

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO
AMBIENTE

ESTUDOS FENOTÍPICOS E GENOTÍPICOS DO MECANISMO DE TRANSPORTE DE
XILOSE EM LEVEDURAS SELVAGENS PARA A PRODUÇÃO DE ETANOL DE
SEGUNDA GERAÇÃO

DAIANE DIAS LOPES

Orientador: Prof. Dr. Marco Antônio Záchia Ayub

Colaborador: Dr. Ronald Hector

Porto Alegre

Julho/2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO
AMBIENTE

**ESTUDOS FENOTÍPICOS E GENOTÍPICOS DO MECANISMO DE TRANSPORTE DE
XILOSE EM LEVEDURAS SELVAGENS PARA A PRODUÇÃO DE ETANOL DE
SEGUNDA GERAÇÃO**

Daiane Dias Lopes
Mestre em Genética e Biologia Molecular

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Microbiologia Agrícola e do Ambiente.

Área de concentração: Microbiologia Industrial

Orientador: Prof. Dr. Marco Antônio Záchia Ayub

Colaborador: Prof. Dr. Ronald Hector

Porto Alegre, Rio Grande do Sul - Brasil

Julho/2016

CIP - Catalogação na Publicação

Lopes, Daiane Dias

Estudos fenotípicos e genotípicos do mecanismo de transporte de xilose em leveduras selvagens para a produção de etanol de segunda geração / Daiane Dias Lopes. -- 2016.

118 f.

Orientador: Marco Antônio Záchia Ayub.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Porto Alegre, BR-RS, 2016.

1. Etanol lignocelulósico. 2. Resíduos agroindustriais. 3. Transportadores de xilose. 4. Via do metabolismo da xilose. 5. Spathaspora. I. Ayub, Marco Antônio Záchia , orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

“Diante de Deus todos somos igualmente sábios e igualmente tolos.”

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, quero agradecer a Deus e toda minha família, especialmente meus pais Luiz Lopes e Cleuza Dias Lopes e meus irmãos Cintia Dias Lopes e Luiz Fernando Dias Lopes. Agradeço todo o suporte oferecido, todo carinho e todas as orações. Essa tese é dedicada a vocês.

A seguir, quero agradecer a todos que de alguma forma contribuíram para minha formação acadêmica e o desenvolvimento desse trabalho:

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul pelo suporte e estrutura que permitiram que esta tese pudesse ser realizada.

Ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente e todos os professores pela oportunidade e ensinamentos que contribuíram para minha formação profissional. Agradeço em especial às coordenadoras Sueli Teresinha Van der Sand e Patrícia Valente da Silva, e a professora Gertrudes Corção, pela amizade, atenção e disposição dispensada, sempre.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pela concessão da bolsa.

Ao USDA de Peoria e especialmente ao Dr Ronald “Ron” Hector pela contribuição científica, paciência, amizade e principalmente pela confiança depositada. Agradeço também a toda equipe da Bioenergy Research Unit: Michael “Mike” Cotta, the boss, que me buscou no aeroporto de Chicago e me ajudou com minha mudança de apartamento; Katherine “Katie” Card e Victoria Nguyen pela amizade e assistência técnica neste estudo; Bruce Dien e Patricia “Pat” O’Byryan pela assistência na avaliação dos ensaios de fermentação e preparação do hidrolisado de “switchgrass”; Jeffrey “Jeff” Mertens pelo experimento do furfural e HMF.

Aos Laboratórios: de Enzimologia do Prof Dr Plinho F. Hertz e de Biocatálise do Prof. Dr Rafael C. Rodrigues, por permitir o uso de seus equipamentos e me auxiliar na avaliação da atividade de transporte; de Virologia do IPVDF de Eldorado do Sul, em especial ao Samuel Cibulski, pela atenção e ensinamento das técnicas moleculares e sequenciamento.

Aos alunos ou ex-alunos do Bioteclab e todo grupo BBB, não só pela amizade e a imensa ajuda no meu trabalho, mas principalmente pelo companheirismo. Agradeço especialmente às amigas Cintia de David e Karina V. Gomes que me ajudaram nos momentos mais difíceis.

E finalmente, quero agradecer ao Prof Dr Marco Antônio Záchia Ayub por ter me aceitado como integrante do seu grupo de pesquisa, pela confiança, amizade e pelos desafios propostos. Acima de tudo, agradeço a sua orientação e suporte durante todos esses anos que foram além dos 4 anos de doutorado.

ESTUDOS FENOTÍPICOS E GENOTÍPICOS DO MECANISMO DE TRANSPORTE DE XILOSE EM LEVEDURAS SELVAGENS PARA A PRODUÇÃO DE ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO¹

Autor: Daiane Dias Lopes

Orientador: Prof. Dr. Marco Antônio Záchia Ayub

Co-orientador: Prof. Dr. Ronald Hector

RESUMO

A levedura *Saccharomyces cerevisiae*, amplamente utilizada na conversão de glicose e frutose a etanol, não é capaz de fermentar a xilose presente na biomassa lignocelulósica de resíduos agroindustriais. Apesar da introdução da via metabólica dessa pentose em linhagens de *S. cerevisiae*, a fermentação da xilose simultaneamente com outros açúcares ainda é pouco eficiente. A proposta deste trabalho foi aumentar a eficiência do consumo da xilose por linhagens de *S. cerevisiae* introduzindo genes de transportadores exógenos identificados em leveduras selvagens que naturalmente fermentam pentoses. A via do metabolismo da xilose foi integrada no genoma de uma linhagem industrial brasileira de *S. cerevisiae* usada na produção de etanol. A partir desta, linhagens isogênicas foram criadas e mostraram ser mais eficientes no metabolismo da xilose em meio sintético e capazes de co-fermentar glicose e xilose na presença de altas concentrações de inibidores resultantes da hidrólise da biomassa lignocelulósica. Os transportadores identificados foram testados nas linhagens industriais geneticamente modificadas criadas neste estudo e em linhagens laboratoriais. Não foi possível confirmar a eficiência dos transportadores nas linhagens, embora os resultados mostraram diferenças nas curvas de crescimento das linhagens industriais expressando os transportadores. Este trabalho foi o início de um estudo dos fatores envolvidos no metabolismo da xilose e servirá como base para que futuros trabalhos sejam realizados na obtenção de uma linhagem mais eficiente para produção de etanol de segunda geração.

Palavras-chaves: Etanol lignocelulósico; resíduos agroindustriais; transportadores de xilose; via do metabolismo da xilose; *Spathaspora*.

¹Tese de Doutorado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (118 p.) julho, 2016.

PHENOTYPIC AND GENOTYPIC STUDIES OF XYLOSE TRANSPORT MECHANISM IN WILD STRAINS OF YEASTS FOR THE SECOND-GENERATION ETHANOL PRODUCTION¹

Author: Daiane Dias Lopes

Advisor: Prof. Dr. Marco Antônio Záchia Ayub

Co-Advisor: Prof. Dr. Ronald Hector

ABSTRACT

The yeast *Saccharomyces cerevisiae*, which efficiently ferments glucose and fructose to ethanol, is unable to ferment xylose present in lignocellulosic biomass of agroindustrial residues. Although the introduction of xylose metabolic pathways in *S. cerevisiae* strains has been described in the literature, the simultaneous fermentation of xylose and glucose in these modified strains is still very inefficient. The aim of this study was to increase the xylose consumption efficiency of *S. cerevisiae* by introduction of exogenous genes identified in wild yeast that naturally ferment pentose. The xylose metabolism pathway was integrated into the genome of a Brazilian industrial strain of *S. cerevisiae* used for the production of ethanol, which was then used to obtain isogenic modified strains. The isogenic strains showed to be more effective in xylose metabolism in synthetic medium and able to co-ferment glucose and xylose in the presence of high concentrations of inhibitors resulting hydrolysis of lignocellulosic biomass. The transporters identified were inserted into genetically modified industrial strains of *S. cerevisiae* created in this study and also in laboratory strains. It was not possible to confirm the transporters efficiency in laboratory strains but the results showed differences in the growth curves of the industrial strains expressing the transporters. This work was the beginning of a study of the factors involved in xylose metabolism and it will help to prepare future work to obtain an efficient strain for lignocellulosic ethanol production.

Keywords: Lignocellulosic ethanol; agroindustrial residues; xylose transporters; xylose metabolic pathways; *Spathaspora*.

¹Doctoral Dissertation in Agricultural and Environmental Microbiology – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (118 p.) July, 2016.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	1
2.	OBJETIVOS	3
3.	REVISÃO DA LITERATURA	4
3.1	Bioetanol	4
3.1.1	Etanol Lignocelulósico ou de segunda geração	5
3.2	Leveduras usadas na pesquisa de produção de etanol 2G	8
3.2.1	Leveduras fermentadoras naturais de pentoses	8
3.2.2	<i>S. cerevisiae</i> geneticamente modificadas para fermentar pentoses	9
3.3	Estratégia para melhorar a eficiência da produção de etanol 2G	12
3.4	Características básicas dos transportadores de pentoses e suas aplicações	14
4.	MATERIAL E MÉTODOS	19
4.1	Leveduras, meios de cultura e métodos gerais	19
4.2	Integração genômica das vias de metabolismo da xilose XR/XDH e XI nas linhagens industriais de <i>S. cerevisiae</i>	20
4.3	Clonagem dos possíveis genes de transportadores de xilose	26
4.4	Ensaio de fermentação	28
4.5	Preparação e fermentação do hidrolisado	29
4.6	Análises de crescimento no Bioscreen	30
4.7	Determinação da atividade de transporte da xilose	31
4.8	Preparação de esporos randômicos e tétrades	32
4.8.1	Esporos randômicos	32
4.8.2	Dissecção das tétrades	33
4.9	Testes de determinação do mating-type, troca do locus <i>MAT</i> e criação de linhagens poliploides	34
4.9.1	Determinação do mating-type	34
4.9.2	Troca do locus <i>MAT</i> e criação de linhagens poliploides	34
4.10	Método analítico	35
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
5.1	Caracterização cinética de utilização da xilose das linhagens selvagens fermentadoras de pentoses	36

5.1.1	Determinação da velocidade de crescimento máximo específico e consumo de xilose	36
5.1.2	Ensaio de atividade de transporte	40
5.2	Obtenção de uma linhagem eficiente de <i>S. cerevisiae</i> geneticamente modificada para fermentar xilose	44
5.2.1	Metabolismo da xilose das linhagens YRH1413 e YRH1414 com as vias XR/XDH e XI integradas ao cromossomo	44
5.2.2	Avaliação do nível de homozigose da linhagem diploide YRH1415 a respeito do metabolismo da xilose por meio de linhagens haploides.....	46
5.2.3	Ensaio de fermentação das linhagens isogênicas	49
5.2.4	Fermentação do hidrolisado de <i>Switchgrass</i> (SGH).....	57
5.3	Expressão fenotípica dos transportadores exógenos em <i>S. cerevisiae</i> geneticamente modificada	61
5.3.1	Análise de crescimento no Bioscreen.....	61
5.3.2	Ensaio de atividade de transporte em <i>S. cerevisiae</i>	66
6.	CONCLUSÃO	69
7.	PERSPECTIVAS	71
8.	REFERÊNCIAS	73
9.	APÊNDICES.....	82
10.	ANEXOS.....	100

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Leveduras usadas neste trabalho. (Continua).....	22
Tabela 2	Plasmídeos usados neste trabalho.....	24
Tabela 3	Primers usados neste trabalho.....	25
Tabela 4	Parâmetros cinéticos das linhagens de leveduras crescendo em YNB suplementado com 5 g L ⁻¹ de xilose.....	40
Tabela 5	Principais resultados do desempenho de fermentação das linhagens de <i>S. cerevisiae</i> construídas neste trabalho e dos controles.....	51
Tabela 6	Tempo da fase lag e taxa de crescimento específico das linhagens crescendo em SGH.....	61

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 Produção mundial de etanol por país/região e ano.....5
- Figura 2 Representação esquemática dos compostos gerados após a hidrólise da biomassa lignocelulósica (adaptada de das Neves et al., 2007).....7
- Figura 3 Fermentação da xilose em *S. cerevisiae*. A via fúngica utiliza xilose redutase (XR) e xilitol desidrogenase (XDH), enquanto a via bacteriana utiliza xilose isomerase (XI). Ambas as vias de produção de D-xilulose é convertida a D-xilulose-5P pela xiluloquinase endógena (XK). D-Xilulose-5P entra na via das pentoses-fosfato (PPP), onde é metabolizado para formar etanol. As setas indicam a direção das reações químicas (Moysés et al., 2016).....11
- Figura 4 Representação da estrutura geral dos transportadores de açúcar de leveduras com seus domínios conservados. As cinco regiões que tem sido reconhecida em transportadores de açúcar estão representadas pelas letras (A-E). As 12 cadeias polipeptídicas transmembranares estão representadas pelos cilindros (Leandro et al., 2009).....14
- Figura 5 Esquema simplificado do papel da proteína quinase Snf1 na ausência da glicose. Quando Snf1 está inativa (glicose alta), Mig1 não está fosforilada e migra para o núcleo, ligando-se ao DNA de genes reprimidos por glicose, promovendo repressão de sua transcrição em associação com Hxk2, uma das duas hexoquinases de leveduras. Hxk2 também interage com Reg1, e esta interação facilita a ação da fosfatase Glc7 em Snf1 para mantê-la em estado inativo. Quando Snf1 é ativada por fosforilação pelas proteínas quinases Elm1, Tos3, ou Sak1 (glicose baixa), Mig1 é fosforilada e migra para o citoplasma, assim como Hxk2, aliviando a repressão (Gancedo e Flores, 2008).....16
- Figura 6 Esquema simplificado da via do Rgt1 responsável pela repressão de genes *HXT* na ausência da glicose. Rgt1 associado aos co-repressores Mth1 e Std1 liga-se aos promotores dos genes *HXT* resultando na repressão da transcrição. Os genes *HXT* são de-reprimidos pela ativação da proteína quinase Yck1 através dos sensores Snf3 e Rgt2 que detectam a presença de glicose. Yck1 fosforila Mth1 e Std1, que são direcionados pela ubiquitina-proteína SCFGrr1 para degradação pelos proteossomos (Johnston e Kim, 2005).....16
- Figura 9 Representação da digestão da parede do esporo (A) e dissecação das tétrades (B) (Silverman e Hickman, 2011).....33

Figura 10	Plasmídeo pRH407 induzido pela galactose para expressar o gene <i>HO</i> e realizar a troca do <i>mating-type</i> . O plasmídeo foi providenciado pelo Dr Ronald Hector (USDA-ARS, NCAUR, Peoria, IL, USA).....35
Figura 11	Cinética da produção de biomassa (DO660) e consumo de xilose (g L ⁻¹) das linhagens crescidas em SC + 5 g L ⁻¹ de xilose durante 24 horas de incubação (30°C e 180 rpm). A. YRH1405; B. YRH1406; C. YRH1407; D. YRH1408; E. YRH1409; F. YRH1410; G. YRH1411; H. YRH1412 - Biomassa (×); Xilose (■). Eixo y da formação de biomassa está em escala logarítmica natural. (Continua).....38
Figura 12	Cinética do consumo de <i>pNPβX</i> (A) e atividade de transporte do <i>pNPβX</i> e <i>pNPβG</i> 5 mM de cada linhagem de leveduras crescidas em SC com 0,5 g L ⁻¹ e 5 g L ⁻¹ de xilose. Símbolos fechados: 0,5 g L ⁻¹ ; símbolos abertos: 5 g L ⁻¹ . Os dados apresentados representam os valores médios em triplicata. Células foram diluídas em tampão Tris-suscinato 50 mM pH 5 para uma concentração celular de 3-5 mg/mL (peso seco). Células mortas por fervura foram usadas como controle.....41
Figura 13	Curvas de crescimento no Bioscreen dos principais isolados de PE-2 (YRH1413) e CAT-1 (YRH1414) com os genes <i>XYL1/XYL2/XKS1</i> vs <i>XII/XK</i> integrados ao genoma em comparação com as linhagens selvagens e uma levedura fermentadora natural de xilose <i>S. arborariae</i> HM19.1a (YRH1407). Crescimento em YPX 2 %.....46
Figura 14	Curvas de crescimento em Bioscreen dos isolados haploides provenientes da esporulação da linhagem YRH1415. (A) Similar crescimento em meio YP + glicose (20 g L ⁻¹); (B) crescimento variado em YP + xilose (20 g L ⁻¹) com melhor desempenho para as linhagens YRH1483, YRH1485 e YRH1506.....47
Figura 15.	Fermentação anaeróbica das linhagens isogênicas em meio YP + glicose (80 g L ⁻¹) (A) e YP + xilose (80 g L ⁻¹) (B) por meio da produção de gás medida por Ankom RF.....50
Figura 16	Cinética da fermentação em meio sintético sob condições de micro-aerofilia. I. Meio YP + 40 g L ⁻¹ de glicose e 40 g L ⁻¹ de xilose; II. Meio YP + 80 g L ⁻¹ de xilose; A. YRH1413; B. YRH1415; C. YRH1483; D. YRH1491 e F. YRH400 - Xilose (Δ); Glicose (○); Xilitol (▲); Glicerol (●); Acetato (×); Etanol (■), Biomassa (+). Eixo y da formação de biomassa está em escala logarítmica natural. (Continua).....54
Figura 17	Cinética da fermentação das linhagens isogênicas em comparação com a selvagem em SGH sob condições de micro-aerofilia. A. YRH1413; B. YRH1415; C. YRH1483; D. YRH1491. Xilose (Δ);Glicose (○); Xilitol (▲);

