



Beatriz Temer

**“Expressão da xilose isomerase de *Propionibacterium acidipropionici*
em *Saccharomyces cerevisiae* visando a produção de etanol de
segunda geração.”**

**CAMPINAS
2014**



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

BEATRIZ TEMER

“Expressão da xilose isomerase de *Propionibacterium acidipropionici* em *Saccharomyces cerevisiae* visando a produção de etanol de segunda geração”

Este exemplar corresponde à
redação final da DISSERTAÇÃO
defendida pela candidata

BEATRIZ TEMER

e aprovada pela Comissão
Julgadora.

DISSERTAÇÃO apresentada ao Instituto de
Biologia da UNICAMP para obtenção do
Título de Mestra em Genética e Biologia
Molecular, na área de Genética de
Microorganismos.

Orientador: Prof. Dr. Gonçalo Amarante Guimarães Pereira

CAMPINAS,
2014

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

T24e Temer, Beatriz, 1988-
Expressão da xilose isomerase de *Propionibacterium acidipropionici* em *Saccharomyces cerevisiae* visando a produção de etanol de segunda geração / Beatriz Temer. – Campinas, SP : [s.n.], 2014.

Orientador: Gonçalo Amarante Guimarães Pereira.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Lignocelulose. 2. Xilose isomerase. 3. Expressão heteróloga. 4. *Saccharomyces cerevisiae*. 5. *Propionibacterium acidipropionici*. I. Pereira, Gonçalo Amarante Guimarães, 1964-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Expression of a xylose isomerase from *Propionibacterium acidipropionici* in *Saccharomyces cerevisiae* aiming the production of lignocellulosic ethanol

Palavras-chave em inglês:

Lignocellulose

Xylose isomerase

Heterologous expression

Saccharomyces cerevisiae

Propionibacterium acidipropionici

Área de concentração: Genética de Microorganismos

Titulação: Mestra em Genética e Biologia Molecular

Banca examinadora:

Gonçalo Amarante Guimarães Pereira [Orientador]

Rosana Goldbeck

Jörg Kobarg

Data de defesa: 18-02-2014

Programa de Pós-Graduação: Genética e Biologia Molecular

Campinas, 18 de fevereiro de 2014

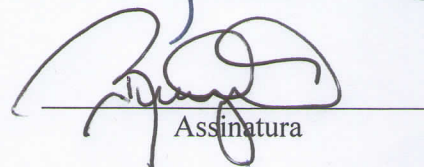
BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Gonçalo Amarante Guimarães Pereira (orientador)



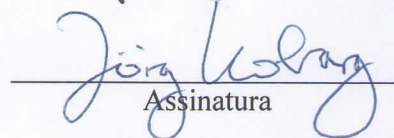
Assinatura

DRA. ROSANA GOLDBECK



Assinatura

Dr. Jörg Kobarg



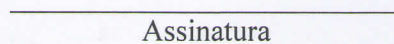
Assinatura

Prof. Dr. Fabio Papes



Assinatura

Prof. Dr. Jonas Contiero



Assinatura

RESUMO

Um dos principais desafios a serem superados para que a produção de etanol lignocelulósico seja viável é a obtenção de um micro-organismo capaz de fermentar pentoses e hexoses de maneira eficiente. A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é o principal micro-organismo utilizado nas fermentações industriais, devido à sua alta eficiência no consumo de glicose e tolerância às altas concentrações de etanol. Entretanto, linhagens selvagens dessa levedura não são capazes de consumir pentoses naturalmente. Desta maneira, a expressão heteróloga de genes que possibilitem o consumo de pentoses em *S. cerevisiae* é uma abordagem interessante que vem sendo desenvolvida por diversos grupos de pesquisa. A xilose é o açúcar de cinco carbonos presente em maior porcentagem nos materiais lignocelulósicos e é consumida pelos organismos através de duas vias principais, a via da xilose isomerase (XI) e a via oxi-redutiva. A bactéria *Propionibacterium acidipropionici*, industrialmente interessante por produzir ácido propiônico, foi estudada neste trabalho com relação à sua capacidade de consumir xilose. A partir dos ensaios de fermentação realizados, foi possível comprovar que ela é capaz de consumir este açúcar na mesma proporção que a glicose. A análise de dados genômicos de *P. acidipropionici* indicou que a via da XI é a utilizada para o consumo de xilose. Assim, o gene *xylA*, que codifica a XI de *P. acidipropionici*, foi expresso em uma linhagem industrial de *S. cerevisiae*. Após a realização de testes fermentativos foi possível constatar que a linhagem construída não apresentou consumo de xilose. Apesar da expressão do gene *xylA* ser comprovada, não foi possível detectar atividade enzimática da XI, resultados que fornecem indícios de que a proteína pode não estar sendo sintetizada ou, caso esteja sendo sintetizada, não é funcional. Mais de 36 XIs provenientes de organismos diferentes já foram expressas em *S. cerevisiae*, dentre essas apenas 12 foram funcionalmente expressas. As causas da não funcionalidade na maioria das tentativas de expressão heteróloga das XIs são desconhecidas. Entretanto, alguns trabalhos afirmam que esse fenômeno

pode estar relacionado ao enovelamento incorreto da xilose isomerase em *S. cerevisiae*. Desta forma, a expressão de genes que codificam chaperonas específicas é uma estratégia promissora para a obtenção de uma xilose isomerase funcional.

ABSTRACT

One of the main challenges to be overcome to enable the production of lignocellulosic ethanol is the development of a microorganism capable of fermenting pentoses and hexoses efficiently. Currently the yeast *Saccharomyces cerevisiae* is the main microorganism used in industrial fermentations due to its high efficiency in glucose uptake and tolerance to high concentrations of ethanol; however, it is not able to consume pentoses naturally. Thus the heterologous expression of genes that allow the pentose consumption in *S. cerevisiae* is an interesting approach that has been developed by several research groups. Xylose is the main component in lignocellulosic biomass, and is consumed by organisms through two main pathways, the xylose isomerase (XI) pathway and the oxy-reductive pathway. The bacterium *Propionibacterium acidipropionici* is industrially interesting for its production of propionic acid, and was studied in this work with respect to its ability to consume xylose. Fermentation assays conducted proved that these bacteria can consume xylose in the same proportion as glucose. The analysis of genomic data from *P. acidipropionici* indicated that the XI pathway is used to ferment xylose, in this manner the *xylA* gene encoding this species XI was expressed in an industrial strain of *S. cerevisiae*. After conducting fermentation tests it was found that the strain developed was not able to consume xylose even though the XI gene was expressed in the yeast. Moreover, it was not possible to detect enzymatic activity of XI, indicating that the protein is probably not being synthesized or it is not functional. Over 36 XIs from different organisms have been expressed in *S. cerevisiae*, among these only 12 were functionally expressed. The causes of non-functionality in most attempts at heterologous expression of the XIs are unknown, however, some studies claim that this event may be related to the absence of chaperones, which assist the correct folding of proteins. Thus the expression of genes that encode specific chaperone is a promising strategy to obtain functional expression of these XIs.

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	1
2. OBJETIVOS	12
3. MATERIAL E MÉTODOS	13
3.1 Material biológico.....	13
3.2 Meios de cultura	13
3.3 Condições de cultivo	14
3.4 Plasmídeos	14
3.5 Extração de DNA genômico de <i>P. acidipropionici</i>	15
3.6 Extração de DNA genômico de <i>S. cerevisiae</i>	15
3.7 Extração de DNA plasmidial em mini escala (miniprep).....	16
3.8 Preparação de bactérias eletrocompetentes	16
3.9 Transformação de <i>E. coli</i> (Eletroporação).....	17
3.10 Transformação de levedura (Acetato de lítio)	17
3.11 Extração de proteínas totais intra-celulares de <i>S. cerevisiae</i>	18
3.12 Determinação da atividade enzimática da XI	18
3.13 Determinação de proteínas totais.....	19
3.14 Purificação de produtos de PCR.....	19
3.15 Fermentação de <i>P. acidipropionici</i>	19
3.16 Oligonucleotídeos iniciadores	20
3.17 Construção do cassete da XI.....	21
3.18 Superexpressão de <i>XKS1</i>	22
3.19 Deleção de <i>GRE3</i>	22
3.20 Remoção do marcador auxotrófico <i>URA3</i>	23
3.21 Fermentação de <i>S. cerevisiae</i>	23
3.22 Extração de RNA de <i>S. cerevisiae</i>	24
3.23 Construção de cDNA e PCR	24
3.24 Quantificação dos produtos da fermentação.....	24
3. 25 Sequenciamento das amostras de DNA.....	25
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	27
4.1 Avaliação do consumo de xilose por <i>P. acidipropionici</i>	27
4.2 Vias metabólicas para consumo de xilose em <i>P. acidipropionici</i>	31
4.3 Construção do cassete de expressão de <i>xylA</i>	33
4.4 Construção da linhagem industrial de <i>S. cerevisiae</i> capaz de consumir xilose.....	35
4.4.1 Superexpressão de <i>XKS1</i>	36
4.4.2 Deleção de <i>GRE3</i>	37
4.4.3 Inserção de <i>xylA</i>	38
4.5 Testes fenotípicos	39
4.6 Otimização dos códons de <i>xylA</i> de <i>P. acidipropionici</i>	41
4.7 Construção de novas linhagens de A1 com gene <i>xylA</i> otimizado	43
4.9 Testes de engenharia evolutiva.....	47
4.10 Extração de RNA de linhagens de <i>S. cerevisiae</i>	49
4.11 Determinação da atividade enzimática da XI	51
4.12 Expressão heteróloga da XI de <i>P. Acidipropionici</i> em <i>E. coli</i>	52
4.13 Desafios da expressão heteróloga da XI de <i>P. acidipropionici</i> em <i>S. cerevisiae</i>	55

5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS.....	60
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61

“The only true wisdom is in knowing you know nothing.”

Sócrates.

AGRADECIMENTOS

À minha família, em especial a minha mãe Leda Temer, meu pai Marco Antônio Temer, *in memoriam*, a minha irmã Thaís Temer, e meus avós Luiz Simões da Cunha e Maria Adelaide Simões da Cunha, por todo o apoio, carinho, atenção, dedicação, paciência e por todo amor, não apenas durante meu mestrado, mas também durante toda a minha vida. Devo à eles tudo que sou hoje, por serem minha inspiração, meu porto seguro, meu amor incondicional, meu tudo.

Ao meu amado namorado, Bruno Benite, pelo companheirismo e paciência incondicionais ao longo dos anos, pela compreensão em todos os momentos e por apoiar todas as minhas decisões, até mesmo quando elas pareciam ser desprovidas de qualquer sentido. Sua ajuda, amor e carinho em todos os momentos foram fundamentais para que eu pudesse dar continuidade à minha jornada.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Gonçalo Amarante Guimarães Pereira, pela orientação, dedicação e atenção durante todo o meu mestrado. Sua energia, sabedoria, motivação e empreendedorismo foram essenciais durante esses dois anos, de forma que faltam palavras para agradecer pela oportunidade concedida.

Ao Leandro Santos, por todo o apoio e discussões sobre meu projeto, pela paciência sempre que precisei de ajuda, pela atenção em todos os momentos e, principalmente, pela amizade. Sua dedicação e competência me surpreendem a cada dia, e a sua ajuda foi essencial para o desenvolvimento deste trabalho.

À Karina Yanagui, por toda a força nos momentos de desespero e tranquilidade, pelos seus sempre sábios conselhos e por ter dedicado seu tempo todas as vezes que precisei de ajuda. Agradeço, ainda, pela amizade e companhia nos cafés diários e açaís semanais, sempre tornando os meus dias mais agradáveis.

Ao Victor Augusti Negri, por todo o apoio desde o meu primeiro dia de trabalho no laboratório, por toda a ajuda nos experimentos e pela inesgotável paciência, fornecendo explicações quantas vezes fossem necessárias, bem como por todas as conversas e pelo companheirismo. Uma amizade valiosa, que me fará falta.

Ao Gleidson Teixeira, pela amizade, por compartilhar comigo conhecimentos sobre os

mais diversos assuntos e por suas valiosas sugestões.

À Eliane Laranja Dias, Silvia Kazue Missawa e Mariana Cerqueira por todo o apoio, paciência, carinho e dedicação, sempre dispostas a ajudar nos mais diversos assuntos.

À todos os integrantes do Laboratório de Genômica e Expressão (LGE), pela amizade e apoio na realização deste trabalho. Agradeço em especial à Angélica M. Gomes, Antônio Pedro Camargo, André Prause, Aline Rodrigues, Bruno Vaz de Oliveira, Beatriz Leite, Camila Cristina Juliatto, Daniela Thomazella, Elaine Soligo Arruda, Eduardo Camargo (Zezé), Ernestina Aparecida Rosa, Giselle de Arruda Rodrigues, Gabriel Fiorin (Doug), Gabriel Santello, Guilherme Borelli, Igor Oliveira, Jorge Lepkison Neto, Luige Llerena Calderon, Ludimila Dias, Marcelo F. Carazzolle, Maria Carolina Grassi, Marcela Salazar, Marina Pessoa, Marcelo Bassalo (Nove), Mateus Nunes, Nádia Sampaio, Osmar Vaz de Carvalho, Odalys G. Cabrera, Paula Padro, Patricia Lopez, Paulo Henrique Martins Netto, Pedro Tizei e Welbe Oliveira Bragança, por toda ajuda durante esses dois anos e pela companhia divertida que fez com que meus dias fossem mais prazerosos.

Ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), pela estrutura disponibilizada.

À FAPESP (processo 2012/05827-8), pelo apoio financeiro.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- 2- DG: 2-deoxiglicose
- 5-FoA: ácido 5- Fluoro-orótico
- AR: aldose redutase
- CAI: índice de adaptação dos códons
- HPLC: Cromatografia Líquida de Alta Pressão
- IPTG: isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside
- KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
- OD: densidade ótica
- PCR: reação da polimerase em cadeia
- PPP: via da pentose fosfato
- X-Gal: 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside
- XI: xilose isomerase
- XIO: xilose isomerase otimizada
- XDH: xilitol desidrogenase
- XK: xiluloquinase
- XR: xilose redutase

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Com o anúncio da diminuição na exploração de petróleo feito pela OPEC (Organização dos Países Exportadores de Petróleo), no início dos anos 80, houve um encarecimento considerável no valor dos combustíveis fósseis e, também, um aumento pela busca por combustíveis alternativos produzidos a partir de fontes renováveis e economicamente viáveis (Galbe & Zacchi 2002). A produção de biocombustíveis no Brasil passou a ter visibilidade a partir de 1975, quando foi instaurado o Proálcool (Programa Nacional do Álcool), um programa de incentivo do governo à substituição de combustíveis derivados do petróleo por etanol (Goldemberg 2007).

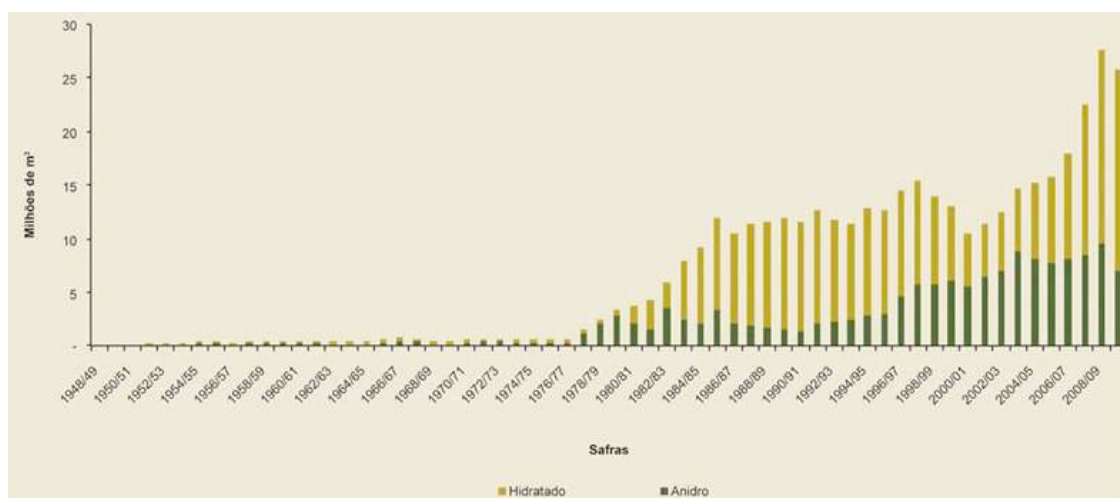


Figura 1: Gráfico ilustrando o aumento na produção de etanol a partir de 1975. Com a criação do Próálcool houve um aumento significativo na produção de etanol produzido a partir da cana de açúcar no país como pode ser observado neste gráfico obtido em relatório elaborado pelo MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento) desenvolvido no ano de 2010.

Nesse contexto, o etanol produzido a partir da cana-de-açúcar conquistou rapidamente seu espaço no mercado, e o país se tornou uma das principais potências no ramo dos biocombustíveis, na **Figura 1** pode ser observado o aumento na produção de etanol a partir da cana-de açúcar no país (Goldemberg 2007). Porém, a demanda para a produção de combustíveis gerados a partir de

fontes renováveis aumenta significativamente a cada ano. Dados coletados pela Agência Internacional de Energia (AIE), em relatório elaborado em 2013, colocam o Brasil como um dos principais países exportadores de biocombustíveis nos próximos anos, com previsões de que em 2035 o país será responsável por 40% do comércio mundial deste produto. Para que essa demanda possa ser cumprida, torna-se necessário o desenvolvimento de novas tecnologias para geração de energia, a partir de fontes renováveis que sejam economicamente viáveis.

Materiais lignocelulósicos, provenientes da agricultura ou de manejo florestal, são as maiores fontes de hexoses (C-6) e pentoses (C-5) com alto potencial para produção de biocombustíveis (Kaparaju et al. 2009). Tais materiais são considerados fontes renováveis de energia, encontrados em abundância e que apresentam baixo custo com relação aos combustíveis fósseis, características importantes a serem consideradas, uma vez que as vantagens ambientais devem ser combinadas com preços competitivos para que haja um interesse da população em utilizar tais fontes renováveis de energia (Balat & Balat 2009; Kim & Dale 2004; Cadenas & Cabezero 1998).

Assim, a utilização de etanol de segunda geração, ou etanol lignocelulósico, surge como uma tecnologia alternativa para complementar o processo tradicional de produção de etanol realizado a partir da fermentação da sacarose presente na cana-de-açúcar (etanol de primeira geração). Uma das principais matérias primas com potencial para a produção do etanol lignocelulósico no país é a palha da cana-de-açúcar. Desde a substituição da metodologia utilizada para colheita da cana, anteriormente feita através de queimadas, por um sistema mecanizado, ocorre um acúmulo da palha da cana no campo que não é utilizada. Esta palha apresenta um alto potencial de produção de etanol, de tal forma que diversos estudos já estão sendo desenvolvidos para aperfeiçoar sua utilização no processo industrial de produção de etanol lignocelulósico (Pippo et al. 2010).

O processo de produção de etanol de segunda geração pode ser dividido em quatro etapas principais, como pode ser observado na **Figura 2**. Inicialmente o material lignocelulósico deve passar por um pré-tratamento, onde a parede celular é quebrada liberando celulose, hemicelulose e lignina, em seguida este material pré-tratado passará por uma hidrólise enzimática onde celulasas e hemicelulasas irão atuar liberando os monômeros de açúcar, **Figura 3**, que, em uma terceira etapa serão fermentados à etanol através da ação de micro-organismos especializados, e, finalmente, o etanol será destilado e destinado para a comercialização (Laluce et al. 2012; Viikari et al. 2012).

Todas essas etapas encarecem o processo, e conseqüentemente, o valor final do produto, de tal forma que estudos que visem otimizar cada uma delas é essencial para que o etanol lignocelulósico seja economicamente viável. Levando em consideração que a fermentação com uma alto rendimento e produção dos açúcares presentes no hidrolisado é um dos principais desafios do processo essa etapa é altamente estudada.

A lignocelulose é composta por três componentes principais: celulose (40 a 50%), hemicelulose (25 a 35%), e lignina (15 a 20%) (Kaparaju et al. 2009; Galbe & Zacchi 2002). A hemicelulose é formada por uma cadeia de açúcares altamente ramificada e diferentemente da celulose (polímero composto apenas de glicose), é considerada um heteropolímero composto geralmente por D-xilose, D-glicose, D-manose, D-galactose e L-arabinose (Saha 2003). Dessa maneira a conversão da biomassa lignocelulósica a etanol é mais difícil, uma vez que ela é altamente resistente à decomposição e, quando decomposta, são liberados açúcares de diferentes tipos, bem como substâncias tóxicas que podem inibir a atividade dos micro-organismos que irão realizar a fermentação.

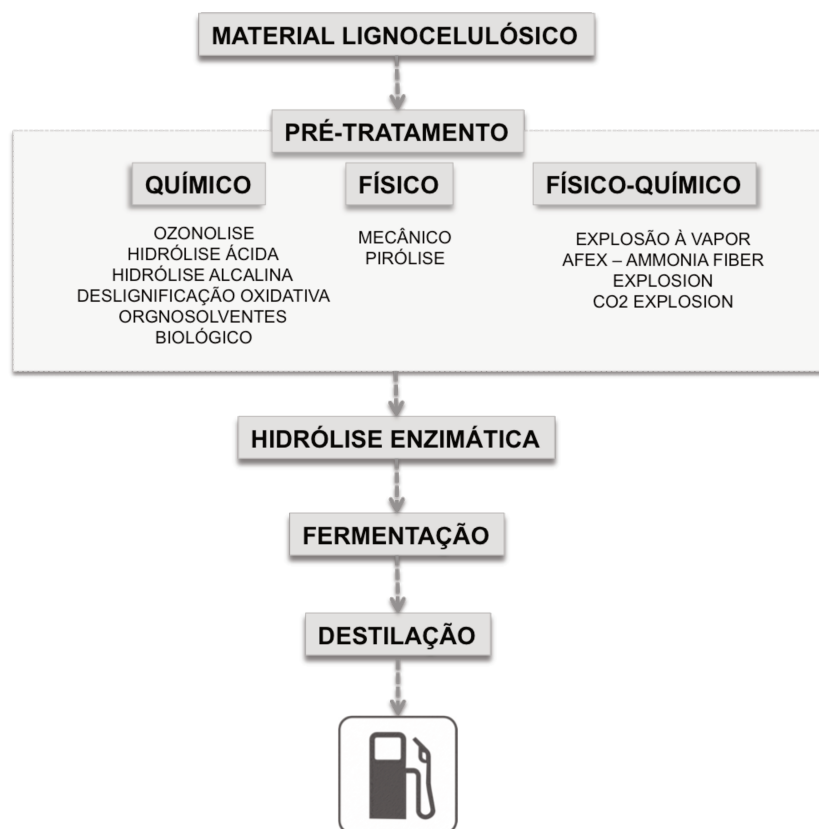


Figura 2: Fluxograma da produção de etanol de segunda geração. Na figura podem ser observados as etapas de produção de etanol lignocelulósico: o pré-tratamento, que pode ser físico, químico ou físico-químico como exemplificado na figura, a hidrólise enzimática, a fermentação e a destilação para posterior comercialização.

