

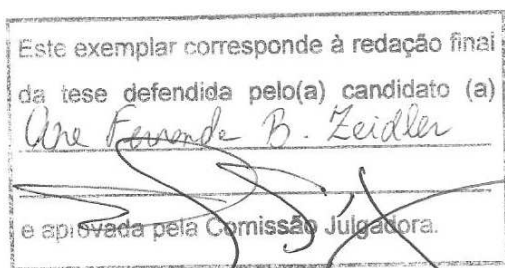
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA



ANE FERNANDA BERALDI ZEIDLER

“Engenharia Metabólica de Leveduras Industriais (*Saccharomyces cerevisiae*) para Produção de Glicerol”



Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia para obtenção do Título de Mestre em Genética e Biologia Molecular, na área de Genética de Micro-organismos.

Orientador: Prof. Dr. Gonçalo Amarante Guimarães Pereira.

Campinas, 2010

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

Z34e

Zeidler, Ane Fernanda Beraldi
Engenharia metabólica de leveduras industriais
(*Saccharomyces cerevisiae*) para produção de glicerol / Ane
Fernanda Beraldi Zeidler. – Campinas, SP: [s.n.], 2010.

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

1. Glicerina. 2. Leveduras. 3. *Saccharomyces
cerevisiae*. 4. Metabolismo. I. Pereira, Gonçalo
Amarante Guimarães. II. Universidade Estadual de
Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Título em inglês: Metabolic engineering of industrial yeasts (*Saccharomyces cerevisiae*) for glycerol production.

Palavras-chave em inglês: Glycerin; Yeasts; *Saccharomyces cerevisiae*; Metabolism.

Área de concentração: Genética de microorganismos.

Titulação: Mestre em Genética e Biologia Molecular.

Banca examinadora: Gonçalo Amarante Guimarães Pereira, Anderson Ferreira da Cunha, Flávio Henrique da Silva.

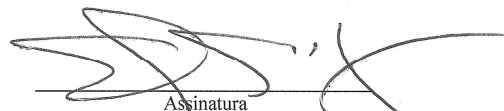
Data da defesa: 09/09/2010.

Programa de Pós-Graduação: Genética e Biologia Molecular.

Campinas, 9 de setembro de 2010

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Gonçalo Amarante Guimarães Pereira
(Orientador)



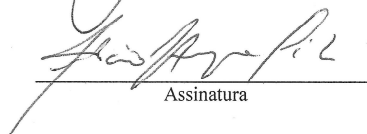
Assinatura

Prof. Dr. Anderson Ferreira da Cunha



Assinatura

Prof. Dr. Flávio Henrique da Silva



Assinatura

Prof. Dr. Marcelo Brocchi

Assinatura

Dr. Luiz Humberto Gomes

Assinatura

Às pessoas mais importantes da minha
vida: meu pai, minha mãe, minhas irmãs
e ao meu namorado, Phelipe.

AGRADECIMENTOS

A Deus por me dar forças e determinação para concluir esse trabalho.

Ao meu pai, Ervin, e à minha mãe, Elizabeth, pelo apoio e amor incondicional e às minhas irmãs por estarem sempre ao meu lado. Amo vocês.

Ao meu namorado, Phelipe, que não só me apoiou e esteve ao meu lado em todos os momentos, especialmente nos mais difíceis, como também me ajudou na conclusão desse trabalho, passando noites no laboratório e em casa me ajudando a escrever. Eu não teria conseguido sem você, te amo!

Ao meu orientador Prof. Dr. Gonçalo pela oportunidade, pelos ensinamentos e discussões a cerca dos mais variados assuntos, pela confiança depositada em mim e pela liberdade com que me deixou conduzir meu mestrado.

Ao Prof. Dr. Juan Argueso, pela disponibilidade, boa vontade e paciência em tirar todas as minhas dúvidas por skype. A sua orientação à distância contribuiu muito para esse trabalho.

Aos meus colegas de bancada e amigos, Luige, Carol e Fabi, e mais recentemente o André, por todas as idéias e apoio durante esse tempo, pela amizade e pelos momentos de diversão e desabafo que vocês me proporcionaram. Ao Luige, pela paciência em me ajudar com HPLC, mesmo eu tendo infinitas amostras. Muito obrigada.

Ao pessoal do grupo da levedura: Silvia, por ter me ensinado a manipular leveduras, tirado minhas inúmeras dúvidas, corrigido relatórios e pela paciência e boa vontade com a qual sempre fez tudo isso; Felipe, pelas linhagens utilizadas nesse trabalho e por toda a ajuda oferecida; Osmar, Aline e Pedro pelas sugestões e amizade.

À Eliane, por sempre estar disposta a ajudar, nos mais diversos assuntos, pelas conversas e apoio.

À BRASKEM, pelo apoio financeiro; ao diretor de Competitividade e Inovação da Divisão de Polímeros da BRASKEM, Antônio Queiroz, pelo apoio ao projeto; ao coordenador desse projeto Antônio Morschbacker, pelas sugestões, discussões e visão crítica do ponto de vista industrial a esse trabalho; à pesquisadora Johana Rincones, pela ajuda na concepção e desenvolvimento desse projeto e à Luiza, pela amizade e apoio.

Ao pessoal do LGE pelas discussões, sugestões e pelos momentos de descontração e amizade.

À FAPESP, pelo apoio financeiro em conjunto com a BRASKEM.

Às minhas avós, Genny e Alcione, ao meu avô, minhas tias e tios, ao meu primo Daniel, minha prima Mídián, minhas amigas Carol, Bianca e Kamila por importantes lições, apoio e incentivo.

“God, give us grace to accept with serenity the things that cannot be changed, courage to change the things which should be changed and the wisdom to distinguish the one from the other.”

Reinhold Niebuhr

RESUMO

A demanda por processos alternativos para produção de compostos químicos tem aumentado nas últimas décadas em decorrência da necessidade da utilização de fontes renováveis e do desenvolvimento de processos menos agressivos ao meio ambiente. Nesse contexto os processos de fermentação microbiana são cada vez mais considerados passíveis de serem empregados industrialmente. A produção de monômeros petroquímicos por via biológica tem sido tema de diversos estudos e, dentre os compostos produzidos por fermentação, ácidos e alcoóis de três e quatro carbonos estão entre as moléculas mais promissoras. O glicerol, além de ser utilizado na fabricação de diversos produtos, tem tido sua utilização estudada como substrato para biotransformação em compostos mais reduzidos e de maior valor agregado, como precursores de polímeros. A produção de glicerol por via fermentativa em leveduras já foi estudada, entretanto, sempre são utilizados organismos de laboratório, mais suscetíveis a estresses. A utilização de leveduras selvagens, mais robustas, isoladas de processos industriais de fabricação de etanol, pode resultar em maiores rendimentos de glicerol e maior adaptabilidade ao processo industrial. Com o intuito de aumentar a produção de glicerol foram deletados os genes: *ADH1* e *TPI1* na linhagem industrial de *S. cerevisiae* PE-2 (JAY270). Essas deleções foram realizadas por recombinação homóloga em linhagens haplóides de diferentes *mating-type*. Essas linhagens foram cruzadas gerando mutantes diplóides para cada um dos genes e para o duplo mutante. Além disso, a complementação do gene *ADH1*, estudada através da construção e inserção de um plasmídeo, foi bem sucedida: após a complementação, os mutantes $\Delta adh1$ alcançaram um rendimento em etanol significativamente igual ao da linhagem selvagem. As deleções dos genes *ADH1* e *TPI1* geraram os resultados esperados, aumentando a produção de glicerol e diminuindo a de etanol, modificando assim o perfil de produção de metabólitos das linhagens. As linhagens selvagens apresentaram rendimentos em glicerol ao redor de 0,01 g glicerol/g glucose, rendimento esperado para linhagens de levedura produtoras de etanol. As linhagens $\Delta adh1$ apresentaram um aumento de aproximadamente 10 vezes no rendimento em glicerol, chegando a 0,24 gramas de glicerol por grama de glucose. A linhagem que apresentou maior rendimento foi a AZY773, linhagem industrial com os genes *ADH1* e *TPI1* deletados, atingindo um rendimento de 0,38 gramas de glicerol por grama de glucose. A linhagem de laboratório com a mesma modificação teve um rendimento de 0,31 gramas de glicerol por grama de glucose, significativamente menor que o rendimento da linhagem industrial. Demonstrou-se neste trabalho, portanto, que a produção de glicerol metabólico com altos rendimentos para bioconversão em compostos mais reduzidos pode ser conseguida através de modificações metabólicas e do uso de organismos robustos.

ABSTRACT

In the past few decades the demand for alternative processes for the production of chemical compounds has increased due to the need for utilization of renewable resources and development of less harming processes to the environment. In this context, large scale microbial fermentative processes are being considered as a viable alternative. The production of petrochemical monomers through biological pathways has been a major research theme and, among the compounds produced by fermentation, three and four carbon acids and alcohols are among the most promising molecules. Glycerol, besides being used for the manufacture of several products, has had its utilization studied as substrate for biotransformation into more reduced and higher added value compounds, e. q. polymers precursors. Glycerol production by yeast fermentation has already been studied, but, only in laboratory strains, which are more stress sensitive. The utilization of wild yeasts, more robust, isolated from the fuel ethanol production process, may result in higher glycerol yields and better adaptability to industrial processes. Aiming to increase glycerol production the *ADH1* and *TPI1* genes from PE-2 (industrial strain of *S. cerevisiae*) were deleted through homologue recombination in haploid strains of different *mating-types*. These strains were mated generating diploid mutants for $\Delta adh1$, Δtpi and $\Delta adh1\Delta tpi1$ deletions. Complementation of *ADH1* gene, carried out through the construction of a plasmid, was successful in allowing the $\Delta adh1$ strains to reach ethanol yields as high as the one reached by wild strains. *ADH1* and *TPI1* deletion increased glycerol and decreased ethanol production, modifying the strains' metabolite production profile, as expected. The wild strains presented glycerol yields of 0,01 g of glycerol per g of glucose, which is a regular yield for ethanol producing yeasts. $\Delta adh1$ strains presented a tenfold increase in glycerol yield, reaching 0,24 g of glycerol per g of glucose. AZY773 strain, industrial strain with both *ADH1* and *TPI1* genes deleted, presented the highest glycerol yield, reaching 0,38 g of glycerol per g of glucose. The laboratory strain with the same genetic modification yielded 0.3 g of glycerol per g of glucose, significantly lower than the industrial strain. This work demonstrated that metabolic glycerol production with high yields for bioconversion in more reduced compounds may be reached through metabolic modification and utilization of robust organisms.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	v
RESUMO	vii
ABSTRACT	viii
SUMÁRIO	ix
1. Introdução	12
2. Revisão bibliográfica	14
2.1 Glicerol	14
2.2 Produção de glicerol por fermentação	15
2.3 Metabolismo de glicerol em leveduras	16
2.3.1 <i>Balanco redox celular</i>	17
2.3.2 <i>Osmorregulação</i>	18
2.4 Engenharia metabólica	23
2.5 Leveduras industriais	23
2.6 Estratégia de Clonagem	25
3. Objetivos	27
4. Materiais e Métodos	28
4.1 Meios de cultura	28
4.2 Linhagens	29
4.3 Plasmídeos	29
4.4 PCR de colônia de bactérias	30
4.5 Preparo de bactérias eletrocompetentes	30
4.6 Transformação de bactérias eletrocompetentes	30
4.7 Extração de plasmídeo de bactérias em mini escala por lise alcalina – Miniprep	31
4.8 Construção de cassetes	31
4.8.1 <i>Cassetes construídos a partir do pCORE</i>	32
4.8.2 <i>Cassetes com regiões longas de homologia</i>	33
4.9 PCR de colônia de leveduras	35
4.10 Preparo de leveduras eletrocompetentes	36
4.11 Transformação de leveduras eletrocompetentes	36
4.12 Extração de DNA total de leveduras a partir de crescimento em meio líquido	37
4.13 Extração de DNA total de leveduras a partir de crescimento em meio sólido	37
4.14 Confirmação da integração homóloga	38

4.15 Cruzamento	38
4.16 Esporulação.....	39
4.17 Random Spore Analysis	39
4.18 Determinação do <i>mating-type</i> por PCR	40
4.19 Construção dos plasmídeos.....	41
4.20 Fermentação em meio líquido YNB	42
4.21 Fermentação em meio líquido YEPD	42
4.22 Análise dos metabólitos produzidos durante a fermentação	43
4.23 Análise Estatística	43
5. Resultados.....	44
5.1 Construção dos cassetes	44
5.1.1 Cassetes construídos a partir do <i>pCORE</i>	44
5.1.2 Cassetes com regiões longas de homologia	45
5.2 Construção dos plasmídeos	48
5.2.1 <i>YEpADH1</i> – Complementação do gene <i>ADH1</i>	49
5.2.2 <i>YEpGPD1</i> – Superexpressão do gene <i>GPD1</i>	55
5.3 Deleção do gene <i>ADH1</i>	59
5.4 Deleção do gene <i>TPI1</i>	65
5.5 Obtenção do duplo mutante - $\Delta adh1$ e $\Delta tpi1$	68
5.6 Transformação com os plasmídeos <i>YEpADH1</i> e <i>YEpGPD1</i>	70
5.7 Cruzamento de linhagens haplóides para obtenção de mutantes diplóides	72
5.8 Fermentação em meio YNB.....	74
5.9 Fermentação em meio YEPD	87
6. Discussão	95
6.1 Deleção de genes por integração homóloga.....	95
6.2 Obtenção dos mutantes.....	95
6.3 Produção de etanol e glicerol em linhagens selvagens e modificadas	96
6.3.1 Deleção do gene <i>ADH1</i>	97
6.3.2 Complemetação do gene <i>ADH1</i>	98
6.3.3 Deleção do gene <i>TPI1</i>	98
6.3.4 Deleção dos genes <i>ADH1</i> e <i>TPI1</i>	99
7. Conclusão e Perspectivas futuras	100
8. Referências Bibliográficas	101
9. Anexos	104

9.1 Lista das linhagens selvagens utilizadas e dos mutantes obtidos	104
9.2 Tabelas estatísticas (ANOVA)	105
9.3 Artigo publicado em colaboração	108

1. Introdução

A produção de compostos químicos a partir de fontes renováveis e por fermentação microbiana é de crescente importância. Tal processo oferece benefícios em termos de sustentabilidade de suprimento de recursos e qualidade ambiental. Um exemplo bem sucedido é o caso da fermentação alcoólica, pela levedura *Saccharomyces cerevisiae*, que usa a sacarose da cana-de-açúcar como substrato. Esse processo tem uma série de parâmetros altamente desejáveis para a aplicação em outras fermentações, sendo um sistema ideal a ser perseguido para a produção de qualquer composto químico. Entretanto, a evolução natural, que conduziu essa levedura ao desenvolvimento de características desejáveis a esse processo industrial, teria que ser substituído por uma evolução dirigida para promover a produção de outros compostos não naturais, que não fazem parte da estratégia evolutiva dos organismos (Rincones et al. 2009).

Na última década, têm sido relatados vários estudos visando à produção biológica de monômeros petroquímicos - em grandes quantidades e a baixo custo - para a síntese de polímeros (Lee et al. 2004; Cameron et al. 1998). As estratégias exploram processos fermentativos, utilizando microrganismos geneticamente modificados e processos de síntese enzimática para o aumento da produção dos monômeros. Os melhores resultados exploram engenharia de etapas metabólicas dos microrganismos e evolução dirigida de enzimas (Rincones et al. 2009).

Dentre os diversos compostos produzidos a partir da fermentação, os mais promissores como precursores de monômeros são: ácido propiônico, propanol, 1,2-propanodiol, ácido láctico, ácido butírico, ácido acrílico, isopropanol e glicerol (Lee et al. 2004). Estes compostos podem ser convertidos em monômeros, como o propeno, através de processos químicos industriais ou através da criação de novas vias bioquímicas para biotransformação destas moléculas usando organismos geneticamente modificados.

O glicerol é um álcool muito utilizado nas indústrias de cosméticos, automotiva, alimentícia, farmacêutica, têxtil ou ainda como matéria-prima para a produção de compostos químicos (Wang et al. 2001). Além disso, novas aplicações do glicerol vêm sendo descobertas, como seu emprego como substrato em fermentações microbianas para a obtenção de produtos de alto valor agregado como polímeros verdes, biosurfactantes, dentre outros (Silva, Mack, & Contiero 2009). Um exemplo é a fermentação do glicerol pela bactéria *Clostridium butyricum* a 1,3 propanodiol, que pode ser usado na síntese de química do polítrimetileno tereftalato, um novo polímero com aplicações nas indústrias de fibras e têxtil (González-Pajuelo et al. 2006).

A vantagem do uso do glicerol como fonte de carbono fica evidente quando a síntese de um produto reduzido é considerada. Devido ao maior grau de redução (γ) dos carbonos do glicerol ($C_3H_8O_3$, $\gamma = 4,67$) em relação aos carbonos de açúcares como a glucose ($C_6H_{12}O_6$, $\gamma = 4$) (Doran

1994), o gasto energético é consideravelmente menor quando o glicerol é usado como fonte de carbono para produção de compostos reduzidos, resultando em um rendimento mais elevado e com menor quantidade de subprodutos (Yazdani & Gonzalez 2007) (Durnin et al. 2009).

O glicerol pode ser obtido de diversas formas: quimicamente a partir do petróleo, por fermentação microbiana, por síntese a partir do óxido de propileno ou como subproduto da produção do sabão, da produção de ácidos graxos e da produção de éster de ácido graxo, principalmente biodiesel (Sabourin-provost & Hallenbeck 2009). Atualmente são produzidos, como subproduto do biodiesel, aproximadamente, 1,2 milhões de toneladas/ano de glicerol, entretanto, esse glicerol contém, normalmente, uma mistura de metanol, água, sais inorgânicos, ácidos graxos livres, mono, di e triglicerídeos não reagidos, metil-ésteres e uma variedade de outros materiais orgânicos (Zhou et al. 2008). A pureza desse glicerol é de, aproximadamente, 50%, uma desvantagem econômica e tecnológica que limita significativamente sua utilização direta. Além disso, os processos de purificação são onerosos e a maioria das plantas de biodiesel apenas descarta o glicerol resultante como efluente (Zhou et al. 2008). Uma alternativa a esse panorama seria a produção de um glicerol metabólico, sem necessidade de purificação, proveniente de fermentação de açúcares e que, posteriormente pudesse ser biotransformado a produtos mais reduzidos de alto valor agregado utilizando microorganismos modificados.

Apesar da produção de glicerol por fermentação poder ser realizada por uma série de microorganismos, incluindo bactérias, algas e fungos, o foco principal sempre foi a produção de glicerol por leveduras, devido aos maiores rendimentos e ao menor tempo de fermentação apresentado por estas (Taherzadeh, Adler, & Lidén 2002).

Por existir uma grande quantidade de informações fisiológicas, genéticas e bioquímicas disponíveis a respeito da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, vários estudos de engenharia metabólica vêm sendo desenvolvidos, com o objetivo de otimizar processos metabólicos naturais da *S. cerevisiae* e também desenvolver novas vias metabólicas, presentes em outros organismos (Nevoigt 2008).

Entretanto, o melhoramento ou desenvolvimento de rotas metabólicas é normalmente realizado em leveduras de laboratório, fáceis de serem manipuladas. Porém, essas linhagens não são capazes de sobreviver às condições estressantes de uma fermentação industrial, tais como: altas concentrações de açúcares e sais, variações de temperaturas, contaminação por leveduras selvagens e bactérias, entre outros. A utilização de linhagens industriais produtoras de etanol, isoladas da própria usina e capazes de suportar as condições adversas da fermentação, tem grande potencial de sucesso para a produção de metabólitos em escala industrial. Logo, a manipulação genética de leveduras industriais visando à produção de um glicerol metabólico parece interessante para o estabelecimento de um processo fermentativo em larga escala.

2. Revisão bibliográfica

2.1 Glicerol

O glicerol, ou propano-1,2,3-triol, é um poliálcool amplamente utilizado nas indústrias químicas que encontra seus maiores usos na manufatura de produtos farmacêuticos e de higiene bucal. Além disso, é também usado na manufatura de produtos das indústrias alimentícia, de cosméticos, automotiva, têxtil, de tintas, de materiais de limpeza e de tabaco (Zhuge et al. 2001). Novas aplicações estão sendo desenvolvidas nas indústrias alimentícia, de poliuretano, de estabilizantes de madeira e na produção de pequenas moléculas (dihidroxiacetona e ácido hidróxi-pirúvico) (Silva, Mack, & Contiero 2009).

Estudos mais recentes têm focado na vantagem de utilizar o glicerol como substrato para fermentações, produzindo diversos compostos, principalmente reduzidos, com maior rendimento do que os apresentados com a utilização de açúcares como substrato. Isso se deve ao maior grau de redução do glicerol, propriedade esta que, para compostos orgânicos pode ser definida como o número de equivalentes de elétrons disponíveis por grama átomo de carbono. Os elétrons disponíveis são aqueles que podem ser transferidos para o oxigênio durante a oxidação do composto a CO_2 , H_2O ou NH_3 , gerando energia (Atkinson & Mavituna 1983). O maior rendimento obtido com a utilização do glicerol como substrato deve-se a uma menor quantidade e diversidade de subprodutos produzidos, uma vez que o balanço redox é alcançado na via fermentativa principal, sem necessidade de escoamento para vias secundárias (Yazdani & Gonzalez 2007).

Um exemplo é a conversão de glicerol a dihidroxiacetona (DHA) pela bactéria *Acetobacter suboxidans*. Em fermentação submersa, a bactéria produz dihidroxietona a partir de glicerol com um rendimento de 0,66 gramas de DHA por grama de glicerol. A dihidroxietona pode ser, posteriormente, biotransformada em dihidroxietona fosfato, que é o substrato essencial para produção, por algumas aldolases, de vários derivados de açúcar opticamente ativos (Wang et al. 2001).

Outro uso potencial do glicerol como substrato é na fermentação a ácido propiônico pela bactéria *Propionibacteria acidipropionici*, atingindo até 42 g/L de ácido propiônico, com um rendimento de 0,52 gramas de ácido propiônico por grama de glicerol, utilizando células imobilizadas. Além do alto rendimento, outra vantagem é a diminuição da produção de acetato em comparação com a utilização de glucose como substrato (Silva, Mack, & Contiero 2009).

Também foi reportada a conversão do glicerol a ácido succínico utilizando a bactéria *Anaerobiospirillum succiniciproducens*. O estudo demonstrou que o ácido succínico pode ser produzido quase sem formação de ácido acético quando o glicerol é utilizado como fonte de carbono, o que facilita a purificação do ácido (Yazdani & Gonzalez 2007).

Outra possibilidade recente é a fotofermentação do glicerol a hidrogênio, um possível futuro combustível, realizada pela bactéria *Rhodopseudomonas palustris* com um rendimento de 75% do máximo teórico. (Sabourin-provost & Hallenbeck 2009).

Na Figura 1 é apresentado um esquema dos produtos que podem ser obtidos a partir da fermentação do glicerol com um balanço redox mais favorável, isto é, com maior rendimento e menor formação de subprodutos em relação à utilização de açúcares como substrato.

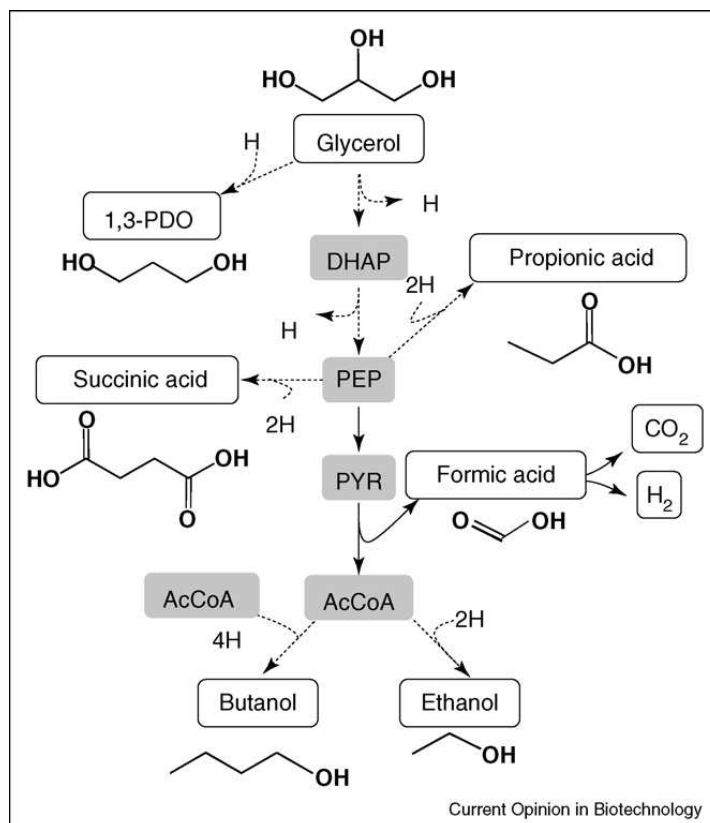


Figura 1. Exemplo de compostos que podem ser obtidos pela fermentação do glicerol com maior rendimento e menor formação de subprodutos em comparação com a fermentação de açúcares.

*Extraído de Yazdani & Gonzalez 2007.

2.2 Produção de glicerol por fermentação

O glicerol é um metabólito responsável por balancear altas pressões osmóticas encontradas no ambiente pelas células; por apresentar essa importante função é produzido por vários micro-organismos incluindo bactérias, leveduras, fungos e algas (Taherzadeh, Adler, & Lidén 2002), sendo encontrado em maior concentração em organismos osmofílicos.

A produção de glicerol por bactérias tem recebido pouca atenção e apenas alguns estudos foram reportados. Dentre eles a produção de glicerol, a partir de altas concentrações de glucose, utilizando *Aerobacter aerogenes* resultou em 3,2 a 4,8 % de glicerol (Zhang et al. 2002). Outro estudo, realizado, com *Bacillus subtilis* alcançou 14, 7 g/L de glicerol, com um rendimento de 0,29

gramas de glicerol por grama de glucose consumida (Wang et al. 2001). Entretanto, a utilização de bactérias para produção de glicerol não é considerada devido à baixa produtividade, consequência dos longos tempos de fermentação, apresentada por esses micro-organismos.

A utilização de algas do gênero *Dunaliella* para produção de glicerol é uma possibilidade atrativa uma vez que a luz solar e o CO₂ são as fontes de energia e carbono, respectivamente, de fácil obtenção. Nessas algas, o glicerol é acumulado em resposta a aumentos na concentração de NaCl. Concentrações extracelulares de glicerol de até 5 g/L foram alcançadas em meio com 4 M de NaCl. Entretanto, a aplicação de algas para produção de glicerol não recebeu muita atenção até o momento (Wang et al. 2001).

Os principais estudos para produção de glicerol utilizam leveduras como organismos produtores, devido aos maiores rendimentos e menor tempo de fermentação. Como o glicerol pode funcionar como um osmólito, leveduras osmofílicas são de interesse para a produção de glicerol. A maioria das espécies com produção relevante de glicerol pertence aos gêneros *Candida*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces* e *Torulaspora* (Wang et al. 2001). Uma conversão de glucose em glicerol de até 40% (0,4 gramas de glicerol por grama de glucose) foi observada utilizando *Candida magnolia*, alcançando uma concentração de 79 g/L de glicerol (Wang et al. 2001). Em 1999, foi isolada no sudoeste da China, uma nova espécie de levedura osmofílica, *Candida glycerinogenes*, capaz de converter 64,5% da glucose em glicerol, chegando a produzir 137 g/L de glicerol em 84 horas (Zhuge et al. 2001). Entretanto, essa linhagem não se encontra disponível em nenhuma das coleções internacionais.

Apesar da grande quantidade de linhagens de levedura capazes de produzir glicerol, a maioria dos estudos foi realizada com a levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Existem três razões principais para o interesse da produção de glicerol nesse organismo: (a) o glicerol é um subproduto predominante do metabolismo fermentativo dessa levedura, (b) o glicerol é um produto final desejável no vinho e (c) o glicerol é tipicamente um produto indesejável na produção de etanol, pois diminui o rendimento de glucose em etanol (Taherzadeh, Adler, & Lidén 2002).

2.3 Metabolismo de glicerol em leveduras

O glicerol possui pelo menos dois papéis fundamentais no metabolismo da *S. cerevisiae*: funciona como um escape para o excesso de NADH acumulado nas reações de anabolismo durante crescimento anaeróbico e como um osmólito balanceando altas pressões osmóticas externas (Taherzadeh, Adler, & Lidén 2002).

2.3.1 Balanço redox celular

A regulação do balanço redox é, sem dúvida, muito eficiente em *S. cerevisiae*. Um exemplo é a fermentação da glucose a etanol, na qual o balanço redox final é neutro, pois o NADH gerado pela oxidação glicolítica do gliceraldeído 3-fosfato a 1,3 – difosfoglicerato é reoxidado pela redução do acetaldeído a etanol. Entretanto, NADH em excesso é formado devido à utilização dos intermediários glicolíticos como precursores para aminoácidos e pela geração de NADH na via de biossíntese de alguns aminoácidos (Taherzadeh, Adler, & Lidén 2002). Além disso, a oxidação aeróbica do piruvato, através de enzimas do ciclo do ácido cítrico e da piruvato desidrogenase, produz NADH na matriz mitocondrial. Entretanto, esse NADH pode ser reoxidado na cadeia respiratória pela NADH desidrogenase interna. Já o NADH em excesso no citosol, que não pode atravessar a membrana interna da mitocôndria, pode ser oxidado pela cadeia respiratória apenas através de duas lançadeiras descritas para *S. cerevisiae*: o sistema glicerol 3-fosfato desidrogenase FAD-dependente (Gut2p) ou a lançadeira etanol-acetaldeído. Entretanto, esse NADH em excesso no citosol também pode ser reoxidado por uma NADH dehidrogenase externa, presente em leveduras, sendo seu poder redutor diretamente utilizado na cadeia respiratória (Taherzadeh, Adler, & Lidén 2002). Em condições anaeróbicas, entretanto, o mecanismo principal de balanço redox é a oxidação do NADH acoplada à redução da dihidroxicetona fosfato a glicerol-3-fosfato. A Figura 2 apresenta a via fermentativa e as reações mitocondriais de reoxidação do NADH.

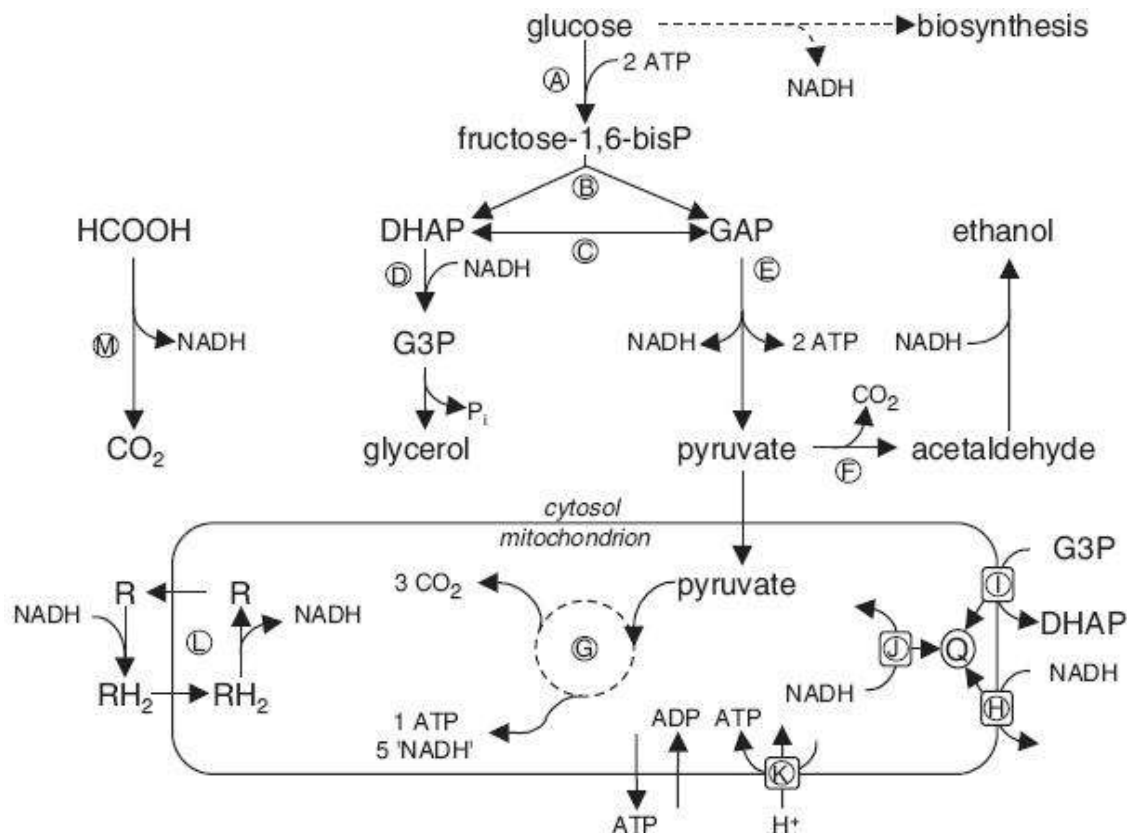


Figura 2. Esquema dos metabolismos fermentativo e oxidativo da glucose em *S. cerevisiae*. (A). Parte inicial da glicólise: duas reações de fosforilação de açúcar. (B). Frutose-1,6-bisfosfato aldolase; faz a divisão da molécula C6 em duas trioses- fosfato. (C). Triose fosfato isomerase; responsável pela interconversão de DHAP e GAP. (D). Via do glicerol; redução do DHAP a glicerol-3-fosfato pela G3P desidrogenase, seguida pela desfosforilação a glicerol pela G3P fosfatase. (E). Parte final da glicólise, conversão de GAP a piruvato com a geração de 1 NADH e 2 ATPs através de uma série de 5 enzimas. (F). Fermentação alcoólica, descarboxilação de piruvato pela piruvato decarboxilase, seguida da redução do acetaldeído a etanol pela ADH1. (G). Piruvato desidrogenase mitocondrial, converte piruvato a acetil-CoA, que entra no ciclo de Krebs. (H). NADH desidrogenases mitocondriais externas. (I). Glicerol-3-fosfato desidrogenase mitocondrial. Elétrons dessas três desidrogenases (H e I) entram na cadeia respiratória no nível do complexo III (Q) (Ubiquinol-Citocromo c Redutase). (J) NADH desidrogenase mitocondrial interna. (K). ATP sintase. (L) Esquema geral da lançadeira NADH. (M) Oxidação do formato pela formato desidrogenase.

* Extraído de Geertman et al. 2006.

2.3.2 Osmorregulação

A maioria das células possui mecanismos que mantêm a osmolaridade intracelular maior que a do meio externo. O gradiente osmótico através da membrana, consequência da diferença de osmolaridades, permite a entrada de água para promover a expansão celular e o desenvolvimento da pressão de turgor (Taherzadeh, Adler, & Lidén 2002). Muitos organismos utilizam osmólitos, ou solutos orgânicos, para ajustar sua osmolaridade intracelular, como o glicerol no caso das leveduras (Wang et al. 2001). A natureza protetora do glicerol parece estar relacionada com o fato de ele interagir desfavoravelmente com as regiões hidrofóbicas das proteínas, portanto, favorecendo a manutenção da conformação nativa das proteínas (Taherzadeh, Adler, & Lidén 2002). O aumento do

acúmulo intracelular de glicerol durante stress osmótico é devido tanto ao aumento na produção do osmólito quanto à maior retenção do glicerol dentro das células (Taherzadeh, Adler, & Lidén 2002). O fluxo de glicerol em *S. cerevisiae* é controlado pelo gene *FPS1*, que codifica o canal, Fps1, que permanece fechado em condições hiperosmóticas, conservando o glicerol dentro da célula, e aberto em condições normais, permitindo que o glicerol permeie livremente através da célula (Wang et al. 2001).

A quantidade de glicerol que é naturalmente produzida pela *S. cerevisiae* em resposta à anaerobiose ou ao estresse osmótico é relativamente baixa, aproximadamente 0,1 g de glicerol por g de glucose consumida (Cordier et al. 2007). Nessa levedura, o glicerol é sintetizado em duas etapas, que consistem na redução da dihidroxiacetona-fosfato (DHAP) pela enzima glicerol 3-fosfato desidrogenase (GPD1 ou GPD2), dependente de NADH, seguida pela desfosforilação do glicerol-3-fosfato pela glicerol 3-fosfatase (GPP1 ou GPP2) (Geertman et al. 2006). Esses genes são submetidos a diferentes controles a expressão dos genes *GPD1* e *GPP2* é aumentada em resposta ao stress osmótico, enquanto os genes *GPD2* e *GPP1* são induzidos em condições anaeróbicas. Baseado em diversas considerações e dados genéticos assume-se que o par *Gpd1p/Gpp2p* é a maior rota para produção de glicerol em condições aeróbicas, enquanto o par *Gpd2p/Gpp1p* tem papel específico no balanço redox em condições anaeróbicas (Cordier et al. 2007). A via metabólica completa da fermentação de *S. cerevisiae*, juntamente com o ciclo do ácido tricarboxílico (TCA), pode ser visualizada na Figura 3.

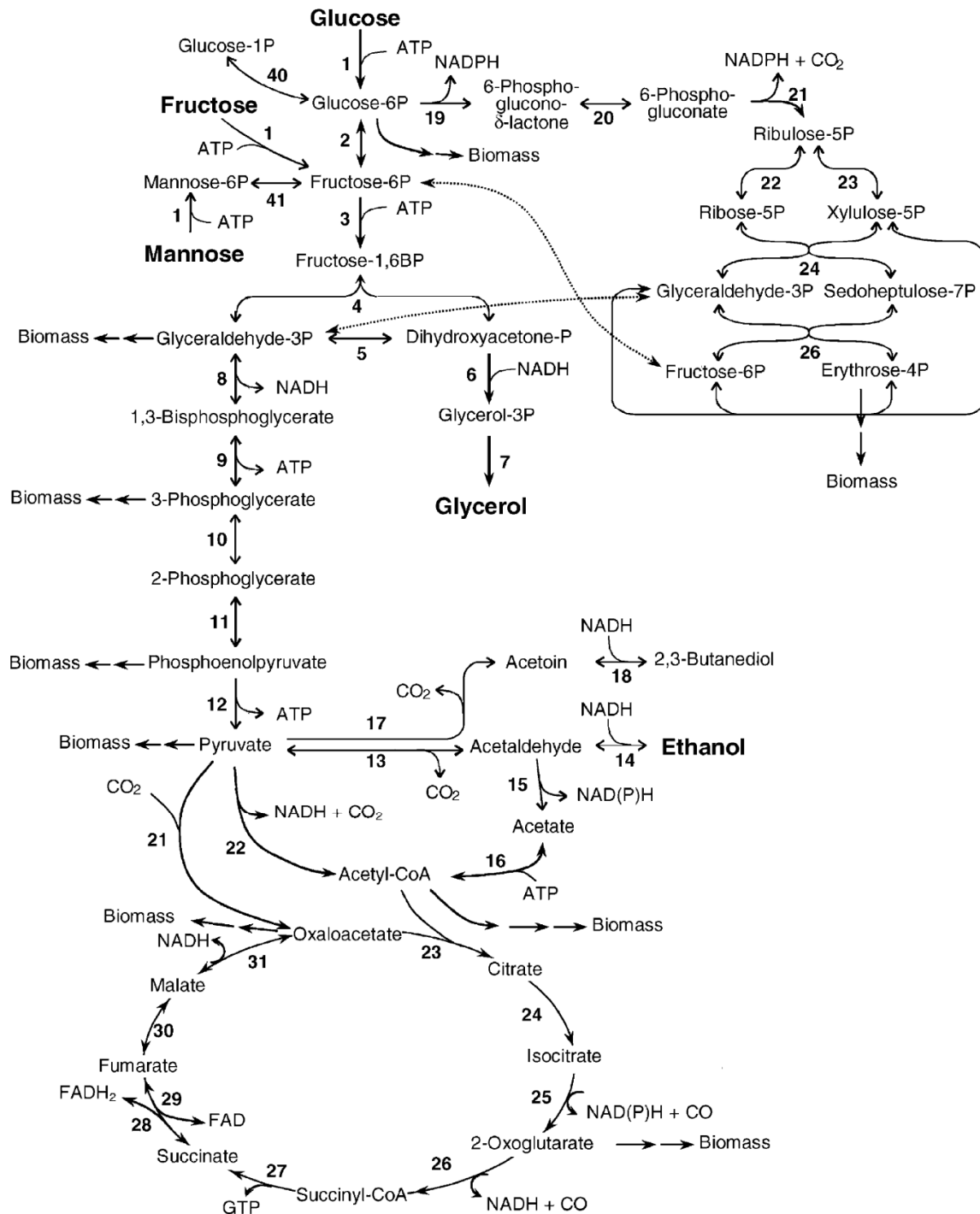


Figura 3. Glicólise e TCA em *S. cerevisiae*. 1.GLK-Glucoquinase e HXK-Hexoquinase. 2.PGI-Fosfoglucoose isomerase. 3.PFK-Fosfofrutokinase. 4.ALD-Aldolase. 5.TPI-Triosefosfato isomerase. 6.GPD-Glicerol-3-fosfato desidrogenase. 7.GPP-Glicerol-3-fosfatase. 8.TDH-Triosefosfato desidrogenase. 9.PGK-Fosfoglicerato quinase. 10.GPM-Fosfoglicerato mutase. 11.ENO-Enolase. 12.PYK-Piruvato kinase. 13.PDC-Piruvato decarboxilase. 14.ADH-Álcool desidrogenase. 15.AIDH-Aldeído desidrogenase. 16.ACS-Acetil-CoA sintetase. 17.Descarboxilação do acetolactato formado na síntese da valina. 18.Butanodiol desidrogenase. 19.Glucose-6-fosfato desidrogenase. 20.Lactonase. 21.6-Fosfo-gluconato desidrogenase. 22.RKI-Ribose-5-fosfato cetioisomerase. 23.RPE-Ribulose-5-fosfato epimerase. 24 e 25.TKL-Transcetolase. 26.TAL-Transaldolase. 27.PYC-Piruvato carboxilase. 28.PDH-Piruvato desidrogenase. 29.CS-Citrato sintase. 30.Aconitase. 31.IDH, IDP1, IDP2-Isocitrato desidrogenase. 32.ODGH-2-Oxoglutarato desidrogenase. 33.Succinil-CoA sintetase. 34.Succinato desidrogenase. 35.FRDS-Fumarato redutase. 36.Fumarase. 37.Malato desidrogenase. 38.GDH-Glutamato dehidrogenase. 39.GS-Glutamina sintetase. 40.PGM-Fosfoglucomutase. 41.PMI-Fosfomanoisomerase.

*Extraído de Taherzadeh, Adler, & Lidén 2002.

Na última década, têm sido realizadas várias tentativas de manipulação do metabolismo de leveduras, principalmente *Saccharomyces cerevisiae*, para otimizar a produção de glicerol. As últimas estratégias têm sido bem sucedidas, pois conseguiram aumentar a produção de glicerol de 0,25 g de glicerol/ g de glucose, obtido pelo método clássico de fermentação (método do sulfito), para 0,42 g de glicerol/g de glucose, obtido por uma estratégia de engenharia metabólica que envolve a deleção do gene *TPI1* (triose fosfato isomerase) e a remoção da oxidação do NADH citosólico pelas lançadeiras mitocondriais de redox (Overkamp et al. 2002).

Em um trabalho mais recente, foi obtido um rendimento de glicerol de 0,46 g de glicerol/g de glucose através da deleção dos genes da piruvato descarboxilase, NADH desidrogenase externa e glicerol-3-fosfato desidrogenase ligada à cadeia respiratória (Geertman et al. 2006). Nesse mesmo trabalho, com a adição de formato, em cultivo aeróbico, o rendimento subiu para 0,55 g de glicerol/g de glucose. O formato foi utilizado para que mais NADH estivesse disponível, aumentando dessa maneira a produção de glicerol. Em *S. cerevisiae*, o formato é oxidado a CO₂ por duas isoenzimas, *FDH1* e *FDH2*, fornecendo NADH citosólico (Overkamp et al. 2002).

Cordier et al. 2007, deletaram os genes *TPI1* e *ADH1* (álcool desidrogenase) e superexpressaram os genes *GPD1* (glicerol-3-fosfato desidrogenase) e *ALD3* (aldeído desidrogenase), resultando em um mutante capaz de produzir 0,46 g de glicerol/g de glucose. Porém, a superexpressão do gene *ALD3* não gerou modificação no rendimento, indicando que a sua superexpressão não resultou em uma maior disponibilidade de NADH, que era o objetivo desta modificação genética. Um resumo de alguns outros trabalhos objetivando a superprodução de glicerol é apresentado na Tabela 1.

Tabela 1. Resumo de outros estudos objetivando a superprodução de glicerol em *S. cerevisiae*.

Linhagem	Processo	Rendimento (g/g glucose)	% (Máximo Teórico)*	Referência
$\Delta tpi1$	Frasco agitado, 5% glucose,	0,34	66,7	Compagno, Boschi, & Ranzi 1996
	Frasco agitado, 10% glucose, 0,335 % YNB	0,36	70,0	
$\Delta gpd1$	Batelada, anaeróbica	0,050	9,8	Nissen et al. 2000
	Batelada, aeróbica	0,050	9,8	
$\Delta gpd2$	Batelada, anaeróbica	0,037	7,2	
	Batelada, aeróbica	0,004	0,8	
$\Delta tpi1$	Contínuo, 0,1% etanol	0,29	56,8	Compagno et al. 2001
	Contínuo, 0,1% ác. fórmico	0,37	72,5	
	Contínuo, 0,18 % etanol	0,32	62,7	
	Contínuo, 0,26 % etanol	0,25	49,0	

	Contínuo, 0,38 % etanol	0,22	43,1	
	Contínuo, 0,72 % etanol	0,12	23,5	
Superexpressão <i>GPD1</i>	Frasco agitado	0,14	27,5	Michnick et al. 1997
Superexpressão <i>GPD1</i> (YEpKm ^R GPD1)	Frasco agitado	0,22	43,1	Nevoigt & Stahl 1996
Mutante <i>PDC</i> e superexpressão <i>GPD1</i> (YEpKm ^R GPD1)	Frasco agitado	0,27	52,9	
Superexpressão <i>GPD1</i>	Frasco agitado	0,12	23,5	Remize, Barnavon, & Dequin 2001
Superexpressão <i>GPD1</i>	Frasco agitado	0,19	37,2	Cordier et al. 2007
Δtpi e superexpressão <i>GPD1</i>	Frasco agitado	0,36	70,6	
$\Delta adh1$	Frasco agitado	0,19	37,2	
Superexpressão <i>GPD1</i> e <i>ALD3</i>	Frasco agitado	0,19	37,2	
$\Delta tpi1$ e superexpressão <i>GPD1</i> e <i>ALD3</i>	Frasco agitado	0,42	82,4	
$\Delta adh1$ e superexpressão <i>GPD1</i> e <i>ALD3</i>	Frasco agitado	0,46	90,2	
$\Delta adh1$, Δtpi , superexpressão <i>GPD1</i> e <i>ALD3</i>	Frasco agitado	0,46	90,2	
$\Delta adh1$, $\Delta tpi1$, superexpressão <i>GPD1</i> , <i>ALD3</i> e <i>FPS1</i>	Frasco agitado	0,46	90,2	
$\Delta tpi1$	Frasco agitado com adição de glucose depois de 28 e 48 horas	0,44	86,3	Compagno, Boschi, & Ranzi 1998
$\Delta tpi1$, $\Delta nde1$, $\Delta nde2$ e $\Delta gut2$	Batelada, aerada	0,50	98,0	(Overkamp et al. 2002)
$\Delta adh1$	Frasco agitado	0,26	51,0	Drewke, Thielen, & Ciriacy 1990

* Rendimento máximo teórico de glicerol a partir de glucose: 0,51 g glicerol/g glucose.

2.4 Engenharia metabólica

O objetivo da engenharia metabólica é a modificação direcionada dos fluxos metabólicos para aumentar a produção de um metabólito natural do organismo, desenvolver a capacidade do organismo de utilizar substratos atípicos ou sintetizar metabólitos não produzidos naturalmente pelo organismo (Nevoigt 2008). A engenharia metabólica, introduzida por Bailey em 1991, visa o melhoramento das atividades celulares pela manipulação das funções enzimáticas, de transporte e regulatórias da célula com o uso da tecnologia do DNA recombinante (Bailey 1991).

A levedura *Saccharomyces cerevisiae*, devido à sua importância na biotecnologia tradicional, tem sido o foco de diversos estudos genéticos, fisiológicos e bioquímicos ao longo do tempo. Além disso, por ser de fácil manipulação e possuir atributos tais como facilidade de transformação e recombinação homóloga foi escolhida como organismo modelo para estudos genéticos. Devido a sua importância no meio científico foi o primeiro organismo eucarioto a ter o genoma completamente seqüenciado e hoje possui inúmeros bancos de dados com informações sobre genes, ORFs, microarranjos, interações protéicas, entre outros. Tais informações detalhadas permitiram a aplicação da engenharia metabólica para modificações nesse organismo.

Devido à capacidade de fermentar açúcares para produzir etanol com alta produtividade e crescer anaerobicamente, os estudos têm sido focados na capacidade da levedura *Saccharomyces cerevisiae* de gerar importantes produtos industriais, tais como glicerol, propanodiol, ácidos orgânicos esteróis e isoprenóides (Nevoigt 2008).

A engenharia metabólica tem tido um papel fundamental no melhoramento e desenvolvimento de linhagens de *S. cerevisiae* capazes de produzir os compostos mencionados acima. Em contraste com os métodos clássicos de melhoramento genético de linhagens como seleção, mutagênese, cruzamento e hibridização, a engenharia metabólica confere duas grandes vantagens: a modificação direta de linhagens sem o acúmulo de mutações desfavoráveis e a introdução de genes de outros organismos com novas características (Nevoigt 2008).

O desenvolvimento da engenharia metabólica tem influenciado fortemente o melhoramento de linhagens de levedura nos últimos anos e tem aumentado o potencial para o uso da *S. cerevisiae* como organismo ideal em processos produtivos industriais.

2.5 Leveduras industriais

O processo de produção de etanol no Brasil é realizado em reatores abertos, com ciclo de até 90% das células durante toda a safra (200-250 dias), resultando em uma alta densidade celular, o que contribui para um pequeno tempo de fermentação (Basso et al. 2008). Tradicionalmente o inóculo inicial da fermentação alcoólica era realizado com a linhagem de *Saccharomyces cerevisiae* utilizada na fermentação de pão. Entretanto, recentemente foi observado que a fermentação é

efetivamente realizada por linhagens selvagens, diferentes das linhagens inoculadas no início do processo (Wheals et al. 1999, Silva-Filho et al. 2005).

Em um estudo realizado Basso et al. 2008 foram isoladas leveduras que apresentavam propriedades fermentativas desejáveis dentre as leveduras selvagens contaminantes com alta capacidade de adaptação. Como resultado, atualmente estão disponíveis comercialmente linhagens que associam características de importância industrial, como elevado rendimento fermentativo, alta viabilidade durante o processo de reaproveitamento celular e baixa produção de espuma, com uma excelente capacidade de competir com as leveduras invasoras e dominar a população microbológica das dornas de fermentação. Dentre esse grupo, destacam-se as linhagens PE-2, CAT-1, e BG-1, que estão entre as mais utilizadas pelas usinas de etanol brasileiras (Basso et al. 2008, Wheals et al. 1999)

Essas linhagens selvagens são capazes de crescer rapidamente e dominar a fermentação, inibindo o crescimento da linhagem inoculada. Isso se deve à alta capacidade de adaptação das linhagens industriais nas condições estressantes impostas pela fermentação industrial tais como: alta concentração de etanol, altas temperaturas, estresse osmótico devido a açúcares e sais, acidez, presença de sulfito e contaminação bacteriana (Basso et al. 2008).

