011) . Porém,

estudos realizados com a levedura *Lipomyces starkeyi* indicam que a enzima málica presente na levedura pode ser NAD⁺ dependente, regenerando assim o cofator NADH ao invés de NADPH, como esperado (Tang et al., 2010).

4. CONCLUSÃO

Apesar dos esforços na tentativa de transformação genética de *L. starkeyi*, nenhuma das técnicas utilizadas no presente trabalho se mostrou eficaz no âmbito de atingir os resultados desejados. Uma análise genômica da levedura também demonstrou que a falta de plasmídeos naturais na mesma, pode ser um grande entrave a técnicas de transformação que se utilizam de plasmídeos modificados. Aliados ao fato da falta de literatura disponível, que retrate com sucesso casos de engenharia genética de *L. starkeyi*, entende-se que sua transformação é de fato muito laboriosa e necessita de estudos mais completos, a fim de que se obtenha êxito e que acima de tudo essa técnica se torne aplicável seja para fins de pesquisa ou na utilização em processos industriais. As análises transcriptômicas mostraram que os genes XYL1, XylB, XylC e XylD participam do processo de metabolismo de xilose, uma vez que todos se apresentaram induzidos quando comparados a fermentação onde a fonte de carbono era a glicose. Enquanto o gene XYL1 é conhecido por fazer parte da via principal de metabolismo de xilose em fungos e leveduras, os demais (XylB, XylC e XylD) fazem parte de uma via não usual de metabolismo de xilose em leveduras, que necessita de estudos adicionais á fim de entender qual seu verdadeiro papel no consumo de xilose. Além destes a análise também mostrou o papel importante que os genes da via das pentoses fosfato (ZWF1, GND1 e PGI1) desempenham durante o consumo de xilose. Em relação á síntese de lipídeos foi possível observar uma regulação positiva da expressão dos genes ICL1, CIT1 e DAG2, logo no início da limitação de nitrogênio, o que indica que estes genes possam estar intimamente ligados ao início do processo de acúmulo de lipídeos de *Lipomyces starkeyi*, se tornando possíveis alvos de manipulações genéticas visando um aumento na concentração de lipídeos intracelulares.

5. TRABALHOS FUTUROS

A presença e, principalmente, a expressão diferenciada durante o cultivo em xilose, dos genes XylB, XylC e XylD, abre interessantes perspectivas quanto a participação desta via não usual no metabolismo de xilose. A inserção dos genes XylB, XylC e XylD em microrganismos que não consomem naturalmente xilose, como *Saccharomyces cerevisiae* e *Escherichia coli*, poderia ajudar a elucidar o papel dos mesmo no consumo de xilose na levedura *L. starkeyi*. Além disso, esta é uma via que possui como produto intermediário o ácido xilônico ou xilonato. Sendo um composto de interesse industrial, é importante observar se este é produzido ao longo do processo fermentativo utilizando a levedura *L. starkeyi* ou, até mesmo, se estes genes, quando expressos em outro microrganismo, são capazes de torná-los potenciais produtores de xilonato.

Paralelamente, esforços precisam ser desenvolvidos na busca por métodos eficazes de transformação genética da levedura em questão, visto que tais ferramentas contribuem de maneira significativa para a manipulação de microrganismos visando à produção de compostos de interesse industrial. Novas metodologias vêm surgindo nos últimos tempos, principalmente advindas dos avanços da biologia sintética, e podem ser testadas na levedura *Lipomyces starkeyi*.

Uma vez determinada a metodologia de transformação genética de *L. starkeyi*, os genes relatados neste trabalho, sejam aqueles ligados ao metabolismo de xilose ou ao acúmulo de lipídeos, surgem como potenciais alvos para sua manipulação genética visando melhorar as características naturais que tornam esta espécie diferenciada.

Realizar uma análise transcriptômica completa de *L. starkeyi* a fim de elucidar o perfil de expressão de todos os genes ligados à via usual de metabolismo de xilose, bem como os genes da via alternativa proposta pelo presente trabalho. A mesma estratégia pode ser também utilizada como ferramenta para investigar quais genes

estão sendo regulados durante o processo fermentativo e, em especial, na fase de transição entre o crescimento celular e o acúmulo de lipídeos determinado pela limitação de nitrogênio, gerando assim um perfil da mudança de expressão dos principais genes ligados a este fenômeno.

O entendimento do metabolismo de *L. starkeyi*, aliado ao conhecimento genético advindo da análise genômica já realizada por nosso grupo de pesquisa, deve nos fornecer arcabouço para identificar as características peculiares desta levedura, como sua especialização no consumo de xilose e de inibidores presentes no hidrolisado hemicelulósico, como furfural, HMF e ácido acético.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agbogbo, F. K. and G. Coward-Kelly. "Cellulosic ethanol production using the naturally occurring xylose-fermenting yeast, *Pichia stipitis*." *Biotechnology Letters* 30(9): 1515-1524.(2008).