Logo, a utilização de micro-organismos capazes de fermentar pentoses e hexoses, e que apresentem resistência aos compostos tóxicos presentes no material hidrolisado, é essencial para a viabilização do processo (Balat & Balat 2009). Os principais micro-organismos utilizados na fermentação alcoólica são bactérias e leveduras. Dentre as bactérias, a *Zymomona mobilis*, uma bactéria gram negativa que possui alta eficiência com baixo consumo de energia e alto rendimento de etanol, é a mais promissora (Madigan et al. 2010). Entretanto, características como o tamanho, a presença de uma parede celular espessa, o crescimento ótimo em pH ácido, requerimentos nutricionais pouco rigorosos, alta resistência à contaminação e tolerância a altas concentrações de etanol, tornam as leveduras os micro-organismos mais bem adaptados para utilização em fermentações industriais (Tomás-Pejó et al. 2008; Jeffries 2006).

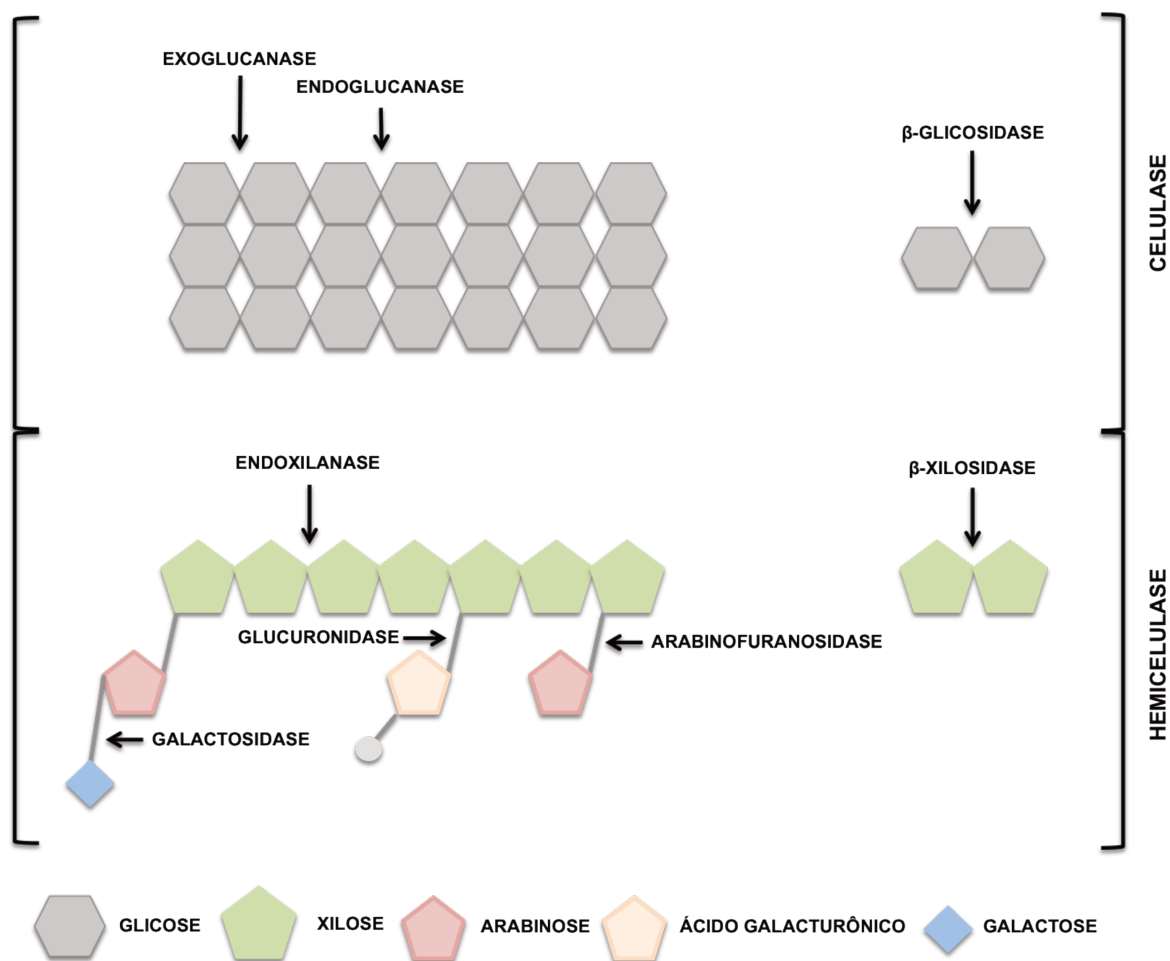


Figura 3: Esquema indicando a ação das celulasas e hemicelulasas. Esquema indicando as principais enzimas utilizadas durante a hidrólise enzimática e sua atuação na clivagem dos polímeros e liberação dos monômeros de açúcar.

Espécies de leveduras pertencentes aos gêneros *Saccharomyces*, *Kluyveromyces* e *Candida* podem ser utilizadas na produção de etanol, porém a *Saccharomyces cerevisiae* é a principal levedura empregada em fermentações industriais. Essa levedura pertence ao grupo dos ascomicetos e é amplamente estudada devido à sua aplicação não apenas à produção de etanol, mas também na indústria alimentícia, na panificação e produção de bebidas alcoólicas (Madigan et al. 2010). A utilização de *S. cerevisiae* na fermentação de hidrolisados lignocelulósicos pode ser vantajosa uma vez que essa levedura, principalmente as linhagens industriais, apresenta certa

tolerância aos compostos inibidores presentes no hidrolisado. No entanto, elas também apresentam a desvantagem de não serem capazes de consumir pentoses naturalmente (Zaldivar et al. 2001; Chandrakant & Bisaria 2000; Olsson & Hahn-Hägerdal 1993).

Outros micro-organismos conhecidos são capazes de fermentar pentoses, porém, em sua grande maioria, não apresentam uma alta eficiência na produção de etanol como as *Saccharomyces* industriais utilizadas atualmente. Algumas bactérias como *Escherichia coli*, *Zymomonas mobilis* e *Klebsiella oxytoca*, já foram estudadas com relação à sua capacidade de metabolizar pentoses à etanol, porém a eficiência desse processo ainda é muito baixa, e a utilização de bactérias apresenta desvantagens, impedindo que se torne uma alternativa competitiva (Golias et al. 2002; Doran et al. 2000; Zhang et al. 1995). Algumas leveduras são conhecidas por fermentar xilose naturalmente, como *Pichia stipitis*, *Candida shehatae*, e *Pachysolen tannophilus*, porém elas apresentam características que inviabilizam sua utilização na fermentação alcoólica, como intolerância a altas concentrações de etanol, sensibilidade a inibidores e a variações no pH (Hahn-Hägerdal et al. 1994).

Desta forma a levedura *S. cerevisiae* ainda é a melhor opção para ser utilizada em fermentações industriais, e apesar de não ser capaz de metabolizar xilose naturalmente, ela apresenta toda a maquinaria necessária para conversão de xilulose à etanol. Assim, a introdução de uma via em *S. cerevisiae* que possibilite a conversão de xilose em xilulose é necessária para viabilizar o metabolismo da xilose nessa espécie (Cai et al. 2012; Eliasson et al. 2000; Jeffries & Shi 1999). Diversos estudos desenvolvidos com *S. cerevisiae*, visam tornar essa levedura eficiente não apenas para a fermentação de glicose, mas também de xilose. A expressão de genes que codificam as principais enzimas envolvidas no consumo de xilose é a principal estratégia utilizada (Zhou 2011).

Desta forma, existem dois mecanismos principais pelos quais a xilose pode ser consumida,

e que podem ser expressos em *S. cerevisiae*, como pode ser observado na **Figura 4**. O primeiro deles ocorre principalmente em fungos filamentosos e leveduras, onde inicialmente a xilose é reduzida a xilitol através da ação da enzima xilose redutase (XR), e em seguida o xilitol é oxidado pela ação da xilitol desidrogenase (XDH). O segundo mecanismo é encontrado principalmente em bactérias, e compreende na isomerização da xilose diretamente à xilulose, através da ação da enzima xilose isomerase (XI) (Hahn-Hägerdal et al. 2001).

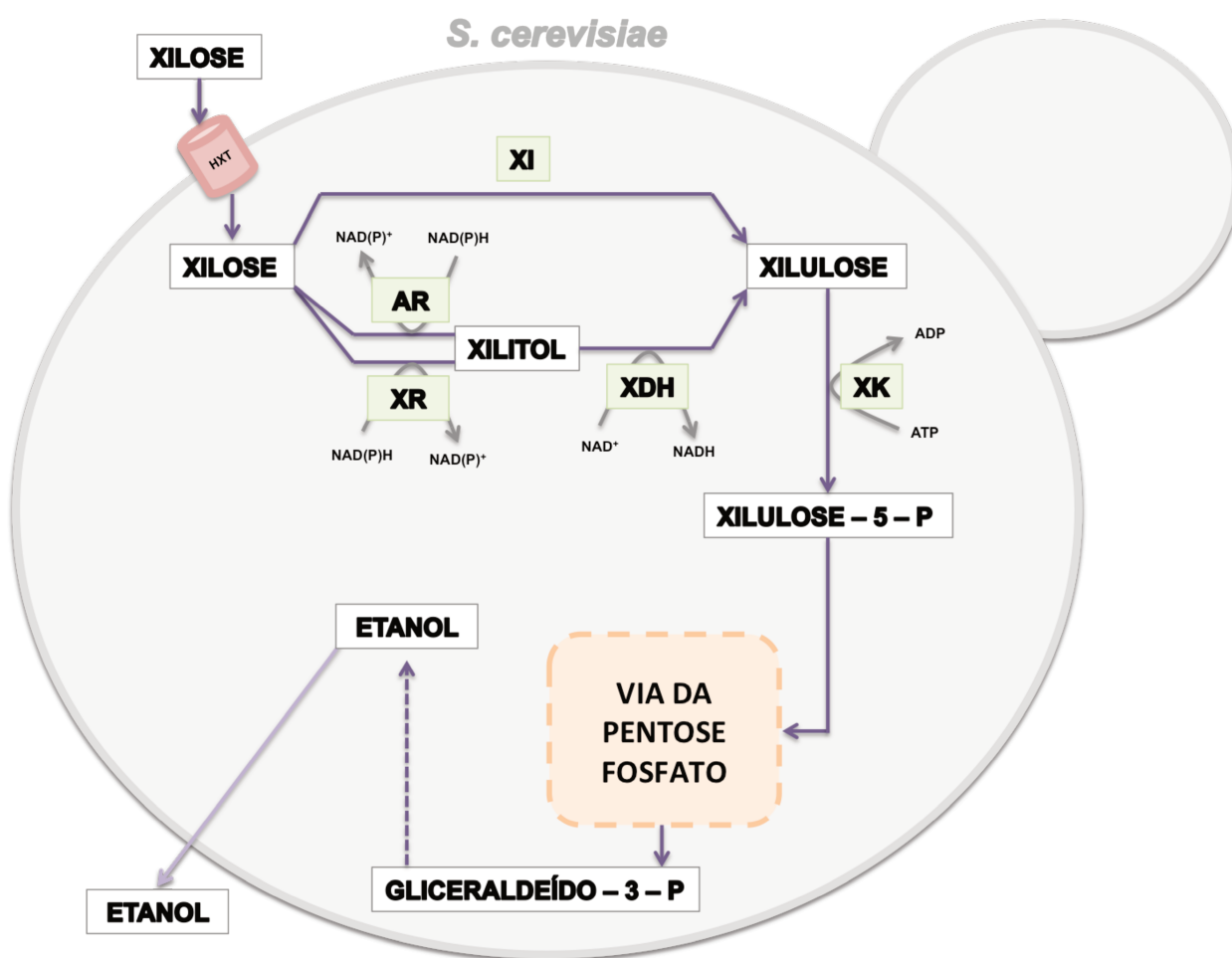


Figura 4: Esquema das vias de consumo de xilose e fermentação da mesma a etanol em *S. cerevisiae*. Esquema indicando as duas principais vias de consumo de xilose nos organismos, a via da xilose isomerase e a via oxi-redutiva, bem como um esquema simplificado do metabolismo dessa pentose no interior da levedura. HXT: transportador de açúcares da família HXT; XI: xilose isomerase; XR: xilose redutase; XDH: xilitol desidrogenase; AR: aldose redutase; XK: xiluloquinase

Alguns outros genes são essenciais para obter uma alta taxa de especificidade na produção de etanol por *S. Cerevisiae* utilizando xilose como fonte de carbono, sendo que o principal deles é o gene *XKSI*, responsável pela codificação de uma xiluloquinase, enzima que fosforila a D-xilulose à D-xilulose-5-fosfato que será metabolizada pela via das pentoses fosfato (van Hoek P et al. 2000; Richard et al. 2000). A presença de apenas uma cópia do gene *XKSI* no genoma da levedura não garante que o fluxo do sistema será direcionado para a produção de etanol, de tal forma que para assegurar a conversão da xilose à etanol é interessante realizar uma superexpressão de *XKSI* (Zhou 2011).

A via das pentoses fosfato é essencial para que o metabolismo de pentoses ocorra, uma vez que ela é o único caminho conhecido para introduzir a xilulose ao metabolismo central do etanol. As principais enzimas envolvidas nesse ciclo são a ribulose-5-fosfato isomerase, a ribulose-5-fosfato epimerase, a transquetolase e a transaldolase, codificadas pelos genes *RKII*, *RPEI*, *TKLI* e *TALI*, respectivamente. É comprovado que a superexpressão desses genes pode ampliar o consumo de xilulose por *S. cerevisiae* (Zhou 2011). Tais técnicas de engenharia genética da levedura *S. cerevisiae* tem sido amplamente aplicadas em estudos que visam otimizar a produção de etanol à partir de pentoses.

Em um estudo desenvolvido por Ho e colaboradores (1998) os genes *xyII* e *xyI2* que codificam as enzimas XR e XDH, respectivamente, de *P. stipitis* foram expressos em *S. cerevisiae*, permitindo o consumo de xilose pela levedura, porém com um rendimento na produção de etanol muito aquém do esperado. Tal fenômeno provavelmente decorre de um desequilíbrio entre os cofatores essenciais para o funcionamento das duas enzimas envolvidas no processo, uma vez que a XR utiliza tanto NADH quanto NADPH, porém tem preferência pelo cofator NADPH, enquanto a XDH utiliza exclusivamente o cofator NAD^+ , tendo, portanto, seu desempenho prejudicado, gerando um acúmulo de xilitol no interior da levedura (Peng et al. 2012; Zhou 2011).

Esse desequilíbrio é o principal problema enfrentado durante a otimização do consumo de xilose por *S. cerevisiae* que apresentam os genes de XR e XDH (Peng et al. 2012). Além disso a XR apresenta baixa afinidade com xilose, sendo necessária uma alta concentração intra-celular desse açúcar para que sua utilização seja eficiente (Hahn-Hägerdal et al. 2001). Deste modo, a expressão funcional de uma XI em *S. cerevisiae* é uma abordagem lógica, uma vez que é uma via simples, que ignora o desequilíbrio de co-fatores e apresenta um rendimento final de etanol superior ao da via oxi-redutiva (Zhou 2011).

O gene *xylA* que codifica a XI do fungo *Piromyces sp.*, primeiro eucarioto relatado que apresenta a via da XI, foi o primeiro a ser expresso com sucesso em *S. cerevisiae* (Kuyper et al. 2003; van Hoek P et al. 2000). As XIs de *Orpinomyces*, um fungo anaeróbico, e das bactérias, *Clostridium phytofermentans* e *Bacteroides thetaiotaomicron*, também são exemplos de enzimas que foram expressas em *S. cerevisiae* e apresentaram atividade satisfatórias (Zhou 2011). No entanto, as *S. cerevisiae* desenvolvidas, que possuem o gene da XI, apresentam desempenhos muito inferiores ao esperado, sendo necessário o desenvolvimento de estudos aprofundados no tema, que visem aperfeiçoar cada vez mais a engenharia genética dessa levedura para possibilitar sua aplicação em processos de produção de etanol lignocelulósico.

A xilose isomerase (E.C.5.3.2.5) é, portanto, uma enzima que catalisa a isomerização reversível de D-xilose a D-xilulose, ela pode ser conhecida também como D-xilose ketoisomerase ou glicose isomerase devido à sua capacidade de catalisar a conversão de glicose à frutose (Hahn-Hägerdal et al. 2001). A maioria das XIs previamente descritas apresentam características semelhantes, como a dependência de cofatores enzimáticos, geralmente cátions bivalentes como Mg^{2+} , Mn^{2+} e Co^{2+} , além disso, a grande maioria delas formam tetrâmeros e apresentam inibição de sua atividade na presença de xilitol (Gárdonyi & Hahn-Hägerdal 2003).

Tendo essa inibição em vista, outra estratégia utilizada no desenvolvimento de *S.*

cerevisiae capazes de consumir xilose através da inserção da XI, é a deleção do gene *GRE3*, responsável pela codificação de uma aldose redutase (AR), que durante o metabolismo da xilose pode converter esse açúcar em xilitol composto que será acumulado no interior da célula, desviando o fluxo de carbono da produção de etanol, além de interferir no desempenho da XI (Träff et al. 2001).

Atualmente, a prospecção por novas XIs que possam apresentar um desempenho melhor na conversão de xilose à etanol quando expressa em *S. cerevisiae* ainda é um tema abordado em diversos estudos que buscam nos mais diferentes micro-organismos enzimas ainda não estudadas que apresentem um potencial promissor para a conversão desse açúcar em etanol. A bactéria *Propionibacterium acidipropionici* apresenta uma ampla gama de aplicações industriais, sendo as principais a produção de ácido propiônico e vitamina B12. O ácido propiônico é uma substância importante para a síntese de fibras de celulose, produção de perfumes, herbicidas e fármacos. Devido ao fato de ser economicamente interessante, essa bactéria tem sido amplamente estudada, apresentando diversos trabalhos que descrevem suas necessidades nutricionais, condições de crescimento, e recentemente teve seu genoma publicado (Parizzi et al. 2012; Zhang & Yang 2009).

Alguns estudos desenvolvidos relatam que a *P. acidipropionici* é capaz de utilizar hidrolisados enzimáticos, que contém altas concentrações de xilose, como substrato para fermentação e produção de ácido propiônico (Carrondo et al. 1988; Ramsay et al. 1998) e, além disso, características como crescimento ótimo em temperaturas próximas a 30°C, pH 6,8, e em condições de anaerobiose a tornam interessante para o desenvolvimento de estudos de fermentação alcoólica a partir de pentoses, uma vez que suas enzimas devem apresentar atividade ótima em condições semelhantes às aquelas em que a levedura *S. cerevisiae* apresenta maior crescimento e produção de etanol, pH 5,5, 30°C e anaerobiose (Fox et al. 2012; Zhang & Yang

2009; Hsu & Yang 1991).

Frente a todas as informações apresentadas, é possível concluir que o desenvolvimento de estudos visando a otimização das etapas envolvidas no processo de produção de etanol lignocelulósico são fundamentais. Sendo a fermentação uma etapa essencial, seu aperfeiçoamento é indispensável para viabilizar o processo e, para isso, o desenvolvimento de leveduras tolerantes à inibição e capazes de fermentar todos os açúcares encontrados nos hidrolisados lignocelulósicos é o grande desafio para que o etanol lignocelulósico se torne uma fonte de energia viável. Desta maneira, o estudo desenvolvido neste trabalho, que visa a construção de uma levedura capaz de metabolizar xilose, é altamente relevante, não apenas academicamente, mas também no âmbito industrial e econômico.

2. OBJETIVOS

O presente trabalho tem como objetivo geral desenvolver uma levedura capaz de fermentar xilose de maneira eficiente através da expressão heteróloga da xilose isomerase de *Propionibacterium acidipropionici* em *Saccharomyces cerevisiae*.

Os objetivos específicos do trabalho são:

- Expressar a xilose isomerase de *P. acidipropionici* em uma linhagem industrial de *S. cerevisiae*;
- Superexpressar o gene XKS1, que codifica a xiluloquinase, tendo em vista otimizar o consumo de xilose por *S. cerevisiae*;
- Deletar o gene da aldose redutase (*GRE3*), com o intuito de evitar a utilização de xilose através de uma rota alternativa levando a produção e acúmulo de xilitol;
- Otimizar os códons do gene proveniente de *P. acidipropionici* de acordo com aqueles com maior frequência de utilização por *S. cerevisiae*;
- Avaliar o consumo de xilose pelas linhagens de *S. cerevisiae* construídas, bem como a dependência da xilose isomerase a cofatores enzimáticos durante a fermentação;
- Realizar procedimentos de engenharia evolutiva a partir das linhagens transformadas visando selecionar um mutante capaz de fermentar xilose com maior eficiência;
- Fazer a expressão heteróloga da xilose isomerase de *P. acidipropionici* em *E. coli* para posterior purificação e caracterização bioquímica da mesma.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material biológico

As linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* utilizadas no desenvolvimento do trabalho estão listadas a seguir:

FY23: linhagem haploide e *URA3Δ*, derivada de S288c;

A1: linhagem haploide e *URA3Δ*, obtida a partir de esporulação da linhagem diploide FGY050 (JAY270 *ura3Δ/ura3Δ* proveniente da PE-2).

JAY289: linhagem haploide obtida a partir de esporulação de linhagem selvagem JAY270.

As linhagens de *Escherichia coli* utilizadas durante o desenvolvimento do trabalho estão listadas a seguir:

DH5α: linhagem empregada na clonagem e multiplicação de plasmídeos.

Rosetta2: linhagem derivada de BL21 desenvolvida para aumentar as chances de expressão de proteínas que apresentam códons raros em *E. coli*. Possui tRNAs para os seguintes códons: AUA, AGG, AGA, CUA, CCC; GGA e CGG.

Durante o desenvolvimento do trabalho foi utilizada a linhagem ATCC4875 da bactéria *Propionibacterium acidipropionici*.

3.2 Meios de cultura

Os meios de culturas utilizados no trabalho estão descritos a seguir:

LB: 1% de triptona/peptona, 1% de extrato de levedura, 0,5% de NaCl e 1,5% de ágar, se sólido. Para a seleção de transformantes foram adicionados ao meio 100 µg/mL de ampicilina, 30 µg/mL de kanamicina, 30 µg/mL de cloranfenicol e 80 µg/mL de X-Gal, dependendo da marca de seleção utilizada. Meio padrão utilizado para o crescimento de bactérias.

YP: 1% extrato de levedura, 2% peptona, 2% fonte de carbono, 2% ágar caso necessário. Meio padrão utilizado para o crescimento de leveduras.