Dentro desse grupo de leveduras selvagens isoladas do próprio processo, um dos exemplos de maior sucesso é a linhagem PE-2 (Basso et al. 2008), utilizada por aproximadamente 30% das usinas brasileiras, o que representa uma parcela de cerca de 10% na produção mundial de etanol (Argueso et al. 2009).

O processo da produção de álcool pela levedura industrial é simples e gera altos rendimentos, chegando a atingir até 92% do rendimento máximo teórico de glucose em etanol, que é de 0,51 gramas de etanol por grama de glucose consumida (Basso et al. 2008), tornando atraente repetir esse desempenho na produção de outro compostos. Portanto, o desafio atual é a substituição da evolução natural das características desejáveis dessas leveduras por uma engenharia metabólica que promova a produção de compostos que não são naturalmente produzidos.

Por essa razão, o domínio da manipulação genética das linhagens selvagens torna-se interessante, uma vez que o uso das linhagens laboratoriais, apesar de serem de fácil manipulação, resulta na substituição desses organismos por linhagens industriais selvagens quando realizadas fermentações industriais.

As linhagens de laboratório de *S. cerevisiae* são haplóides estáveis, normalmente exibem uma boa capacidade de cruzamento, são facilmente transformáveis e contém marcadores de seleção (auxotróficos). Em comparação, tais características geralmente não estão presentes em linhagens industriais, tornando-as mais difíceis de serem manipuladas (Walker et al. 2003). Porém, avanços na domesticação da levedura industrial PE-2 vem sendo realizados. Desde o início de 2008 nosso grupo de pesquisa vem dando passos para desvendar as características genéticas e moleculares da

linhagem PE-2 com o objetivo final de desenvolver estratégias de manipulação e domesticação (Argueso et al. 2009).

Como os estoques da linhagem PE-2 disponíveis comercialmente são constituídos por uma população mista de células com perfis cariotípicos muito similares, foi necessário purificá-la através da obtenção de colônias isoladas. Foi então selecionada uma única colônia isolada que apresentava um perfil cariotípico representativo da média da população original (Argueso et al. 2009). Esse novo isolado, denominado JAY270, é indistinguível da cultura original da linhagem PE-2 em testes fenotípicos (Argueso et al. 2009).

Foi realizada uma caracterização genética molecular detalhada do isolado JAY270, que incluiu a análise estrutural de seus cromossomos e o sequenciamento completo do genoma de duas linhagens haplóides irmãs derivadas do mesmo isolado (JAY291 e JAY292) (Argueso et al. 2009). Os resultados obtidos demonstraram que JAY270 é uma linhagem diplóide naturalmente heterotática que apresenta um genoma altamente heterozigoto, com alta frequência de polimorfismos estruturais e de nucleotídeos (Argueso et al. 2009).

Apesar do nível elevado de variação estrutural, a linhagem JAY270 apresenta uma alta eficiência de esporulação e uma alta frequência de esporos viáveis (~93%) (Argueso et al. 2009).

A frequência elevada de polimorfismos estruturais e de nucleotídeos demonstra que existe um nível muito alto de diversidade genética em JAY270. Os níveis elevados de heterozigose no genoma são frequentemente associados com o crescimento robusto e a alta produtividade de plantas e animais híbridos (Argueso et al. 2009).

2.6 Estratégia de Clonagem

Ao longo dos anos várias técnicas de modificação genética vêm sendo desenvolvidas, entretanto a maioria se baseia no uso de marcadores dominantes. Tais técnicas têm como principal desvantagem a inserção de seqüências externas, como as de resistência a antibióticos, criando organismos transgênicos. Uma alternativa a esse problema é a abordagem do *delitto perfetto*, desenvolvida para a levedura *Saccharomyces cerevisiae* (Storici, Lewis, & Resnick 2001). A estratégia é assim chamada pois o marcador utilizado para guiar a deleção (vetor pCORE) pode ser removido após cada modificação, podendo então ser re-utilizado nas modificações subsequentes. Esse método para mutagênese *in vivo* fornece seleção direta para quase qualquer modificação cromossômica. A mutagênese é alcançada em duas etapas de recombinação homóloga. O primeiro passo envolve a integração de um cassete (CORE) com um gene repórter (gene de resistência) e um gene co-selecionável (marcador auxotrófico) com bordas de homologia que é integrado no *locus* desejado do genoma utilizando procedimentos normais de integração. A segunda etapa é alcançada pela transformação com os oligonucleotídeos (IROs – Integrative Recombinant Oligonucleotides) apropriados de maneira que o cassete CORE seja retirado do genoma, permitindo que seja re-

utilizado nas modificações subsequentes (Storici & Resnick 2006). A Figura 4 exemplifica os processos de deleção e mutação de genes através da estratégia do *delitto perfetto*.

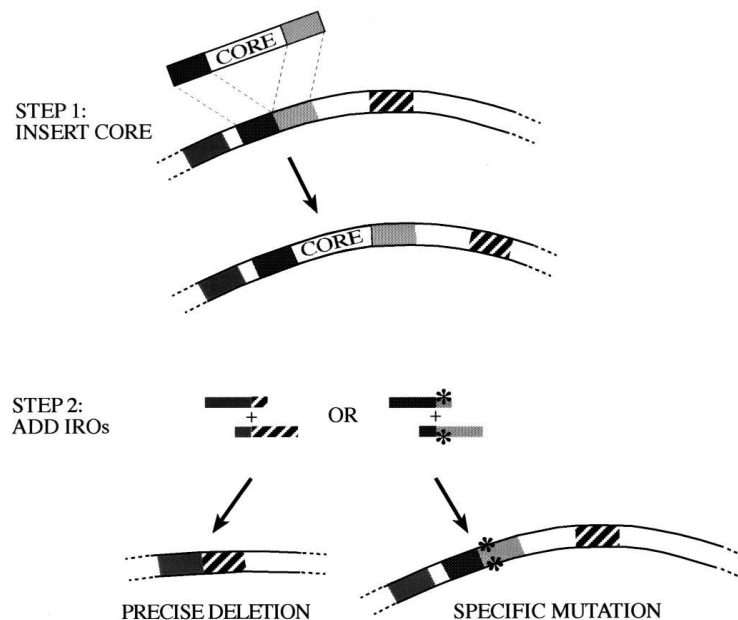


Figura 4. O sistema *delitto perfetto*. No passo 1, o cassete CORE é inserido no *lôcus* escolhido para ser deletado ou próximo a um sítio no qual uma mudança seja desejada. No passo 2, a transformação das células com os IROs leva à excisão do cassete CORE, não deixando nenhuma marca de seleção no genoma.

*Extraído de Storci, 2001.

Existem vários tipos de vetor pCore; o utilizado nesse trabalho possui o gene de resistência à geneticina, *KanMX4*, e o gene *URA3* de *Kluyveromyces lactis*, capaz de retornar a prototrofia. Sendo assim, a deleção deve ser realizada numa linhagem mutante $\Delta ura3$, para que possam ser realizadas as duas seleções, uma que detecta a presença do cassete de deleção e uma que detecta a remoção do mesmo. O ácido 5-fluoro orótico (5-FOA) é um análogo do precursor da uracila, que quando metabolizado pela enzima codificada pelo gene *URA3*, orotina-5'-monofosfato dicarboxilase, gera a 5-fluorodeoxiuridina, um composto tóxico para as células de levedura. Os mutantes $\Delta ura3$ não são capazes de crescer em meio sem uracila, entretanto, são capazes de crescer na presença do composto ácido 5-fluoro orótico, sendo que esta mutação é considerada um marcador tanto auxotrófico (a linhagem é incapaz de crescer sem suplementação do meio com uracila) quanto dominante (a linhagem é resistente ao 5-FOA) (Boeke, Lacroute, & Fink 1984). Assim, um mutante auxotrófico para *URA3* (resistente a 5-FOA) que for transformado com este cassete irá se tornar susceptível a 5-FOA e resistente a geneticina, podendo ser selecionado em meio com geneticina. Após a retirada deste cassete, o transformante será susceptível a geneticina e voltará a ser resistente a 5-FOA, podendo ser selecionado em 5-FOA. Desta maneira é possível realizar modificações de maneira sequencial usando este sistema em qualquer linhagem de levedura mutante $\Delta ura3$.

3. Objetivos

Este projeto visa o desvio de uma rota metabólica da levedura *Saccharomyces cerevisiae* para produção de glicerol a partir da fermentação de açúcares por linhagens industriais. O objetivo principal desse trabalho é a superprodução de glicerol na levedura industrial PE-2 (JAY270) através do desvio do fluxo metabólico do etanol para o glicerol. Para isso, serão realizadas três modificações no metabolismo: deleção do gene *ADH1* (álcool desidrogenase 1 NAD⁺-dependente), deleção do gene *TPI1* (triose fosfato isomerase), e superexpressão do gene *GPD1* (glicerol 3-fosfato desidrogenase). Além disso, também será analisada a complementação do gene *ADH1* em linhagens $\Delta adh1$ com o intuito de verificar a capacidade de recuperação das características da linhagem selvagem.

Os objetivos específicos são:

- 1) Construção dos cassetes de deleção dos genes *ADH1* e *TPI1*
- 2) Construção do plasmídeo para superexpressão do gene *GPD1*.
- 3) Construção do plasmídeo para complementação do gene *ADH1*.
- 4) Obtenção dos mutantes.
- 5) Testes fermentativos para verificação do perfil de produção de metabólitos das linhagens obtidas.

4. Materiais e Métodos

4.1 Meios de cultura

LB: meio para crescimento das bactérias: *E. coli*. Composição: 1% de triptona, 1% de extrato de levedura, 0,5% de NaCl e 1,5% de ágar, se necessário. Para a seleção da transformação com plasmídeos foram adicionados ao meio 100 µg/mL de ampicilina, 30 µg/mL de kanamicina e/ou 80 µg/mL de X-gal, quando necessário (após autoclavagem).

YEPD: meio de cultura padrão utilizado para o crescimento das linhagens de *S. cerevisiae*. Composição: 1% extrato de levedura, 2% peptona, 2% glucose e 2% ágar, se necessário. Para a seleção dos transformantes integrativos o meio foi complementado com o antibiótico geneticina, G418, (Hyclone) a uma concentração de 200 µg/mL ou higromicina (Invitrogen) 300 µg/mL, após autoclavagem.

YNB: meio sintético utilizado para crescimento de *S. cerevisiae*. Composição: 0,67% YNB sem aminoácidos da Difco (2 mg de biotina, 0,4 g de pantotenato de cálcio, 2 mg de ácido fólico, 2 g de inositol, 0,4 g de niacina, 0,2 g de ácido p-aminobenzóico, 0,4 g de piridoxina, 0,2 g de riboflavina, 0,4 g de tiamina, 0,5 g de ácido bórico, 40 mg de sulfato de cobre, 0,1 g de iodeto de potássio, 0,2 g de cloreto de ferro, 0,4 g de sulfato de manganês, 0,2 g de molibdato de sódio, 0,4 g de sulfato de zinco, 1 g de fosfato monobásico de potássio, 0,5 g de sulfato de magnésio, 0,1 g de cloreto de sódio e 0,1 g de cloreto de cálcio), 3% de glucose, 1% da solução dropout de aminoácidos (0,5 g de adenina, 0,24 g de L-arginina, 1,2 g de L-ácido aspártico, 1,2 g de L-ácido glutâmico, 0,36 g de L-lisina, 0,24 g de L-metionina, 0,6 g de L-fenilalanina, 4,5 g de L-serina, 2,4 g de L-treonina, 0,18 g de L-tirosina e 1,8 g de L-valina) e 3% de ágar, se necessário. Triptofano, histidina e leucina, além da uracila, são preparados a parte em uma solução estoque e são adicionados ao meio. 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-orótico) ao meio.

YEPE: meio utilizado para crescimento de leveduras incapazes de crescer em glucose como única fonte de carbono, como por exemplo, linhagens com o gene *TPI1* deletado. A principal fonte de carbono é o etanol. Composição: 0,1% de dextrose, 1% extrato de levedura, 2% peptona, 2% etanol (adicionado após autoclavagem) e 2% de ágar, se necessário. Para a seleção dos transformantes integrativos o meio foi complementado com o antibiótico geneticina, G418, (Hyclone) a uma concentração de 200 µg/mL ou higromicina (Invitrogen) 300 µg/mL, após autoclavagem.

Meio de esporulação: meio deficiente em nitrogênio utilizado para induzir a esporulação de leveduras diplóides. Possui como fonte de carbono o acetato, que promove altos níveis de respiração celular, induzindo a esporulação. Composição: 1% de acetato de potássio, 0,1% de extrato de levedura, 0,05% de dextrose e 2% de ágar.

Todos os meios de cultura foram autoclavados a 121 °C por 20 minutos em autoclave Eletrolab vertical, modelo 503/3.

4.2 Linhagens

A linhagem de *E. coli* utilizada para a construção e propagação dos plasmídeos foi a DH10B.

As modificações genéticas foram realizadas em linhagens de laboratório e industriais da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. As linhagens de laboratório utilizadas, derivadas da linhagem modelo S288c, foram FY23 (*MATa*, *ura3-52*, *trpΔ63*, *leu2Δ1*) e FY86 (*MATα*, *ura3-52*, *his3Δ200*, *leu2Δ1*).

As linhagens industriais utilizadas são derivadas da linhagem PE-2, isolada de usinas de álcool (Basso, 2008). Uma colônia pura da PE-2 foi isolada e denominada JAY270 (Argueso, 2009). O estudo genético dessa linhagem teve início com o isolado diplóide JAY270, que, por ser um organismo selvagem, não possui as mutações auxotróficas utilizadas para modificações genéticas em leveduras. Dessa maneira, em um trabalho prévio desenvolvido pelo aluno de mestrado Felipe Galzerani, foram deletadas ambas as cópias do gene *URA3* do isolado diplóide JAY270, conferindo então, um descendente da linhagem industrial PE-2 com marca auxotrófica, denominado FGY050. Durante a construção da linhagem FGY050 foram realizadas duas esporulações, em diferentes passos, que deram origem às linhagens haplóides e com o gene *URA3* deletado FGY031 (*MATa*) e FGY042 (*MATα*) que foram utilizadas nesse trabalho.

Todas as linhagens foram mantidas armazenadas a -80°C em solução de 20% de glicerol.

4.3 Plasmídeos

pCORE: possui o gene de resistência a geneticina (*KanMX4*), e o gene *URA3* de *Kluyveromyces lactis* (Storici & Resnick 2006). Foi utilizado para construção de cassetes integrativos para deleção de genes.

pAG32: possui o gene de resistência a higromicina B (*hph*) de *Klebsiella pneumoniae*. Foi utilizado para a amplificação do gene *hph* para construção dos cassetes.

pFA6aKanMX4: possui o gene de resistência a geneticina (*KanMX4*). Foi utilizado para a amplificação do gene *KanMX4* para construção dos cassetes.

YE_p 352: vetor episomal capaz de replicar autonomamente em leveduras pois possui a origem de replicação do plasmídeo 2 μm. Possui também o gene *URA3* (marca de seleção para levedura) e o gene de resistência a ampicilina (marca de seleção para bactéria). Foi utilizado para construção dos plasmídeos de superexpressão dos genes *ADH1* e *GPD1*.

pGEM T- Easy: vetor comercial linearizado contendo o gene de resistência a ampicilina e sítio de clonagem dentro do gene *lacZ*. A presença de timinas em ambas as bordas do plasmídeo facilita a

clonagem de produtos de PCR que tiveram adição de uma adenina na região 3'. Foi utilizado na construção dos plasmídeos de superexpressão dos genes *ADH1* e *GPD1*.

4.4 PCR de colônia de bactérias

Uma vez obtidas colônias isoladas de bactérias, aproximadamente uma ponta de palito de cada colônia foi misturado com 10 µL de água destilada estéril em tubos de PCR. O conteúdo dos tubos foi aquecido a 94°C durante 6 minutos e logo em seguida resfriado a -20°C por 10 minutos. Essa variação brusca na temperatura tem como objetivo liberar o conteúdo celular e, conseqüentemente, o DNA das amostras. Posteriormente os tubos foram centrifugados a 13.000 rpm por 3 minutos (Centrífuga 5810R Eppendorf) e 2 µL dos sobrenadantes obtidos foram utilizados para as reações de PCR.

Cada PCR continha 2 µL da suspensão contendo o DNA, 1 µL de tampão de PCR 10x (Invitrogen), 0,6 µL de MgCl₂ 50 mM (Invitrogen), 0,2 µL de solução de dNTPs 10 mM (Invitrogen), 0,6 µL dos *primers forward* e *reverse* a 5 pmol/µL, 0,2 µL de *Taq* DNA Polymerase (Invitrogen) e 4,8 µL de água Milli-Q estéril.

Os PCRs foram realizados no equipamento Veriti Thermal Cycler (Applied Biosystems) com os seguintes parâmetros: 1ª etapa - 94°C por 7 min, 2ª etapa - 35 ciclos a 94°C por 50 s, temperatura de hibridização dos *primers* por 50 s e 72°C por 1 minuto para cada Kb que se deseja amplificar, 3ª etapa - 72°C por 5 min.

Os produtos finais de cada PCR foram aplicados em géis de agarose (LGC Biotecnologia) a 1% contendo brometo de etídio. Cada corrida foi realizada em tampão TAE 1x (Tris-acetato 40 Mm e Na₂EDTA-2H₂O 2 mM, pH 8,5) utilizando-se a fonte PowerPac 3000 (BioRad). Posteriormente os géis foram visualizados e fotografados sob luz ultravioleta em fotodocumentado Image Master VDS (Pharmacia Biotech). Essa técnica foi utilizada para visualização de todas as reações de PCR realizadas neste trabalho.

4.5 Preparo de bactérias eletrocompetentes

O preparo de células de bactéria eletrocompetentes foi realizado de acordo com o protocolo “*High-Efficiency Transformation by Electroporation*” descrito em Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel et al. 2003).

4.6 Transformação de bactérias eletrocompetentes

A transformação foi realizada através da eletroporação em eletroporador *E. coli Pulser* (BioRad). Foram adicionados entre 1 e 5 µL do plasmídeo a 40 µL de células eletrocompetentes retiradas do freezer -80 °C e descongeladas no gelo. O DNA e as células foram transferidos para uma cubeta

de eletroporação de 0,2 cm (Bio-Rad) previamente resfriada. A cubeta foi levada ao eletroporador e um pulso de 2,5 kV. A cubeta foi retirada imediatamente do eletroporador e adicionou-se 1 mL de meio LB líquido ao interior da mesma, para a recuperação das células. O meio LB contendo as células foi transferido para um tubo eppendorf de 1,5 mL e incubado a 37 °C por 1 hora. Alíquotas de 50, 100 ou 200 µL do meio contendo células foram plaqueadas em meio sólido seletivo adequado e as placas foram incubadas a 37 °C *overnight*.

4.7 Extração de plasmídeo de bactérias em mini escala por lise alcalina – Miniprep

Cada colônia de bactéria foi inoculada em tubo de ensaio autoclavado contendo 3 mL de meio LB e o antibiótico adequado. Os tubos foram incubados em shaker Innova 4230 (New Brunswick) a 37 °C e 250 rpm *overnight*. Foram transferidos 1,5 mL das culturas crescidas para tubos *ependorf* de 1,5 mL para que fossem centrifugados a 13000 rpm por 5 minutos para peletar as células. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em 100 µL da solução 1 (EDTA 10 mM pH 8, TrisHCl 25 mM pH 8 e 10 µg de RNase) gelada, os tubos foram incubados a 37 °C por 15 minutos para a ação da RNase. Foram então adicionados 200 µL da solução 2 (NaOH 0,2 M e SDS 1%) preparada no dia e os tubos foram homogeneizados por inversão. Em seguida foram adicionados 150 µL da solução 3 (Acetato de potássio 3 M e ácido acético glacial 11,5%) gelada e os tubos foram mantidos no gelo por 10 a 30 minutos. Foram então centrifugados a 13000 rpm por 15 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi transferido para outro tubo, foi adicionado 1 mL de etanol absoluto gelado, os tubos foram misturados por inversão e centrifugados novamente nas mesmas condições. O sobrenadante foi descartado, o pellet formado foi lavado com etanol 70% gelado e após a evaporação completa do etanol, foi ressuspensado em 50 µL de água Milli-Q estéril. Para a realização das reações de PCR, a solução contendo o plasmídeo extraído foi diluída em uma proporção de 1:10.

4.8 Construção de cassetes

Foram delineadas duas estratégias diferentes para a modificação genética da linhagem (deleção dos genes *ADH1* e *TPI1* e superexpressão do gene *GPD1*). A primeira consiste na utilização da metodologia do *delitto perfetto*, que não deixa marca de seleção, entretanto trabalha com pequenas regiões de homologia entre o cassete e o genoma. A segunda estratégia utiliza cassetes com longas regiões de homologia ao genoma e foi desenhada em vista da possível dificuldade de obter mutantes *locus*-específicos usando regiões curtas de homologia. Tendo em vista essas diferentes abordagens, para cada *locus* a ser deletado (*ADH1* e *TPI1*) foram construídos dois conjuntos diferentes de cassetes: cassetes construídos a partir do vetor pCORE e cassetes de resistência a geneticina ou higromicina flanqueados com regiões de homologia (~200 pb) aos *loci* de interesse. Para a superexpressão do gene *GPD1* construiu-se um plasmídeo.

O primeiro passo para a realização de ambas as estratégias consistiu na análise de sequência do vetor pCORE, das resistências a higromicina e a geneticina e na análise das sequências dos genes *URA3*, *ADH1*, *TPI1* e *GPD1* na linhagem industrial PE-2 de *Saccharomyces cerevisiae*. Com base nessa análise foram definidos todos os oligonucleotídeos a serem sintetizados para a realização do experimento. O programa usado para selecionar os oligonucleotídeos mais apropriados foi *Primer3* (<http://frodo.wi.mit.edu/>), disponível on-line de maneira gratuita. Todos os oligonucleotídeos desenhados foram sintetizados pela IDT-Prodinol. Depois de construídos os cassetes foram dialisados em Membrana Filtrante MF (Millipore) 0,025 µm para retirar o excesso de sal, que pode atrapalhar na eletroporação. Caso a amplificação não tenha sido específica, o fragmento de interesse foi purificado com kit Purelink Quick Gel Extraction (Invitrogen).

A verificação da construção correta de cada cassete foi feita por análise de restrição. Cada reação continha 3 µL do cassete, 1 µL do tampão de reação 10X adequado para as enzimas, 0,2 µL de cada enzima apropriada e 5,6 µL de água Milli-Q estéril. As reações foram incubadas *overnight* ou por 3 horas na temperatura adequada. Os produtos finais de cada reação de restrição foram aplicados em géis de agarose (LGC Biotecnologia) a 1% contendo brometo de etídio. Cada corrida foi realizada em tampão TAE 1x (Tris-acetato 40 Mm e Na₂EDTA-2H₂O 2 mM, pH 8,5) utilizando-se a fonte PowerPac 3000 (BioRad). Posteriormente os géis foram visualizados e fotografados sob luz ultravioleta em fotodocumentado Image Master VDS (Pharmacia Biotech).

4.8.1 Cassetes construídos a partir do pCORE

Os oligonucleotídeos sintetizados para esta estratégia são quiméricos, sendo que possuem uma região de alinhamento para amplificação do vetor pCORE na extremidade 5', enquanto que na extremidade 3' têm uma região de 43 nucleotídeos idêntica às bordas do gene alvo, as quais guiam a recombinação homóloga. Além destes oligonucleotídeos quiméricos, foram sintetizados os Oligonucleotídeos Integrativos para Recombinação (IROs) necessários para guiar a recombinação homóloga que irá retirar o cassete pCORE (Storici & Resnick 2006). Os IROs devem ter aproximadamente 140 bp, mas como o serviço terceirizado de síntese de oligos é custoso e menos eficiente para oligos maiores a 100 bp, foram desenhados dois oligos de 80 bp com 20 bp de sobreposição na extremidade 3', de forma que o uso de ambos simultaneamente como moldes e *primers* em uma PCR permita criar os IROs de 140 bp. A sequência dos oligonucleotídeos sintetizados pode ser visualizado na Tabela 2.

Tabela 2. Sequência dos *primers* para construção dos cassetes utilizando pCORE.

Nome	Sequência
pCORE-dADH1-F	TGTTCCAGAGCTGATGAGGGGTATCTCGAAGCACACGAAACTTTTC

	CTACCATTAAGTTGAT
pCORE-dADH1-R	TAACCTATTTAATAATAAAAAATCATAAATCATAAGAAATTCGCTCGAG CTCGTTTTCGACACTGG
ADH1-IRO-F	GCGCTCTTTTCCGATTTTTTTCTAAACCGTGGAATATTTCCGATATC CTTTTGTTTCCGGGTGTACAATGCCTGCAA
ADH1-IRO-R	AGATTCATCAACTCATTGCTGGAGTTAGCATATCTACAATTGGGTGA AATGGGGAGCGATTTGCAGGCATTGTACACCCG
pCORE-dTPI-F	TGCTTAAATCTATAACTACAAAAACACATACATAAACTAAAATTCCT TACCATTAAGTTGATC
pCORE-dTPI-R	TATAAAGAAAAGAAGATAATATTTTTATATAATTATATTAATCTCGAG CTCGTTTTCGACACGG
TPI-IRO-F	TCTATTGATGTTACACCTGGACACCCCTTTTCTGGCATCCAGTTTTT AATCTTCAGTGGCATGTGAGATTAGAAAAGCAT
TPI-IRO-R	TTACAAGGATTTAGAGACAAAGTAATATTCTTCGTTGATATAGAGGT GTTCAATTGTAAATGCTTTTCTAATCTCACAT

Os oligonucleotídeos quiméricos foram utilizados para amplificação por PCR da região do vetor pCORE contendo o gene *URA3* de *Kluyveromyces lactis* e o gene de resistência a geneticina, KanMX4. Foi preparada uma reação de amplificação padrão com os seguintes componentes: 7 µL do vetor pCORE diluído 1:10, 7 µL do *primer forward* a uma concentração de 5 pmol/µL, 7 µL do *primer reverse* a uma concentração de 5 pmol/µL, 3,5 µL de dNTPs a 10 mM, 20 µL do tampão de reação 5X contendo 1,5 mM de cloreto de magnésio (Clontech), 1 µL de Taq Advantage HD (Clontech) e 54,5 µL de água Milli-Q estéril. A reação ocorreu em termociclador Thermal Cycler (Applied Biosystems) com o seguinte programa: 5 min a 94 °C para desnaturação inicial do DNA e do anticorpo policlonal presente no sítio ativo da Taq Advantage HD (Clontech) seguido de 30 ciclos de 50 s a 94 °C, 20 s na temperatura de hibridização dos *primers* e 3 minutos a 68 °C. A ciclagem foi seguida de um passo de extensão final por 7 minutos a 68 °C.

Para construção dos IROs foi preparada uma reação com 2 µL do *primer forward* a uma concentração de 100 pmol/µL, 2 µL do *primer reverse* a uma concentração de 2 pmol/µL, 5 µL do tampão de PCR 10X (Invitrogen), 2,5 µL de MgCl₂ a 50 mM (Invitrogen), 1 µL de DNTPs 10 mM, 0,8 µL de Taq DNA Polymerase (Invitrogen) e 36,7 µL de água Milli-Q estéril.

A reação foi realizada em termociclador Thermal Cycler (Applied Biosystems) com o seguinte programa: 1 min a 94 °C, 1 min a 55 °C e 5 min a 72 °C.

4.8.2 Cassetes com regiões longas de homologia

Para deleção do gene *ADH1* foi construído um cassete (ADH1-HYG) com o gene de resistência a higromicina e regiões de homologia de aproximadamente 200 pb *upstream* e

downstream ao gene *ADH1*. O cassete para a deleção do gene *TPI1* (TPI1-KAN) foi construído com o gene de resistência à geneticina além das regiões de homologia *up* e *downstream* ao gene *TPI1*. Ambos os cassetes foram construído usando a técnica Double-joint PCR, que elimina passos sucessivos de clonagem, de acordo com (Yu et al. 2004). Nessa técnica são realizados três *rounds* de PCR. No primeiro *round* são amplificados, separadamente, o gene de resistência, a região de homologia *upstream* e a região de homologia *downstream*, com seus respectivos *primers*. O *primer* reverse da região *upstream* e o *primer forward* da região *downstream* são sintetizados com uma cauda de cerca de 25 pb de homologia à região 5'e 3', respectivamente, do gene de resistência. O segundo *round* é uma reação de amplificação sem *primers*. Os três fragmentos amplificados no primeiro *round* são misturados em uma PCR e as regiões de homologia agem como *primers*, estendendo os fragmentos. No terceiro *round* utiliza-se a reação do segundo *round* como DNA molde e realiza-se uma PCR normal com os *primers* Nested, capazes de amplificar todo o cassete. A sequência dos oligonucleotídeos sintetizados pode ser visualizada na Tabela 3.

Tabela 3. Sequência dos *primers* utilizados para construção dos cassetes com regiões longas de homologia.

Nome	Sequência (5' – 3')
HygSC-F	GCGCCAGATCTGTTTAGCTT
HygSC-R	CAGCAGTATAGCGACCAGCA
Kan-F	CGTTAGAACGCGGCTACAAT
Kan-R	GCCGATTCATTAATGCAGGT
5_ <i>ADH1</i> -F	TCTCACCATATCCGCAATGA
5_ <i>ADH1</i> -R-HYG	ACAAGGCAAGCTAAACAGATCTGGCGCAGGAACGAGAACAAATGACG
3_ <i>ADH1</i> -F-HYG	ATGTGAATGCTGGTCGCTATACTGCTGATCAAGTTGTCGGCTTGTC
3_ <i>ADH1</i> -R	CCGGTAGAGGTGTGGTCAAT
5_ <i>ADH1</i> -Nest-F	CACCATATCCGCAATGACAA
3_ <i>ADH1</i> -Nest-R	GTGGTCAATAAGAGCGACCTC
5_ <i>TPI1</i> -F	CCATCAGGTTGGTGGAAGAT
5_ <i>TPI1</i> -R-KAN	TGTATTAATTGTAGCCGCGTTCTAACGGCGTAACAAACCACCTGTCA
3_ <i>TPI</i> -F-KAN	CAGGTTAACCTGCATTAATGAATCGGCGGCTGATGTCGATGGTTTCT
3_ <i>TPI1</i> -R	CACGAAATTTAAGTGGCTCAGA
5_ <i>TPI1</i> -Nest-F	CAGGTTGGTGGAAGATTACCC
3_ <i>TPI1</i> -Nest-R	TTAAGTGGCTCAGAATGAAAAG

Cada um dos três *rounds* utilizado na construção dos cassetes possui diferenças nas reações e ciclos:

1º *round* - gene de resistência - 4 µL de plasmídeo diluído 1:10, 3 µL do *primer forward* a uma concentração de 5 pmol/µL, 3 µL do *primer reverse* a uma concentração de 5 pmol/µL, 1,8 µL de dNTPs a 10 mM, 10 µL do tampão de reação 5X contendo 1,5 mM de cloreto de magnésio

(Clontech), 0,5 µL de Taq Advantage HD (Clontech) e 27,7 µL de água Milli-Q estéril. A reação ocorreu em termociclador Thermal Cycler (Applied Biosystems) com o seguinte programa: 5 min a 94 °C, seguido de 30 ciclos de 50 s a 94 °C, 20 s na temperatura de hibridização dos *primers* e 2 minutos a 68 °C. A ciclagem foi seguida de um passo de extensão final por 7 minutos a 68 °C.

1º round - regiões de homologia - 4 µL de DNA da linhagem PE-2 diluído 1:10, 3 µL do *primer forward* a uma concentração de 5 pmol/µL, 3 µL do *primer reverse* a uma concentração de 5 pmol/µL, 1,8 µL de dNTPs a 10 mM, 10 µL do tampão de reação 5X contendo 1,5 mM de cloreto de magnésio (Clontech), 0,5 µL de Taq Advantage HD (Clontech) e 27,7 µL de água Milli-Q estéril. O programa utilizado foi: 7 min a 94 °C, seguido de 30 ciclos de 50 s a 94 °C, 20 s na temperatura de hibridização dos *primers* e 30 s a 68 °C. A ciclagem foi seguida de um passo de extensão final por 5 minutos a 68 °C.

2º round - 2 µL de DNA da região de homologia 5', 2 µL de DNA da região de homologia 3', 6 µL de DNA do gene de resistência, 1,6 µL de dNTPs a 10 mM, 10 µL do tampão de reação 5X contendo 1,5 mM de cloreto de magnésio (Clontech), 0,5 µL de Taq Advantage HD (Clontech) e 27,9 µL de água Milli-Q estéril. O programa utilizado foi: 3 min a 94 °C, seguido de 12 ciclos de 30 s a 94 °C, 10 min a 58 °C e 5 min a 68 °C. A ciclagem foi seguida de um passo de extensão final por 10 minutos a 68 °C.

3º round – 0,8 µL do 2º round, 6 µL do *primer forward* a uma concentração de 5 pmol/µL, 6 µL do *primer reverse* a uma concentração de 5 pmol/µL, 1,8 µL de dNTPs a 10 mM, 10 µL do tampão de reação 5X contendo 1,5 mM de cloreto de magnésio (Clontech), 0,5 µL de Taq Advantage HD (Clontech) e 24,9 µL de água Milli-Q estéril. O programa utilizado foi: 5 min a 94 °C, seguido de 30 ciclos de 50 s a 94 °C, 20 s na temperatura de hibridização dos *primers* e 2:30 min a 68 °C. A ciclagem foi seguida de um passo de extensão final por 7 minutos a 68 °C.

4.9 PCR de colônia de leveduras

Uma vez obtidas colônias isoladas de leveduras, aproximadamente uma ponta de palito de cada colônia foi misturado com 10 µL de água destilada estéril em tubos de PCR. O conteúdo dos tubos foi aquecido a 94°C durante 6 minutos e logo em seguida resfriado a -80°C por 15 minutos. Essa variação brusca na temperatura tem como objetivo liberar o conteúdo celular e, conseqüentemente, o DNA das amostras. Posteriormente os tubos foram centrifugados a 13.000 rpm por 3 minutos (Centrífuga MiniSpin Eppendorf) e 4 µL dos sobrenadantes obtidos foram utilizados para as reações de PCR.

Cada PCR continha 4 µL da suspensão contendo o DNA, 1 µL de tampão de PCR 10x (Invitrogen), 0,6 µL de MgCl₂ 50 mM (Invitrogen), 0,2 µL de solução de dNTPs 10 mM (Invitrogen), 0,6 µL dos *primers forward* e *reverse* a 5 pmol/µL, 0,2 µL de Taq DNA Polymerase (Invitrogen) e 2,8 µL de água Milli-Q estéril.

Os PCRs foram realizados no equipamento Veriti Thermal Cycler (Applied Biosystems) com os seguintes parâmetros: 1ª etapa - 94°C por 7 min, 2ª etapa - 35 ciclos a 94°C por 50 s, temperatura de hibridização dos *primers* por 50 s e 72°C por 1 minuto para cada kb que se deseja amplificar, 3ª etapa - 72°C por 5 min.

4.10 Preparo de leveduras eletrocompetentes

Para que a eficiência do processo de transformação seja maior é necessário utilizar sempre células frescas, recém-preparadas, não sendo recomendável guardá-las no freezer -80 °C para transformação posterior.

As linhagens foram retiradas do freezer -80 °C e crescidas em placa com meio sólido adequado, a 30 °C, por um a dois dias. Uma colônia isolada foi inoculada em um *Erlenmeyer* de 250 mL contendo 25 mL de meio líquido adequado (YEPD, YEPE) e foi então incubado em *shaker* Innova 4230 (New Brunswick) a 30 °C e 200 rpm overnight. No dia seguinte foi medida a densidade ótica (OD) da cultura a 600 nm em espectrofotômetro ULTROSPEC 2000 (Pharmacia Biotech) e dilui-se a cultura para uma OD = 0,2 em um Erlenmeyer de 500 mL contendo 100 mL do meio líquido adequado. O Erlenmeyer foi incubado a 30 °C e 200 rpm e o crescimento foi sendo acompanhado por medidas de OD a 600 nm até que a cultura alcançasse uma OD = 1,3 - 1,5 (entre 4 a 8 horas). A cultura foi então transferida para dois tubos falcon de 50 mL que foram colocados no gelo por no mínimo 30 minutos para o crescimento fosse parado. A partir desse momento os tubos foram mantidos no gelo durante todo o procedimento para manter a viabilidade celular. Os tubos foram centrifugados a 3300 rpm e 4 °C em centrífuga GPR (Beckman) por 10 minutos para peletar as células. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* celular ressuspensionado em 50 mL de água destilada estéril gelada. Os tubos foram centrifugados da mesma maneira e o sobrenadante novamente descartado. O *pellet* celular foi ressuspensionado outra vez em 50 mL de água destilada estéril gelada e os tubos novamente centrifugados nas mesmas condições. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspensionado em 10 mL de sorbitol 1 M gelado e transferido para o outro tubo falcon contendo o *pellet* celular. O *pellet* foi ressuspensionado e completou-se com sorbitol 1 M gelado até 40 mL. O tubo foi centrifugado a 3300 rpm e 4 °C por 10 minutos e o sobrenadante descartado. O *pellet* celular foi ressuspensionado em 200 µL de sorbitol 1 M gelado.

4.11 Transformação de leveduras eletrocompetentes

A transformação foi realizada através da eletroporação em eletroporador *E. coli* Pulser (Bio-Rad). Foram adicionados entre 1 e 5 µL de plasmídeo ou de 1 a 12 µL de cassete para integração homóloga a 40 µL de células eletrocompetentes recém preparadas. O DNA e as células foram misturados e mantidos no gelo por pelo menos 5 minutos. Foram então transferidos para uma cubeta de eletroporação de 0,2 cm (Bio-Rad) previamente resfriada. A cubeta foi levada ao eletroporador e

um pulso de 1,5 kV foi aplicado. A cubeta foi retirada imediatamente do eletroporador e adicionou-se 1 mL de meio YEPD com 1 M de sorbitol ou YEPE com 1 M de sorbitol líquido ao interior da mesma, para a recuperação das células. O meio contendo as células foi transferido para um tubo *eppendorf* de 1,5 mL. Para transformação com plasmídeos alíquotas de 100, 200 e 700 µL foram plaqueadas imediatamente em meio sólido seletivo. Para transformação com cassetes integrativos o meio líquido contendo as células foi incubado em estufa 30 °C por no mínimo 4 horas e no máximo overnight. O tubos foram centrifugados a 13000 rpm por 3 minutos para peletar as células e aproximadamente 800 µL do sobrenadante foram descartados. As células foram ressuspensas nos 200 µL restantes, plaqueadas em meio sólido seletivo adequado e as placas foram armazenadas a 30 °C por 3 a 5 dias.

4.12 Extração de DNA total de leveduras a partir de crescimento em meio líquido

Para a extração do DNA genômico, as linhagens foram crescidas overnight em 5 mL de meio de cultura líquido adequado. Foram então transferidos aproximadamente 1,5 mL de cada cultura para tubos *eppendorf* de 1,5 mL, que foram centrifugados a 14.000 rpm por 2 minutos (Centrífuga 5804 R Eppendorf). O sobrenadante foi descartado e o pellet celular obtido foi ressuspensionado em 200 µL de tampão de quebra (2% Triton X-100, 1% SDS, 100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM EDTA pH 8,0). Foram então adicionados 200 µL de glass beads, medidos em tubo *eppendorf* de 1,2 mL, e 200 µL de uma solução de fenol equilibrado / clorofórmio / álcool isoamílico em uma proporção de 25:24:1. Os tubos foram vortexados a velocidade máxima por 2 minutos e em seguida centrifugados a 14.000 rpm por 15 minutos. O sobrenadante obtido foi então transferido para um novo tubo, onde foram adicionados 20 µL de acetato de sódio 3M (pH 5,3) e 500 µL de etanol absoluto gelado. Os tubos foram homogeneizados por inversão e deixados a -20°C por no mínimo 1 hora e em seguida foram centrifugados a 14.000 rpm por 15 minutos a 4°C. O *pellet* de DNA obtido foi então lavado com etanol 70% gelado e, após a evaporação completa do etanol, foi ressuspensionado em 40 µL de água Milli-Q estéril. Para a realização das reações de PCR, a solução contendo o DNA extraído foi diluída em uma proporção de 1:10.

4.13 Extração de DNA total de leveduras a partir de crescimento em meio sólido

Para a extração do DNA genômico, as linhagens foram crescidas *overnight* em meio sólido adequado. Foram então ressuspensionados aproximadamente 2 cm x 2 cm de massa celular em 200 µL de tampão de quebra (2% Triton X-100, 1% SDS, 100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM EDTA pH 8,0). Foram então adicionados 200 µL de glass beads e 200 µL de uma solução saturada de fenol equilibrado / clorofórmio em uma proporção de 1:1. Os tubos foram vortexados a velocidade máxima por 2 minutos. Adicionaram-se 200 µL de água e em seguida os tubos foram centrifugados a 14.000 rpm por 15 minutos (Centrífuga 5804 R Eppendorf). O sobrenadante obtido foi então transferido para um novo tubo, onde foram adicionados 14 µL de acetato de sódio 3M (pH 5,3) e 1 mL de etanol

absoluto. Os tubos foram homogeneizados por inversão e centrifugados a 14.000 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente. O pellet de DNA obtido foi então lavado com etanol 70% e, após a evaporação completa do etanol, foi ressuspensionado em 70 µL de água Milli-Q estéril. A solução contendo o DNA extraído não precisou ser diluída para a realização das reações de PCR.

4.14 Confirmação da integração homóloga

A confirmação da integração homóloga foi feita por PCR utilizando *primers* externos ao *locus* de inserção para a estratégia do *delitto perfetto*. Para a estratégia que utiliza cassetes com região mais longa de homologia o *primer forward* se hibridiza na região *upstream* ao *locus* de inserção e o *primer reverse* no interior do cassete. O nome e a sequência dos *primers* estão descritos na Tabela 4. Além desses *primers*, em alguns momentos foram utilizadas combinações com os *primers* utilizados na construção dos cassetes (Tabela 3) para que os resultados de inserção fossem confirmados.

Tabela 4. Sequência dos *primers* utilizados para confirmação da integração homóloga.

Nome	Sequência (5' – 3')
Gen-F	AACCATGGGTAAGGAAAAGACTC
Conf-dADH1_core-F	AAGTCCAATGCTAGTAGAGAAGG
Conf-dADH1_core-R	AGATAGAGCCCAACTGAAGG
Conf-dTPI1_core-F	TGGTGGAAGATTACCCGTTC
Conf-dTPI1_core-R	TCTTCTCAACGCGAAAATGA
Conf-ADH1_Int-F	ATAGGCGCATGCAACTTCTT
Conf-ADH1_Int-R	CATGGGGATGTATGGGCTAA
Conf-TPI1_Int-F	CACCCTACTTATTCCCTTCGAG
Conf-TPI1_Int-R	ACATGGGGATGTATGGGCTA

Cada PCR continha 1 µL da suspensão contendo o DNA diluído 1:10, 1 µL de tampão de PCR 10x (Invitrogen), 0,6 µL de MgCl₂ 50 mM (Invitrogen), 0,2 µL de solução de dNTPs 10 mM (Invitrogen), 0,6 µL dos *primers forward* e *reverse* a 5 pmol/µL, 0,2 µL de *Taq* DNA Polymerase (Invitrogen) e 4,8 µL de água Milli-Q estéril.

Os PCRs foram realizados no equipamento Veriti Thermal Cycler (Applied Biosystems) com os seguintes parâmetros: 1ª etapa - 94°C por 7 min, 2ª etapa - 30 ciclos a 94°C por 50 s, temperatura de hibridização dos *primers* por 50 s e 72°C por 1 minuto para cada Kb que se deseja amplificar, 3ª etapa - 72°C por 5 min.

4.15 Cruzamento

As leveduras podem ser haplóides ou diplóides. As leveduras haplóides podem ser de dois *mating-types* diferentes: MATa e a outra MATα. As leveduras diplóides possuem ambos os *mating-*

types: MATa/ α . O cruzamento só pode ser realizado entre leveduras haplóides com *mating-type* diferentes.

As linhagens foram retiradas do estoque -80°C e crescidas em meio sólido adequado por pelo menos 12 horas. Após a formação de massa celular, ressuspendeu-se aproximadamente 1 cm x 1 cm de células crescidas em 200 μ L de água estéril, cada linhagem em um *ependorf* diferente. Utilizou-se o vórtex para que a mistura água/células ficasse bem homogênea. Misturou-se 25 μ L de cada uma das duas linhagens em outro *ependorf* e a suspensão de células foi novamente homogeneizada em vórtex. Colocou-se 20 μ L da solução de células contendo as duas linhagens em meio sólido adequado. As placas foram incubadas a 30°C *overnight*. A partir do crescimento foram isoladas colônias e realizados testes para confirmação do cruzamento (esporulação e determinação do *mating-type* por PCR).

4.16 Esporulação

Após o crescimento da linhagem diplóide em meio completo, as células foram ressuspendidas em 1 mL de água estéril, homogeneizadas e centrifugadas em centrífuga Mini-Spin (Eppendorf) para retirada do excesso de água. Colocou-se 100 μ L da suspensão em placa contendo meio de esporulação e incubou-se por 2 a 3 dias a 30°C. A formação de tétrades, conseqüente da esporulação, foi observada em lâmina a fresco no microscópio.

4.17 Random Spore Analysis

É uma técnica alternativa à dissecação de esporos utilizada para a liberação dos esporos da tétrade.

Após o crescimento da levedura em meio de esporulação, ressuspendeu-se aproximadamente 1 cm x 1 cm da massa celular em 1 mL água estéril, foram então adicionados 50 μ L de uma solução da enzima de lise *Novozym* (Novozymes) na concentração de 25 mg/mL e 2 μ L de β -mercaptoetanol. Esta suspensão foi incubada a 30°C e 150 rpm *overnight*.

Após o tempo de incubação, a solução foi centrifugada a 3500 rpm em centrífuga Mini-Spin (Eppendorf) por 10 minutos à temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspendidas em 1 mL de Triton X-100 0,5%. A suspensão foi novamente centrifugada a 3500 rpm por 10 min. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspendidas em 1 mL de Triton X-100 0,5% e deixadas no gelo por 15 minutos. A solução foi sonicada no gelo em sonicador (Unique) a 65% da potência total por três ciclos de 30 segundos com 2 minutos de intervalo entre cada ciclo. A solução foi centrifugada a 3500 rpm por 10 minutos à temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspendidas em 1 mL de Triton X-100 0,5%. A solução foi sonicada novamente como descrito acima. Após a sonicação centrifugou-se da mesma maneira novamente e as células foram ressuspendidas em 1 mL de água estéril. As células foram

contadas na diluição adequada em Câmara de Neubauer e plaquetas em meio seletivo de acordo com a diluição que resultaria em aproximadamente 100 colônias por placa. As placas foram incubadas a 30°C por dois a três dias.

4.18 Determinação do *mating-type* por PCR

A determinação do *mating-type* de leveduras por PCR é realizada com a utilização de três *primers* simultaneamente. O *primer* JLMo14, que é o *primer forward*, hibridiza na região do gene BUD5, externa ao *lôcus* do *mating-type*, presente tanto em linhagens MATa quanto MAT α . Os *primers reverse* hibridizam apenas em regiões específicas de cada um dos *mating-types*. O *primer* JMLo15 hibridiza na região do *lôcus* do *mating-type* α e o *primer* JLMo16 hibridiza na região do *lôcus* do *mating-type* a. A sequência desses *primers* está descrita na Tabela 5. A amplificação de uma linhagem haplóide MATa gera um fragmento de 544 pb, enquanto uma haplóide do MAT α gera um fragmento de 404 pb. Uma linhagem diplóide apresenta ambos os fragmentos.

Tabela 5. Sequência dos *primers* utilizados para determinação do *mating-type*.

Nome	Sequência (5' – 3')
JLMo14	CCAATAAGACTCTACCCAG
JLMo15	CCACAAATCACAGATGAG
JLMo16	GAAGTGGAGTAATGCCAC

A determinação do *mating-type* pode ser feita por PCR de colônia ou de DNA extraído. A composição de cada uma dessas reações é descrita a seguir:

PCR de colônia: 4 μ L da suspensão contendo o DNA, 1 μ L de tampão de PCR 10x (Invitrogen), 0,6 μ L de MgCl₂ 50 mM (Invitrogen), 0,2 μ L de solução de dNTPs 10 mM (Invitrogen), 0,6 μ L do *primers* JLMo14 a 5 pmol/ μ L, 0,6 μ L do *primer* JLMo15 a 5 pmol/ μ L, 0,6 μ L do *primer* JLMo16 a 5 pmol/ μ L, 0,2 μ L de *Taq* DNA Polymerase (Invitrogen) e 2,2 μ L de água Milli-Q estéril.

PCR de DNA extraído: 1 μ L de DNA diluído 1:10, 1 μ L de tampão de PCR 10x (Invitrogen), 0,6 μ L de MgCl₂ 50 mM (Invitrogen), 0,2 μ L de solução de dNTPs 10 mM (Invitrogen), 0,6 μ L do *primers* JLMo14 a 5 pmol/ μ L, 0,6 μ L do *primer* JLMo15 a 5 pmol/ μ L, 0,6 μ L do *primer* JLMo16 a 5 pmol/ μ L, 0,2 μ L de *Taq* DNA Polymerase (Invitrogen) e 5,2 μ L de água Milli-Q estéril.

Os PCRs foram realizados no equipamento Veriti Thermal Cycler (Applied Biosystems) com os seguintes parâmetros: 1ª etapa - 94°C por 7 min, 2ª etapa - 35 ciclos a 94°C por 50 s, 51 °C por 50 s e 72°C por 40 s, 3ª etapa - 72°C por 5 min.

4.19 Construção dos plasmídeos

Foram construídos dois plasmídeos: YEpADH1, para a complementação do gene *ADH1*, e YEpGPD1, para superexpressão do gene *GPD1*. Ambos os genes foram amplificados com as regiões promotoras por PCR. As condições da reação foram: 4 µL de DNA diluído 1:10, 3 µL do *primer* forward a uma concentração de 5 pmol/µL, 3 µL do *primer* reverse a uma concentração de 5 pmol/µL, 1,8 µL de dNTPs a 10 mM, 10 µL do tampão de reação 5X contendo 1,5 mM de cloreto de magnésio (Clontech), 0,5 µL de Taq Advantage HD (Clontech) e 27,7 µL de água Milli-Q estéril. A reação ocorreu em termociclador Thermal Cycler (Applied Biosystems) com o seguinte programa: 5 min a 94 °C, seguido de 30 ciclos de 50 s a 94 °C, 20 s na temperatura de hibridização dos *primers* e 2 minutos a 68 °C. A ciclagem foi seguida de um passo de extensão final por 7 minutos a 68 °C.

Para clonagem em pGEM T-easy foi realizada a adição da cauda poli-A segundo a reação: 1 µL de tampão 10X (Invitrogen), 0,6 µL de MgCl₂ (Invitrogen), 0,2 µL de dATP 10 mM, 1 µL de Taq DNA Polymerase (Invitrogen) e 7,2 µL do gene amplificado. A reação foi colocada em termociclador a 70 °C por 20 minutos.

As reações de ligação do inserto com o vetor foram realizadas levando-se em conta a proporção 3:1 (inserto:vetor), 1 µL do tampão 10X ou 5 µL do tampão 2X da ligase (Promega) e 1 µL da T4 DNA ligase (Promega). As ligações foram incubadas a 4 °C *overnight* (coesivas) ou 15 °C *overnight* (*blunt*).