Ageitos, J. M., J. A. Vallejo, P. Veiga-Crespo and T. G. Villa. "Oily yeasts as oleaginous cell factories." *Applied Microbiology and Biotechnology* 90(4): 1219-1227.(2011).

Angerbauer, C., M. Siebenhofer, M. Mittelbach and G. M. Guebitz. "Conversion of sewage sludge into lipids by *Lipomyces starkeyi* for biodiesel production." *Bioresource Technology* 99(8): 3051-3056.(2008).

Anschau, A., M. C. Xavier, S. Hernalsteens and T. T. Franco. "Effect of feeding strategies on lipid production by *Lipomyces starkeyi*." *Bioresour Technol* 157C: 214-222.(2014).

Azocar, L., G. Ciudad, H. J. Heipieper and R. Navia. "Biotechnological processes for biodiesel production using alternative oils." *Applied Microbiology and Biotechnology* 88(3): 621-636.(2010).

Beopoulos, A., Z. Mrozova, F. Thevenieau, M. T. Le Dall, I. Hapala, S. Papanikolaou, T. Chardot and J. M. Nicaud. "Control of Lipid Accumulation in the Yeast *Yarrowia lipolytica*." *Applied and Environmental Microbiology* 74(24): 7779-7789.(2008).

Berghall, S., S. Hilditch, M. Penttila and P. Richard. "Identification in the mould *Hypocrea jecorina* of a gene encoding an NADP(+): d-xylose dehydrogenase." *FEMS Microbiol Lett* 277(2): 249-253.(2007).

Blazeck, J., A. Hill, L. Liu, R. Knight, J. Miller, A. Pan, P. Otoupal and H. S. Alper. "Harnessing *Yarrowia lipolytica* lipogenesis to create a platform for lipid and biofuel production." *Nature Communications* 5: 3131.(2014).

Bligh, E. G. and W. J. Dyer. "A rapid method of total lipid extraction and purification." *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology* 37(8): 911-917.(1959).

Boulton, C. A. and C. Ratledge. "Correlation of Lipid-Accumulation in Yeasts with Possession of Atp-Citrate Lyase." *Journal of General Microbiology* 127(Nov): 169-176.(1981).

Brouns, S. J., N. Smits, H. Wu, A. P. Snijders, P. C. Wright, W. M. de Vos and J. van der Oost. "Identification of a novel alpha-galactosidase from the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus*." *Journal of Bacteriology* 188(7): 2392-2399.(2006).

Caspeta, L. and J. Nielsen. "Economic and environmental impacts of microbial biodiesel." *Nature Biotechnology* 31(9): 789-793.(2013).

Chen, W. H., S. C. Ye and H. K. Sheen. "Hydrolysis characteristics of sugarcane bagasse pretreated by dilute acid solution in a microwave irradiation environment." *Applied Energy* 93: 237-244.(2012).

Dagley, S. and P. W. Trudgill. "Metabolism of Galactarate D-Glucarate and Various Pentoses by Species of Pseudomonas." *Biochemical Journal* 95(1): 48-&.(1965).

Dahms, A. S. "New Pathway for D-Xylose Metabolism." *Federation Proceedings* 33(5): 1560-1560.(1974).

Dugar, D. and G. Stephanopoulos. "Relative potential of biosynthetic pathways for biofuels and bio-based products." *Nature Biotechnology* 29(12): 1074-1078.(2011).

Dulermo, T. and J. M. Nicaud. "Involvement of the G3P shuttle and beta-oxidation pathway in the control of TAG synthesis and lipid accumulation in *Yarrowia lipolytica*." *Metabolic Engineering* 13(5): 482-491.(2011).

Elshafei, A. M. and O. M. Abdel-Fatah. "Evidence for a non-phosphorylated route of galactose breakdown in cell-free extracts of *Aspergillus niger*." *Enzyme Microb Technol* 29(1): 76-83.(2001).

Evans, C. T. and C. Ratledge. "The Role of the Mitochondrial Nad⁺ - Isocitrate Dehydrogenase in Lipid-Accumulation by the Oleaginous Yeast *Rhodospiridium-Toruloides Cbs-14*." *Canadian Journal of Microbiology* 31(9): 845-850.(1985).

Evans, C. T., A. H. Scragg and C. Ratledge. "A Comparative-Study of Citrate Efflux from Mitochondria of Oleaginous and Non-Oleaginous Yeasts." *European Journal of Biochemistry* 130(1): 195-204.(1983).

Fakas, S., S. Papanikolaou, A. Batsos, M. Galiotou-Panayotou, A. Mallouchos and G. Aggelis. "Evaluating renewable carbon sources as substrates for single cell oil

production by *Cunninghamella echinulata* and *Mortierella isabellina*." *Biomass & Bioenergy* 33(4): 573-580.(2009).

Fan, X. C., Q. Zhu, R. Hong, P. Sharpe, Z. X. Xue, N. Yadav, B. Tyreus, B. Boonyaratanakornkit, C. Dellomonaco, D. Short, S. Suwannakham, D. M. Xie and E. Jackson. "Metabolic engineering of *Yarrowia lipolytica* to produce polyunsaturated fatty acids." *Yeast* 30: 39-39.(2013).