YNB: 0,67% YNB sem aminoácidos (Difco), 3% fonte de carbono de interesse (xilose e/ou glicose), 1% de solução *dropout*, uma mistura contendo concentrações conhecidas dos aminoácidos e bases nitrogenadas de interesse, nesse caso sem a suplementação de uracila. Para seleção de células com o gene *URA3* funcional, uracila não é adicionada ao meio. Para seleção de mutantes com o gene *URA3* deletado acrescenta-se uracila e 0,1% de 5-FoA (ácido 5- Fluoro-urótico). Meio mínimo sintético para crescimento de leveduras.

Meio PA: 2% de fonte de carbono de interesse (glicose e/ou xilose), 1% de extrato de levedura, 0,1% KH_2PO_4 , 0,2% $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, 0,1% Solução I (1% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,25% $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,5% $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,5% $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - deixar solução descansar por 24 horas), 0,1% solução II (1% $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 1% $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), ajustar pH para 6,8 com NaOH 10M, autoclavar. Meio utilizado para crescimento de *P. acidipropionici*.

3.3 Condições de cultivo

As linhagens de *S. cerevisiae* foram cultivadas a 30°C sob agitação (200/250 rpm). As linhagens de *E. coli* foram cultivadas a 37°C e 250 rpm. *P. acidipropionici* foi cultivada sob condições estacionárias e de semi-anaerobiose em tubos de centrifuga de 50 mL contendo 50 mL de meio em estufa a 30°C.

3.4 Plasmídeos

Os plasmídeos utilizados para o desenvolvimento do trabalho estão descritos a seguir:

pRS246: vetor circular obtido comercialmente, possui gene de resistência à ampicilina e gene *URA3*. Utilizado para expressão heteróloga do gene da xilose isomerase (*xylA*) de *P. acidipropionici* em *S. cerevisiae*.

pGem-T-easy: vetor linearizado obtido comercialmente (Promega), apresenta timinas em ambas as extremidades facilitando a clonagem de produtos de PCR que possuam adenina na região 3'. Possui gene de resistência à ampicilina e sítio de clonagem inserido no gene *lacZ*.

Utilizado para clonagem do gene *xylA* de *P. acidipropionici* para posterior clivagem e subclonagem em pETSUMO.

pETSUMO - versão Síncroton: vetor pET28a (Novagen) ligado a cauda SUMO (do pETSUMO original Invitrogen). Utilizado para expressão heteróloga de xilose isomerase de *P. acidipropionici* em *E. coli*.

pSH65: vetor de expressão da cre-recombinase. Utilizado nas deleções de *URA3* durante as construções das leveduras.

3.5 Extração de DNA genômico de *P. acidipropionici*

Para extração de DNA genômico da bactéria *P. acidipropionici* foi preparado um inóculo inicial que foi incubado a 30°C até atingir o final da fase exponencial. As células foram centrifugadas e ressuspensas em tampão TE pH 8,0 contendo 50 µL de lisozima (10 mg/mL), e incubadas sob leve agitação a 37°C *overnight*. Em seguida foram adicionados 70 µL de SDS 10% e 5 µL de Proteinase K (10 mg/mL), a solução foi incubada a 65°C durante 10 minutos, e em seguida adicionou-se 100 µL de uma solução de NaCl 5M e 100 µL de solução pré-aquecida a 65°C de CTAB/NaCl (0,8 g/L de brometo de citramina e 0,4 g/L de cloreto de sódio), a solução foi incubada por 10 minutos a 65°C. Foram adicionados 750 µL de solução de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1). A solução foi centrifugada e o sobrenadante transferido para um novo tubo, a este foi adicionado 0,6 volumes de isopropanol gelado, e mantido a -20°C por 30 minutos. Em seguida foi realizada uma centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* lavado 2 vezes com etanol 70% gelado e ressuspendido com H₂O ultrapura. A amostra de DNA foi armazenada a -20°C. Protocolo adaptado de Ausubel e colaboradores (2003).

3.6 Extração de DNA genômico de *S. cerevisiae*

Para extrair DNA genômico de *S. cerevisiae* as culturas de células foram cultivadas em meio YPD a 30°C e 250 rpm *overnight*. Elas foram centrifugadas e ressuspensas em tampão de

lise, foi adicionado um volume de pérolas de vidro ao tubo e uma solução contendo fenol : clorofórmio : álcool isoamílico (25:24:1), o tubo foi agitado vigorosamente em *vórtex* por 2 minutos para lisar as células. Foi realizada uma centrifugação e o sobrenadante foi transferido a um novo tubo, ao qual adicionou-se 0,1 volumes de NaAc 3M pH 5,3 e 2 volumes de etanol 100% gelado para precipitar os ácidos nucleicos, incubado a -20°C por 1 hora. A solução foi então centrifugada, o sobrenadante descartado, o *pellet* lavado com etanol 70% gelado, e, ressuspendido em H₂O ultrapura. DNA foi armazenado a -20°C. Protocolo adaptado de Ausubel e colaboradores (2003).

3.7 Extração de DNA plasmidial em mini escala (miniprep)

Para extração de DNA plasmidial de bactérias as colônias foram crescidas em meio LB (contendo o antibiótico adequado) a 37°C e 250 rpm *overnight*. As células foram centrifugadas e adicionou-se 100 µL de solução contendo EDTA pH 8,0, RNase (1 mg/mL) e tampão Tris-HCl pH 8,0, em seguida foi adicionado 200 µL de solução de NaOH 10M e SDS 10%, a solução foi homogeneizada e acrescentou-se 150 µL de solução contendo acetato de potássio 3M e ácido acético glacial 11,5%. A solução foi centrifugada e o sobrenadante foi transferido para um novo tubo, foi acrescentado etanol 100% gelado e mantido a -20°C por 30 minutos para garantir a precipitação. Após outra centrifugação o sobrenadante foi descartado e o *pellet* lavado com etanol 70%, em seguida, foi ressuspendido em H₂O ultrapura. O DNA plasmidial foi armazenado a -20°C.

3.8 Preparação de bactérias eletrocompetentes

As bactérias eletrocompetentes de *E. coli* DH5α e Rosetta2 foram preparadas de acordo com protocolo descrito em Sambrook & Russel (2001). Inicialmente foi realizado um pré-inóculo em 50 mL de meio LB, esse foi incubado *overnight* a 37°C e 250 rpm. Em seguida 25 mL do pré-inóculo foram transferidos para um erlenmeyer de 2 L contendo 475 mL de meio, esse foi

incubado a 300 rpm e 37°C até atingir a OD₆₀₀ de 0,35. Para interromper o crescimento celular o meio foi resfriado, em seguida as células foram centrifugadas o sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuscitado em H₂O ultrapura gelada. Em seguida as células foram centrifugadas novamente e ressuscitadas em glicerol 10% gelado. Foram realizadas 3 lavagens com glicerol 10% e ao final as células foram centrifugadas, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuscitado em glicerol 10% para uma concentração final de 3x10¹⁰ células/mL, a suspensão de células foi alíquotada, congelada imediatamente em nitrogênio líquido e armazenada a -80°C.

3.9 Transformação de *E. coli* (Eletroporação)

As bactérias eletrocompetentes previamente preparadas foram transferidas a uma cubeta de eletroporação 0,2 cm (BioRad) juntamente com o material de transformação (DNA plasmidial) e foram submetidas a uma voltagem de 2,5 kV em eletroporador *E. coli Pulser* (BioRad), em seguida as bactérias foram imediatamente ressuscitadas em 1 mL de meio LB e incubadas a 37°C por 1 hora, depois foram plaqueadas em meio LB com o antibiótico de interesse e incubadas a 37°C, *overnight*.

3.10 Transformação de levedura (Acetato de lítio)

A transformação das linhagens de *S. cerevisiae* foi realizada de acordo com protocolo: *Transformation Using Lithium Acetate* descrito em Ausubel e colaboradores (2003). Inicialmente foi realizado um pré-inóculo com a levedura em 3 mL de meio YPD que foi incubado a 30°C e 200 rpm *overnight*. O pré-inóculo foi transferido para 100 mL de meio YPD e incubado a 30°C e 200 rpm por 4 horas. Em seguida a cultura foi transferida para tubos *falcon* e centrifugada, o sobrenadante foi descartado e as células ressuscitadas em H₂O ultrapura gelada e a suspensão foi centrifugada novamente. Após o descarte do sobrenadante as células foram ressuscitadas em 1 mL de solução 1x TE/LiAc, composta por TE^{10x}, LiAc e H₂O ultrapura, e a suspensão foi incubada por 1 hora a 30°C. Em seguida 200 µL das células preparadas foram adicionados a um

tubo contendo 5 µg do DNA que será inserido e 100 mg de espermatozoides de salmão previamente desnaturado a 100°C e logo depois foram adicionados 600 µL de uma solução contendo PEG 40%, 1x liAc e TE. A mistura foi incubada a 30°C por 45 minutos sob agitação, e em seguida foi acrescentado DMSO e o tubo foi aquecido a 42°C por 15 minutos e ao final resfriado em gelo por 2 minutos. Finalmente foram acrescentados 700 µL de H₂O ultrapura, as células foram centrifugadas, ressuspensas em 100 µL de H₂O ultrapura, plaqueadas em meio de cultivo e incubadas a 30°C por 2 a 4 dias.

3.11 Extração de proteínas totais intra-celulares de *S. cerevisiae*

As proteínas intracelulares de *S. cerevisiae* foram extraídas utilizando o reagente comercial Y-PER (*Thermo Scientific*), específico para extração de proteínas intracelulares de leveduras, segundo instruções do fabricante. Inibidores de proteases foram adicionado ao reagente. A solução foi armazenada em freezer a -20°C.

3.12 Determinação da atividade enzimática da XI

A atividade da XI foi determinada através de método da cisteína-carbazole descrito por Callens e colaboradores (1986). As amostras de proteínas intracelulares foram adicionadas a tubos contendo tampão Tris-HCl 0,01M pH 8,0, 50mM de D-xilose e 10mM de MgSO₄ . 7H₂O. A reação foi incubada a 35°C por 15 minutos. Em seguida foi acrescentado ácido tricloroacético 25% para parar a reação. A xilulose formada foi quantificada a partir de reação contendo ácido sulfúrico concentrado (75%), solução de cisteína a 2,4% e solução de carbazole a 0,12%, a reação foi incubada a 25°C por 10 minutos e em seguida foi realizada leitura em espectrofotômetro a 540nm.

A xilulose é uma pentose do grupo das ketopentoses e a metodologia utilizada neste trabalho permite a quantificação desses açúcares a partir do aparecimento de uma coloração roxa escura, que pode ser lida em espectrofotômetro a 540nm, liberada a partir da interação desse

açúcar com carbazole em solução de ácido sulfúrico concentrado. Os detalhes sobre a reação que ocorre não são conhecidos.

3.13 Determinação de proteínas totais

A concentração de proteínas totais dos extratos intracelulares de *S. cerevisiae* foi determinada a partir do Método de Lowry (Lowry et al. 1951), utilizando SBA (Soroalbumina bovina) como padrão.

3.14 Purificação de produtos de PCR

A purificação dos fragmentos utilizados nas construções dos cassetes e plasmídeos de expressão foram realizadas com Kit de Purificação de DNA da Promega (*Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System*) segundo as instruções do fabricante.

3.15 Fermentação de *P. acidipropionici*

Para o desenvolvimento do trabalho foram preparadas culturas de células permanentes de *P. acidipropionici* a partir de uma colônia isolada em placa contendo meio PA com xarope de cana-de-açúcar, obtido a partir da evaporação do caldo de cana, a uma concentração de 8% como fonte de carbono. A colônia isolada foi transferida para tubo de centrífuga de 15 mL contendo 15 mL de meio PA líquido, o inóculo foi incubado a 30°C até atingir o final da fase exponencial, 7,5 mL dessa cultura foram transferidos para um tubo de centrífuga de 50 mL contendo 42,5 mL de meio PA líquido e este foi incubado a 30°C até atingir o final da fase exponencial novamente. As células foram aliquotadas em tubos de centrífuga de 1,5 mL com 1 volume de glicerol 30%, os tubos foram congelados imediatamente em nitrogênio líquido e armazenados a -80°C.

Cada experimento conduzido utilizando *P. acidipropionici* foi iniciado a partir dessa cultura de células permanentes e elas foram ativadas sempre da mesma maneira para garantir a reprodutibilidade dos experimentos. Para ativar as células elas eram adicionadas a tubo de centrífuga contendo 14 mL de meio PA com a fonte de carbono de interesse e incubadas a 30°C

até atingir o final da fase exponencial, quando eram transferidas para tubo contendo 50 mL de meio e incubadas novamente nas mesmas condições até atingir o final da fase exponencial.

As curvas de crescimento foram realizadas em tubos de centrífuga de 50 mL contendo 50 mL de meio PA com a fonte de carbono de interesse. A OD₆₀₀ inicial da fermentação era ajustada para 0,2 e as culturas foram mantidas em estufa a 30°C. A OD₆₀₀ foi medida a cada 8 horas e foram retiradas alíquotas, congeladas e armazenadas a -20°C para posterior análise em HPLC. Todas as fermentações foram realizadas em triplicata.

3.16 Oligonucleotídeos iniciadores

Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados durante o desenvolvimento do trabalho foram desenhados manualmente levando em consideração os seguintes parâmetros: tamanho da sequência, na maioria dos casos variando de dez a trinta pares de bases; conteúdo GC, sempre que possível o conteúdo GC foi mantido entre 40 e 60% visando otimizar a especificidade da reação; a complementaridade da sequência, tomando sempre o cuidado para que não ocorresse complementaridade intramolecular (*Self Dimer*) ou intermolecular (*Cross Dimer*); e a *T_m* (temperatura de *melting*) do *primer*, sempre que possível os oligonucleotídeos iniciadores direto e reverso foram montados de tal forma que suas *T_m*s não fossem muito elevadas e que fossem parecidas entre si. Para controle dos parâmetros mencionados acima foi utilizado um software online, *Beacon Designer Free Edition*. A **Tabela 1** apresenta os oligonucleotídeos iniciadores utilizados no desenvolvimento do trabalho, sua sequência e aplicação.

Tabela 1: Lista de oligonucleotídeos iniciadores, suas respectivas sequências de nucleotídeos e sua utilização no desenvolvimento do trabalho.

Oligonucleotídeo iniciador	Sequência	Utilização
XIO_F	5'ATGGCTGATCTGTGGAACAT3'	Amplificação de do gene <i>xyIA</i> original
XIO_R	5'TCAGGCCTGGGCCAGG3'	
XIO_TDH1_F	5'TTCACTAAATTTACACACAAAAACAAATGGCTGATCTGTGGAACAT3'	Amplificação do gene <i>xyIA</i> original e adição de cauda de homologia com regiões promotora e terminadora <i>TDH1</i>
XIO_TDH1_R	5'TCATTATCCTCATCAAGATTGCTTTATTTCAGGCCTGGGCCAG3'	
BamHI_TDH1_F	5'TGGTGGATCCATGGCTGATCTGTGGAACAT3'	Amplificação de gene <i>xyIA</i> original e adição de cauda de homologia aos sítios de clivagem das enzimas de restrição BamHI e HindIII
HindIII_TDH1_R	5'CCTGGCCAGGCCTGAAAGCTTGC GG3'	
XI_F	5'ATGGCTGATTTGTGGAAT3'	Amplificação do gene <i>xyIA</i> otimizado
XI_R	5'GCTTTGGCACAAGCTTAA3'	
XI_TDH1_F	5'ACAGTACTTCACTAAATTTACACACAAAAACAAATGGCTGATTTGTGGAAT3'	Amplificação do gene <i>xyIA</i> otimizado e adição de cauda de homologia com regiões promotora e terminadora <i>TDH1</i>
XI_TDH1_R	5'GCTTTGGCACAAGCTTAAATAAAGCAATCTTGATGAGGATAATGATT3'	
pRSBamHI_TDH1_pF	5'GATAAGCTTGATATCGAATTCCTGCAGCCCGGGGATCCAATGTATATGCTCATTTACAC3'	Amplificação da sequência promotora <i>TDH1</i> e adição de regiões de homologia ao vetor
TDH1_pR	5'TTTGTTTTGTGTGTAAATTTAG3'	
TDH1_tF	5'ATAAGCAATCTTGATGAGG3'	Amplificação da sequência terminadora <i>TDH1</i> e adição de regiões de homologia ao vetor
pRSBamHI_TDH1_tR	5'TATTGCTGCCTTTGCAAGGATCCACTAGTTCTAGAGCGGCCGCCACCGCGGTGGAGCTCC3'	
Cen2_F	5'TTCAAAGTACAGGATTTGTTGA3'	Amplificação do cassete contendo o gene <i>XKS1</i> com homologia a regiões próximas ao centrômero do cromossomo II de <i>S. cerevisiae</i>
Cen2_R	5'AAGCTTTCTATTAGTCAATCTTC3'	
Check_Cen2_F	5'TGAGACGATTAGAGTAAGGT3'	Amplificação de região próxima ao centrômero do cromossomo II onde está inserido o cassete da <i>XKS1</i>
Check_Cen2_R	5'GGTGACGACGATATACAG3'	
ADH_pR	5'TGTATATGAGATAGTTGATTGTATG3'	Utilizado em conjunto com Check_Cen2_F para checar se o gene <i>XKS1</i> foi inserido corretamente
URA3loxP_GRE3Δ_F	5'ATATAGAAGCAAATAGTTGTCAAGTGCAATCCTTCAAGACGATCACTATAGGGCGAATTGG3'	Amplifica <i>URA3</i> com regiões de homologia ao promotor e terminador de <i>GRE3</i>
URA3loxP_GRE3Δ_R	5'GTAAAAATTATACACATATACAGCATCGGAATGAGGGAATCTCAAGCTATGCATCCAA3'	
Check_ΔGRE3_F	5'AGCCACATGCGGAAGAAT3'	Amplifica região onde <i>GRE3</i> está localizado, utilizado para confirmar sua deleção
Check_ΔGRE3_R	5'AAGCGTGGATGACACCAC3'	

3.17 Construção do cassete da XI

Para a construção do cassete contendo o gene *xyIA* foi utilizado o promotor e terminador do gene que codifica gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (*TDH1*). O promotor desse gene é constitutivo e apresenta um bom desempenho na expressão de proteínas heterólogas em *S. cerevisiae* (Hadfield et al. 1993).

O vetor de expressão utilizado neste trabalho foi o plasmídeo pRS426, comumente utilizado para expressão de proteínas heterólogas em *S. cerevisiae*. Os cassetes contendo os genes da xilose isomerase com a região promotora e terminadora *TDHI*, foram construídos utilizando o método descrito por Gibson e colaboradores (2009), onde todos os fragmentos são unidos em uma reação isotérmica. São acrescentadas 3 enzimas à reação, a T5 exonuclease, que remove nucleotídeos da região 5' das fitas de DNA, uma DNA polimerase, que irá completar os *gaps* após o anelamento das regiões 3' complementares, e uma DNA ligase que irá reparar os espaços entre as fitas (**Figura 5**).

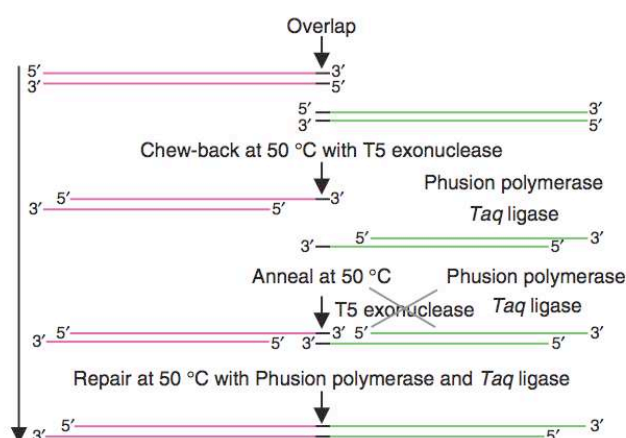


Figura 5: Esquema da reação isotérmica descrita por Gibson *et al.*, 2009.

3.18 Superexpressão de *XKS1*

O gene *XKS1* foi inserido em cassete integrativo que apresenta região promotora e terminadora *ADHI*, e o gene *URA3*, como marca de seleção, flanqueado por regiões *loxP*, e regiões de 126 pb nas extremidades que apresentam homologia com a região subsequente ao centrômero do cromossomo II de *S. cerevisiae*.

3.19 Deleção de *GRE3*

Para realizar a deleção do gene *GRE3* de *S. cerevisiae* foi utilizado um cassete contendo o

gene *URA3*, flanqueado por regiões *loxP* e regiões de aproximadamente 42 pb em cada extremidade que apresentam homologia às regiões promotora a terminadora do gene *GRE3*, permitindo a deleção desse gene

3.20 Remoção da marca de seleção *URA3*

O cassete utilizado para superexpressar o gene *XKSI*, para deletar o gene *GRE3*, e também o plasmídeo onde *xylA* foi clonado, apresentam o gene *URA3* como marca de seleção. Assim sendo, a cada modificação genética, foi necessário retirar a marca auxotrófica *URA3* para que a transformação seguinte pudesse ser viabilizada. Assim, a deleção desse gene foi realizada através do sistema de recombinação Cre-LoxP, como descrito em Gueldener e colaboradores (2002).

Derivado do bacteriófago P1, esse sistema permite que a recombinase Cre se ligue a um par de sequências alvo, denominadas *loxP*, permitindo a ativação, repressão e deleção de genes. O gene *URA3* nos cassetes de *XKSI* e *GRE3* está flanqueado por regiões *loxP*, na mesma orientação. Ao transformar a levedura com o plasmídeo pSH65, a expressão da recombinase Cre, induzida por galactose, permite que o gene *URA3* seja deletado.

A confirmação da deleção é feita através do cultivo dos transformantes em meio contendo 5-FOA, que é convertida em um composto tóxico para a levedura pela enzima codificada por *URA3*, de tal forma que apenas as células que tiveram o gene deletado sobreviverão.

3.21 Fermentação de *S. cerevisiae*

Para garantir a reprodutibilidade das fermentações de *S. cerevisiae* foram preparadas culturas permanentes das linhagens transformadas. Elas foram inoculadas em meio mínimo YNB com glicose 2% como fonte de carbono, e mantidas a 30°C e 250 rpm até atingirem o final da fase exponencial, onde a concentração de células é maior, essas células foram então alíquotadas e ressuspensas com 1 volume de meio YNB contendo glicerol 30%, em seguida os tubos foram congelados em nitrogênio líquido e armazenados a -80°C. A partir das culturas permanentes foi

definido o tempo de ativação (período no qual um inóculo em 50 mL de meio YNB, contendo glicose 2% como fonte de carbono a 30°C e 200 rpm, leva para atingir o final da fase exponencial) das células. Todas as fermentações foram mantidas a 30°C, 200 rpm e foram realizadas em triplicata.