	Glicerol (●); Acetato (×); Etanol (■). SGH (90%) foi composto por (em g L ⁻¹): glicose, 56,8; xilose, 37,7; arabinose, 4,2; ácido acético, 5,2; HMF, 0,5 e furfural, 1,5. Uréia (38 mM) foi adicionada como fonte de nitrogênio.....	59
Figura 18	Formação de biomassa (DO660) em SGH sob condições de micro-aerofilia das linhagens isogênicas em comparação com a selvagem YRH1413 e a parental YRH1415. O eixo y está em escala logarítmica natural.....	60
Figura 19.	Curvas de crescimento no Bioscreen das linhagens YRH400 e YRH1415 com os plasmídeos contendo os possíveis transportadores de xilose. Os dados apresentados representam os valores médios do experimento em duplicata.....	63
Figura 20	Figura 20. Curvas de crescimento no Bioscreen da linhagem YRH1483 com os plasmídeos contendo os possíveis transportadores de xilose. Os dados apresentados representam os valores médios do experimento em duplicata	65

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1G	Primeira Geração
2G	Segunda Geração
CONAB	Companhia Nacional de Abastecimento
DO	Densidade Óptica
EUA	Estados Unidos da América
FCCP	Carbonil cianido p-trifluorometoxi fenil hidrazona
g	Gramma
h	Hora
HMF	Hidroximetilfurufural
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
KAc	Acetato de potássio
K_m	Constante de afinidade da enzima (Constante de Michaelis)
L	Litro
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MAT	Mating-type
MCS	Multiple Cloning Site
mg	Miligramma
min	Minutos
mL	Mililitros
MME/EPE	Ministério de Minas e Energia/Empresa de Pesquisa Energética
M	Molar
mM	Milimolar
mmol	Milimol
MSF	Superfamília Facilitadora Principal
nmol	nanomol
OECD	Organization for Economic Co-operation Development
ORF	Open Reading Frame
PCR	Polimerase Chain Reaction
pH	Potencial Hidrogeniônico
p NP	p -nitrofenol

<i>p</i> NP α G	<i>p</i> -nitrofenil- α -D-glicopiranosídeo
<i>p</i> NP β G	glicose <i>p</i> -nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo
<i>p</i> NP β X	<i>p</i> -nitrofenil- β -D-xilopiranosídeo
PPP	Pentoses-fosfato
<i>Q</i> <i>p</i>	Produtividade
RFA	Renewable Fuels Association
rpm	Rotações por minuto
s	Segundos
SC	Meio Sintético Completo
SGH	Switchgrass Hydrolysate
SSF	Simultaneous Saccharification and Fermentation
U	Unidade da enzima ($\mu\text{mol min}^{-1}$)
$\mu_{\text{máx}}$	Crescimento máximo específico
μm	Micrometro
μmol	Micromol
USDA	United States Department of Agriculture
V_{max}	Velocidade máxima
XDH	Xilitol desidrogenase
XI	Xilose isomerase
XK	Xiluloquinase
XR	Xilose redutase
Y	Rendimento
YNB	Meio Nitrogênio Levedura Base
YP	Meio Levedura Peptona
YPD	Meio Levedura Peptona Dextrose
YPX	Meio Levedura Peptona Xilose

1. INTRODUÇÃO

A demanda mundial por energia cresce continuamente, levando à busca por novas fontes de matérias-primas e tecnologias para a produção de combustíveis. Nesse cenário, os combustíveis produzidos a partir de fontes renováveis, principalmente biorrenováveis, são considerados boas alternativas para diminuir a dependência de combustíveis fósseis, tão prejudiciais ao meio ambiente. O etanol desponta como o biocombustível mais conhecido e produzido. Podendo ser formado a partir de diferentes substratos vegetais, sendo o milho e a cana-de-açúcar os mais utilizados no mundo. O etanol obtido diretamente da conversão de açúcares extraídos, normalmente amido (milho) ou sacarose (cana-de-açúcar) da biomassa vegetal é conhecido como etanol de primeira geração (etanol 1G).

A biomassa lignocelulósica (em geral, resíduo de culturas agrícolas) é responsável pela estrutura do vegetal e é composta basicamente por polímeros de carboidratos (celulose e hemicelulose) e lignina, os quais, quando dissociados, liberam açúcares que podem ser bioconvertidos a etanol. Devido às grandes quantidades disponíveis e o baixo custo em relação às culturas alimentares, a biomassa lignocelulósica tem potencial para se tornar uma significativa fonte de matéria-prima para o processo de transformação da biomassa em etanol, sendo denominado etanol lignocelulósico ou de segunda geração (etanol 2G).

Diversas espécies de bactérias, leveduras e fungos filamentosos, apresentam a capacidade de fermentar compostos lignocelulósicos. Entretanto, para que a conversão a etanol por leveduras possa ocorrer em escala industrial, deve-se aplicar um pré-tratamento (hidrólise) físico-químico e/ou enzimático à biomassa lignocelulósica para que haja a liberação dos monômeros de açúcar presentes na celulose (glicose) e hemicelulose (rica em pentoses).

Os principais açúcares resultantes da hidrólise dos resíduos lignocelulósicos, em ordem de concentração, são: glicose e as pentoses xilose e arabinose. Para que a produção de etanol lignocelulósico seja um processo industrial economicamente viável, é necessário que todos os açúcares presentes no hidrolisado sejam fermentados. Entretanto, a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, amplamente utilizada na conversão de glicose a etanol, não é capaz de fermentar xilose. Considerando a fundamental importância para a assimilação de xilose, estudos recentes vêm sendo realizados a partir da introdução da via metabólica desse açúcar em linhagens de *S. cerevisiae*. Porém, a fermentação da xilose simultânea à glicose tem se mostrado pouco eficiente.

Outra alternativa para aumentar a eficiência do consumo da xilose seria introduzir genes de transportadores exógenos mais eficientes em linhagens de *S. cerevisiae*. As espécies *Spathaspora passalidarum* e *Sp. arborariae* são conhecidas pela habilidade em fermentar a xilose em etanol e pelo potencial na produção de etanol lignocelulósico. As diferentes espécies desse gênero poderiam ser utilizadas diretamente para produção de etanol ou como fontes de genes de enzimas e/ou transportadores de açúcar.

Segundo projeções do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA), na próxima década, o Brasil, segundo maior produtor de etanol do mundo, deve aumentar em 90% a produção deste biocombustível. Portanto, as pesquisas em torno da produção biotecnológica de etanol a partir de resíduos lignocelulósicos agroindustriais tem se tornado cada vez mais importante principalmente pela grande quantidade disponível e pelo potencial de extrair pelo menos duas vezes mais combustível da mesma área de terra comparado ao etanol tradicional.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Estudar a funcionalidade de genes envolvidos na utilização da xilose em linhagens industriais de *S. cerevisiae* geneticamente modificadas para o metabolismo de xilose.

2.2 Objetivos Específicos

2.2.1 Identificar/selecionar uma dentre novas espécies de leveduras selvagens com alta capacidade de assimilar xilose;

2.2.2 Identificar e isolar genes envolvidos no transporte da xilose das linhagens selecionadas;

2.2.3 Obter linhagens recombinantes de *S. cerevisiae* eficientes no metabolismo da xilose e capazes de fermentar simultaneamente xilose e glicose em meio sintético e hidrolisado de resíduos agroindustriais;

2.2.4 Inserir os genes isolados nas linhagens industriais de *S. cerevisiae* recombinantes;

2.2.5 Analisar a funcionalidade desses genes em comparação com as linhagens parentais.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Bioetanol

Biocombustível é um termo associado ao combustível derivado de qualquer matéria orgânica, usualmente renovável. O etanol é o tipo mais conhecido de biocombustível e tem sido importante para a economia de alguns países, sendo o Brasil um dos principais beneficiados, principalmente devido à introdução dos veículos com tecnologia bicombustível (popularizado como “flex-fuel”) e a crescente demanda interna por combustíveis com maior mistura de etanol (United States Department of Agriculture - USDA, 2013). De acordo com o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA, 2016), até maio de 2016, a produção de etanol, para a safra 2015/16, foi de 30,5 bilhões de litros, o que até o momento representa 5% a mais que a safra anterior. A produção mundial também vem aumentando e alcançou em 2015 um total de 97,2 bilhões de litros, sendo a maior parte, cerca de 85%, produzida por Estados Unidos (EUA) e Brasil (Renewable Fuels Association - RFA, 2015) (Figura 1).

Atualmente, o etanol é produzido a partir da fração amilácea ou sacarínea de algumas culturas agrícolas comestíveis, como milho, cana-de-açúcar e beterraba (Moysés et al., 2016). O álcool brasileiro é proveniente da cana-de-açúcar (gênero *Saccharum* L.), uma gramínea tropical que acumula sacarose, que pode ser convertida em etanol diretamente por micro-organismos, sem pré-tratamento enzimático (Argueso et al., 2009). Por razões econômicas e ambientais, resíduos agroindustriais e outras fontes de baixo valor têm sido consideravelmente propostos para a produção de etanol (Farrell et al., 2006).

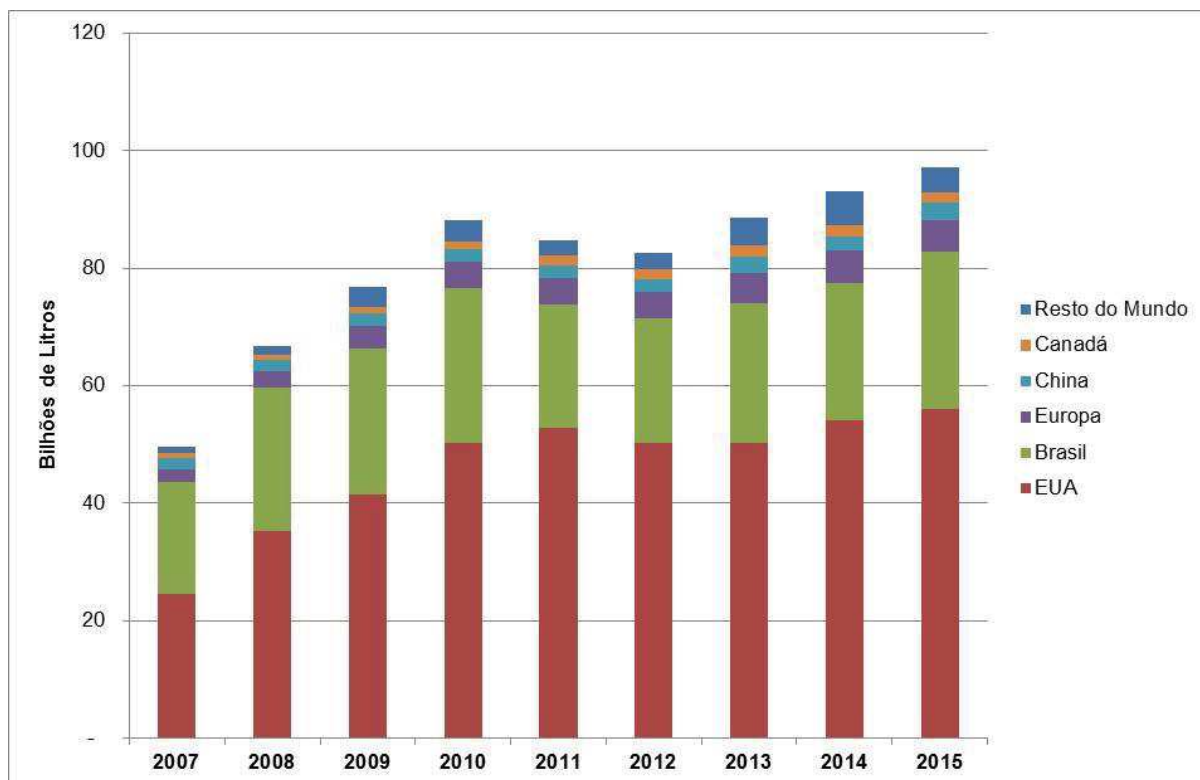


Figura 1. Produção mundial de etanol por país/região e ano. Adaptado de: www.afdc.energy.gov/data/.

3.1.1 Etanol Lignocelulósico ou de segunda geração

A produção de etanol combustível a partir de fontes renováveis é considerada uma alternativa para diminuir a dependência de combustíveis fósseis. Porém, as críticas quanto ao uso de recursos alimentares como matéria-prima para produção de etanol de primeira geração, incentivam a produção do etanol lignocelulósico ou 2G (Tan et al., 2008). A matéria-prima para produção do etanol 2G são os resíduos provenientes da agroindústria, assim como de florestas, tratamentos de resíduos sólidos municipais, gramas perenes, entre outros (Balat, 2011). No entanto, grande parte da biomassa lignocelulósica provém do processamento de culturas agrícolas, como o bagaço de cana-de-açúcar, a palha de arroz e casca de soja (Hasunuma et al., 2012). O Brasil é o segundo maior

exportador agrícola mundial. Sendo o maior fornecedor de açúcar, suco de laranja, café e soja, neste último tendo ultrapassado os Estados Unidos em 2013. É ainda, um grande produtor de milho, arroz e carne bovina, os quais têm como maior consumidor o mercado interno (Food and Agriculture Organization of the United Nations - OECD-FAO, 2016).

A agricultura no Brasil contribui de forma importante para o fornecimento de energia no país. A energia renovável, em 2014, representou 39,4% de toda a energia utilizada no Brasil. 39,8% dessa matriz energética renovável é produzida a partir da biomassa de cana-de-açúcar, incluindo nesse valor, 12,9 % de etanol (Ministério de Minas e Energia, Empresa de Pesquisa Energética - MME/EPE, 2015). A produção de cana-de-açúcar na safra 2015/16 foi de 655,16 milhões de toneladas (Companhia Nacional de Abastecimento - CONAB, Ago/2015). Do bagaço obtido do processamento da cana, cerca de 7 a 10 % do total (aproximadamente 280 kg de bagaço por tonelada de cana) se encontra disponível para outros usos, e o restante é empregado como combustível primário na geração de vapor e energia elétrica (Soares e Rosell, 2009). Dessa forma, a produção do etanol 2G a partir do bagaço da cana apresenta perspectivas positivas de produção e vem sendo fortemente estudada por grupos de pesquisa do sudeste brasileiro (Rabelo et al., 2009). O Rio Grande do Sul (RS) não participa do mercado sucroalcooleiro brasileiro, portanto, não produz bagaço de cana com grande expressão. Em compensação, é o maior produtor de arroz e o terceiro maior produtor de soja do país. Na safra 2014/15, a produção de arroz no RS atingiu aproximadamente 8,2 milhões de toneladas (67% do total produzido no Brasil), já a de soja alcançou 13,5 milhões de toneladas (14% do total produzido no Brasil) (CONAB, Jan/2015). Conseqüentemente, os resíduos provenientes do processamento desses grãos tornam-se atrativos para a produção

de etanol 2G, agregando utilidade a essa biomassa lignocelulósica e diminuindo o descarte indevido no ambiente.