Também foram realizadas reações de digestão para construção do plasmídeo. Cada reação de digestão continha: 20 µL do plasmídeo, 5 µL do tampão de digestão 10x apropriado para cada enzima de restrição, 1 µL de cada enzima de restrição apropriada e 24 µL de água Milli-Q estéril. Todas as reações foram incubadas *overnight* a 37°C (temperatura de atividade ótima de todas as enzimas utilizadas). Os produtos finais de cada reação de digestão foram aplicados em géis de agarose (LGC Biotecnologia) a 1% contendo brometo de etídio. Cada corrida foi realizada em tampão TAE 1x utilizando-se a fonte PowerPac 3000 (BioRad). Os fragmentos de interesse foram purificados em gel com o kit Purelink Quick Gel Extraction (Invitrogen).

A correta inserção dos fragmentos nos plasmídeos foi verificada por PCR de colônia de bactéria, segundo protocolo já citado (item 4.4). Os *primers* utilizados na construção e verificação dos plasmídeos estão listados na Tabela 6.

Tabela 6. Sequência dos *primers* utilizados na construção e verificação dos plasmídeos.

Nome	Sequência (5' – 3')
pUC/M13-F	GTTTTCCCAGTCACGAC
pUC/M13-R	CAGGAAACAGCTATGAC
Re-URA3-F	AGAACGAAGGAAGGAGCACA
P-ADH1-F	GACTACACCAATTACTGC

P-ADH1-R	ATGAGATAGTTGATTGTATGC
Conf-sGPD1-F	GACACGCACGTGATGACC
Super_GPD1_Amp-R	GCAACCAAATTGTCGGGTAG
GPD1-R	ATTGGTGAAGGTGTGGCACT

Para confirmar que os plasmídeos foram construídos corretamente, os mesmos foram sequenciados em Sequenciador 3500 genetic Analyzer (Applied Biosystems).

4.20 Fermentação em meio líquido YNB

Após a obtenção dos mutantes, foram realizados testes fermentativos para a quantificação da produção de glicerol.

O teste fermentativo foi realizado em triplicata, em frascos *Erlenmeyers* de 250 mL contendo 45 mL de meio YNB completo com 2,5% de glucose. As linhagens foram retiradas do freezer -80 °C e crescidas em meio sólido adequado por 1 dia. O pré-inóculo foi realizado inoculando as células previamente crescidas em meio sólido em Erlenmeyers de 125 mL contendo 30 mL de meio YNB , exceto pelos mutantes para o gene *TPI1*, que, por serem incapazes de crescer utilizando glucose como única fonte de carbono, foram crescidos no meio YEPE. O pré-inóculo foi incubado a 30 °C e 190 rpm em incubadora Multitron 3 deck (Infors) por cerca de 40 horas. O inóculo foi realizado diluindo-se a cultura do pré-inóculo para uma OD inicial de aproximadamente 0,25. As culturas foram incubadas a 190 rpm e 30°C em incubadora Multitron 3 deck (Infors) por 21 horas. Foram retiradas amostras em diversos tempos de crescimento, até que a fase estacionária fosse atingida. O acompanhamento do crescimento foi feito através da densidade óptica das células, medida em espectrofotômetro ULTROSPEC 2000 (Pharmacia Biotech) em comprimento de onda 600nm. As amostras foram guardadas em freezer -20 °C para posterior análise em HPLC.

4.21 Fermentação em meio líquido YEPD

O teste fermentativo também foi realizado utilizando o meio YEPD. O teste fermentativo foi realizado em triplicata, em Erlenmeyers de 125 mL contendo 40 mL de meio YEPD completo com 2,5% de glucose. As linhagens foram retiradas do freezer -80 °C e crescidas em meio sólido adequado por 1 dia. O pré-inóculo foi realizado inoculando as células em Erlenmeyers de 250 mL contendo 75 mL de meio YEPD, exceto pelos mutantes para o gene *TPI1*, que, por serem incapazes de crescer utilizando glucose como única fonte de carbono, foram crescidos no meio YEPE. O pré-inóculo foi incubado a 30 °C e 190 rpm em incubadora Multitron 3 deck (Infors) por cerca de 36 horas. Para realização do inóculo centrifugou-se a quantidade necessária de células do pré-inóculo. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em 5 mL de meio YEPD e inoculadas para que a OD inicial nos Erlenmeyers de 125 mL fosse de aproximadamente 1,5. As culturas foram

incubadas a 190 rpm e 30°C em incubadora Multitron 3 deck (Infors) por 12 horas. Foram retiradas amostras em diversos tempos de crescimento, até que a fase estacionária fosse atingida. O acompanhamento do crescimento foi feito através da densidade óptica das células, medida em espectrofotômetro ULTROSPEC 2000 (Pharmacia Biotech) em comprimento de onda 600nm. As amostras foram guardadas em freezer -20 °C para posterior análise em HPLC.

4.22 Análise dos metabólitos produzidos durante a fermentação

A presença e quantidade do etanol, glucose e glicerol nas fermentações foram verificadas por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). As amostras foram previamente centrifugadas e filtradas (filtro Millipore 0,22µm) e injetadas em cromatógrafo Alliance-HT (Waters) com a coluna Aminex HPX 87H (bioRad) com ácido sulfúrico a 0,4 mM como fase móvel, à temperatura de 35 °C e com fluxo de 0,6 mL/min. A detecção dos compostos foi realizada por detector de Índice de Refração. A quantificação dos compostos foi possível pela comparação com curvas padrão.

4.23 Análise Estatística

Todos os testes foram realizados em triplicata e a média da concentração dos metabólitos e da biomassa obtidos foi considerada como valor de resposta. Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância ANOVA *one- way* para testar diferenças entre o desempenho das linhagens obtidas. Em conjunto com a análise de ANOVA foi realizado o teste Tukey HSD (*Honestly Significant Difference*) para comparação das médias dos rendimentos e assim determinar as diferenças significativas.

5. Resultados

5.1 Construção dos cassetes

5.1.1 Cassetes construídos a partir do pCORE

Os cassetes utilizando o pCORE são constituídos do plasmídeo pCORE, de 3195 pb, flanqueado por 43 pb de homologia com o genoma, tanto na região 5' como na região 3',. Dessa maneira, o tamanho dos cassetes é de 3284 pb. A representação esquemática de um cassette pCORE genérico é mostrada na Figura 5.



Figura 5. Representação esquemática de um cassette genérico utilizando pCORE.

O cassette para a deleção do gene *ADH1*, *ADH1pCORE*, foi construído através da amplificação do plasmídeo pCORE com os *primers* pCORE-d*ADH1*-F e pCORE-d*ADH1*-R. O IRO-*ADH1*, para a retirada do cassette *ADH1pCORE* foi construído utilizando os *primers* *ADH1*-IRO-F e *ADH1*-IRO-R.

O cassette para a deleção do gene *TPI1*, *TPI1pCORE*, e o IRO-*TPI1* foram construídos utilizando os respectivos *primers* (pCORE-d*TPI1*-F e pCORE-d*TPI1*-R; *TPI1*-IRO-F e *TPI1*-IRO-R).

Ambos os cassetes de deleção foram construídos e resultaram em bandas específicas, com tamanho de 3284 pb. Os cassetes podem ser visualizados na Figura 6 (A). A construção dos IROs também resultou em bandas específicas de 140 pb. Os IROs podem ser visualizados na Figura 6 (B).

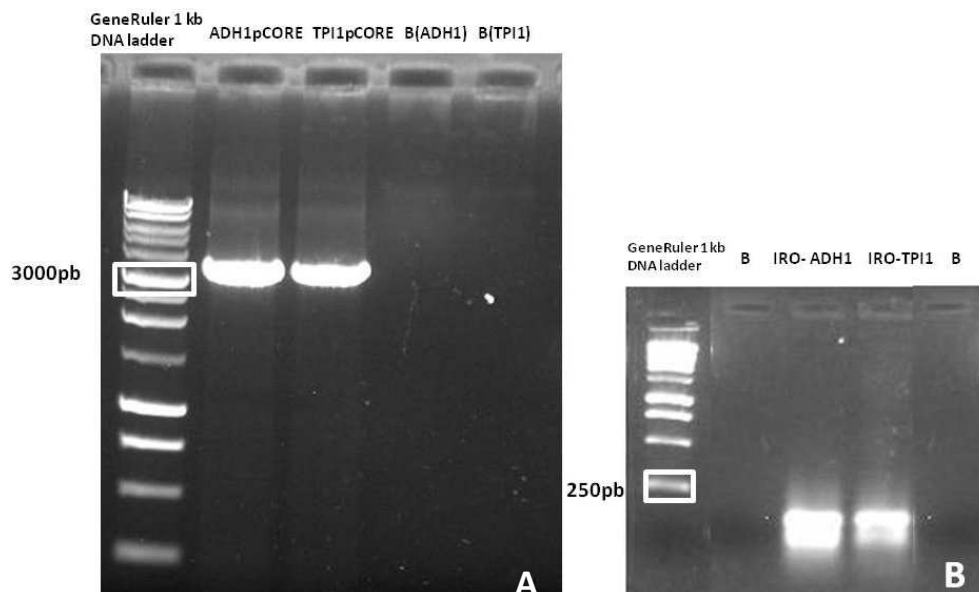


Figura 6. Cassetes de deleção construídos a partir do pCORE e IROs. **A.** Cassetes de deleção ADH1pCORE (3284 pb) e TPI1pCORE (3284 pb), respectivamente, com marcador de massa molecular GeneRuler 1 kb DNA ladder (Fermentas). **B.** IRO-ADH1 (140 pb) e IRO-TPI1 (140 pb) com marcador de massa molecular GeneRuler 1 kb DNA ladder (Fermentas).

5.1.2 Cassetes com regiões longas de homologia

O cassete ADH1-HYG, para deleção do gene *ADH1*, foi construído utilizando como marcador dominante o gene de resistência à higromicina (*hph*) regulado pelo promotor do gene *tef* (protein elongation factor, de *S. cerevisiae*) e seu terminador, num total de 1629 pb. Além disso, o cassete possui 288 pb de homologia com a região *upstream* do gene *ADH1* e 273 pb de homologia com a região *downstream* do gene. A representação esquemática do cassete ADH1-HYG, que possui 2190 pb, pode ser visualizado na Figura 7.



Figura 7. Representação esquemática do cassete de deleção ADH1-HYG.

O cassete ADH-HYG foi construído em três *rounds*, seguindo a técnica do Double-joint PCR (Yu et al. 2004). Um esquema ilustrativo dos passos é mostrado na Figura 8.

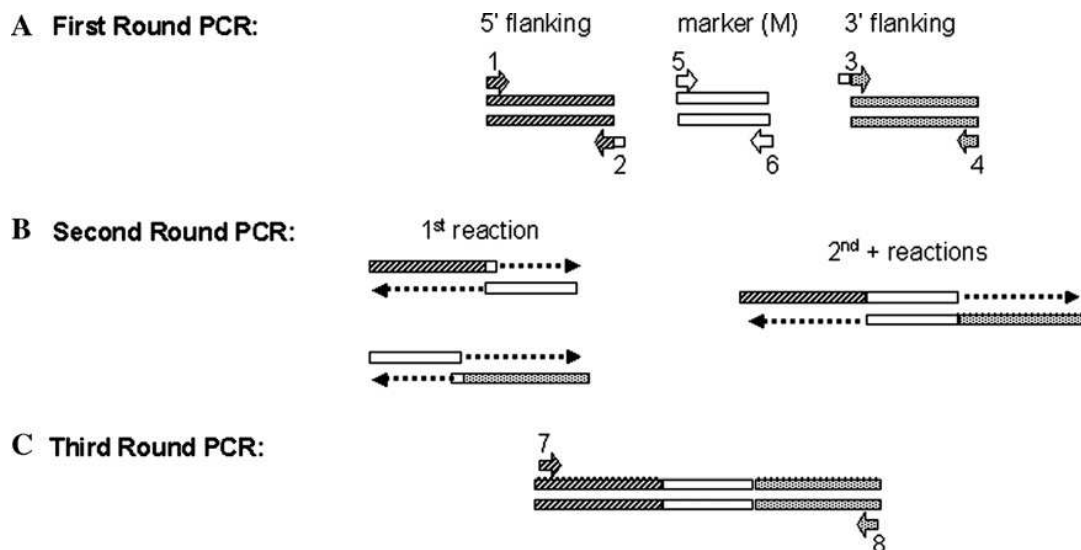


Figura 8. Esquema ilustrativo dos passos para construção do cassete por Double-joint PCR.
 * Extraído de Yu et al. 2004.

No primeiro *round* foram amplificados, separadamente, o gene de resistência à higromicina e as regiões de homologia *upstream* e *downstream*. O gene de resistência à higromicina, com o promotor *tef* e o terminador *tef*, foi amplificado do plasmídeo pAG32 com os *primers* HygSC-F e HygSC-R. A região *upstream* ao gene ADH1 foi amplificada com os *primers* 5_ADH1-F e 5_ADH1-R-HYG e a região *downstream* com os *primers* 3_ADH1-F-HYG e 3_ADH1-R. Os dois últimos fragmentos possuem bordas homólogas ao fragmento amplificado do gene de resistência à higromicina. Todos os fragmentos amplificados no primeiro *round* podem ser visualizados na Figura 9 A. O segundo *round* consiste na PCR com os três fragmentos de DNA amplificados no primeiro round, sem a presença de *primers*. No terceiro *round*, esse fragmento de DNA gerado no segundo *round* foi amplificado com os *primers* 5_ADH1-Nest-F e 3_ADH1-Nest-R, dando origem ao cassete ADH1-HYG. Entretanto, como mostrado na Figura 9 B, o último *round* gerou uma amplificação inespecífica, resultando em três bandas. O tamanho esperado da banda, que é de 2190 pb, foi isolada do gel de agarose, purificada e pode ser visualizado na Figura 9 C.

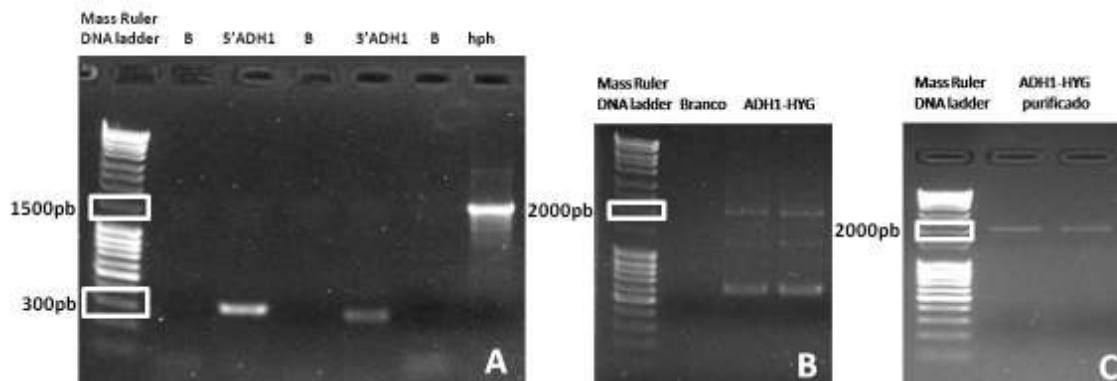


Figura 9. Construção do cassete de deleção ADH1-HYG. **A.** Marcador de massa molecular Mass Ruler DNA ladder Mix (Fermentas), região 5' do gene *ADH1* (320 pb), região 3' do gene *ADH1* (311 pb) e gene de

resistência a higromicina, *hph*, (1629 pb). **B.** Marcador de massa molecular Mass Ruler DNA ladder Mix (Fermentas) e 3° *round* de amplificação do cassete ADH1-HYG, inespecífico. **C.** Marcador de massa molecular Mass Ruler DNA ladder Mix (Fermentas) e cassete de deleção ADH1-HYG purificado.

O cassete TPI1-KAN, para deleção do gene *TPI1*, foi construído utilizando como marcador dominante o gene de resistência à geneticina, KanMX4, regulado pelo promotor do gene *tef* (*translation elongation factor*, de *S. cerevisiae*) e seu terminador, num total de 1705 pb. Além disso, o cassete possui 190 pb de homologia com a região *upstream* do gene TPI1 e 199 pb de homologia com a região *downstream* do gene. A representação esquemática do cassete TPI1-KAN, que possui 2094 pb, pode ser visualizado na Figura 10.



Figura 10. Representação esquemática do cassete de deleção TPI1-KAN.

O cassete de deleção do gene *TPI1* (TPI1-KAN) foi construído da mesma maneira que o cassete ADH1-HYG. O gene de resistência à geneticina, com o promotor e terminador *tef*, foi amplificado do plasmídeo pFA6aKanMX4 com os *primers* Kan-F e Kan-R. A região *upstream* ao gene TPI1 foi amplificada com os *primers* 5_TPI1-F e 5_TPI1-R-KAN e a região *downstream* com os *primers* 3_TPI1-F-KAN e 3_TPI1-R. Ambos os fragmentos possuem bordas homólogas ao fragmento amplificado da resistência à geneticina. A amplificação dos três fragmentos pode ser visualizada na Figura 11 (A e B). Foi realizada então uma PCR com os três fragmentos de DNA amplificados (segundo *round*). Posteriormente, esse fragmento de DNA foi amplificado com os *primers* 5_TPI1-Nest-F e 3_TPI1-Nest-R, dando origem ao cassete TPI1-KAN (terceiro *round*). Essa amplificação final resultou em um fragmento de 2094 pb apresentado na Figura 11 C.

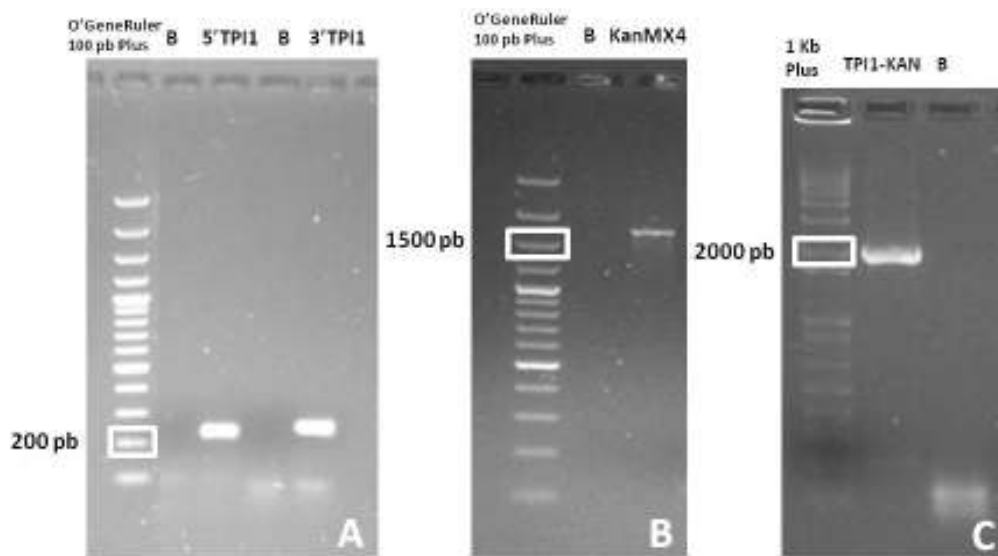


Figura 11. Construção do cassete de deleção TPI1-KAN. **A.** Marcador de massa molecular O'GeneRuler 100 pb Plus DNA Ladder (Fermentas), região 5' do gene *TPI1* (221 pb) e região 3' do gene *TPI1* (234 pb). **B.**

Marcador de massa molecular O'GeneRuler 100 pb Plus DNA Ladder (Fermentas) e gene de resistência a higromicina, KanMX4, (1705 pb). **C.** Marcador de massa molecular 1 Kb Plus (Invitrogen) e cassete de deleção TPI-KAN.

Para confirmação de que os cassetes haviam sido construídos corretamente foram realizadas reações de restrição para cada um deles. O cassete ADH1pCORE foi digerido com as enzimas *XhoI* e *HindIII* gerando fragmentos de 483 pb, 1399 pb e 1402 pb. Para a digestão do cassete ADH1-HYG foram utilizadas as enzimas *BglII* e *EcoRI* que geraram fragmentos de 294 pb, 635 pb e 1261 pb. As duas restrições podem ser visualizadas na Figura 12 A.

O cassete TPI1-KAN foi digerido com as enzimas *EcoRV* e *HindIII* gerando fragmentos de 41 pb, 100 pb, 161 pb, 278 pb, 531 pb e 983 pb. Para a digestão do cassete TPI1pCORE foram utilizadas as enzimas *SphI* e *XhoI* que geraram fragmentos de 124 pb, 193 pb, 1576 pb e 1838 pb. As duas restrições podem ser visualizadas na Figura 12 B.

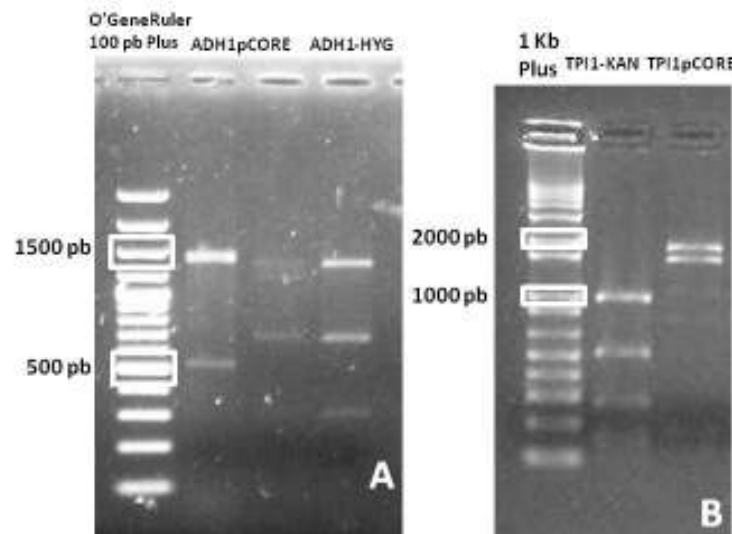


Figura 12. Confirmação dos cassetes ADH1pCORE, TPI1pCORE, ADH1-HYG e TPI1-KAN por restrição. **A.** Marcador de massa molecular O'GeneRuler 100 pb Plus DNA Ladder (Fermentas), restrição do cassete ADH1pCORE e restrição do cassete ADH1-HYG. **B.** Marcador de massa molecular 1 Kb Plus (Invitrogen), restrição do cassete TPI1-KAN e restrição do cassete TPI1pCORE.

5.2 Construção dos plasmídeos

Os plasmídeos YEpADH1 e YEpGPD1 foram construídos tendo como base o plasmídeo YEp 352, de 5181 pb. Os genes desejados, *ADH1* e *GPD1*, foram clonados no sítio de policlonagem desse plasmídeo. Um desenho esquemático do plasmídeo YEp 352, com a localização da região de hibridização dos *primers* pUC/M13-F, pUC/M13-R e Re-URA3-F é apresentado na Figura 13.

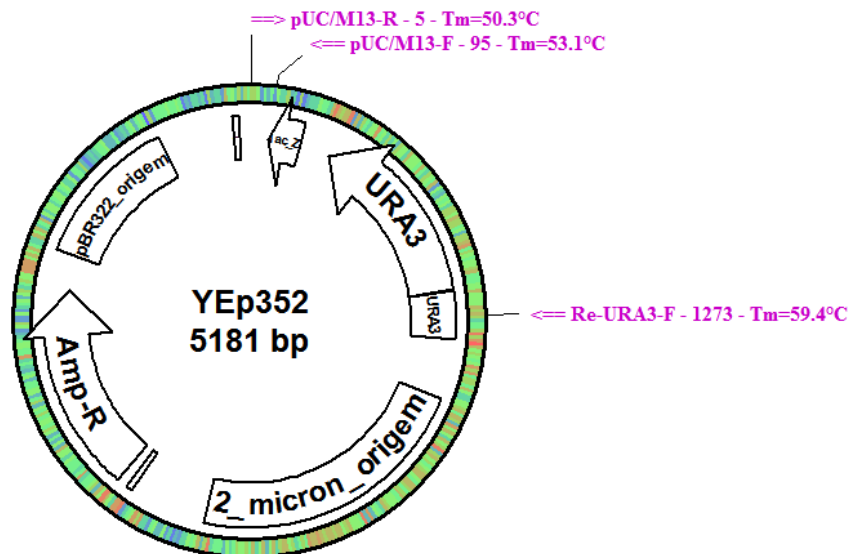


Figura 13. Desenho esquemático do plasmídeo YEp 352 com a localização da região de pareamento dos primers pUC/M13-F, pUC/M13-R e Re-URA3-F.

5.2.1 YEpADH1 – Complementação do gene ADH1

Para a construção do plasmídeo YEpADH1, a primeira estratégia visava à ligação do gene *ADH1* diretamente no plasmídeo YEp352, gerando o plasmídeo YEpADH1. Para tanto, o gene *ADH1* foi amplificado da linhagem industrial haplóide FGY031 com os primers Conf-dADH1_core-F e Conf-dADH1_core-R, resultando em um fragmento de 2208 pb, que pode ser visualizado na Figura 14.

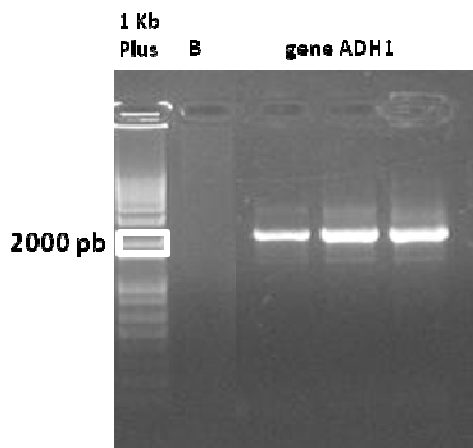


Figura 14. Amplificação do gene *ADH1* com região promotora para clonagem no YEp352. Marcador de massa molecular 1 Kb Plus (Invitrogen) e amplificação do gene *ADH1* (2208 pb).

Após a amplificação o gene foi digerido com as enzimas *SphI* e *DraI*, gerando fragmentos de 19 pb, 103 pb, 169 pb, 391 pb e 1526 pb. Um desenho esquemático da restrição é mostrado na Figura 15. O fragmento de 1526 pb, correspondente ao gene *ADH1*, foi isolado do gel e possuía uma ponta coesiva, gerada pela enzima *SphI*, e uma ponta *blunt*, gerada pela enzima *DraI*. Da mesma forma o plasmídeo YEp 352 foi digerido com as enzimas *SphI*, coesiva, e *SmaI*, cega, gerando

fragmentos de 31 pb e 5150 pb. O fragmento de 5150 pb, correspondente ao plasmídeo, foi purificado. Um desenho esquemático da restrição é mostrado na Figura 16. As restrições podem ser visualizadas na Figura 17.

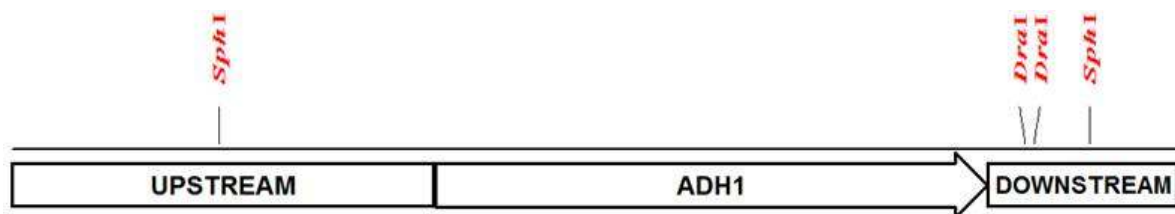


Figura 15. Desenho esquemático da restrição do gene *ADH1* com as enzimas *SphI* e *DraI*.

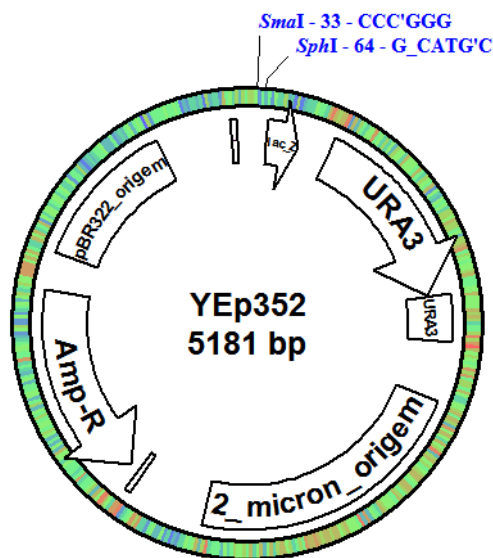


Figura 16. Desenho esquemático da restrição do plasmídeo YEp 352 com as enzimas *SmaI* e *SphI*.

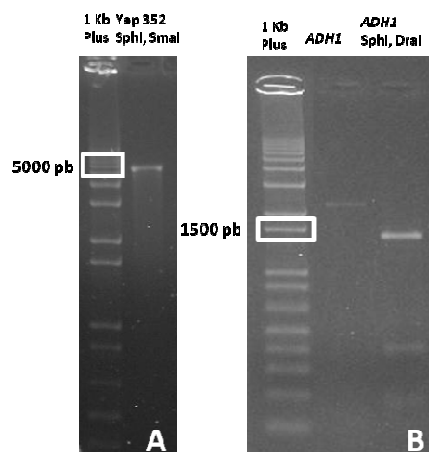


Figura 17. Restrições do plasmídeo YEp352 e do gene *ADH1* para clonagem. **A.** Marcador de massa molecular 1 Kb Plus (Invitrogen) e restrição do plasmídeo YEp 352. **B.** Marcador de massa molecular 1 Kb Plus (Invitrogen), amplificação do gene *ADH1* e restrição do gene *ADH1*.

Após a obtenção dos fragmentos esperados por restrição, os mesmos foram quantificados e ligados. A ligação foi dialisada e transformada em *E. coli*. Após o aparecimento de colônias foram realizados PCRs de colônia com diversos *primers* e análises de restrição dos plasmídeos obtidos. Entretanto nenhum apresentava a clonagem correta. Todo o procedimento de clonagem foi repetido mais 2 vezes, sem êxito. Em vista da dificuldade encontrada para realizar essa clonagem, uma nova estratégia foi abordada, que consistiu em clonar o fragmento do gene *ADH1* primeiramente no plasmídeo comercial pGEM T-Easy. Esta estratégia tem por objetivo propiciar novos sítios de restrição ao gene *ADH1* para que a clonagem no plasmídeo YEp 352 possa ser realizada com duas enzimas coesivas. Dessa maneira, o gene *ADH1* foi novamente amplificado da linhagem industrial haplóide FGY031, mas com os *primers* Conf-dADH1_core-F e 3_ADH1-Nest-R, resultando em um fragmento de 2024 pb. Essa mudança do *primer* reverse na amplificação tem como objetivo eliminar o sítio de clivagem da enzima *SphI* na região *downstream* do gene *ADH1*, como mostrado na Figura 15. A retirada desse sítio é importante para que o gene possa ser retirado do pGEM T-Easy com enzimas compatíveis com o plasmídeo YEp 352. Após a amplificação, que pode ser visualizada na Figura 18, foi adicionada uma adenina para que pudesse ser realizada a clonagem no vetor pGEM T-Easy. A reação de ligação foi dialisada e transformada em *E. coli*.

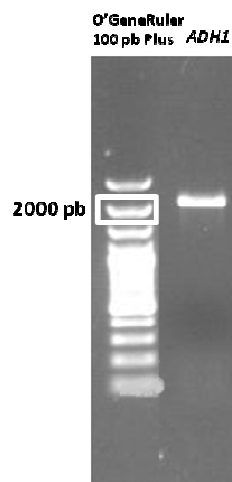


Figura 18. Amplificação do gene *ADH1* para ligação em pGEM T-Easy. Marcador de massa molecular O'GeneRuler 100 pb Plus DNA Ladder (Fermentas) e amplificação do gene *ADH1* (2024 pb).

Após o aparecimento de colônias brancas e azuis, foi feito PCR de colônia de algumas colônias brancas com os *primers* P-ADH1-F e P-ADH1-R. Esses *primers* hibridizam na região promotora do gene *ADH1*, portanto, apenas ocorreria a amplificação de um fragmento de 545 pb se o gene *ADH1* tivesse sido clonado no vetor pGEM T-Easy. Como pode ser visualizado na Figura 19, várias colônias apresentaram o padrão relativo à clonagem do gene *ADH1* no vetor pGEM T-Easy. Como o gene *ADH1* foi amplificado juntamente com o seu promotor o sentido da clonagem no pGEM T-Easy não é relevante.

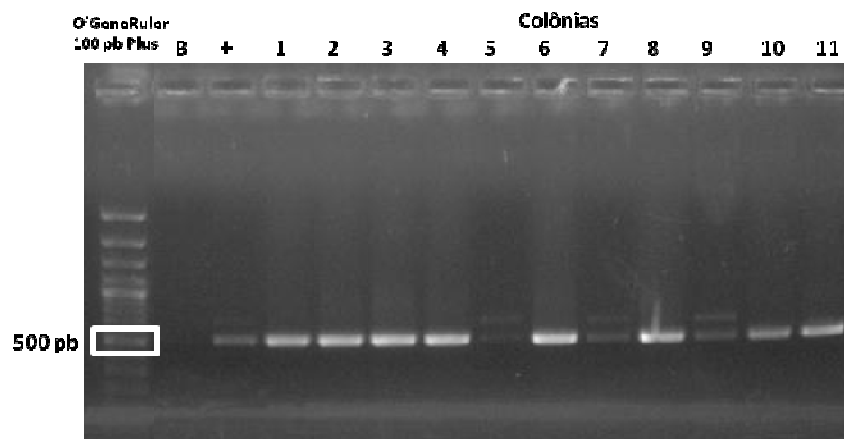


Figura 19. PCR confirmando a clonagem do gene *ADH1* no pGEM T-Easy. Marcador de massa molecular O'GeneRuler 100 pb Plus DNA Ladder (Fermentas), controle negativo, sem DNA, (B), amplificação do gene *ADH1*, 545 pb, (+) e amplificação das colônias obtidas após transformação com a ligação pGEM-*ADH1*.

Após confirmação, por análise de restrição, de que a clonagem ocorreu corretamente o plasmídeo pGEM-*ADH1* foi digerido com as enzimas *SphI* e *SacI*, gerando fragmentos de 425 pb, 1682 pb e de 2932 pb. Um desenho esquemático dessa restrição é mostrado na Figura 20. O fragmento de 1682 pb, correspondente ao gene *ADH1*, foi isolado do gel e possuía duas pontas coesivas: uma gerada pela enzima *SphI* e outra pela enzima *SacI*. Da mesma forma o plasmídeo YEp 352 foi digerido com as enzimas *SphI* e *SacI* gerando fragmentos de 39 pb e 5142 pb. Essa restrição foi realizada duas vezes para garantir que o plasmídeo foi realmente digerido, uma vez que não é possível visualizar o fragmento de 39 pb em gel de agarose 1%. Um desenho esquemático da restrição é mostrado na Figura 21. As restrições podem ser visualizadas na Figura 22.

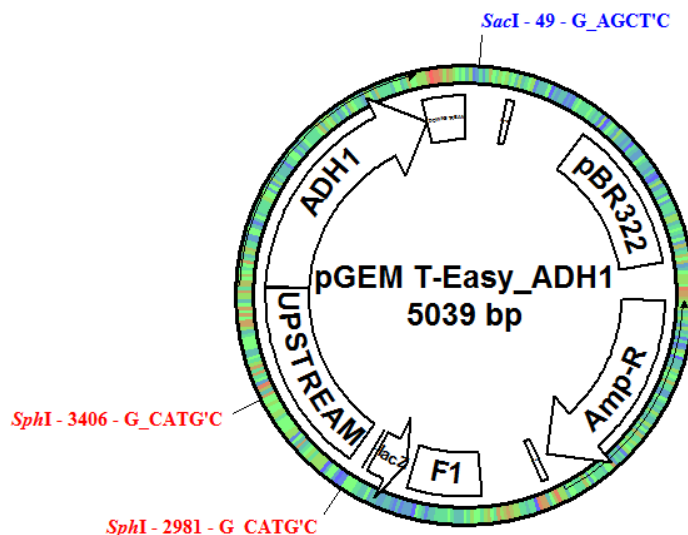


Figura 20. Desenho esquemático do plasmídeo pGEM-*ADH1* com os sítios de restrição utilizados.

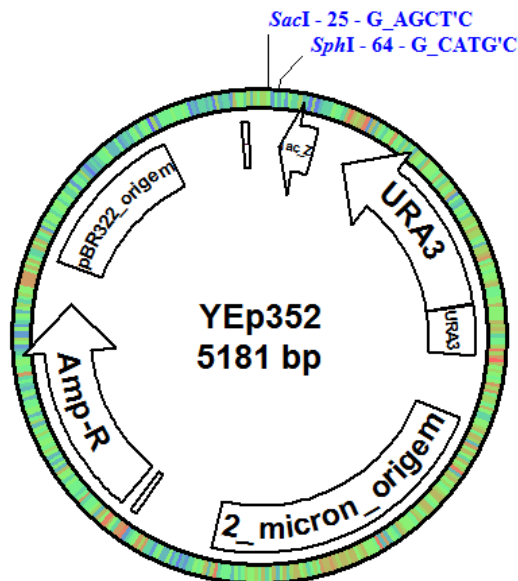


Figura 21. Desenho esquemático do plasmídeo YEp 352 com os sítios de restrição utilizados.

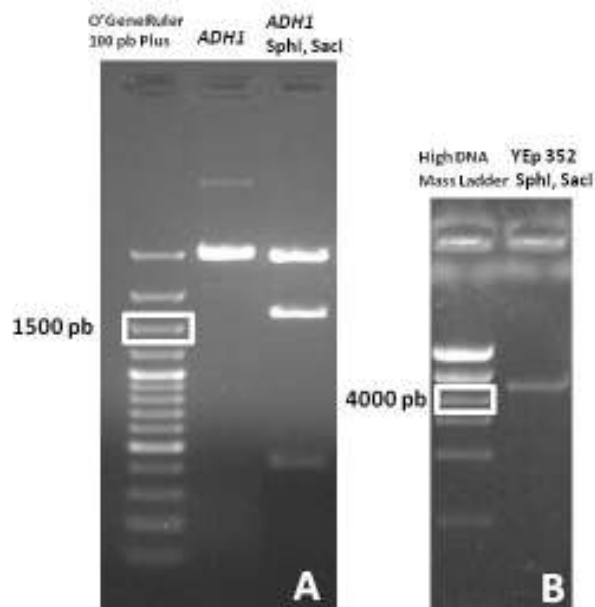


Figura 22. Restrição dos plasmídeos pGEM-ADH1 e YEp352 para clonagem. **A.** Marcador de massa molecular O'GeneRuler 100 pb Plus DNA Ladder (Fermentas), plasmídeo pGEM-ADH1 e restrição do pGEM-ADH1 com SphI e SacI. **B.** Marcador de massa molecular High DNA Mass Ladder (Invitrogen) e restrição do plasmídeo YEp 352 com SphI e SacI.

Os fragmentos purificados obtidos pela digestão, gene *ADH1* (1682 pb) e plasmídeo YEp 352 (5142 pb), foram quantificados e foi realizada uma reação de ligação. A ligação foi dialisada e transformada em *E. coli*. Após o aparecimento de colônias brancas, foi feito PCR de colônia com os *primers* 5_*ADH1*-F e P-*ADH1*-R. Esses *primers* hibridizam na região promotora do gene *ADH1*, portanto, apenas ocorreria a amplificação de um fragmento de 360 pb se o gene *ADH1* tivesse sido clonado no plasmídeo YEp 352. Como pode ser visualizado na Figura 23, várias colônias apresentaram o padrão relativo à clonagem do gene *ADH1* no plasmídeo YEp 352.

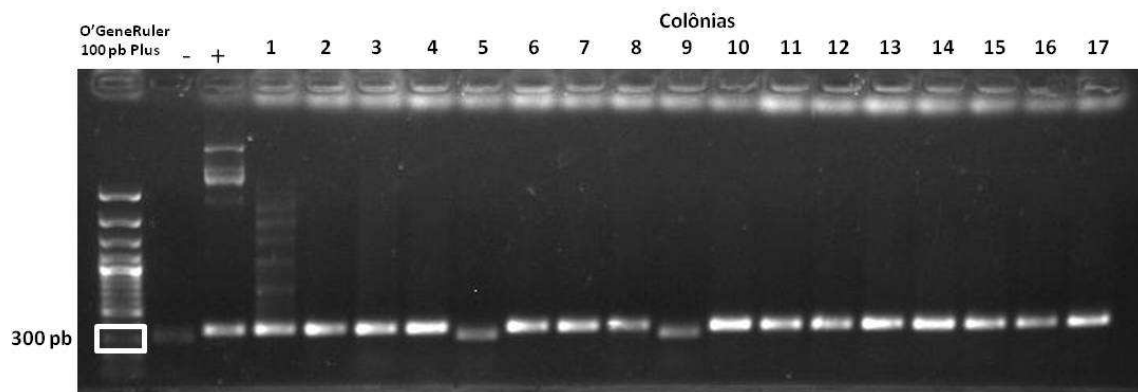


Figura 23. PCR de colônia confirmando a clonagem do gene *ADH1* no plasmídeo YEp352. Marcador de massa molecular O'GeneRuler 100 pb Plus DNA Ladder (Fermentas), amplificação do plasmídeo YEp 352 vazio (-), amplificação do gene *ADH1*, 360 pb, (+) e amplificação das colônias obtidas após transformação com a ligação YEpADH1. Apenas as colônias 5 e 9 não apresentam o tamanho esperado.

Foi feita miniprep de algumas colônias e verificação da clonagem por PCR e restrição. Na Figura 24 A é apresentado o resultado da amplificação utilizando os *primers* pUC/M13-F e pUC/M13-R. Esses *primers*, como mostrado na Figura 13, hibridizam na região externa ao sítio de policlonagem do plasmídeo YEp 352. Dessa forma, a amplificação com esses *primers* gera um fragmento de 123 pb em um plasmídeo vazio e um fragmento de 1805 pb com o gene *ADH1* clonado. Os plasmídeos 2 e 8 apresentaram a banda de 1805 pb, indicando a clonagem do gene *ADH1*.

A Figura 24 B mostra a amplificação utilizando os *primers* Re-URA3-F e pUC/M13-R. O *primer* Re-URA3-F hibridiza na região *upstream* do gene *URA3* presente no plasmídeo YEp 352 (Figura 21). Dessa forma, a amplificação com esses *primers* gera um fragmento de 1304 pb em um plasmídeo vazio e um fragmento de 2986 pb com o gene *ADH1* clonado. Os plasmídeos 2 e 8 apresentaram a banda de 2886 pb, indicando a clonagem do gene *ADH1*.

Foram feitas duas restrições diferentes para confirmação do plasmídeo YEpADH1 que podem ser visualizadas na Figura 24 C. A restrição com as enzimas *KpnI* e *PvuI* gerou fragmentos de 1333 pb, 2100 pb e 3391 pb, como esperado. A restrição com as enzimas *SphI* e *SacI* gerou dois fragmentos de 5142 pb e 1682 pb, também de acordo com o esperado.

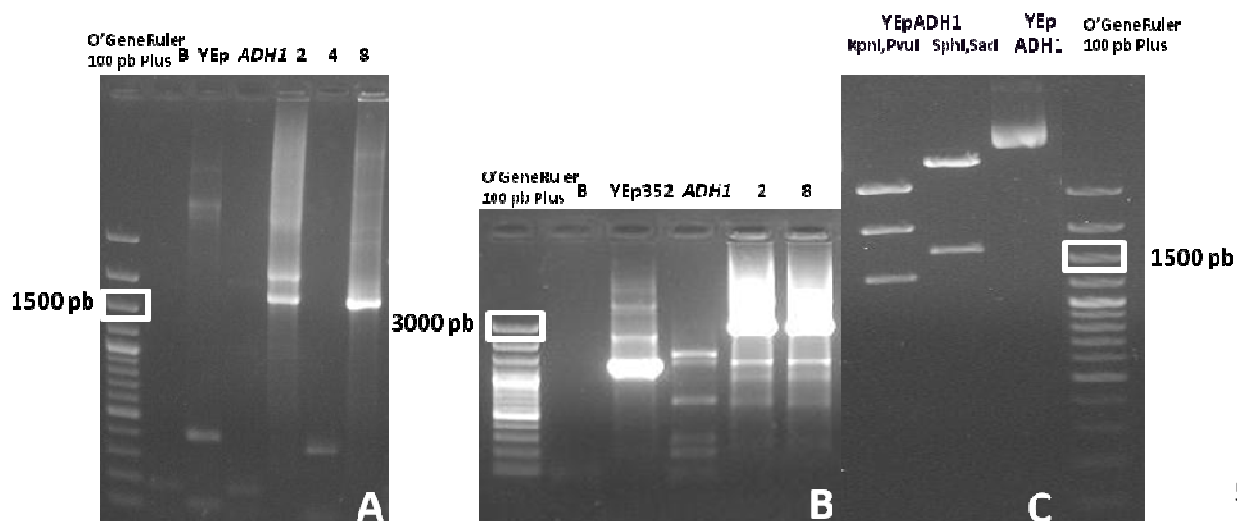


Figura 24. Confirmação da construção do plasmídeo YEpADH1 por PCR e restrição. **A.** Marcador de massa molecular O'GeneRuler 100 pb Plus DNA Ladder (Fermentas), reação sem DNA, amplificação do plasmídeo YEp 352 vazio (123 pb), amplificação do gene ADH1 e amplificação das colônias 2, 4 e 8. Apenas as colônias 2 e 8 apresentaram o tamanho esperado (1805 pb). **B.** Marcador de massa molecular O'GeneRuler 100 pb Plus DNA Ladder (Fermentas), reação sem DNA, amplificação do plasmídeo YEp 352 vazio (1304 pb), amplificação do gene ADH1 e amplificação das colônias 2 e 8. Ambas apresentaram o tamanho esperado (2986 pb). **C.** Restrição do plasmídeo YEpADH1 com as enzimas KpnI e PvuI, restrição do plasmídeo YEpADH1 com as enzimas SphI e SacI, plasmídeo YEpADH1 e marcador de massa molecular O'GeneRuler 100 pb Plus DNA Ladder (Fermentas).

Após as análises de restrição foi possível comprovar o sentido da clonagem do gene *ADH1* no plasmídeo YEp 352, que gerou o plasmídeo YEpADH1, de 6824 pb. Um desenho esquemático do plasmídeo YEpADH1 é mostrado na Figura 25.

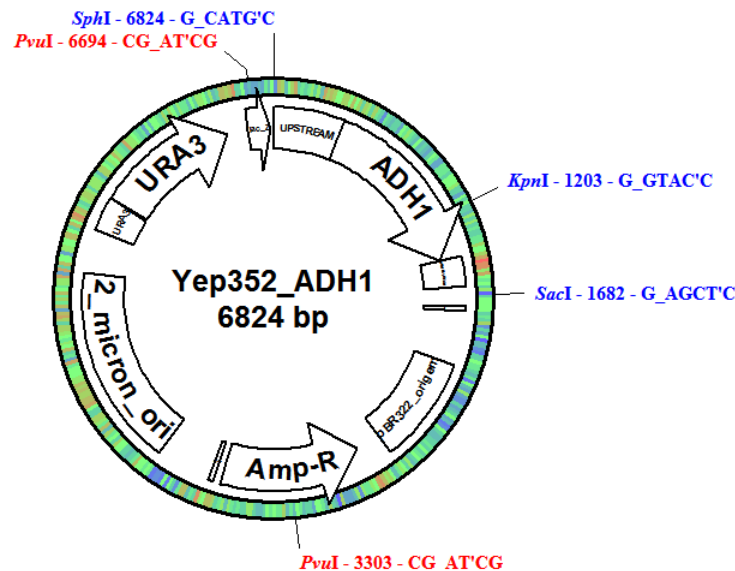


Figura 25. Desenho esquemático do plasmídeo YEpADH1 com sítio de clivagem para as enzimas *SphI*, *SacI*, *PvuI* e *KpnI*.

Além das reações de PCR e restrição, o plasmídeo foi seqüenciado e o seqüenciamento confirmou a inserção do gene *ADH1* no sítio de policlonagem do plasmídeo YEp 352, dando origem ao plasmídeo YEpADH1.

5.2.2 YEpGPD1 – Superexpressão do gene *GPD1*

Após análise dos sítios de clivagem do plasmídeo YEp 352 e da região adjacente ao gene *GPD1* foi verificado que as sequencias não possuíam dois sítios de restrição compatíveis. Sendo assim, não foi possível fazer a clonagem do gene *GPD1* diretamente no sítio de policlonagem do plasmídeo YEp 352. Adotou-se então a estratégia de clonar o fragmento do gene *GPD1* primeiramente no plasmídeo comercial pGEM T-Easy, disponibilizando novos sítios de restrição que possibilitassem a clonagem no YEp 352. Para tanto, o gene *GPD1* foi amplificado da linhagem

industrial haplóide FGY031 com os *primers* Conf-sGPD1-F e GPD1-R, resultando em um fragmento de 2378 pb. Após a amplificação, que pode ser visualizada na Figura 26, foi adicionada uma adenina para que pudesse ser realizada a clonagem no vetor pGEM T-Easy. A reação de ligação foi dialisada e transformada em *E. coli*.

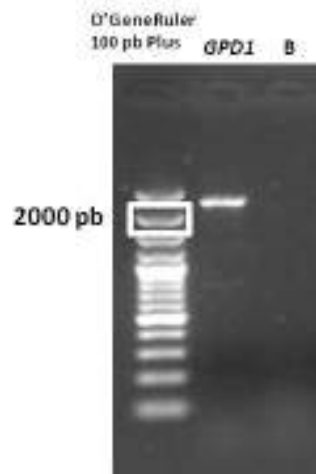


Figura 26. Amplificação do gene *GPD1* com região promotora para clonagem em pGEM T-Easy. Marcador de massa molecular O'GeneRuler 100 pb Plus DNA Ladder (Fermentas), amplificação do gene *GPD1* (2378 pb) e amplificação sem DNA.

Após o aparecimento de colônias brancas e azuis, foi feito PCR de colônia de algumas colônias brancas com os *primers* Conf-sGPD1-F e Super_GPD1_Amp-R. O *primer* Conf-sGPD1-F hibridiza na região *upstream* ao gene *GPD1*, enquanto o Super_GPD1_Amp-R hibridiza dentro do gene, portanto, apenas ocorreria a amplificação de um fragmento de 1143 pb se o gene *GPD1* tivesse sido clonado no vetor pGEM T-Easy. Como pode ser visualizado na Figura 27 várias colônias apresentaram o padrão relativo à clonagem do gene *GPD1* no vetor pGEM T-Easy. Como o gene *GPD1* foi amplificado juntamente com o seu promotor o sentido da clonagem no pGEM T-Easy não é relevante.