3.22 Extração de RNA de *S. cerevisiae*

A extração de RNA de *S. cerevisiae* foi realizada de acordo com protocolo descrito em Ausubel e colaboradores (2003). O resultado da extração foi confirmado através da aplicação das amostras em gel de agarose 2% para identificar se elas estavam degradadas ou não. As amostras de RNA foram tratadas com DNase (Kit Promega) e RNase out (Promega) durante 30 minutos. Para detectar se as amostras estavam contaminadas com DNA foi realizado PCR utilizando o RNA e oligonucleotídeos iniciadores XI_F e XI_R.

3.23 Construção de cDNA e PCR

A construção de cDNA a partir do RNA total foi realizada com a enzima *Superscript II* e Kit de síntese de cDNA da *Invitrogen*. Para confirmar a expressão do gene da XI nas linhagens de *S. cerevisiae* transformadas foi realizado um PCR utilizando o cDNA construído anteriormente. O RNA extraído da linhagem JAY289 foi utilizado como controle negativo e o gene *RPE1*, que codifica a enzima D-ribulose-5-fosfato-3-epimerase, foi utilizado como controle positivo da reação.

3.24 Quantificação dos produtos da fermentação

A quantificação dos produtos das fermentações de *S. cerevisiae* e *P. acidipropionici* foi realizada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) em cromatógrafo Alliance HT (*Waters*) com detector de índice de refração Waters 2414. As corridas foram realizadas em coluna HPX-87H (BioRad), mantida a 35°C, com ácido sulfúrico 5 mM como fase móvel e um fluxo de 0,6 mL/min. A quantificação dos compostos foi realizada através da comparação com curvas de

concentração padrão de cada um dos compostos analisados.

3.25 Sequenciamento das amostras de DNA

O sequenciamento das amostras de DNA analisadas foi feito em sequenciador 3500 *Genetic Analyser* (Applied Biosystems), baseado na tecnologia Sanger. As reações foram realizadas utilizando o kit “*Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit*” (Applied Biosystems), seguindo o protocolo fornecido pelo fabricante.

3.26 Construção do plasmídeo de expressão heteróloga da XI em *E. coli*

Para construir o plasmídeo de expressão da XI em *E. coli* foi utilizado o gene *xylA* amplificado e purificado a partir do DNA genômico de *P. acidipropionici*, a esse foram adicionadas regiões de homologia ao local de ação das enzimas de restrição BamHI e HindIII. A escolha destas enzimas foi feita de forma a permitir a subclonagem direcionada no vetor de expressão. O fragmento amplificado foi ligado no vetor pGem-T-Easy (Promega), e em seguida foi transformado em *E. coli* DH5 α eletrocompetentes. Após a seleção dos transformantes positivos e confirmação da transformação por PCR o plasmídeo foi sequenciado para checar se não haviam mutações no gene.

Em seguida o plasmídeo pGem-T-Easy + *xylA* foi submetido a uma digestão dupla com as enzimas de restrição: BamHI e HindIII, para obter a sequência de *xylA* do plasmídeo. O vetor de expressão pETSUMO - versão Síncroton, também foi submetido a uma digestão dupla com as mesmas enzimas de restrição, visando a linearização do mesmo. O gene *xylA* foi subclonado no plasmídeo linearizado utilizando a enzima T4 DNA Ligase (Promega), seguindo o protocolo fornecido pelo fabricante. Enfim, o plasmídeo obtido foi transformado nas cepas de expressão *E. coli* Rosetta 2. Após as etapas de clonagem e subclonagem foram realizados os ensaios de expressão.

3.27 Ensaios de expressão da XI em *E. coli*

Os ensaios de expressão foram realizados seguindo os procedimentos descritos no manual do pETSUMO (Promega), variando alguns parâmetros da expressão:

- OD₆₀₀ de indução: 0,8
- Temperatura de indução: 18°C, 30°C ou 37°C
- Concentração de IPTG: 1 mM, 0,2 mM e 0,05 mM

Antes do início da indução foi retirada uma amostra e ao longo do ensaio de expressão, foram retiradas 2 amostras: uma 4 horas após a adição do IPTG e outra após a indução por período *overnight*. Cada uma das amostras foi separada em fase solúvel e insolúvel, através de etapas consecutivas de congelamento e descongelamento seguidas de um tratamento com lisozima, como sugerido no protocolo do pETSUMO (Promega). Visando a obtenção de um mesmo número de células em todas as amostras a OD₆₀₀ das culturas foi analisada e foi armazenado um volume equivalente a para todas as amostras. O gel de poliacrilamida SDS-PAGE foi utilizado para verificar a presença de uma banda alvo e foi preparado segundo o método Laemmli (Sambrook & Russel, 2001).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Avaliação do consumo de xilose por *P. acidipropionici*

A capacidade de *P. acidipropionici* crescer em xilose já foi descrita por Carrondo e colaboradores (1988), contudo, esse trabalho não abordou de maneira aprofundada o consumo dessa fonte de carbono. Assim, no presente trabalho, foram realizados estudos do crescimento e consumo de xilose por esta bactéria. Na **Figura 6** é possível observar o padrão de crescimento de *P. acidipropionici* em meio PA suplementado com três fontes de carbono diferentes: xilose 2%, glicose 2% e uma mistura de glicose e xilose (1:1) 2%, indicando um perfil semelhante de crescimento nas três condições, onde a cultura atingiu o final da fase *log* após 54 horas do início de fermentação nos três casos, sugerindo uma taxa semelhante de consumo de ambas as fontes de carbono.

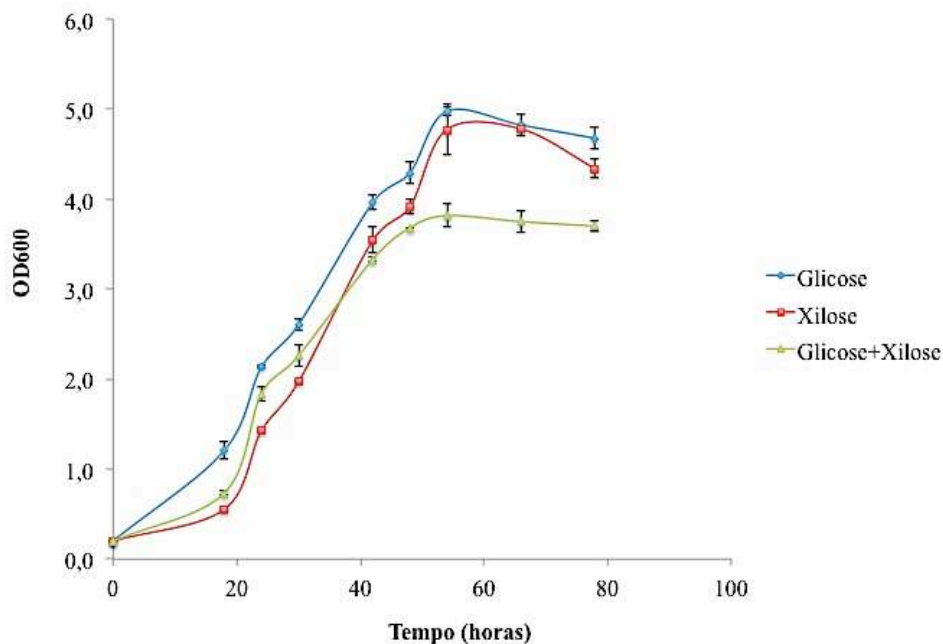


Figura 6: Curva de crescimento de *P. acidipropionici*. Crescimento em semi-anaerobiose a 30°C com diferentes fontes de carbono: glicose 2% (azul), xilose 2% (vermelho) e mistura de xilose e glicose 2% (1:1) (verde).

Para uma melhor compreensão das condições nas quais a fermentação estava

ocorrendo, foram retiradas amostras em diferentes pontos durante o crescimento da população bacteriana, e as fontes de carbono e os produtos da fermentação foram quantificados em HPLC. Os resultados obtidos a partir das análises em HPLC podem ser observados na **Figura 7** e **Figura 8a** e **8b**, que indicam que *P. acidipropionici* apresenta um consumo de xilose semelhante ao de glicose e produção dos principais produtos da fermentação, ácido propiônico, ácido acético e ácido succínico, similares em ambas as situações.

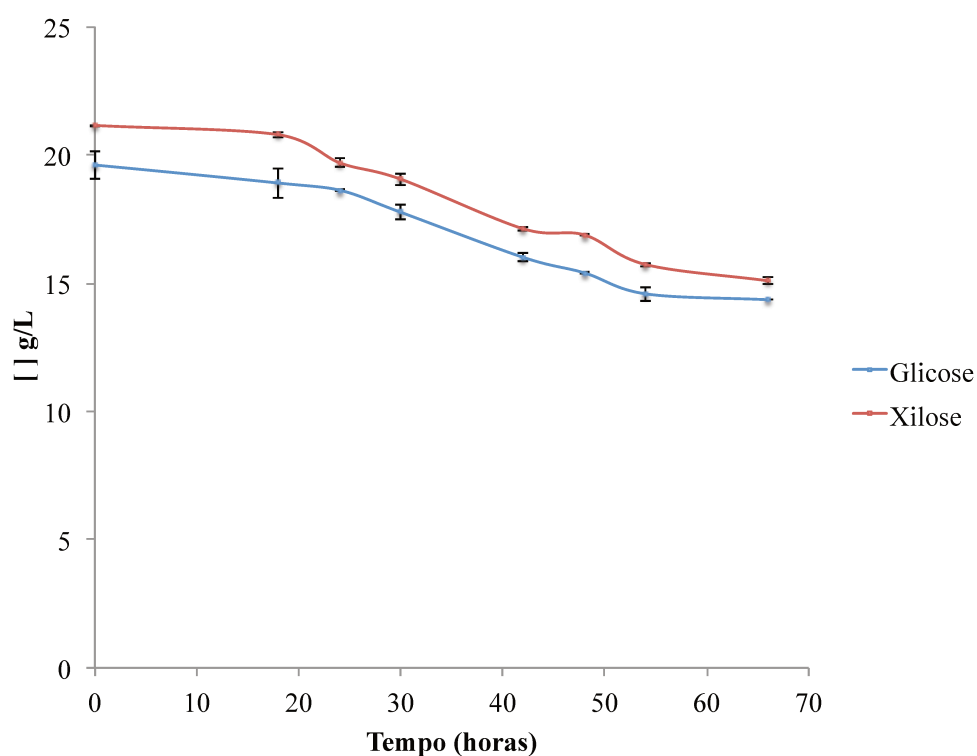


Figura 7: Consumo de diferentes fontes de carbono por *P. acidipropionici*. Meios de cultura contendo glicose 2% (azul) como única fonte de carbono e xilose 2% (vermelho) como única fonte de carbono.

Uma vez que os estudos foram conduzidos em tubos de centrifuga onde não houve controle do pH durante a fermentação, e levando em consideração que os principais produtos da fermentação da bactéria em questão são ácidos, conforme a concentração dos mesmos aumenta o pH do meio diminui levando a uma inibição do crescimento da cultura de bactérias. Assim sendo

não foi possível observar nos ensaios realizados o consumo completo da fonte de carbono, bem como o tempo real de consumo dos açúcares e formação do produto, porém, como o objetivo do experimento em questão não era estudar o desempenho no consumo de xilose, e sim comparar o consumo de xilose com o de glicose essa inibição pelo produto não foi levada em consideração.

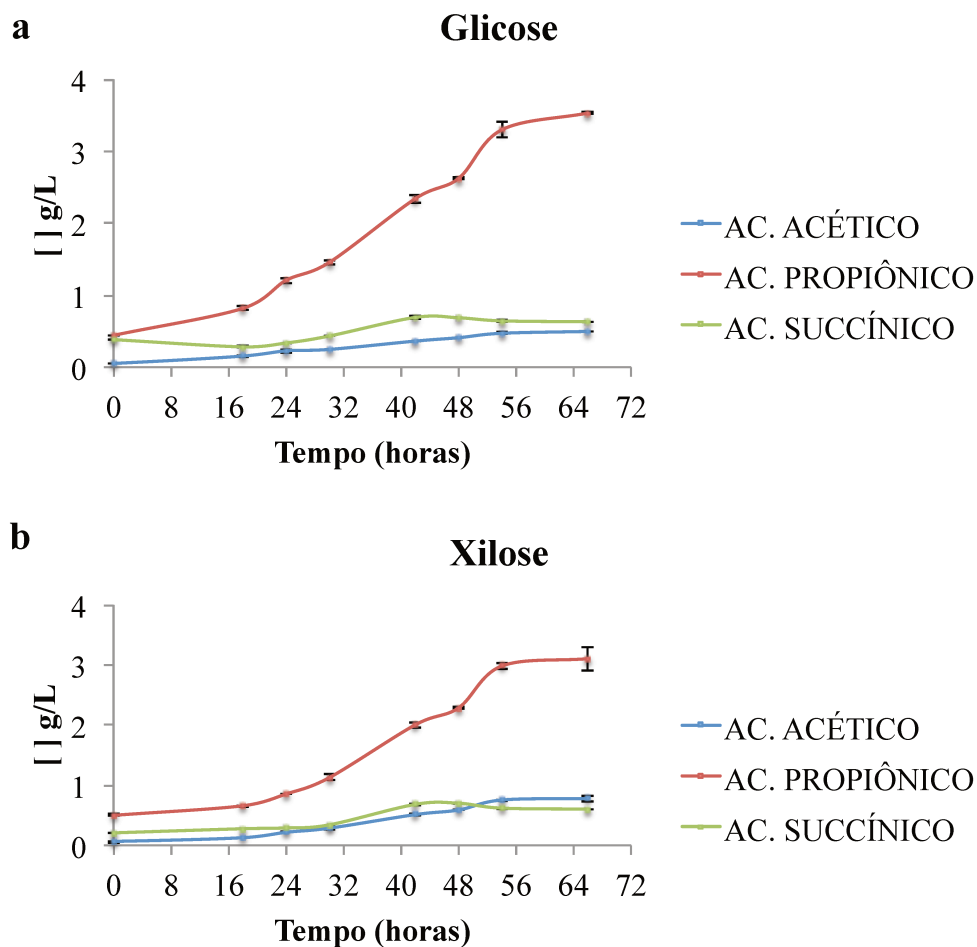


Figura 8: Produtos da fermentação de *P. acidipropionici*. (a) Fermentação com glicose 2% como única fonte de carbono; (b) fermentação com xilose 2% como única fonte de carbono.

Na fermentação contendo a mistura de xilose e glicose o padrão de consumo observado foi diferente, a glicose foi consumida preferencialmente à xilose como pode ser observado na **Figura 9**. A diferença no consumo dessas fontes de carbono durante a co-fermentação é um fenômeno

comum e esperado, isso ocorre devido à um mecanismo de regulação conhecido como repressão catabólica, onde a presença de glicose inibe a transcrição de genes utilizados para o consumo de fontes de carbono alternativas (Cox et al. 2012).

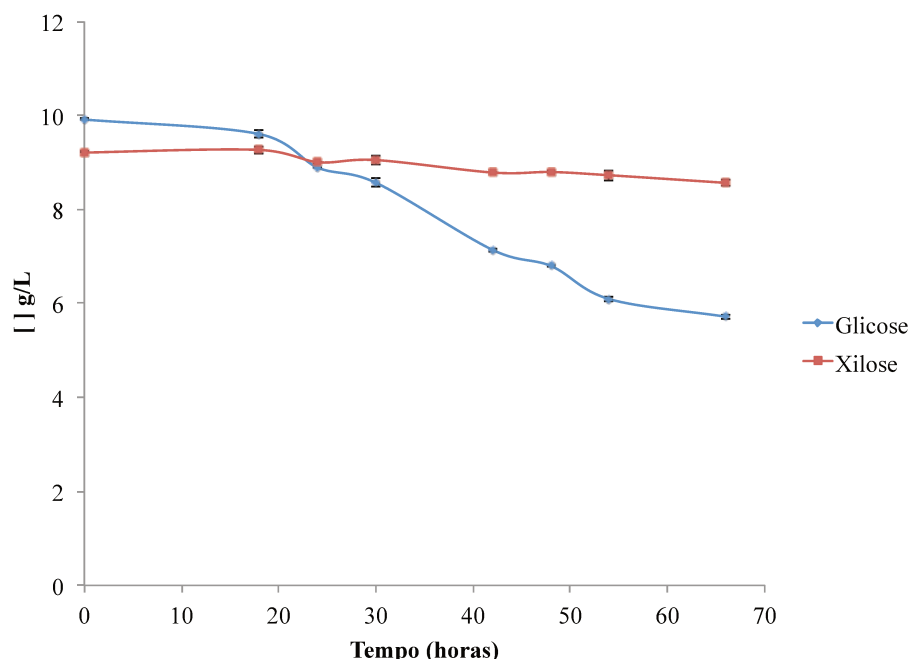


Figura 9: Co-fermentação de xilose e glicose por *P. acidipropionici*. Consumo das fontes de carbono por *P. acidipropionici* quando fermentada em meio de cultura contendo uma mistura de glicose (azul) e xilose (vermelho) (1:1) 2%.

Entretanto, como citado anteriormente, os ensaios de fermentação foram realizados em tubos de centrífuga e não houve controle do pH durante o crescimento, na medida em que os produtos eram formados o pH do meio diminuía e consequentemente inibia o crescimento da cultura, dificultando a observação do comportamento de *P. acidipropionici* durante a co-fermentação. Assim, foi realizada uma nova fermentação para avaliar se ocorria repressão catabólica. Para isso, *P. acidipropionici* foi fermentada em meio contendo 2-deoxi-glicose (2-DG), um análogo de glicose que mimetiza os efeitos desta fonte de carbono, porém não é metabolizado pelo sistema da bactéria, de tal forma que apenas mutantes resistentes a repressão catabólica por esse açúcar são capazes de crescer (Randez-Gil et al. 1995). Os resultados obtidos na fermentação

com xilose e 2-DG podem ser observados na **Figura 10**, e indicam que o consumo de xilose não sofre repressão catabólica em *P. acidipropionici* na presença de glicose.

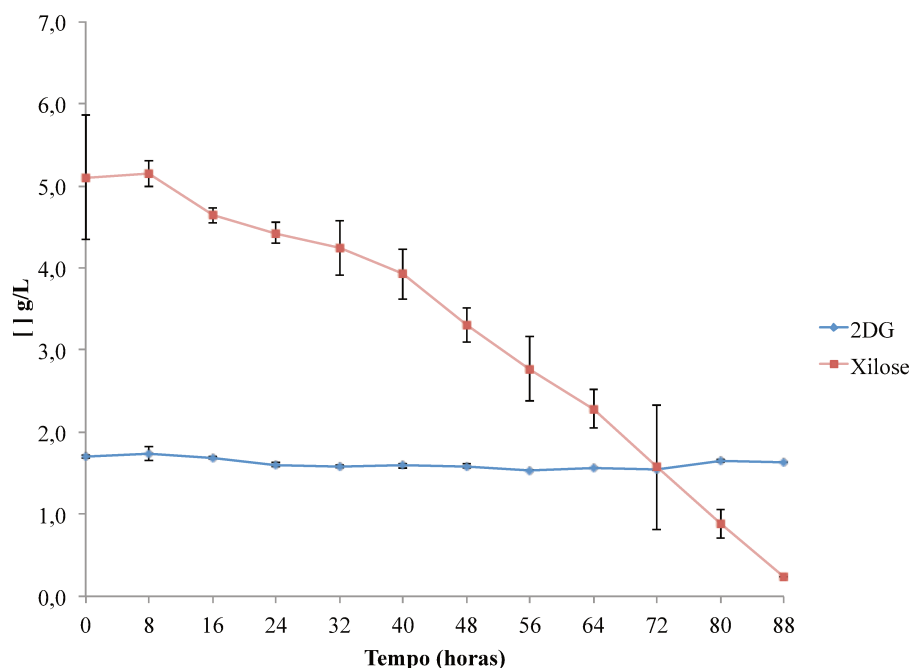


Figura 10: Co-fermentação de xilose e 2-deoxiglicose por *P. acidipropionici*. Consumo das fontes de carbono por *P. acidipropionici* em fermentação contendo uma mistura de xilose 2% e 2-DG em uma concentração de 6mM.

Tendo em vista os resultados apresentados anteriormente é possível concluir que *P. acidipropionici* apresenta uma via metabólica para o consumo de xilose que é eficiente e ainda não estudada, e pode, portanto, apresentar enzimas com alto potencial biotecnológico, tornando seu estudo relevante.

4.2 Vias metabólicas para consumo de xilose em *P. acidipropionici*

A principal via de consumo de xilose, presente na maioria das bactérias, é a via que apresenta apenas uma etapa, catalisada pela xilose isomerase (E.C.5.3.1.5), que converte D-xilose diretamente em D-xilulose. Outra via comum em micro-organismos é a oxi-redutiva onde a D-xilose é convertida a D-xilulose a partir da ação de duas enzimas, a xilose redutase (E.C.1.1.1.307) e a xilitol desidrogenase (E.C.1.1.1.B19). Uma busca realizada no genoma de *P. acidipropionici*

pelas três enzimas citadas anteriormente indicou, como esperado, que apenas a xilose isomerase está presente. Foram encontradas 4 anotações do genoma da bactéria, que correspondem a xiloses isomerases, como pode ser observado na **Figura 11**. A análise individual de cada sequência, realizada através do software InterProScan (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/pfa/iprscan/>), assinalou que apenas uma, PACID_03490, apresenta similaridade significativa com xiloses isomerases de outros micro-organismos procariotos. As demais sequências apresentam apenas regiões de domínio conservado semelhantes à regiões presentes nas xilose isomerases em geral.

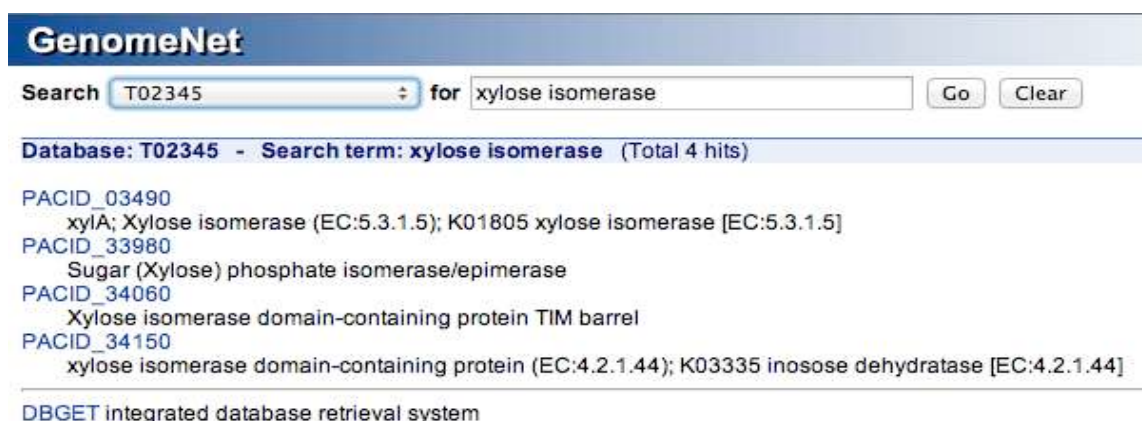


Figura 11: Xiloses isomerases anotadas no genoma de *P. acidipropionici*. Busca realizada em banco de dados do KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes).