A biomassa lignocelulósica é responsável pela estrutura do vegetal. É composta basicamente por polímeros de carboidratos (celulose e hemicelulose) e lignina (Kumar et al., 2008). A celulose é um homopolímero de glicose, enquanto que a hemicelulose é composta por hexoses (glicose, manose e galactose) e pentoses (xilose e arabinose) (Hayn et al., 1993). A conversão desses açúcares em etanol só é possível após um tratamento (hidrólise) físico-químico e/ou enzimático do material lignocelulósico, visando liberar os monômeros de açúcar presentes na celulose e hemicelulose (Bösch et al., 2010) (Figura 2).

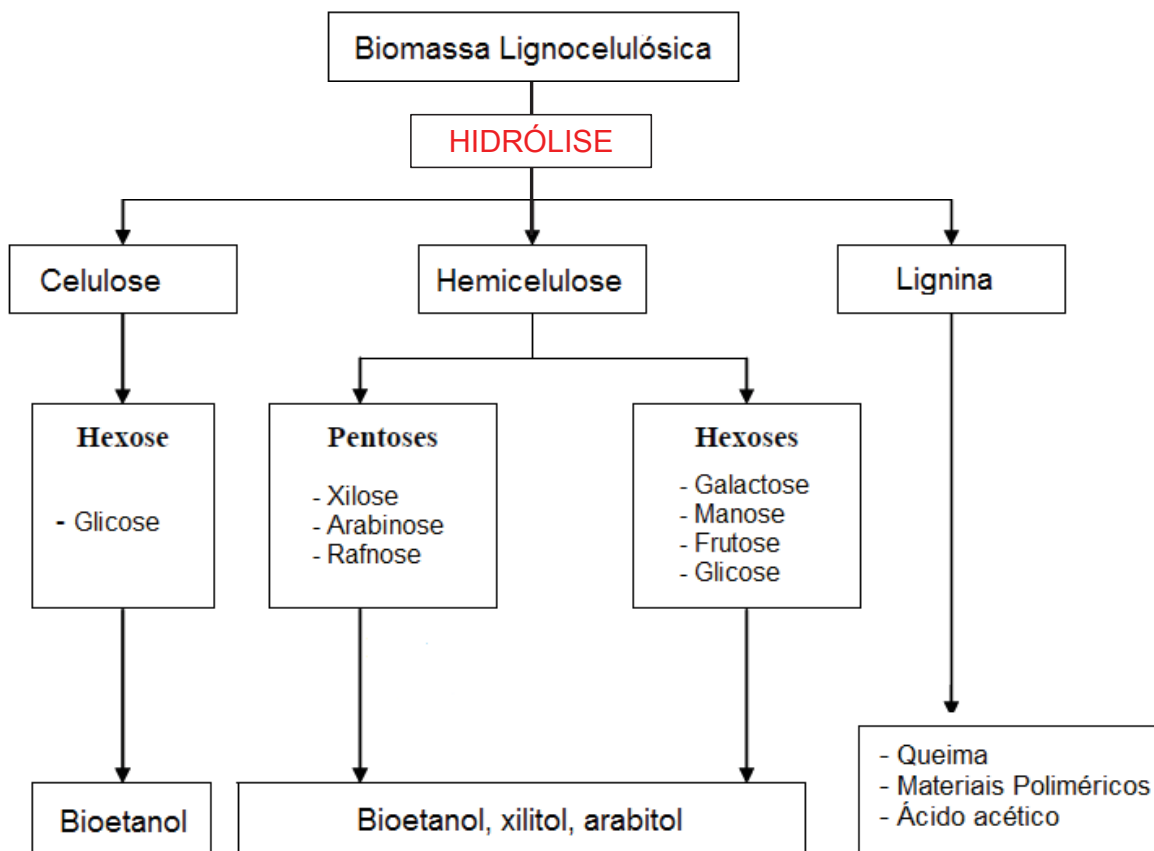


Figura 2. Representação esquemática dos compostos gerados após a hidrólise da biomassa lignocelulósica (adaptada de das Neves et al., 2007).

A xilose é um dos principais açúcares fermentescíveis presente na biomassa lignocelulósica hidrolisada, sendo o segundo mais abundante depois da glicose (Howard et al., 2003). Para que a produção de etanol lignocelulósico seja um processo industrial economicamente viável, é necessário que todos os açúcares presentes no hidrolisado sejam fermentados. Entretanto, a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, que é a espécie mais utilizada na conversão de glicose a etanol, não é capaz de fermentar xilose.

3.2 Leveduras usadas na pesquisa de produção de etanol 2G

A conversão das hexoses a etanol é passível de ser realizada pela levedura *S. cerevisiae*, amplamente utilizada na produção de etanol 1G devido à sua alta eficiência na fermentação e tolerância superior ao etanol, pressão osmótica do açúcar, altas temperaturas e ao baixo pH (da Silva Filho et al., 2005). Além disso, tolera compostos inibitórios gerados durante o tratamento da biomassa lignocelulósica (Klinke et al., 2004; Pereira et al., 2014). No entanto, não é capaz de fermentar pentoses, pois não possui a via metabólica necessária para conversão a etanol. A maior parte dos trabalhos encontrados na literatura tem focado em melhorar a eficiência de conversão da xilose, pois são mais abundantes na biomassa lignocelulósica do que a arabinose (Hahn-Hägerdal et al., 2007).

3.2.1 Leveduras fermentadoras naturais de pentoses

As espécies de leveduras conhecidas como melhores fermentadoras de xilose a etanol são: *Scheffersomyces (Pichia) stipitis*, *Kluyveromyces marxianus*, *Pachisolen tannophilus* e *Candida shehatae*, porém, apresentam rendimento

relativamente baixo e poucas são tolerantes aos inibidores formados durante a hidrólise de resíduos lignocelulósicos (Margaritis e Bajpai, 1982; Tian et al., 2009). Como estratégia de aproveitamento total dos açúcares presentes no hidrolisado, a utilização de culturas para a produção de etanol, combinando uma levedura fermentadora de pentoses e um micro-organismo fermentador de glicose, parece ter vantagens em relação ao uso de uma única cultura. As espécies *Spathaspora passalidarum* e *Sp. arborariae* são conhecidas pela habilidade em fermentar a xilose em etanol e pelo potencial na produção de etanol lignocelulósico (Cadete et al., 2009; Hou, 2012). Nos trabalhos de da Cunha-Pereira et al. (2011) e Hickert et al. (2013), a espécie *Sp. arborariae* foi testada em sistema de co-fermentação com *S. cerevisiae*, resultando em produtividade de etanol maior do que as atingidas quando ambas as espécies foram avaliadas em fermentações isoladas. Além do bom rendimento, essas leveduras foram capazes de crescer e produzir etanol na presença de compostos tóxicos do hidrolisado de casca de arroz ou quando adicionados ao meio sintético.

Além da possibilidade de serem usadas diretamente para produção de etanol, essas e outras espécies do gênero *Spathaspora* são fortes candidatas para servir como fontes de genes de enzimas e/ou transportadores de açúcar mais eficientes (Cadete et al., 2012).

3.2.2 *S. cerevisiae* geneticamente modificadas para fermentar pentoses

Embora a fermentação das pentoses seja realizada por leveduras não-*Saccharomyces*, a maioria dos trabalhos envolvendo fermentação das pentoses em levedura é focada na geração de linhagens de *S. cerevisiae* geneticamente modificadas com vias heterólogas do metabolismo da xilose. Isso porque as muitas

propriedades da levedura *S. cerevisiae*, sendo a principal delas a alta tolerância ao etanol e a compostos inibidores presentes no hidrolisado, a faz ser altamente desejada no processo industrial de produção de etanol lignocelulósico. A via oxirreduzora (XR/XDH) de *S. stipitis* é a mais utilizada para criar leveduras para fermentação de xilose e muitos trabalhos vêm sendo realizados para o aperfeiçoamento do metabolismo de xilose e, com isso, melhorar a produtividade do etanol na *S. cerevisiae* recombinante. Um dos problemas identificado na inserção dessa via é o acúmulo de xilitol devido ao desequilíbrio redox gerado pela diferença de especificidade de cofatores das enzimas que metabolizam a xilose. A xilose redutase (XR), enzima responsável pela redução da D-xilose a D-xilitol, utiliza principalmente NADPH como cofator, enquanto que a xilitol desidrogenase (XDH) utiliza somente NAD^+ para converter D-xilitol a D-xilulose. A D-xilulose é convertida a D-xilulose-5P pela xiluloquinase (XK) para entrar na via das pentoses-fosfato (PPP) (Jeffries, 2006; Moysés et al., 2016; Watanabe et al., 2007) (Figura 3). A regeneração de NAD^+ e de NADPH ocorre em processos metabólicos diferentes, portanto, o equilíbrio redox é um alvo relevante para engenharia metabólica (Jeffries e Jin, 2004; Zaldivar et al., 2002). Mudanças na seletividade de XR para maior utilização de NADH em detrimento de NADPH tem resultado em efeitos positivos sobre o rendimento e produtividade em etanol (Banta et al., 2002; Petschacher e Nidetzky, 2005; Watanabe et al., 2007; Zaldivar et al., 2002). Outra estratégia, que vem sendo muito realizada, para corrigir o desequilíbrio redox é a introdução de genes da via da xilose isomerase (XI) de fungos e de bactérias, onde a D-xilose é convertida diretamente a D-xilulose (Figura 3). A introdução da enzima xilose isomerase (XI), do fungo *Piromyces* sp., por exemplo, promoveu uma alta atividade da enzima e, conseqüentemente, a conversão da xilose de etanol. Porém, o

crescimento em xilose sob condições aeróbias é baixo e nenhum crescimento é obtido sob anaerobiose (Diao et al., 2013; Kuyper et al., 2003). Por isso, diversos trabalhos sob condições anaeróbias usando XI de bactérias vem sendo relatados atualmente (Brat et al., 2009; Demeke et al., 2013; Karhumaa et al., 2007). Um recente trabalho reportou pela primeira vez a co-expressão de XI/XK em *S. cerevisiae* da bactéria do rúmem *Prevotella ruminicola* (Hector et al., 2013). Neste trabalho, após um processo de evolução adaptativa, a levedura obteve uma boa taxa de crescimento em xilose, além de boa produtividade de etanol (82,9% de produtividade teórica).

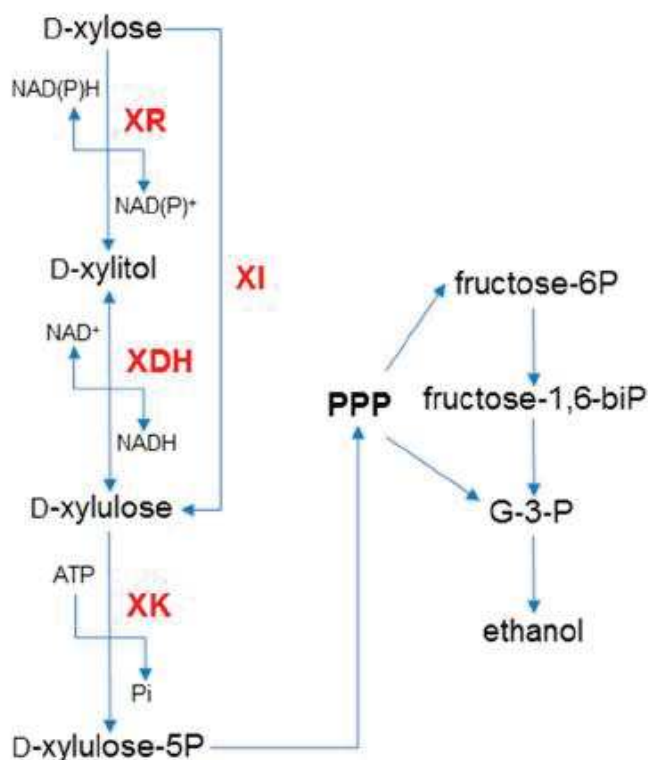


Figura 3. Fermentação da xilose em *S. cerevisiae*. A via fúngica utiliza xilose redutase (XR) e xilitol desidrogenase (XDH), enquanto a via bacteriana utiliza xilose isomerase (XI). Ambas as vias de produção de D-xilulose é convertida a D-xilulose-5P pela xiluloquinase endógena (XK). D-Xilulose-5P entra na via das pentoses-fosfato (PPP), onde é metabolizado para formar etanol. As setas indicam a direção das reações químicas (Moysés et al., 2016).

3.3 Estratégia para melhorar a eficiência da produção de etanol 2G

Muitos desafios ainda precisam ser superados para que a produção de etanol 2G seja realizada em grande escala e que seja competitiva com o etanol 1G. O principal deles é a necessidade de que todos os açúcares presentes na biomassa lignocelulósica sejam utilizados por micro-organismos capazes de realizar a conversão a etanol de modo eficiente e sob as condições adversas do processo fermentativo (Hahn-Hägerdal et al., 2007).

Um micro-organismo eficiente para a produção de etanol 2G, além de ser capaz de co-fermentar eficientemente glicose e xilose, precisa ser tolerante às condições estressantes impostas pelo processo fermentativo. As linhagens industriais de *S. cerevisiae* são amplamente utilizadas no processo fermentativo, pois apresentam melhor capacidade de tolerância às condições adversas geradas durante a fermentação (da Silva-Filho et al., 2005). No entanto, a maioria dos trabalhos encontrados na literatura foi realizada usando linhagens de laboratório, devido à facilidade de manipulação genética. Porém, ao contrário das linhagens industriais, estas não foram selecionadas para a produção de etanol em larga escala. Poucos estudos têm optado por usar linhagens industriais melhorando, seja por adaptação evolutiva, inserção/deleção ou super-expressão de genes, seu desempenho fermentativo (Hahn-Hägerdal et al., 2007; Matsushika et al., 2009; Moon et al., 2013; Romaní et al., 2015; Sonderegger et al., 2004). Diao et al. (2013) usaram linhagens industriais de *S. cerevisiae* que possuíam a via XI, mas que cresciam lentamente em xilose sob condições aeróbias. Por evolução adaptativa, foi possível melhorar a capacidade fermentativa das linhagens através de sucessivas transferências em meio com xilose e sob condições aeróbias. Além disso, os autores inseriram transportadores exógenos e super-expressaram vários genes para

acelerar a conversão da xilulose a etanol. Adaptação a compostos tóxicos do hidrolisado de lignocelulósicos também em linhagens industriais de *S. cerevisiae* foi realizado por Sehnem et al. (2013) e Tomás-Pejo et al. (2010). As linhagens foram submetidas a crescentes concentrações de hidrolisado ou de toxinas acrescentadas ao meio de cultura, durante várias gerações. A adaptação desenvolveu linhagens mais tolerantes a compostos tóxicos, tais como hidroximetilfurfural (HMF) e furfural, e com maior produtividade de etanol em relação às parentais. Nas linhagens industriais YRH396 e YRH400 estudadas por Hector et al. (2011), foram introduzidos genes da via do metabolismo que resultou em uma relativa melhora na produtividade de etanol em meio sintético e em hidrolisado de resíduo agroindustrial.