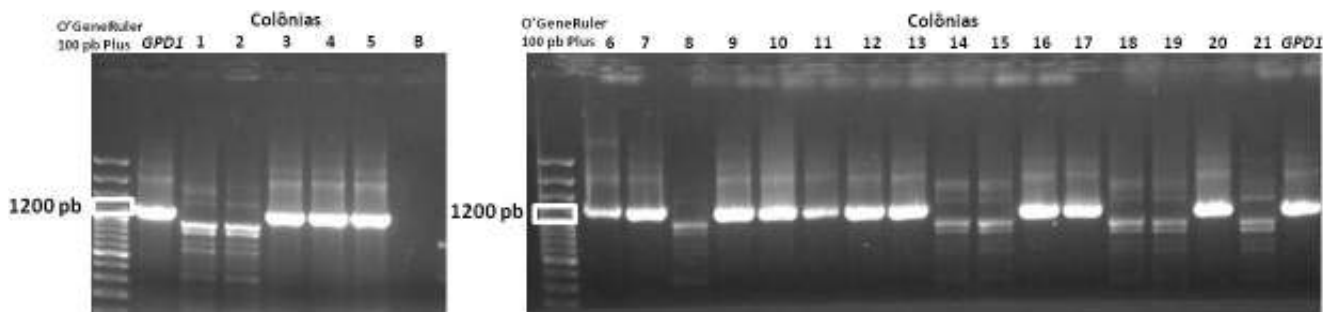


Figura 27. PCRs para confirmação da clonagem do gene *GPD1* no plasmídeo pGEM T-Easy. Marcador de massa molecular O'GeneRuler 100 pb Plus DNA Ladder (Fermentas), gene *GPD1*, 1143 pb, (controle positivo), amplificação das colônias, reação sem DNA (B), marcador de massa molecular O'GeneRuler 100 pb Plus DNA Ladder (Fermentas), amplificação das colônias e gene *GPD1*, 1143 pb, (controle positivo).

Após confirmação, por análise de restrição, de que a clonagem ocorreu corretamente o plasmídeo pGEM-GPD1 foi digerido com as enzimas SphI e SacI, gerando fragmentos de 2461 pb e

2932 pb. Um desenho esquemático dessa restrição é mostrado na Figura 28. O fragmento de 2461 pb, correspondente ao gene *GPD1*, foi isolado do gel e possuía duas pontas coesivas: uma gerada pela enzima *SphI* e outra pela enzima *SacI*. Da mesma forma o plasmídeo YEp 352 foi digerido com as enzimas *SphI* e *SacI* gerando fragmentos de 39 pb e 5142 pb. Essa restrição foi realizada duas vezes para garantir que o plasmídeo foi realmente digerido, uma vez que não é possível visualizar o fragmento de 39 pb em gel de agarose 1%. Um desenho esquemático da restrição é mostrado na Figura 21. A restrição do plasmídeo pGEM-GPD1 pode ser visualizada na Figura 29 e a do YEp 352 na Figura 22 B

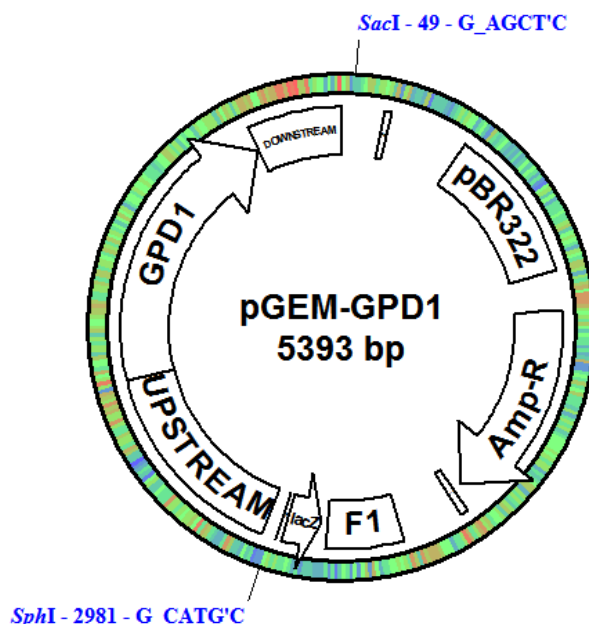


Figura 28. Desenho esquemático do plasmídeo pGEM-GPD1 com os sítios de restrição utilizados.

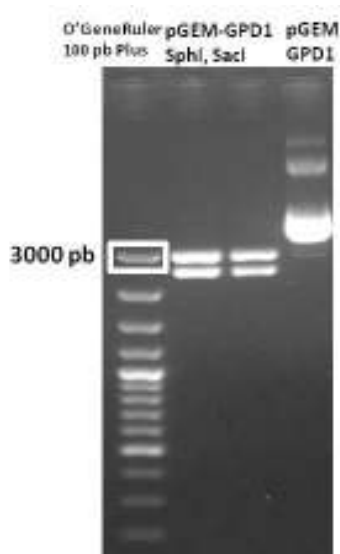


Figura 29. Restrição do plasmídeo pGEM-GPD1 para clonagem no plasmídeo YEp352. Marcador de massa molecular O'GeneRuler 100 pb Plus DNA Ladder (Fermentas), restrição do plasmídeo pGEM-GPD1 com *SphI* e *SacI* e pGEM-GPD1.

Os fragmentos purificados obtidos pela digestão, gene *GPD1* (2461 pb) e plasmídeo YEp 352 (5142 pb), foram quantificados e foi realizada uma reação de ligação. A ligação foi dialisada e transformada em *E. coli*. Após o aparecimento de colônias brancas, foi feito PCR de colônia novamente com os *primers* Conf-sGPD1-F e Super_GPD1_Amp-R que geram um fragmento de 1143 pb. Como pode ser visualizado na Figura 30, todas as colônias apresentaram o padrão relativo à clonagem do gene *GPD1* no plasmídeo YEp 352.

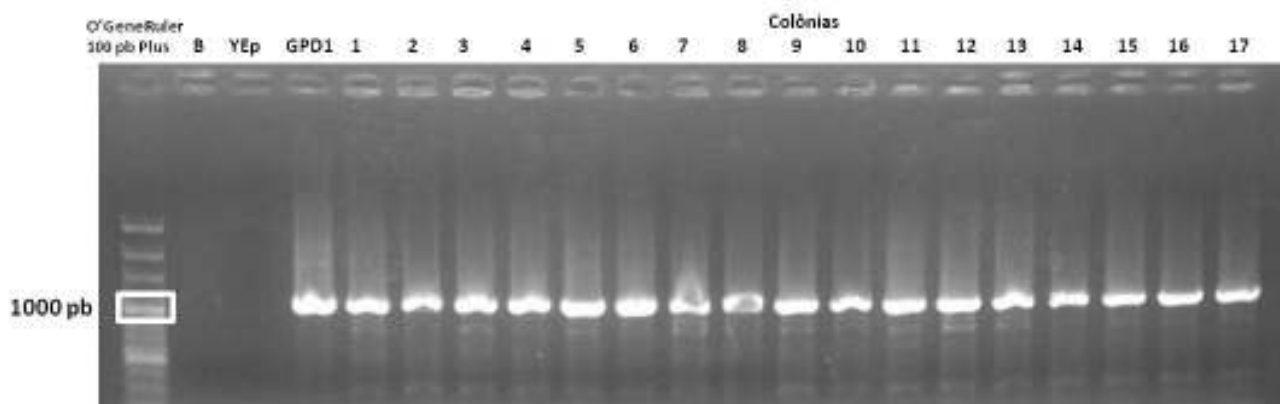


Figura 30. Confirmação da construção do plasmídeo YEpGPD1 por PCR. Marcador de massa molecular O'GeneRuler 100 pb Plus DNA Ladder (Fermentas), reação sem DNA (B), amplificação do plasmídeo YEp 352 vazio, amplificação do gene *GPD1*, 1143 pb, e amplificação das colônias obtidas após transformação com a ligação YEpGPD1.

Foi feita miniprep de algumas colônias e verificação da clonagem por reação de restrição com as enzimas *SphI* e *SacI*. A restrição gerou fragmentos de 5142 pb e 2461 pb, de acordo com o esperado, e pode ser visualizada na Figura 31.

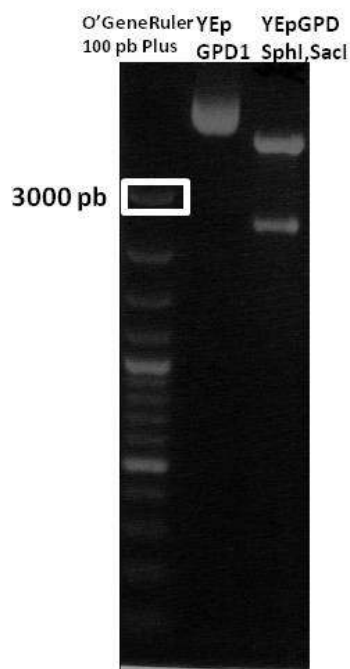


Figura 31. Confirmação da construção do plasmídeo YEpGPD1 por restrição. Marcador de massa molecular O'GeneRuler 100 pb Plus DNA Ladder (Fermentas), plasmídeo YEpGPD1 e restrição do plasmídeo YEpGPD1 com as enzimas *SphI* e *SacI*.

Um desenho esquemático do plasmídeo YEpGPD1, de 7603 pb, é mostrado na Figura 32.

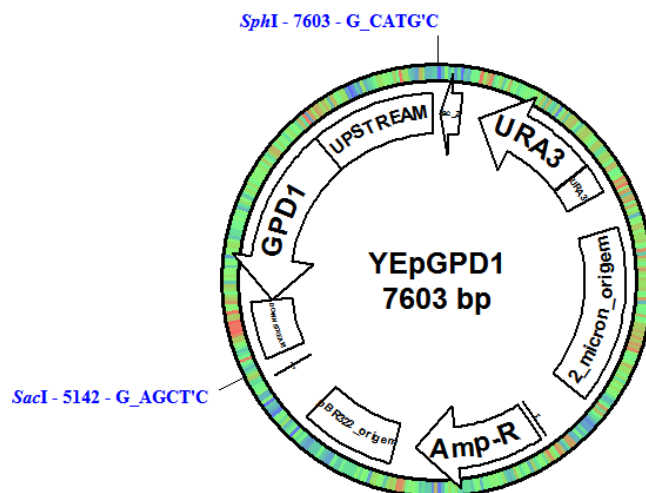


Figura 32. Desenho esquemático do plasmídeo YEpGPD1 com sítio de clivagem para as enzimas *SphI* e *SacI*.

Além das reações de PCR e restrição, o plasmídeo foi seqüenciado e o seqüenciamento confirmou a inserção do gene *GPD1* no sítio de policlonagem do plasmídeo YEp 352, gerando plasmídeo YEpGPD1.

5.3 Deleção do gene *ADH1*

Para a construção da linhagem produtora de glicerol o primeiro passo foi a deleção do gene *ADH1*. Os cassetes *ADH1-HYG* e *ADH1pCORE* foram transformados em linhagens haplóides industriais (FGY031 e FGY042) e laboratoriais (FY23 e FY86) de levedura. Apesar do aparecimento de algumas colônias resistentes, após a verificação da transformação por reações de PCR confirmou-se que não houve integração por recombinação homóloga. O crescimento de colônias no meio com seleção pode ser devido ao fato de algumas leveduras possuírem resistência a essas concentrações de antibiótico. Outra possibilidade é a inserção do cassete em outra região do genoma. As transformações foram repetidas muitas vezes, sem sucesso. Após diversas tentativas foi possível a identificação de transformantes para ambos os cassetes. As transformações ocorreram de maneira homóloga, e sendo assim, houve a deleção do gene *ADH1*. A confirmação da transformação foi feita por PCR utilizando diversos pares de *primers* cuja região de pareamento no gene *ADH1* original pode ser visualizada na Figura 33. A região de pareamento dos *primers* após a deleção do gene *ADH1* com o cassete *ADH1-HYG* ou *ADH1pCORE* pode ser visualizada nas Figuras 34 e 35 respectivamente.



Figura 33. Desenho esquemático do *lôcus* do gene *ADH1* com a região de pareamento dos *primers*.

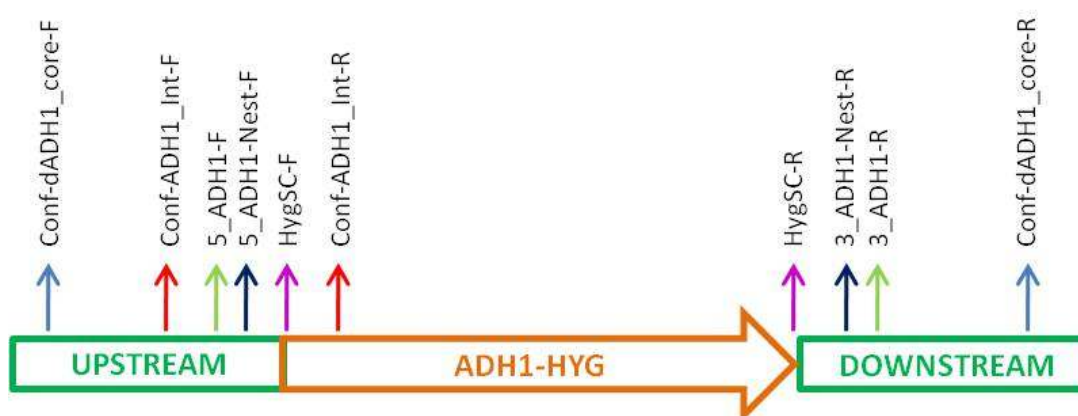


Figura 34. Desenho esquemático do *lôcus* do gene *ADH1* após a deleção do mesmo com o cassete *ADH1-HYG* e a região de pareamento dos *primers*.

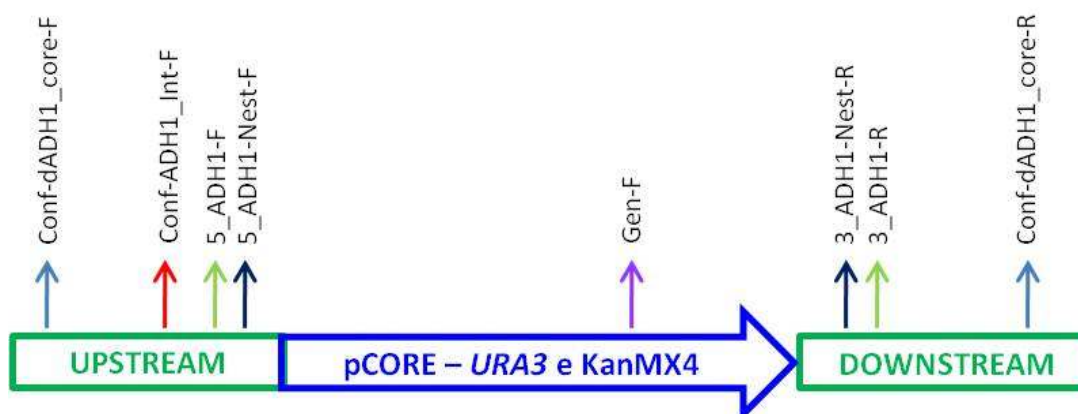


Figura 35. Desenho esquemático do *lôcus* do gene *ADH1* após a deleção do mesmo com o cassete *ADH1pCORE* e a região de pareamento dos *primers*.

A confirmação da deleção do gene *ADH1* com o cassete *ADH1-HYG* nas linhagens de laboratório FY23 e FY86 pode ser visualizada na Figura 36. A Figura 36 A é resultado da amplificação com os *primers* Conf-ADH1_Int-F, que hibridiza na região upstream ao gene *ADH1*, e Conf-ADH1-Int-R, que hibridiza dentro do cassete, gerando fragmentos de 496 pb, apenas nos

transformantes. Na Figura 36 B foram utilizados os *primer* HygSC-F e HygSC-R, que hibridizam dentro do cassete, gerando amplificação de 1629 pb apenas nas linhagens transformadas. Além dessas duas reações também foi feita uma amplificação utilizando os *primers* Conf-dADH1_core-F e Conf-dADH1_core-R, que hibridizam na região *upstream* e *downstream* do gene *ADH1*, respectivamente. Esse PCR, apresentado na Figura 37 amplifica tanto a linhagem selvagem, fragmento de 2208 pb, quanto a linhagem com a inserção do cassete, fragmento de 2812 pb, permitindo uma comprovação mais confiável da transformação.

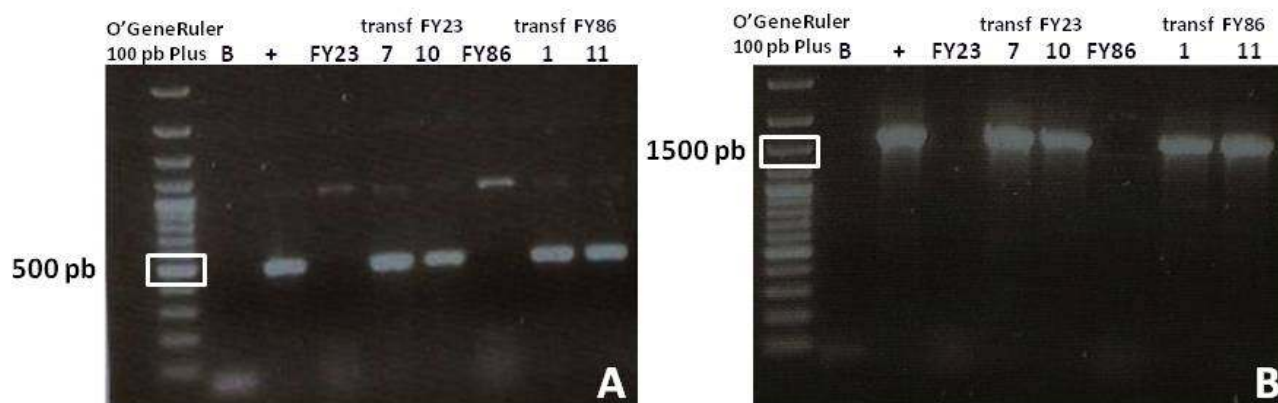


Figura 36. Confirmação da integração do cassete ADH1-HYG nas linhagens FY23 e FY86 por PCR utilizando um *primer* interno ao cassete e um externo (A) e utilizando dois *primers* internos ao cassete (B). **A.** Marcador de massa molecular O'GeneRuler 100 pb Plus DNA Ladder (Fermentas), reação sem DNA (B), controle positivo, 496 pb, (+), FY23 selvagem, possíveis transformantes FY23 (7 e 10), FY86 selvagem e possíveis transformantes FY86 (1 e 11). **B.** Marcador de massa molecular O'GeneRuler 100 pb Plus DNA Ladder (Fermentas), reação sem DNA (B), controle positivo, 1629 pb, (+), FY23 selvagem, possíveis transformantes FY23 (7 e 10), FY86 selvagem e possíveis transformantes FY86 (1 e 11).

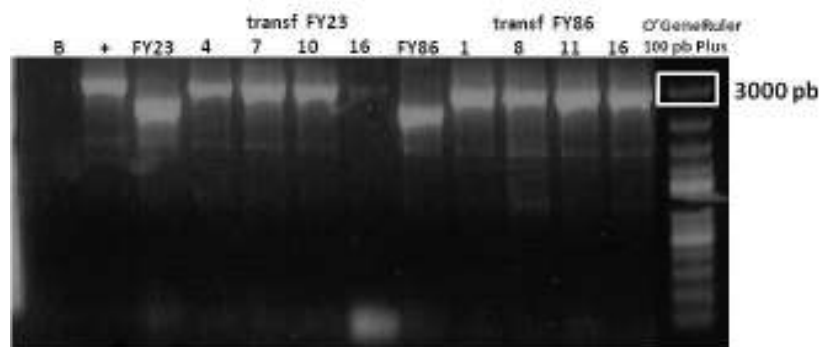


Figura 37. Confirmação da integração do cassete ADH1-HYG nas linhagens FY23 e FY86 por PCR utilizando dois *primers* externos. Reação sem DNA (B), controle positivo, 2812 pb, (+), FY23 selvagem (2208 pb), possíveis transformantes FY23 (4, 7, 10 e 16), FY86 selvagem (2208 pb), possíveis transformantes FY86 (1, 8, 11 e 16) e marcador de massa molecular O'GeneRuler 100 pb Plus DNA Ladder (Fermentas).

A deleção do gene *ADH1* na linhagem industrial FGY031 com o cassete ADH1-HYG através de PCR de colônia com a utilização dos *primers* Conf-ADH1_Int-F e Conf-ADH1-Int-R (496 pb) pode ser visualizada na Figura 38 A. Na Figura 38 B e C são apresentados os resultados das

amplificações, do DNA extraído, utilizando os *primers* HygSC-F e HygSC-R (1629 pb) e Conf-dADH1_core-F e Conf-dADH1_core-R (selvagem - 2208 pb; $\Delta adh1$ ADH1-HYG - 2812 pb), respectivamente.

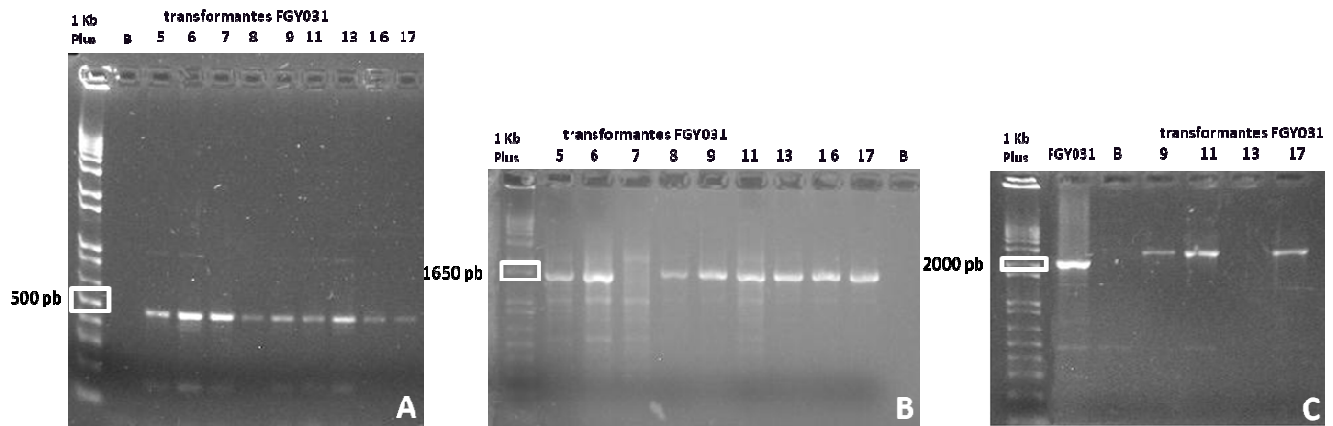


Figura 38. Confirmação da integração do cassete ADH1-HYG na linhagem FGY031 por PCR utilizando um primer interno e um externo ao cassete (A), dois primers internos ao cassete (B) e dois primers externos (C). **A.** Marcador de massa molecular 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen), reação sem DNA (B) e colônias possíveis transformantes FGY031 (496 pb). **B.** Marcador de massa molecular 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen), possíveis transformantes FGY031 (1629 pb) e reação sem DNA (B). **C.** Marcador de massa molecular 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen), FGY031 selvagem (2208 pb), reação sem DNA (B) e possíveis transformantes FGY031 (2812 pb).

A confirmação da deleção do gene *ADH1* com o cassete ADH1-HYG na linhagem industrial FGY042 foi realizada por PCR utilizando apenas os *primers* Conf-dADH1_core-F e Conf-dADH1_core-R. O resultado pode ser observado na Figura 39. Tais *primers* hibridizam na região *upstream* e *downstream* do gene *ADH1*, respectivamente, permitindo a distinção entre linhagens selvagens, fragmento de 2208 pb, e linhagens $\Delta adh1$ (ADH1-HYG), fragmento de 2812 pb.

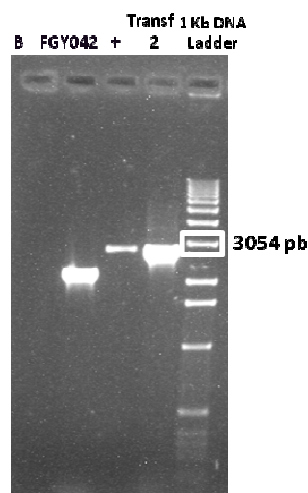


Figura 39. Confirmação da integração do cassete ADH1-HYG na linhagem FGY042 por PCR utilizando primers externos. Reação sem DNA (B), FGY042 selvagem (2208 pb), controle positivo, 2812 pb, (+), possível transformante (2) e marcador de massa molecular 1 Kb DNA Ladder (Invitrogen).

A deleção do gene *ADH1* nas linhagens de laboratório FY23 e FY86 com o cassete *ADH1pCORE* foi verificada por PCR somente com os *primers* Conf-d*ADH1_core*-F e Conf-d*ADH1_core*-R. Esse PCR amplifica tanto a linhagem selvagem, fragmento de 2208 pb, quanto a linhagem com a inserção do cassete, fragmento de 4359 pb, possibilitando a diferenciação dos transformantes corretos. Como pode ser visualizado na Figura 40 apenas nas colônias 22 (FY23) e 23 (FY86) o gene *ADH1* foi deletado, em todas as outras colônias aparece, além da banda relativa à inserção do cassete, a banda relativa ao gene original.

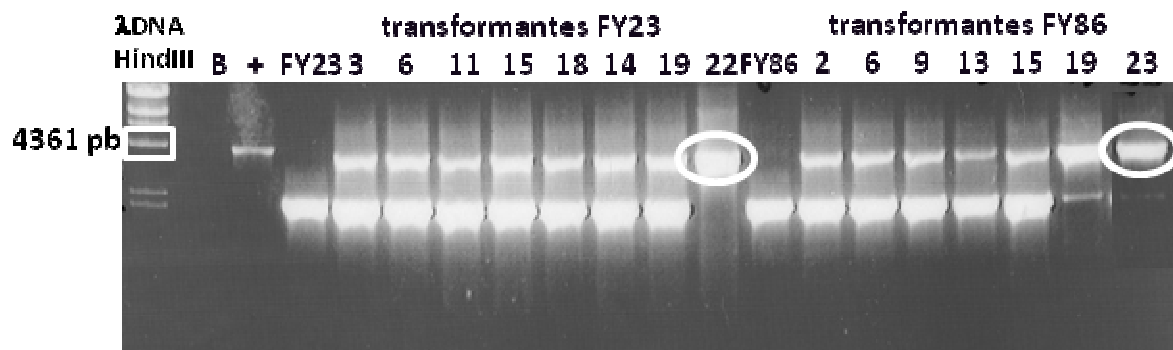


Figura 40. Confirmação da integração do cassete *ADH1pCORE* nas linhagens FY23 e FY86 por PCR utilizando primers externos. Marcador de massa molecular λ DNA HindIII (Invitrogen), reação sem DNA (B), controle positivo, 4359 pb, (+), FY23 selvagem (2208 pb), possíveis transformantes FY23, FY86 selvagem (2208 pb) e possíveis transformantes FY86.

A verificação da deleção do gene *ADH1* na linhagem industrial FGY031 com o cassete *ADH1pCORE* foi realizada por PCR com os *primers* Gen-F, que hibridiza dentro do cassete, e Conf-d*ADH1_core*-R, gerando um fragmento de 1427 pb apenas nos transformantes. Como pode ser visualizado na Figura 41 A, as colônias 1, 3, 4, 6 e 8 apresentam a banda esperada. Entretanto, quando se realiza o PCR com os *primers* externos Conf-d*ADH1_core*-F e Conf-d*ADH1_core*-R, pode-se ver pela Figura 41 B que apenas na colônia 8 houve realmente a deleção do gene *ADH1*.

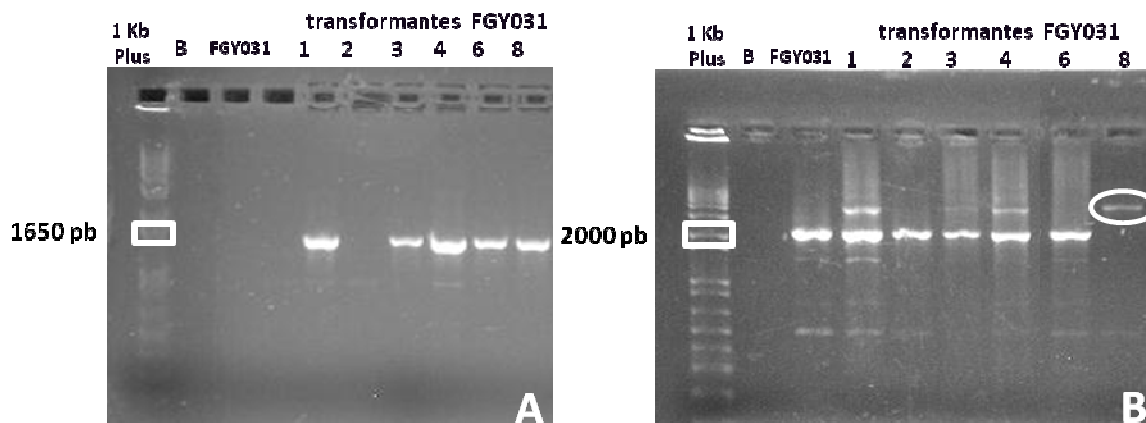


Figura 41. Confirmação da integração do cassete *ADH1pCORE* na linhagem FGY031 por PCR utilizando um primer interno e um externo ao cassete (A) e dois primers externos ao cassete (B). A. Marcador de massa molecular 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen), reação sem DNA (B), FGY031 selvagem e possíveis transformantes (1427 pb). B. Marcador de massa molecular 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen), reação sem DNA (B), FGY031 selvagem (2208 pb) e possíveis transformantes (4359 pb).

Após as verificações por PCR confirmou-se a obtenção de linhagens FY23, FY86, FGY031 e FGY042 com o gene *ADH1* deletado pela inserção do cassete ADH1-HYG no *locus* original e linhagens de FY23, FY86 e FGY031 com o gene *ADH1* deletado pela inserção do cassete ADH1pCORE também no *locus* original. Essas linhagens foram renomeadas para AFY (linhagens de laboratório) ou AZY (linhagens industriais) e são apresentadas na Tabela 6, juntamente com uma breve descrição de genótipo.

Tabela 6. Nome, origem e descrição breve das características genotípicas das linhagens obtidas após a deleção do gene *ADH1*.

Nome*	Origem	Genótipo
AFY311	FY23 colônia 7	laboratório - <i>MATa-ura3-52, trp1Δ63, leu2Δ1, Δadh1</i> com ADH1-HYG
AFY312	FY23 colônia 10	laboratório - <i>MATa-ura3-52, trp1Δ63, leu2Δ1, Δadh1</i> com ADH1-HYG
AFY321	FY86 colônia 1	laboratório - <i>MATα-ura3-52, his3Δ200, leu2Δ1, Δadh1</i> com ADH1-HYG
AFY322	FY86 colônia 11	laboratório - <i>MATα-ura3-52, his3Δ200, leu2Δ1, Δadh1</i> com ADH1-HYG
AFY315	FY23 colônia 22	laboratório - <i>MATa-ura3-52, trp1Δ63, leu2Δ1, Δadh1</i> com ADH1pCORE- <i>URA3 (K. lactis)</i>
AFY325	FY86 colônia 23	laboratório - <i>MATα-ura3-52, his3Δ200, leu2Δ1, Δadh1</i> com ADH1pCORE- <i>URA3 (K. lactis)</i>
AZY331	FGY031 colônia 11	industrial - <i>MATa-Δura3, Δadh1</i> com ADH1-HYG
AZY332	FGY031 colônia 17	industrial - <i>MATa-Δura3, Δadh1</i> com ADH1-HYG
AZY341	FGY042 colônia 2	industrial - <i>MATα-Δura3, Δadh1</i> com ADH1-HYG
AZY335	FGY031 colônia 8	industrial - <i>MATa-Δura3, Δadh1</i> com ADH1pCORE - <i>URA3 (K. lactis)</i>

* O primeiro número da linhagem corresponde ao gene deletado (3- *ADH1*; 4- *TPI1*; 7- *ADH1* e *TPI1*). O segundo número corresponde à linhagem (1-FY23; 2- FY86; 3- FGY031; 4- FGY042). O terceiro número corresponde aos diferentes indivíduos com as mesmas modificações.

De acordo com a estratégia original, o próximo passo seria a deleção do gene *TPI1* nas linhagens *Δadh1*. Para as linhagens com o cassete ADH1-HYG inserido no genoma a deleção do gene *TPI1* poderia ser feita diretamente. Entretanto, para as linhagens transformadas com o ADH1pCORE primeiro seria necessário a retirada do cassete do genoma com o IRO-ADH1, para que então o cassete TPI1pCORE pudesse ser utilizado para a deleção do gene *TPI*, uma vez que a estratégia do *delitto perfetto* é baseada na reciclagem do cassete.

Entretanto, houve um decréscimo na taxa de crescimento das linhagens após a deleção do gene *ADH1*. Isso dificultou ainda mais a transformação das leveduras, uma vez que o protocolo de células competentes baseia-se na fase exponencial do crescimento, que foi afetada. Por essa razão, um *screening* ainda maior foi necessário. Porém, mesmo após diversas tentativas de transformação com o IRO-ADH1 não foi possível encontrar transformantes. Na estratégia do pCORE a integração homóloga já é mais difícil por causa da pequena região de homologia. Isso, aliado ao decréscimo na taxa de crescimento, inviabilizou a obtenção de mutantes por essa estratégia, que foi abandonada.

5.4 Deleção do gene *TPI1*

Dessa maneira, a deleção do gene *TPI1* foi conseguida apenas com a estratégia que utiliza cassetes de longa homologia. Entretanto, mesmo utilizando o cassette *TPI1-KAN* que tem aproximadamente 200 pb de homologia, tanto na região 5' quanto na 3', após inúmeras tentativas, não foi possível a obtenção de transformantes utilizando as linhagens $\Delta adh1$. Sendo assim, o cassette *TPI1-KAN* foi transformado nas linhagens selvagens industriais (FGY031 e FGY042) e de laboratório (FY23 e FY86). A deleção do gene *TPI1* resulta na incapacidade da linhagem de crescer em glucose como fonte de carbono, devido ao acúmulo de dihidroxiacetona fosfato. Por essa razão as linhagens $\Delta tpi1$ são crescidas sempre em meio YEPE. A confirmação da transformação foi feita por PCR utilizando diversos pares de *primers* cuja região de pareamento no gene *TPI1* original pode ser visualizada na Figura 42. A região de pareamento dos *primers* após a deleção do gene *TPI1* com o cassette *TPI1-KAN* pode ser visualizada na Figura 43.



Figura 42. Desenho esquemático do *locus* do gene *TPI1* com a região de pareamento dos *primers*.

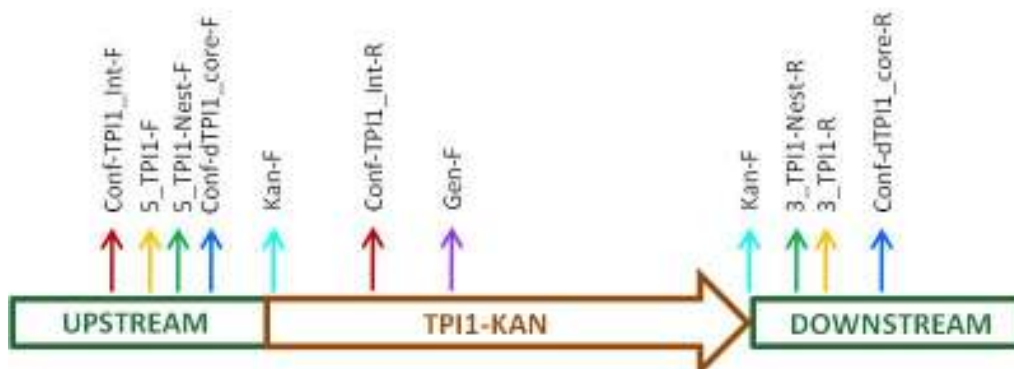


Figura 43. Desenho esquemático do *locus* do gene *TPI1* após a deleção do mesmo com o cassette *TPI1-KAN* e a região de pareamento dos *primers*.

O *screening* para verificação da deleção do gene *TPI1* com o cassette *TPI1-KAN* nas quatro linhagens foi realizado por PCR de colônia utilizando os *primers* Conf-TPI1_Int-F, que hibridiza na

região *upstream* ao gene TPI1, e Conf-TPI1_Int-R que hibridiza no interior do cassete. A amplificação apenas ocorre em linhagens transformadas gerando um fragmento de 515 pb que pode ser observado na Figura 44.



Figura 44. Confirmação da integração do cassete TPI1-KAN nas linhagens FY23, FY86, FGY031 e FGY041 por PCR de colônia utilizando um primer externo e um interno ao cassete. Marcador de massa molecular O'GeneRuler 100 pb Plus DNA Ladder (Fermentas), reação sem DNA (B), FY23 selvagem, possíveis transformantes FY23, FGY031 selvagem, possíveis transformantes FGY031, FGY042 selvagem, possíveis transformantes FGY042, FY86 selvagem e possíveis transformantes FY86.

Após a escolha de algumas colônias pelo PCR de colônia foi realizada a amplificação do genoma com os *primers* Conf-dTPI1_core-F e Conf-dTPI_core-R, que hibridizam na região *upstream* e *downstream* do gene *TPI1*, respectivamente. Esse PCR amplifica tanto a linhagem selvagem, fragmento de 1525 pb, quanto a linhagem com a inserção do cassete, fragmento de 2339 pb. A amplificação das linhagens FY86, FGY031, FY23 e FGY042 pode ser visualizada nas Figuras 45 A, 45 B, 46 e 47 respectivamente.

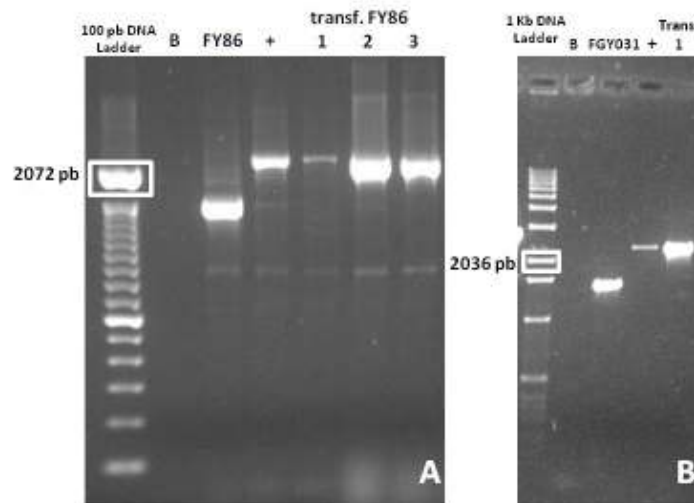


Figura 45. Confirmação da integração do cassete TPI1-KAN no *locus* do gene *TPI1* nas linhagens FY86 (A) e FGY031 (B) por PCR utilizando primers externos. A. Marcador de massa molecular 100 pb DNA Ladder (Invitrogen), reação sem DNA, FY86 selvagem (1525 pb), controle positivo, 2339 pb, (+) e possíveis transformantes. B. Marcador de massa molecular 1 Kb DNA Ladder (Invitrogen), reação sem DNA, FGY031 selvagem (1525 pb), controle positivo, 2339 pb, (+) e possíveis transformantes.

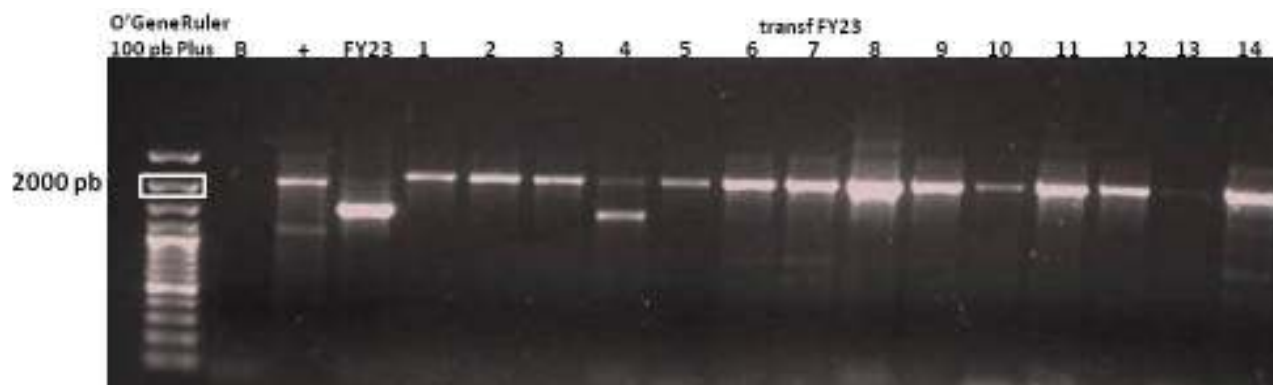


Figura 46. Confirmação da integração do cassete TPI1-KAN no *locus* do gene *TPI1* na linhagem FY23 por PCR utilizando dois primers externos. Marcador de massa molecular O'GeneRuler 100 pb Plus DNA Ladder (Fermentas), reação sem DNA (B), controle positivo, 2339 pb, (+), FY23 selvagem (1525 pb) e possíveis transformantes.

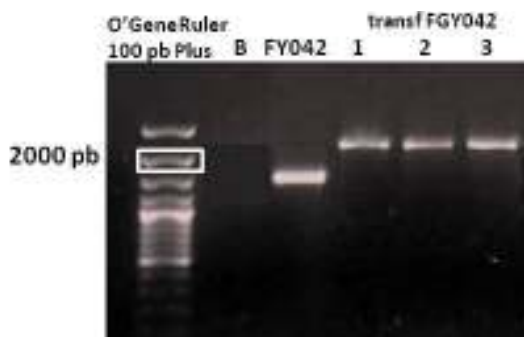


Figura 47. Confirmação da integração do cassete TPI1-KAN no *locus* do gene *TPI1* na linhagem FGY042 por PCR utilizando dois primers externos. Marcador de massa molecular O'GeneRuler 100 pb Plus DNA Ladder (Fermentas), reação sem DNA (B), FGY042 selvagem (1525 pb) e possíveis transformantes.

Após as verificações por PCR confirmou-se a obtenção de linhagens FY23, FY86, FGY031 e FGY042 com o gene *TPI1* deletado pela inserção do cassete TPI1-KAN no *locus* original. Essas linhagens foram renomeadas para AFY (linhagens de laboratório) ou AZY (linhagens industriais) e são apresentadas na Tabela 7, juntamente com uma breve descrição de genótipo.

Tabela 7. Nome, origem e descrição genotípica das linhagens obtidas após a deleção do gene *TPI1*.

Nome*	Origem	Genótipo
AFY411	FY23 colônia 1	laboratório - <i>MATa- ura3-52, trp1Δ63, leu2Δ1, Δtpi1</i> com TPI1-KAN
AFY412	FY23 colônia 12	laboratório - <i>MATa- ura3-52, trp1Δ63, leu2Δ1, Δtpi1</i> com TPI1-KAN
AFY421	FY86 colônia 2	laboratório - <i>MATα - ura3-52, his3Δ200, leu2Δ1, Δtpi1</i> com TPI1-KAN
AZY431	FGY031 colônia 1	industrial - <i>MATa - Δura3, Δtpi1</i> com TPI1-KAN
AZY441	FGY042 colônia 1	industrial - <i>MATα - Δura3, Δtpi1</i> com TPI1-KAN
AZY442	FGY042 colônia 2	industrial - <i>MATα - Δura3, Δtpi1</i> com TPI1-KAN
AZY443	FGY042 colônia 3	industrial - <i>MATα - Δura3, Δtpi1</i> com TPI1-KAN

* O primeiro número da linhagem corresponde ao gene deletado (3- *ADH1*; 4- *TPI1*; 7- *ADH1* e *TPI1*). O segundo número corresponde à linhagem (1-FY23; 2- FY86; 3- FGY031; 4- FGY042). O terceiro número corresponde aos diferentes indivíduos com as mesmas modificações.

5.5 Obtenção do duplo mutante - $\Delta adh1$ e $\Delta tpi1$

Como não foi possível a deleção de ambos os genes na mesma levedura, devido às dificuldades encontradas na transformação, foi desenvolvida outra estratégia para a obtenção do duplo mutante. Essa estratégia foi baseada em cruzamentos e esporulações, uma vez que os genes se encontram em cromossomos separados e, portanto, a segregação é independente. Como os genes *ADH1* e *TPI1* foram deletados em duas linhagens de laboratório e duas linhagens industriais, de diferentes *mating-type*, foi possível realizar o cruzamento dessas linhagens. A linhagem AFY322 (FY86 $\Delta adh1$ ADH1-HYG) foi cruzada com a linhagem AFY412 (FY23 $\Delta tpi1$ TPI1-KAN) e a linhagem AZY331 (FGY031 $\Delta adh1$ ADH1-HYG) foi cruzada com a linhagem AZY441 (FGY042 $\Delta tpi1$ TPI1-KAN). Após os cruzamentos é esperado que a linhagem se torne diplóide, mas possua apenas uma cópia dos genes *ADH1* e *TPI1* e apresente resistência à higromicina e geneticina. Sendo assim, para o isolamento de colônias após o cruzamento foi utilizado o meio sólido YEPE com geneticina e higromicina, no qual apenas as linhagens com ambos os cassetes, e, portanto, diplóides foram capazes de crescer. Após o crescimento de colônias isoladas, foi realizado um PCR de colônia para determinar o *mating-type* e verificar se realmente houve o cruzamento. Em linhagens *MATa* há a amplificação de um fragmento de 544 pb, em linhagens de *MAT α* um fragmento de 404 pb e em linhagens diploides há a amplificação de ambos os fragmentos. Como pode ser visualizado na Figura 48. Algumas linhagens são diplóides, comprovando que o cruzamento realmente ocorreu.

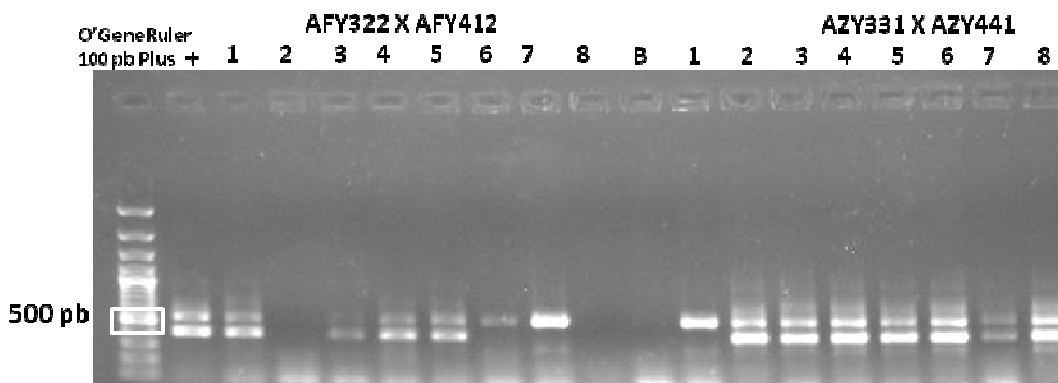


Figura 48. Confirmação do cruzamento das linhagens AFY322 X AFY412 e AZY331 X AZY441 por PCR do *mating-type*. Marcador de massa molecular O'GeneRuler 100 pb Plus DNA Ladder (Fermentas), amplificação da linhagem diplóide JAY 270 (+), colônias do cruzamento AFY322 X AFY412, reação sem DNA (B), colônias do cruzamento AZY331 X AZY441.

Após a comprovação do cruzamento, foi realizada a esporulação de várias colônias diplóides, com o intuito de encontrar algum esporo que possuísse os genes *ADH1* e *TPI1* deletados. As colônias foram incubadas em meio de esporulação para que fossem formadas as tétrades de esporos. O isolamento dos esporos normalmente é realizado manualmente através da dissecação das tétrades em microscópio com micromanipulador. Essa foi a técnica utilizada inicialmente para o isolamento dos esporos, entretanto, até que se adquira prática, é uma técnica demorada e laboriosa.

Como o objetivo da esporulação era a obtenção de um esporo duplo mutante, não sendo necessário saber de qual tétrade provinha, nem qual o genótipo dos esporos irmãos, optou-se por utilizar a técnica do *Random Spore Analysis*. Essa técnica consiste na liberação dos produtos da meiose pelo rompimento por sonicação das tétrades. Entretanto, também pode ocorrer contaminação por linhagens diplóides não esporuladas.

As células liberadas após o rompimento das tétrades foram contadas e plaqueadas em meio YEPE com geneticina e higromicina para que apenas os esporos duplos mutantes crescessem. Após o crescimento de colônias no meio seletivo foi determinado o *mating-type* por PCR de colônia para verificar se realmente eram esporos ou apenas linhagens diplóides não esporuladas. Como pode se visualizado na Figura 49. O isolamento de esporos foi bem sucedido, tanto de *MATa* quanto *MAT α* , havendo apenas poucas colônias referentes às células diplóides.

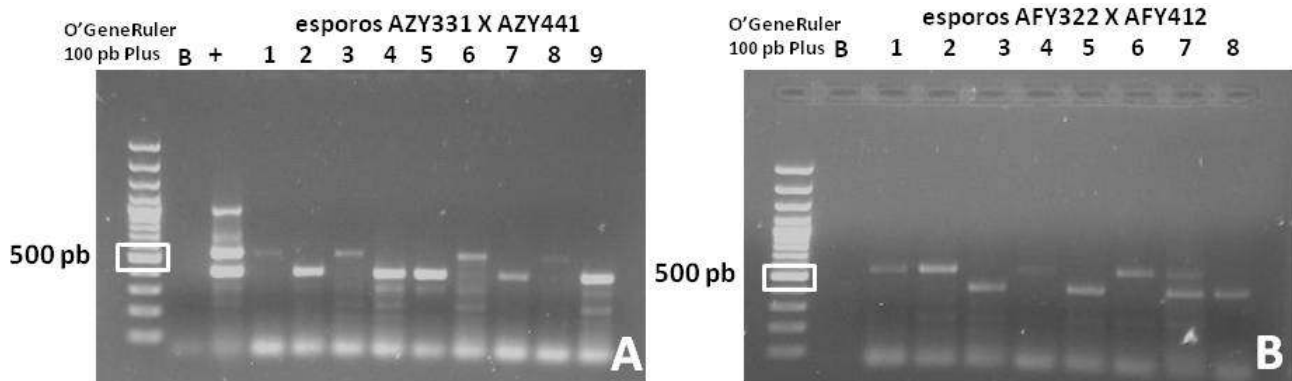


Figura 49. Confirmação da obtenção de esporos por Random Spore Analysis por PCR do *mating-type*. **A.** Marcador de massa molecular O'GeneRuler 100 pb Plus DNA Ladder (Fermentas), reação sem DNA (B), amplificação da linhagem diplóide JAY 270 (+) e esporos do cruzamento AZY331 X AZY441. **B.** Marcador de massa molecular O'GeneRuler 100 pb Plus DNA Ladder (Fermentas), reação sem DNA (B) e esporos do cruzamento AFY322 X AFY412.

Para confirmação de que essas linhagens haplóides possuíam tanto o gene *ADH1* quanto o gene *TPI1* deletados foram realizados PCRs de colônia utilizando os *primers* Conf-ADH1_Int-F e Conf-ADH1_Int-R, para verificação do *locus ADH1* (496 pb), e Conf-TPI1_Int-F e Conf-TPI1_Int-R para verificação do *locus TPI1* (515 pb). Como pode ser observado na Figura 50 as linhagens haplóides realmente possuem os dois genes deletados, confirmando a obtenção tanto de duplos mutantes industriais quanto de laboratório. Essas linhagens foram renomeadas para AFY (linhagens de laboratório) ou AZY (linhagens industriais) e são apresentadas na Tabela 8, juntamente com uma breve descrição de genótipo.