Em seguida foi realizada uma análise da posição do gene *xylA* no genoma visando identificar genes com localização próxima que possam estar relacionados à via de consumo de xilose, indicando, eventualmente, a presença de um *Operon* que contenha outros genes necessários para o consumo de xilose pela bactéria. Na **Figura 12** é possível observar a posição do gene *xylA* e também outros quatro genes contíguos, com mesma orientação. O primeiro gene (PACID_03480), codifica um transportador de açúcares da família MFS, em seguida encontra-se o gene que codifica uma xiluloquinase (PACID_03470), e na sequência outros dois que codificam proteínas com funções desconhecidas (PACID_03460 e PACID_03450). Desta maneira, para o

desenvolvimento do estudo foi utilizada apenas a xilose isomerase (PACID_03490), vez que o transportador encontrado não é específico para o transporte de xilose e a levedura apresenta em seu genoma o gene que codifica uma xiluloquinase.

Preliminarmente ao início dos procedimentos para a expressão da XI em *S. cerevisiae*, foi realizada uma análise bioinformática da proteína a ser expressa. A análise pelo *ProtParam* (Gasteiger et al. 2005) revelou uma proteína contendo 468 aminoácidos e um ponto isoelétrico de 4,78, estimada em um peso molecular de aproximadamente 52 kDa.

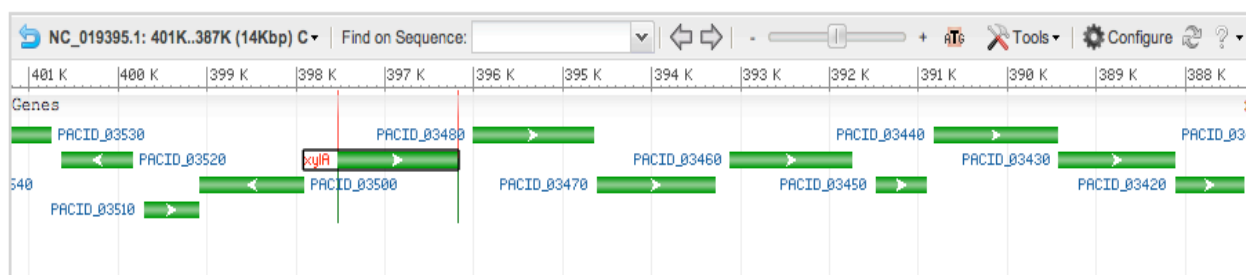


Figura 12: Análise da posição de *xylA* no genoma de *P. acidipropionici* e genes relacionados. *xylA* (PACID_03490) está posicionado ao lado de um transportador de açúcares (PACID_03480); em seguida encontra-se um gene que codifica uma xiluloquinase, (PACID_03470), seguido de outros dois genes que codificam proteínas com funções desconhecidas (PACID_03460 e PACID_03450). Informações obtidas em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=PACID_03490.

4.3 Construção do cassete de expressão de *xylA*

Para construção do cassete de expressão, o gene *xylA*, de *P. acidipropionici*, e as regiões promotora e terminadora, *TDHI*, foram amplificados por PCR. O plasmídeo pRS426 foi clivado com a enzima BamHI para inserção dos fragmentos. Na **Figura 13** podem ser observados os fragmentos que foram utilizados para construção do cassete de expressão.

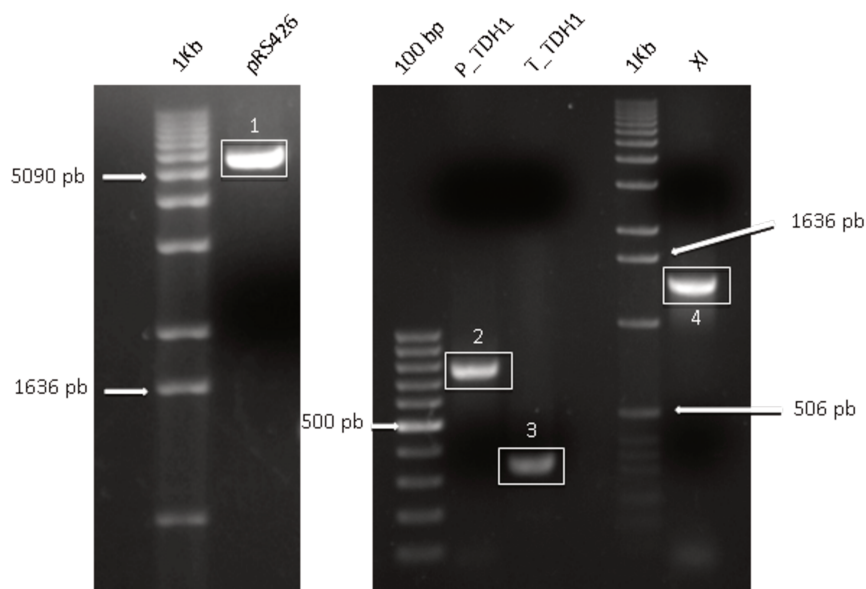


Figura 13: Amplificação de fragmentos utilizados para construção do cassete da XI. (1) fragmento com 5726 pb representa o plasmídeo pRS426 clivado; (2) fragmento com 742 pb representa o promotor *TDH1*; (3) fragmento com 311 pb representa o terminador *TDH1*; (4) fragmento com 1347 pb representa gene *xylA*.

Após a ligação dos fragmentos, através do método descrito por Gibson e colaboradores (2009), a reação foi dialisada e os plasmídeos inseridos, através de eletroporação, em *E. coli* DH5 α eletrocompetente, as células transformadas foram plaqueadas em meio LB contendo ampicilina. Os transformantes positivos foram confirmados através de PCR do DNA plasmidial extraído das colônias obtidas, **Figura 14**. Em seguida o plasmídeo construído foi sequenciado para checar se não foram inseridas mutações no cassete durante a construção do mesmo.

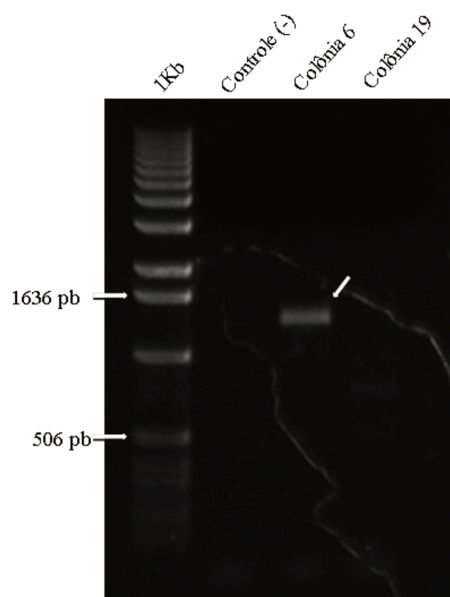


Figura 14: PCR com DNA plasmidial de colônias 6 e 19 de *E. coli*. As colônias foram previamente selecionadas através de uma lise rápida, foi extraído DNA plasmidial das colônias 6 e 19, que apresentaram padrões de bandas diferentes, e, em seguida realizado um PCR para checar se o gene da XI estava presente. A banda indicada pela seta corresponde ao gene da XI com 1347 pb.

4.4 Construção da linhagem industrial de *S. cerevisiae* capaz de consumir xilose

A linhagem de *S. cerevisiae* que foi utilizada no trabalho é uma linhagem industrial, haploide, derivada da PE-2 e que possui o gene *URA3* deletado, denominada de A1. Além da expressão do gene da XI de *P. acidipropionici* outras duas modificações foram realizadas visando otimizar a conversão de xilose em etanol. A primeira foi o aumento da expressão do gene *XKS1* que codifica a xiluloquinase (XK), enzima que converte a xilulose em xilulose-5-fosfato, que será metabolizada pela via das pentoses fosfato (PPP). A segunda modificação é a deleção do gene *GRE3*, responsável pela codificação de uma aldose redutase (AR), enzima que pode interferir no metabolismo da xilose uma vez que ela é capaz de converter xilose em xilitol, composto que será acumulado no interior da célula desviando o fluxo de carbono, e, além disso, pode atuar inibindo a atividade da XI, uma vez que a grande maioria das XI caracterizadas tem sua atividade inibida na presença de xilitol.

Assim, foram construídas três linhagens diferentes de A1, a primeira, denominada A1_L1,

apresentando apenas o gene *xyIA*, a segunda, denominada A1_L2, além da inserção de *xyIA* também apresenta a superexpressão de *XKS1* e a terceira, A1_L3, além das duas alterações anteriores a linhagem também teve seu gene *GRE3* deletado. As transformações foram feitas na seguinte ordem: [1] superexpressão de *XKS1*; [2] deleção de *GRE3*; [3] inserção de *xyIA*.

4.4.1 Superexpressão de *XKS1*

O cassete integrativo contendo a cópia extra do gene *XKS1* e o gene *URA3* como marca de seleção, e com regiões de homologia a uma região adjacente ao centrômero do cromossomo II de *S. cerevisiae*, foi transformado em A1. Para selecionar os transformantes a levedura foi cultivada em meio mínimo sem a suplementação de uracila. Uma vez obtidas as colônias, foi realizada a extração de DNA genômico das mesmas e em seguida um PCR para amplificar o gene *XKS1* e checar se a transformação foi bem sucedida. Na **Figura 15** podem ser observadas as colônias que foram transformadas com sucesso.

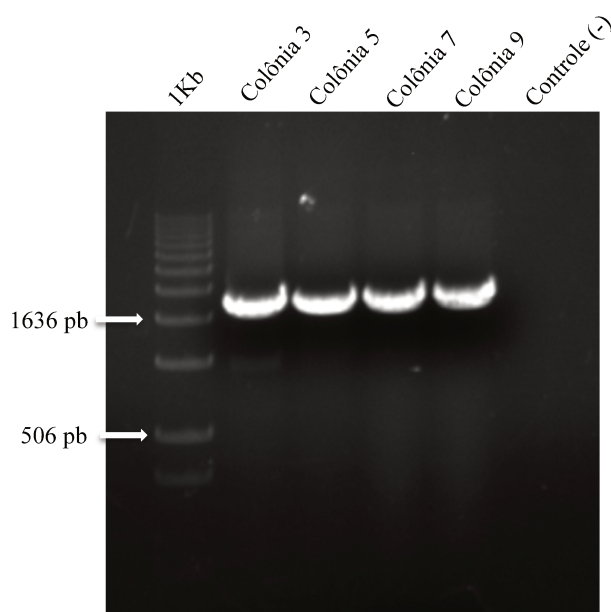


Figura 15: Colônias de A1 transformadas com *XKS1*. As colônias 3, 5, 7 e 9 foram eficientemente transformadas com o gene *XKS1*, representado pelo fragmento de aproximadamente 1900 pb.

Juntamente com o gene *XKS1* foi inserido o gene *URA3*, e para dar continuidade à construção foi necessário fazer a deleção desse gene. O gene *URA3* está flanqueado por regiões

loxp, posicionadas na mesma orientação, como descrito no item 3.20. Para tanto, a linhagem foi transformada com o plasmídeo pSH65, que possui o gene que codifica a cre-recombinase; os transformantes foram plaqueados em meio contendo o antibiótico zeocina e as colônias obtidas foram inoculadas em meio contendo galactose como fonte de carbono para induzir a expressão do gene da cre-recombinase. Em seguida a cultura foi plaqueada em meio contendo 5-FOA, de tal forma que apenas os transformantes que tiveram o gene *URA3* deletado serão capazes de se desenvolver. A deleção do gene foi checada por PCR como pode ser observado na **Figura 16**.

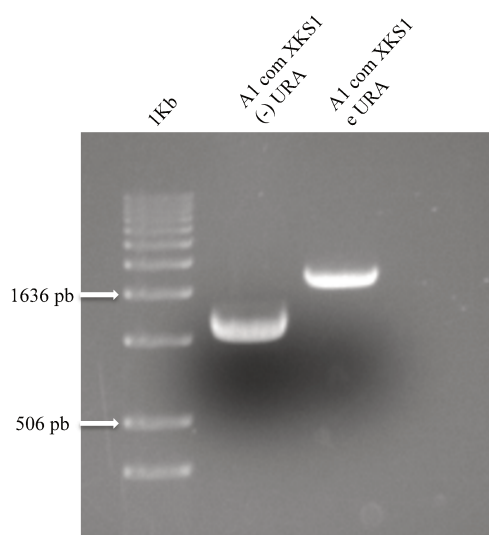


Figura 16: Linhagem A1 com superexpressão de *XKS1* e deleção de *URA3*. O fragmento com tamanho aproximado de 1100 pb representa A1 com *XKS1* e *URA3* deletado, e o fragmento com aproximadamente 1900 pb representa A1 com os dois genes clonados.

4.4.2 Deleção de *GRE3*

Após a obtenção da linhagem A1 com a superexpressão de *XKS1* e deleção de *URA3* foi realizada a deleção de *GRE3*. O cassete utilizado para a deleção apresentava o gene *URA3* flanqueado por regiões *loxp* e regiões de homologia às regiões promotora e terminadora do local onde *GRE3* está posicionado no genoma. Desta forma, ao transformar a linhagem ocorreu uma substituição de *GRE3* por *URA3*. Os transformantes foram selecionados em meio mínimo sem a suplementação de uracila e o DNA genômico das colônias obtidas foi extraído para confirmar a

deleção de *GRE3* por PCR, como pode ser observado na **Figura 17**. Em seguida, para dar continuidade ao trabalho e inserir o plasmídeo contendo *xyIA*, foi realizada a deleção do gene *URA3*, inserido no local de *GRE3*, através da estratégia da cre-recombinase descrita anteriormente.

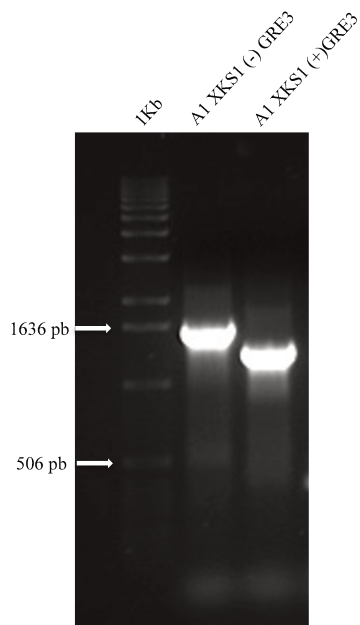


Figura 17: Deleção de *GRE3*. PCR para checar a deleção de *GRE3*. Fragmento com 1617 pb representa a deleção do gene, que foi substituído por *URA3*. Fragmento com 1344 pb indica que *GRE3* está presente na linhagem.

4.4.3 Inserção de *xyIA*

As linhagens de A1 construídas anteriormente foram transformadas com o gene *xyIA* dando origem às 3 linhagens descritas anteriormente A1_L1, A1_L2 e A1_L3. O gene da XI foi clonado no vetor pRS426, de alto número de cópias, contendo o gene *URA3* como marca de seleção. Os transformantes foram selecionados em meio mínimo sem a suplementação de uracila e em seguida foi realizada a extração de DNA genômico das colônias obtidas e confirmação da transformação através de PCR para amplificar o gene da XI. Na **Figura 18** é possível observar as colônias das três linhagens que foram transformadas corretamente.

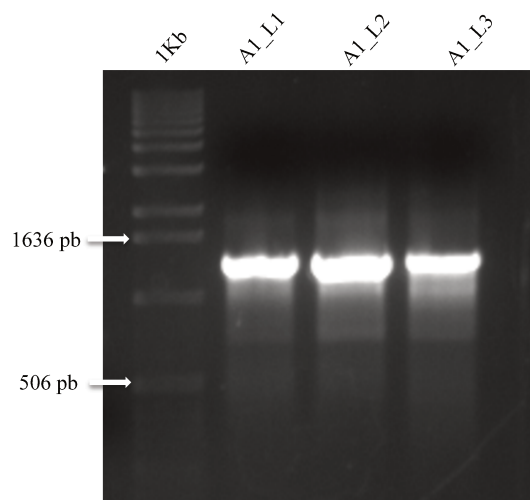


Figura 18: Inserção de *xyIA* em linhagens de A1. PCR confirmando a transformação de linhagens de A1 com *xyIA*. Fragmento com 1347 pb indica a presença do gene em A1_L1, A1_L2 e A1_L3.

4.5 Testes fenotípicos

Uma vez obtidas as 3 linhagens de A1 foram realizadas fermentações em erlenmeyers para avaliar o desempenho das leveduras transformadas com relação ao consumo de xilose e produção de etanol. Como controle negativo foi utilizada a linhagem JAY289, derivada da PE-2, que possui o gene *URA3* e não apresenta nenhuma das modificações realizadas neste trabalho. Inicialmente, visando garantir uma reprodutibilidade dos testes, foram preparadas células permanentes das linhagens; essas foram ativadas em meio mínimo, sem a suplementação de uracila, contendo apenas glicose como fonte de carbono.

As células ativadas foram inoculadas em meio mínimo, sem a suplementação de uracila, que continha uma mistura de xilose e glicose 2% (1:1), como fonte de carbono; o crescimento das células foi controlado através de medidas da OD₆₀₀ em espectrofotômetro e foram retiradas alíquotas a cada 12 horas para posterior análise em HPLC. Após 10 dias de crescimento as células foram transferidas para novo meio contendo apenas xilose 2% como fonte de carbono, e a fermentação foi acompanhada por mais dez dias.

A **Figura 19** apresenta os resultados obtidos a partir das fermentações, indicando que não

houve consumo de xilose em nenhuma das situações por nenhuma das linhagens desenvolvidas. Dessa maneira, tendo em vista que a bactéria *P. acidipropionici* apresenta um alto conteúdo GC e um *codon usage* diferente de *S. cerevisiae*, características que dificultam a expressão heteróloga da proteína, foi adotada uma estratégia de otimização dos códons na tentativa de facilitar a expressão funcional da proteína.

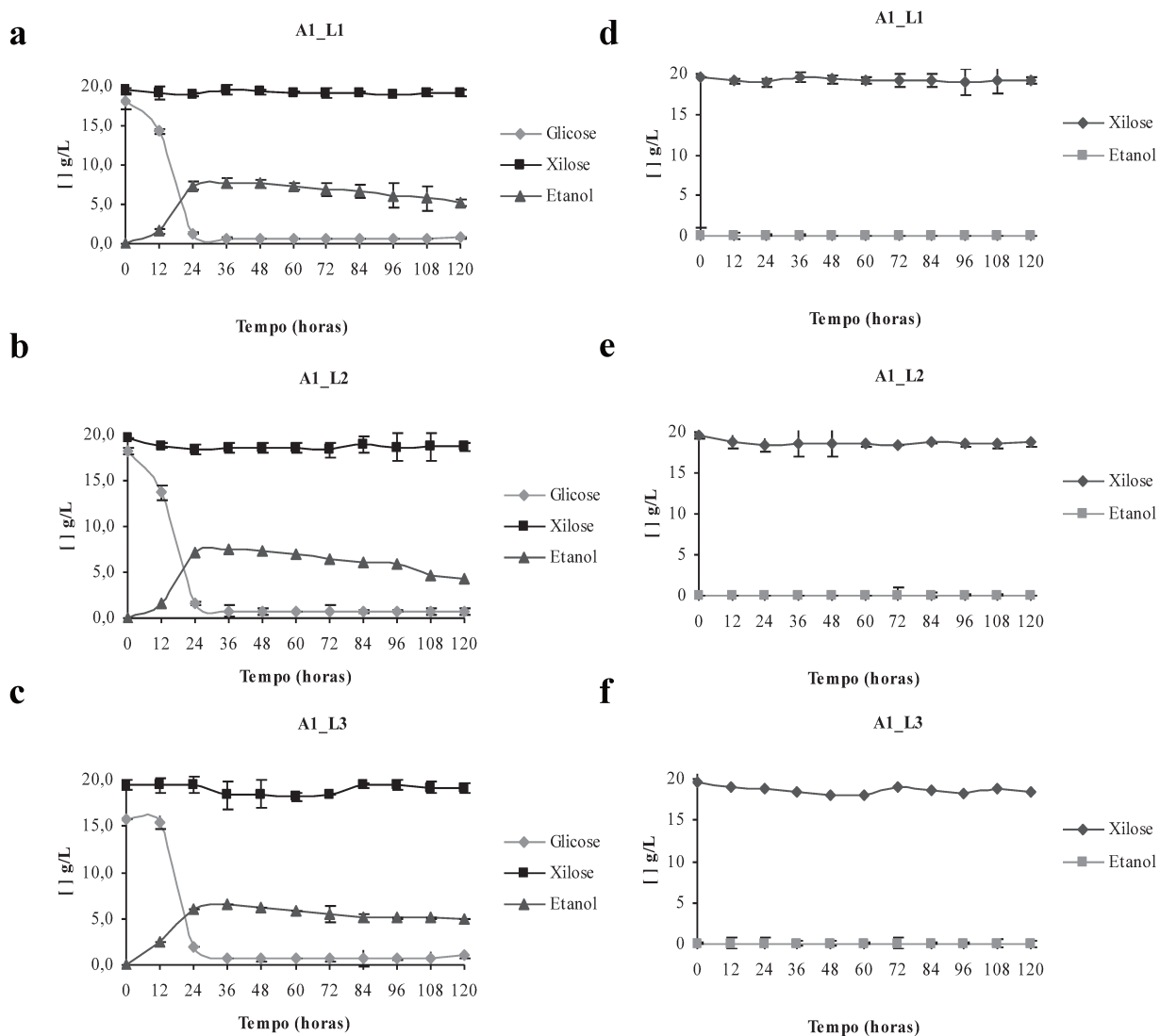


Figura 19: Gráficos da fermentação de linhagens de A1. (a) fermentação de A1_L1 em meio contendo mistura de glicose e xilose (1:1) 2%; (b) fermentação de A1_L2 em meio contendo mistura de glicose e xilose (1:1) 2%; (c) fermentação de A1_L3 em meio contendo mistura de glicose e xilose (1:1) 2%; (d) fermentação de A1_L1 em meio contendo xilose 2% como única fonte de carbono; (e) fermentação de A1_L2 em meio contendo xilose 2% como única fonte de carbono; (f) fermentação de A1_L3 em meio contendo xilose 2% como única fonte de carbono.

4.6 Otimização dos códons de *xylA* de *P. acidipropionici*

O *codon usage*, ou utilização preferencial de códons, é considerado um dos principais fatores que influenciam a expressão heteróloga de proteínas em procariotos (Lithwick & Margalit 2003). Duas estratégias podem ser adotadas para contornar as diferenças entre os códons de dois micro-organismos: a primeira é a expressão de tRNAs na célula hospedeira específicos para o transporte dos códons raros presentes no gene exógeno, e a segunda é a otimização dos códons do gene que será expresso, substituindo os códons com menor frequência de utilização por outros de maior frequência (Wu et al. 2006; Gustafsson et al. 2004).