Outra estratégia utilizada com o objetivo de melhorar o consumo de todos os açúcares presentes no substrato é a inserção de transportadores exógenos de xilose em *S. cerevisiae* recombinante. Super-expressão dos transportadores de hexoses Hxt próprios da *S. cerevisiae* recombinante para melhorar o consumo da xilose também foi relatado (Gonçalves et al., 2014). No entanto, muitos trabalhos estão voltados para o estudo de transportadores de organismos que naturalmente fermentam pentoses. Os pesquisadores tem mostrado que é possível aumentar a eficiência do consumo da xilose introduzindo genes de transportadores de leveduras selvagens com alta eficiência em transportar o açúcar e capazes de expressá-los em altos níveis quando submetidos a condições definidas de crescimento. Foi assim que Leandro et al. (2006) identificaram genes Gxf1p e Gxf2p de *Candida intermedia* escolhida após um procedimento de triagem com outras espécies de leveduras fermentadoras de xilose (Gárdonyi et al., 2003). O uso alternativo desses genes também foi relatado em outros trabalhos (Diao et al., 2013; Runquist et al., 2009; Young et al., 2011). Já Katahira et al. (2008) introduziram três transportadores de

glicose/xylose de *S. stipitis*, Sut1p, Sut2p and Sut3p porque estes apresentaram bons parâmetros cinéticos (tais como V_{max}) para xilose nos testes de transporte. Transportadores de xilose de organismos filogeneticamente distintos também estão sendo testados em *S. cerevisiae*, como o An25p de *Neurospora crassa* (Du et al., 2010) e XtrDp de *Aspergillus nidulans* (Colabardini et al., 2014), além dos transportadores At5g59250p e At5g17010p de *Arabidopsis thaliana* (Hector et al., 2008) e AraEp de *Corynebacterium glutamicum* (Wang et al., 2013).

3.4 Características básicas dos transportadores de pentoses e suas aplicações

Os transportadores de pentose, como todos da subfamília de transportadores de açúcar, são membros da Superfamília Facilitadora Principal (MSF) e geralmente apresentam de 400 a 600 aminoácidos (Pao et al., 1998). Contém 12 cadeias transmembranares hidrofóbicas em alfa hélices ligadas por alças hidrofílicas com cerca de cinco domínios conservados, o que tem facilitado a identificação de possíveis novos genes de transportadores de açúcar (Leandro et al., 2009) (Figura 4).

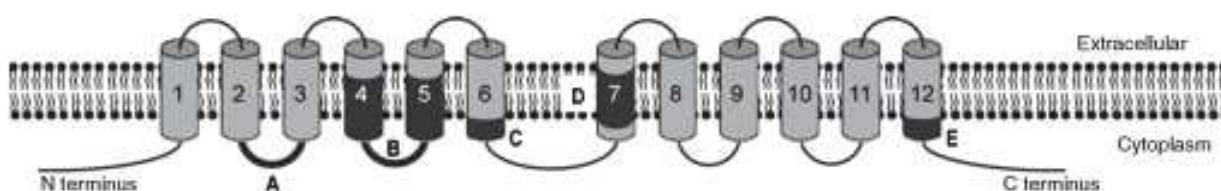


Figura 4. Representação da estrutura geral dos transportadores de açúcar de leveduras com seus domínios conservados. As cinco regiões que tem sido reconhecida em transportadores de açúcar estão representadas pelas letras (A-E). As 12 cadeias polipeptídicas transmembranares estão representadas pelos cilindros (Leandro et al., 2009).

A importância do estudo de transportadores de pentoses é atribuída à abundância desse tipo de açúcar na biomassa lignocelulósica utilizada como matéria-prima para a produção de etanol de 2G. As leveduras e os fungos filamentosos capazes de fermentar pentoses com eficiência possuem transportadores de alta e baixa afinidade. Os transportadores de alta afinidade são do tipo xilose/H⁺ simporter, e são expressos em baixas concentrações do açúcar. Já os de baixa afinidade transportam o açúcar por difusão facilitada, e são expressos quando o açúcar é abundante (Leandro et al., 2009).

Na maioria das leveduras, a expressão de genes que codificam os transportadores e as demais enzimas relacionadas ao metabolismo de fontes alternativas de carbono, é inibida pela presença da glicose. Na ausência do açúcar, a rede da proteína quinase Snf1 é essencial para o crescimento de leveduras *Saccharomyces* em meios com carbonos fermentescíveis menos preferidos como a sacarose, galactose e a xilose (no caso de linhagens geneticamente modificadas para metabolizar pentoses) (Jeffries, 2006; Zaman et al., 2008). Além disso, Snf1 desempenha um importante papel na resposta celular ao estresse (Sanz, 2003). A proteína é ativada quando a glicose é exaurida do meio, e por fosforilação do repressor transcricional Mig1, permite que genes antes reprimidos sejam transcritos (Gancedo e Flores, 2008; Zaman et al., 2008) (Figura 5).

A expressão dos genes de transportadores de hexoses também é reprimida na ausência de glicose. A repressão ocorre pela rede do repressor Rgt1, função que requer fosforilação pela proteína quinase Snf1, bem como depende da associação dos co-repressores Mth1 e Std1 (Johnston e Kim, 2005; Zaman et al., 2008) (Figura 6).

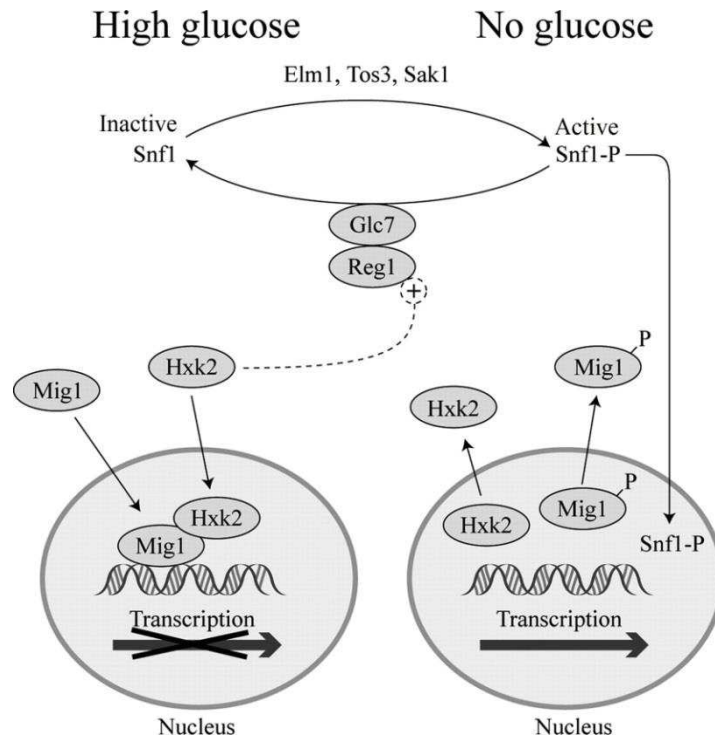


Figura 5. Esquema simplificado do papel da proteína quinase Snf1 na ausência da glicose. Quando Snf1 está inativa (glicose alta), Mig1 não está fosforilada e migra para o núcleo, ligando-se ao DNA de genes reprimidos por glicose, promovendo repressão de sua transcrição em associação com Hxk2, uma das duas hexoquinases de leveduras. Hxk2 também interage com Reg1, e esta interação facilita a ação da fosfatase Glc7 em Snf1 para mantê-la em estado inativo. Quando Snf1 é ativada por fosforilação pelas proteínas quinases Elm1, Tos3, ou Sak1 (glicose baixa), Mig1 é fosforilada e migra para o citoplasma, assim como Hxk2, aliviando a repressão (Gancedo e Flores, 2008).

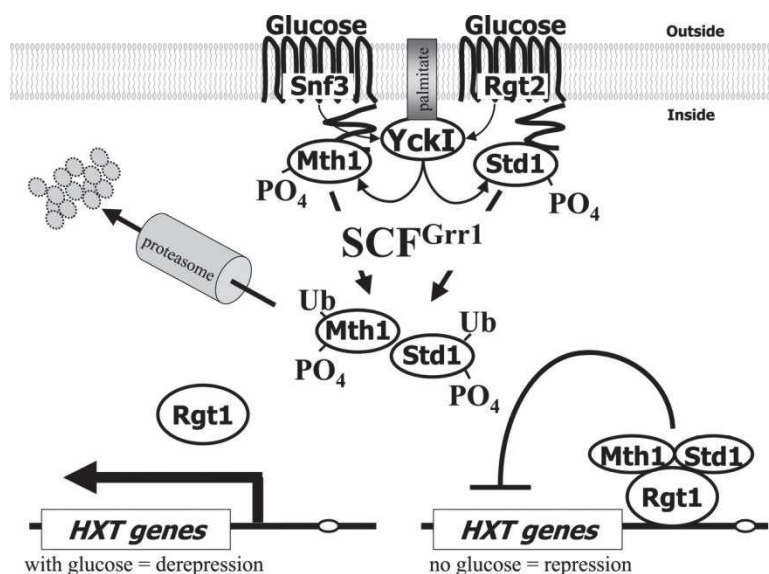


Figura 6. Esquema simplificado da via do Rgt1 responsável pela repressão de genes *HXT* na ausência da glicose. Rgt1 associado aos co-repressores Mth1 e Std1 liga-se aos promotores dos genes *HXT* resultando na repressão da transcrição. Os genes *HXT* são de-reprimidos pela ativação da proteína quinase Yck1 através dos sensores Snf3 e Rgt2 que detectam a presença de glicose. Yck1 fosforila Mth1 e Std1, que são direcionados pela ubiquitina-proteína SCF^{Grr1} para degradação pelos proteossomos (Johnston e Kim, 2005).

S. cerevisiae tem 20 genes que codificam proteínas semelhantes a transportadores de glicose (Bisson et al., 1993) e embora tenham mostrado a repressão dos genes *HXT* na ausência da glicose, outros estudos revelaram que *S. cerevisiae* é capaz de consumir pentoses por alguns destes transportadores. Em um estudo realizado por Sedlak e Ho (2004), os transportadores Hxt7p e Hxt5p foram mais efetivos no consumo de xilose em linhagens recombinantes. Esses transportadores foram fortemente reprimidos quando a concentração da glicose era alta, mas foram gradativamente sendo transcritos à medida que a glicose foi consumida durante a fermentação na presença de xilose. Foi determinado previamente que Hxt7p é um transportador de alta afinidade e que sua expressão é independente da fonte de carbono (Ye et al., 2001).

Embora seja possível a conversão de pentoses a etanol por linhagens geneticamente modificadas de *S. cerevisiae*, a afinidade por xilose, por exemplo, pelos transportadores de glicose é bem menor (Jeffries, 2006). Dessa forma, introduzir genes de transportadores exógenos específicos de xilose ou arabinose poderia aumentar a eficiência do consumo (Leandro et al., 2006). O transporte de pentoses em fungos, que naturalmente metabolizam esse tipo de açúcar, ainda é pouco conhecido e pouco explorado. Várias sequências de possíveis transportadores de xilose vêm sendo depositadas no banco de dados do GenBank, mas poucas foram caracterizadas.

No estudo de transportadores exógenos, especialmente de xilose, linhagens de *S. cerevisiae* que não apresentam os principais ou nenhum dos transportadores de hexoses (*hxt-null*) são, na maioria das vezes, utilizadas como hospedeiras para os testes de caracterização. Os transportadores Gxf1p e Gxs1p de *Candida intermedia* (Leandro et al., 2006), XylHPp de *Debaryomyces hansenii*,

Xut1p, Xut3p e Xyp29p de *S. stipitis* (Du et al., 2010; Young et al., 2011) foram expressos nas linhagens *hxt-null*. As linhagens *hxt-null* também são usadas para testar transportadores de fungos filamentosos: An25p de *Neurospora crassa* (Du et al., 2010) e XtrDp de *Aspergillus nidulans* (Colabardini et al., 2014). Já o transportador TrXlt1p, do fungo *Trichoderma reesei*, foi testado em uma linhagem que não apresenta as principais Hxt permeases (Saloheimo et al., 2007).

Para uma aplicação mais prática, alguns genes de transportadores de xilose são caracterizados diretamente em tipos selvagens de *S. cerevisiae*, por exemplo, Gxf1p de *C. intermedia* já citado anteriormente (Runquist et al., 2009) e Sut1p de *S. stipitis* (Katahira et al., 2008). As leveduras apresentaram uma melhora na capacidade de absorção da xilose e na produtividade do etanol, quando este foi analisado. No entanto, utilizar linhagens industriais como hospedeiras para transportadores de pentoses poderia melhorar a conversão dos açúcares presentes na biomassa lignocelulósica e possibilitaria sua utilização em processos fermentativos para a produção de etanol 2G em escala industrial. Como já citado anteriormente, Diao et al. (2013) observou um melhor consumo de xilose ao usar transportadores exógenos. Porém, mais pesquisas que envolvam linhagens industriais de *S. cerevisiae* devem ser realizadas, pois pouco se sabe sobre o quanto o genótipo dessas linhagens recombinantes poderia afetar no consumo da xilose.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Leveduras, meios de cultura e métodos gerais

Todas as leveduras usadas neste trabalho, as previamente obtidas bem como as contruídas no presente estudo, estão listadas na Tabela 1. As leveduras selvagens fermentadoras de pentoses foram obtidas da coleção de cultura do Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais (Carlos A. Rosa, UFMG-ICB, Belo Horizonte, MG, Brasil). Linhagens de *S. cerevisiae* genótipos CEN.PK2-1C (Euroscarf; Frankfurt, Germany), BY4727 (ATCC; Manassas, VA, USA) e a industrial geneticamente modificada para fermentar xilose YRH400 (Hector et al., 2011) foram obtidas da coleção de cultura do National Center for Agricultural Utilization Research, United States Department of Agriculture - Agricultural Research Service (Ronald Hector, USDA-ARS, NCAUR Peoria, IL, USA). As linhagens industriais de *S. cerevisiae* produtoras de etanol PE-2 e CAT-1 (Fermentec; Piracicaba, SP, Brasil) foram obtidas de nossos estoques preservados no BiotecLab, Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (Marco A. Z. Ayub, UFRGS-ICTA, Porto Alegre, RS, Brasil). Linhagens de *Escherichia coli* DH10B, TOP10 (Invitrogen; Carlsbad, CA, USA), NEB5a, e NEB10b (New England Biolabs (NEB); Ipswich, MA, USA) foram utilizadas para manutenção e preparação de plasmídeos e foram crescidas em meio Luria-Bertani (triptona 10 g L⁻¹, extrato de levedura 0,5 g L⁻¹ e NaCl 10 g L⁻¹) (Sambrook e Russell, 2001). Plasmídeos e primers previamente obtidos, bem como os construídos neste trabalho, são mostrados na Tabela 2 e 3. As leveduras foram transformadas usando o método padrão do acetato de lítio (Gietz e Woods, 2002). Os antibióticos usados

para seleção dos transformantes foram ClonNat (100 µg/mL; Werner BioAgents; Lena, Germany), G418/geneticina (100 µg/mL; Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, USA), e higromicina (100 µg/mL; Fischer Scientific; Pittsburgh, PA, USA). O meio YP (extrato de levedura 10 g L⁻¹ e peptona bacteriológica 20 g L⁻¹) foi autoclavado sem o carboidrato. Meio sintético completo (SC) consistiu de 6,7 g L⁻¹ de nitrogênio levedura base (YNB) e foi suplementado com carboidratos e aminoácidos conforme a necessidade do experimento (Amberg et al., 2005). O inóculo foi preparado com células crescendo exponencialmente em YP adicionado de D-glicose ou D-maltose (solução estéril 20 %) e lavadas com água estéril antes da inoculação. Os estoques foram mantidos em YPD + glicerol (20 %) a -80 °C.

4.2 Integração genômica das vias de metabolismo da xilose XR/XDH e XI nas linhagens industriais de *S. cerevisiae*

Os cassetes de expressão *XYL1/XYL2/XKS1* e *XI/XK* foram previamente inseridos no vetor *HO-KanMX4-poly-HO* (Voth et al., 2001) para gerar os plasmídeos de integração cromossomal no locus *HO* de *S. cerevisiae* pRH277 (Hector et al., 2011) e pRH398 (RH, USDA-ARS, NCAUR, Peoria, IL, USA), respectivamente (Figura 7; Tabela 2). Os genes do fragmento contendo a via oxi-redutora XR/XDH foram baseados em *XYL1* e *XYL2* de *Scheffersomyces (Pichia) stipitis* Y-7124 (NRRL, Peoria, IL, USA), e *XKS1* de *S. cerevisiae* BY4727 (ATCC, Manassas, VA, USA). Os genes da via da D-xilose isomerase *XI* e *XK* foram isolados da bactéria *Prevotella ruminicola* TC2-24 (M. Cotta, USDA-ARS, NCAUR, Peoria, IL, USA). Os genes bacterianos foram códon-adaptados para expressar em *S. cerevisiae* (Hector et al., 2011; Hector et al., 2013).