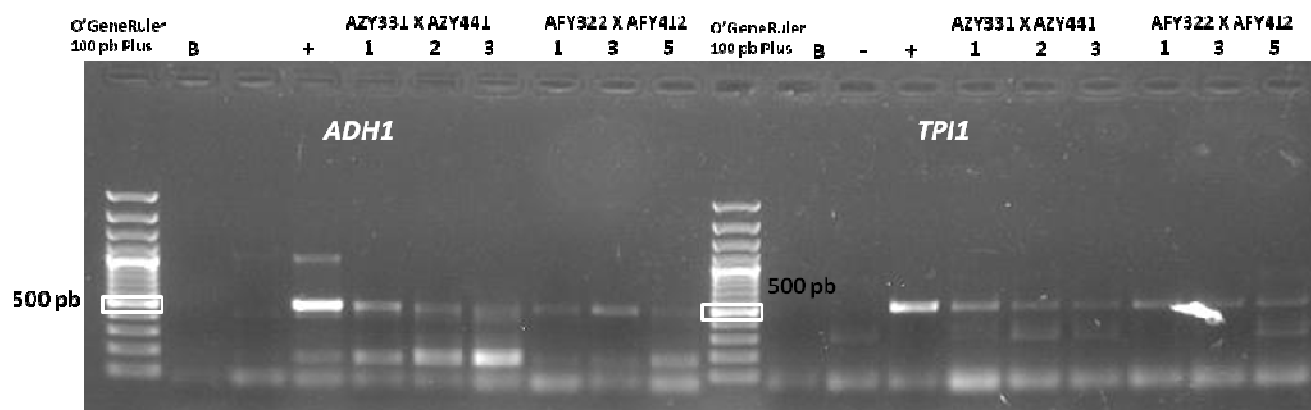


Figura 50. Confirmação da obtenção de duplo mutantes industriais e de laboratório haplóides por PCR. Marcador de massa molecular O'GeneRuler 100 pb Plus DNA Ladder (Fermentas), reação sem DNA (B), linhagem selvagem (-), linhagem $\Delta adh1$, 496 pb, (+), linhagens haplóides provenientes do cruzamento AZY331 X AZY441, linhagens haplóides provenientes do cruzamento AFY322 X AFY412, marcador de massa molecular O'GeneRuler 100 pb Plus DNA Ladder (Fermentas), reação sem DNA (B), linhagem selvagem (-), linhagem $\Delta tpi1$, 515 pb, (+), linhagens haplóides provenientes do cruzamento AZY331 X AZY441 e linhagens haplóides provenientes do cruzamento AFY322 X AFY412.

Tabela 8. Nome, origem e descrição breve das características genotípicas das linhagens duplo mutantes.

Nome*	Origem	Genótipo
AFY731	AFY322 X AFY412 colônia 1	laboratório - $MATa$ - $ura3$ -52, $leu2\Delta1$, $\Delta adh1$, $\Delta tpi1$
AFY732	AFY322 X AFY412 colônia 3	laboratório - $MAT\alpha$ - $ura3$ -52, $leu2\Delta1$, $\Delta adh1$, $\Delta tpi1$
AZY771	AZY331 X AZY441 colônia 1	industrial - $MATa$ - $\Delta ura3$, $\Delta adh1$, $\Delta tpi1$
AZY772	AZY331 X AZY441 colônia 2	industrial - $MAT\alpha$ - $\Delta ura3$, $\Delta adh1$, $\Delta tpi1$

* O primeiro número da linhagem corresponde ao gene deletado (3- $ADH1$; 4- $TPI1$; 7- $ADH1$ e $TPI1$) O segundo número corresponde à linhagem (1-FY23; 2- FY86; 3- FGY031; 4- FGY042), linhagens obtidas por cruzamentos correspondem à soma dos números das linhagens originais . O terceiro número corresponde aos diferentes indivíduos com as mesmas modificações.

5.6 Transformação com os plasmídeos YEpADH1 e YEpGPD1

O plasmídeo YEpADH1 foi construído para que fosse realizada a complementação do gene $ADH1$ nas linhagens $\Delta adh1$ com o intuito de verificar a capacidade de recuperação das características da linhagem selvagem. O plasmídeo foi transformado nas linhagens AFY312 e AZY331, ambas $\Delta ura3$, pois nesse caso a seleção é feita pela capacidade de crescer em meio sem uracila, uma vez que o gene $URA3$ está presente no plasmídeo. Sendo assim, o plasmídeo também possibilitou a verificação da complementação do gene $URA3$. A confirmação da transformação foi realizada utilizando os *primer* pUC/M13-F e pUC/M13-R, que hibridizam na região externa ao sítio da clonagem do gene $ADH1$ no plasmídeo YEp 352, amplificando toda a região do gene $ADH1$. Dessa forma, a amplificação com esses *primers* gera um fragmento de 1805 pb apenas nas linhagens transformadas com o plasmídeo YEpADH1, como pode ser visualizado na Figura 51.

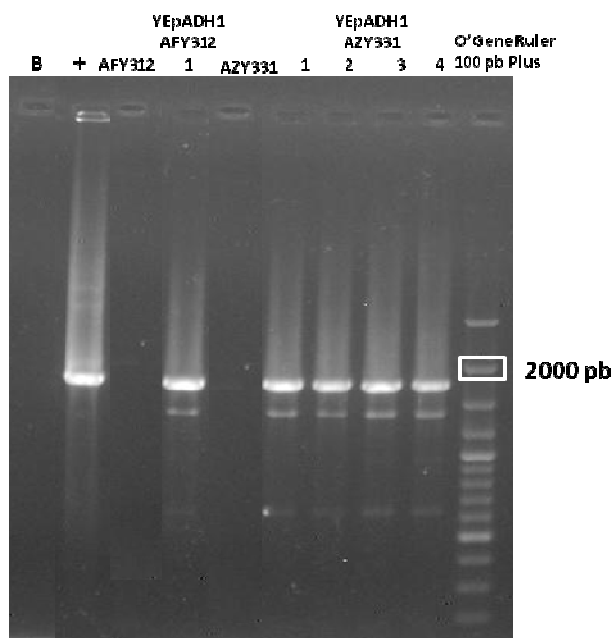


Figura 51. Transformação das linhagens AFY312 e AZY331 com o plasmídeo YEpADH1 para complementação do gene *ADH1*. Reação sem DNA (B), amplificação do plasmídeo YEpADH1, 1805 pb, (+), linhagem AFY312, transformante AFY312, linhagem AZY331, transformantes AZY331 e marcador de massa molecular O'GeneRuler 100 pb Plus DNA Ladder (Fermentas).

Após a realização do PCR foi confirmada a transformação das linhagens AFY312 e AZY331 com o plasmídeo YEpADH1, apesar das linhagens serem $\Delta adh1$ e possuírem um perfil de crescimento diferente. Isso demonstra que a transformação de plasmídeos é muito mais fácil do que a transformação de cassetes para integração homóloga. O nome juntamente com uma breve descrição de genótipo dessas linhagens é apresentado na Tabela 9.

Tabela 9. Nome, origem e descrição breve das características genotípicas das linhagens obtidas após a transformação com o plasmídeo YEpADH1.

Nome*	Origem	Genótipo
AFY511	AFY312 colônia 1	laboratório - <i>MATa- ura3-52, trp1Δ63, leu2Δ1, ADH1-HYG, URA3, ADH1</i>
AZY531	AZY331 colônia 1	industrial - <i>MATa - ADH1-HYG, URA3, ADH1</i>
AZY532	AZY331 colônia 2	industrial - <i>MATa - ADH1-HYG, URA3, ADH1</i>
AZY533	AZY331 colônia 3	industrial - <i>MATa - ADH1-HYG, URA3, ADH1</i>
AZY534	AZY331 colônia 4	industrial - <i>MATa - ADH1-HYG, URA3, ADH1</i>

* O primeiro número da linhagem corresponde ao gene deletado (3- *ADH1*; 4- *TPI1*; 7- *ADH1* e *TPI1*), para linhagem com o gene *ADH1* complementado - 5; O segundo número corresponde à linhagem (1-FY23; 2- FY86; 3- FGY031; 4- FGY042. O terceiro número corresponde aos diferentes indivíduos com as mesmas modificações.

O plasmídeo YEpGPD1 foi construído para a superexpressão do gene *GPD1* nas linhagens duplo mutante com o intuito de aumentar a produção de glicerol. O plasmídeo foi transformado nas linhagens AFY731 e AZY771, entretanto, mesmo após algumas tentativas não foi possível a

obtenção de transformantes. Apesar da transformação de plasmídeos ser bem mais fácil que a de cassetes de integração, as linhagens $\Delta adh1$ e $\Delta tpi1$ tiveram um decréscimo muito grande na taxa de crescimento, sendo, inclusive, incapazes de crescer em glucose como única fonte de carbono. Mesmo em meio utilizando etanol como fonte de carbono a taxa de crescimento é bem baixa, o que, sem dúvida, dificulta o processo de transformação.

5.7 Cruzamento de linhagens haplóides para obtenção de mutantes diplóides

Para a utilização em um processo industrial a linhagem diplóide apresenta vantagens em relação à linhagem haplóide, principalmente no que diz respeito à manutenção das modificações no genoma. Linhagens haplóides, por poderem realizar cruzamentos, são mais suscetíveis à perda ou aquisição de características.

Como as deleções foram realizadas em duas linhagens de cada tipo (laboratório ou industrial) com *mating-types* diferentes o cruzamento entre elas é possível. Também foram obtidos haplóides com *mating-types* diferentes para as linhagens $\Delta adh1$ e $\Delta tpi1$ de laboratório e industrial. Sendo assim, as linhagens foram cruzadas e as colônias isoladas obtidas testadas para o *mating-type* por PCR de colônia. As linhagens selvagens de laboratório FY23 e FY86 foram cruzadas, assim como as linhagens industriais FGY031 e FGY042.

Na Figura 52 são apresentados os resultados dos cruzamentos das linhagens AFY312 com AFY322, AFY315 com AFY325 e FGY031 com FGY042. Em linhagens *MAT α* há a amplificação de um fragmento de 544 pb, em linhagens de *MAT α* um fragmento de 404 pb e em linhagens dipóides há a amplificação de ambos os fragmentos.

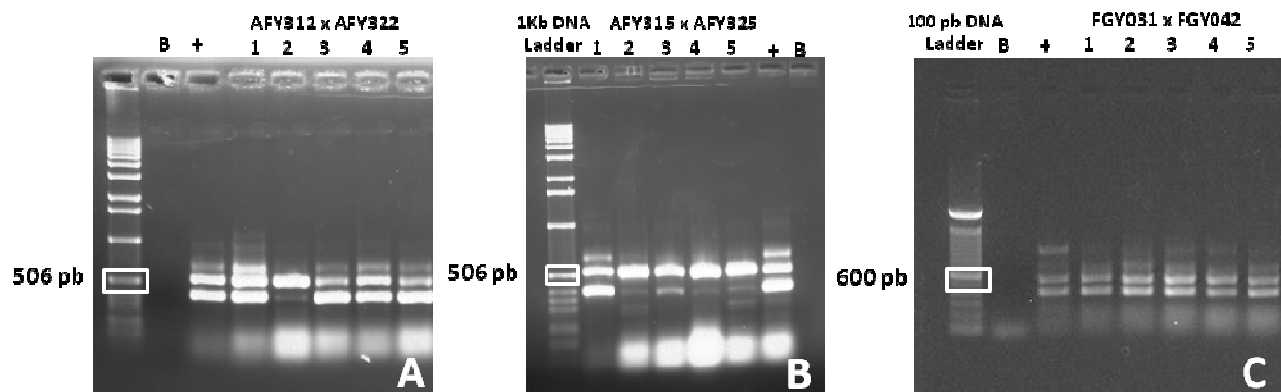


Figura 52. Confirmação do cruzamento das linhagens AFY312 X AFY322, AFY315 X AFY325 e FGY031 X FGY041 por PCR do mating-type. **A.** Marcador de massa molecular 1 Kb DNA Ladder (Invitrogen), reação sem DNA (B), amplificação da linhagem diplóide JAY 270 (+) e colônias do cruzamento AFY312 X AFY322. **B.** Marcador de massa molecular 1 Kb DNA Ladder (Invitrogen), colônias do cruzamento AFY315 X AFY 325, amplificação da linhagem diplóide JAY 270 (+) e reação sem DNA (B). **C.** Marcador de massa molecular 100 pb DNA Ladder (Invitrogen), reação sem DNA (B), amplificação da linhagem diplóide JAY 270 (+) e colônias do cruzamento FGY031 X FGY041.

O cruzamento das linhagens AFY412 com AFY421 e AZY431 com AZY441 pode ser visualizado na Figura 53.

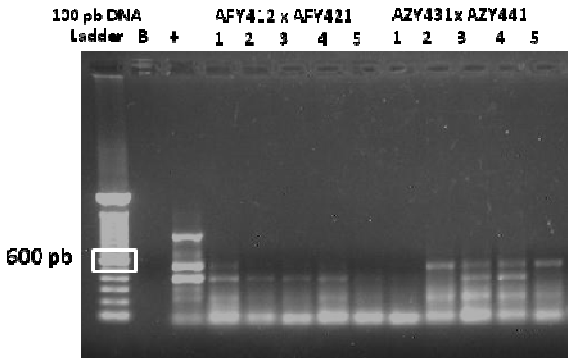


Figura 53. Confirmação do cruzamento das linhagens AFY412 X AFY421 e AZY431 X AZY441 por PCR do mating-type. Marcador de massa molecular 100 pb DNA Ladder (Invitrogen), reação sem DNA (B), amplificação da linhagem diplóide JAY 270 (+), colônias do cruzamento AFY412 X AFY421 e colônias do cruzamento AZY431 X AZY441.

Na Figura 54 podem ser observados os resultados dos cruzamentos das linhagens AFY731 com AFY732, FY23 com FY86, AZY771 com AZY772 e AZY331 com AZY341.

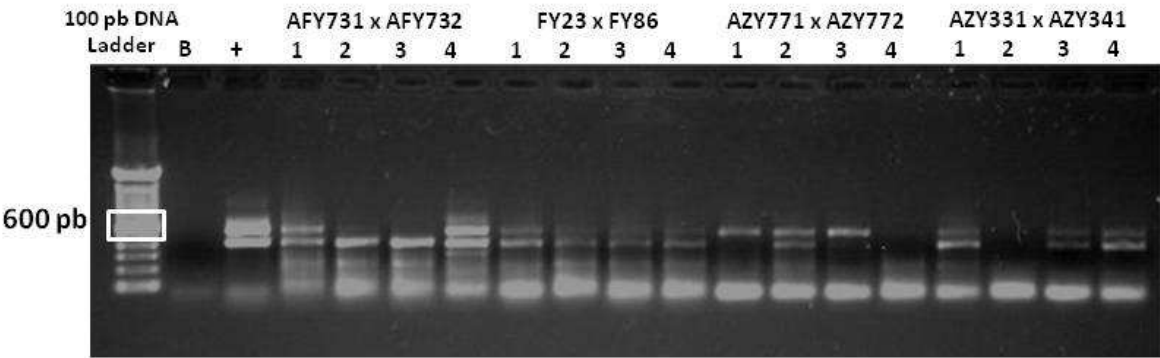


Figura 54. Confirmação do cruzamento das linhagens AFY731 X AFY732, FY23 X FY86, AZY771 X AZY772 e AZY331 X AZY341 por PCR do mating-type. Marcador de massa molecular 100 pb DNA Ladder (Invitrogen), reação sem DNA (B), amplificação da linhagem diplóide JAY 270 (+), colônias do cruzamento AFY731 X AFY732, colônias do cruzamento FY23 X FY86, colônias do cruzamento AZY771 X AZY772 e colônias do cruzamento AZY331 X AZY341.

Após as verificações por PCR confirmou-se a obtenção de linhagens diplóides em todos os cruzamentos realizados. A lista das linhagens obtidas é apresentada na Tabela 10, juntamente com uma breve descrição de genótipo.

Tabela 10. Nome, origem e descrição breve das características genotípicas das linhagens diplóides obtidas após cruzamento.

Nome*	Origem	Genótipo
AFY109	FY86xFY23	laboratório - <i>ura3-52, leu2Δ1</i>
FGY073	FGY031xFGY042	industrial - <i>Δura3</i>
AFY634	AFY312xAFY322	laboratório - <i>ura3-52, leu2Δ1, Δadh1</i> com ADH1-HYG
AFY640	AFY315xAFY325	laboratório - <i>ura3-52, leu2Δ1, Δadh1</i> com ADH1pCORE - <i>URA3 (K. lactis)</i>

AZY672	AZY331xAZY341	industrial - $\Delta ura3$, $\Delta adh1$ com ADH1-HYG
AFY833	AFY412xAFY421	laboratório - $ura3-52$, $leu2\Delta1$, $\Delta tpi1$ com TPI1-KAN
AZY872	AZY431xAZY441	industrial - $\Delta ura3$, $\Delta tpi1$ com TPI1-KAN
AFY733	AFY731xAFY732	laboratório - $ura3-52$, $leu2\Delta1$, $\Delta adh1$, $\Delta tpi1$
AZY773	AZY771xAZY772	industrial - $\Delta ura3$, $\Delta adh1$, $\Delta tpi1$

* O primeiro número da linhagem corresponde ao gene deletado (6- *ADH1*; 8- *TPI1*; 7- *ADH1* e *TPI1*). O segundo número corresponde à linhagem (1-FY23; 2- FY86; 3- FGY031; 4- FGY042), linhagens obtidas por cruzamentos correspondem à soma dos números das linhagens originais O terceiro número corresponde aos diferentes indivíduos com as mesmas modificações.

5.8 Fermentação em meio YNB

Após a confirmação da transformação por PCR, efetuou-se um teste de crescimento para análise do perfil de produção de metabólitos das linhagens de leveduras em meio YNB. Por ser um meio sintético, o YNB permite o crescimento das linhagens com o plasmídeo YEpADH1, pois a manutenção do plasmídeo é obtida através da utilização de um meio sem adição de uracila. Todos os testes foram realizados em triplicata e o desvio padrão foi calculado. Foram comparadas todas as linhagens mostradas na Tabela 11.

Tabela 11. Linhagens utilizadas para teste fermentativo em YNB.

Linhagem	Genótipo
FY 23	laboratório - <i>MATa- ura3-52</i> , <i>trp1</i> Δ 63, <i>leu2</i> Δ 1
AFY 109	laboratório - diplóide - $ura3-52$, $leu2\Delta1$
JAY 270	industrial – diploid
FGY 050	industrial - diplóide - $\Delta ura3$
FGY 031	industrial - <i>MATa</i> - $\Delta ura3$
FGY 042	industrial - <i>MATα</i> - $\Delta ura3$
FGY 073	industrial - diplóide - $\Delta ura3$
AFY 634	laboratório - diplóide - $ura3-52$, $leu2\Delta1$, $\Delta adh1$ com ADH1-HYG
AFY 640	laboratório - diplóide - $ura3-52$, $leu2\Delta1$, $\Delta adh1$ com ADH1pCORE - <i>URA3 (K.lactis)</i>
AZY 672	industrial - diplóide - $\Delta ura3$, $\Delta adh1$ com ADH1-HYG
AZY 335	industrial - <i>MATa</i> - $\Delta ura3$, $\Delta adh1$ com ADH1pCORE - <i>URA3 (K. lactis)</i>
AFY 511	laboratório - <i>MATa- ura3-52</i> , <i>trp1</i> Δ 63, $leu2\Delta1$, ADH1-HYG, <i>URA3</i> , <i>ADH1</i>
AZY 531	industrial - <i>MATa</i> - ADH1-HYG, <i>URA3</i> , <i>ADH1</i>
AFY 833	laboratório - diplóide - $ura3-52$, $leu2\Delta1$, $\Delta tpi1$ com TPI1-KAN
AZY 872	industrial - diplóide - $\Delta ura3$, $\Delta tpi1$ com TPI1-KAN
AFY 733	industrial - diplóide - $\Delta ura3$, $\Delta adh1$, $\Delta tpi1$
AZY 773	industrial - diplóide - $\Delta ura3$, $\Delta adh1$, $\Delta tpi1$

As amostras foram retiradas a cada duas ou três horas e a densidade ótica (DO) foi medida, dando origem à curva de crescimento mostrada na Figura 55.

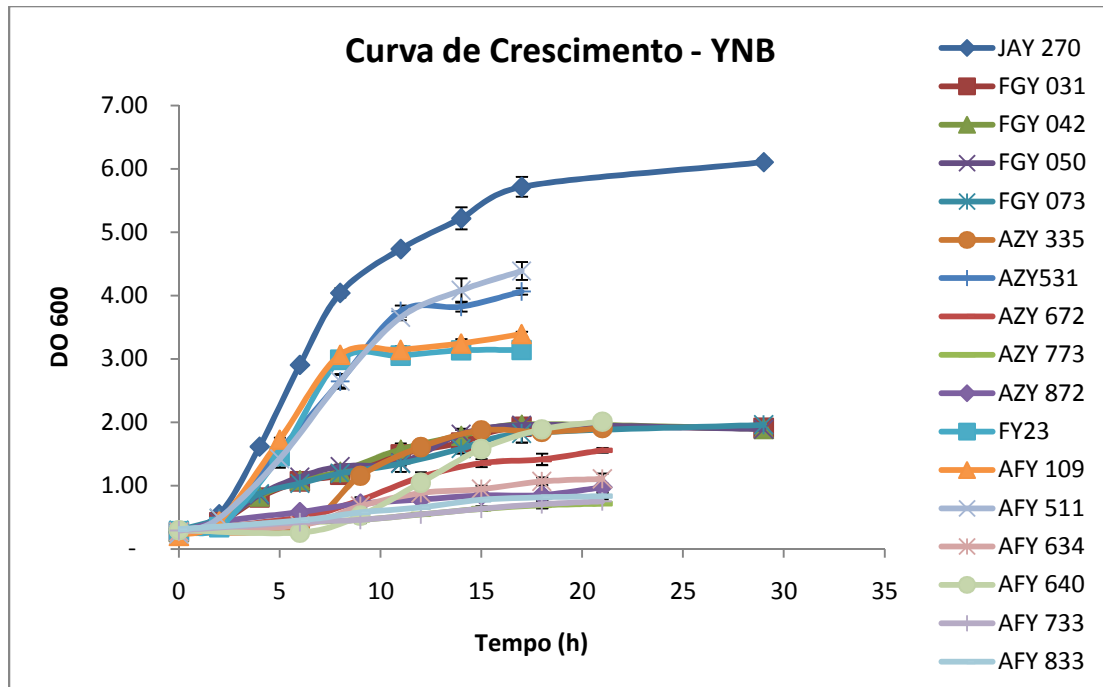


Figura 55. Curva de crescimento em meio YNB.

Como pode ser visualizado, a linhagem original industrial JAY270 possui, não apenas uma taxa de crescimento maior, mas também uma formação de biomassa muito maior ao longo do tempo em relação a todas as outras linhagens, incluindo as linhagens com complementação dos genes *ADH1* e *URA3*. Isso se deve ao fato de ser uma linhagem industrial e selvagem, sem nenhuma modificação genética. Para uma melhor visualização das diferenças de crescimento entre as outras linhagens apresenta-se a Figura 56, gráfico da curva de crescimento sem as linhagens selvagens industriais e de laboratório, JAY270 e FY23.

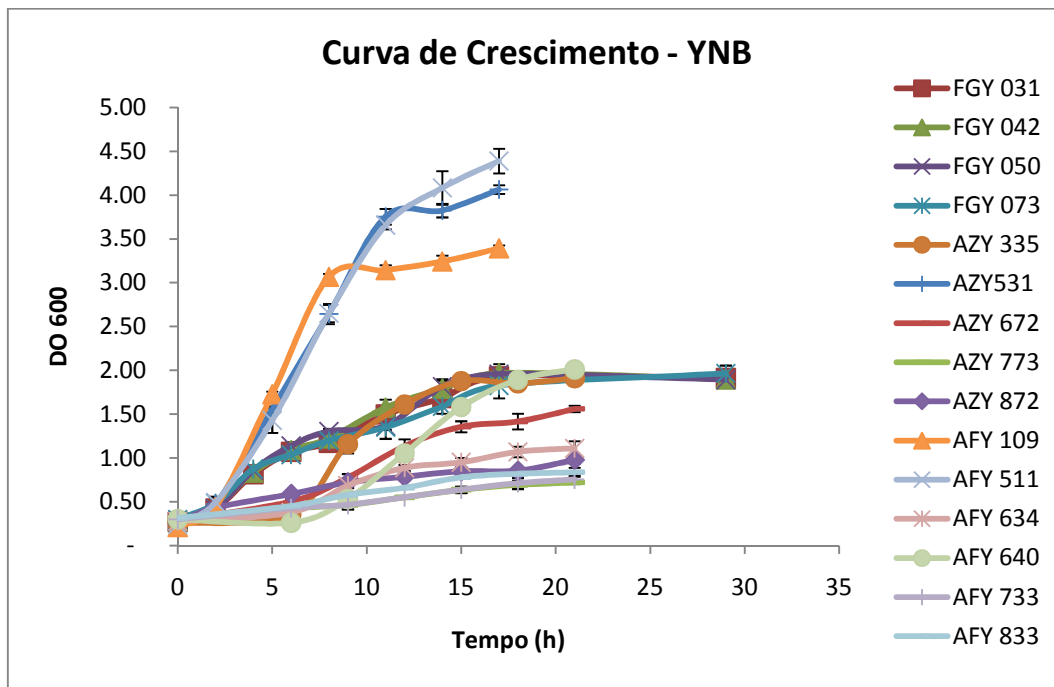


Figura 56. Curva de crescimento em meio YNB sem as linhagens JAY270 e FY23.

Depois da linhagem JAY270, as linhagens complementadas, AFY511 e AZY531, foram as que alcançaram as maiores concentrações finais de biomassa, tendo atingindo uma DO maior que a linhagem AFY109, diplóide de laboratório. Pode-se verificar também que as linhagens FGY, derivadas da JAY270 mas com deleção do gene *URA3*, apresentaram um déficit de crescimento, não alcançando uma OD maior do que 2. Na Figura 57 é apresentada a mesma curva de crescimento, entretanto sem as linhagens AFY511, AZY531 e AFY109.

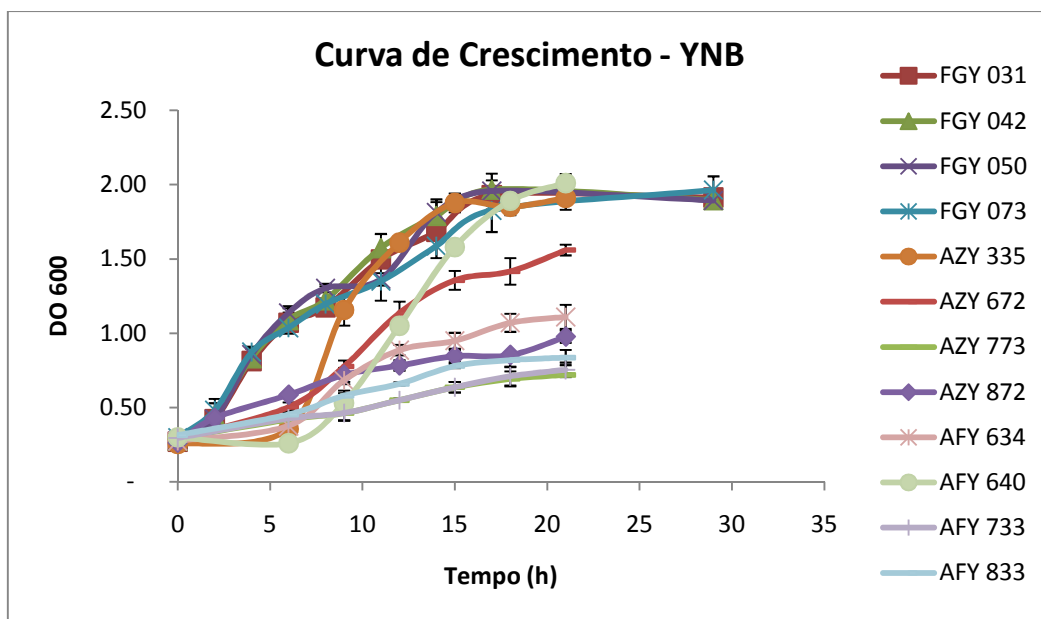


Figura 57. Curva de crescimento em meio YNB sem as linhagens JAY270, FY23, AFY109, AFY511 e AFY531.

Pela Figura 57 pode-se observar que a diferença entre as linhagens industriais FGY e as linhagens com o gene *ADH1* deletado pelo cassete ADH1pCORE não é em relação à quantidade final de biomassa gerada, mas sim ao perfil da curva de crescimento celular. Para melhorar a visualização, a Figura 58 Apresenta apenas as linhagens FGY073, AFY640, AFY634, AZY 672 e AZY335.

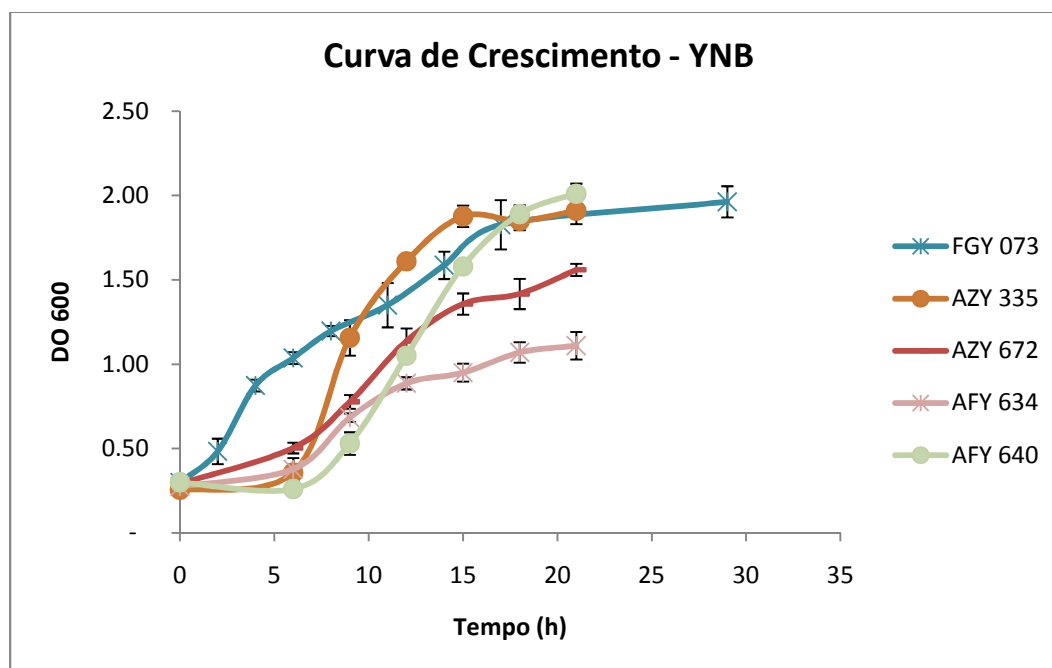


Figura 58. Curva de crescimento em meio YNB com as linhagens FGY073, AFY640, AFY634, AZY672 e AZY335.

Na Figura 58 Fica bem clara a diferença do perfil de crescimento celular entre as linhagens FGY073 e aquelas com o gene *ADH1* deletado. Além disso, as linhagens AFY640 e AZY335 deletadas com ADH1pCORE, que possui o gene *URA3* de *K. lactis*, foram capazes de alcançar maior concentração de biomassa do que aquelas deletadas com o ADH1-HYG, AFY634 e AZY672.

A Figura 59 apresenta apenas o crescimento das linhagens AFY833, AZY872, AFY733 e AFY773. Pode-se observar que as linhagens com o gene *TPI1* deletado e com os genes *ADH1* e *TPI1* deletados apresentam taxa de crescimento celular muito baixa. Isso se deve à incapacidade das linhagens $\Delta tpi1$ de utilizar glicose como fonte de carbono para crescimento. Entretanto, são capazes de converter a glicose em glicerol ao invés de convertê-la em etanol.

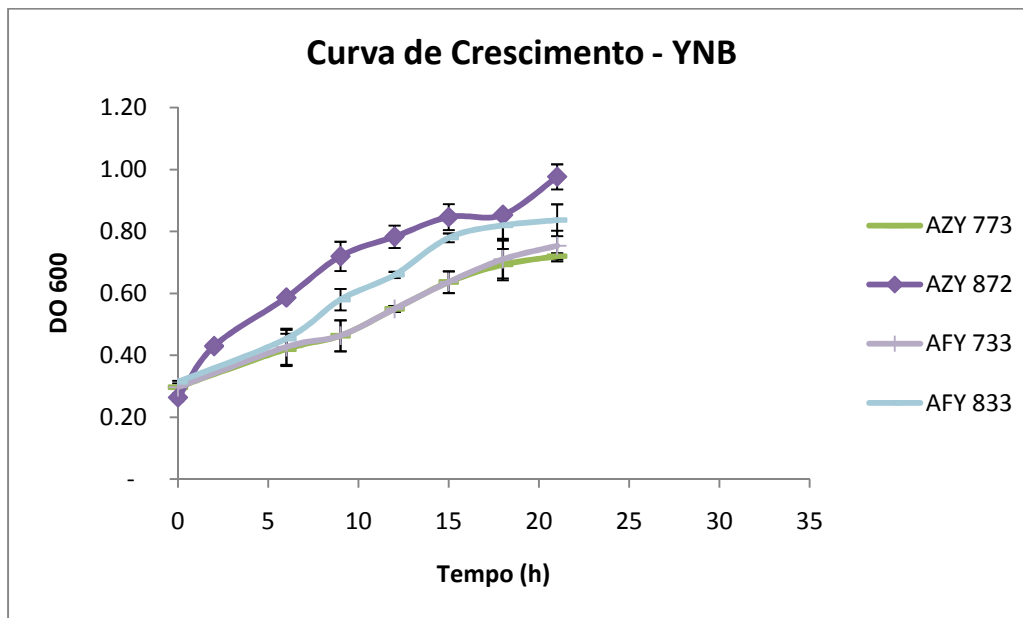
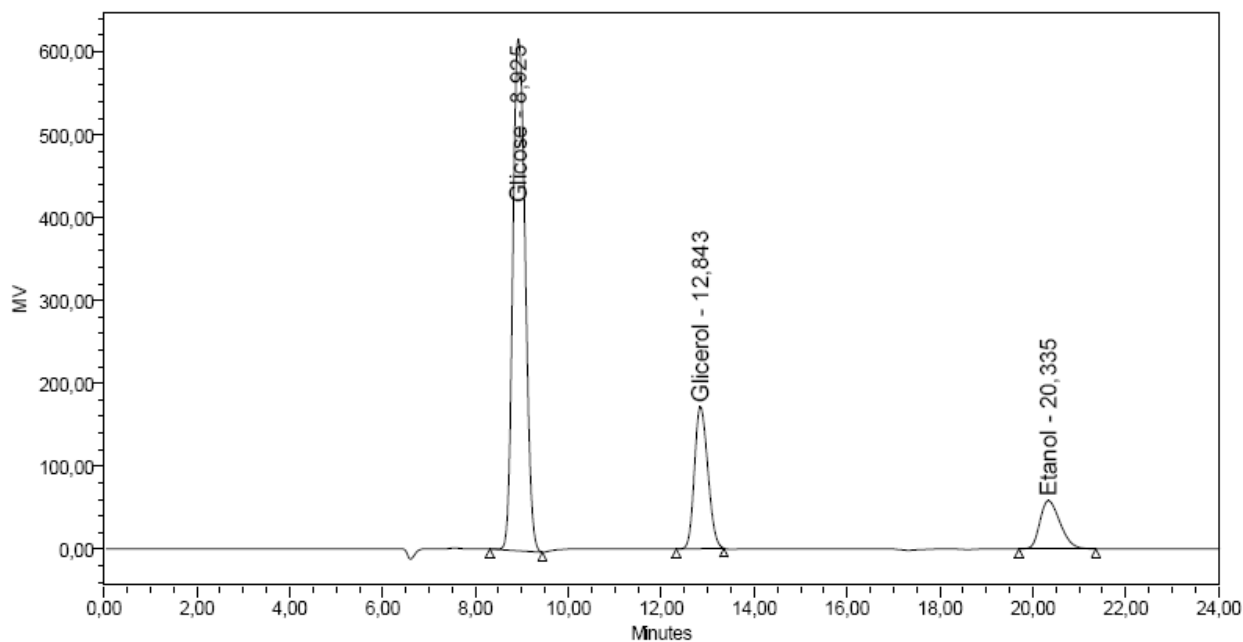


Figura 59. Curva de crescimento em meio YNB com as linhagens AFY833, AZY872, AFY733 e AFY773.

Para a determinação dos metabólitos, as amostras foram centrifugadas, filtradas e injetadas no HPLC. Um exemplo do cromatograma obtido é mostrado na Figura 60. Após a análise por HPLC das amostras coletadas dos cultivos, foram gerados cromatogramas, como o exemplificado na Figura 60.



	Peak Name	RT	Area	% Area	Height	Amount	Units
1	Glucose	8,925	11500199	68,93	617658	20,000	g/L
2	Glicerol	12,843	3431202	20,57	171207	7,500	g/L
3	Etanol	20,335	1752042	10,50	58179	7,496	g/L

Figura 60. Cromatograma obtido após injeção da amostra em HPLC.

Após processamento e análise dos resultados, os perfis do consumo de glucose e produção de etanol e glicerol dos cultivos realizados foram obtidos.

Foi realizada a média dos dados das triplicatas e os valores de consumo de glucose, produção e rendimento de etanol são mostrados na Tabela 12. Todos os rendimentos foram calculados como quantidade de glicerol ou etanol produzida por quantidade de glucose consumida e são apresentados com base em 1 grama de glucose.

Tabela 12. Valores da média do consumo de glucose, produção e rendimento de etanol obtido no teste fermentativo em meio YNB para cada linhagem.

Linhagem	Consumo de Glucose (g/L)	Produção Etanol (g/L)	Rendimento (g/g)	% Teórico
JAY 270 ^a	24.89	9.29	0.37	73.16
FGY 031 ^g	25.70	6.38	0.25	48.63
FGY 050 ^{bc}	25.03	8.73	0.35	68.43
FGY 042 ^{de}	25.10	7.97	0.32	62.25
FGY 073 ^e	22.91	7.16	0.31	61.26
AZY 335 ^f	20.17	5.82	0.29	56.61
AZY 531 ^{ab}	23.32	8.51	0.36	71.56
AZY 672 ^h	22.82	4.59	0.20	39.48
AZY 773 ⁱ	7.96	0.00	0.00	0.00
AZY 872 ⁱ	10.26	0.00	0.00	0.00
FY 23 ^{cd}	17.86	6.06	0.34	66.53
AFY 109 ^{ab}	17.72	6.48	0.37	71.71
AFY 511 ^{ab}	22.99	8.42	0.37	71.81
AFY 634 ^g	11.25	2.75	0.24	47.87
AFY 640 ^h	15.05	3.13	0.21	40.80
AFY 733 ⁱ	9.54	0.00	0.00	0.00
AFY 833 ⁱ	9.72	0.00	0.00	0.00

^{a,b,c,d,e,f,g,h,i} Linhagens seguidas pela mesma letra não têm valores de rendimento diferentes estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey (p < 0,05).

Os dados da produção de etanol foram convertidos em gráficos de barra e são apresentados na Figura 61. A legenda acima do gráfico representa o genótipo das linhagens.

<i>URA3</i>	+	-	-	-	-	*	*	-	-	-	-	-	*	-	*	-	-
<i>ADH1</i>	+	+	+	+	+	-	*	-	-	-	+	+	*	-	-	-	-
<i>TPI1</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+

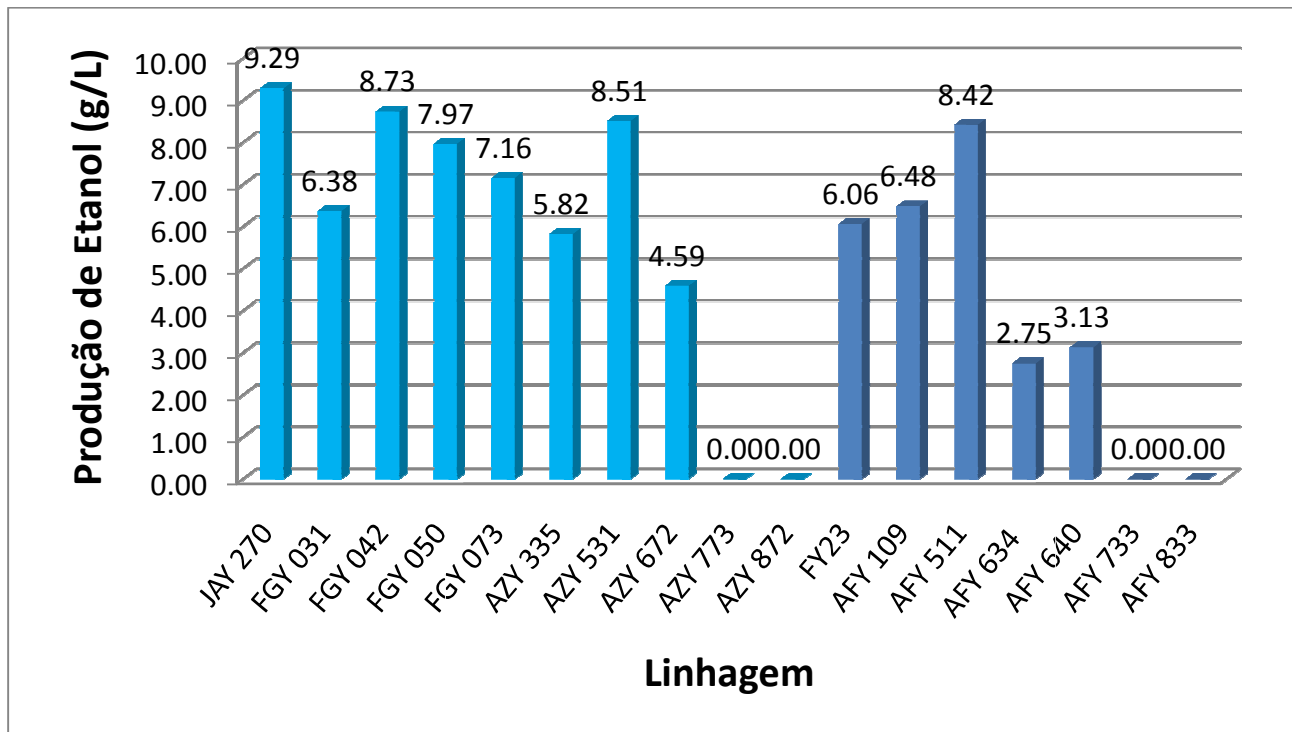


Figura 61. Gráfico da produção total de etanol em meio YNB das linhagens selvagens e modificadas. Azul-claro refere-se às linhagens industriais, enquanto azul-escuro às linhagens de laboratório. Os sinais +, - e * correspondem à presença do gene original, deleção do gene e gene complementado, respectivamente.

Pode-se observar que a linhagem que produziu maior quantidade de etanol foi a linhagem JAY270, como esperado. Além disso, as linhagens com deleção do gene *TPI1* e duplo mutantes não produziram etanol. Entretanto, nem todas as linhagens foram capazes de consumir toda a glucose, portanto os resultados são expressos de maneira mais adequada em termos de rendimento de etanol por grama de glucose consumida. A Figura 62 apresenta os resultados de rendimento.

<i>URA3</i>	+	-	-	-	-	*	*	-	-	-	-	-	*	-	*	-	-
<i>ADH1</i>	+	+	+	+	+	-	*	-	-	-	+	+	*	-	-	-	-
<i>TPI1</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+

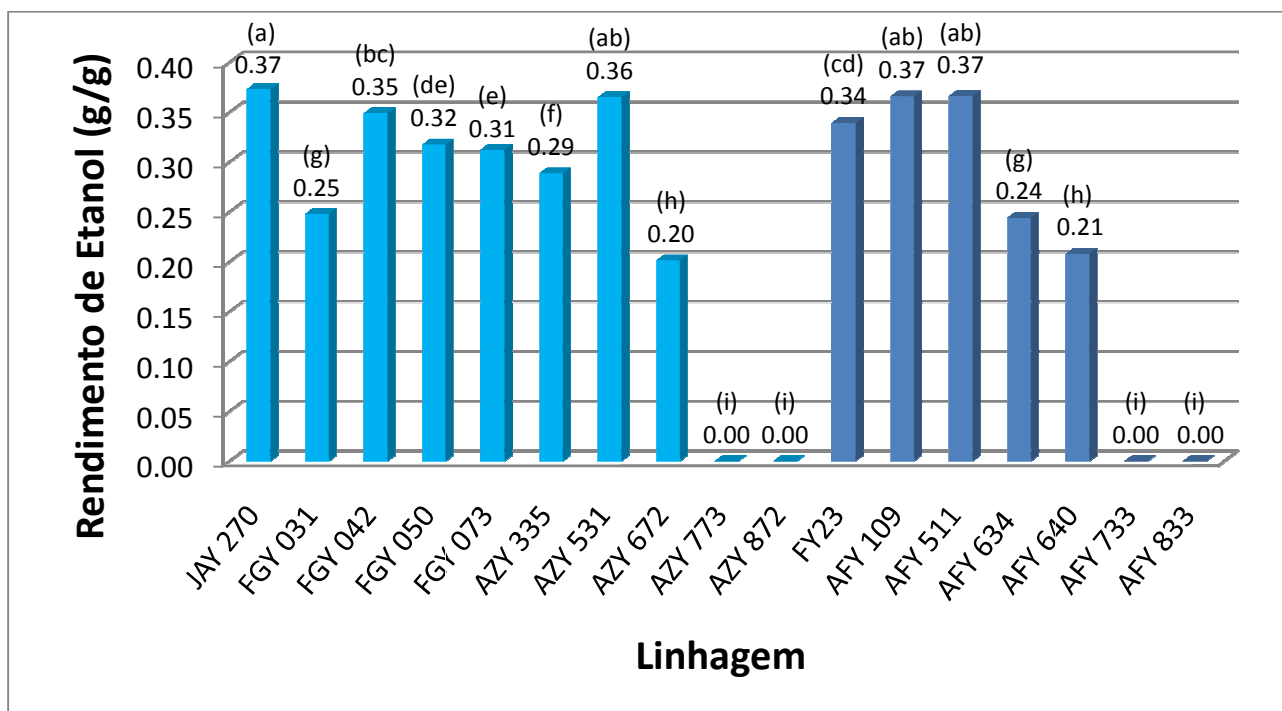


Figura 62. Gráfico do rendimento de etanol a partir da glucose, em meio YNB, em linhagens selvagens e modificadas. Azul-claro refere-se às linhagens industriais, enquanto azul-escuro às linhagens de laboratório. a,b,c,d,e,f,g,h,i Linhagens seguidas pela mesma letra não têm valores de rendimento diferentes estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey ($p < 0,05$). Os sinais +, - e * correspondem à presença do gene original, deleção do gene e gene complementado, respectivamente.

Pelo gráfico do rendimento pode-se comprovar que as linhagens JAY270, AFY109 e AFY511 tiveram o maior rendimento, de 0,37 g/g. Além disso, de acordo com a análise estatística, a linhagem AZY531 também está entre as maiores produtoras. As linhagens com deleção do gene *ADH1* tiveram um rendimento entre 0,20-0,29 g/g.

Os valores de consumo de glucose, produção e rendimento de glicerol são mostrados na Tabela 13.

Tabela 13. Valores da média do consumo de glucose, produção e rendimento de glicerol obtido no teste fermentativo em meio YNB para cada linhagem.

Linhagem	Consumo de Glucose (g/L)	Produção Glicerol (g/L)	Rendimento (g/g)	% Teórico
JAY 270 ^{ij}	24.89	0.55	0.02	4.29
FGY 031 ^{ij}	25.70	0.61	0.02	4.64
FGY 050 ^{hi}	25.03	0.99	0.04	7.78
FGY 042 ^{hi}	25.10	1.29	0.05	10.04
FGY 073 ^{hi}	22.91	0.91	0.04	7.75

AZY 335 ^g	20.17	2.31	0.11	22.44
AZY 531 ^{hi}	23.32	0.93	0.04	7.81
AZY 672 ^d	22.82	5.41	0.24	46.51
AZY 773 ^a	7.96	3.00	0.38	73.92
AZY 872 ^b	10.26	3.37	0.33	64.42
FY 23 ^j	17.86	0.10	0.01	1.05
AFY 109 ^{ij}	17.72	0.37	0.02	4.08
AFY 511 ^{hi}	22.99	0.94	0.04	8.00
AFY 634 ^e	11.25	2.24	0.20	39.01
AFY 640 ^f	15.05	2.57	0.17	33.45
AFY 733 ^c	9.54	2.91	0.31	59.83
AFY 833 ^{bc}	9.72	3.20	0.33	64.50

a,b,c,d,e,f,g,h,i,j Linhagens seguidas pela mesma letra não têm valores de rendimento diferentes estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey ($p < 0,05$).

Os dados da produção de glicerol foram convertidos em gráficos de barra e são apresentados na Figura 63.

<i>URA3</i>	+	-	-	-	-	*	*	-	-	-	-	-	*	-	*	-	-
<i>ADH1</i>	+	+	+	+	+	-	*	-	-	-	+	+	*	-	-	-	-
<i>TPI1</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+

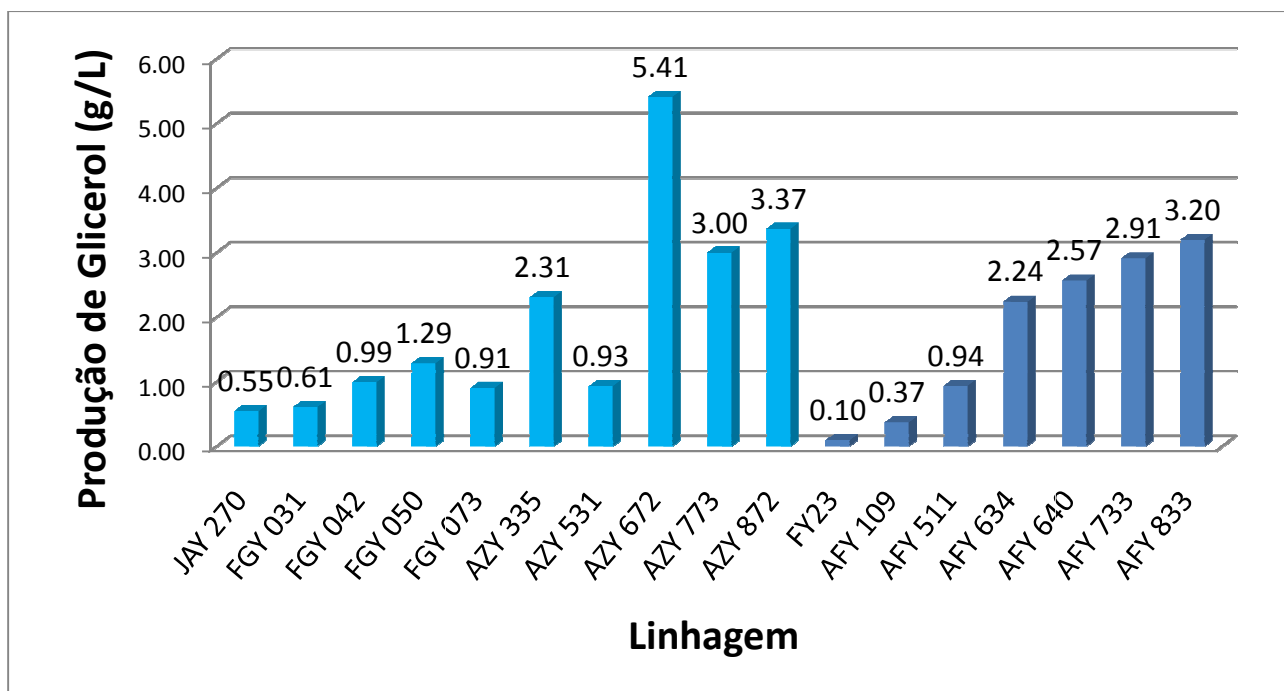


Figura 63. Gráfico da produção total de glicerol em meio YNB das linhagens selvagens e modificadas. Azul-claro refere-se às linhagens industriais, enquanto azul-escuro às linhagens de laboratório. Os sinais +, - e * correspondem à presença do gene original, deleção do gene e gene complementado, respectivamente.