Froissard, M., S. D'andrea, C. Boulard and T. Chardot. "Heterologous expression of *AtClo1*, a plant oil body protein, induces lipid accumulation in yeast." *Fems Yeast Research* 9(3): 428-438.(2009).

Gill, C. O., M. J. Hall and C. Ratledge. "Lipid accumulation in an oleaginous yeast (*Candida* 107) growing on glucose in single-stage continuous culture." *Appl Environ Microbiol* 33(2): 231-239.(1977).

Goldemberg, J. and P. Guardabassi. "Are biofuels a feasible option?" *Energy Policy* 37(1): 10-14.(2009).

Gong, Z. W., Q. Wang, H. W. Shen, C. M. Hu, G. J. Jin and Z. B. K. Zhao. "Co-fermentation of cellobiose and xylose by *Lipomyces starkeyi* for lipid production." *Bioresource Technology* 117: 20-24.(2012).

Groguenin, A., Y. Wache, E. Escamilla Garcia, M. Aguedo, F. Husson, M. T. LeDall, J. M. Nicaud and J. M. Belin. "Genetic engineering of the beta-oxidation pathway in the yeast *Yarrowia lipolytica* to increase the production of aroma compounds." *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic* 28(2-3): 75-79.(2004).

He, M. X., Q. C. Hu, X. H. Gou, X. Y. Liu, Q. Li, K. Pan, Q. L. Zhu and J. Wu. "Screening of oleaginous yeast with xylose assimilating capacity for lipid and bio-ethanol production." *African Journal of Biotechnology* 9(49): 8392-8397.(2010).

Hong, K. K. and J. Nielsen. "Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*: a key cell factory platform for future biorefineries." *Cellular and Molecular Life Sciences* 69(16): 2671-2690.(2012).

Huang, C., M. H. Zong, H. Wu and Q. P. Liu. "Microbial oil production from rice straw hydrolysate by *Trichosporon fermentans*." *Bioresource Technology* 100(19): 4535-4538.(2009).

Jeffries, T. W., I. V. Grigoriev, J. Grimwood, J. M. Laplaza, A. Aerts, A. Salamov, J. Schmutz, E. Lindquist, P. Dehal, H. Shapiro, Y. S. Jin, V. Passoth and P. M. Richardson. "Genome sequence of the lignocellulose-bioconverting and xylose-fermenting yeast *Pichia stipitis*." *Nature Biotechnology* 25(3): 319-326.(2007).

Jeffries, T. W. and Y. S. Jin. "Metabolic engineering for improved fermentation of pentoses by yeasts." *Applied Microbiology and Biotechnology* 63(5): 495-509.(2004).

Jeffries, T. W. and Y. S. Jin. "Metabolic engineering for improved fermentation of pentoses by yeasts." *Appl Microbiol Biotechnol* 63(5): 495-509.(2004).

Jeppsson, M., O. Bengtsson, K. Franke, H. Lee, R. Hahn-Hagerdal and M. F. Gorwa-Grauslund. "The expression of a *Pichia stipitis* xylose reductase mutant with higher K-M for NADPH increases ethanol production from xylose in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*." *Biotechnology and Bioengineering* 93(4): 665-673.(2006).

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

Jin, Y. S., H. Ni, J. M. Laplaza and T. W. Jeffries. "Optimal growth and ethanol production from xylose by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* require moderate D-xylose dehydrogenase activity." *Appl Environ Microbiol* 69(1): 495-503.(2003).

Johnsen, U. and P. Schönheit. "Novel xylose dehydrogenase in the halophilic archaeon *Haloarcula marismortui*." *Journal of Bacteriology* 186(18): 6198-6207.(2004).

Kanauchi, M. and C. W. Bamforth. "Use of xylose dehydrogenase from *Trichoderma viride* in an enzymic method for the measurement of pentosan in barley." *Journal of the Institute of Brewing* 109(3): 203-207.(2003).

Kim, S. T., W. K. Huh, B. H. Lee and S. O. Kang. "D-arabinose dehydrogenase and its gene from *Saccharomyces cerevisiae*." *Biochim Biophys Acta* 1429(1): 29-39.(1998).

Kohlwein, S. D. "Triacylglycerol Homeostasis: Insights from Yeast." *Journal of Biological Chemistry* 285(21): 15663-15667.(2010).

Kruger, N. J. and A. von Schaewen. "The oxidative pentose phosphate pathway: structure and organisation." *Curr Opin Plant Biol* 6(3): 236-246.(2003).

Li, Q., W. Du and D. H. Liu. "Perspectives of microbial oils for biodiesel production." *Applied Microbiology and Biotechnology* 80(5): 749-756.(2008).

Liang, M. H. and J. G. Jiang. "Advancing oleaginous microorganisms to produce lipid via metabolic engineering technology." *Progress in Lipid Research* 52(4): 395-408.(2013).