Os plasmídeos foram digeridos com a enzima de restrição *EagI* para liberar os cassetes *HO-KanMX4-XYL1/XYL2/XKS-HO* e *HO-KanMX4-XII/XK-HO* com homologia ao gene alvo *HO* e cada DNA foi transformado nas linhagens industriais YRH1413 (PE-2) e YRH1414 (CAT-1). As células foram recuperadas em YPD líquido por 4 h antes de serem plaqueadas em YPD + G418 (200 µg/mL). A integração cromossomal no locus *HO* foi confirmada usando um *forward primer* com homologia ao gene *KanMX4* do fragmento integrado (#235) e um *reverse primer* com homologia ao cromossomo que flanqueia o sítio de integração (#236).

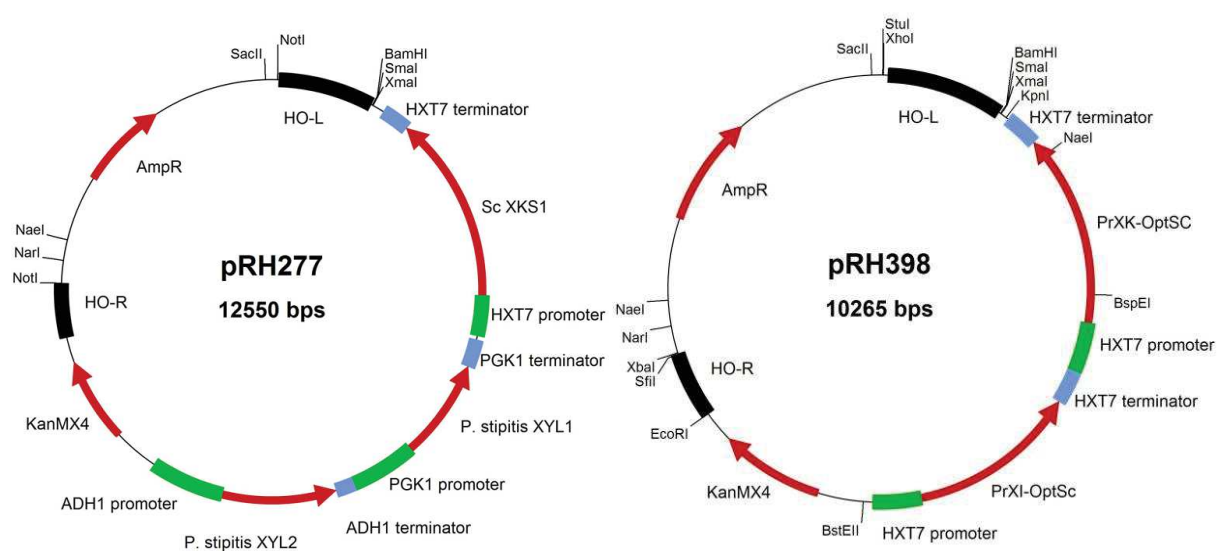


Figura 7. Plasmídeos de integração cromossomal no locus *HO* de *S. cerevisiae*. Os cassetes de genes *XYL1/XYL2/XKS1* e *XII/XK* foram inseridos no vetor *HO-KanMX4-poly-HO* para gerar os plasmídeos pRH277 e pRH398, respectivamente. Os plasmídeos foram providenciados pelo Dr Ronald Hector (USDA-ARS, NCAUR, Peoria, IL, USA).

Tabela 1. Leveduras usadas neste trabalho. (Continua)

Linhagem	Genótipo	Referência
CEN.PK2-1C	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> MATa <i>ura3-52 trp1-289 leu2-3_112 his3 Δ1 MAL2-8^C SUC2</i>	Euroscarf
YRH400	<i>S. cerevisiae</i> linhagem industrial D5A, [KanMX::P _{PGK1} -XYL1-T _{PGK1} ; P _{ADH1} -XYL2-T _{ADH1} ; P _{HXT7} -XKS1-T _{HXT7}]	Hector et al. 2011
YRH700	CEN.PK2-1C + pRS418	RH
YRH701	BY4727, MAT alpha, + pRS418	RH
YRH1388	CEN.PK2-1C + <i>Bacillus pumilus</i> xynB (de pRH726)	RH
YRH1400	CEN.PK2-1C <i>hxt1--hxt7Δ</i> + <i>B. pumilus</i> xynB (de pRH726)	RH
YRH1405	<i>Spathaspora xylofermentans</i> HMD25.1	Cadete et al. 2012
YRH1406	<i>Sp. xylofermentans</i> HMD23.3	Cadete et al. 2012
YRH1407	<i>Sp. arborariae</i> HM19.1a	Cadete et al. 2009
YRH1408	<i>Sp. suhii</i> XMD16.2	Cadete et al. 2012
YRH1409	<i>Sp. brasiliensis</i> XMD19.3	Cadete et al. 2012
YRH1410	<i>Sp. roraimanensis</i> XMD23.2	Cadete et al. 2012
YRH1411	<i>Scheffersomyces (Pichia) stipitis</i> IMH43.2	Cadete 2009
YRH1412	<i>Candida shehatae</i> HM52.1	Cadete 2009
YRH1413	<i>S. cerevisiae</i> linhagem industrial PE-2 diploide (levedura brasileira produtora de etanol)	Fermentec
YRH1414	<i>S. cerevisiae</i> linhagem industrial CAT-1 diploide (levedura brasileira produtora de etanol)	Fermentec
YRH1415	PE-2, <i>hoΔ</i> ::[KanMX::P _{PGK1} -XYL1-T _{PGK1} ; P _{ADH1} -XYL2-T _{ADH1} ; P _{HXT7} -XKS1-T _{HXT7}]	Este trabalho
YRH1417	PE-2, <i>hoΔ</i> ::[KanMX:: P _{HXT7} -Pr XI-T _{HXT7} ; P _{HXT7} -PrXKS1-T _{HXT7}]	Este trabalho
YRH1419	CAT-1, <i>hoΔ</i> ::[KanMX::P _{PGK1} -XYL1-T _{PGK1} ; P _{ADH1} -XYL2-T _{ADH1} ; P _{HXT7} -XKS1-T _{HXT7}]	Este trabalho
YRH1421	CAT-1, <i>hoΔ</i> ::[KanMX:: P _{HXT7} -Pr XI-T _{HXT7} ; P _{HXT7} -PrXKS1-T _{HXT7}]	Este trabalho
YRH1423	YRH1417 adaptado em YP + xilose (50 g L ⁻¹)	Este trabalho
YRH1425	YRH1421 adaptado em YP + xilose (50 g L ⁻¹)	Este trabalho
YRH1426	YRH400 + pRH755	Este trabalho
YRH1427	YRH400 + pRH756	Este trabalho
YRH1428	YRH400 + pRH757	Este trabalho
YRH1429	YRH400 + pRH758	Este trabalho
YRH1430	YRH1415 + pRH755	Este trabalho
YRH1431	YRH1415 + pRH756	Este trabalho
YRH1432	YRH1415 + pRH757	Este trabalho
YRH1433	YRH1415 + pRH758	Este trabalho
YRH1434	YRH1388 + pRH755	Este trabalho
YRH1435	YRH1388 + pRH756	Este trabalho
YRH1436	YRH1388 + pRH757	Este trabalho
YRH1437	YRH1388 + pRH758	Este trabalho
YRH1438	YRH1400 + pRH755	Este trabalho
YRH1439	YRH1400 + pRH756	Este trabalho
YRH1440	YRH1400 + pRH757	Este trabalho
YRH1441	YRH1400 + pRH758	Este trabalho
YRH1442	CEN.PK2-1C <i>hxt1--hxt7Δ</i> + XYL1/XYL2/XKS1 genes (pRH315)	RH
YRH1448	YRH1442 + CiGXF1 glicose/xilose facilitador	RH
YRH1450	YRH1442 + pRH755	Este trabalho

Tabela 1. Leveduras usadas neste trabalho. (Conclusão)

YRH1451	YRH1442 + pRH756	Este trabalho
YRH1452	YRH1442 + pRH757	Este trabalho
YRH1453	YRH1442 + pRH758	Este trabalho
YRH1482	MAT a (esporo isolado de YRH1415)	Este trabalho
YRH1483	MAT a (esporo isolado de YRH1415)	Este trabalho
YRH1484	MAT alfa (esporo isolado de YRH1415)	Este trabalho
YRH1485	MAT alfa (esporo isolado de YRH1415)	Este trabalho
YRH1490	YRH1483 mating type trocado de a para alfa	Este trabalho
YRH1491	YRH1483 x YRH1490	Este trabalho
YRH1500	Esporo 1B: MAT alfa Haploide dissecada da tétrade YRH1415	Este trabalho
YRH1501	Esporo 1C: MAT alfa Haploide dissecada da tétrade YRH1415	Este trabalho
YRH1502	Esporo 2C: MAT alfa Haploide dissecada da tétrade YRH1415	Este trabalho
YRH1503	Esporo 2D: MAT alfa Haploide dissecada da tétrade YRH1415	Este trabalho
YRH1504	Esporo 3B: MAT a Haploide dissecada da tétrade YRH1415	Este trabalho
YRH1505	Esporo 3D: MAT alfa Haploide dissecada da tétrade YRH1415	Este trabalho
YRH1506	Esporo 4A: MAT alfa Haploide dissecada da tétrade YRH1415	Este trabalho
YRH1507	Esporo 4C: MAT a Haploide dissecada da tétrade YRH1415	Este trabalho
YRH1508	Esporo 5B: MAT alfa Haploide dissecada da tétrade YRH1415	Este trabalho
YRH1509	Esporo 5C: MAT a Haploide dissecada da tétrade YRH1415	Este trabalho
YRH1525	YRH1400 + pRH780	Este trabalho
YRH1526	YRH1400 + pRH781	Este trabalho
YRH1527	YRH1400 + pRH784	Este trabalho
YRH1528	YRH1400 + pRH785	Este trabalho
YRH1529	Diploide de YRH1491 MAT trocado para a/a	Este trabalho
YRH1530	Diploide de YRH1491 MAT trocado para alfa/alfa	Este trabalho
YRH1531	YRH1483 + pRH755	Este trabalho
YRH1532	YRH1483 + pRH756	Este trabalho
YRH1533	YRH1483 + pRH757	Este trabalho
YRH1534	YRH1483 + pRH758	Este trabalho
YRH1535	YRH1483 + pRH780	Este trabalho
YRH1536	YRH1483 + pRH781	Este trabalho
YRH1537	YRH1483 + pRH784	Este trabalho
YRH1538	YRH1483 + pRH785	Este trabalho

RH, Plasmídeos e linhagens providenciadas por Dr Ronald Hector do U.S. Department of Agriculture, Bioenergy Research Unit, National Center for Agricultural Utilization Research, Agricultural Research Service, Peoria, IL, USA.

Tabela 2. Plasmídeos usados neste trabalho.

Plasmídeos	Descrição	Referência
pRS414	Low copy shuttle vector (<i>TRP1</i>)	Christianson et al. 1992
pRS418	Low copy shuttle vector (clonNAT)	Addgene
pRS425	High copy shuttle vector (<i>LEU2</i>)	Christianson et al. 1992
pRS426	High copy shuttle vector (<i>URA3</i>)	Christianson et al. 1992
HO-poly-KanMX4-HO	HO integration vector	Voth et al. 2001
pRH154	pRS425 + P _{HXT7} – MCS – T _{HXT7}	RH ^a
pRH164	pRS414 + P _{HXT7} – MCS – T _{HXT7}	Hector et al. 2011
pRH167	pRS426 + P _{HXT7} – MCS – T _{HXT7}	Hector et al. 2013
pRH211	pRS416- P _{PGK1} -XYL1-T _{PGK1} ; P _{ADH1} -XYL2-T _{ADH1} (P _{ADH1} -XYL2-T _{ADH1} cloned (Xho1-Sac1-blunt) from pRH169 into pRH185 (Sac1, blunt, CIP)	Hector et al. 2011
pRH274	pRH211 + XKS1 expression cassette [P _{HXT7} -XKS1-T _{HXT7}]	RH
pRH277(pRS416- P _{PGK1} -XYL1-T _{PGK1} ; P _{ADH1} -XYL2-T _{ADH1} ; P _{HXT7} -XKS1-T _{HXT7}) HO-poly-KanMX4-HO + P _{PGK1} -XYL1-T _{PGK1} ; P _{ADH1} -XYL2-T _{ADH1} ; P _{HXT7} -XKS1-T _{HXT7}	Hector et al. 2011
pRH315	pRH274 (With <i>URA3</i> switched to <i>TRP1</i> by recombinational repair)	RH
pRH384	pRH164 + PrXKS1 -----(pRS414 + P _{HXT7} – PrXKS1 – T _{HXT7})	Hector et al. 2013
pRH385	pRH167 + PrXI -----(pRS426 + P _{HXT7} – PrXI – T _{HXT7})	Hector et al. 2013
pRH393	pRH384 + PrXI -----(pRS414 + P _{HXT7} – PrXKS1 – T _{HXT7} ; P _{HXT7} – PrXI – T _{HXT7})	RH
pRH398	HO-poly-KanMX4-HO + P _{HXT7} -PrXI-T _{HXT7} + P _{HXT7} -PrXKS1-T _{HXT7} ^a	RH
pRH407	pGAL-HO-hph	RH
pRH635	pRS418 with SacI site near clonNAT marker inactivated by site-directed mutation	RH
pRH718	pRH635 + P _{TEF} – MCS – T _{ADH1}	RH
pRH726	pRH154 + <i>Bacillus pumilus xynB</i>	RH
pRH755	pRH635 + P _{TEF} -contig126-T _{ADH1} ^b	Este trabalho
pRH756	pRH635 + P _{TEF} -contig226-T _{ADH1} ^b	Este trabalho
pRH757	pRH635 + P _{TEF} -contig226.1-T _{ADH1} ^b	Este trabalho
pRH758	pRH635 + P _{TEF} -contig3-T _{ADH1} ^b	Este trabalho
pRH780	pRH635 + P _{TEF} -contig284-T _{ADH1} ^b	Este trabalho
pRH781	pRH635 + P _{TEF} -contig3097-T _{ADH1} ^b	Este trabalho
pRH784	pRH635 + P _{TEF} -contig794-T _{ADH1} ^c	Este trabalho
pRH785	pRH635 + P _{TEF} -contig794.1-T _{ADH1} ^{a, c}	Este trabalho

RH, Plasmídeos e linhagens providenciadas pelo Dr Ronald Hector do U.S. Department of Agriculture, Bioenergy Research Unit, National Center for Agricultural Utilization Research, Agricultural Research Service, Peoria, IL, USA. Pr, *Prevotella ruminicola* TC2-24.

^a Sequência foi códon-otimizada para expressão em *S. cerevisiae*.

^b YRH1406 possível transportador de xilose.

^c YRH1405 possível transportador de xilose.

Todos os promotores *HXT7* referem-se a uma versão truncada que apresenta expressão constitutiva.