A primeira estratégia geralmente é adotada para organismos simples e de fácil manipulação, como *E. coli*, uma vez que a expressão de tRNAs pode ser dificultada dependendo da complexidade do organismo. Deste modo, a otimização de códons é uma estratégia adotada por diversos trabalhos e em muitos casos aumenta significativamente os níveis de expressão heteróloga das proteínas que tiveram seus genes otimizados (Gustafsson et al. 2004).

A *P. acidipropionici* está classificada como pertencente ao grupo de bactérias que apresentam um alto conteúdo GC (Actinobactéria) (Vorobjeva 1999), dificultando a expressão heteróloga de suas proteínas em organismos eucariotos. Neste trabalho foi realizada uma comparação entre os códons preferencialmente utilizados em *S. cerevisiae* com relação aos preferencialmente utilizados por *P. acidipropionici* presentes no gene da XI, que indicou uma diferença na utilização dos códons de 55,66% (**Figura 20**).

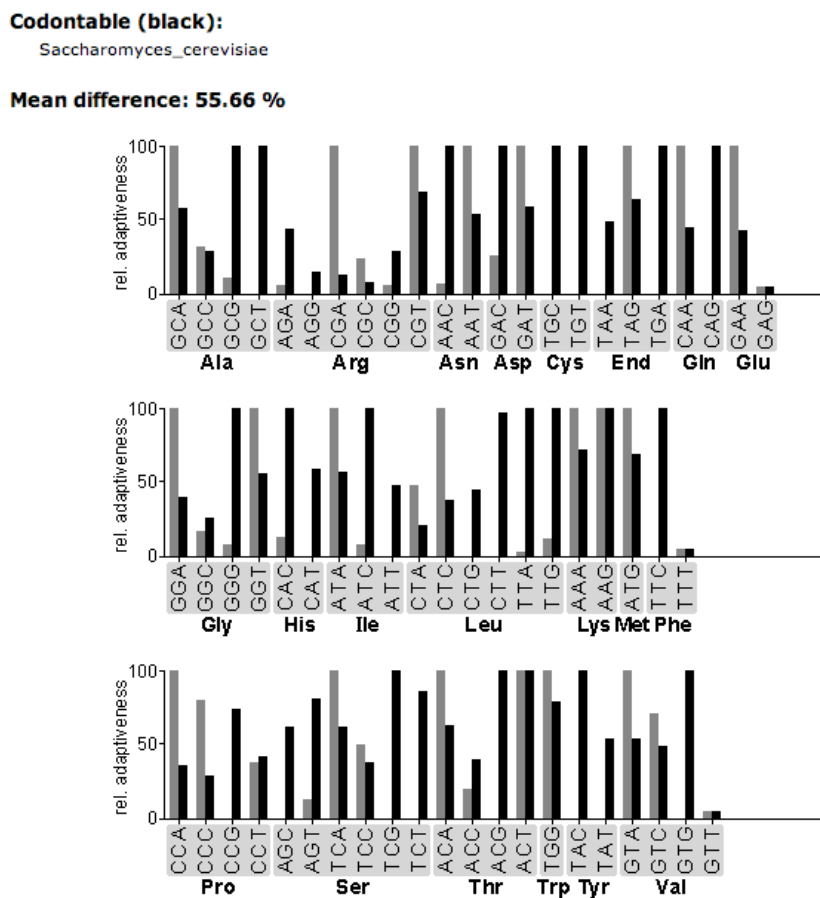


Figura 20: Gráficos de comparação dos códons preferencialmente utilizados por *S. cerevisiae* com relação aos códons presentes na XI de *P. acidipropionici*. Barras em cinza representam os códons que aparecem no gene da XI, e barras em preto representam os códons que são preferencialmente utilizados por *S. cerevisiae*. Gráfico gerado em software GCUA - *Graphical Codon Usage Analyser* (Fuhrmann et al. 2004).

Desta maneira, com o objetivo de aumentar as chances de expressão heteróloga da proteína de *P. acidipropionici* em *S. cerevisiae* foi realizada uma otimização manual dos códons, considerando alguns parâmetros pré-estabelecidos em Gustafsson *et al.*, 2004. Após a otimização, foi realizada uma análise do índice de adaptação dos codóns (CAI), que indica as chances de expressão de um gene em um determinado micro-organismo - quanto mais próximo de 1 maior é a probabilidade do gene ser funcionalmente expresso (Carbone et al. 2003). Assim, as sequências da XI original e da XI otimizada foram comparadas, e foi possível notar que o CAI, que inicialmente era 0,49, subiu para 0,93 após a otimização (**Figura 21**). O gene otimizado foi

sintetizado pela empresa DNA2.0 e em seguida foram realizadas novas construções do cassete de expressão com o novo gene da XI de *P. acidipropionici*.

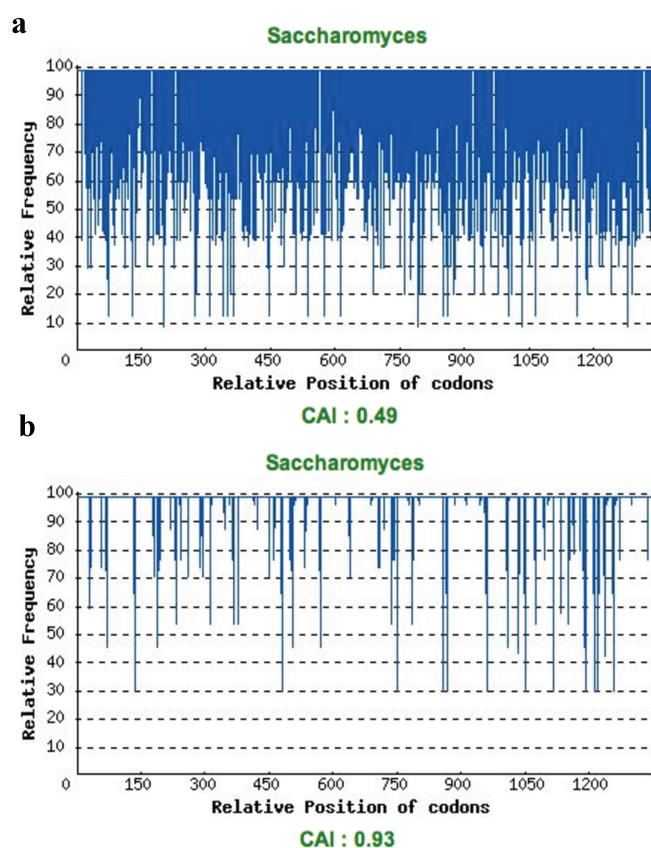


Figura 21: Gráficos do índice de adaptação dos códons (CAI) de XI original e otimizada. As barras azuis indicam a frequência de utilização dos códons por *S. cerevisiae*, de tal forma que quanto maior a região azul do gráfico, menores são as chances de expressão da proteína. **(a)** CAI de gene da XI original e **(b)** CAI de gene da XI otimizada.

4.7 Construção de novas linhagens de A1 com gene *xyIA* otimizado

A xilose isomerase otimizada (XIO) foi amplificada por PCR e utilizada para construir um novo cassete de expressão com o mesmo plasmídeo utilizado anteriormente, pRS426, e também as mesmas regiões promotora e terminadora, *TDH1*. Após a construção do cassete pela metodologia descrita por Gibson e colaboradores (2009) este foi clonado em linhagem DH5 α de *E. coli*, os transformantes foram selecionados em meio contendo ampicilina. Em seguida foi realizada a extração de DNA plasmidial das colônias obtidas e a amplificação de gene de XIO por PCR para checar quais transformantes continham o plasmídeo (**Figura 22**). O plasmídeo construído foi

então sequenciado para checar se foram inseridas mutações durante a construção.

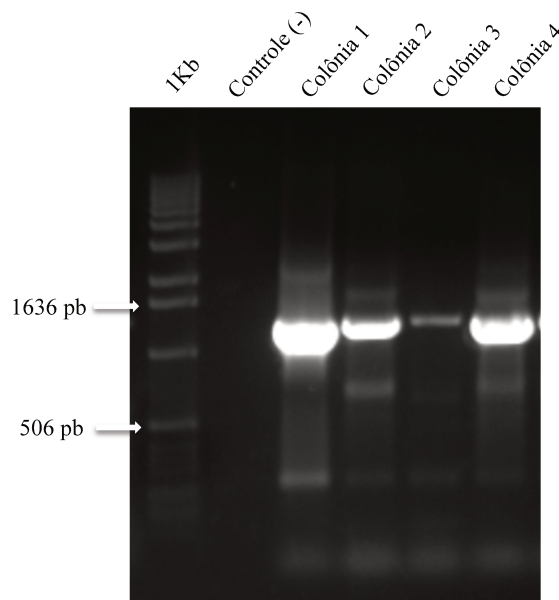


Figura 22: Construção de cassete de XIO. PCR para confirmar as colônias de *E. coli* DH5 α que apresentam o plasmídeo da XIO. O fragmento com 1347 pb indica a presença da XIO nas colônias.

Foram utilizadas as três linhagens de A1 construídas anteriormente, A1 sem nenhuma alteração, A1 com a superexpressão de *XKSI* e A1 com *XKSI* e *GRE3* deletado, para construir as novas linhagens com a XIO, estas foram denominadas: A1_L1O, A1_L2O e A1_L3O. As linhagens base foram transformadas com o plasmídeo contendo a XIO e os transformantes foram selecionados em meio mínimo sem a suplementação de uracila. As colônias obtidas tiveram o seu DNA genômico extraído e foi realizado um PCR para confirmar a inserção do gene de interesse na levedura (**Figura 23**). Depois de finalizadas as construções das novas linhagens, foram realizados novos testes fenotípicos para avaliar o crescimento e consumo de xilose pelas mesmas.

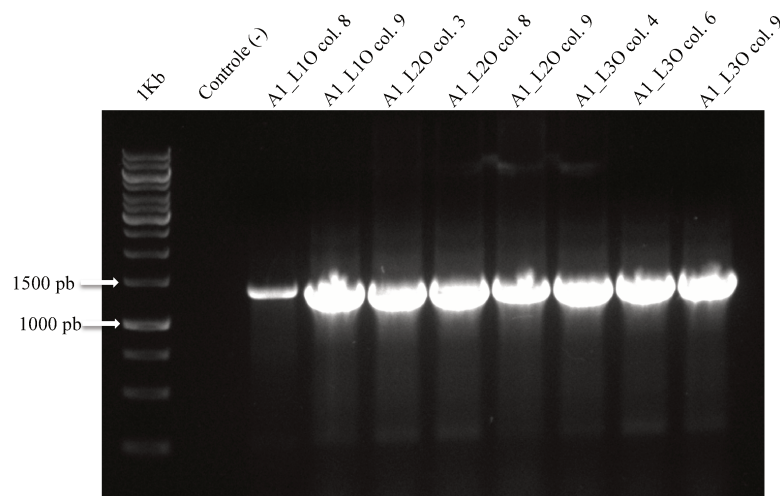


Figura 23: Transformação de linhagens de A1 com plasmídeo de XIO. Fragmento com 1347 pb indica a presença da XIO nas linhagens de A1_L1O, A1_L2O e A1_L3O.

4.8 Testes fenotípicos de *S. cerevisiae* contendo XIO

Inicialmente foram preparadas culturas permanentes das linhagens A1_L1O, A1_L2O e A1_L3O, para garantir a reprodutibilidade dos experimentos. A partir dessas culturas permanentes foi realizada a ativação das células em meio mínimo, sem a suplementação de uracila, contendo apenas glicose como fonte de carbono. Quando o pré-inóculo atingiu o final da fase exponencial foi realizado um novo inóculo com uma OD₆₀₀ inicial de aproximadamente 0,2, em meio mínimo sem suplementação de uracila, e uma mistura de xilose e glicose 2% (1:1). A OD₆₀₀ foi monitorada a cada 12 horas e foram retiradas alíquotas para posterior análise em HPLC.

Após 5 dias de crescimento as células foram transferidas para novo meio contendo apenas xilose 2% como fonte de carbono, a OD₆₀₀ foi monitorada a cada 12 horas e alíquotas foram retiradas para posterior análise em HPLC. Na **Figura 24** estão representadas as curvas de consumo das fontes de carbono durante as fermentações, e elas indicam que novamente não houve consumo de xilose por nenhuma das linhagens construídas.

Tendo em vista que as xiloses isomerases dependem de cofatores enzimáticos, e que a ausência desses cofatores já foi descrita como a causa da não funcionalidade da XI em *S.*

cerevisiae (Sarchy et al. 1987), foram realizados ensaios fermentativos com acréscimo de cátions bivalentes, Mg^{2+} , Mn^{2+} e Co^{2+} , geralmente descritos como cofatores dessa enzima. Diferentes concentrações (0,25mM, 0,5mM e 1mM) de sulfato de magnésio, sulfato de manganês e cloreto de cobalto foram adicionados ao meio de cultivo das linhagens de A1_L3O. A fermentação foi realizada por 7 dias, em meio mínimo sem a suplementação de uracila, contendo apenas xilose como fonte de carbono. Os resultados obtidos após análise das amostras em HPLC estão apresentados na **Figura 25**, onde novamente não é possível observar consumo de xilose.

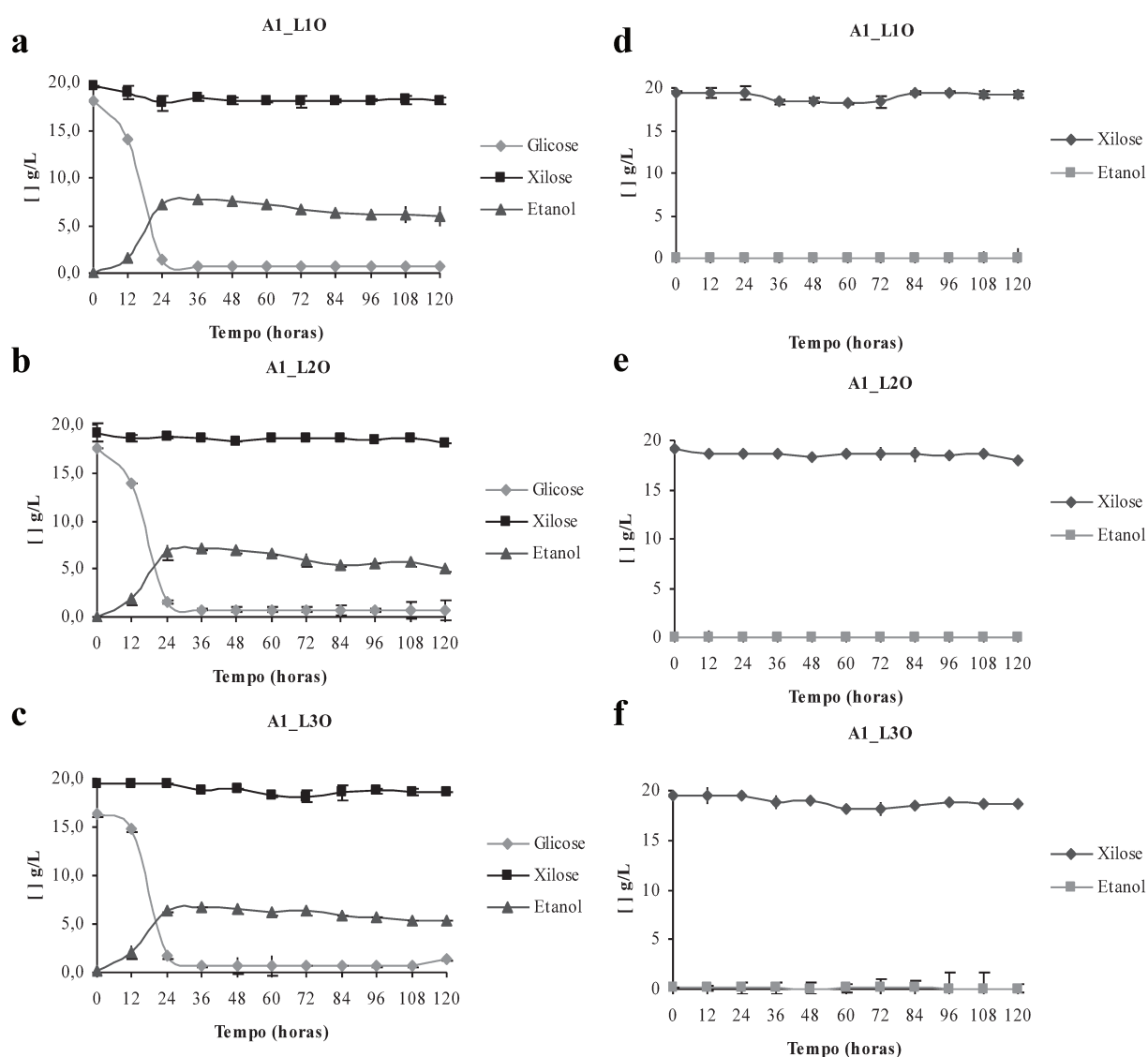


Figura 24: Fermentações de linhagens de A1 com gene da *xyfA* otimizado. (a) fermentação de A1_L1O em meio contendo mistura de glicose e xilose (1:1) 4%; **(b)** fermentação de A1_L2O em meio contendo mistura de glicose e

xilose (1:1) 4%; **(c)** fermentação de A1_L3O em meio contendo mistura de glicose e xilose (1:1) 4%; **(d)** fermentação de A1_L1O em meio contendo xilose 2% como única fonte de carbono; **(e)** fermentação de A1_L2O em meio contendo xilose 2% como única fonte de carbono; **(f)** fermentação de A1_L3O em meio contendo xilose 2% como única fonte de carbono.

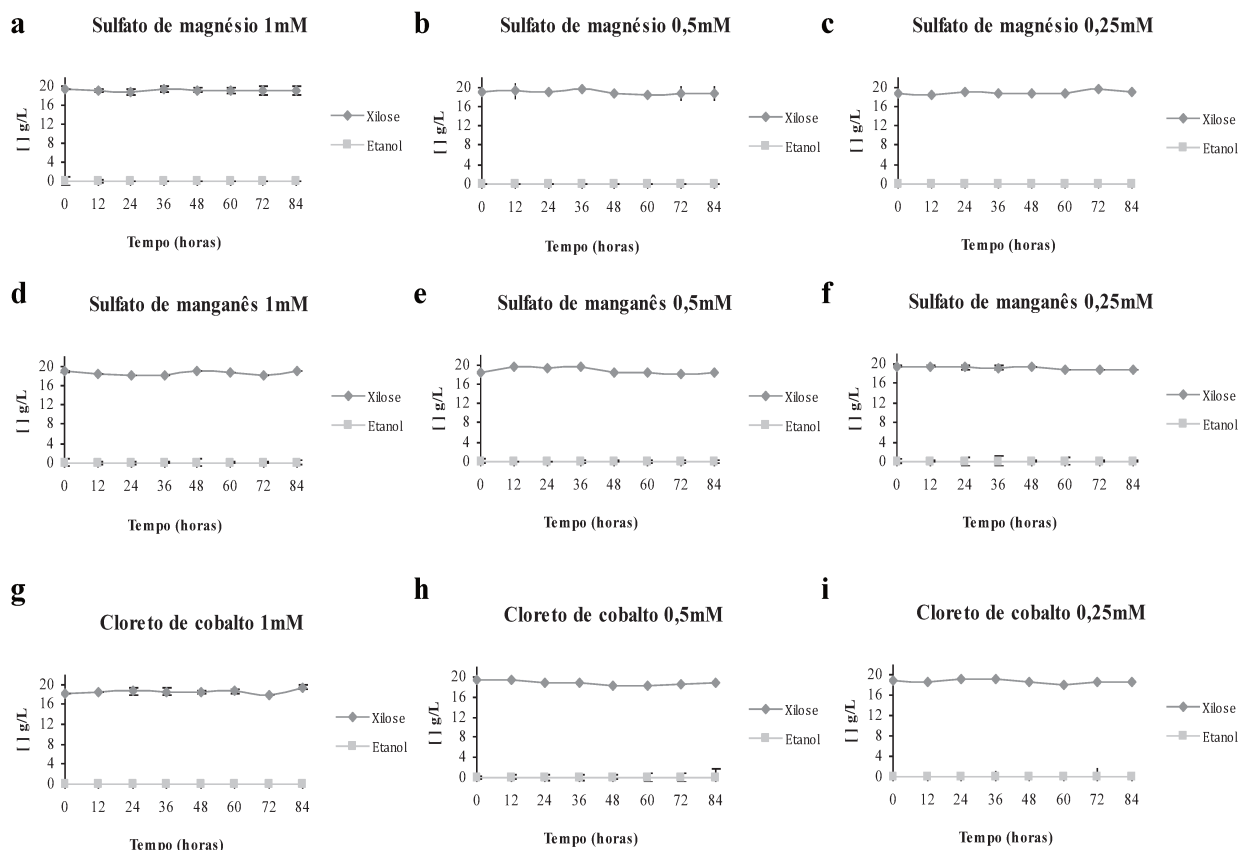


Figura 25: Fermentações de A1_L3O em meios contendo cofatores enzimáticos. **(a)** fermentação de A1_L3O em meio suplementado com sulfato de magnésio 1mM; **(b)** fermentação de A1_L3O em meio suplementado com sulfato de magnésio 0,5mM; **(c)** fermentação de A1_L3O em meio suplementado com sulfato de magnésio 0,25mM; **(d)** fermentação de A1_L3O em meio suplementado com sulfato de manganês 1mM; **(e)** fermentação de A1_L3O em meio suplementado com sulfato de manganês 0,5mM; **(f)** fermentação de A1_L3O em meio suplementado com sulfato de manganês 0,25mM; **(g)** fermentação de A1_L3O em meio suplementado com cloreto de cobalto 1mM; **(h)** fermentação de A1_L3O em meio suplementado com cloreto de cobalto 0,5mM; **(i)** fermentação de A1_L3O em meio suplementado com cloreto de cobalto 0,25mM.

4.9 Testes de engenharia evolutiva

Uma maneira de estudar a capacidade de adaptação e desenvolvimento de um micro-organismo em ambientes diferentes é através da utilização de técnicas de engenharia evolutiva. A engenharia evolutiva pode ser definida como uma estratégia de melhoramento baseada na teoria da seleção natural, onde o passo inicial é a identificação do fenótipo de interesse, para que em

seguida seja determinada a base genética e/ou os fatores ambientais que concedem tal genótipo. Essa é uma técnica muito utilizada como complemento dos estudos de engenharia metabólica (Sauer 2001).

O desenvolvimento de uma linhagem de *S. cerevisiae* capaz de consumir xilose e produzir etanol com alto rendimento e produtividade é o foco de estudo de diversos grupos de pesquisa, e em muitos casos, mesmo após a execução de todas as modificações teoricamente necessárias para permitir o consumo de xilose pela levedura, não foi observado crescimento na presença desse açúcar, ou quando apresentava, o rendimento era muito inferior ao esperado (Sonderegger & Sauer 2003). Para contornar esse problema, alguns pesquisadores utilizaram a engenharia evolutiva, e puderam observar um aumento significativo no desempenho das linhagens desenvolvidas (Brat et al. 2009; Madhavan et al. 2009; Kuyper et al. 2005; Hahn-Hägerdal et al. 2001).