Liu, H., X. Zhao, F. Wang, X. Jiang, S. Zhang, M. Ye, Z. K. Zhao and H. Zou. "The proteome analysis of oleaginous yeast *Lipomyces starkeyi*." *Fems Yeast Research* 11(1): 42-51.(2011).

Manirakiza, P., A. Covaci and P. Schepens. "Comparative study on total lipid determination using Soxhlet, Roese-Gottlieb, Bligh & Dyer, and modified Bligh & Dyer extraction methods." *Journal of Food Composition and Analysis* 14(1): 93-100.(2001).

Meng, X., J. M. Yang, X. Xu, L. Zhang, Q. J. Nie and M. Xian. "Biodiesel production from oleaginous microorganisms." *Renewable Energy* 34(1): 1-5.(2009).

Morin, N., J. Cescut, A. Beopoulos, G. Lelandais, V. Le Berre, J. L. Uribelarrea, C. Molina-Jouve and J. M. Nicaud. "Transcriptomic Analyses during the Transition from Biomass Production to Lipid Accumulation in the Oleaginous Yeast *Yarrowia lipolytica*." *Plos One* 6(11).(2011).

Murray, J. and D. King. "Oil's tipping point has passed." *Nature* 481(7382): 433-435.(2012).

Mysiakina, I. S. and N. S. Funtikova. "[Activity of NAD-dependent isocitrate dehydrogenase, isocitrate lyase, and malate dehydrogenase in *Mucor circinelloides* var. *lusitanicus* INMI under different modes of nitrogen supply]." *Mikrobiologija* 77(4): 453-459.(2008).

Naganuma, T., Y. Uzuka and K. Tanaka. "Physiological Factors Affecting Total Cell Number and Lipid-Content of the Yeast, *Lipomyces-Starkeyi*." *Journal of General and Applied Microbiology* 31(1): 29-37.(1985).

Nelson, N. "A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose." *Journal of Biological Chemistry* 153(2): 375-380.(1944).

O'Neill, B. C. and M. Oppenheimer. "Climate change. Dangerous climate impacts and the Kyoto Protocol." *Science* 296(5575): 1971-1972.(2002).

Papanikolaou, S. and G. Aggelis. "Lipids of oleaginous yeasts. Part I: Biochemistry of single cell oil production." *European Journal of Lipid Science and Technology* 113(8): 1031-1051.(2011).

Papanikolaou, S., M. Komaitis and G. Aggelis. "Single cell oil (SCO) production by *Mortierella isabellina* grown on high-sugar content media." *Bioresource Technology* 95(3): 287-291.(2004).

Ratledge, C. "Fatty acid biosynthesis in microorganisms being used for Single Cell Oil production." *Biochimie* 86(11): 807-815.(2004).

Ratledge, C. "Yeasts for Lipid Production." *Biochemical Society Transactions* 16(6): 1088-1091.(1988).

Ratledge, C. and J. P. Wynn. "The biochemistry and molecular biology of lipid accumulation in oleaginous microorganisms." *Advances in Applied Microbiology*, Vol 51 51: 1-51.(2002).

Rossi, M., P. Buzzini, L. Cordisco, A. Amaretti, M. Sala, S. Raimondi, C. Ponzoni, U. M. Pagnoni and D. Matteuzzi. "Growth, lipid accumulation, and fatty acid composition in obligate psychrophilic, facultative psychrophilic, and mesophilic yeasts." *Fems Microbiology Ecology* 69(3): 363-372.(2009).

Runguphan, W. and J. D. Keasling. "Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for production of fatty acid-derived biofuels and chemicals." *Metabolic Engineering* 21: 103-113.(2014).

Salusjarvi, L., M. Kankainen, R. Soliymani, J. P. Pitkanen, M. Penttila and L. Ruohonen. "Regulation of xylose metabolism in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*." *Microbial Cell Factories* 7: 18.(2008).

Shuai, L. and X. J. Pan. "Biohydrocarbons: Next Generation Liquid Fuels from Lignocellulosic Biomass." *Research Progress in Paper Industry and Biorefinery* (4th Issue), Vols 1-3: 1293-1297.(2010).

Somogyi, M. "A NEW REAGENT FOR THE DETERMINATION OF SUGARS." *Journal of Biological Chemistry* 160(1): 61-68.(1945).

Srienc, F., B. Arnold and J. E. Bailey. "Characterization of intracellular accumulation of poly-beta-hydroxybutyrate (PHB) in individual cells of *Alcaligenes eutrophus* H16 by flow cytometry." *Biotechnol. Bioeng* 26(8): 982.(1984).

Stephens, C., B. Christen, T. Fuchs, V. Sundaram, K. Watanabe and U. Jenal. "Genetic analysis of a novel pathway for D-xylose metabolism in *Caulobacter crescentus*." *Journal of Bacteriology* 189(5): 2181-2185.(2007).