Tabela 3. Primers usados neste trabalho

N°	DNA	Sequência
235	<i>KanMX</i> gene Chromosomal	AGAGAGTTGTCACCAAGGCCAT
236	region flanking <i>HO</i> gene	TATGGAAGTGCCTCGGTGAG
638		<u>GGACTAGT</u> ATG CACGGCGGTGGTGATG
639	Contig126 ORF	<u>GCGTCGACT</u> TAGTTACTTTTCAGATTCAGCAACAGCCTT ACC
640	Contig226 ORF	<u>GGACTAGT</u> ATG TCTGCTCAAGATCAATTACCTG
641		<u>GCGTCGACT</u> TAAACATGTTCTTGAGATGGCTTG
642	Contig226.1 ORF	TC <u>AGGATCC</u> ATG AGTTCATCACAACCAAACTTC
643		<u>GCGTCGACT</u> TACGCATTTACGTGTCTTTTAGC
644	Contig3 ORF	<u>GGACTAGT</u> ATG GGTTTAGAAGATAGTCAATTTCTCC
645		<u>GCGTCGACT</u> TAAACACCATTGCCACTACTACTATTTCC
652	Contig284 ORF	<u>GGACTAGT</u> ATG GGTTTAGAAGATAGCAAATTCCTTA
653		<u>GCGTCGACT</u> CTCTAAGCAGATTCAGAACTTCAAC
654	Contig794 ORF foward prime	<u>GGACTAGT</u> ATG GTAGTATTTGCGATCGGAAGA
655	Contig794 reverse intern primer	GAATTTTTGATGACAAAAAATTCGGATTTTGGCTTATTA TTATCTGG
656	Contig794 foward intern primer	CCAGATAATAATAAGCCAAAATCCGAATTTTTTGTATC AAAAATTC
657	Contig794 reverse intern primer	GACTATAGGACATCCTTTGGAGTACATTAGAATCGGAA TAAACTCTTG
658	Contig794 foward intern primer	ATTCCGATTCTAATGTACTCCAAAGGATGTCCTATAGT CTTGGAATTGG
659	Contig794 ORF reverse primer	<u>GCGTCGACT</u> TATAACATTCGTGTGGTCTCATCATC
660	Contig3097 ORF	<u>GGACTAGT</u> ATG CACGGCGGTGGTGATG
661		<u>GCGTCGACT</u> TAGTTACTTTTCAGATTCAGCAACAGCC
738	<i>MAT</i> locus	AGT CACATCAAGATCGTTTATGG
739	<i>MAT</i> alfa flanking gene	GCACGGAATATGGGACTACTTCG
740	<i>MAT</i> a flanking gene	ACTCCACTTCAAGTAAGAGTTTG

Sítios das enzimas de restrição estão sublinhados e em itálico.
Start códons estão em negrito.

4.3 Clonagem dos possíveis genes de transportadores de xilose

Os genes de transportadores foram amplificados usando Phusion high-fidelity DNA polymerase (Thermo Fisher Scientific; Waltham, MA, USA) a partir do DNA genômico das leveduras selvagens fermentadoras de pentoses, linhagens YRH1405 (*Spathaspora xylofermentans* HMD25.1) e YRH1406 (*Spathaspora xylofermentans* HMD23.3). Os genomas das linhagens foram previamente sequenciados usando o sistema Illumina MiSeq pelo Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor, Fepagro Saúde Animal (Samuel P. Cibulski, IPVDF, Eldorado do Sul, RS, Brasil). Os *contigs* foram obtidos usando o programa de análise de sequência CLC Main Workbench (Qiagen, Hilden, Germany). As ORFs dos *contigs* foram identificadas usando o programa Clone Manager (Scientific & Educational Software, Denver, CO, USA) e suas sequências comparadas aos principais transportadores de xilose depositados no banco de dados do GenBank usando a ferramenta Blastn. As sequências das ORFs estão apresentadas na seção 9.1 dos Apêndices. Os transportadores identificados nos *contigs* foram amplificados usando os primers 638-45/52-61 contendo sítios de restrição para as enzimas *SpeI* e *BamHI* nos primers *forward* e *Sall* nos primers *reverse* (ver tabela 3). A sequência do contig794 foi códon-otimizada para expressão em *S. cerevisiae* por meio da troca dos códons CTG presentes na ORF usando primers internos à ORF contendo códons TCC. Os fragmentos de DNA amplificados usando os pares de primers internos 654/655, 656/657 e 658/659 foram purificados do gel (Macherey-Nagel NucleoTrap Gel extraction; Düren, Germany) e usados como DNA molde para amplificação da ORF do contig794 códon-otimizada usando o par de primers 654/659. Cada fragmento de DNA foi clonado no vetor pCR 2.1 TOPO (Invitrogen)

para sequenciamento. Os fragmentos de DNA livres de erros de replicação foram subclonados dentro do Sítio Múltiplo de Clonagem (MCS - *Multiple Cloning Site*) do vetor de expressão pRH718 (RH, USDA-ARS, NCAUR, Peoria, IL, USA) (Figura 8) usando as enzimas *SpeI/SalI* ou *BamHI/SalI*, para gerar os plasmídeos pRH755-58/80-81/84-85.

Os plasmídeos foram transformados nas linhagens industriais e de laboratórios de *S. cerevisiae* contendo a via de metabolismo da xilose ou o gene *xynB* da beta-xilosidase, mutantes ou não para os transportadores de hexoses Hxt1-7 (ver Tabela 1). As linhagens transformadas foram submetidas a 2 h de recuperação em meio líquido antes de serem plaqueadas em meio YPD ou YP-maltose (YPM), ou em SM^{-leu}, conforme o genótipo da linhagem, e na presença de ClonNat (100 µg/mL). Os transportadores foram testados através da análise do crescimento em xilose ou pela determinação da atividade de transporte da xilose nas linhagens com o gene *xynB* conforme descrito nos tópicos 4.6 e 4.7.

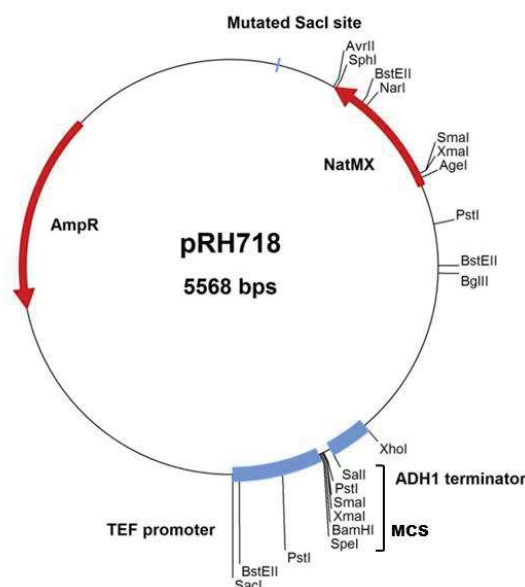


Figura 8. Vetor de expressão contendo a região MCS onde os possíveis genes de transportadores de xilose foram inseridos usando as enzimas de restrição *SpeI/SalI* ou *BamHI/SalI*. O vetor pRH718 foi providenciado pelo Dr Ronald Hector (USDA-ARS, NCAUR, Peoria, IL, USA).

4.4 Ensaio de fermentação

Meios de cultivo YP (50 mL) com 80 g L^{-1} de glicose, 80 g L^{-1} de xilose e misturas com 40 g L^{-1} de cada açúcar foram inoculadas com células crescendo exponencialmente a uma $\text{DO}_{660} = 1$. A fermentação anaeróbia da glicose e da xilose ocorreu a $30 \text{ }^\circ\text{C}$ e foi monitorada continuamente por meio de um sistema *wireless* de medição da produção de gases (Ankom Technologies; Macedon, NY, USA). O sistema monitora a produção de CO_2 indiretamente através da medição da pressão do gás acumulado. A produção de CO_2 é calculada usando a lei dos gases ideais (como rotina interna do equipamento). O sistema foi ajustado para liberar a pressão quando esta atingisse 1 psi e para monitorar a pressão acumulada a cada 15 min. Amostras foram retiradas ao fim da fermentação para determinação da biomassa celular (por DO_{660}) e analisar açúcares residuais e produtos formados por HPLC. Valores da pressão acumulada foram utilizados para calcular a quantidade de CO_2 produzida durante a fermentação. Quantidades de CO_2 utilizadas para os cálculos de recuperação de carbono assumem que 1 mol de CO_2 é produzido para cada 1 mol de etanol. As fermentações de xilose e da mistura de xilose e glicose foram realizadas em condições de limitação de oxigênio (100 rpm) a $30 \text{ }^\circ\text{C}$. Amostras foram retiradas dentro do intervalo de 120 h de fermentação para determinar a biomassa celular (DO_{660}) e analisar açúcares residuais e os produtos formados por HPLC. Todos os experimentos foram realizados em triplicata. Cálculos de recuperação de carbono foram baseados em carbono de entrada total a partir de glicose e/ou xilose e da glicose e/ou xilose restantes, juntamente com outros produtos de fermentação. A formação de biomassa não foi incluída nos cálculos. O rendimento do etanol a partir de xilose ou glicose e xilose (Y_{Etanol}) foi definida como g

de etanol/g de açúcar consumido. O rendimento do xilitol a partir de xilose (Y_{xilitol}) foi definido como g de xilitol/g de xilose consumida. Produção de biomassa ($Y_{X/S}$, g/g) foi expressa como g de células seca/g de açúcares consumidos. O peso seco foi determinado pela regressão linear entre a densidade óptica (DO_{660}) e mg de células secas. A produtividade do etanol (Q_p , g(L h)^{-1}) foi definida como a concentração de etanol no intervalo de tempo t de produção deste metabólito.

4.5 Preparação e fermentação do hidrolisado

Processo de produção de 20% (fração mássica) de sólidos de hidrolisado de *Switchgrass* (*Panicum virgatum* L.) (SGH) foi realizado como descrito por Slininger et al. (2015). *Switchgrass* foi pré-tratada através da mistura de 21,69 g de peso seco desta biomassa lignocelulósica com 80 mL de uma solução de ácido sulfúrico 0,936 % (fração volumétrica) e 0,3 g de Pluronic F-268. Cada um dos 12 recipientes de aço inoxidável foi preenchido com os reagentes, lacrado e montado em um forno Mathis Labomat IR Dyer, onde foram rodadas a 50 rpm (1 min à direita, em seguida, 1 min à esquerda) e aquecidas a 160°C durante 15 min, e depois esfriada para 40°C. Após o pré-tratamento, o material teve o pH ajustado para 4,5 pela adição de 3,6 mL de solução de Ca(OH)_2 30% e 4,5 mL de solução de ácido cítrico 1 M diretamente em cada recipiente e, em seguida, rotacionadas por 30 min no Labomat (50 rpm; 1 min direita, 1 min esquerda; temperatura ambiente). Os hidrolisados foram transferidos dos recipientes para um Erlenmeyer de 250 mL para sacarificação. Foram adicionados 2,7 mL da enzima CTec (celulase) e 0,5 mL da enzima HTec (endoxilanase com alta afinidade para hemicelulose solúvel) (Novozymes, Bagsvaerd, Denmark). O frasco foi tampado e incubado por cerca de

72 h a 50°C e 175 rpm. Sólidos da biomassa foram removidos por filtração através de uma malha filtrante para um novo frasco. O hidrolisado resultante teve o pH ajustado para 5,5 e foi esterilizado por filtração (filtro Nalgene 0,2 µm de diâmetro). Amostras para HPLC foram preparadas para determinar a sua composição. SGH é caracterizado por um elevado teor de furaldeídos e ácido acético, e níveis muito baixos de nitrogênio disponível necessário para suportar o crescimento de leveduras e fermentação. Dessa forma um pré-teste avaliando a melhor concentração de hidrolisado e fonte de nitrogênio foi realizado. O hidrolisado foi mantido refrigerado a 4°C até utilização. A fermentação do SGH foi realizada em condições de limitação de oxigênio (100 rpm) a 30 °C. Culturas com volumes de 25 mL foram inoculadas com células crescendo exponencialmente a uma $DO_{660} = 1$. Os experimentos foram realizados em triplicata. As amostras foram retiradas durante as 120 h de fermentação para determinar a biomassa celular (DO_{660}) e analisar por HPLC os açúcares residuais e os produtos formados.

4.6 Análises de crescimento no Bioscreen

Culturas de células em placas de microtitulação estéreis (100 poços) foram realizadas usando o sistema automatizado de análise de curva de crescimento microbiológico Bioscreen C™ (Growth Curves USA; Piscataway, NJ, USA). As culturas foram iniciadas em 300 µL de meio a uma DO_{660} de 0,05, e incubadas a 30°C. As placas eram agitadas com um ajuste de amplitude elevada e velocidade normal durante 30 s, e com um intervalo de 60 s. A DO_{660} foi determinada pela conversão dos valores de DO de ampla banda do Bioscreen C™ usando a equação (1):

$$DO_{660} = 1,74*DO + 0,535*(DO)^2 - 0,749 *(DO)^3 + 0,675*(DO)^4 \quad (R2 = 0,999) \quad (1)$$

Os dados apresentados representam os valores médios do experimento em duplicata ou triplicata.

4.7 Determinação da atividade de transporte da xilose

O método espectrofotométrico do *p*-nitrofenol (*p*NP) foi usado para determinar a atividade dos transportadores da xilose das linhagens selvagens fermentadoras de pentoses (nas condições descritas por Hollatz e Stambuk, 2001), e dos transportadores transformados nas linhagens com genótipo CEN.PK contendo o gene *xynB* da beta-xilosidase do *Bacillus pumilus* (nas condições descritas por Wang et al., 2013), usando os substratos análogos à xilose e glicose, *p*-nitrofenil- β -D-xilopiranosídeo (*p*NP β X) e *p*-nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo (*p*NP β G), respectivamente. Beta-xilosidase é uma enzima que atua intracelularmente e, portanto, os substratos necessitam entrar na célula para serem degradados. Isso permite que o experimento possa ser realizado por longos períodos, pois as enzimas não serão secretadas e não irão interferir no resultado final do teste. Todas as medidas foram realizadas em triplicatas. Células mortas por fervura (100 °C; 5 min) ou linhagens parentais (sem transportadores) foram usadas como controles. As células foram recolhidas durante metade da fase exponencial de crescimento por centrifugação (2500 g a 4 °C), lavadas duas vezes com água destilada gelada e ressuspensas no tampão de reação para uma concentração celular final de 0,2-5 mg/mL (peso seco), dependendo do experimento. Cada substrato, dissolvido em mesmo tampão de reação, foi adicionado às células para uma concentração final de 5 ou 25 mM. Tampão carbonato-bicarbonato 0,5 M (pH 10) foi adicionado ao fim do

tempo determinado a fim de parar a reação e dar coloração às amostras. As células foram removidas por centrifugação. A concentração de *p*NP presente no sobrenadante foi determinada no espectrofotômetro de luz UV a 405 nm de absorvância usando a equação obtida com a curva de calibração de *p*NP. Uma unidade (1U) da atividade da β -xilosidase foi definida pela quantidade de enzima requerida para liberar 1 μ mol de *p*NP do *p*NP β X em 1 min (μ mol min⁻¹). 1U x 1000 de atividade enzimática por mg de células (peso seco) foi definida pela quantidade de células requeridas para liberar 1 nmol de *p*NP do *p*NP β X em 1 min (nmol min⁻¹ mg⁻¹ peso seco).

4.8 Preparação de esporos randômicos e tétrades

Células crescendo exponencialmente a uma DO₆₆₀ ~ 5,00 foram inoculadas meio de esporulação (10 g L⁻¹ de KAc, 1 g L⁻¹ de extrato de levedura, 0,5 g L⁻¹ de glicose). Após incubação (48 h a 25 °C), as células foram examinadas ao microscópio para visualização de esporos.

4.8.1 Esporos randômicos

1 mg/mL de Zymolyase 100T/DTT 10 mM foi adicionado às células que permaneceram incubadas à temperatura ambiente durante 3 h. Os esporos foram colhidos por centrifugação, lavados uma vez com água destilada estéril e ressuspendidos em 1 mL de Nonident P-40 0,01%. A suspensão foi agitada no vórtex com pérolas de vidro para liberar os esporos e diluições foram plaqueadas em YPD-G418. Os isolados resistentes foram conduzidos ao teste de determinação do *mating-type*.

4.8.2 Dissecção das tétrades

0,25 mg/mL de Zymolyase 100T/sorbitol 1 M foi adicionado às células (DO₆₆₀ 2-4) que permaneceram incubadas à temperatura ambiente dentro de um intervalo de tempo de 5-30 min. As células foram verificadas sob o microscópio a cada 5 minutos para encontrar tétrades capazes de serem dissecadas usando o microscópio de dissecção SporePlay (Singer Instruments, Somerset, UK) (Figura 9A). Com o micromanipulador, 4 esporos de cada tétrade foram colocadas em placas com YPD (Figura 9B) e replaqueadas em YPD-G418 após 48 h de incubação (30°C). Os isolados resistentes foram conduzidos ao teste do mating-type e determinou-se se a linhagem era MAT a ou alfa (adaptado de Silverman e Hickman, 2011).