As linhagens selvagens produziram entre 0,10 e 0,55 g de glicerol, compatíveis com os dados da literatura, já as linhagens FGYs produziram ao redor de 1 g de glicerol. Pode-se observar que a linhagem que produziu maior quantidade de glicerol foi a linhagem AZY672, $\Delta adh1$. Entretanto, nem todas as linhagens foram capazes de consumir toda a glucose, portanto os resultados podem ser mais bem expressados em termos de rendimento de glicerol por grama de glucose consumida. A Figura 64 apresenta os resultados de rendimento.

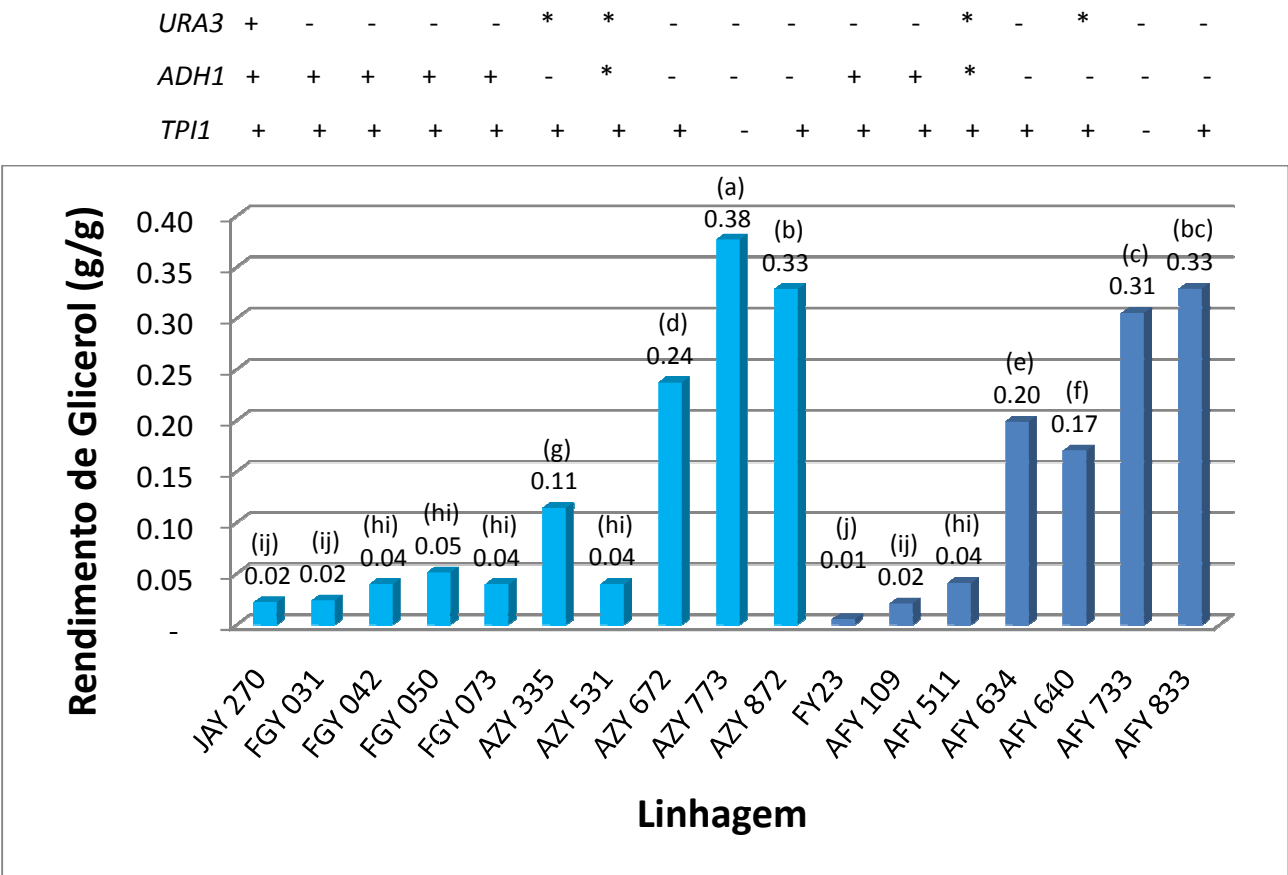


Figura 64. Gráfico do rendimento de glicerol a partir da glucose, em meio YNB, em linhagens selvagens e modificadas. Azul-claro refere-se às linhagens industriais, enquanto azul-escuro às linhagens de laboratório. a,b,c,d,e,f,g,h,i,j Linhagens seguidas pela mesma letra não têm valores de rendimento diferentes estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey ($p < 0,05$). Os sinais +, - e * correspondem à presença do gene original, deleção do gene e gene complementado, respectivamente.

Quando se apresentam os dados de rendimento, pode-se verificar que a linhagem AZY773, industrial e duplo mutante, foi a linhagem capaz de fazer a melhor conversão de glucose a glicerol, chegando ao redor de 74% do máximo teórico. Já a linhagem duplo mutante de laboratório alcançou um rendimento de apenas 60% do máximo teórico. As linhagens selvagens tiveram rendimentos ao redor de 0,02 g/g, próximo aos obtidos na literatura. Entre as linhagens $\Delta adh1$ o rendimento foi bastante variado, sendo possível observar que as linhagens deletadas com o cassete ADH1pCORE tiveram menores rendimentos de glicerol quando comparadas com as linhagens deletadas com o

cassete ADH1-HYG. O rendimento para os mutantes $\Delta tpi1$ ficou em 0,33 g/g, tanto para a linhagem industrial quanto para a linhagem de laboratório.

Após a análise de todos os dados pode-se concluir que as modificações realmente foram capazes de desviar o fluxo metabólico do etanol para o glicerol. As figuras 65, 66, 67, 68 e 69 mostram a evolução do desvio do fluxo metabólico com as diversas modificações genéticas, nas leveduras industriais, através do consumo da glucose e da produção de etanol e glicerol.

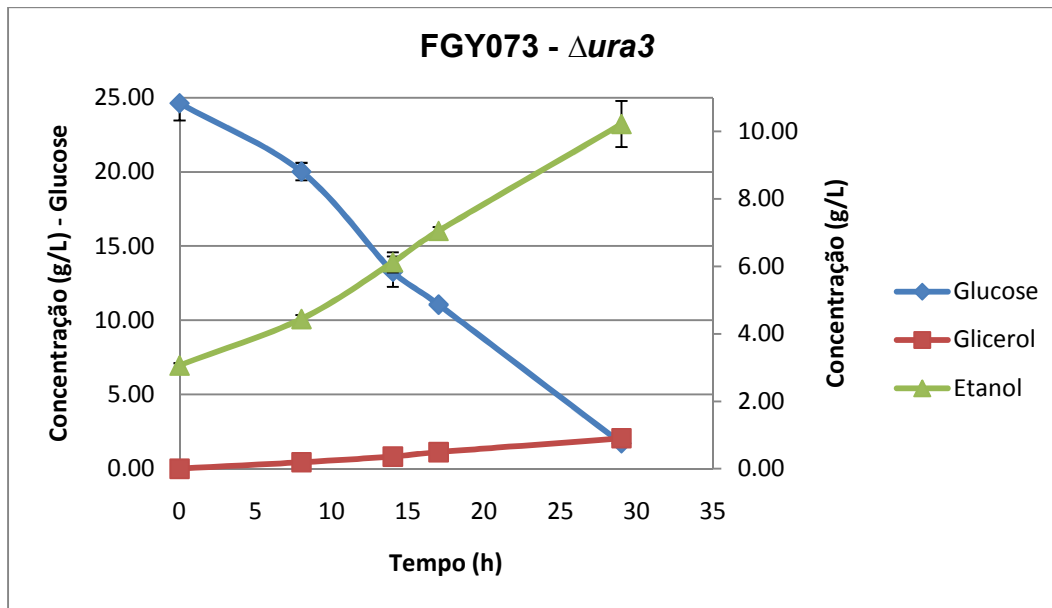


Figura 65. Gráfico do perfil de produção em meio YNB da linhagem FGY073, industrial, que possui apenas o gene *URA3* deletado.

A linhagem FGY073 apresentou um perfil característico, consumindo quase toda a glucose e produzindo grande quantidade de etanol e pequena quantidade de glicerol. Apesar de ser um perfil característico a linhagem tem uma taxa de consumo de glucose muito menor do que a levedura industrial JAY270.

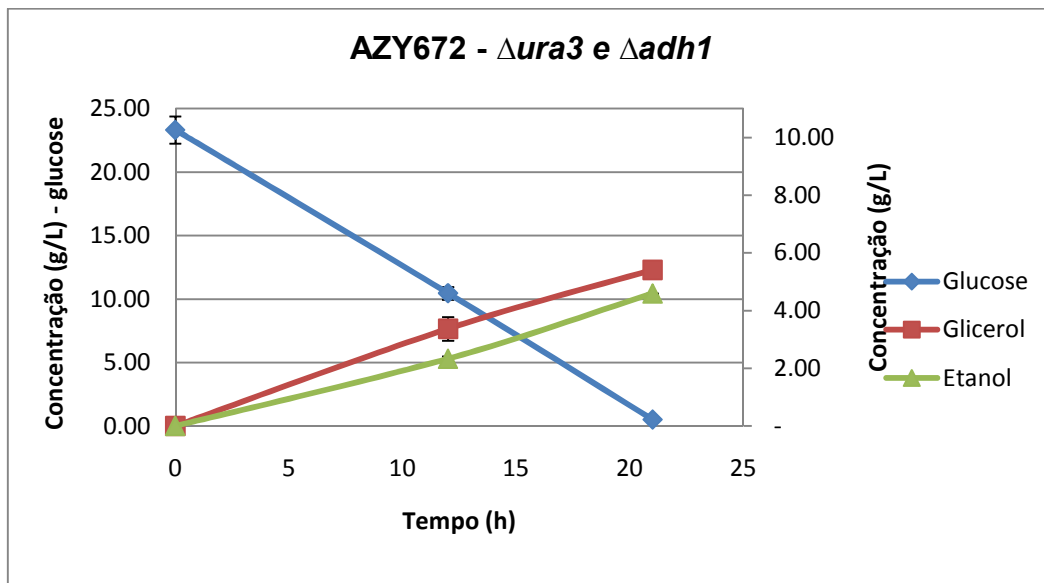


Figura 66. Gráfico do perfil de produção em meio YNB da linhagem AZY672, industrial, $\Delta ura3$, após a deleção do gene *ADH1*.

A linhagem AZY672 corresponde ao mutante $\Delta adh1$, e após essa primeira modificação já é possível observar a inversão da produção. A linhagem consumiu toda a glucose, entretanto passou a produzir mais glicerol do que etanol.

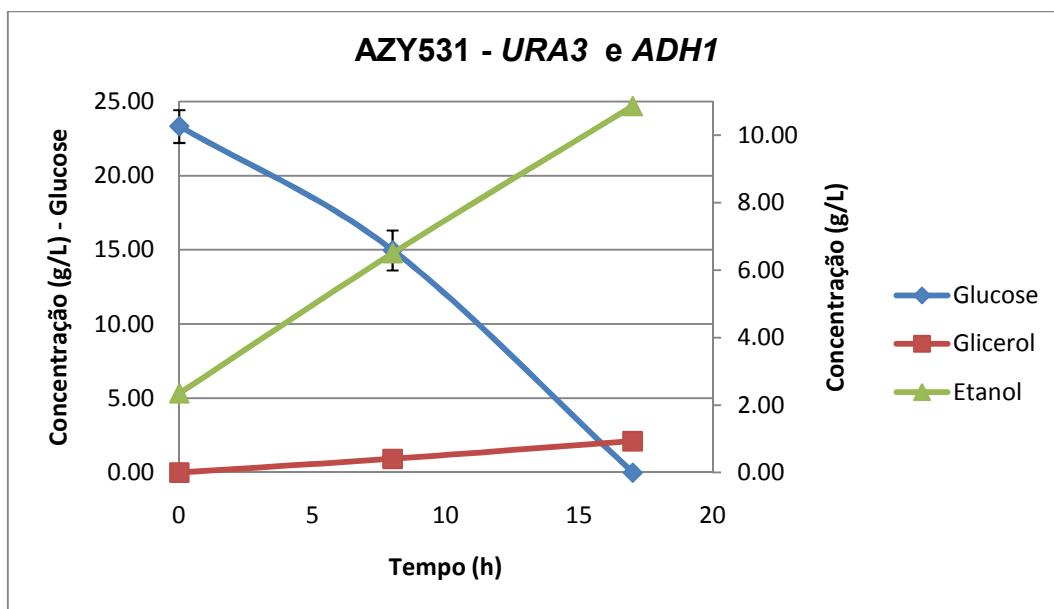


Figura 67. Gráfico do perfil de produção em meio YNB da linhagem AZY531, industrial, $\Delta ura3$, $\Delta adh1$, após a complementação com o plasmídeo YEpADH1.

A linhagem AZY531 demonstra a complementação dos genes *ADH1* e *URA3*. A linhagem passa a apresentar novamente o perfil de produção característico, consumindo toda a glucose e produzindo grande quantidade de etanol e pouco glicerol. A glucose foi consumida em menos de 20 horas, enquanto a linhagem FGY031 levou mais de 30 horas para consumir a mesma quantidade.

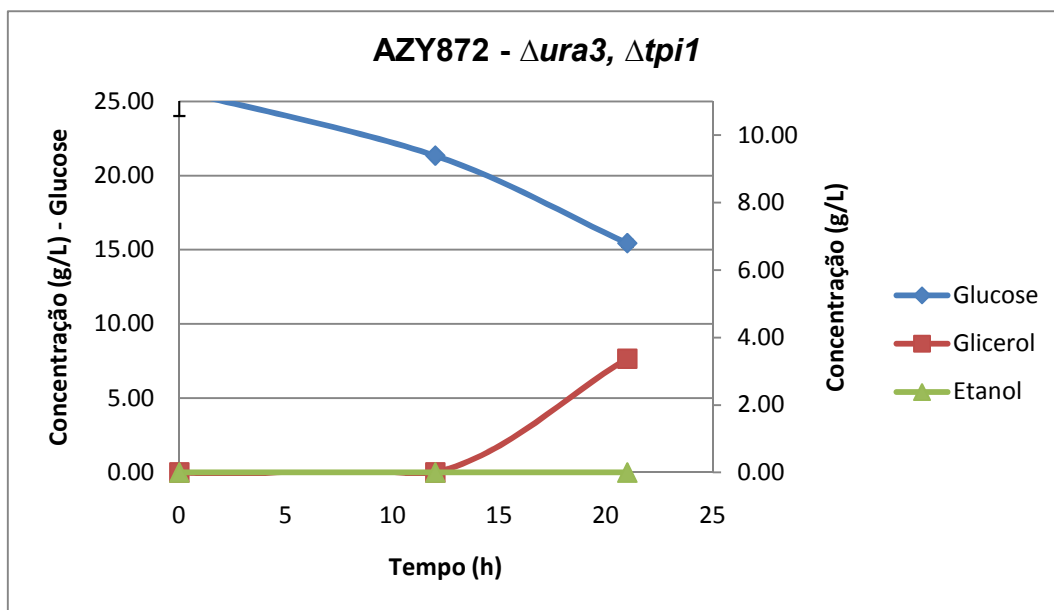


Figura 68. Gráfico do perfil de produção em meio YNB da linhagem AZY872, industrial, $\Delta ura3$, após a deleção do gene *TPI1*.

A linhagem AZY872 possui um perfil bem diferenciado, consumindo apenas 10 gramas de glucose em 20 horas. Além disso, não houve produção de etanol, sendo toda a glucose convertida em glicerol.

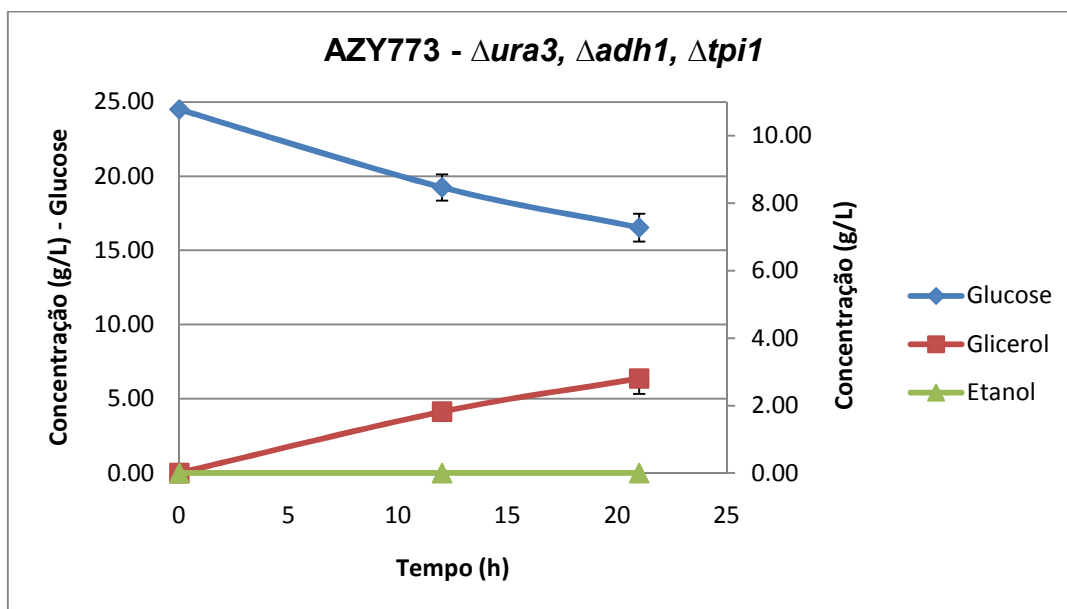


Figura 69. Gráfico do perfil de produção em meio YNB da linhagem AZY773, industrial, $\Delta ura3$, após a deleção dos genes *ADH1* e *TPI1*.

A linhagem AZY773 possui um perfil similar ao da linhagem AZY872, mas consumiu menos de 10 gramas de glucose em 20 horas. Apesar disso, foi capaz de produzir maior quantidade de glicerol que a linhagem AZY872. Essa linhagem também não apresentou produção de etanol.

5.9 Fermentação em meio YEPD

Foi realizado outro teste fermentativo, mas desta vez em meio YEPD. Por ser um meio complexo, não possibilita a retirada da uracila de sua composição, portanto as linhagens com o plasmídeo YEpADH1 não foram utilizadas nesse teste. Além disso, como o teste anterior não mostrou diferenças entre linhagens haplóides e diplóides, foram escolhidas apenas algumas linhagens para a realização desse teste. As linhagens utilizadas nessa fermentação estão na Tabela 14. Todos os testes foram realizados em triplicata e o desvio padrão foi calculado.

Tabela 14. Linhagens utilizadas para teste fermentativo em YEPD.

Linhagem	Genótipo
AFY 109	laboratório - diplóide - <i>ura3-52, leu2Δ1</i>
JAY 270	industrial – diploid
FGY 073	industrial - diplóide - $\Delta ura3$
AFY 634	laboratório - diplóide - <i>ura3-52, leu2Δ1, Δadh1</i> com ADH1-HYG
AFY 640	laboratório - diplóide - <i>ura3-52, leu2Δ1, Δadh1</i> com ADH1pCORE - <i>URA3 (K.lactis)</i>
AZY 672	industrial - diplóide - $\Delta ura3, \Delta adh1$ com ADH1-HYG
AZY 335	industrial - <i>MATa - Δura3, Δadh1</i> com ADH1pCORE - <i>URA3 (K. lactis)</i>
AFY 833	laboratório - diplóide - <i>ura3-52, leu2Δ1, Δtpi1</i> com TPI1-KAN
AZY 872	industrial - diplóide - $\Delta ura3, \Delta tpi1$ com TPI1-KAN
AFY 733	industrial - diplóide - $\Delta ura3, \Delta adh1, \Delta tpi1$
AZY 773	industrial - diplóide - $\Delta ura3, \Delta adh1, \Delta tpi1$

As amostras foram retiradas a cada duas horas e a densidade ótica (DO) foi medida, dando origem à curva de crescimento celular mostrada na Figura 70.

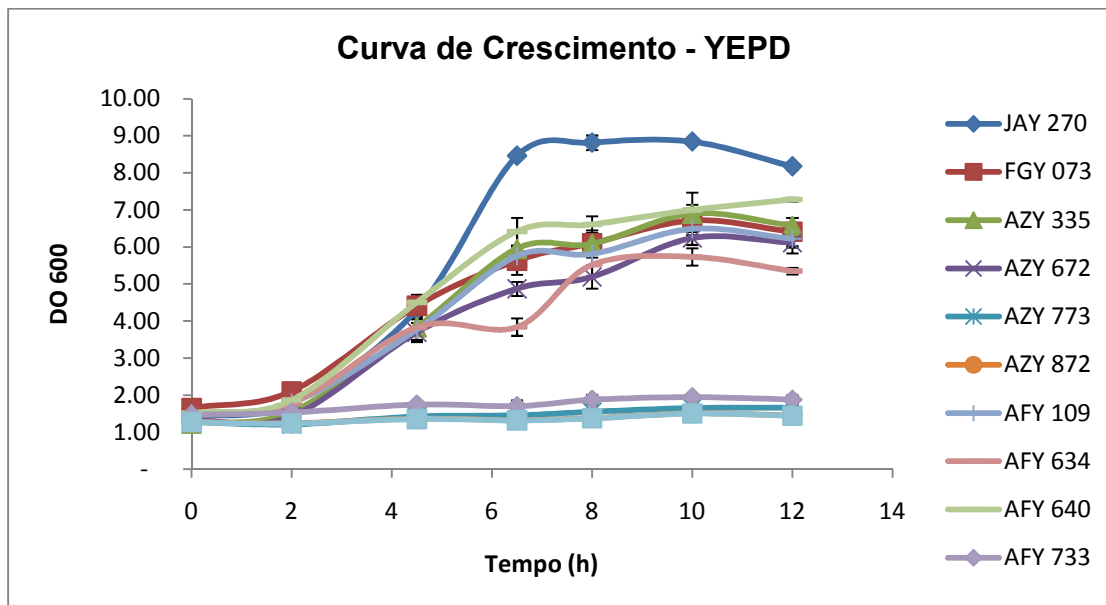


Figura 70. Curva de crescimento em meio YEPD.

Também em meio YEPD, a linhagem JAY270 apresenta, não apenas uma taxa de crescimento maior, mas também uma formação de biomassa muito maior em relação a todas as outras linhagens. Entretanto, nesse meio é possível distinguir grupos mais bem formados no que tange ao crescimento. As linhagens com deleção do gene *ADH1* apresentam um crescimento intermediário enquanto as linhagens com a deleção do gene *TPI1* e os duplo mutantes não apresentam crescimento. Para uma melhor visualização das diferenças de crescimento entre as linhagens FGY073, AFY109 e $\Delta adh1$ apresenta-se a Figura 71, gráfico da curva de crescimento apenas com as linhagens FGY073, AFY109, AZY335, AZY672, AFY634 e AFY640.

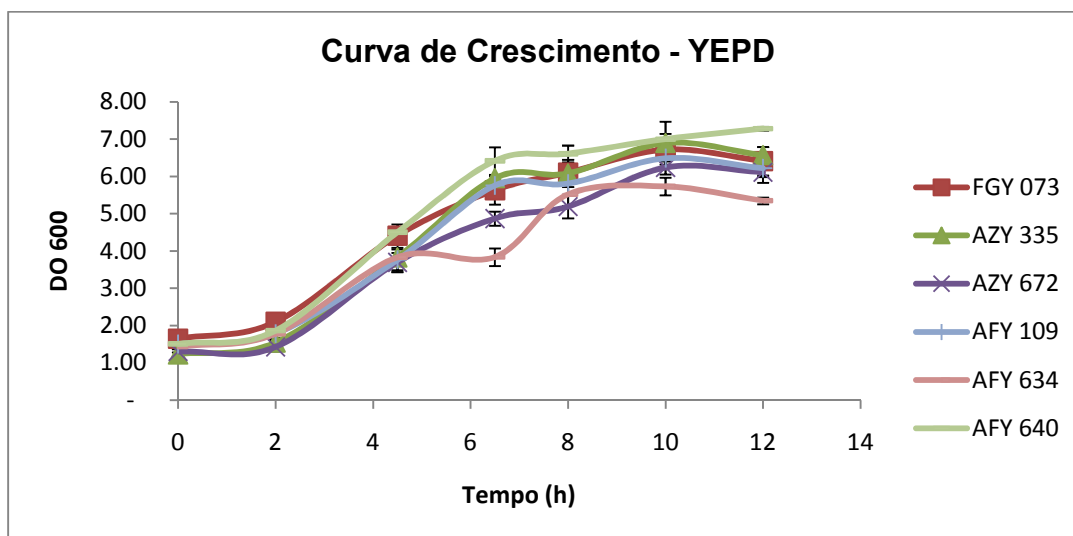


Figura 71. Curva de crescimento em meio YEPD com as linhagens FGY073, AFY109, AZY335, AZY672, AFY634 e AFY640.

Pela Figura 71 pode-se observar que as linhagens com o gene *ADH1* deletado pelo cassete ADH1pCORE (AFY634 e AZY672) apresentaram maior formação de biomassa do que as linhagens transformadas com o cassete ADH1-HYG, confirmando que, mesmo em meio sem limitação de uracila, a ausência do gene *URA3* possui um efeito negativo sobre o crescimento. Com um inóculo maior, a fase de adaptação e a menor taxa de crescimento das linhagens $\Delta adh1$ presentes no teste anterior não acontecem, não sendo visível uma diferença significativa de perfil de crescimento entre as linhagens FGY073 e as linhagens $\Delta adh1$.

A Figura 72 apresenta apenas o crescimento das linhagens AFY833, AZY872, AFY733 e AFY773. Pode-se observar que as linhagens com o gene *TPI1* deletado e com os genes *ADH1* e *TPI1* deletados continuaram estáveis durante todo o experimento, mesmo tendo começado com uma OD ao redor de 1,5, o que comprova a incapacidade dessas linhagens de crescer em meio com glucose.

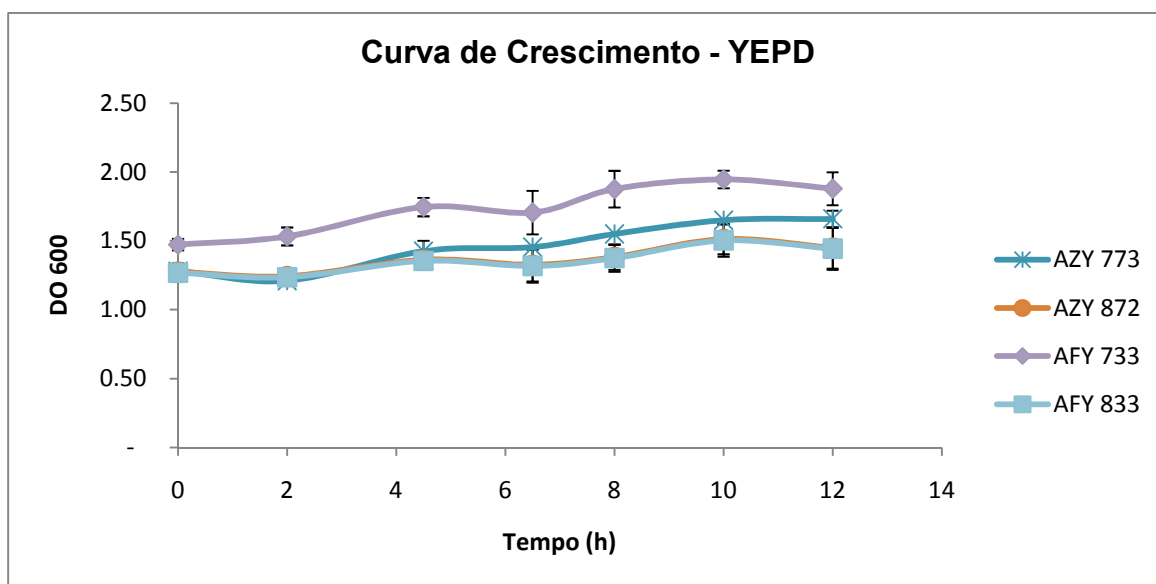


Figura 72. Curva de crescimento em meio YEPD com as linhagens AFY833, AZY872, AFY733 e AFY773.

Foi realizada a média dos dados das triplicatas e os valores de consumo de glucose, produção e rendimento de etanol são mostrados na Tabela 15. Todos os rendimentos foram calculados como quantidade de glicerol ou etanol produzida por quantidade de glucose consumida e são apresentados com base em 1 grama de glucose.

Tabela 15. Valores da média do consumo de glucose, produção e rendimento de etanol obtido no teste fermentativo em meio YEPD para cada linhagem.

Linhagem	Consumo de Glucose (g/L)	Produção Etanol (g/L)	Rendimento	% Teórico
JAY 270 ^a	22.93	9.62	0.42	82.28
FGY 073 ^{abc}	22.95	8.95	0.39	76.50
AZY 335 ^{bc}	23.00	5.60	0.37	73.29
AZY 672 ^c	23.05	5.18	0.36	69.63

AZY 773 ^d	3.73	0.00	0.00	0.00
AZY 872 ^d	12.93	0.00	0.00	0.00
AFY 109 ^{ab}	22.90	9.15	0.40	78.34
AFY 634 ^c	22.96	5.47	0.37	72.35
AFY 640 ^{bc}	22.89	5.52	0.37	73.01
AZY 733 ^d	2.49	0.00	0.00	0.00
AFY 833 ^d	13.05	0.00	0.00	0.00

^{a,b,c,d} Linhagens seguidas pela mesma letra não têm valores de rendimento diferentes estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey ($p < 0,05$).

O gráfico comparando os rendimentos de etanol pode ser visualizado na Figura 73, como novamente nem todas as linhagens foram capazes de consumir toda a glucose esse é um parâmetro comparativo melhor do que a produção total.

<i>URA3</i>	+	-	*	-	-	-	-	-	*	-	-
<i>ADH1</i>	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-
<i>TPI1</i>	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+

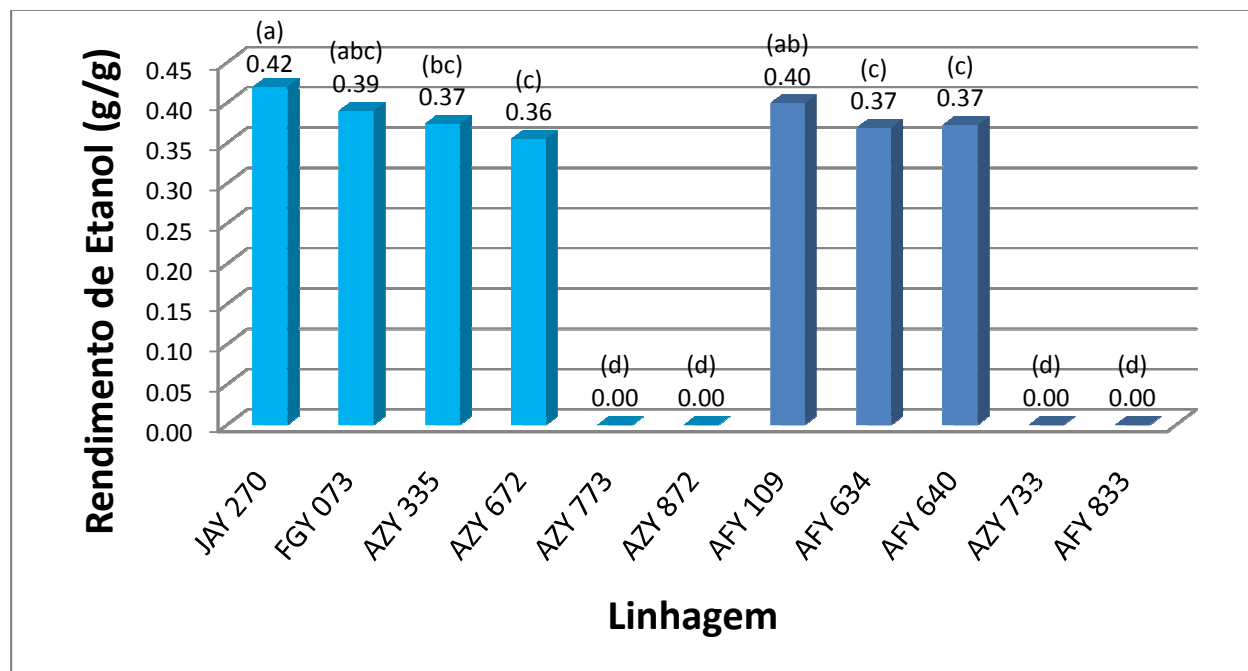


Figura 73. Gráfico do rendimento de etanol a partir da glucose, em meio YEPD, em linhagens selvagens e modificadas. Azul-claro refere-se às linhagens industriais, enquanto azul-escuro às linhagens de laboratório.

^{a,b,c,d,e,f,g} Linhagens seguidas pela mesma letra não têm valores de rendimento diferentes estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey ($p < 0,05$). Os sinais +, - e * correspondem à presença do gene original, deleção do gene e gene complementado, respectivamente.

Pelo gráfico do rendimento pode-se comprovar que, no meio YEPD, a linhagem JAY270 possui um rendimento acima de todas as outras. As linhagens $\Delta adh1$ tiveram pequenas diferenças de rendimento em relação à fermentação em YNB, entretanto a tendência foi mantida. As linhagens $\Delta tpi1$ e duplo mutantes não produziram etanol.

Os valores de consumo de glicose, produção e rendimento de glicerol são mostrados na Tabela 16.

Tabela 16. Valores da média do consumo de glicose, produção e rendimento de glicerol obtido no teste fermentativo em meio YEPD para cada linhagem.

Linhagem	Consumo de Glucose (g/L)	Produção Glicerol (g/L)	Rendimento	% Teórico
JAY 270 ^g	22.93	0.66	0.03	5.66
FGY 073 ^g	22.95	0.89	0.04	7.62
AZY 335 ^f	23.00	2.97	0.13	25.30
AZY 672 ^d	23.05	4.99	0.22	42.49
AZY 773 ^a	3.73	1.33	0.36	69.84
AZY 872 ^b	12.93	3.81	0.29	57.81
AFY 109 ^g	22.90	0.61	0.03	5.21
AFY 634 ^{de}	22.96	4.43	0.19	37.86
AFY 640 ^e	22.89	3.85	0.17	32.99
AZY 733 ^c	2.49	0.63	0.25	49.79
AFY 833 ^b	13.05	4.07	0.31	61.11

a,b,c,d,e,f,g Linhagens seguidas pela mesma letra não têm valores de rendimento diferentes estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey ($p < 0,05$).

O gráfico de rendimento de glicerol pela glicose consumida é apresentado na Figura 74.

URA3	+	-	*	-	-	-	-	-	*	-	-
ADH1	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-
TPI1	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+

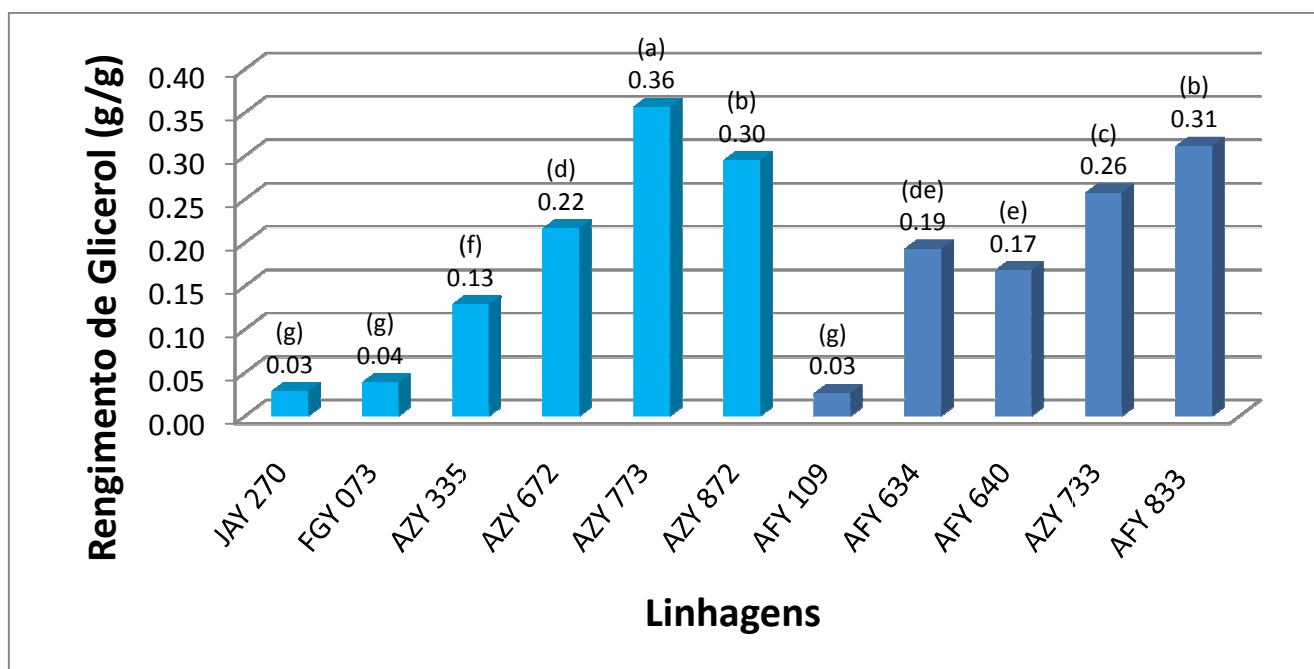


Figura 74. Gráfico do rendimento de glicerol a partir da glicose, em meio YEPD, em linhagens selvagens e modificadas. Azul-claro refere-se às linhagens industriais, enquanto azul-escuro às linhagens de laboratório. Os sinais +, - e * correspondem à presença do gene original, deleção do gene e gene complementado, respectivamente.

Através da análise dos dados de rendimento em glicerol pode-se verificar que a linhagem AZY773, industrial e duplo mutante, foi a linhagem capaz de fazer a melhor conversão de glucose a glicerol, em meio YEPD, chegando a 0,36 g/g. A linhagem de laboratório com a mesma modificação teve um rendimento de apenas 0,26 g/g. As linhagens selvagens mantiveram valores de rendimento compatíveis com a literatura. Entre as linhagens $\Delta adh1$ o rendimento foi novamente bastante variado, e mais uma vez foi possível observar que as linhagens deletadas com o cassete ADH1pCORE tiveram menores rendimentos de glicerol quando comparadas com as linhagens deletadas com o cassete ADH1-HYG. O rendimento para os mutantes $\Delta tpi1$ ficou ao redor de 0,31 g/g, tanto para a linhagem industrial quanto para a linhagem de laboratório.

Os perfis de consumo de glucose e de produção de etanol e glicerol foram muito similares aos obtidos no teste com meio YNB. As Figuras 75 e 76 mostram o perfil produtivo das linhagens JAY270 e AFY109, respectivamente e as Figuras 77 e 78 o perfil produtivo das linhagens AFY733 e AZY773, respectivamente.

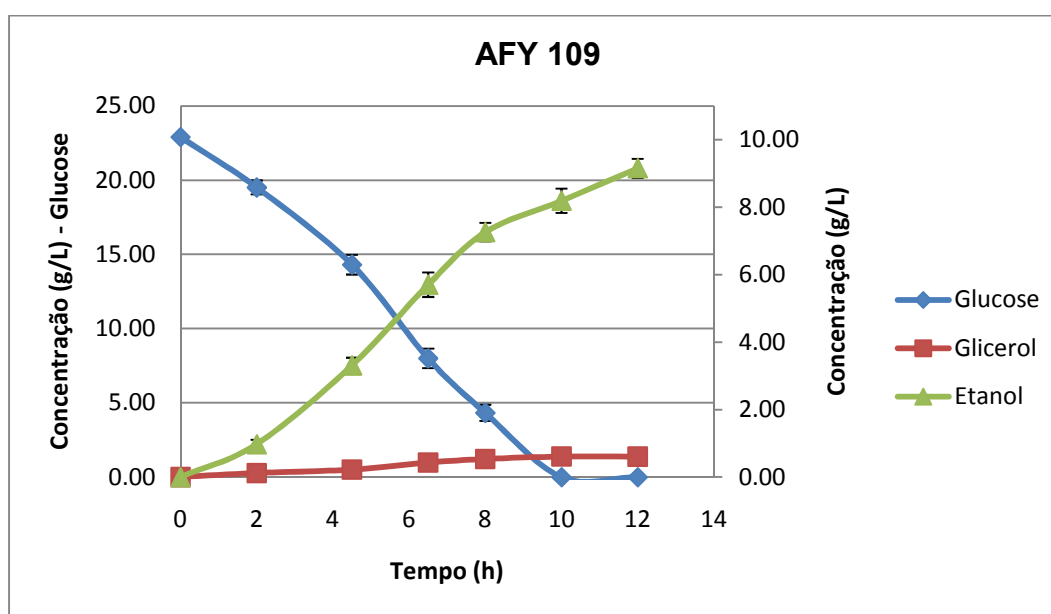


Figura 75. Gráfico do perfil de produção da linhagem de laboratório AFY109.

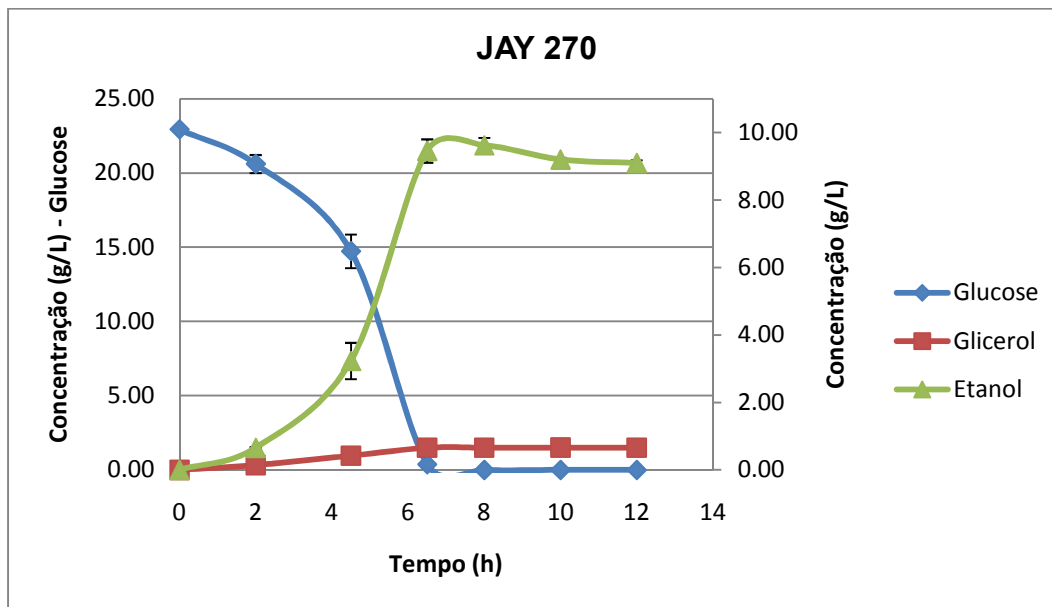


Figura 76. Gráfico do perfil de produção da linhagem industrial selvagem JAY270.

As linhagens JAY270 e AFY109 apresentaram um perfil característico, consumindo toda a glucose e produzindo grande quantidade de etanol e pequena quantidade de glicerol. Entretanto, é possível observar as diferenças na taxa de consumo de glucose e de produção de etanol entre as duas linhagens. Enquanto a linhagem AFY109 leva 10 horas para esgotar a glucose do meio, a linhagem JAY270 necessita de apenas 6 horas para consumir a mesma quantidade de glucose.

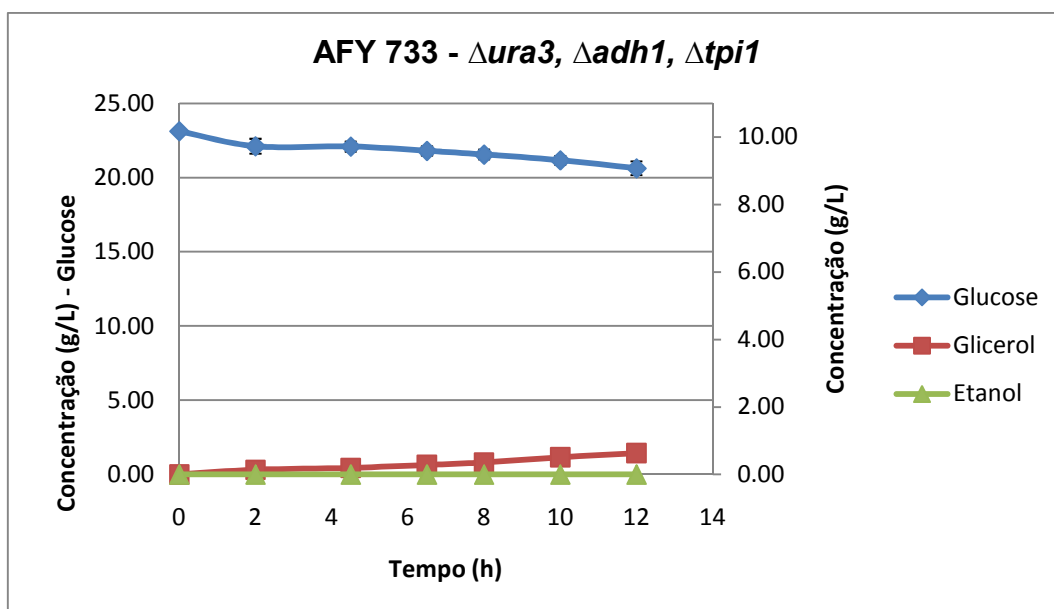


Figura 77. Gráfico do perfil de produção da linhagem AZY733, de laboratório, após a deleção dos genes *ADH1* e *TPI1*.

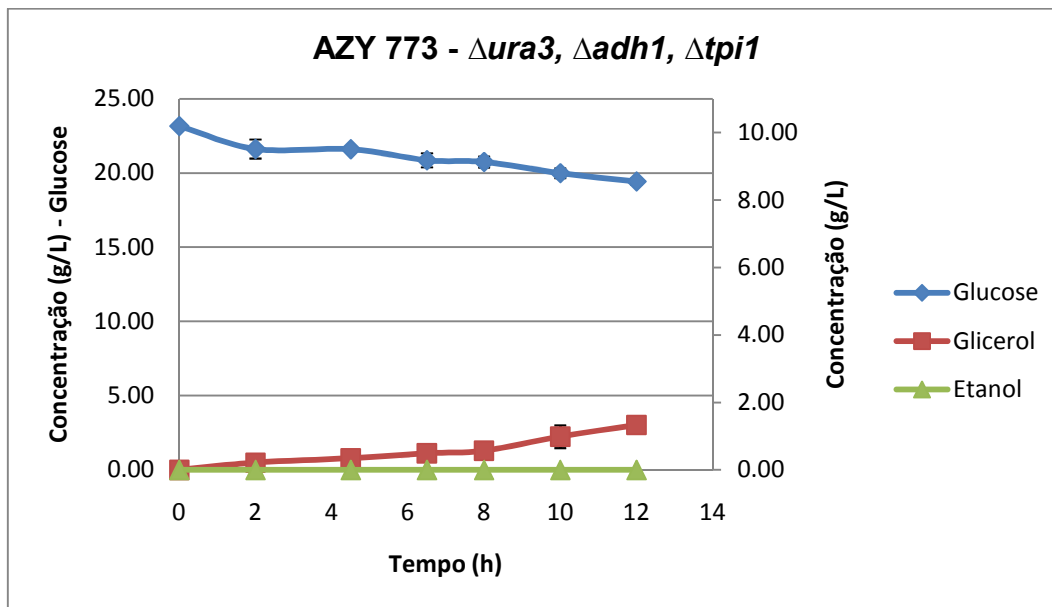


Figura 78. Gráfico do perfil de produção da linhagem AZY773, industrial, $\Delta ura3$, após a deleção dos genes *ADH1* e *TPI1*.

As linhagens AFY733 e AZY773 possuem um perfil bem diferenciado, consumindo menos de 5 gramas de glucose em 12 horas. Além disso, não há produção de etanol, sendo toda a glucose consumida convertida em glicerol. A linhagem industrial, entretanto é capaz de converter a glucose em glicerol com maior eficiência.

A análise dos quatro gráficos permite perceber a maior capacidade de produção das linhagens industriais em comparação com as linhagens de laboratório.

6. Discussão

6.1 Deleção de genes por integração homóloga

Dentre os métodos de transformação de leveduras a eletroporação é o mais rápido e fácil, entretanto a eficiência desse método varia de acordo com a linhagem utilizada (Ausubel et al. 2003). Além disso, a eficiência da transformação que é de 10^5 transformantes/ μg DNA para plasmídeos circulares, cai para 10^2 transformantes/ μg DNA quando se pretende a recombinação homóloga com cassete linear (Ausubel et al. 2003). A transformação de leveduras *S. cerevisiae* de laboratório por eletroporação é relativamente fácil, uma vez que essas linhagens já foram extensivamente estudadas. Entretanto, para a linhagem industrial JAY270, derivada da PE-2, um *screening* maior é necessário para a obtenção de mutantes por recombinação homóloga. Isso pode ser devido à características inerentes da linhagem, uma vez que ela foi isolada do processo industrial de fabricação do etanol, um ambiente extremamente competitivo e com vários fatores de estresse, como altas temperaturas, baixo pH e estresse osmótico causado pelas altas concentrações de açúcares e sais. (Basso et al. 2008)

Outro ponto importante é o tamanho da região de homologia utilizado nos cassetes. Quanto maior a região de homologia, mais facilmente ocorre a recombinação homóloga. Isso foi observado na transformação das linhagens com os cassetes ADH1-HYG e ADH1pCORE. A transformação com o cassete ADH1pCORE, com uma região de apenas 43 pb, gerou sempre um número muito menor de transformantes para todas as linhagens. Apesar de terem sido tentadas várias transformações com esse cassete na linhagem FGY042 não foi possível a obtenção de transformantes.

6.2 Obtenção dos mutantes

A obtenção de mutantes para o gene *ADH1* foi conseguida através de diversas tentativas de transformação e do aumento do *screening* para verificação dos transformantes.

Entretanto, após a deleção do gene ADH1 houve um decréscimo na taxa de crescimento das linhagens, fenômeno descrito por Drewke, Thielen, & Ciriacy 1990 e Cordier et al. 2007. Essa redução pode ser devida à taxa insuficiente de redução de NADH pelo GPD1 e/ou à acumulação de acetaldeído (Cordier et al. 2007).

Além da dificuldade inerente ao processo de transformação das leveduras, a diminuição da taxa de crescimento das linhagens $\Delta adh1$ impossibilitou a realização de transformações consecutivas. A alteração da taxa de crescimento pode ser crítica para a boa eficiência da eletroporação, uma vez que as células devem estar na fase exponencial, na qual a parede celular é menos densa, para que a eletroporação seja bem sucedida.

A obtenção de mutantes para o gene *TPI1* também necessitou de um *screening* grande, principalmente porque as linhagens demoram muito mais tempo para crescer e formaram colônias

menores. Isso pode ser devido à necessidade de crescer essas linhagens em meio com etanol como fonte de carbono.

Além da obtenção de transformantes por recombinação homóloga, também foram realizadas transformações com os plasmídeos. As linhagens $\Delta adh1$ foram transformadas com o plasmídeo YEpADH1 e, apesar do déficit de crescimento gerado pela deleção, a transformação do plasmídeo ocorreu sem problemas, provavelmente devido à maior eficiência na transformação de plasmídeos. Entretanto, mesmo considerando essa maior eficiência não foi possível a transformação do plasmídeo YEpGPD1 nas linhagens duplo mutantes $\Delta adh1$ e $\Delta tpi1$. A deleção desses dois genes modifica ainda mais o perfil de crescimento da linhagem, não sendo possível identificar uma fase exponencial bem definida.