Stephens, C., B. Christen, T. Fuchs, V. Sundaram, K. Watanabe and U. Jenal. "Genetic analysis of a novel pathway for D-xylose metabolism in *Caulobacter crescentus*." *Journal of Bacteriology* 189(5): 2181-2185.(2007).

Suzuki, T. and H. Onishi. "Oxidation and Reduction of D-Xylose by Cell-Free Extract of *Pichia-Quercuum*." *Applied Microbiology* 25(5): 850-852.(1973).

Tang, W., S. F. Zhang, H. D. Tan and Z. B. K. Zhao. "Molecular Cloning and Characterization of a Malic Enzyme Gene from the Oleaginous Yeast *Lipomyces starkeyi*." *Molecular Biotechnology* 45(2): 121-128.(2010).

Tang, W., S. F. Zhang, Q. Wang, H. D. Tan and Z. K. Zhao. "The isocitrate dehydrogenase gene of oleaginous yeast *Lipomyces starkeyi* is linked to lipid accumulation." *Canadian Journal of Microbiology* 55(9): 1062-1069.(2009).

Tang, X. L., H. X. Feng and W. N. Chen. "Metabolic engineering for enhanced fatty acids synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*." *Metabolic Engineering* 16: 95-102.(2013).

Tapia, V. E., A. Anschau, A. L. Coradini, T. F. T and A. C. Deckmann. "Optimization of lipid production by the oleaginous yeast *Lipomyces starkeyi* by random mutagenesis coupled to cerulenin screening." *AMB Express* 2(1): 64.(2012).

Teste, M. A., M. Duquenne, J. M. Francois and J. L. Parrou. "Validation of reference genes for quantitative expression analysis by real-time RT-PCR in *Saccharomyces cerevisiae*." *Bmc Molecular Biology* 10.(2009).

Toivari, M., Y. Nygard, E. P. Kumpula, M. L. Vehkomaki, M. Bencina, M. Valkonen, H. Maaheimo, M. Andberg, A. Koivula, L. Ruohonen, M. Penttila and M. G. Wiebe. "Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for bioconversion of D-xylose to D-xylonate." *Metabolic Engineering* 14(4): 427-436.(2012).

Toivari, M. H., Y. Nygard, M. Penttila, L. Ruohonen and M. G. Wiebe. "Microbial D-xylonate production." *Applied Microbiology and Biotechnology* 96(1): 1-8.(2012).

Toivari, M. H., L. Ruohonen, P. Richard, M. Penttila and M. G. Wiebe. "Saccharomyces cerevisiae engineered to produce D-xylonate." *Applied Microbiology and Biotechnology* 88(3): 751-760.(2010).

Tsai, C. S., J. L. Shi and H. G. Ye. "Kinetic studies of gluconate pathway enzymes from *Schizosaccharomyces pombe*." *Arch Biochem Biophys* 316(1): 163-168.(1995).

Twerdochlib, A. L., F. O. Pedrosa, S. Funayama and L. U. Rigo. "L-Rhamnose Metabolism in *Pichia-Stipitis* and *Debaryomyces-Polymorphus*." *Canadian Journal of Microbiology* 40(11): 896-902.(1994).

Vanderwalt, J. P. "The Lipomycetaceae, a Model Family for Phylogenetic Studies." *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology* 62(4): 247-250.(1992).

Weber, C., A. Farwick, F. Benisch, D. Brat, H. Dietz, T. Subtil and E. Boles. "Trends and challenges in the microbial production of lignocellulosic bioalcohol fuels." *Applied Microbiology and Biotechnology* 87(4): 1303-1315.(2010).

Weimberg, R. "Pentose Oxidation by *Pseudomonas Fragi*." *Journal of Biological Chemistry* 236(3): 629-&.(1961).

Wohlbach, D. J., A. Kuo, T. K. Sato, K. M. Potts, A. A. Salamov, K. M. LaButti, H. Sun, A. Clum, J. L. Pangilinan, E. A. Lindquist, S. Lucas, A. Lapidus, M. J. Jin, C. Gunawan, V. Balan, B. E. Dale, T. W. Jeffries, R. Zinkel, K. W. Barry, I. V. Grigoriev and A. P. Gasch. "Comparative genomics of xylose-fermenting fungi for enhanced biofuel production." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108(32): 13212-13217.(2011).

Wynn, J. P., A. A. Hamid, Y. H. Li and C. Ratledge. "Biochemical events leading to the diversion of carbon into storage lipids in the oleaginous fungi *Mucor circinelloides* and *Mortierella alpina*." *Microbiology-Sgm* 147: 2857-2864.(2001).

Wynn, J. P. and C. Ratledge. "Evidence that the rate-limiting step for the biosynthesis of arachidonic acid in *Mortierella alpina* is at the level of the 18 : 3 to 20 : 3 elongase." *Microbiology-Uk* 146: 2325-2331.(2000).