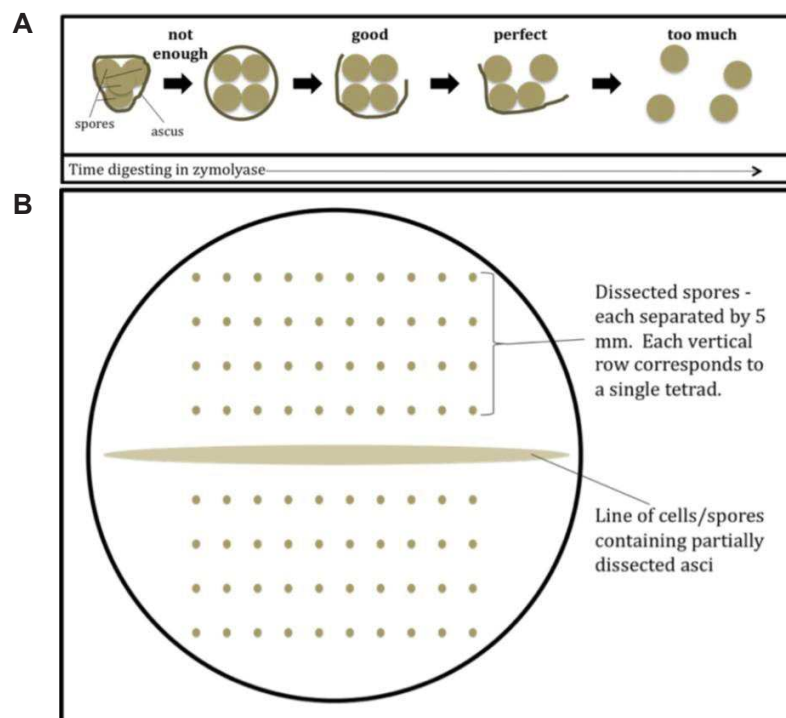


Figura 9. Representação da digestão da parede do esporo (A) e dissecção das tétrades (B) (Silverman e Hickman, 2011).

4.9 Testes de determinação do mating-type, troca do locus *MAT* e criação de linhagens poliploides

4.9.1 Determinação do mating-type

Cada levedura foi misturada separadamente com as linhagens YRH700 (*MAT*_a) e YRH701 (*MAT*_{alpha}) em placas de YPD para determinar o seu *mating-type*. Após incubação durante 3 h a 30°C, réplicas da mistura de células foram transferidas para placas YPD-G418-ClonNat. O *mating-type* foi confirmado por PCR multiplex usando os primers 738/739/740.

4.9.2 Troca do locus *MAT* e criação de linhagens poliploides

O plasmídeo pRH407 contendo o gene *HO* regulado por um promotor induzido pela galactose e gene de resistência a higromicina (*hph*) foi transformado nas leveduras para a troca do locus *MAT* de linhagens haploides (a para alfa e vice-versa) e diploides (*a/alfa* para *a/a* ou *alfa/alfa*) (Figura 10). Após crescimento *overnight* (30°C, 250 rpm) em YP-sacarose 2%, as células transformadas foram ressuspensas em YP-galactose 2% e incubadas (30°C, 250 rpm). Amostras foram retiradas a cada 2 h e mantidas no gelo. O objetivo era fazer com que as células trocassem o locus *MAT* sem que ocorresse o cruzamento. Após 6 h de incubação, as amostras foram misturadas e a DO_{660} determinada para calcular a densidade de células a fim de obter 100-200 células por placa (YPD). A troca do locus foi confirmada pelo teste do mating-type e PCR multiplex descritos no tópico 4.9.1. Para criar as linhagens poliploides, duas leveduras com loci *MAT* opostos foram misturadas em placas YPD e incubadas *overnight* a 30 °C. Após o período de incubação, isolados da mistura foram obtidos por esgotamento em placa YPD e

submetidos ao teste do *mating-type*. O não crescimento de células após o teste indicava que houve cruzamento entre as linhagens, o que foi confirmado pelo PCR multiplex.

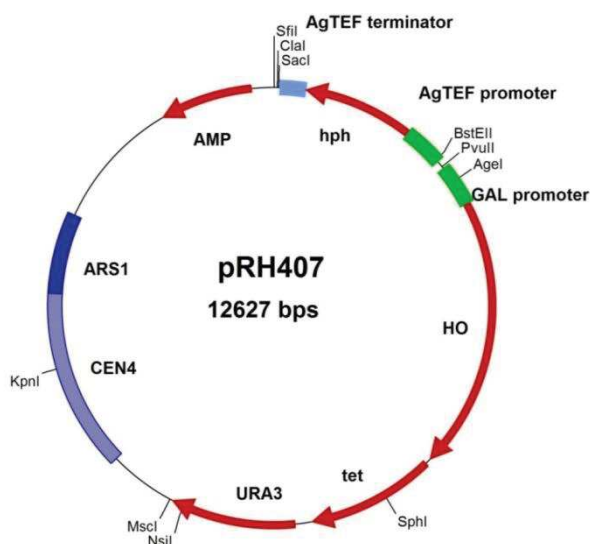


Figura 10. Plasmídeo pRH407 induzido pela galactose para expressar o gene *HO* e realizar a troca do *mating-type*. O plasmídeo foi providenciado pelo Dr Ronald Hector (USDA-ARS, NCAUR, Peoria, IL, USA).

4.10 Método analítico

Concentrações de açúcares e metabólitos formados foram determinadas usando HPLC. As amostras foram analisadas usando um sistema de cromatografia líquida SpectraSYSTEM (Thermo Electron Corporation, CA, EUA) equipado com um amostrador automático, aquecedor de coluna, bomba isocrática, detector de índice de refração, e integrador baseado em computador executando o software Chromquest versão 2.5 (Thermo Electron Corporation). As amostras eram injetadas (20 μ L) para uma coluna de açúcar (Coluna Aminex HPX-87H, 300 x 7,8 mm, Bio-Rad Laboratories, Inc.) e eluída em ácido sulfúrico 5 mM a 0,6 mL/min e 65 °C.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização cinética de utilização da xilose das linhagens selvagens fermentadoras de pentoses

Para identificar uma nova levedura como potencial fonte de genes para transportadores de xilose, linhagens selvagens fermentadoras de pentoses selecionadas para estudo YRH1405-12 foram analisadas quanto ao metabolismo de xilose pela cinética de crescimento e atividade de transporte em meio SC contendo xilose como única fonte de carbono.

5.1.1 Determinação da velocidade de crescimento máximo específico e consumo de xilose

A velocidade de crescimento máximo específico (μ_{max}) e consumo de xilose das linhagens fermentadoras de pentoses foram determinados pela formação de biomassa (DO_{600}) e utilização da xilose (5 g L^{-1}) durante o período de 24 h de incubação ($30 \text{ }^\circ\text{C}$ e 180 rpm) e em duplicata. O μ_{max} foi determinado pela inclinação máxima da regressão linear de $\ln(DO_{600})$ pelo tempo. A Figura 11 mostra a cinética de crescimento das 8 leveduras selecionadas e do consumo de xilose. Foi possível observar que o período da fase exponencial das leveduras foi em média entre 0-12 h, com a concentração máxima de formação de biomassa variando entre 4-8 (DO_{600}). As linhagens YRH1406 e YRH1407 não consumiram toda a xilose. Pequenas quantidades de produtos formados, como xilitol e etanol, foram detectadas (dados não mostrados). O $\mu_{m\acute{a}x}$ variou entre $0,41 \text{ h}^{-1}$ e $0,61 \text{ h}^{-1}$ (Tabela 4). O resultado do $\mu_{m\acute{a}x}$ em geral não pré-determinou a máxima formação de biomassa e

consumo total da xilose. Os maiores valores de $\mu_{\text{máx}}$ foram obtidos com as linhagens do gênero *Spathaspora*, com YRH1405 apresentando a maior taxa de crescimento ($0,61 \text{ h}^{-1}$). O rápido crescimento em xilose pode ser atribuído a uma melhor capacidade em transportar esse açúcar ativamente. Gárdonyi et al. (2003) realizaram uma triagem com várias leveduras fermentadoras de xilose. Dentre as que apresentaram mais rápido crescimento em frascos agitados contendo xilose como única fonte de carbono, a linhagem *Candida intermedia* PYCC 4715, obteve um alto valor de $\mu_{\text{máx}}$ ($0,37 \text{ h}^{-1}$) em relação às outras leveduras, além de apresentar maior capacidade em transportar D- ^{14}C xilose ($6,6 \text{ mmol h}^{-1}\text{g}^{-1}$). Embora as linhagens YRH1406 e YRH1407 também tenham sido superiores às outras leveduras em relação aos valores de $\mu_{\text{máx}}$ obtidos, estas não consumiram toda a xilose. Ao fim do experimento, o pH de todas as amostras atingiu valores próximos a 2 (pH inicial foi em torno de 5). As linhagens YRH1406 e YRH1407 podem ser menos tolerantes ao baixo pH, o que suspendeu o crescimento e o consumo total do açúcar. Um experimento anterior, realizado em meio SC contendo 20 g L^{-1} de xilose dentro de um período de 48 h de incubação, mostrou que cerca de 70% da xilose não foi consumida, e a fase estacionária em todas as linhagens foi atingida antes de 18 h. Isso reforça a hipótese de que o baixo pH do meio influencia o metabolismo do micro-organismo. Matsushika et al. (2008) realizaram uma análise quantitativa do metabolismo de uma linhagem recombinante de *S. cerevisiae* onde a fermentação da xilose, que era a única fonte de carbono, além de outras respostas fisiológicas, aumentaram drasticamente o nível de citrato no ciclo ácido tricarboxílico nas células. No presente trabalho, foi detectado um pico com um tempo de retenção semelhante ao do ácido cítrico, porém a concentração não foi determinada.

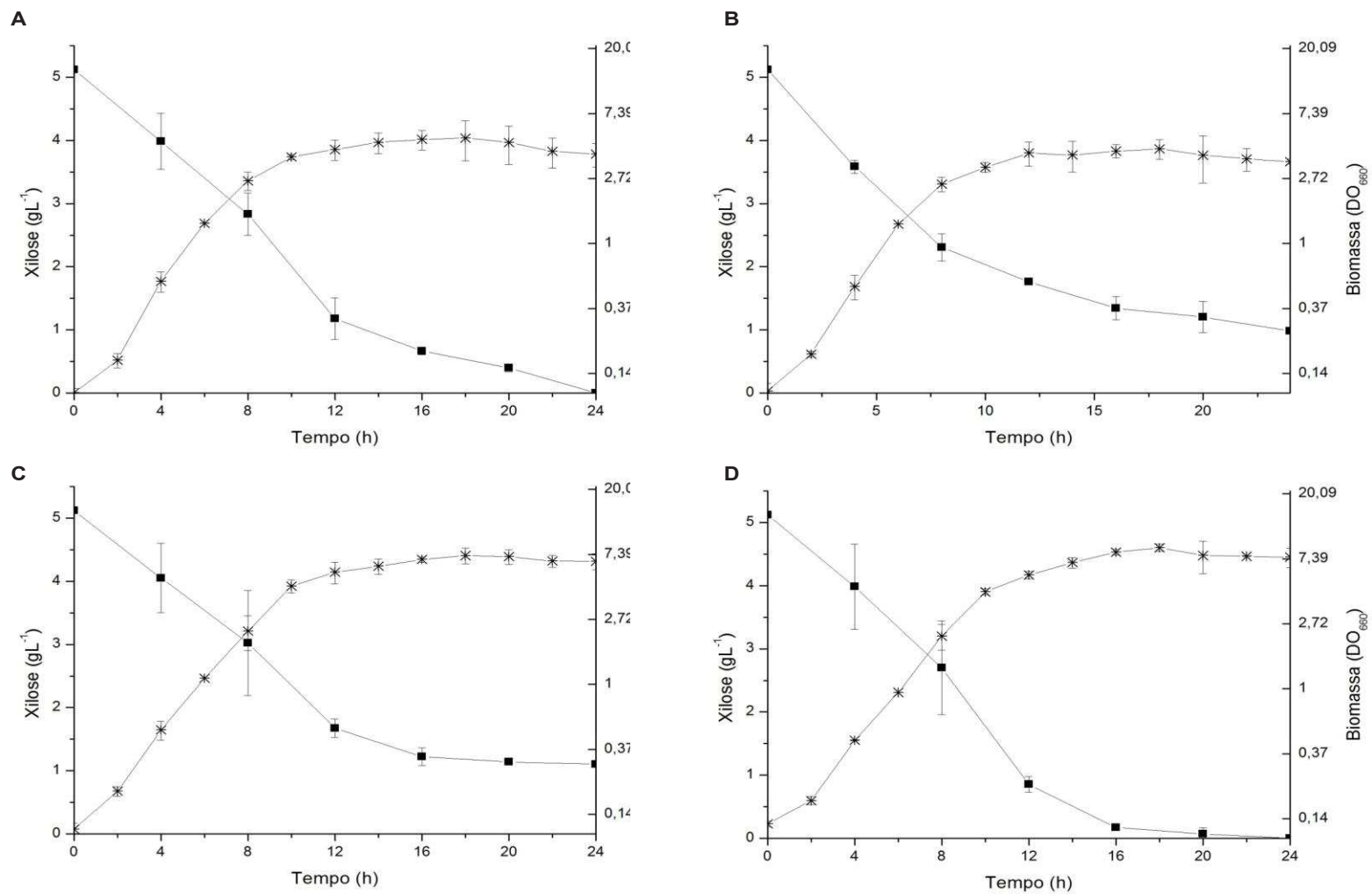


Figura 11. Cinética da produção de biomassa (DO₆₆₀) e consumo de xilose (g L⁻¹) das linhagens crescidas em SC + 5 g L⁻¹ de xilose durante 24 horas de incubação (30°C e 180 rpm). A. YRH1405; B. YRH1406; C. YRH1407; D. YRH1408; E. YRH1409; F. YRH1410; G. YRH1411; H. YRH1412 - Biomassa (×); Xilose (■). Eixo y da formação de biomassa está em escala logarítmica natural. (Continua)