6.3 Produção de etanol e glicerol em linhagens selvagens e modificadas

O rendimento máximo teórico de glucose a etanol é 0,51 g/g (Basso et al. 2008), entretanto esse rendimento nunca é alcançado, pois sempre há o desvio de parte da glucose para outras rotas, como formação de biomassa. O rendimento normalmente atingido industrialmente para fermentação alcoólica com *S. cerevisiae* está ao redor de 90% do máximo teórico (0,46 g/g).

As linhagens de laboratório tiveram um rendimento de etanol entre 0,34-0,37 g/g (YNB) e 0,4 g/g em YEPD. Um rendimento mais baixo para essas linhagens já era esperado, uma vez que possuem inúmeras modificações no genoma e estão adaptadas às condições de laboratório.

Os rendimentos de glicerol ficaram ao redor de 0,2 g/g. A linhagem apresentou formação de biomassa e taxa de crescimento intermediários.

A linhagem JAY270, como esperado, teve o maior rendimento em ambos os testes fermentativos com um 0,42 g/g (82%).

O rendimento de glicerol normalmente encontrado na fermentação alcoólica é de 0,1 g/g (Cordier et al. 2007). Ambos os rendimentos obtidos para a linhagem JAY270 estão abaixo desse valor (máximo de 0,03 g/g), entretanto, como o teste foi realizado em condições controladas e com baixa concentração de glucose não houve fatores de estresse. Além disso, a produção de biomassa e a taxa de crescimento da linhagem foram muito superiores a das outras linhagens em ambos os testes. Essa superioridade em todos os aspectos já era esperada, uma vez que essa linhagem foi isolada e caracterizada por ser robusta e ótima produtora de etanol, além de produzir menos glicerol (Basso et al. 2008).

As linhagens FGY (JAY270 com a mutação $\Delta ura3$) apresentaram um rendimento de etanol não só abaixo daquele apresentado pela JAY270, como também abaixo dos rendimentos da linhagem de laboratório (0,25-0,35 g/g em YNB e 0,39 g/g em YEPD).

Os rendimentos de glicerol ficaram, em ambos os meios, ao redor de 0,04 g/g. Entretanto, a maior diferença com relação à linhagem JAY270 foi na formação de biomassa. Em meio YNB, as

linhagens FGY cresceram 65% a menos que a linhagem JAY270, enquanto em meio YEPD essa diferença cai para 30%. Isso indica que o gene URA3 influencia outros processos celulares além da síntese de uracila, uma vez que esta foi suplementada em ambos os meios. O aumento de crescimento pela inserção do gene URA3 já foi reportado para linhagens de *S. cerevisiae* (Chopra, Sharma, & Ganesan 1999).

6.3.1 Deleção do gene *ADH1*

Os rendimentos de literatura obtidos para deleção do gene *ADH1* estão entre 0,19 g glicerol/g glucose e 0,29 g etanol/g glucose (Cordier et al. 2007) e 0,26 g glicerol/g glucose e 0,18 g etanol/g glucose (Drewke, Thielen, & Ciriacy 1990).

As linhagens AFY634 e AZY672, que tiveram o gene *ADH1* deletado com o cassete ADH1-HYG tiveram, respectivamente, rendimentos de glicerol ao redor de 0,195 g/g e 0,23 g/g e rendimentos de etanol de 0,24 g/g e 0,21 g/g. Os rendimentos encontrados estão dentro das faixas estabelecidas na literatura. A linhagem industrial teve um rendimento em glicerol maior que a linhagem de laboratório. A formação de biomassa ficou comprometida após a deleção do gene *ADH1*.

A produção de etanol mesmo após a deleção do gene *ADH1* é explicado pela presença de outros três genes de álcool desidrogenases (*ADH3*, *ADH4* e *ADH5*) capazes de converter acetaldeído em etanol. A maior formação de glicerol, juntamente com a diminuição do crescimento, deve-se ao acúmulo de NADH uma vez que o acetaldeído não está sendo convertido em etanol, gerando também acúmulo deste composto tóxico (Cordier et al. 2007). O NADH sobressalente é oxidado a NAD pela reação concomitante de redução da dihidroxiacetona fosfato pela enzima glicerol – 3 fosfato desidrogenase em glicerol- 3 fosfato, que é então desfosforilado gerando glicerol (Drewke, Thielen, & Ciriacy 1990). Entretanto, a enzima glicerol-3 fosfato desidrogenase pode não ser capaz de converter toda a DHAP (dihidroxiacetona fosfato), gerando, além do acúmulo desse composto, desbalanço redox, que pode afetar o crescimento celular (Cordier et al. 2007).

As linhagens AFY640 e AZY335, que tiveram o gene *ADH1* deletado com o cassete ADH1pCORE tiveram, respectivamente, rendimentos de glicerol ao redor de 0,17 g/g e 0,12 g/g e rendimentos de etanol de 0,225 g/g e 0,265 g/g. Os rendimentos de glicerol para essas linhagens estão abaixo dos citados na literatura. Dessa vez, a linhagem de laboratório teve um rendimento em glicerol maior que a linhagem industrial. A formação de biomassa não foi afetada, entretanto o perfil de crescimento foi modificado.

A diferença de resposta das duas linhagens só pode ser devida à inserção do gene URA3 de *K. lactis*, presente no pCORE, no genoma dessas linhagens, indicando, mais uma vez, que o gene URA3 tem um papel importante nos processos celulares.

6.3.2 Complementação do gene *ADH1*

A complementação do gene *ADH1* visa a verificação da capacidade de recuperação das características originais da linhagem. Como o plasmídeo também possui o gene *URA3*, foi possível realizar, concomitantemente, a complementação desse gene. Os rendimentos obtidos para as linhagens AFY511 e AZY531 foram, respectivamente, 0,37 g etanol/ g glucose e 0,36 g etanol/ g glucose e 0,04 g glicerol/ g glucose para ambas as linhagens. Os rendimentos de etanol foram significativamente iguais aos obtidos para a linhagem industrial, comprovando que a complementação do gene *ADH1* foi bem sucedida. A formação de biomassa também foi aumentada, chegando a um crescimento maior que as linhagens FGY, precursoras dessas linhagens. Isso comprova o papel fundamental do gene *URA3* na formação de biomassa em *S. cerevisiae*. Apesar de produzir uma quantidade de biomassa bem maior que as linhagens FGY, as linhagens AFY511 e AZY531 não produziram tanta biomassa quanto a linhagem JAY270. Entretanto, como comprovado, a complementação tanto do gene *ADH1* quanto do gene *URA3* foi bem sucedida. Entretanto, a complementação foi realizada com um plasmídeo do tipo YEp, que é um plasmídeo com alto número de cópias, o que pode ter causado um efeito deletério no crescimento celular. A superexpressão do gene *ADH1* já foi relacionada com uma diminuição na formação de massa celular (Gutiérrez-Lomelí et al. 2008).

6.3.3 Deleção do gene *TPI1*

Os rendimentos de glicerol da literatura para a deleção do gene *TPI* variam enormemente de 0,12 a 0,44 gramas glicerol por grama de glucose, de acordo com o tipo de cultivo.

A deleção do gene *TPI1* causou uma modificação metabólica tão grande que as linhagens AFY833 e AZY872 passaram a ser incapazes de produzir etanol, resultando em um valor nulo de rendimento. As duas linhagens tiveram um rendimento de glicerol 0,33 g/g em meio YNB. Já em meio YEPD a linhagem AFY833 teve um rendimento de glicerol de 0,31 g/g enquanto a AZY872 teve um rendimento de 0,31 g/g.

Apesar de terem tido uma alta conversão de glucose em glicerol, as linhagens praticamente não apresentaram crescimento. Essa incapacidade de crescer em glucose como única fonte de carbono deve-se ao acúmulo de dihidroxiacetona fosfato. A acumulação de DHAP pode ter algumas conseqüências no metabolismo celular, como diminuição de ATP intracelular e aprisionamento de fosfato inorgânico (Compagno et al. 2001). A acumulação de altos níveis de DHAP inibe a enzima mio-inositol sintase, codificada pelo gene *INO1*, responsável pela síntese de inositol que tem papel fundamental nas vias de transdução de sinal (Cordier et al. 2007).

6.3.4 Deleção dos genes *ADH1* e *TPI1*

Não foram encontrados dados na literatura de rendimento de glicerol para mutantes $\Delta adh1$ e $\Delta tpi1$.

Entretanto, como observado na deleção do gene *TPI1*, houve uma modificação de fluxo metabólico levando a produção apenas de glicerol. Mais uma vez as linhagens não foram capazes de produzir etanol.

O rendimento de glicerol da linhagem AFY733, de laboratório, foi de 0,31 g/g em meio YNB e 0,26 g/g em meio YEPD. A linhagem AZY773 obteve rendimentos maiores em ambos os meios, atingindo uma conversão de 0,36 g/g em meio YEPD e 0,38 g/g em meio YNB. Esse rendimento de glicerol corresponde a 74% do máximo teórico.

Entretanto, as células não são capazes de crescer em meio com glucose, apenas fazem a bioconversão do açúcar em glicerol. O efeito deletério no crescimento é devido à acumulação de DHAP nas células, uma vez que a enzima glicerol-3 fosfato desidrogenase é incapaz de metabolizar todo o DHAP em glicerol-3 fosfato. Dessa maneira, a superexpressão do gene *GPD1*, aumentando sua eficiência na conversão de DHAP em G3P, é capaz de restaurar a habilidade da levedura de crescer em glucose como fonte de carbono, aumentando ainda mais o rendimento de glicerol (Cordier et al. 2007).

7. Conclusão e Perspectivas futuras

Para a realização das modificações genéticas na levedura foram construídos os cassetes ADH1pCORE, ADH1-HYG e TPI1-KAN, todos corretamente, e dois plasmídeos: YEpADH1 e YEpGPD1, que foram sequenciados para confirmação da construção correta.

O gene *ADH1* foi deletado com os dois cassetes, ADH1pCORE, ADH1-HYG, tanto em linhagens de laboratório quanto em linhagens industriais. A deleção desse gene resultou em um rendimento de glicerol a partir de glicose compatíveis com os valores da literatura para as linhagens de laboratório, entretanto a linhagem industrial AZY672 apresentou um rendimento de 0,24 g/g, 26 % maior que o rendimento reportado na literatura.

Além disso, a complementação do gene *ADH1*, no que diz respeito tanto à produção quanto ao rendimento de etanol e glicerol, foi bem sucedida, uma vez que se igualaram aos valores obtidos para a linhagem selvagem JAY270.

A deleção do gene *TPI1* também foi realizada tanto em linhagens de laboratório quanto industriais. Essa deleção resultou em valores de rendimento de glicerol compatíveis com a literatura.

A obtenção de linhagens com ambas as deleções também foi possível para as linhagens industriais e de laboratório. A linhagem industrial diplóide com os genes *ADH1* e *TPI1* deletados (AZY773) foi capaz de produzir glicerol com rendimento de 0,38 g/g, chegando a 74% do máximo teórico. Esse resultado foi 22% maior do que o obtido para a linhagem de laboratório AFY733.

As modificações genéticas realizadas nas linhagens de levedura resultaram em aumento na produção de glicerol e interrupção da produção de etanol, devido ao desvio do fluxo metabólico para a produção de glicerol em detrimento da produção de etanol. A produção de glicerol com altos rendimentos e em fermentações de baixo custo pode ser conseguida através de modificações metabólicas e do uso de organismos robustos, como as leveduras industriais, que tiveram rendimentos de glicerol maiores que as leveduras de laboratório com as mesmas deleções.

A dificuldade de crescimento em glicose apresentada pelas linhagens duplo mutante pode ser revertida pela superexpressão do gene GPD1. Além disso, fermentações com essas linhagens simulando condições industriais tais como utilização de caldo de cana como substrato, alta concentração inicial de açúcar e competição com micro-organismos contaminantes podem gerar resultados ainda mais positivos a avaliar a capacidade de utilização dessas linhagens em fermentações industriais.

8. Referências Bibliográficas

- Argueso, J.L., Carazzolle, M.F., Mieczkowski, P.A., Duarte, F.M., Netto, O.V., Missawa, S.K., Galzerani, F., Costa, G.G., Vidal, R.O., Noronha, M.F., Dominska, M., Andrietta, M.G., Andrietta, S.R., Cunha, A.F., Gomes, L.H., Tavares, F.C., Alcarde, A.R., Dietrich, F.S., McCusker, J.H., Petes, T.D. & Pereira, G.A. (2009) Genome structure of a *Saccharomyces cerevisiae* strain widely used in bioethanol production. *Genome research*, **19**, 2258-70.
- Atkinson, B. & Mavituna, F. (1983) *Biochemical Engineering and Biotechnology Handbook*. Macmillan, Inc., New York.
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. & Struhl, K. (2003) *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons, Inc. 2003. John Wiley and Sons, Inc.
- Bailey, J.E. (1991) Towards a Science of Metabolic Engineering. *Science*, **252**, 1668-1674.
- Basso, L.C., de Amorim, H.V., de Oliveira, A.J. & Lopes, M.L. (2008) Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil. *FEMS yeast research*, **8**, 1155-63.
- Boeke, J.D., Lacroute, F. & Fink, G.R. (1984) A positive selection for mutants lacking orotidine-5' -phosphate decarboxylase activity in yeast : 5-fluoro-orotic acid resistance. *Molecular And General Genetics*, **197**, 345-346.
- Cameron, D.C., Altaras, N.E., Hoffman, M.L. & Shaw, a.J. (1998) Metabolic engineering of propanediol pathways. *Biotechnology progress*, **14**, 116-25.
- Chopra, R., Sharma, V.M. & Ganesan, K. (1999) Elevated growth of *Saccharomyces cerevisiae* ATH1 null mutants on glucose is an artifact of nonmatching auxotrophies of mutant and reference strains. *Applied and environmental microbiology*, **65**, 2267-8.
- Compagno, C., Boschi, F. & Ranzi, B.M. (1998) Factors Affecting Glycerol production by a Bioconversion Process with a Triose Phosphate Isomerase Deficient Mutant of *Saccharomyces Cerevisiae*. *Biocatalysis and Biotransformation*, **16**, 135-143.
- Compagno, C., Boschi, F. & Ranzi, B.M. (1996) Glycerol Production in a Triose Phosphate Isomerase Deficient Mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology Progress*, **12**, 591-595.
- Compagno, C., Brambilla, L., Capitanio, D., Boschi, F., Ranzi, B.M. & Porro, D. (2001) Alterations of the glucose metabolism in a triose phosphate isomerase-negative *Saccharomyces cerevisiae* mutant. *Yeast*, **18**, 663-670.
- Cordier, H., Mendes, F., Vasconcelos, I. & François, J.M. (2007) A metabolic and genomic study of engineered *Saccharomyces cerevisiae* strains for high glycerol production. *Metabolic Engineering*, **9**, 364-378.
- Doran, P.M. (1994) *Bioprocess Engineering Principles*. Academic Press, Sydney.
- Drewke, C., Thielen, J. & Ciriacy, M. (1990) Ethanol formation in *adh0* mutants reveals the existence of a novel acetaldehyde-reducing activity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of bacteriology*, **172**, 3909-17.

Durnin, G., Clomburg, J., Yeates, Z., Alvarez, P.J., Zygmourakis, K., Campbell, P. & Gonzalez, R. (2009) Understanding and Harnessing the Microaerobic Metabolism of Glycerol in *Escherichia coli*. *Biotechnology*, **103**, 148-161.

Geertman, J.A., van Maris, A.J., van Dijken, J.P. & Pronk, J.T. (2006) Physiological and genetic engineering of cytosolic redox metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* for improved glycerol production. *Metabolic engineering*, **8**, 532-542.

González-Pajuelo, M., Meynial-Salles, I., Mendes, F., Soucaille, P. & Vasconcelos, I. (2006) Microbial Conversion of Glycerol to 1, 3-Propanediol : Physiological Comparison of a Natural Producer , *Clostridium butyricum* VPI 3266 , and an Engineered Strain , *Clostridium acetobutylicum* DG1 (pSPD5). *Society*, **72**, 96-101.

Gutiérrez-Lomelí, M., Torres-Guzmán, J.C., González-Hernández, G.A., Cira-Chávez, L.A., Pelayo-Ortiz, C. & Ramírez-Córdova, J.D. (2008) Overexpression of ADH1 and HXT1 genes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* improves the fermentative efficiency during tequila elaboration. *Antonie van Leeuwenhoek*, **93**, 363-71.

Lee, S.Y., Hong, S.H., Lee, S.H. & Park, S.J. (2004) Fermentative production of chemicals that can be used for polymer synthesis. *Macromolecular bioscience*, **4**, 157-64.

Michnick, S., Roustan, J.L., Remize, F., Barre, P. & Dequin, S. (1997) Modulation of glycerol and ethanol yields during alcoholic fermentation in *Saccharomyces cerevisiae* strains overexpressed or disrupted for GPD1 encoding glycerol 3-phosphate dehydrogenase. *Yeast*, **13**, 783-793.

Nevoigt, E. & Stahl, U. (1996) Reduced Pyruvate Decarboxylase and Increased Glycerol-3-phosphate Dehydrogenase [NAD⁺] Levels Enhance Glycerol Production in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, **12**, 1331-1337.

Nevoigt, E. (2008) Progress in Metabolic Engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **72**, 379-412.

Nissen, T.L., Hamann, C.W., Kielland-brandt, M.C., Nielsen, J. & Villadsen, J. (2000) Anaerobic and aerobic batch cultivations of *Saccharomyces cerevisiae* mutants impaired in glycerol synthesis. *Yeast*, **16**, 463-474.

Overkamp, K.M., Bakker, B.M., Kötter, P., Luttik, M.A., Dijken, J.P. & Pronk, J.T. (2002) Metabolic Engineering of Glycerol Production in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology*, **68**, 2814-2821.

Remize, F., Barnavon, L. & Dequin, S. (2001) Glycerol Export and Glycerol-3-phosphate Dehydrogenase, but Not Glycerol Phosphatase, Are Rate Limiting for Glycerol Production in *Saccharomyces cerevisiae*. *Metabolic Engineering*, **3**, 301-312.

Rincones, J., Zeidler, A., Grassi, M.C., Carazzolle, M. & Pereira, G. (2009) The Golden Bridge for Nature: The New Biology Applied to Bioplastics. *Polymer Reviews*, **49**, 85-106.

Sabourin-provost, G. & Hallenbeck, P.C. (2009) Bioresource Technology High yield conversion of a crude glycerol fraction from biodiesel production to hydrogen by photofermentation. *BIORESOURTE TECHNOLOGY*, **100**, 3513-3517.

Silva, G.P., Mack, M. & Contiero, J. (2009) Glycerol : A promising and abundant carbon source for industrial microbiology. *Biotechnology Advances*, **27**, 30-39.

Silva-Filho, E.A., Brito Dos Santos, S.K., Resende, A.D., de Moraes, J.O., de Moraes, M.A. & Ardaillon Simões, D. (2005) Yeast population dynamics of industrial fuel-ethanol fermentation process assessed by PCR-fingerprinting. *Antonie van Leeuwenhoek*, **88**, 13-23.

Storici, F. & Resnick, M. (2006) The Delitto Perfetto Approach to In Vivo Site-Directed Mutagenesis and Chromosome Rearrangements with Synthetic Oligonucleotides in Yeast. *Methods in Enzymology*, **409**, 329-345.

Storici, F., Lewis, L.K. & Resnick, M.a. (2001) In vivo site-directed mutagenesis using oligonucleotides. *Nature biotechnology*, **19**, 773-6.

Taherzadeh, M.J., Adler, L. & Lidén, G. (2002) Strategies for enhancing fermentative production of glycerol — a review. *Enzyme and Microbial Technology*, **31**, 53-66.

Walker, M., Gardner, J., Vystavelova, A., McBryde, C., Lopes, B.M. & Jiranek, V. (2003) Application of the reuseable, selectable marker to industrial yeast: construction and evaluation of heterothallic wine strains of , possessing minimal foreign DNA sequences. *FEMS Yeast Research*, **4**, 339-347.

Wang, Z., Zhuge, J., Fang, H. & Prior, B.A. (2001) Glycerol production by microbial fermentation : A review. *Biotechnology Advances*, **19**, 201 - 223.

Wheals, A.E., Basso, L.C., Alves, D.M. & Amorim, H.V. (1999) Fuel ethanol after 25 years. *Science*, **17**, 482-487.

Yazdani, S.S. & Gonzalez, R. (2007) Anaerobic fermentation of glycerol : a path to economic viability for the biofuels industry. *Current Opinion in Biotechnology*, **18**, 213-219.

Yu, J., Hamari, Z., Han, K., Seo, J., Reyes-Domínguez, Y. & Scazzocchio, C. (2004) Double-joint PCR: a PCR-based molecular tool for gene manipulations in filamentous fungi. *Fungal genetics and biology* : *FG & B*, **41**, 973-81.

Zhang, J., Liu, D., Xie, D., Wang, Y. & Sun, Y. (2002) Production of glycerol by fermentation using osmophilic yeast *Candida krusei* with different starchy substrates. *Enzyme and Microbial Technology*, **30**, 758 -762.

Zhou, C.C., Beltramini, J.N., Fan, Y. & Lu, G.Q. (2008) Chemoselective catalytic conversion of glycerol as a biorenewable source to valuable commodity chemicals. *Society*, 527-549.

Zhuge, J., Fang, H., Wang, Z., Chen, D., Jin, H. & Gu, H. (2001) Glycerol production by a novel osmotolerant yeast *Candida glycerinogenes*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **55**, 686-692.

9. Anexos

9.1 Lista das linhagens selvagens utilizadas e dos mutantes obtidos

Linhagem	Genótipo
Selvagem	
FY 23	laboratório - <i>MATa- ura3-52, trp1Δ63, leu2Δ1</i>
FY86	laboratório - <i>MATα- ura3-52, trp1Δ63, leu2Δ1</i>
JAY 270	industrial – diplóide
FGY 050	industrial - diplóide - <i>Δura3</i>
FGY 031	industrial - <i>MATa - Δura3</i>
FGY 042	industrial - <i>MATα - Δura3</i>
<i>Δadh1</i>	
AFY311	laboratório - <i>MATa- ura3-52, trp1Δ63, leu2Δ1, Δadh1</i> com ADH1-HYG
AFY312	laboratório - <i>MATa - ura3-52, trp1Δ63, leu2Δ1, Δadh1</i> com ADH1-HYG
AFY321	laboratório - <i>MATα - ura3-52, his3Δ200, leu2Δ1, Δadh1</i> com ADH1-HYG
AFY322	laboratório - <i>MATα - ura3-52, his3Δ200, leu2Δ1, Δadh1</i> com ADH1-HYG
AFY315	laboratório - <i>MATa - ura3-52, trp1Δ63, leu2Δ1, Δadh1</i> com ADH1pCORE – URA3 (<i>K.lactis</i>)
AFY325	laboratório - <i>MATα - ura3-52, his3Δ200, leu2Δ1, Δadh1</i> com ADH1pCORE – URA3 (<i>K.lactis</i>)
AZY331	industrial - <i>MATa - Δura3, Δadh1</i> com ADH1-HYG
AZY332	industrial - <i>MATa - Δura3, Δadh1</i> com ADH1-HYG
AZY341	industrial - <i>MATα - Δura3, Δadh1</i> com ADH1-HYG
AZY335	industrial - <i>MATa - Δura3, Δadh1</i> com ADH1pCORE - URA3 (<i>K. lactis</i>)
<i>Δadh1 - YEpADH1</i>	
AFY511	laboratório - <i>MATa- ura3-52, trp1Δ63, leu2Δ1, ADH1-HYG, URA3, ADH1</i>
AZY531	industrial - <i>MATa - ADH1-HYG, URA3, ADH1</i>
AZY532	industrial - <i>MATa - ADH1-HYG, URA3, ADH1</i>
AZY533	industrial - <i>MATa - ADH1-HYG, URA3, ADH1</i>
AZY534	industrial - <i>MATa - ADH1-HYG, URA3, ADH1</i>
<i>Δtpi1</i>	
AFY411	laboratório - <i>MATa- ura3-52, trp1Δ63, leu2Δ1, Δtpi1</i> com TPI1-KAN
AFY412	laboratório - <i>MATa- ura3-52, trp1Δ63, leu2Δ1, Δtpi1</i> com TPI1-KAN
AFY421	laboratório - <i>MATα - ura3-52, his3Δ200, leu2Δ1, Δtpi1</i> com TPI1-KAN
AZY431	industrial - <i>MATa - Δura3, Δtpi1</i> com TPI1-KAN
AZY441	industrial - <i>MATα - Δura3, Δtpi1</i> com TPI1-KAN
AZY442	industrial - <i>MATα - Δura3, Δtpi1</i> com TPI1-KAN
AZY443	industrial - <i>MATα - Δura3, Δtpi1</i> com TPI1-KAN
<i>Δadh1, Δtpi1</i>	
AFY731	laboratório - <i>MATa- ura3-52, leu2Δ1, Δadh1, Δtpi1</i>
AFY732	laboratório - <i>MATα - ura3-52, leu2Δ1, Δadh1, Δtpi1</i>
AZY771	industrial - <i>MATa - Δura3, Δadh1, Δtpi1</i>
AZY772	industrial - <i>MATα - Δura3, Δadh1, Δtpi1</i>
diplóides	
AFY109	laboratório - <i>ura3-52, leu2Δ1</i>
FGY073	industrial - <i>Δura3</i>

AFY634	laboratório - <i>ura3-52, leu2Δ1, Δadh1</i> com ADH1-HYG
AFY640	laboratório - <i>ura3-52, leu2Δ1, Δadh1</i> com ADH1pCORE - <i>URA3 (K. lactis)</i>
AZY672	industrial - <i>Δura3, Δadh1</i> com ADH1-HYG
AFY833	laboratório - <i>ura3-52, leu2Δ1, Δtpi1</i> com TPI1-KAN
AZY872	industrial - <i>Δura3, Δtpi1</i> com TPI1-KAN
AFY733	laboratório - <i>ura3-52, leu2Δ1, Δadh1, Δtpi1</i>
AZY773	industrial - <i>Δura3, Δadh1, Δtpi1</i>

9.2 Tabelas estatísticas (ANOVA)

Anova: fator único – Biomassa YNB

RESUMO

<i>Grupo</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>
Coluna 1	17	40.7006	2.394153	1.913057
Coluna 2	17	40.686	2.393294	1.919585
Coluna 3	17	41.094	2.417294	2.018714

ANOVA

<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	0.006303	2	0.003151	0.001616	0.998386	3.190727
Dentro dos grupos	93.6217	48	1.950452			
Total	93.628	50				

Anova: fator único – Biomassa YEPD

RESUMO

<i>Grupo</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>
Coluna 1	11	55.04	5.003636	7.6047855
Coluna 2	11	54.01	4.91	7.58994
Coluna 3	11	55.25	5.022727	7.6977618

ANOVA

<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>Gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	0.080079	2	0.040039	0.0052471	0.9947676	3.3158295
Dentro dos grupos	228.9249	30	7.630829			

Total	229.005	32
-------	---------	----

Anova: fator único – Glicerol YNB

RESUMO

<i>Grupo</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>
Coluna 1	17	2.436258212	0.143309307	0.0200358
Coluna 2	17	2.346697459	0.138041027	0.017445416
Coluna 3	17	2.276113392	0.133889023	0.015914595

ANOVA

<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	0.000757835	2	0.000378918	0.021289179	0.978945	3.190727
Dentro dos grupos	0.854332992	48	0.017798604			
Total	0.855090828	50				

Anova: fator único – Glicerol YEPD

RESUMO

<i>Grupo</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>
Coluna 1	11	1.972974268	0.179361297	0.013525938
Coluna 2	11	2.107212105	0.191564737	0.016138965
Coluna 3	11	1.987360449	0.180669132	0.012928534

ANOVA

<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	0.000987611	2	0.000493806	0.03478041	0.965856362	3.31583
Dentro dos grupos	0.425934373	30	0.014197812			
Total	0.426921985	32				

Anova: fator único – Etanol YNB

RESUMO

<i>Grupo</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>
Coluna 1	17	3.981813508	0.234224324	0.021146619
Coluna 2	17	4.055227015	0.238542766	0.021657971
Coluna 3	17	3.906989787	0.229822929	0.020096786

ANOVA

<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	0.000646322	2	0.000323161	0.015412741	0.98471	3.190727
Dentro dos grupos	1.006422007	48	0.020967125			
Total	1.007068328	50				

Anova: fator único – Etanol YEPD

RESUMO

<i>Grupo</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>
Coluna 1	11	2.684450398	0.244040945	0.037719873
Coluna 2	11	2.668526463	0.242593315	0.03729753
Coluna 3	11	2.685640259	0.244149114	0.037782829

ANOVA

<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	1.66021E-05	2	8.30105E-06	0.000220772	0.999779	3.31583
Dentro dos grupos	1.128002312	30	0.037600077			
Total	1.128018914	32				

This article was downloaded by:

On: 24 April 2009

Access details: *Access Details: Free Access*

Publisher *Taylor & Francis*

Informa Ltd Registered in England and Wales Registered Number: 1072954 Registered office: Mortimer House, 37-41 Mortimer Street, London W1T 3JH, UK



Polymer Reviews

Publication details, including instructions for authors and subscription information:

<http://www.informaworld.com/smpp/title~content=t713597276>

The Golden Bridge for Nature: The New Biology Applied to Bioplastics

Johana Rincones ^a; Ane F. Zeidler ^a; Maria Carolina B. Grassi ^a; Marcelo F. Carazzolle ^{ab}; Gonçalo A. G. Pereira ^a

^a Laborat3rio de Gen3mica e Express3o, Departamento de Gen3tica e Evolu3o, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, S3o Paulo, Brazil ^b Centro Nacional de Processamento de Alto Desempenho em S3o Paulo, Universidade Estadual de Campinas, S3o Paulo, Brazil

Online Publication Date: 01 April 2009

To cite this Article Rincones, Johana, Zeidler, Ane F., Grassi, Maria Carolina B., Carazzolle, Marcelo F. and Pereira, Gonçalo A. G.(2009)'The Golden Bridge for Nature: The New Biology Applied to Bioplastics',Polymer Reviews,49:2,85 – 106

To link to this Article: DOI: 10.1080/15583720902834817

URL: <http://dx.doi.org/10.1080/15583720902834817>

PLEASE SCROLL DOWN FOR ARTICLE

Full terms and conditions of use: <http://www.informaworld.com/terms-and-conditions-of-access.pdf>

This article may be used for research, teaching and private study purposes. Any substantial or systematic reproduction, re-distribution, re-selling, loan or sub-licensing, systematic supply or distribution in any form to anyone is expressly forbidden.

The publisher does not give any warranty express or implied or make any representation that the contents will be complete or accurate or up to date. The accuracy of any instructions, formulae and drug doses should be independently verified with primary sources. The publisher shall not be liable for any loss, actions, claims, proceedings, demand or costs or damages whatsoever or howsoever caused arising directly or indirectly in connection with or arising out of the use of this material.

Reviews

The Golden Bridge for Nature: The New Biology Applied to Bioplastics

JOHANA RINCONES,¹ ANE F. ZEIDLER,¹ MARIA CAROLINA B. GRASSI,¹ MARCELO F. CARAZZOLLE,^{1,2} GONÇALO A. G. PEREIRA¹

¹Laboratório de Genômica e Expressão, Departamento de Genética e Evolução, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, CP 6109, Campinas 13083-970, São Paulo, Brazil

²Centro Nacional de Processamento de Alto Desempenho em São Paulo, Universidade Estadual de Campinas, CP 6141, Campinas 13083-970, São Paulo, Brazil

There is a common concept in life: large and complex molecules result from the synthesis of units that are later joined together. Mankind learned this principle and employed it to develop language, culture, and technology. This same principle is applied in the petrochemical industry by fractionating the fossilized carbon chains into small molecules and then polymerizing them in order to develop synthetic polymers, which are much more flexible, resistant, and durable than natural polymers. Recent developments in molecular biology have opened the possibility of modifying organisms in order to create new biosynthetic routes for the production of monomers that would fit the biggest challenge in modern society: the production of high quality polymers from renewable feedstocks. This review focuses on the latest advances in molecular biology and the new knowledge and technologies that enable the possibility of converting cells into efficient and sustainable chemical reactors. The first examples of this technological advancement are already in the market.

Keywords omics approach, synthetic biology, system biology, fermentation, CO₂ mitigation, green polymers

1. Introduction

Fossil oil is the most important energy source for our society and during the last decades we have faced the concern of depleting our reserves, a threat that was illustrated by the oil crisis of the 1970s. Nowadays, it has become apparent that fossil oil is still abundant but

Address correspondence to Gonçalo A. G. Pereira, Laboratório de Genômica e Expressão, Departamento de Genética e Evolução, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, CP 6109, Campinas 13083-970, São Paulo, Brazil; Fax: +55 19 35216235. E-mail: goncalo@unicamp.br.

its supply and price are threatened by geopolitical and macroeconomic issues. Moreover, fossil oil extraction and cracking has resulted in alarmingly high levels of CO₂ in the atmosphere, with disastrous consequences for our environment.¹ The worldwide concern for this issue was demonstrated by the Nobel Peace Prize of 2007, granted to Al Gore, ex-Vice President of the United States, and the U.N. Climate Panel “for their efforts to build up and disseminate greater knowledge about man-made climate change, and to lay the foundations for the measures that are needed to counteract such change.”²

In addition to fuels, it has been estimated that about 4% of the world’s annual oil production serves as feedstock for plastics, while another 4% is used as energy for the manufacture of these commodities.³ Thus the plastic industry is also facing the consequences of volatile oil prices and the new constraints to CO₂ emissions. Moreover, since chemically synthesized plastics are often not easily degraded when discarded in nature, their disposal in large amounts causes further deleterious effects to our environment. Biodegradable plastics have been pointed out as one of the possible solutions to these problems and several of these plastics have been developed. However, their high production costs have been a major hindrance to their commercialization. In addition, the complete biodegradation of these polymers ultimately releases CO₂ into the atmosphere and the energy used for their manufacture is lost as heat during this process.

An alternative for this situation is the production of plastics from renewable sources, which are generally known as bioplastics. With this aim in mind, one possibility is to employ microorganisms that produce natural polymers, such as polyhydroxyalkanoates (PHAs), which can be used directly by industry. However, this strategy fails to solve the problem since these natural polymers lack several desirable traits shown by synthetic polymers. A more attractive solution would be to find microorganisms that are able to produce the same monomers employed by the petrochemical industry, such as ethylene, propylene, or propanediol, but from renewable sources. In this latter case, the standard to be reached would be equivalent to ethanol fermentation by yeasts, which is produced from a low cost and renewable feedstock (cornstarch or sugarcane juice), it is simple to achieve, and is produced with high efficiency. This paradigm has become one of the most important challenges in many chemical companies around the world.

This review summarizes the most economically relevant advances in the bioplastic industry to date and outlines the application of systems and synthetic biology for the future production of bulk chemicals for the petrochemical industry.

2. Plastics and Nature

Polymers are abundantly present in all living things. These natural polymers are widely varied and play numerous roles in life, ranging from carrying and manipulating essential information (nucleic acids and proteins), storing energy reserves (starch and glycogen), and performing structural functions (cellulose, silk, rubber, etc.). The study of natural polymers has brought to light several interesting characteristics. Most notable is the observation that homopolymers can have different properties depending on the type of ligation among monomers. Such is the case of glucose, that when polymerized linearly by $\beta(1-4)$ bonds forms the highly resistant cellulose and when the bonds are $\beta(1-4)$ with or without branching at $\beta(1-6)$ it forms starch and glycogen, which are more easily degradable into its glucose monomers.

Our understanding of the properties and uses of natural polymers, such as rubber, has led in the last few decades to the production of new man-made polymers designed for a variety of uses in our daily life. Some of these polymers are semi-synthetic, being partly derived from a natural resource, with the chain molecule produced in a living tissue

but later modified chemically into a half-synthetic polymer. Nowadays most polymers are completely synthetic: the chain molecule or network is built from monomers obtained by a chemical process.⁴ It was only during the twentieth century that the plastic industry became independent of the naturally occurring polymer materials and started to develop processes for producing polymers derived from petroleum cracking.⁵ The properties of plastics can be modified through the use of fillers, reinforcing agents, and chemical additives. Because of their flexibility, durability, and the ease of processing, plastics have found many engineering applications and have become indispensable materials in our daily life (Table 1).

As can be seen in Table 1, polyolefins are the most diverse group of synthetic polymers currently used in industry, accounting for ~90% of all plastics manufactured.⁴ Their main difference when compared to the other polymers is that their backbone is entirely composed of carbon-carbon single bonds, which are highly stable and thus render great durability to their products. This characteristic is in contrast to most natural polymers, such as cellulose, starch, proteins, and nucleic acids, in which the backbone is composed of links between carbon and other atoms, such as oxygen, or, in the case of rubber, contain carbon-carbon double bonds that are more susceptible to microbial degradation via oxidation.⁴ In addition, organisms have developed enzymes to degrade their natural polymers, which have a predetermined lifespan, and are thus less stable and eventually converted into CO₂.

In view of this situation, the next big challenge would be to obtain organisms able to produce olefins of interest for the plastic industry from renewable carbon sources, which are photosynthesizing organisms that obtain their carbon from atmospheric CO₂. In contrast to biofuels, in which the vegetal carbon source is quickly burned and released back into the atmosphere as CO₂, its use for the production of highly stable plastics would help mitigate carbon dioxide pollution by fixing it for a long period of time.

Although nature is widely diverse, it is finite and limited by the diversity of environments. Moreover, evolution is a long process and even with directed selection pressure, speciation is a long-term event.⁶ For instance, there are no organisms for which the production of olefins such as propylene and ethylene on a large scale had proved advantageous from the evolutionary point of view. Therefore, since nature has not created these organisms, science must create them. Only recently has this objective become a reality due to the latest advances in molecular biology.

3. The New Biology

The molecular basis of genetics started with the discovery of the DNA structure in 1953,⁷ followed by the discovery of the genetic code,⁸ which led to the establishment of the central dogma of molecular biology (Fig. 1a): DNA is transcribed into messenger RNA, which in turn is translated into proteins and proteins carry out most of the cell's processes, including metabolite production.⁹ This dogma indicates the existence of a hierarchical organization for these molecular processes and since DNA is at the top of this hierarchy it became the focus of most research. The next big technological breakthrough occurred in the 1970s when enzymes that could copy, cut, and join specific pieces of DNA were characterized. These enzymes were then used to generate semi-synthetic DNA molecules with sequence combinations that do not occur in nature. With this technology, biologists were able to use tools to manipulate molecules marking the beginning of a new era in science: genetic engineering.¹⁰

In genetic engineering the gene is defined as a stretch of DNA composed of two different regions: the coding region, in which triplets of nucleotides known as codons code for the amino acids that compose the protein; and the promoter region, which precedes the coding region and carries the information relating to when the protein is needed in the cell and in what amount. Genetic engineering can be used to eliminate genes (gene deletion) to increase

Table 1
Most commonly used plastic polymers

Family	Acronym	Polymer	Monomers	Uses
Polyolefins	LDPE	Low-density polyethylene	Ethylene	Packaging films, bags, pipes, crates, pails, bottles
	LLDPE	Linear low-density polyethylene	Ethylene	
	HDPE	High-density polyethylene	Ethylene	
	PTFE	Polytetrafluoroethylene	Tetrafluoroethylene, hexafluoropropylene, vinyl fluoride, vinyl ether	Coatings for chemical process equipment, cable insulation, electrical components, nonsticking surfaces for cookware
	PP	Polypropylene	Propylene	Films for packaging, fibers, crates, pipes, automotive parts
	PB	Polybutylene	Butylene	Film for heavy-duty bags, hot water transport pipers
	PVC	Polyvinylchloride	Vinyl	Pipes, gutters, cables, bottles, floor tiles
Polyamide Polyester	PS	Polystyrene	Styrene	Foam for packaging, thermal insulation, coffee cups, household ware
	PA	Polyamide	Adipic acid, caprolactam	Home furnishings, apparel, tire cord
	PC	Polycarbonate	Bisphenol A, phosgene	Glazing, electrical and electronics, compact discs, appliances
	PETP	Polyethylene terephthalate	Terephthalic acid, dimethyl terephthalate	Apparel, tire cord, home furnishings , bottles
Acrylic	PMMA	Polymethyl methacrylate	Methyl methacrylate	Signs, glazing, lighting, fixtures, sanitary wares, solar panels, automotive tail and stoplight lenses

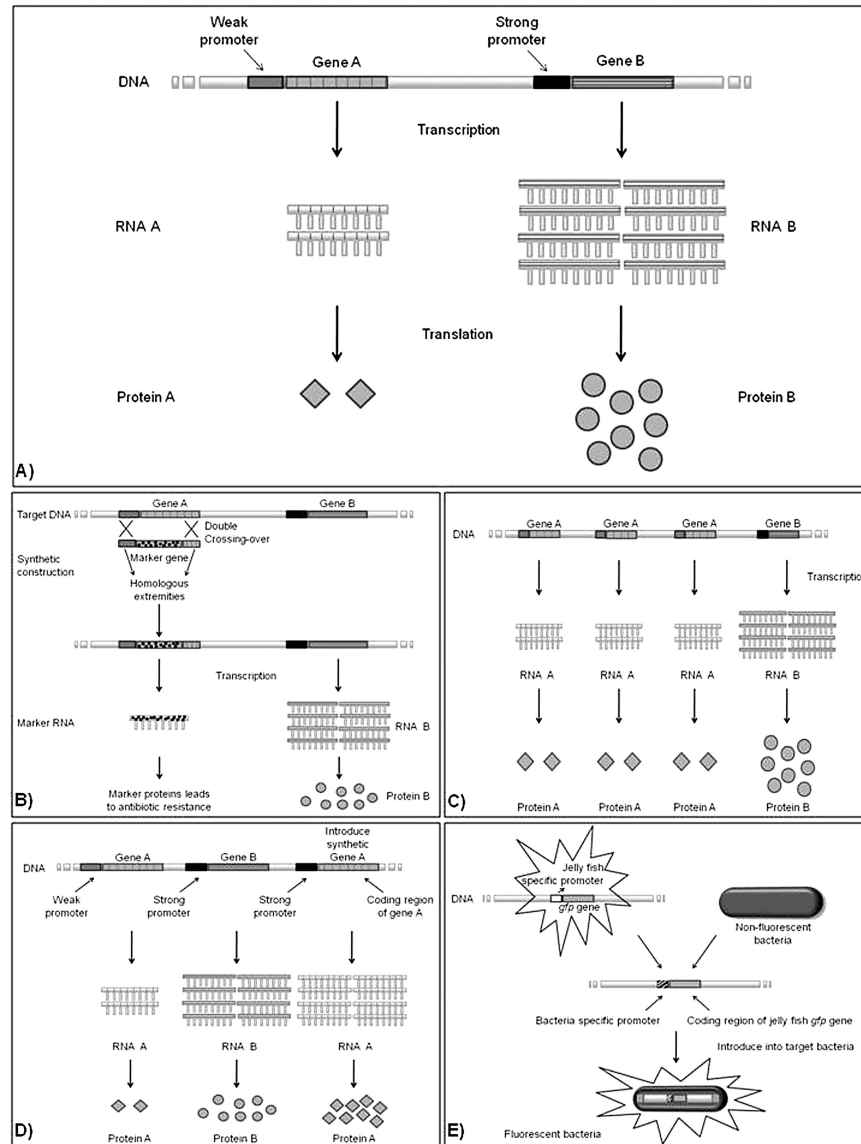


Figure 1. Central dogma of molecular biology illustrating the differences in RNA and protein production between a gene with a weak promoter and a gene with a strong promoter. **B.** Illustration of the process of gene deletion by homologous recombination. **C.** Illustration of the process of gene super-expression by introduction of multiple copies of the target gene. **D.** Illustration of the process of gene super-expression by creating a synthetic gene composed by the coding region of the target gene preceded by a strong promoter. **E.** Illustration of the creation of a transgenic organism.

the number of proteins coded by a gene (gene super-expression) and also for the introduction of genes from one organism into another (creation of transgenic organisms). Gene deletion is accomplished by a process known as homologous recombination: a synthetic piece of DNA is created that consists of a marker gene (i.e. antibiotic resistance gene) flanked by small stretches identical to the extremities of the gene to be deleted. When introduced into

the target cell this synthetic DNA will align with the chromosome due to its identity with the extremities of the target gene and a natural process known as double crossing-over will promote the exchange of the marker gene in place of the target gene (Fig. 1b). Gene super-expression can be accomplished in two ways: by introducing additional copies of the gene into the genome of the target organism (Fig. 1c) or by exchanging its natural promoter for a “strong” promoter, which is the type of promoter found in genes that are more actively transcribed and thus result in numerous copies of the coded protein (Fig. 1d). In order to create transgenic organisms, the coding region of interest is fused to the promoter of a gene from the target organism and then this construct is introduced into the target organism genome (Fig. 1e).

The promises of genetic engineering were many: from producing drugs inexpensively using genetically modified bacteria that could act as biofactories, to gene therapy, and made-to-order organisms. Some of these promises were soon fulfilled, such as the production of human insulin in recombinant *Escherichia coli*.¹¹ Nevertheless, most of the initial optimism on genetic engineering was stalled given the fact that genetically manipulated organisms most often than not failed to behave as anticipated. It was soon realized that in order to correctly match pieces of DNA and effectively obtain a desired result a complete understanding of the DNA code was needed, and this need prompted the development of two major technologies: manual DNA sequencing¹² and the polymerase chain reaction that allows the million-fold amplification of specific DNA stretches.¹³ These two techniques, coupled to the advances in computer technology, rapidly led to automated sequencing and biology entered into the Genome era.

Coordinated by the U.S. Department of Energy and the National Institutes of Health, the Human Genome Project (HGP) was a 13-year project completed in 2003, two years ahead of time,¹⁴ having reached the following aims: 1) assess ethical, legal, and social issues that may arise from the project; 2) improve DNA sequencing technologies by obtaining the genome of increasingly complex model organisms (the bacterium *Escherichia coli*, the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, the worm *Caenorhabditis elegans*, the fruit fly *Drosophila melanogaster*, the plant *Arabidopsis thaliana*, and the laboratory mouse *Mus musculus*); 3) improve computational technologies for DNA sequence data analysis, 4) determine the sequence of 3.2 billion base pairs that compose human DNA, 5) identify the ~23,000 genes of the human genome, 6) create databases to store these data, and 7) transfer the technology to the private sector.¹⁵ Therefore, the achievements of the HGP far exceed the simple sequencing of human DNA; it actually set the foundations for a new scientific approach for biology: molecular biology as an informational science.^{16,17}

Nowadays, DNA sequencing is one of the most important technologies for biosciences, which is confirmed by the exponential growth in molecular sequence data. The first complete viral genome sequence (5,000 base pairs) was obtained over a one-year period and was published in 1977.¹⁸ Afterwards, it took almost 20 years until the complete genome sequence of a free-living organism was published: the bacterium *Haemophilus influenzae* (1.8 million base pairs);¹⁹ since then and until November of 2008, 4843 different organisms (2042 viruses, 978 Bacteria, 69 Archaea, and 1678 Eukaryotes) have been or are in the process of being completely sequenced, totaling over 98 billion base pairs of nonredundant sequence.^{20,21} And, if this growth seems extraordinary, the next few years will witness an explosion of DNA sequence data due to the recent arrival in the market of the next generation of sequencers, which were spurred by the announcement in 2004 of a challenge to sequence a human genome with a 100-fold cost reduction per base pair.²² Compared to the traditional automated sequencing system based on the technology that gave Fred Sanger the Nobel Prize in 1980, the two leading next-generation sequencing technologies, the

Roche/454 FLX²³ and the Illumina/Solexa Genome Analyzer,²⁴ are able to obtain up to ten thousand and ten millions-fold more sequence information, respectively, in a fraction of the time and up to 100 times cheaper.²⁵ Even cheaper and faster sequencing technologies will continue to arise in the near future until the quest for sequencing 1000 human genomes at the price of US \$1,000,00 each becomes a reality,²⁶ and thus DNA sequence data will continue to grow exponentially.

Although the genomic DNA sequence of an organism provides a wealth of information, the HGP showed that science was still unable to make sense of a significant portion of it.²⁷ The understanding of the genome in the genome era was mostly focused on the coding sequences, which are the stretches of DNA that are effectively transcribed into messenger RNA and translated into proteins. In organisms with smaller genomes, such as the unicellular Bacteria and Archea, coding DNA constitutes up to 80% of the genome,^{28,29,30} while in multicellular organisms with larger genomes, such as humans, the coding sequence represents as little as 3%. When discovered, this tendency surprised researchers and clearly indicated that the noncoding sequences hold the key to understanding one of the main goals of modern functional genomics: gene regulation and interaction. It is now believed that it is the evolution of these gene regulatory networks, and not of the genes themselves, which drives speciation.¹⁷

In order to understand these gene regulatory networks, other processes of the central dogma of molecular biology (RNA transcription, protein translation, and metabolite production) are also being studied using the large-scale approach of genomics, namely: transcriptomics (whole mRNA content), proteomics (whole protein content), and metabolomics (whole metabolite content). Differently from genomics, in which DNA is a static molecule, these new “omics” approaches show different results depending on environmental (metabolite concentration, stress factors, chemical gradients, etc.) and intrinsic factors (stage of the cell cycle, developmental stage, tissue specificity, etc.) affecting the cells at the time of sample collection.^{31,32} Thus, specific factors can be selected as variables in order to study their effect on gene regulation and thus help establish networks of regulatory interactions among genes. This approach has only recently come to be realized due to the latest advances in modern bioinformatics technology, which was in turn stimulated by the large amounts of data generated in the genome era.³³

The massive amount of data provided by this type of informational approach to biology is now leading to a new view of molecular biology: a comprehensive approach that aims at understanding all genes and interaction networks as a whole, which contrasts with the previous reductionist approach of studying one gene or a limited set of genes.^{16,34,17} This comprehensive approach to molecular biology is called systems biology and its main objectives are to gather comprehensive data from all levels of molecular organization (“omics” approach) for an individual biological system and to integrate these data into a mathematical model of the system that will allow hypotheses formulation and to predict outcomes of specific perturbations to the system.^{16,34,17,35} Thus, systems biology aims at integrating discovery science (“omics” data) and hypothesis-driven science (mathematical modeling) in order to improve the understanding of the molecular mechanisms of life.¹⁶ Figure 2 illustrates the sequential appearance and accumulation of scientific publications regarding genomics, transcriptomics, proteomics, systems biology, and synthetic biology over recent years.

Systems biology has brought new life to genetic engineering, since it is expected that this comprehensive approach coupled to the aid of computer-based mathematical modeling will allow scientists to effectively predict the outcome of deliberate genetic manipulations, thus finally enabling the production of made-to-order organisms. This radical approach to

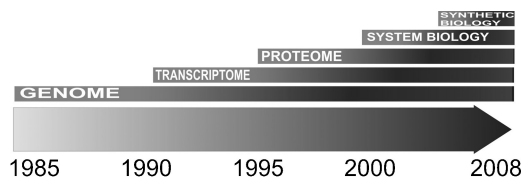


Figure 2. Timeline indicating the appearance and increase of scientific papers with “Omics” as keyword and showing how the increase in these data led to the systems and synthetic biology approaches. In October of 2008 the total number of papers with these keywords were: 197,279 for genome, 8,965 for transcriptome, 5,314 for proteome, 3,221 for systems biology, and 227 for synthetic biology (source: Pubmed Central).

genetic engineering is known today as Synthetic Biology (Synbio). Although the term was first coined in 1980 to describe some of the first genetically engineered microorganisms,³⁶ Synbio as it is understood today can be approached in two ways: by creating artificial life from scratch using synthetic molecules, or by borrowing engineering concepts to generate interchangeable natural parts that can be effectively used to manipulate organisms that behave in a predictable manner.³⁷ Independently to the approach, the final aim of synthetic biology is to understand the molecular basis of life by acquiring the ability to build it, thus paraphrasing the Nobel Physics laureate Richard Feynman who once wrote “which I cannot create, I do not understand.”³⁸

In addition to systems biology, Synbio is also based on the concept of metabolic engineering, which has been defined as “the improvement of cellular activities by manipulation of enzymatic, transport, and regulatory functions of the cell with the use of recombinant DNA technology;”³⁹ however, the main difference is that in Synbio such “improvement” could go as far as completely modifying the cell’s metabolism.