Xue, Z. X., P. L. Sharpe, S. P. Hong, N. S. Yadav, D. M. Xie, D. R. Short, H. G. Damude, R. A. Rupert, J. E. Seip, J. Wang, D. W. Pollak, M. W. Bostick, M. D. Bosak, D. J. Macool, D. H. Hollerbach, H. X. Zhang, D. M. Arcilla, S. A. Bledsoe, K. Croker, E. F. McCord, B. D. Tyreus, E. N. Jackson and Q. Zhu. "Production of omega-3

eicosapentaenoic acid by metabolic engineering of *Yarrowia lipolytica*." *Nature Biotechnology* 31(8): 734-+. (2013).

Zhang, B. X., H. Q. Chen, M. Li, Z. N. Gu, Y. D. Song, C. Ratledge, Y. Q. Chen, H. Zhang and W. Chen. "Genetic engineering of *Yarrowia lipolytica* for enhanced production of trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid." *Microbial Cell Factories* 12.(2013).

Zhao, X., X. L. Kong, Y. Y. Hua, B. Feng and Z. B. Zhao. "Medium optimization for lipid production through co-fermentation of glucose and xylose by the oleaginous yeast *Lipomyces starkeyi*." *European Journal of Lipid Science and Technology* 110(5): 405-412.(2008).

Zhu, Z., S. Zhang, H. Liu, H. Shen, X. Lin, F. Yang, Y. J. Zhou, G. Jin, M. Ye, H. Zou and Z. K. Zhao. "A multi-omic map of the lipid-producing yeast *Rhodospiridium toruloides*." *Nature Communications* 3: 1112.(2012).

ANEXOS

Anexo 1: TRANSFORMAÇÃO POR ACETATO DE LÍTIO (LiAc)

- As cepas de leveduras foram inoculadas em meio YPD até que a OD₆₀₀ tivesse atingido 0.6 (aproximadamente 48h).
- As culturas foram transferidas para tubos Falcon 50 ml e centrifugadas a 1000 g , durante 5' e temperatura ambiente.
- O sobrenadante foi descartado e o pellet ressuscitado em água estéril, juntando tudo em um único tubo falcon de 50 ml.
- Centrifugou-se a 1000 g , durante 5' e temperatura ambiente.
- Descartou-se o sobrenadante e ressuscitou-se o pellet em 1,5ml de Te/LiAc(1x)
- O DNA carreador ssDNA (DNA de esperma de salmão) foi preparado através de desnaturação por incubação a 100°C.
- Colocou-se em 1 eppendorf 100ul das células ressuscitadas, juntamente com o plasmídeo linearizado que contém o cassete integrativo e o DNA carreador(ssDNA).
- Vortexou-se e adicionou-se a mistura 600ul de PEG/LiAc.
- Incubou-se no shaker por 1h a 30°C e 200rpm.
- Foram adicionados 70ul de DMSO e misturou-se por inversão.
- Choque térmico em banho a seco 42°C durante 15' e depois banho de gelo por 2'.
- Centrifugou-se a 14.000 rpm durante 5' e temperatura ambiente.
- O pellet foi ressuscitado em 1,0ml de meio YPD e incubado ON a 30°C
- Centrifugou-se a 7000 g por 5' .
- O pellet foi ressuscitado em 0,5ml de água estéril e plaqueado em placas com meio sólido YPD e geneticina. Para o controle negativo foi realizada a

transformação, porém sem a adição do plasmídeo linearizado que contém o cassete integrativo.

-As placas foram ser incubadas a 28°C até o aparecimento de colônias.

Anexo 2: TRANSFORMAÇÃO POR ELETROPORAÇÃO

- Dois dias antes do experimento, inoculou-se em 50 ml de meio YPD, uma única colônia isolada de cepa a ser transformada, até uma $OD_{600} = 0,6$ (aproximadamente 48hr).

- Transferiu-se o inóculo para tubos falcon de 50 ml e centrifugou-se a 4000 g e 4°C durante 5'.

- O sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspendido em 20 ml de H₂O estéril.

- Adicionou-se 10 ml de 10x TE buffer, pH = 7,5.

- Adicionou-se 10 ml de 10x LiAc(1M) . Colocou-se no shaker durante 45' e 30°C.

- Adicionou-se 2,5 ml de 1M DTT (Dithiothreitol) enquanto agitava-se levemente. Colocou-se no shaker a baixa rotação durante 15' a 30°C.

- Adicionou-se 25 ml de H₂O gelada e centrifugou-se a 6000 g e 5'.

- O sobrenadante foi descartado e os pellets ressuspendidos em 3 ml de sorbitol(1M) gelado. Centrifugou-se a 6000 g durante 5'.

- O sobrenadante foi descartado novamente e os pellets ressuspendidos em 0,2 ml de sorbitol.

- Separou-se os 0,2 ml em quatro eppendorfs de 1,5 ml, cada um contendo 50ul das células ressuspendidas em sorbitol.

- Adicionou-se diferentes concentrações de DNA(plasmídeo linearizado contendo o cassete integrativo), aos tubos contendo as células. O DNA foi adicionado segundo

as seguintes concentrações: 0,8ul; 4,6ul; 8,3ul; 9,0ul.