Desta maneira, ensaios de engenharia evolutiva foram realizados com as linhagens A1_L1O, A1_L2O e A1_L3O de *S. cerevisiae*. O experimento foi desenvolvido em *erlenmeyers* contendo meio mínimo, sem a suplementação de uracila, e inicialmente uma mistura de xilose e glicose (1:1) 2%; alíquotas foram retiradas a cada 48 horas. A cada sete dias, as células eram transferidas para novos meios contendo concentrações cada vez maiores de xilose e menores de glicose, até que após um mês elas foram inoculadas em meio contendo apenas xilose 4%. O experimento teve duração de dois meses e, ao final, ainda não foi possível observar o consumo de xilose por nenhuma das três linhagens, como pode ser observado na **Figura 26**.

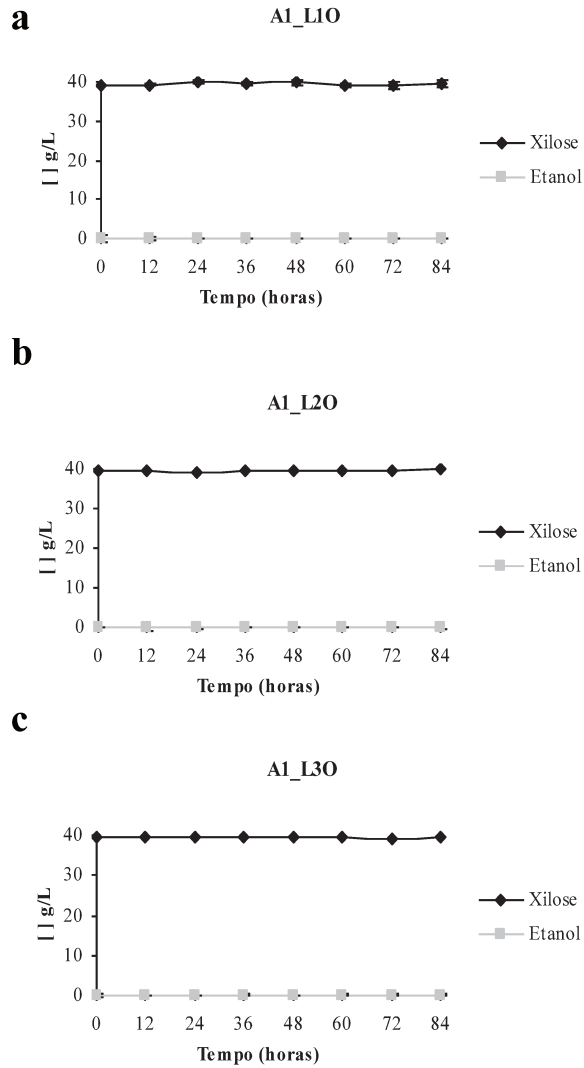


Figura 26: Fermentações de A1 contendo gene *xyIA* otimizado após dois meses de engenharia evolutiva. (a) fermentação de A1_L1O em meio contendo xilose 4% como única fonte de carbono; **(b)** fermentação de A1_L2O em meio contendo xilose 4% como única fonte de carbono; **(c)** fermentação de A1_L3O em meio contendo xilose 4% como única fonte de carbono.

4.10 Extração de RNA de linhagens de *S. cerevisiae*

Na tentativa de compreender os motivos pelos quais as linhagens desenvolvidas não foram capazes de consumir xilose, mesmo após os testes de engenharia evolutiva e testes de fermentação com cofatores enzimáticos, foi realizada a extração de RNA das mesmas para verificar se o gene da XIO inserido estava expresso nas leveduras. Após o tratamento das amostras de RNA com DNase, foi realizado um PCR para checar se não havia contaminação com DNA nas amostras de

RNA (**Figura 27**). Em seguida, foi realizada a síntese de cDNA.

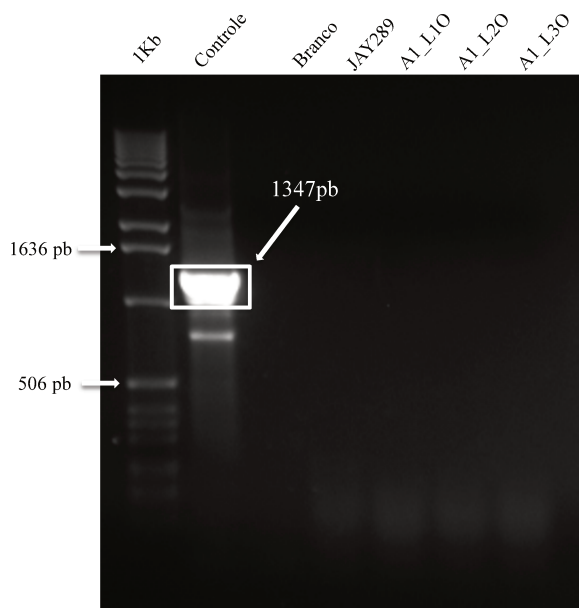


Figura 27: Confirmação da ausência de contaminação das amostras de RNA com DNA. A ausência de bandas nas amostras: branco, JAY289, A1_L1O, A1_L2O e A1_L3O indica que não há contaminação com DNA nas amostras de RNA.

Foi realizado um PCR com o cDNA, utilizando os oligonucleotídeos iniciadores para amplificar o gene *xylA* otimizado, e também, os oligonucleotídeos iniciadores do gene de referência *RPE1*, que codifica a ribulose-fosfato 3-epimerase (E.C. 5.1.3.1), para validar o PCR. Na **Figura 28**, observa-se que o gene da XIO está expresso nas três linhagens A1_L1O, A1_L2O e A1_L3O. Esse resultado é um indicativo forte de que a expressão do gene não é o problema, e este pode ser atribuído a alguma dificuldade durante a tradução da mesma, que impossibilitaria seu funcionamento adequado.

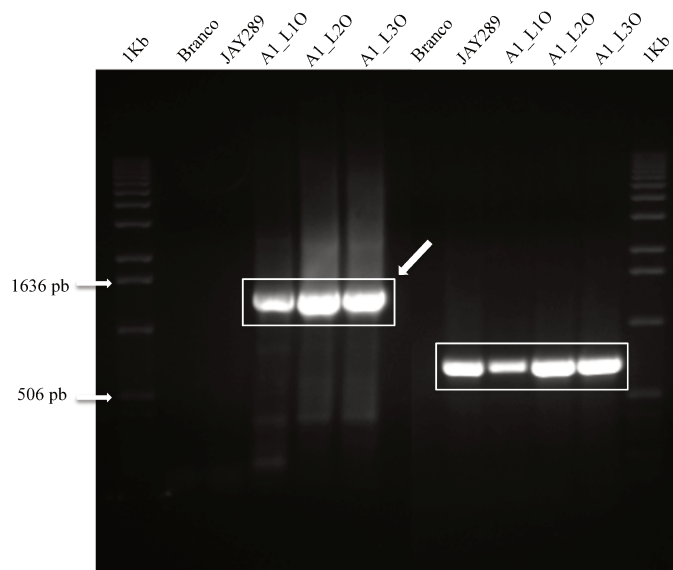


Figura 28: Confirmação de expressão de gene *xyIA* nas linhagens transformadas. Retângulo branco indicado com a seta apresenta as bandas de amplificação de *xyIA* a partir de cDNA das linhagens A1_L1O, A1_L2O, e A1_L3O, a linhagem JAY289 foi utilizada como controle negativo para o gene da XIO. Retângulo com quatro bandas são referentes à gene *RPEI* utilizado como controle positivo.

4.11 Determinação da atividade enzimática da XI

Tendo em vista o fato de que o gene da XIO está expresso nas linhagens de A1 construídas, e que mesmo assim elas não são capazes de consumir xilose, foram realizados ensaios enzimáticos visando analisar se a proteína é funcional. Assim, foi realizada uma padronização do ensaio para dosar a atividade enzimática utilizando como controle uma xilose isomerase proveniente de um fungo expressa sob as mesmas condições na mesma linhagem de *S. cerevisiae* e que possibilita o consumo de xilose pela levedura. Essa linhagem foi denominada A1_CTRL.

Os ensaios foram realizados com o extrato bruto intracelular obtido das linhagens A1_L1O, A1_L2O, A1_L3O, JAY 289, como controle negativo e A1_CTRL, como controle positivo da atividade. Na **Tabela 2** é possível observar os resultados obtidos, onde nenhuma das três linhagens construídas apresentou atividade enzimática, indicando que provavelmente a proteína não está sendo traduzida ou que não está ocorrendo o enovelamento correto da mesma, impossibilitando que a mesma seja funcional, sendo necessários novos estudos para compreender

melhor quais as razões que levam à não funcionalidade da enzima quando expressa em *S. cerevisiae*.

Tabela 2: Atividade em U/mL e atividade específica (U/mg.prot) da xilose isomerase das linhagens construídas, A1_L1O, A1_L2O e A1_L3O. ND: atividade não detectada.

Linhagem	Atividade U/mL	Atividade específica U/mg.prot
JAY289	ND	ND
Controle (+)	0,67 ±0,02	0,47 ±0,01
A1_L1O	ND	ND
A1_L2O	ND	ND
A1_L3O	ND	ND

4.12 Expressão heteróloga da XI de *P. acidipropionici* em *E. coli*

Uma vez que o gene da XIO está expresso mas a enzima não apresenta atividade enzimática e, visando compreender os motivos que causam a não funcionalidade, foram delineados experimentos para caracterizar bioquimicamente a enzima em questão e tentar, desta forma, analisar se fatores como o pH ótimo, a temperatura ótima, a estabilidade em diferentes pHs e temperaturas, bem como o comportamento da enzima na presença de íons e outras substâncias, como o xilitol, podem influenciar seu desempenho quando expressa em *S. cerevisiae*.

Assim, inicialmente, foi realizada a expressão heteróloga da proteína em *E. coli*, para posterior purificação da mesma por cromatografia de afinidade e, em seguida, caracterizá-la bioquimicamente. A clonagem de *xylA* em pGem-T-Easy (**Figura 29**) e subclonagem em pETSUMO – versão síncroton (**Figura 30**) foram realizadas como descrito anteriormente.

Após a obtenção da cepa de *E. coli* Rosetta2 contendo o pETSUMO + *xylA* foram realizados os ensaios de expressão como descrito anteriormente. As amostras obtidas foram processadas e a amostra não induzida, utilizada como controle negativo, e as fases solúvel e insolúvel foram aplicadas em gel de poliacrilamida SDS-PAGE visando observar o padrão de

expressão da proteína nas diferentes condições analisadas.

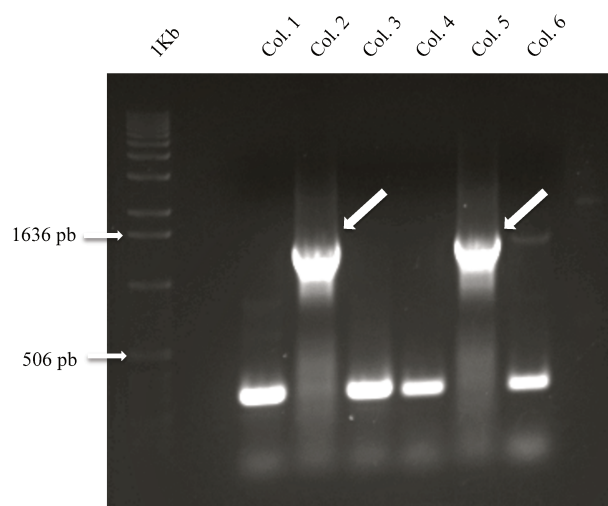


Figura 29: Confirmação de transformação de *E. coli* DH5α com pGem-T-Easy + *xylA*. Setas indicam bandas de colônias 2 e 5 com 1347 pb que representam gene *xylA* amplificado.

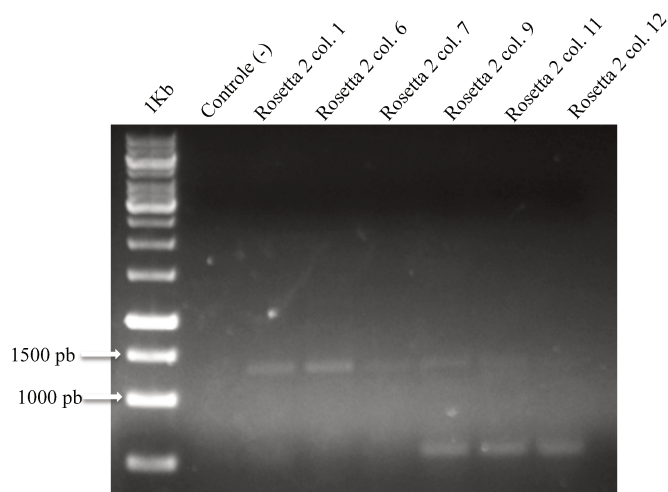


Figura 30: Confirmação de transformação de *E. coli* Rosetta2 com pETSUMO + *xylA*. O fragmento de 1347 pb indica a presença da XI colônias 1, 6, 7, 9 e 11 de Rosetta2.

Após a análise dos géis de SDS-PAGE não foi possível observar um padrão de expressão da proteína. A XI de *P. acidipropionici* apresenta aproximadamente 52kDa, e sua expressão resultaria em uma proteína com cerca de 65kDa, correspondendo aos 52kDa da XI somados aos

13kDa da cauda SUMO, porém, não foi observada a expressão da proteína tanto na fase solúvel quanto na insolúvel, como apresentado na **Figura 31**. Para dar continuidade ao experimento e tentar compreender as características da XI de *P. acidipropionici* que podem dificultar sua expressão em *S. cerevisiae*, novas estratégias de expressão heteróloga devem ser adotadas.

Variar as condições de indução da proteína seria a primeira estratégia a ser adotada neste caso, alterando a temperatura dos testes de expressão, a agitação do cultivo, ou até mesmo a OD₆₀₀ inicial da cultura. Secundariamente, caso as alternativas apresentadas não demonstrem resultado positivo, pode ser considerada a realização de uma nova construção, utilizando um vetor de expressão diferente, ou então, utilizar outra cepa de *E. coli* e, em último caso, realizar uma otimização e síntese de um novo gene da XI. Isto porque a *P. acidipropionici* apresenta um alto conteúdo GC, o que lhe confere características peculiares, apresentando um *codon usage* diferente de *E. coli*, fato que pode dificultar a expressão heteróloga do gene.

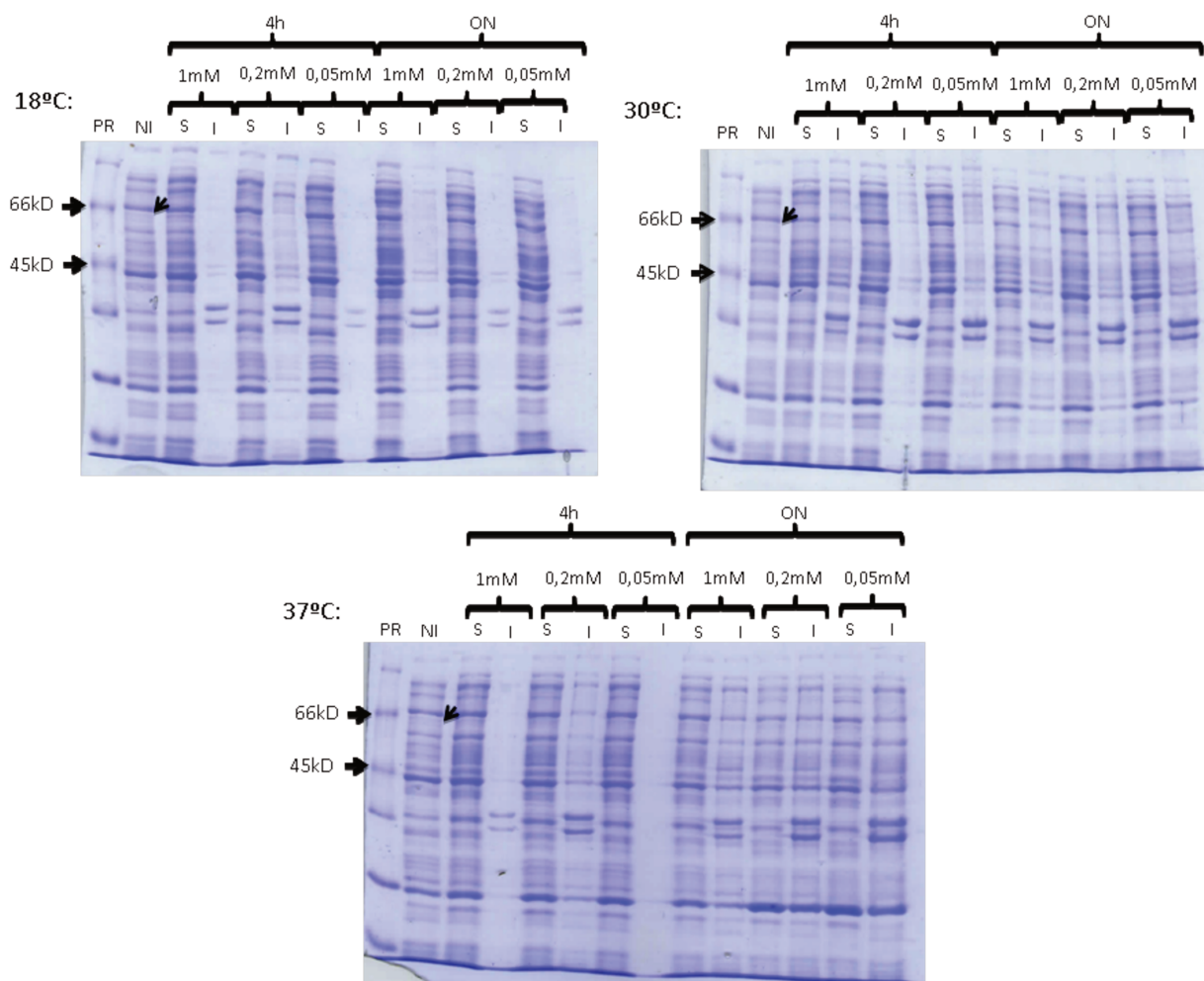


Figura 31: Gel de poliacrilamida SDS-PAGE de teste de expressão de *xylA*. Seta preta indica banda relativa à enzima XI. **NI:** amostra não induzida. **S:** amostra da fração solúvel. **I:** amostra da fração insolúvel. **PR:** Page Ruler.

4.13 Desafios da expressão heteróloga da XI de *P. acidipropionici* em *S. cerevisiae*

Durante o desenvolvimento do trabalho, por diversas vezes, surgiram questionamentos com relação às características que levam a xilose isomerase em questão não ser funcionalmente expressa na levedura *S. cerevisiae* e, na busca por uma explicação, que pudesse ajudar a contornar este problema, foram encontrados diversos estudos que abordam a expressão heteróloga da XI em *S. cerevisiae*, sendo que alguns obtiveram o sucesso desejado, enquanto outros se depararam com desafios semelhantes aos apresentados neste trabalho.

A **Tabela 3** apresenta uma relação de 36 organismos diferentes, dos quais 36 xiloses

isomerases foram obtidas e expressas em *S. cerevisiae*. Dentre essas, apenas 12 XI foram funcionalmente expressas, provenientes de diversos organismos, como bactérias: *Bacterioides fragilis*, *Bacterioides stercoris*, *Bacterioides thetaiotaomicron*, *Clostridium difficile*, *Clostridium phytofermentans*, *Fusobacterium mortiferu*, *Thermus thermophilus* e *Prevotella ruminicol*; fungos: *Cyllumyces aberensis*, *Orpinomyces sp.* e *Piromyces sp E2*; e até mesmo de um urocordado *Ciona intestinalis* (Hector et al. 2013; Shen et al. 2012; Teunissen & De Bont 2011; Ha et al. 2010; Brat et al. 2009; Madhavan et al. 2009; Maris et al. 2007; Kuyper et al. 2003; Walfridsson et al. 1996).

Tabela 3: Lista dos micro-organismos que tiveram suas xiloses isomerases expressas em *S. cerevisiae*, indicando se a expressão foi funcional ou não.

Organismo de origem	Atividade em <i>S. cerevisiae</i>	Referência
<i>Actinoplanes missouriensis</i>	-	Amore et al., 1989
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	-	Brat et al., 2008
<i>Arabidopsis thaliana</i>	-	Brat et al., 2008
<i>Arthrobacter aurescens</i>	-	Teunissen e De Bont, 2011
<i>Bacillus licheniformis</i>	-	Brat et al., 2008
<i>Bacillus subtilis</i>	-	Amore et al., 1989
<i>Bacteroides fragilis</i>	+	Teunissen e De Bont, 2011
<i>Bacteroides stercoris</i>	+	Ha et al., 2010
<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	+	Maris et al., 2007
<i>Bifidobacterium longus</i>	-	Ha et al., 2010
<i>Burkholderia phytofirmans</i>	-	Teunissen e De Bont, 2011
<i>Burkholderia xenovorans</i>	-	Brat et al., 2009
<i>Ciona intestinalis</i>	+	Teunissen e De Bont, 2011
<i>Clostridium difficile</i>	+	Shen et al., 2012
<i>Clostridium phytofermentans</i>	+	Brat et al., 2009
<i>Clostridium thermosulfurogens</i>	-	Moes et al., 1996
<i>Cyllumyces aberensis</i>	+	Shen et al., 2012
<i>Escherichia coli</i>	-	Sarthy et al., 1987
<i>Fusobacterium mortiferum</i>	+	Teunissen e De Bont, 2011
<i>Haemophilus somnus</i>	-	Teunissen e De Bont, 2011
<i>Lactobacillus pentosus</i>	-	Hallborn, 1995
<i>Leifsonia xyli</i>	-	Brat et al., 2009
<i>Orpinomyces sp.</i>	+	Madhavan et al., 2009
<i>Physcomitrella patens</i>	-	Teunissen e De Bont, 2011
<i>Piromyces sp. E2</i>	+	Kuyper et al., 2003
<i>Prevotella ruminicola</i>	+	Hector et al., 2013
<i>Robiginatalea biformata</i>	-	Brat et al., 2009
<i>Saccharophagus degradans</i>	-	Brat et al., 2009
<i>Salmonella typhimurium</i>	-	Brat et al., 2009
<i>Staphylococcus xylosus</i>	-	Brat et al., 2009
<i>Streptomyces diastaticus</i>	-	Brat et al., 2009
<i>Streptomyces rubiginosus</i>	-	Gárdonyi e Hahn-Hägerdal, 2003
<i>Thermatoga maritima</i>	-	Teunissen e De Bont, 2011
<i>Thermoanaerobacterium thermosulfurigenes</i>	-	Moes et al., 1996
<i>Thermus thermophilus</i>	+	Walfridsson et al., 1996
<i>Xantomonas campestris</i>	-	Brat et al., 2009

As demais XIs provenientes dos organismos listados não puderam ser expressas com sucesso. Apesar do grande número de tentativas de expressão, sem sucesso, poucos são os trabalhos descritos que procuram compreender as razões que permitem que algumas XIs sejam funcionalmente expressas, sem desafios aparentes, enquanto outras apresentam tantos entraves. Alguns trabalhos aprofundaram essa discussão e apresentaram algumas hipóteses sobre as causas da não funcionalidade das enzimas.