Currently, the approach to Synbio most widely explored consists of developing a foundational technology that would enable the design and engineering of biological systems using natural interchangeable parts. An example of this approach is MIT’s Biobricks Initiative.⁴⁰ Biobricks are standardized and functionally annotated DNA stretches that may be arranged in specific combinations to execute a predetermined function.⁴¹ In addition to standardization, another essential technology needed for Synbio to fulfill its maximum potential is the production of cheap and accurate large molecules of synthetic DNA. In the 1980s when the first DNA synthesizers appeared, up to 50 nucleotides could be sequentially polymerized in 17 hours with an error rate of 5 per 100 nt.⁴² Nowadays, new technologies are able to obtain specific sequences of up to 30,000 nts, enough to synthesize any gene or combination of a few genes. More recently, the J. Craig Venter Institute has pioneered several techniques to produce long and accurate stretches of DNA, including the recent announcement of obtaining a whole synthetic chromosome with sequence identical to the bacterium *Mycoplasma genitalium*, which is 582,970 bp long.⁴³ This new technology is called synthetic genomics and constitutes an important breakthrough for the production of synthetic DNA.

The current interest in Synbio is fueled by the numerous applications these synthetic organisms could have in every aspect of human technological advancement, ranging from cutting edge medical treatments for incurable diseases to the production of clean biofuels and bioremediation agents that would help rid the environment of pollutants. Nowadays, the concepts of systems and synthetic biology are integrated in order to obtain organisms with novel characteristics. In this case, the process of mathematical modeling arising from

a systems biology approach can be fed continuously with new data derived from genetically manipulated organisms so that the predictions of future perturbations become more accurate until the desired characteristic is obtained.

As an example of the potential application of the new biology concepts to the green chemistry movement, Amyris Biotechnologies produced an engineered strain of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* that is able to convert glucose into a precursor of the antimalarial drug artemisin, which is a compound that occurs at low concentrations in the plant species *Artemisia annua* L. After dozens of genetics modifications, the resulting engineered yeast was able to produce up to 100 mg.L⁻¹ of artemisic acid that is excreted into the growth medium and is easy to purify;⁴⁴ however, artemisic acid is a fine chemical to be produced at low volumes. This situation contrasts with the production of bulk chemicals for the plastic industry that has a market of 100 million⁴⁵ tons per year and that must be economically competitive with the traditional petrochemical routes in order to reach the market.

4. The New Biology and Bioplastics

The application of the new biology concepts to the bioplastic industry has only recently begun and two main routes for their production are being explored: by producing the whole polymer or by producing monomers that will undergo subsequent chemical polymerization.⁴⁶

Among the naturally produced polymers with characteristics suitable for the bioplastic industry the most widely studied are polyhydroxyalkanoates (PHAs). PHAs are types of polyesters produced by a wide variety of bacteria and actinomycetes and stocked as a carbon reserve material in the form of intracellular granules. PHAs were first described in 1926 by Lemoigne and since then, an overwhelming number of different polyhydroxyalkanoates, comprising about 150 different hydroxyalkanoic acids as constituents, have been isolated from bacteria.⁴⁷ PHAs are grossly divided into short chain length (PHAscl), with thermoplastic properties and medium chain length (PHAmcl), with elastomer properties.⁴⁸ Their structural diversity, biodegradable and biocompatible properties, and the possibility of being synthesized from renewable carbon sources have placed PHAs on the spotlight as candidates to replace synthetic plastics,^{49,50} with the first PHA consumer product launched in 1990 in Germany.⁵¹

Accumulation of PHAs in the bacterial cell occurs when a carbon source is in excess and at least one other nutrient essential for growth has been depleted.⁴⁷ The bacterium *Alcaligenes eutrophus* is capable of accumulating up to 80% (w/w) of the PHA polyhydroxybutyrate (PHB) when glucose is provided as a carbon source.⁵¹ Other microbial genera capable of accumulating PHAs are: *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Rhodospseudomonas*, *Protomonas*, *Aeromonas*, *Thiococcus*, *Rhodococcus*, *Corynebacterium*, *Ralstonia*, *Burkholderia*, *Chromobacterium*, *Nocardia*, and *Rhizobium*.^{51,52,53} The current application of synbio to PHAs production aims at introducing new metabolic pathways to broaden the range of substrates or to transfer the PHA-producing ability of certain organisms into others that are easier to culture. One example is the production of PHA by recombinant *E. coli* harboring the *A. eutrophus* PHB biosynthetic genes. This research showed promising results, since the engineered *E. coli* strain produced over 80 g.L⁻¹ of PHB with productivity greater than 2 g.L⁻¹.h⁻¹ in fed-batch cultures, which is comparable to the results obtained with *A. eutrophus*.^{46,54,48}

Another naturally produced polymer is starch, which is one of the most widely available carbon stock reserves in plants. Starch has been combined with man-made monomers

that render properties desirable for the plastic industry.^{55,56} One of these polymers is commercially known as Plastarch Materials (PSM) and is produced by Teinnoventions Inc. The polymer is a biodegradable resin consisting of more than 80% corn starch. During the fabrication process, corn starch is mixed with cellulose and unspecified enzymes and reagents for condensation and polymerization in order to create PSM crystals. These crystals are submitted to extrusion and generate PSM grains.⁵⁷ PSM has various applications including food packaging, industrial packaging, medical products, and disposable items. It also has a high heat tolerance, which makes it fit for many thermoforming, injection molding, blown film, and foaming applications.⁵⁸ Other trademarks based on the same principle include DuPont™ Biomax®,⁵⁹ Ever Corn Resin,⁶⁰ and Cereplast Compostables® resins.⁶¹ DuPont uses the technology from Plantic® Technologies to manufacture the Biomax®. The process consists of modifying the high amylose starch through a process called hydroxypropylation, which retards retrogradation and plasticizes the starch.^{62,63} Until now, no genetic modifications have been applied to improve the production of starch and all advances in the use of this polymer have been made from the chemical point of view.

In spite of the advantages of being “green,” biopolymers such as PHB and PSM, are still expensive to produce and face concerns regarding their intrinsic quality, sometimes due to being composed by heterogeneous mixtures of carbon chains. Moreover, they are not easily processed into products comparable to the ones obtained by the petrochemical industry⁴⁶ and there is a clear limitation to their natural diversity. In addition, their biodegradability implies the return to the atmosphere of the CO₂ captured in the production of renewable carbon sources, and this is an undesirable trait due to our current concerns regarding the atmospheric levels of CO₂.

In view of these limitations, there is a growing tendency towards developing green processes for the production of monomers similar or identical to the ones produced by the petrochemical industry, since there would be no need to change or adapt the technologies used for their downstream processing. An important aspect of the development of this approach of monomer production from renewable carbon sources is that it promotes the integration between the fields of biology and chemistry in order to obtain the desired final product, and this interaction is beneficial to all involved since it opens new fields of multidisciplinary studies.

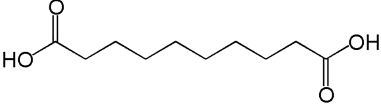
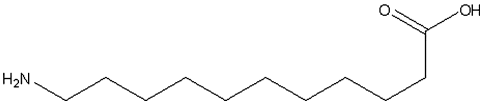
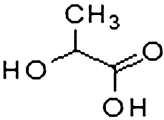
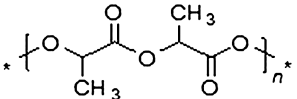
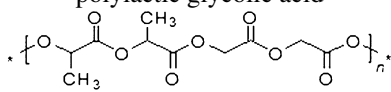
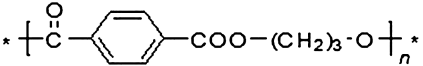
Up until now, this second strategy has included polymers made from monomers that are naturally produced by microorganisms on a relatively large scale, and the first attempts at applying the new biology concepts to their improvement aim at expanding the substrates that can be used for their production, to increase their productivity, or to reduce the production costs related to large-scale anaerobic culture. It has been shown that it is possible to produce significant amounts of several monomers of interest for the plastic industry by fermentation using natural or genetically engineered microorganisms and these have been reviewed elsewhere.⁵ (Table 2) However, only four of these biological processes are efficient and economically competitive with the standard petrochemical route to be currently marketed in the plastic industry: 11-amino-undecanoic acid (PA11), sebacic acid (PA6,10), lactic acid (PLA), and 1,3-propanediol (PPT) and will be discussed in greater detail here.

4.1. Polyamides (Bio-PAs)

The development of polyamides started with Carothers, in 1935, who first synthesized nylon-6,6—a polyamide of hexamethylene diamine and adipic acid.⁶⁴ In 1939 the DuPont Company started the commercial production of nylon-6,6 and its conversion into fibers. At

Table 2

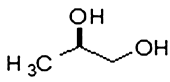
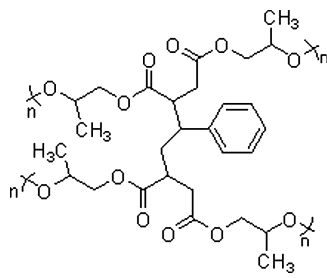
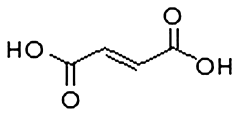
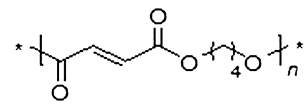
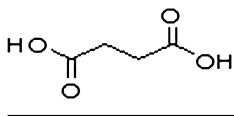
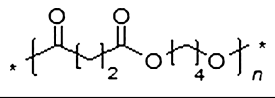
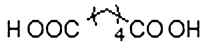
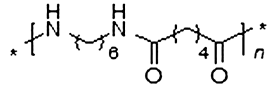
Most efficient production bioprocess reported to date for obtaining monomers for the plastic industry and their polymers.

Monomer	Most efficient process	Polymer	Max.Y (%)	Ref.
Sebacic acid 	Sebacic acid is obtained directly from castor beans	Polyamide 6.10 $[-NH-(CH_2)_6-NH-CO-(CH_2)_8-CO-]_n$	10	67,66
11 amino-undecanoic acid 	Ricinoleic acid is obtained from castor beans	Polyamide 11 $-[NH-CO-(CH_2)_{10}]_n-$	22	67
Lactic acid 	Glucose continuous fermentation by natural microorganisms	Polylactic acid and  poly(lactic glycolic acid) 	18	73
1,3-Propanediol 	Glucose fermentation by genetically modified <i>E. coli</i>	Polypropylene terephthalate 	13.5	80,82,83

(Continued on next page)

Table 2

Most efficient production bioprocess reported to date for obtaining monomers for the plastic industry and their polymers. (*Continued*)

Monomer	Most efficient process	Polymer	Max. Y (%)	Ref.
	Glucose fermentation by <i>Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum</i>	Polyester 	0.79	⁵
	Sugar fermentation by <i>Rhizopus</i> sp.	Polybutylene fumarate 	7	⁸⁴
	Glucose fermentation by genetically modified <i>E. coli</i>	Polybutylene succinate 	9.92	^{85,86}
	Glucose fermentation by genetically modified <i>E. coli</i> to muconic acid and chemical conversion to adipic acid	Nylon-6,6 	3.57	⁸⁷

Max. Y: Maximum yield reported.

the same time, Schlack (Germany) developed polyamides by ring-opening polymerization of cyclic lactams, and nylon-6 derived from caprolactam.⁶⁴

Recent efforts based on green petrochemistry concepts have led to the development of Polyamide 11 (PA 11) or Nylon 11, which is derived from vegetable oil. It is produced by Arkema under the trade name Rilsan from the ricinoleic acid (C18) that is the main fatty acid found in castor bean oil.⁶⁵ To make PA11, ricinoleic acid is first cleaved into molecules with 7 and 11 carbon atoms by steam cracking and the C11 acid is then aminated, thus resulting in the monomer 11 amino-undecanoic acid that is polymerized to form PA11.⁶⁴ PA 11 is not biodegradable and its properties are similar to PA 12, but since it can be partly derived from a renewable carbon source it has a lower environmental impact, consumes less nonrenewable resources, and has superior thermal resistance. It is used in high-performance applications such as automotive fuel lines, pneumatic airbrake tubing, electrical anti-termite cable sheathing, oil and gas flexible pipes, control fluid umbilicals, sports shoes, electronic device components, and catheters.

Another polyamide, PA-6.10, is currently being produced by BASF under the trade-name Ultramid® BALANCE composed of 60% of sebacic acid derived from castor oil. In order to obtain sebacic acid, the ricinoleic acid present in castor oil is cleaved at a high temperature (250–300°C) in a concentrated alkali (80%) reaction, in aqueous solution, and in the presence of a thinning agent.⁶⁶ Sebacic acid is then condensed with hexamethylene diamine to form nylon 6,10.⁶⁷ This polymer combines a relatively low density polyamide with good low-temperature impact resistance and has great dimensional stability due to its reduced capacity for water absorption.⁶⁸ The current market for Rilsan™ PA11, Rilsan™ PA12 (synthetic), and Ultramid® BALANCE is about 7% of the global market of polyamides. In 2006, the demand for PA compounds or polymers reached 863,000 tons and is expected to grow to 986,000 tons in 2010, with an increase of 4.4% annually. However, the special group of bio-derived polyamides 11, 12, and 6 is expected to grow faster, about 7–8% annually.⁶⁹

4.2. Polylactic Acid (PLA)

PLA (polylactic acid) is a polyester of lactic acid units. Lactic acid is an appropriate monomer for the polymer industry due to its carboxylic acid and alcohol groups that allows the formation of ester bonds. Given its biocompatibility, superior thermal/mechanical properties, and transparency of the processed materials, PLA is widely used in medical applications such as wound closure, surgical implants, reabsorbable sutures, tissue culture and, more recently, in packaging.⁷⁰

The primary feedstock for the polymerization of lactic acid is its cyclic dimer dilactide (3,6-dimethyl-*p*-dioxane-2,5-dione). Dilactide is formed by dehydration in the presence of weakly basic catalysts, such as zinc and tin oxides,^{71,72} and is obtained preferably from the L-isomer of lactic acid, due to the higher yield and superior physical properties of the resulting polymer, such as a high degree of crystallinity and tensile strength.⁷³ Polymerization of dilactide is usually performed by using ring-opening polymerization initiated by a multivalent metal alkoxide, such as Tin(II)Butoxide.⁷⁴ Given the isomer specificity of the process, currently worldwide production of L-lactic acid is based on sugar fermentation since bioprocesses are stereoisomer selective.⁷³

Anaerobic fermentation of lactic acid from glucose or pure starch is mainly performed by bacteria of the genus *Lactobacillus*, although the genera *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*,

Vagococcus, and *Weissella*⁵ have also been reported as lactic-acid producing strains.⁷⁵ As a means to reduce production costs, starchy hydrolysates obtained from corn, cassava, barley, wheat, and potatoes have also proven to be suitable substrates for lactic acid fermentation.⁷⁵ L-Lactic acid production by fermentation is considered high, reaching concentrations of up to 180 g.L⁻¹ and productivities of ~2 g.L⁻¹.h⁻¹.⁷⁶ However, due to the high cost associated with the anaerobic culture conditions needed to produce lactic acid in bacteria of the genus *Lactobacillus*, advances have also been made in metabolic engineering of more easily grown microorganisms, such as the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. A laboratory strain of *S. cerevisiae* was genetically modified by deleting both pyruvate decarboxylase genes followed by the insertion of two copies of the lactate dehydrogenase gene; this modification resulted in a yeast strain able to produce 82.3 g.L⁻¹ lactic acid, with a conversion percentage of up to 81.5% from glucose⁷⁷ (Ishida, 2006). In spite of these advances, productivity and conversion rates have remained higher in *Lactobacillus*, and consequently, the yeast process has not been adopted by industry.

Nevertheless, Bio-PLA is currently among the most economically viable bioplastics, as illustrated by the announcement on December 4, 2007, by Cargill and Teijin Limited of Japan that all required regulatory approvals for the 50/50 NatureWorks LLC joint venture have been received and they intend to produce 140,000 tons/year of lactic acid for the synthesis of a PLA-based biopolymer marketed worldwide as IngeoTM.⁷⁸ Nowadays, commercialization of IngeoTM constitutes, approximately, 0.02% of the plastic market.⁷⁹

5. Polypropylene Terephthalate (Bio-PPT)

1,3-Propanediol (1,3-PD) is used as a building block for polyesters, polyethers and polyurethanes.^{80,81} 1,3-PD, or propylene glycol, is one of the oldest known anaerobic fermentation products of glycerol by a large number of bacterial genera, including *Citrobacter*, *Clostridium*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, and *Lactobacillus*.⁸² Over the past few decades, the interest in 1,3-propanediol has been increasing significantly. In 1995, Shell Chemical Company announced the commercialization of a new polyester based on terephthalic acid and 1,3-PD: poly-propylene terephthalate (PPT) or CorterraTM, with applications in the fiber and textile industry. In view of the higher demand for 1,3-PD, Shell, and Degussa developed and patented chemical synthesis pathways for 1,3-PD production from petrochemicals, more economically viable than its production from glycerol.^{80,81} Corterra is polymerized from 1,3PD and either purified terephthalic acid (PTA) or dimethyl terephthalate (DMT) by melt-polymerization in two steps. The first step consists of an esterification between 1,3-PD and PTA or a transesterification between 1,3-PD and DMT to obtain a mixture of 3-hydroxypropyl-terephthalate and oligomers. The second step is a polycondensation *in vacuo* of the esterification or transesterification product, which removes the polycondensation byproducts 1,3-PD and water.⁸⁸

The economic relevance of 1,3-PD coupled to the wealth of information regarding the fermentation of this monomer by microorganisms dating from 1937⁸⁹ prompted research aiming at improving 1,3-PD production from renewable raw materials. The result of this research constitutes the most significant success to date of a biopolymer: SoronaTM. The story of Sorona began in 1995, when DuPont and Genencor, one of the largest biotechnology companies in the world, signed a cooperation agreement to develop a biotechnological pathway for the production of 1,3-PD from glucose, using a recombinant strain of *Escherichia coli*. The rationale behind changing glycerol to glucose as the feed-stock basis for the fermentative 1,3-PD production was to obtain a significant reduction in the costs of



Figure 3. Timeline for the microbial production of Bio-1,3-PD using genetically modified *Escherichia coli* from idea conception until commercial fabrication of Sorona™ (Adapted from⁹¹).

the raw materials, thus rendering the final product more competitive with the established petrochemical route. As a result, an *E. coli* strain was modified for production of glycerol from dihydroxyacetone phosphate (DHAP) by the introduction of the genes glycerol 3-phosphate dehydrogenase (*gpd1*) and glycerol 3-phosphate phosphatase (*gpp1*) of *Saccharomyces cerevisiae*. The obtained glycerol is then metabolized into 1,3-PD by the action of glycerol dehydratase and oxidoreductase enzymes which are expressed by genes of *K. pneumoniae* and *E. coli*, respectively.⁸² This process has been revealed in a series of patents and applications.^{90,91,92,93} Once the successful biotechnological process was developed, DuPont and Tate & Lyle established a joint venture: DuPont Tate & Lyle BioProducts with the goal of producing the poly-propylene terephthalate (PPT) fibers called Sorona, from corn sugar.⁹⁴ In only 12 years, the final product reached the market, estimated at 100 million lbs/year⁹⁵ (Fig. 3).

Sorona's production of bio-1,3-PE from glucose constitutes the first example of an integrated systems and synthetic biology approach that resulted in the creation of a biosynthetic process that is twice more efficient than the standard petrochemical process. Moreover, this process has low energy requirements that result in lower greenhouse gas emissions when compared to the petrochemical process.⁹⁶ It has been estimated that for every 50,000 ton of bio-1,3-PE produced, the equivalent to 10 million gallons of gasoline can be saved, or enough to fuel 22,000 cars.⁹⁷ Such a remarkable success illustrates the power of the systems and synthetic biology approach for the production of bulk chemicals for the petrochemical industry.

6. Brazilian Ethanol Fermentation as a Model for Green Petrochemistry

As exemplified above, the fermentation of commodities is the great objective to be reached by the petrochemical industry⁵ and the standard to be reached is that of Brazilian ethanol fermentation by the yeast *S. cerevisiae*, which uses sugarcane sucrose as substrate. The industrial ethanol fermentation process is simple, and is mostly accomplished by batch fermentation.⁹⁸ The short (6–10 h) fermentation times allow the yeasts to be recycled up to three times a day for as long as 200 days.⁹⁹ This process shows two main characteristics that are highly desirable for the fermentation of commodities: 1) is made in open reactors without the need of astringent sterilization processes, since the yeast has evolved a system of rapid ethanol production and high ethanol tolerance (10–12%) and this compound is able to control most of the contaminants¹⁰⁰ and 2) although ethanol fermentation is anaerobic in nature, the process can be carried out without the need of atmosphere control due to the fact that the yeast-gene regulation system is able to perceive the presence of fermentable sugars in the media and turns off the genes responsible for molecular respiration.¹⁰¹ Nowadays, the USA and Brazil produce 35.4 million cubic meters¹⁰² per year of ethanol from corn or sugarcane juice and this technology is becoming increasingly significant in the biofuels industry, as illustrated by the numerous research initiatives sponsored in this area.¹⁰³

This natural process of ethanol fermentation by the yeast is used by man for the industrial production of ethanol and the current challenge is to substitute the natural evolution of these desirable traits for a directed evolution that would mimic these characteristics but promote the production of compounds that are not produced naturally and thus are not part of the natural evolution of these organisms. Regarding this it has recently been discovered that industrial ethanol fermentation in Brazil is carried out by wild strains different from the cultured inoculated strains; these wild strains are able to rapidly outgrow the inoculums and account for the country's industrial ethanol production.¹⁰⁴ This fact has been a major hindrance to the genetic manipulation of yeasts for industrial purposes because the use of laboratory strains, which are easier to manipulate, results in their substitution for wild strains once they are placed inside the large-scale fermenting vats.¹⁰⁴ This observation illustrates that evolution is a major factor to be considered in any Synbio project and that the microorganism strains best adapted for industry should be used as the basic genetic framework for further molecular modifications. Regarding this Brazil has one of the most promising microbial diversity currently characterized and this resource is considered as part of the country's natural patrimony.

In addition to the creation of new microorganisms, the fermentation of new commodities would not become a reality unless there is a large supply of fermentable biomass able to substitute a large part of the 3,952.8 million ton/year¹⁰⁵ of the petroleum based industry. Brazil's tropical sun, abundant water supply, and great expanses of arable land make it ideal for biomass production. For instance, Brazil has become the largest sugarcane producer in the world¹⁰³ and the first largest producer of ethanol from sugarcane juice by the yeast *S. cerevisiae*.¹⁰⁶ Although the United States produces more ethanol per year using corn starch, it has been estimated that the carbon balance for sugarcane is more favorable than for corn, it is cheaper, and does not compete with food production.¹⁰³ Moreover, Brazil is the first exporter of cellulose pulp, and cellulose is considered the greatest source of glucose for fermentation.^{107,108} Although the processes for obtaining fermentable sugar from cellulose are still expensive, Brazil is pioneering the establishment of industrial-scale acid pyrolysis of cellulose^{109,110} and is committed by means of resources in the order of 10 million USD annually¹¹¹ devoted to research in all areas relevant to maintain its world leadership in the ethanol industry. These pre-existing resources render Brazil as a strategic start point for future research in green petrochemistry and thus constitute an example to follow by other tropical countries.

This strategic advantage of Brazilian sugarcane production was recently demonstrated by the joint venture agreement between Amyris Biotechnologies and the Brazilian Crystalsev (a fuel distributor) and Santelisa Vale (an ethanol refiner) announced in 2008. Amyris has created a yeast strain able to convert sugarcane juice into ultrapure diesel (composed only by the hydrocarbon farnacene), which is compatible with current motor engines. The joint venture agreement aims at placing this new product in the market by 2010 through the creation of a pilot plant in São Paulo State, where most of the Brazilian ethanol is produced.¹¹²

Following this example, the use of ethanol fermentation by yeast is already being applied directly to the plastic industry. Polyethylene is built from ethylene monomers, and ethanol can be converted into ethylene by dehydration. Bio-derived polyethylene (Bio-PE) is chemically and physically identical to traditional PE. Although Bio-PE does not biodegrade, it can be recycled. An advantage of Bio-PE is that it can considerably reduce greenhouse gas emissions. The Brazilian petrochemical group Braskem recently acquired the certification of a 100% green Bio-PE produced from sugarcane ethanol.¹¹³ It has been estimated that the production of one ton of Bio-PE removes from the environment

2.5 ton of carbon dioxide, while the traditional petrochemical route results in emissions of 3.5 ton.¹¹⁴ Braskem plans to introduce commercial quantities of its first bio-derived high density polyethylene in 2010 to be used in packaging, such as bottles and tubes, and has also developed a technology to produce bio-derived butene, required to make the linear low density polyethylene types used in film production.¹¹⁵

7. Conclusion

Volatile oil prices and the constraints to CO₂ emissions are pushing the petrochemical industry towards the creation of high quality plastics from renewable sources. The first possibility explored was the production of natural and biodegradable polymers from microorganisms; however, it was quickly realized that these natural polymers lack several desirable traits shown by synthetic polymers and that biodegradation is not desirable since the carbon returns to the atmosphere in the form of CO₂. Nowadays, it seems apparent that the ideal solution would be to produce the same monomers currently employed by the petrochemical industry from microorganism fermentation of renewable plant resources. In this case, the CO₂ fixed in the vegetal carbon source would be incorporated into highly stable plastics and would thus help mitigate carbon dioxide pollution by fixing it for a long period of time. The recent advances in molecular biology have finally enabled the creation of new microorganism capable of producing these synthetic monomers, and thus open great opportunities for the bioplastic industry. Due to the availability of sun, water, arable land, and the climatic conditions suitable for sugarcane production, which in contrast to corn does not compete with food production, tropical countries such as Brazil have a strategic advantage and begin to show promising results in the production of bioplastics.

Acknowledgements

We thank Braskem, S.A., FAPESP (*Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo*) and UNIEMP for financial support and Dr. Luciana Gonzaga de Oliveira and Ramon Vidal for artwork used in this paper.

References

1. Madsen, M. "The role of biomass in the future global energy supply", The 20th World Energy Congress 2007: http://vbn.aau.dk/fbspretrieve/14071392/MichaelMadsen_WEC_Youth_Programme_paper.pdf (last accessed Sept. 2008)
2. The Nobel Foundation. The Nobel Peace Prize 2007: http://nobelprize.org/nobel_prizes/peace/laureates/2007/index.html (last accessed Sept. 2008)
3. <http://www.wasteonline.org.uk/resources/InformationSheets/Plastics.htm> (last accessed Sept. 2008)
4. Stevens, E.S. "What makes green plastics green?," *Biocycle* **2003**, 44, 24–27.
5. Lee, S.Y., Hong, S.H., Lee, S.H., Park, S.J. "Fermentative production of chemicals that can be used for polymer synthesis," *Macromol. Biosci.* **2004**, 4, 157–164.
6. Futuyma, D.J. "Progress on the Origin of Species," *PLoS Biol.* **2005**, 3, 197–199.
7. Watson, J.D., Crick, F.H. "The structure of DNA," *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* **1953**, 18, 123–131.
8. Nirenberg, M., Caskey, C.T., Marshall, R., Brimacombe, R., Kellogg, D., Doctor, B., Hatfield, D., Levin, J., Rottman, F., Pestka, S., Wilcox, M., Anderson, F. "The RNA code and protein synthesis," *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* **1966**, 31, 11–24.
9. Crick, F. "Central dogma of molecular biology," *Nature* **1970**, 227, 561–563.

10. Smith, K.B. "Genetic engineering — techniques and potential," *Trends Biochem. Sci.* **1976**, June 1976,
11. Goeddel, D.V., Kleid, D.G., Bolivar, F., Heyneker, H.L., Yansura, D.G., Crea, R., Hirose, T., Kraszewski, K.I., Riggs, A.D. "Expression in *Escherichia coli* of chemically synthesized genes for human insulin," *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1979**, 79, 106–110.
12. Maxam, A.M., Gilbert, W. "A new method for sequencing DNA," *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1977**, 74, 560–564.
13. Mullis, K., Fallona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., Erlich, H. "Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction," *Cold Spring harbor Symposia on Quantitative Biology* **1986**, 51, 263–273.
14. Lander, E.S., Linton, L.M., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M.C., Baldwin, J., Devon, K., Dewar, K., Doyle, M., FitzHugh, W., Funke, R., Gage, D., Harris, K., Heaford, A., Howland, J., Kann, L., Lehoczy, J., LeVine, R., McEwan, P., McKernan, K., Meldrim, J., Mesirov, J.P., Miranda, C., Morris, W., Naylor, J. "Initial sequencing and analysis of the human genome," *Nature* **2001**, 409, 860–921.
15. Genomics.energy.gov. Human Genome Project Information: <http://www.ornl.gov/sci/techresources/HumanGenome/home.shtml> (last accessed Sept. 2008)
16. Ideker, T., Galitski, T., Hood, L. "A new approach to decoding life: Systems Biology," *Annu. Rev. Genom. Hum. Genet.* **2001**, 343–372.
17. Hood, L., Galas, D. "The digital code of DNA," *Nature* **2003**, 421, 444–448.
18. Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R. "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors," *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1977**, 74, 5463–5467.
19. Fleischmann, R.D., Adams, M.D., White, O., Clayton, R.A., Kirkness, A.R., Kerlavage, A.R., Bult, C.J., Tomb, J.F., Dougherty, B.A., Merrick, J.M., McKenney, K., Sutton, G., FitzHugh, W., Fields, C., Gocayne, J.D., Scott, J., Shirley, R., Liu, L., Glodek, A., Kelley, J.M., Weidman, J.F., Phillips, C.A., Spriggs, T., Hedblom, E., Cotton, M.D., Utterback, T.R., Manna, M.C., Nguyen, D.T., Saudek, D.M., Brandon, R.C., Fine, L.D., Fritchman, J.L., Fuhrmann, J.L., Geoghagen, N.S.M., Gnehm, C.L., McDonald, L.A., Small, K.V., Fraser, C.M., Smith, H.O., Venter, J.C. "Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd," *Science* **1995**, 269, 496–512.
20. National Center for Biotechnology Information (NCBI). Entrez Genome: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=genome> (last accessed Oct. 2008)
21. European Bioinformatics Institute. The EMBL Nucleotide Sequence Database, Statistics: <http://www.ebi.ac.uk/embl/Services/DBStats/> (last accessed Sept. 2008)
22. Chan, E.Y. "Advances in sequencing technology," *Mutat. Res.* **2005**, 573, 13–40.
23. Margulies, M., Egholm, M., Altman, W.E., Attiya, S., Bader, J.S. "Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors," *Nature* **2005**, 437, 376–380.
24. Bentley, D.R. "Whole-genome resequencing," *Curr. Opin. Genet.* **2006**, 16, 545–552.
25. Morozova, O., Marra, M.A. "Applications of next-generation sequencing technologies in functional genomics," *Genomics* **2008**, 92, 255–264.
26. Shendure, J., Mitra, R.D., Varma, C., Church, G.M. "Advanced sequencing technologies: methods and goals," *Nat. Rev. Genet.* **2004**, 5, 335–344.
27. Austin, C.P. "The completed human genome: implications for chemical biology," *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2003**, 7, 511–515.
28. Sebaihia, M., Wren, B.W., Mullany, P., Fairweather, N.F., Minton, N., Stabler, R., Thomson, N.R., Roberts, A.P., Cerdeno-Tarraga, A.M., Wang, H.W., Holden, M.T.G., Wright, A., Churcher, C., Quail, M.A., Baker, S., Bason, N., Brooks, K., Chillingworth, T., Cronin, A., Davis, P., Dowd, L., Fraser, A., Feltwell, T., Hance, Z., Holroyd, S., Jagels, K., Moule, S., Mungall, K., Price, C., Rabinowitsch, E., Sharp, S., Simmonds, M., Stevens, K., Unwin, L., Whithead, S., Dupuy, B., Dougan, G., Barrell, B., Parkhill, J. "The multidrug-resistant human pathogen *Clostridium difficile* has a highly mobile, mosaic genome," *Nat. Genet.* **2006**, 38, 779–786.

29. Methe, B.A., Nelson, K.E., Eisen, J.A., Paulsen, I.T., Nelson, W., Heidelberg, J.F., Wu, D., Wu, M., Ward, N., Beanan, M.J., Dodson, R.J., Madupu, R., Brinkac, L.M., Daugherty, S.C., Deboy, R.T., Durkin, A.S., Gwinn, M., Kolonay, J.F., Sullivan, S.A., Haft, D.H., Selengut, J., Davidsen, T.M., Zafar, N., White, O., Tran, B., Romero, C., Forberger, H.A., Weidman, J., Khouri, H., Feldblyum, T.V., Utterback, T.R., Van Aken, S.E., Lovley, D.R., Fraser, C.M. "Genome of *Geobacter sulfurreducens*: Metal reduction in subsurface environments," *Science* **2003**, 302, 1967–1969.
30. Weiner, R.M., Taylor, L.E., Henrissat, B., Hauser, L., Land, M., Coutinho, P.M., Rancurel, C., Saunders, E.H., Longmire, A.G., Zhang, H.T., Bayer, E.A., Gilbert, H.J., Larimer, F., Zhulin, I.B., Ekborg, N.A., Lamed, R., Richardson, P.M., Borovok, I., Hutcheson, S. "Complete genome sequence of the complex carbohydrate-degrading marine bacterium, *Saccharophagus degradans* strain 2-40(T)," *Plos Genet.* **2008**, 4, e1000087.
31. Park, S.J., Lee, S.Y., Cho, J., Kim, T.Y., Lee, J.W., Park, J.H., Han, M.J. "Global physiological understanding and metabolic engineering of microorganisms based on omics studies," *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2005**, 68, 567–579.
32. Joyce, A.R., Palsson, B.O. "The model organism as a system: integrating 'omics' data sets," *Nature* **2006**, 7, 198–210.
33. Palsson, B. "In silico biology through "omics"," *Nat. Biotechnol.* **2002**, 20, 649–650.
34. Ideker, T., Thorsson, V., Ranish, J.A., Christmas, R., Buhler, J. "Integrated genomic and proteomic analyses of a systematically perturbed metabolic network," *Science* **2001**, 292, 929–934.
35. Ge, H., Walhout, A.J.M., Vidal, M. "Integrating 'omic' information: a bridge between genomics and systems biology," *Trends Genet.* **2003**, 19, 551–560.
36. Hobom, B. "Gene surgery: on the threshold of synthetic biology," *Med. Klin.* **1980**, 21, 834–841.
37. Benner, S.A., Sismour, A.M. "Synthetic biology," *Nat. Rev. Genet.* **2005**, 6, 533–543.
38. Russ, Z.N. "Synthetic biology: enormous possibility, exaggerated perils," *J. Biol. Eng.* **2008**, 2, 1–3.
39. Bailey, J.E. "Toward a science of metabolic engineering 9," *Science* **1991**, 252, 1668–1675.
40. Massachusetts Institute of Technology. International Genetically Engineered Competition Home Page: http://parts2.mit.edu/wiki/index.php/Main_Page (last accessed Sept. 2008)
41. Endy, D. "Foundations for engineering biology," *Nat. Rev.* **2005**, 438, 449–453.
42. Applied Biosystems "Major progress announced in DNA synthesis," *Nucleic Acids Res.* **1984**, 12, 1.
43. J. Craig Venter Institute. Venter Institute Scientists Create First Synthetic Bacterial Genome: <http://www.jcvi.org/cms/research/projects/synthetic-bacterial-genome/press-release/> (last accessed Sept. 2008)
44. Ro, D., Paradise, E.M., Ouellet, M., Fisher, K.J., Newman, K.L., Ndungu, J.M., Ho, K.A., Eachus, R.A., Ham, T.S., Kirby, J., Chang, M.C.Y., Withers, S.T., Shiba, Y., Sarpong, R., Keasling, J.D. "Production of the antimalarial drug precursor artemisinic acid in engineered yeast," *Nature* **2006**, 440, 940–943.
45. Waste Online. Plastic Recycling Information Sheet: <http://www.wasteonline.org.uk/resources/InformationSheets/Plastics.htm> (last accessed Sept. 2008)
46. Luengo, J.M., García, B., Sandoval, A., Naarro, G., Olivera, E.R. "Bioplastics from microorganisms," *Curr. Opin. Microbiol.* **2003**, 6, 251–260.
47. Steinbuchel, A., Hein, S. "Biochemical and molecular basis of microbial synthesis of polyhydroxyalkanoates in microorganisms," *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **2001**, 71, 81–123.
48. Khanna, S., Srivastava, A.K. "Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates," *Process Biochem.* **2005**, 40, 607–619.
49. Kalia, V.C., Lal, S., Cheema, S. "Insight in to the phylogeny of polyhydroxyalkanoate biosynthesis: Horizontal gene transfer," *Gene* **2007**, 389, 19–26.
50. Nonato, R., Mantelatto, P., Rossell, C. "Integrated production of biodegradable plastic, sugar and ethanol," *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2001**, 57, 1–5.
51. Anderson, A.J., Dawes, E.A. "Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates," *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **1990**, 54, 450–472.

52. Braunegg, G., Lefebrve, G., Genser, K.F. "Polyhydroxyalkanoates, biopolyesters from renewable sources: Physiological and engineering aspects," *Journal of Biotechnology* **1998**, 65, 127–161.
53. Steinbuechel, A., Valentine, S.J. "Diversity of bacterial polyhydroxyalkanoic acids," *FEMS Microbiology Letters* **1995**, 128, 219–228.
54. Suriyamongkol, P., Weselake, R., Narine, S., Moloney, M., Shah, S. "Biotechnological approaches for the production of polyhydroxyalkanoates in microorganisms and plants — A review," *Biotechnol. Adv.* **2007**, 25, 148–175.
55. Chandra, R., Rustgi, R. "Biodegradable Polymers," *Progr. Polym. Sci.* **1998**, 23, 1273–1335.
56. Chiellini, E., Solaro, R. "Biodegradable polymeric materials," *Adv. Mater.* **1996**, 8, 305–313.
57. PSM (HK) Company Limited. What is PSM?: <http://www.psm-hk.com/Eng/material.htm> (last accessed Feb. 2009)
58. PSM North America. What is PSM?: http://www.psmna.com/what_is_psm.html (Last accessed Sept. 2008)
59. DuPont: The Miracles of Science. DuPont™ Biomax® sheet, resins and modifiers: http://www2.dupont.com/Biomax/en_US/ (last accessed March 2009)
60. Japan Corn Starch Co. Ltd. Biodegradable Plastic Ever Corn TM: http://www.japan-cornstarch.com/h_13.html (last accessed Feb. 2009)
61. Cereplast: The Renewable Plastic. Cereplast Compostables and Cereplast hybrid Resins: <http://www.cereplast.com/product.php> (last accessed Sept. 2008)
62. Plantic: Changing the Nature of Plastics. Starch Technologies: <http://www.plantic.com.au/our-technologies/capabilities/starch-technologies/> (last accessed Feb. 2009)
63. Long, Y., Coombs, S., Christie, G.B.Y. "Biodegradable polymer," US20070148383, 2007.
64. Evstatiev, M. "Polyamides," In *Handbook of Thermoplastics*, 1, Olabisi, O., Eds., CRC Press: New York City, **1997**.
65. Change reference to: "Arkema Inc. North America. Rilsan Polyamide 11 and 12: <http://www.arkema-inc.com/index.cfm?pag=109> (last accessed Sept. 2008)"
66. Logan, L.R., Udesch, S.V. "Method for preparing sebacic acid and octanol-2," US Patent 6392074 B1.
67. Ogunniyi, D.S. "Castor oil: A vital industrial raw material," *Bioresour. Technol.* **2006**, 97, 1086–1091.
68. BASF The Chemical Company. Polyamide from renewable raw materials: http://www.plasticsportal.net/wa/plasticsEU~en_GB/portal/show/common/plasticsportal_news/2007/07_450 (last accessed Sept. 2008)
69. Plastemart. Special polyamides are expected to grow much faster than polyamide 6 & 6.6: http://www.plastemart.com/upload/Literature/special_polyamides.asp (last accessed Feb. 2009)
70. Wu, S. "Improving polylactide/starch biocomposites by grafting polylactide with acrylic acid: Characterization and biodegradability assessment," *Macromolecular Bioscience* **2005**, 5, 352–361.
71. El du Pont de Nemours & Co. Inc. "Preparation of optically active lactides," UK Patent 1007347, **1965**.
72. De Vries, K.S. "Preparation of polylactic acid and copolymers of lactic acids," US4797468, **1989**.
73. Mehta, R., Kumar, V., Bhunia, H., Upadhyay, S.N. "Synthesis of poly(lactic acid): A review," *Polymer Rev.* **2005**, 45, 325–349.
74. Kowalski, A., Libiszowski, J., Duda, A., Penczek, S. "Polymerization of L,L-dilactide initiated by tin(II) butoxide," *Macromol.* **2000**, 36, 1964–1971.
75. Venus, J., Richter, K. "Production of lactic acid from barley: strain selection, phenotypic and medium optimization," *Eng. Life Sci.* **2006**, 6, 492–500.
76. Ding, S., Tan, T. "L-lactic acid production by *Lactobacillus casei* fermentation using different fed-batch feeding strategies," *Process Biochem.* **2006**, 41, 1451–1454.
77. Ishida, N., Saitoh, S., Onishi, T., Tokuhiro, K., Nagamori, E., Kitamoto, K., Takahashi, H. "The effect of pyruvate decarboxylase gene knockout in *Saccharomyces cerevisiae* on L-lactic acid production," *Biosci. Biotech. Biochem.* **2006**, 70, 1148–1153.

78. Nature Works LLC. Ingeo, Ingenious materials: <http://www.natureworksllc.com/> (last accessed Sept. 2008)
79. Datta, R., Henry, M. "Lactic acid: recent advances in products, processes and technologies – a review," *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **2006**, *81*, 1119–1129.
80. Biebl, H., Menzel, K., Zeng, A.P., Deckwer, W.D. "Microbial production of 1,3-propanediol," *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1999**, *52*, 289–297.
81. Haveren, J.V., Scott, E.L., Sanders, J. "Bulk chemicals from biomass," *BioFPR.* **2008**, *2*, 41–57.
82. Nakamura, C.E., Whited, G.M. "Metabolic engineering for the microbial production of 1,3-propanediol," *Curr. Opin. Biotechnol.* **2003**, *14*, 454–459.
83. Antoniewicz, M.R., Kraynie, D.F., Laffend, L.A., Gonzalez-Lergier, J., Kelleher, J.K., Stephanopoulos, G. "Metabolic flux analysis in a nonstationary system: fed-batch fermentation of a high yielding strain of *E. coli* producing 1,3-propanediol," *Metab. Eng.* **2007**, *9*, 277–292.
84. Cao, N.J., Du, J.X., Chen, C.S., Gong, C.S., Tsao, G.T. "Production of fumaric acid by immobilized *Rhizopus* using rotary biofilm contactor," *Appl. Biochem. Biotechnol.* **1997**, 63–5, 387–394.
85. Vemuri, G.N., Eiteman, M.A., Altman, E. "Succinate production in dual-phase *Escherichia coli* fermentations depends on the time of transition from aerobic to anaerobic conditions," *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2002**, *28*, 325–332.
86. Vemuri, G.N., Eiteman, M.A., Altman, E. "Effects of growth mode and pyruvate carboxylase on succinic acid production by metabolically engineered strains of *Escherichia coli*," *Appl. Environ. Microbiol.* **2002**, *68*, 1715–1727.
87. Change Patent Number. Correct Reference: Frost, J.W., Draths, K.M. "Synthesis of catechol from biomass-derived carbon sources." WO/1995/007979, **1995**.
88. Duh, B. "Solid-state polymerization of poly(trimethylene terephthalate)," *J. Appl. Polymer Sci.* **2003**, *89*, 3188–3200.
89. Dozois, K.P., Lee, G.A., Carr, C.J., Hachtel, F., Krantz, J.C. "The fermentation of propylene glycol by members of the *escherichia-aerobacter-intermediate* groups 30," *J. Bacteriol.* **1937**, *34*, 9–13.
90. Laffend, L.A., Nagarajan, V., Nakamura, C.E. "Bioconversion of a fermentable carbon source to 1,3-propanediol by a single microorganism." US7169588, **2007**.
91. Nair, R.V., Payne, M.S., Trimbur, D.E., Valle, F. "Method for the production of glycerol by recombinant organisms." WO 99/28480, **1999**.
92. Diaz-Torres, M., Dunn-Coleman, N.S., Chase, M.W., Trimbur, D. "Method for the recombinant production of 1,3-propanediol." US Patent 6953684, **2005**.
93. Emptage, M., Haynie, S.L., Laffend, L.A., Pucci, J.P., Whited, G. "Process for the biological production of 1,3-propanediol with high titer," US Patent 7067300, **2006**.
94. Du Pont Tate and Lyle. Bioproducts: <http://www.duponttateandlyle.com/> (last accessed Sept. 2008)
95. Westervelt, R. "DuPont to launch renewable and nano-based engineering plastics," *Chem. Week* **2006**, 168, 9–10.
96. Carlson, R. "Laying the foundations for a bio-economy," *Syst. Synth. Biol.* **2007**, *1*, 109–117.
97. DuPont: The Miracles of Science. DuPont Engineering Polymers today announced at NPE that it is moving forward with plans to produce a new family of high-performance thermoplastic resins and elastomer products made with renewable resources: http://www2.dupont.com/Government/en_US/news_events/article20060620.html (last accessed March 2009)
98. Cunha, A.F., Missawa, S.K., Pereira, G.A.G. "Industrial potential of yeast biotechnology in the production of bioethanol in Brazil: the example of conditional flocculation," In *Industrial Perspectives for Bioethanol*, Franco, T.T., Ed., Instituto Uniemp: São Paulo. **2006**.
99. Wheals, A.E., Basso, L.C., Alves, D.M.G., Amorim, H.V. "Fuel ethanol after 25 years," *Trends Biotechnol.* **1999**, *17*, 482–487.

100. Bai, F.W., Anderson, W.A., Moo-Young, M. "Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks," *Biotechnol. Adv.* **2008**, *26*, 89–105.
101. Westergaard, S.L., Oliveira, A.P., Bro, C., Olsson, L., Nielsen, J. "A systems biology approach to study glucose repression in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*," *Biotechnol. Bioeng.* **2007**, *96*, 134–145.
102. Goldemberg, J., Coelho, S.T., Guardabassi, P. "The sustainability of ethanol production from sugarcane," *Energy Policy* **2008**, *36*, 2086–2097.
103. Marris, E. "Sugarcane and ethanol: Drink the best and drive the rest," *Nature* **2006**, *444*, 670–672.
104. Vertes, A.A., Inui, M., Yukawa, H. "Technological options for biological fuel ethanol," *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **2008**, *15*, 16–30.
105. BP (British Petroleum). Global oil consumption grew by 1 mb/d: <http://www.bp.com/sectiongenericarticle.do?categoryId=9023771&contentId=7044470> (last accessed Sept. 2008)
106. Koh, L.P., Ghazoul, J. "Biofuels, biodiversity, and people: Understanding the conflicts and finding opportunities," *Biological Conservation* **2008**, *141*, 2450–2460.
107. Lynd, L.R., Cushman, J.H., Nichols, R.J., Wyman, C.E. "Fuel ethanol from cellulosic biomass," *Science* **1991**, *251*, 1318–1323.
108. Badger, P.C. "Ethanol from cellulose: A general review," *Trends in new crops and new uses* **2002**, 17–21.
109. Dedini: Indústrias de Base. Dedini açúcar e etanol: <http://www.dedini.com.br/pt/aea.html> (last accessed Sept. 2008). In Portuguese.
110. Oliverio, J.L., Soares, P.A. "Produção de Álcool a Partir de Bagaço: o Processo Didini Hidrólise Rápida": <http://www.iea.usp.br/iea/online/midiateca/etanolcelulosicosoares.pdf> 2007 (last accessed Sept. 2008). In Portuguese.
111. FAPESP. BIOEN—Chamada FAPESP-Dedini para Apoio à Pesquisa: <http://www.fapesp.br/materia/3257/chamadas-de-propostas/bioen-chamada-fapesp-dedini-para-apoio-a-pesquisa.htm> (last accessed Sept. 2008). In Portuguese.
112. Amyris Biotechnologies. Amyris and Crystalsev Join to Launch Innovative Renewable Diesel from Sugarcane by 2010: http://www.amyris.com/index.php?option=com_content&task=view&id=54&Itemid=307 (last accessed March 2009)
113. Braskem: A World Class Brazilian Petrochemical Company. Braskem has the first certified green Polyethylene in the World: http://www.braskem.com.br/site/portal_braskem/en/sala_de_imprensa/sala_de_imprensa_detalhes_6062.aspx 2007 (last accessed Sept. 2008)
114. Agência Brasileira de Desenvolvimento Industrial. Braskem Define Fábrica de Plástico Verde: <http://www.abdi.com.br/?q=node/353> (last accessed Sept. 2008). In Portuguese.
115. Braskem: A World Class Brazilian Petrochemical Company. Braskem achieves new technological advance for production of green polymers: http://www.braskem.com.br/site/portal_braskem/en/sala_de_imprensa/sala_de_imprensa_detalhes_7271.aspx (Last accessed Sept. 2008)

DECLARAÇÃO

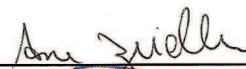
Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha dissertação/tese de Mestrado intitulada Engenharia Metabólica de Leveduras Industriais (*Saccharomyces cerevisiae*) para Produção de Glicerol:

() não se enquadra no § 3º do Artigo 1º da Informação CCPG 01/08, referente a bioética e biossegurança.

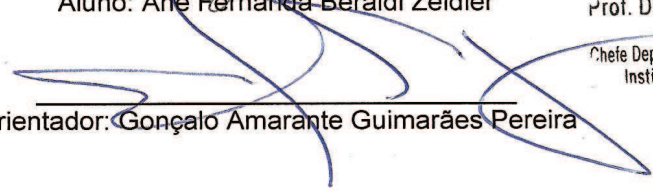
(x) tem autorização da(s) seguinte(s) Comissão(ões) de Bioética ou Biossegurança*:

CiBio – Comissão Interna de Biossegurança Instituto de Biologia, sob Protocolo(s) nº 2009/03, NB-1 projeto Rotas Verdes, aprovado em 21/12/2009.

** Caso a Comissão seja externa ao IB/UNICAMP, anexar o comprovante de autorização dada ao trabalho. Se a autorização não tiver sido dada diretamente ao trabalho de tese ou dissertação, deverá ser anexado também um comprovante do vínculo do trabalho do aluno com o que constar no documento de autorização apresentado.*


Aluno: Ane Fernanda Beraldi Zeidler

Prof. Dr. Gonçalo A. G. Pereira
Professor Titular
Chefe Dep. Genética, Evolução e Bioagentes
Instituto de Biologia/UNICAMP

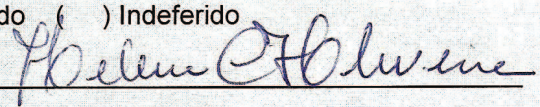

Orientador: Gonçalo Amarante Guimarães Pereira

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

(x) Deferido () Indeferido

Nome:

Função:


Profa. Dra. HELENA COUTINHO F. DE OLIVEIRA
Presidente
Comissão Interna de Biossegurança
CiBio/IB - UNICAMP