- Transferiu-se a mistura do DNA com as células para uma cubeta de eletroporação gelada.
- Eletroporou-se em eletroporador a 1,5 kV, 25 uF e 200Ω.
- Logo após a eletroporação, foram adicionadas as cubetas 1 ml de sorbitol para recuperação das células.
- As células foram deixadas ON incubadas a 30°C
- Foram feitas 5 placas seletivas YPD/Sorbitol, as quais foram adicionadas antes do plaqueamento 100ul de geneticina(G418).
- O conteúdo dos eppendorfs deixados na estufa ON foi centrifugado a 10000 g durante 5' .
- Os pellets foram totalmente ressuspensos em 200ul de sorbitol e plaqueados nas placas seletivas com geneticina. O controle negativo foi feito com as células eletroporadas sem a presença do DNA e plaqueado nas placas seletivas com geneticina.

Anexo 3: OBTENÇÃO DE ESFEROPLASTOS

Preparação de esferoplastos:

- Inoculou-se duas colônias da levedura a ser transformada em 50 ml de meio YPD, contidos em dois erlenmeyers de 250 ml, durante cerca de 40h a 200rpm.
- Colocou-se o inóculo em tubo falcon de 50 ml que foi levado a centrifuga 4000rpm durante 5 minutos para formação de pellet.
- As amostras foram lavadas 2x com H₂O estéril, centrifugando a 4500 rpm durante 5 minutos.

- O sobrenadante foi descartado e adicionou-se em cada falcon contendo a amostra, 5 ml de solução de digestão enzimática da parede celular , devidamente filtrado em filtro Millex 0,22 um.
- As células juntamente com a solução de digestão permaneceram incubadas ON na estufa a 28°C.
- Após a incubação, as amostras foram observadas em microscópio para verificação da formação dos esferoplastos. Posteriormente as amostras foram centrifugadas a 4000rpm durante 5 minutos para formação de pellets.
- Observou-se que parte das células não pelletou, ficando na porção mais externa do sobrenadante.
- A porção mais externa do sobrenadante foi retirada e transferida para outro falcon.
- Ao pellet e ao sobrenadante foram adicionados 2 ml de sorbitol(1M) e centrifugados a 4000rpm durante 5 minutos.
- Do tubo com pellet foi realizada mais uma lavagem com sorbitol (1M), enquanto que no tubo que continha o sobrenadante foi retirada a parte do sobrenadante com aspecto mais denso, onde parecia haver células em suspensão. Este sobrenadante de aspecto mais denso foi transferido para outro tubo, ao qual adicionamos 2 ml de sorbitol(1M) e centrifugamos a 4000rpm durante 5 minutos. No tubo em que se encontravam anteriormente as células em suspensão houve uma pequena formação de pellet, ao qual foram adicionados 2 ml de sorbitol(1M) e centrifugados junto aos demais tubos a 4000rpm durante 5 minutos.
- Ao final da lavagem obtivemos 3 amostras que foram plaqueadas em placas com meio YPD/Sorbitol para análise da recuperação dos esferoplastos.

Anexo 4: TRANSFORMAÇÃO POR ESFEROPLASTOS

- Inocularam-se 2 colônias da levedura de interesse, uma em cada erlenmeyer de 250 ml contendo 50 ml de meio YPD, durante 40 h, sob agitação de 200rpm.
- Após a incubação as amostras foram transferidas para 2 tubos falcon de 50 ml e centrifugadas a 4000rpm durante 5 minutos.
- O sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuspendido em H₂O estéril, sendo novamente centrifugado a 4000rpm durante 5 minutos. Repetiu-se este processo mais uma vez.
- Descartou-se o sobrenadante e foram adicionados a cada tubo 5 ml de solução de lise enzimática da parede celular.
- As células juntamente com a solução de lise enzimática foram deixadas no shaker ON a 28°C.
- Após a incubação as células foram inspecionadas no microscópio para confirmar a formação de protoplastos.
- As amostras foram centrifugadas a 400rpm durante 5 minutos para formação de pellet.
- Como já visualizado anteriormente além do pellet foi formada uma suspensão de células, portanto utilizamos uma seringa descartável para retirar a porção do sobrenadante entre o pellet e a suspensão de células.
- O restante da amostra presente nos tubos foi lavado com 2 ml de sorbitol(1M), e centrifugado a 4000rpm durante 5 minutos.
- Descartou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o pellet em 0,5 ml de sorbitol/CaCl₂.
- As amostras foram centrifugadas a 4000rpm durante 5 minutos para formação de pellet. O sobrenadante foi descartado.
- O pellet foi ressuspendido novamente em 5 ml de Sorbitol/CaCl₂, totalizando 2 amostras, uma proveniente do inóculo 1 e outra proveniente do inóculo 2.

- A partir deste passo as amostras serão submetidas aos 2 diferentes protocolos de transformação.