Uma hipótese levantada refere-se à deficiência de cofatores enzimáticos, que poderia levar à não funcionalidade da enzima (Sarthy et al. 1987). Entretanto, é pouco provável que esse fator seja resolutivo no caso desse estudo, uma vez que foram realizados ensaios de fermentação com suplementação dos principais cofatores enzimáticos (Item 4.8) e, ao final, os resultados obtidos indicaram que não houve melhoria no consumo de xilose pelas linhagens. O pH interno da levedura também já foi considerado um potencial fator limitante à atividade da enzima (van Maris et al. 2006; Walfridsson et al. 1996; Sarthy et al. 1987), porém é comprovado que durante a fermentação o pH interno da levedura se mantém perto da neutralidade (Dombek & Ingram 1987), diminuindo a probabilidade de que essa hipótese explique a situação em questão.

A hipótese mais aceita atualmente é a de que a não funcionalidade se dá em razão de um enovelamento incorreto da proteína. Um trabalho desenvolvido por Gárdonyi & Hahn-Hägerdal (2003) comparou a XI não funcionalmente expressa de *Streptomyces rubiginosus* com a de *Thermus thermophilus*, e foi encontrada uma diferença significativa nos pares de íons internos formados nos tetrâmeros das duas proteínas. A partir disso concluíram que muito provavelmente essa diferença está diretamente relacionada com o enovelamento correto da proteína. Porém, é comum encontrar proteínas provenientes de organismos termófilos com um alto número de pares de íons, uma vez que estes são responsáveis por conferir uma maior estabilidade às proteínas que estão sujeitas à temperaturas elevadas (Németh et al. 2000).

Outra hipótese interessante foi levantada com base em uma patente (Teunissen & De Bont 2011) que protegia todas as xiloses isomerases expressas em *S. cerevisiae* que apresentassem oito regiões contendo aminoácidos conservados em posições específicas. Com essas informações foi deduzido que a presença desses aminoácidos na proteína é essencial para sua expressão funcional na levedura. A função desses motivos conservados poderia estar relacionada à estabilização do tetrâmero - que é formado pela maioria das XI, ou à formação dos pares de íons citados anteriormente - que supostamente seriam responsáveis pelo enovelamento correto da proteína, ou ainda, que essas regiões permitiriam a ancoragem de chaperonas, presentes na levedura, que auxiliariam no enovelamento da proteína.

Dessa forma, a sequência da XI de *P. acidipropionici* utilizada neste trabalho foi alinhada com a sequência de *Pyromyces SP* descrita na patente para avaliar se a primeira possuía as 8 regiões conservadas. Como pode ser observado na **Figura 32**, que representa o alinhamento das sequências, foi possível notar que apenas 3 das 8 regiões eram compatíveis.

Inicialmente foi deduzido que a ausência dessas regiões conservadas explicaria a não funcionalidade da XI de *P. acidipropionici*. Para avaliar essa possibilidade, foi realizado um novo alinhamento da sequência de *Pyromyces sp.* com sequências das XIs descritas como funcionalmente expressas em *S. cerevisiae*. Através dessa análise foi possível notar que a proteína de *T. thermophilus* também não apresentava todas as regiões conservadas, levando à conclusão de que a presença desses motivos não são essenciais para a expressão funcional de todas as xilose isomerases.

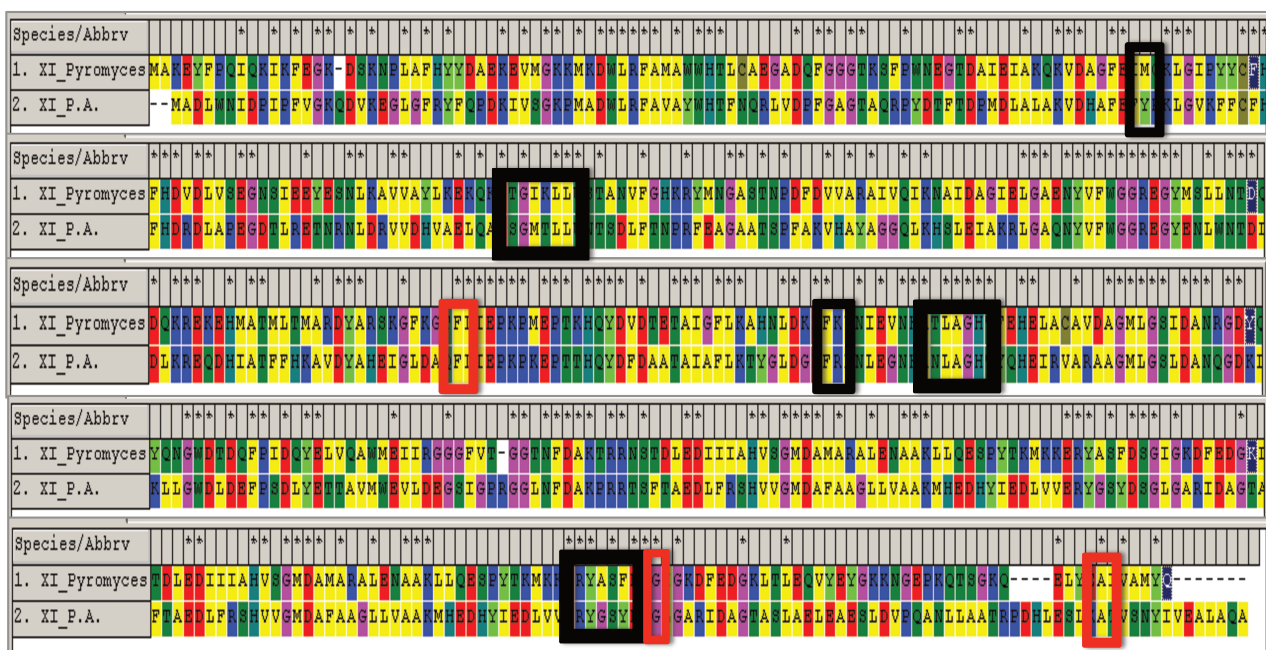


Figura 32: Alinhamento das sequências das xiloses isomerases provenientes de *Pyromyces* sp. E2 e *P. acidipropionici*. Regiões destacadas em preto não apresentam similaridade, e regiões destacadas em vermelho apresentam similaridade.

Alguns trabalhos, que se baseiam na hipótese de que as dificuldades de expressão heteróloga da XI em *S. cerevisiae* são provenientes do enovelamento incorreto da proteína, têm focado na expressão de chaperonas juntamente com a enzima de interesse. Recentemente, Guadalupe-Medina e colaboradores (2013) desenvolveram um trabalho de expressão heteróloga de uma rubisco, proveniente de *Thiobacillus denitrificans* em *S. cerevisiae*, juntamente com um sistema de chaperoninas proveniente de *E. coli*, que possibilitou a expressão funcional da enzima na levedura, indicando uma estratégia promissora para auxiliar a expressão heteróloga de proteínas.

5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

O desenvolvimento de uma linhagem de *S. cerevisiae* capaz de fermentar xilose à etanol é essencial para a viabilização do processo de produção de etanol a partir de materiais lignocelulósicos. Para tal, a expressão da via da xilose isomerase é uma estratégia promissora, uma vez que é simples, apresenta um rendimento final de produção de etanol elevado e não sofre com o desbalanço de cofatores que ocorre na via oxi-redutiva.

A partir dos dados obtidos neste trabalho é possível afirmar que a bactéria *P. acidipropionici* consome xilose como única fonte de carbono de maneira eficiente e, para tal, utiliza a via da xilose isomerase, convertendo a xilose diretamente à xilulose. Além disso, também ficou comprovado que a via de consumo de xilose dessa bactéria não sofre repressão catabólica na presença de glicose. Apesar de suas condições ótimas de crescimento, pH 6,8 e temperatura 30°C, serem semelhantes às condições ótimas de fermentação da levedura *S. cerevisiae*, sua xilose isomerase não pôde ser funcionalmente expressa na levedura.

O gene *xylA* de *P. acidipropionici* foi expresso em *S. cerevisiae*, porém não foi detectada atividade enzimática e a levedura não apresentou consumo de xilose em nenhuma das condições fermentativas analisadas, indicando que provavelmente a proteína formada não é funcional. Diversas são as teorias que podem explicar esse fenômeno e, dentre elas, a mais plausível propõe que a proteína não é enovelada corretamente, impossibilitando sua expressão funcional. A expressão de um sistemas de chaperoninas foi apresentado recentemente como uma solução para o enovelamento incorreto das proteínas em *S. cerevisiae*, de tal forma que essa metodologia será posteriormente estudada visando alcançar a expressão funcional da XI de *P. acidipropionici* na levedura.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alonso Pippo, W. et al., 2010. Energy recovery from sugarcane-trash in the light of 2nd generation biofuels. Part 1: Current Situation and Environmental Aspects. *Waste and Biomass Valorization*, 2(1), pp.1–16.
- Amore, R., Wilhelm, M., Hollenberg, C.P., 1989. Biotechnology the fermentation of xylose-an analysis of the expression of *Bacillus* and *Actinoplanes* xylose isomerase genes in yeast. *Applied microbiology and biotechnology*, 75, pp.351-357.
- Ausubel, F.M. et al., 2003. *Current Protocols in Molecular Biology Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley and Sons Inc.
- Balat, M. & Balat, H., 2009. Recent trends in global production and utilization of bio-ethanol fuel. *Applied Energy*, 86(11), pp.2273–2282.
- Brat, D., Boles, E. & Wiedemann, B., 2009. Functional expression of a bacterial xylose isomerase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and environmental microbiology*, 75(8), pp.2304–11.
- Cadenas, A. & Cabezudo, S., 1998. Biofuels as Sustainable Technologies: Perspectives for Less Developed Countries. *Technological Forecasting and Social Change*, 58(1-2), pp.83–103.
- Cai, Z., Zhang, B. & Li, Y., 2012. Engineering *Saccharomyces cerevisiae* for efficient anaerobic xylose fermentation: reflections and perspectives. *Biotechnology journal*, 7(1), pp.34–46.
- Callens, M. et al., 1986. Catalytic properties of D-xylose isomerase from *Streptomyces violaceoruber*. *Enzyme and microbial technology*, 8, pp.696–700.
- Carbone, a., Zinovyev, a. & Kepes, F., 2003. Codon adaptation index as a measure of dominating codon bias. *Bioinformatics*, 19(16), pp.2005–2015.
- Carrondo, M.J.T., Crspo, J.P.S.G. & Moura, M.J., 1988. Production of propionic acid using a xylose utilizing *Propionibacterium*. , pp.295–312.
- Chandrakant, P. & Bisaria, V.S., 2000. Application of a compatible xylose isomerase in simultaneous bioconversion of glucose and xylose to ethanol. *Biotechnology and Bioprocess*

Engineering, 5(1), pp.32–39.

Cox, M.M., Doudna, J.A. & O'Donnell, M., 2012. *Biologia Molecular: Princípios e Técnicas* First., Artmed.

Dombek, K.M. & Ingram, L.O., 1987. Ethanol production during batch fermentation with *Saccharomyces cerevisiae*: changes in glycolytic enzymes and internal pH. *Applied and environmental microbiology*, 53(6), pp.1286–91.

Doran, J.B. et al., 2000. Fermentations of pectin-rich biomass with recombinant bacteria to produce fuel ethanol. *Applied biochemistry and biotechnology*, 84-86(2), pp.141–52.

Eliasson, A. et al., 2000. Anaerobic xylose fermentation by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* carrying XYL1, XYL2, and XKS1 in mineral medium chemostat cultures. *Applied and environmental microbiology*, 66(8), pp.3381–3386.

Fox, J.M. et al., 2012. An evaluation of cellulose saccharification and fermentation with an engineered *Saccharomyces cerevisiae* capable of cellobiose and xylose utilization. *Biotechnology journal*, 7(3), pp.361–73.

Fuhrmann, M. et al., 2004. Monitoring dynamic expression of nuclear genes in *Chlamydomonas reinhardtii* by using a synthetic luciferase reporter gene. *Plant molecular biology*, 55(6), pp.869–81.

Galbe, M. & Zacchi, G., 2002. A review of the production of ethanol from softwood. *Applied microbiology and biotechnology*, 59(6), pp.618–28.

Gárdonyi, M. & Hahn-Hägerdal, B., 2003. The *Streptomyces rubiginosus* xylose isomerase is misfolded when expressed in *Saccharomyces cerevisiae*. *Enzyme and Microbial Technology*, 32(2), pp.252–259.

Gasteiger, E. et al., 2005. Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. In J. M. Walker, ed. *The Proteomics Protocols Handbook*. Totowa, NJ: Humana Press Inc., pp. 571–608.

Gibson, D.G. et al., 2009. Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred

- kilobases. *Nature Methods*, 6(5), pp.12–16.
- Goldemberg, J., 2007. Ethanol for a sustainable energy future. *Science (New York, N.Y.)*, 315(5813), pp.808–10.
- Golias, H. et al., 2002. Evaluation of a recombinant *Klebsiella oxytoca* strain for ethanol production from cellulose by simultaneous saccharification and fermentation: comparison with native cellobiose-utilising yeast strains and performance in co-culture with thermotolerant yeast and *Zymomonas mobilis*. *Journal of biotechnology*, 96(2), pp.155–68.
- Guadalupe-Medina, V. et al., 2013. Carbon dioxide fixation by Calvin-Cycle enzymes improves ethanol yield in yeast. *Biotechnology for biofuels*, 6(1), p.125.
- Gueldener, U. et al., 2002. A second set of loxP marker cassettes for Cre-mediated multiple gene knockouts in budding yeast. *Nucleic acids research*, 30(6), p.e23.
- Gustafsson, C., Govindarajan, S. & Minshull, J., 2004. Codon bias and heterologous protein expression. *Trends in biotechnology*, 22(7), pp.346–53.
- Ha, S. et al., 2010. Engineered *Saccharomyces cerevisiae* capable of simultaneous cellobiose and xylose fermentation. , pp.1–6.
- Hadfield, C. et al., 1993. The expression and performance of cloned genes in yeasts. *Mycological Research*, 97(8), pp.897–944.
- Hahn-Hägerdal, B. et al., 1994. Biochemistry and physiology of xylose fermentation by yeasts. *Enzyme Microb. Technol.*, 16, pp.933–943.
- Hahn-Hägerdal, B. et al., 2001. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for xylose utilization. *Advances in biochemical engineering/biotechnology*, 73, pp.53–84.
- Hallborn, J. 1995. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*: ex- pression of genes involved in pentose metabolism. Lund University, Lund, Sweden.
- Hector, R.E. et al., 2013. Growth and fermentation of D-xylose by *Saccharomyces cerevisiae* expressing a novel D-xylose isomerase originating from the bacterium *Prevotella ruminicola*

TC2-24. *Biotechnology for biofuels*, 6(1), p.84.

Ho, N.W.Y., Chen, Z. & Brainard, A.P., 1998. Genetically Engineered *Saccharomyces* Yeast Capable of Effective Cofermentation of Glucose and Xylose. *Applied and environmental microbiology*, 64(5), pp.1852–1859.

Van Hoek P, van Dijken JP & Pronk, J., 2000. Regulation of fermentative capacity and levels of glycolytic enzymes in chemostat cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *Enzyme and microbial technology*, 26(9-10), pp.724–736.

Hsu, S. & Yang, S., 1991. Propionic Acid Fermentation of Lactose. *Biotechnology and bioengineering*, 38, pp.571–578.

Jeffries, T.W., 2006. Engineering yeasts for xylose metabolism. *Current opinion in biotechnology*, 17(3), pp.320–6.

Jeffries, T.W. & Shi, N., 1999. Genetic engineering for improved xylose fermentation by yeasts. *Advances in biochemical engineering/biotechnology*, 65, pp.117-161.

Kaparaju, P. et al., 2009. Bioethanol, biohydrogen and biogas production from wheat straw in a biorefinery concept. *Bioresource technology*, 100(9), pp.2562–8.

Kim, S. & Dale, B.E., 2004. Global potential bioethanol production from wasted crops and crop residues. *Biomass and Bioenergy*, 26(4), pp.361–375.

Kuyper, M. et al., 2005. Evolutionary engineering of mixed-sugar utilization by a xylose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae* strain. *FEMS yeast research*, 5(10), pp.925–34.

Kuyper, M. et al., 2003. High-level functional expression of a fungal xylose isomerase: the key to efficient ethanolic fermentation of xylose by yeasts? *FEMS Yeast Research*, 4(1), pp.69–78.

Laluce, C. et al., 2012. Advances and developments in strategies to improve strains of *Saccharomyces cerevisiae* and processes to obtain the lignocellulosic ethanol-a review. *Applied biochemistry and biotechnology*, 166(8), pp.1908–26.

Lithwick, G. & Margalit, H., 2003. Hierarchy of Sequence-Dependent Features Associated With

- Prokaryotic Translation. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, 13, pp.2665–2673.
- Lowry, O.H. et al., 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. , pp.265–275.
- Madhavan, A. et al., 2009. Xylose isomerase from polycentric fungus *Orpinomyces*: gene sequencing, cloning, and expression in *Saccharomyces cerevisiae* for bioconversion of xylose to ethanol. *Applied microbiology and biotechnology*, 82(6), pp.1067–78.
- Madigan, M.T. et al., 2010. *Microbiologia de Brook*. 12a ed., Artmed.
- van Maris, A.J.A. et al., 2006. Alcoholic fermentation of carbon sources in biomass hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*: current status. *Antonie van Leeuwenhoek*, 90(4), pp.391–418.
- van Maris, A.J.A. et al., 2007. Development of Efficient Xylose Fermentation in *Saccharomyces cerevisiae*: Xylose Isomerase as a Key Component. *Advances in biochemical engineering/biotechnology*, 108(April), pp.179–204.
- Moes, C.J., Pretorius, I.S., van Zyl, W.H., 1996. Cloning and expression of the *Clostridium thermosulfurogenes* D-xylose isomerase gene (*xylA*) in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology letters*, 18(3), pp.269-274.
- Németh, A. et al., 2000. Mirror image mutations reveal the significance of an intersubunit ion cluster in the stability of 3-isopropylmalate dehydrogenase. *FEBS letters*, 468, pp.48–52.
- Olsson, L. & Hahn-Hägerdal, B., 1993. Fermentative performance of bacteria and yeasts in lignocellulose hydrolysates. *Process Biochemistry*, 28(4), pp.249–257.
- Parizzi, L.P. et al., 2012. The genome sequence of *Propionibacterium acidipropionici* provides insights into its biotechnological and industrial potential. *BMC genomics*, 13, p.562.
- Peng, B. et al., 2012. Improvement of xylose fermentation in respiratory-deficient xylose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae*. *Metabolic engineering*, 14(1), pp.9–18.
- Ramsay, J.A., Hassan, M.A. & Ramsay, B.A., 1998. Biological conversion of hemicellulose to propionic acid. *Enzyme and Microbial Technology*, 22, pp.292–295.

- Randez-Gil, F., Prieto, J. a & Sanz, P., 1995. The expression of a specific 2-deoxyglucose-6P phosphatase prevents catabolite repression mediated by 2-deoxyglucose in yeast. *Current genetics*, 28(2), pp.101–7.
- Richard, P., Toivari, M.H. & Penttilä, M., 2000. The role of xylulokinase in *Saccharomyces cerevisiae* xylulose catabolism. *FEMS microbiology letters*, 190(1), pp.39–43.
- Saha, B.C., 2003. Hemicellulose bioconversion. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 30(5), pp.279–91.
- Sambrook, J. & Russel, D.W., 2001. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 3rd ed., New York: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Sarthy, a V et al., 1987. Expression of the *Escherichia coli* xylose isomerase gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and environmental microbiology*, 53(9), pp.1996–2000.
- Sauer, U., 2001. Evolutionary engineering of industrially important microbial phenotypes. *Advances in biochemical engineering/biotechnology*, 73, pp.129–69.
- Shen, Y. et al., 2012. An efficient xylose-fermenting recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strain obtained through adaptive evolution and its global transcription profile. *Applied microbiology and biotechnology*, 96(4), pp.1079–91.
- Sonderegger, M. & Sauer, U., 2003. Evolutionary engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for anaerobic growth on xylose. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(4), pp.1990–1998.
- Teunissen, A.W.R.H. & De Bont, J.A.M., 2011. Xylose isomerase genes and their use in fermentation of pentose sugars. *United States Patent Application Publication, patent number: US2011/0318790*, p.18.
- Tomás-Pejó, E., Oliva, J.M. & Ballesteros, M., 2008. Realistic approach for full-scale bioethanol production from lignocellulose : a review. *Journal of Scientific and Industrial Research*, 67, pp.874–884.
- Träff, K.L., Cordero, R.R.O. & Zyl, W.H. Van, 2001. Deletion of the *GRE3* aldose reductase gene and its influence on xylose metabolism in recombinant strains of *Saccharomyces*

- cerevisiae* expressing the *xylA* and *XKS1* genes. *Applied and environmental microbiology*, 67, pp.5668–5674.
- Viikari, L., Vehmaanperä, J. & Koivula, a., 2012. Lignocellulosic ethanol: From science to industry. *Biomass and Bioenergy*, 46, pp.13–24.
- Vorobjeva, L.I., 1999. *Propionibacterium* 1st ed., Springer US.
- Walfridsson, M. et al., 1996. Ethanol fermentation of xylose with *Saccharomyces cerevisiae* harboring the *Thermus thermophilus xylA* gene, which expresses an active xylose (glucose) isomerase. *Applied and environmental microbiology*, 62(12), pp.4648–4651.
- Wu, G., Bashir-Bello, N. & Freeland, S.J., 2006. The Synthetic Gene Designer: a flexible web platform to explore sequence manipulation for heterologous expression. *Protein expression and purification*, 47(2), pp.441–5.
- Zaldivar, J., Nielsen, J. & Olsson, L., 2001. Fuel ethanol production from lignocellulose: a challenge for metabolic engineering and process integration. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 56(1-2), pp.17–34.
- Zhang, A., Yang, S.T., 2009. Engineering *Propionibacterium acidipropionici* for enhanced propionic acid tolerance and fermentation. *Biotechnology and Bioengineering*, xxx, pp.1-8.
- Zhang, M. et al., 1995. Metabolic engineering of a pentose metabolism pathway in ethanologenic *Zymomonas mobilis*. *Science*, 267, pp.240–243.
- Zhou, H., 2011. *Metabolic Engineering of Yeast for Xylose Uptake and Fermentation*. Dissertação de Doutorado apresentada ao Massachusetts Institute of technology, p.157.