- A amostra 01, proveniente do inoculo 01, foi dividida em 2 eppendorfs(200 ul cada) contendo 10ug do DNA (cassete Δ ura3) e 5 ul de ssDNA. Onde um dos eppendorfs foi submetido à transformação por LiAc e o outro a transformação por esferoplastos. No 3º eppendorf foram colocados 100 ul da amostra para realizar o controle.

- O mesmo passo acima foi feito para a amostra 02 ,proveniente do inoculo 02.

- A molécula de ssDNA foi pré aquecida a 100°C e depois resfriado rapidamente em gelo para desnaturação.

Para as amostras que posteriormente serão transformadas por esferoplastos seguiu-se o seguinte protocolo:

- Adicionou-se 10 volumes de solução PEG/CaCl₂ agitando-se levemente. A amostra foi deixada a temperatura ambiente por 30 minutos.

- Posteriormente as amostras foram centrifugadas a 4000rpm durante 5 min.

- O sobrenadante foi parcialmente descartado, sendo deixado apenas 150 ul nas amostras transformadas com o DNA e 300 µl na amostra separada para controle negativo e positivo.

Para as amostras de esferoplastos transformadas pela metodologia de Acetato de Lítio seguiu-se o seguinte protocolo:

- Adicionou-se a cada amostra 0,6 ml de PEG/LiAc e vortexou-se brevemente.

- As amostras foram incubadas a 28°C durante 1h e 200rpm.

- Foi realizado o choque térmico em banho-maria a 42°C durante 35 minutos,e posterior banho em gelo por 2 minutos.

- As amostras foram centrifugadas a 4000rpm durante 5 minutos.

- O sobrenadante foi parcialmente descartado, sendo deixado apenas 150 ul nas amostras transformadas com o DNA e 300 ul na amostra separada para controle negativo e positivo.

Ao final das transformações obtivemos:

- 1 eppendorf contendo as células do inoculo 01 transformadas pelo método de esferoplasto(150 ul)

- 1 eppendorf contendo as células do inoculo 01 transformadas pelo método de LiAc (150 ul).

- 1 eppendorf contendo as células provenientes do inoculo 01 que serão utilizadas no controle positivo e negativo (300 ul).

- 1 eppendorf contendo as células do inoculo 02 transformadas pelo método de esferoplasto(150 ul)

- 1 eppendorf contendo as células do inoculo 02 transformadas pelo método de LiAc (150 ul).

- 1 eppendorf contendo as células provenientes do inoculo 02 que serão utilizadas no controle positivo e negativo (300 ul).

Todas as amostras foram plaqueadas em meio YPD/Sorbitol.

- Para o controle foram utilizados 150 ul das células em placa contendo geneticina (controle negativo), e 150 ul em placas sem geneticina (controle positivo).

- Todas as placas foram incubadas a 28°C.

Anexo 5: EXTRAÇÃO DE RNA COM FENOL ÁCIDO

- Primeiramente, a biomassa foi lavada com 5ml de H₂O mili-q autoclavada gelada, e em seguida peletada novamente por centrifugação a 4000rpm durante 5 minutos.

- Em seguida o sobrenadante foi descartado e a biomassa foi ressuspensa por pipetagem após adição de 500ul de TES. Posteriormente foram adicionados 500ul de fenol ácido e vortexou-se durante 10 segundos. Em relação a quantidade de TES e fenol ácido utilizado, estas foram variáveis, dependendo da quantidade de biomassa utilizada na extração. Para otimizar a extração, a cada 25mg de biomassa, eram utilizados 500ul de TES e 500ul de fenol ácido-quente. Como exemplo, em caso de termos 50mg de biomassa usaremos 1ml de TES e 1ml de fenol ácido.
- Após vortexada, a amostra foi incubada em banho-maria a 65°C durante 50 minutos, vortexando a cada 10 minutos. Após os 50 minutos a amostra foi colocado no gelo por 5 minutos e em seguida peletada por centrifugação a 4000rpm durante 5 minutos e 4°C.
- Desta vez a fase aquosa é transferido para tubos de plástico de 1,5 ml e adicionados 500ul de fenol ácido-quente. A solução foi vortexada e colocada no gelo por 5 minutos, sendo em seguida centrifugada a 12.000rpm, durante 5 minutos e 4°C.
- Novamente a fase aquosa foi transferida para um novo tubo de plástico sendo adicionados 500ul de clorofórmio, vortexando em seguida. A solução foi centrifugada a 12.000rpm, durante 5 minutos e 4°C.
- A fase aquosa foi retirada e transferida para novo tubo de plástico, onde foram adicionados 40ul de Acetato de Sódio 3M e 1ml de Etanol 100%. A solução foi vortexada e armazenada a -80°C durante 2hr. Em seguida a solução foi centrifugada a 12.000rpm, durante 30 minutos e 4°C.
- O sobrenadante foi descartado e o pellet lavado com Etanol 70% gelado preparado com H₂O DEPC. Em seguida a solução foi centrifugada a 12.000rpm, durante 5 minutos e 4°C.
- Ao final o pellet de RNA é ressuspensa em 50ul de H₂O DEPC e armazenado a -80°C.