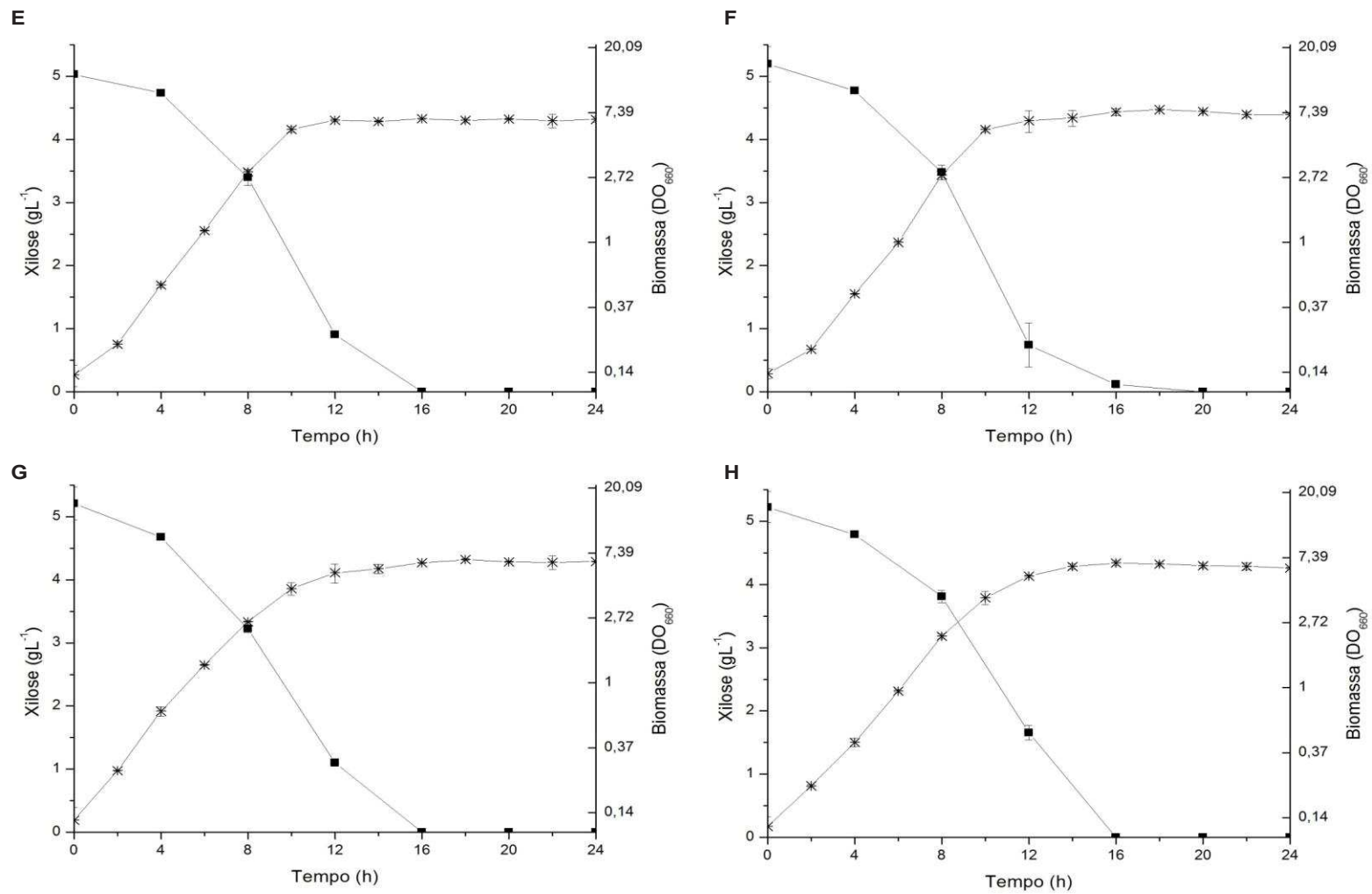


Figura 11. Cinética da produção de biomassa (DO₆₆₀) e consumo de xilose (g L⁻¹) das linhagens crescidas em SC + 5 g L⁻¹ de xilose durante 24 horas de incubação (30°C e 180 rpm). A. YRH1405; B. YRH1406; C. YRH1407; D. YRH1408; E. YRH1409; F. YRH1410; G. YRH1411; H. YRH1412 - Biomassa (*); Xilose (■). Eixo y da formação de biomassa está em escala logarítmica natural. (Conclusão)

Tabela 4. Parâmetros cinéticos das linhagens de leveduras crescendo em YNB suplementado com 5 g L⁻¹ de xilose.

Linhagem	$\mu_{\text{máx}}$ (h ⁻¹)	Xilose residual (g L ⁻¹)	Máxima concentração de biomassa (DO ₆₆₀)
YRH1405	0,608	0	5,08 ± 1,5
YRH1406	0,520	0,98 ± 0,1	4,30 ± 0,7
YHR1407	0,472	1,11 ± 0,0	7,27 ± 0,9
YRH1408	0,464	0	8,77 ± 0,5
YRH1409	0,458	0	6,72 ± 0,1
YRH1410	0,458	0	7,72 ± 0,1
YHR1411	0,455	0	6,67 ± 0,1
YRH1412	0,409	0	6,79 ± 0,3

μ_{max} (h⁻¹) foi determinado pela inclinação máxima da regressão linear de ln(DO₆₆₀) pelo tempo.

5.1.2 Ensaios de atividade de transporte

Os ensaios de atividade de transporte foram realizados conforme descrito por Hollatz e Stambuk (2001) e fez parte de um estudo para verificar se o rápido crescimento das linhagens em xilose está atribuído a uma melhor capacidade em transportar xilose. As leveduras foram colhidas por centrifugação durante metade da fase exponencial de crescimento em SC com duas diferentes concentrações de xilose (0,5 g L⁻¹ e 5 g L⁻¹), e ressuspendidas em tampão Tris-suscinato 50 mM pH 5 para uma concentração celular final da reação de 3-5 mg/mL (peso seco). Células mortas por fervura foram usadas como controle. Os substratos *p*NPβX e *p*NPβG foram diluídos em mesmo tampão para concentração final da reação de 5 mM. O teste ocorreu dentro de um intervalo de 10 minutos. A Figura 12 mostra a relação do consumo de *p*NPβX com o tempo (A) e atividade de transporte do *p*NPβX e *p*NPβG (B) de cada linhagem de leveduras crescidas em SC com 0,5 g L⁻¹ e 5 g L⁻¹ de xilose.

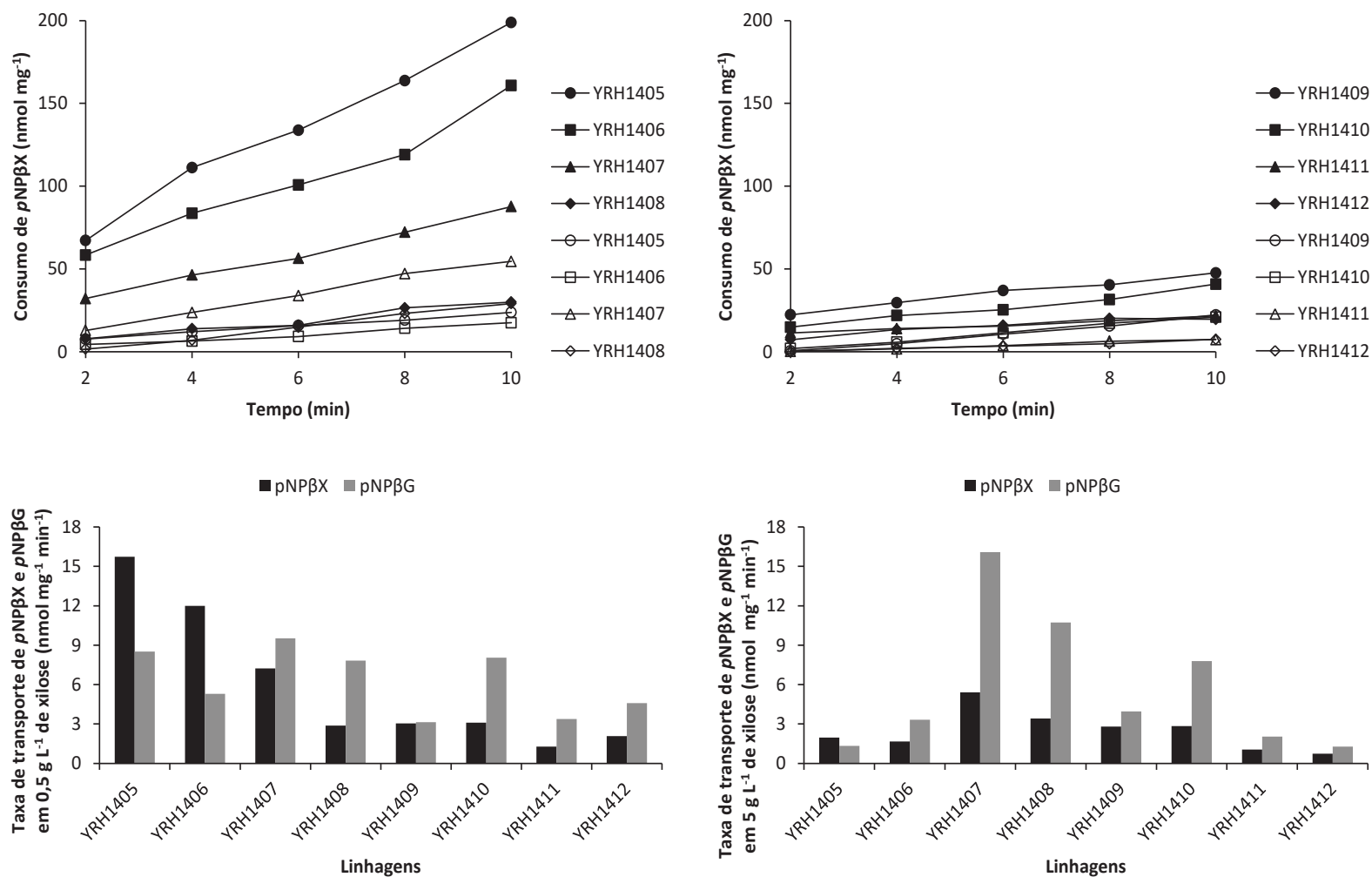


Figura 12. Cinética do consumo de pNPβX (A) e atividade de transporte do pNPβX e pNPβG 5 mM de cada linhagem de leveduras crescidas em SC com 0,5 g L⁻¹ e 5 g L⁻¹ de xilose. Símbolos fechados: 0,5 g L⁻¹; símbolos abertos: 5 g L⁻¹. Os dados apresentados representam os valores médios em triplicata. Células foram diluídas em tampão Tris-suscinato 50 mM pH 5 para uma concentração celular de 3-5 mg/mL (peso seco). Células mortas por fervura foram usadas como controle.

Assim como no experimento anterior, a atividade de transporte foi maior entre as linhagens do gênero *Spathaspora*, sendo as linhagens YRH1407 e YRH1405 as que apresentaram melhores resultados nas concentrações 5 e 0,5 g L⁻¹, respectivamente. A atividade de transporte foi melhor quando utilizada a menor concentração de xilose, pois houve aumento do consumo de *p*NPβX por parte da maioria das linhagens, principalmente nas linhagens YRH1405 e YRH1406 (Figura 12A). Já é conhecido que transportadores de alta afinidade são expressos em baixas concentrações de açúcar (Leandro et al., 2009).

Embora os ensaios de transporte de açúcar sejam normalmente realizados com substratos radiomarcados, alguns autores tem determinado a taxa de transporte da xilose de forma indireta através da hidrólise do *p*NPβX em *p*-nitrofenol (*p*NP) pelas xilosidases (Chen et al., 2009; Ren et al., 2009; Wang et al., 2013). Como este tipo de substrato precisa ser transportado pela membrana da célula para ser hidrolisado pelas enzimas intracelulares e liberar o *p*NP, o método pode ser utilizado para estudos de transporte.

Substratos ligados a *p*-nitrofenol vêm sendo utilizados para estudos de transporte pela membrana plasmática há algumas décadas. O teste utilizando os substratos *p*NPβX e *p*NPβG foi realizado conforme Hollatz e Stambuk (2001), com algumas modificações. Os autores propuseram o teste para determinar o consumo de α-glicosídeos pelo transportador AGT1 usando o substrato *p*NPαG em *S. cerevisiae*. A permease mostrou ter alta afinidade por *p*NPαG ($K_m \sim 3$ mM), semelhante à encontrada em outros transportadores de α-glicosídeos descritos na literatura. Essa afinidade é relativamente menor quando comparada com a de α-glicosidase intracelular ($K_m = 1-2 \cdot 10^{-4}$ M, Yoshikawa et al., 1994). Portanto, os valores encontrados não podem ser atribuídos às enzimas intracelulares. Além

disso, quando a barreira da membrana plasmática é interrompida por permeabilização das células, uma quantidade significativamente superior de *p*NP é produzida. Ainda não foi possível calcular o *K_m* dos transportadores de xilose nas linhagens de *Spathaspora* do presente estudo, mas sabe-se que a afinidade da xilose redutase para reduzir a xilose a xilitol, costuma ser $K_m = 2-5 \cdot 10^{-4}$ M (Hahn-Hagerdal et al., 2001). São poucos trabalhos que utilizam essa metodologia para medir a atividade de transporte do *p*NPβX são encontrados na literatura. Além disso, os autores não calcularam a afinidade dos transportadores pelo substrato (Chen et al., 2009; Wang et al., 2013).

Outro fato que valida o método é a possibilidade da atividade de transporte ser inibida por vários compostos. Sendo o *p*NPβX transportado ativamente pelo mecanismo H⁺-simporte, a presença do agente desacoplador FCCP (carbonil cianido *p*-trifluorometoxi fenil hidrazona) no experimento de Hollatz e Stambuk (2001) diminuiu a eficiência de transporte do *p*NPαG. Além disso, o consumo de *p*NPαG foi significativamente inibido devido à competição com vários α-glicosídeos pela α-glicosídeo permease. Nos experimentos de Chen et al. (2009) e Wang et al. (2013), o consumo de *p*NPβX diminuiu com o aumento da concentração de glicose e xilose adicionada à reação, indicando que *p*NPβX e xilose, ou glicose, são substratos competitivos para os transportadores. No presente estudo, foi observado, em um experimento separado, que o consumo de *p*NPβX foi inibido quando as células foram crescidas em SC suplementado com glicose (dados não mostrados). O substrato análogo à glicose *p*-nitrofenil-β-D-glicopiranosídeo (*p*NPβG) foi utilizado para verificar se os transportadores também teriam afinidade por esse substrato (Figura 12B). Com exceção da linhagem YRH1405, a taxa de transporte de *p*NPβG em 5 g L⁻¹ foi superior a de *p*NPβX. Estes resultados mostram que os

transportadores de baixa afinidade que assimilam tanto a glicose como a xilose por difusão facilitada, porém com maior afinidade para glicose, podem ter sido expressos no experimento com a concentração maior de xilose, pois glicose/xilose facilitadores são expressos quando o açúcar é abundante no meio (Leandro et al., 2009).

5.2 Obtenção de uma linhagem eficiente de *S. cerevisiae* geneticamente modificada para fermentar xilose

Com base nos resultados apresentados, as linhagens YRH1405 e YRH1406 foram escolhidas como doadoras de genes de possíveis transportadores de xilose para serem testados em *S. cerevisiae* geneticamente modificada para fermentar xilose. As linhagens industriais PE-2 e CAT-1, que neste trabalho foram nomeadas YRH1413 e YRH1414, respectivamente, são as mais utilizadas para produção de etanol combustível no Brasil (Della-Bianca et al., 2013) e demonstram ter robustez necessária para fermentação de hidrolisados lignocelulósicos (Pereira et al., 2014). Dessa forma, nessas linhagens foram inseridos vias de fermentação da xilose e estudos adicionais foram realizados com objetivo de obter uma eficiente linhagem fermentadora de xilose, além de servir como hospedeira de genes exógenos a serem testados.

5.2.1 Metabolismo da xilose das linhagens YRH1413 e YRH1414 com as vias XR/XDH e XI integradas ao cromossomo

O metabolismo da xilose das linhagens contendo as vias XR/XDH e XI

integradas ao cromossomo foi avaliado pelas curvas de crescimento no Bioscreen e comparadas com a da levedura que naturalmente fermenta pentose YRH1407 (Figura 13). Dentre as linhagens de *S. cerevisiae*, apenas os isolados provenientes de YRH1413 contendo a via XR/XDH foram eficientes em metabolizar a xilose sem qualquer adaptação prévia. O que obteve o melhor desempenho foi nomeado YRH1415 e selecionado para os outros experimentos no presente estudo. Não foi observado crescimento em xilose nos isolados da linhagem YRH1414 contendo a mesma via, mesmo após breves tentativas de adaptação. Estudos têm demonstrado que em linhagens de *Saccharomyces* industriais, geneticamente modificadas para a fermentar da xilose, o genótipo é importante para otimização da fermentação (Hector et al., 2011; Romaní et al., 2015). Mesmo assim, o isolado nomeado YRH1419 (genótipo CAT-1) foi preservado para que futuras adaptações possam ser realizadas. Também não foi observado crescimento entre isolados contendo a via XI proveniente da bactéria *P. ruminicola* integrada ao cromossomo. Embora linhagens de *S. cerevisiae* contendo os mesmos genes usados no presente estudo apresentaram resultados comparáveis na literatura, a via XI somente foi expressa com eficiência em plasmídeos com fortes promotores e em múltiplas cópias (Hector et al. 2013). Assim, como observado em outros trabalhos (Kuyper et al., 2003; Karhumaa et al., 2007), os resultados obtidos com ambas linhagens industriais mostraram que a expressão única dessa via não foi suficiente para um efetivo crescimento em xilose. Os isolados YRH1417 (genótipo PE-2) e YRH1421 (genótipo CAT-1) foram preservados para futuras investigações.

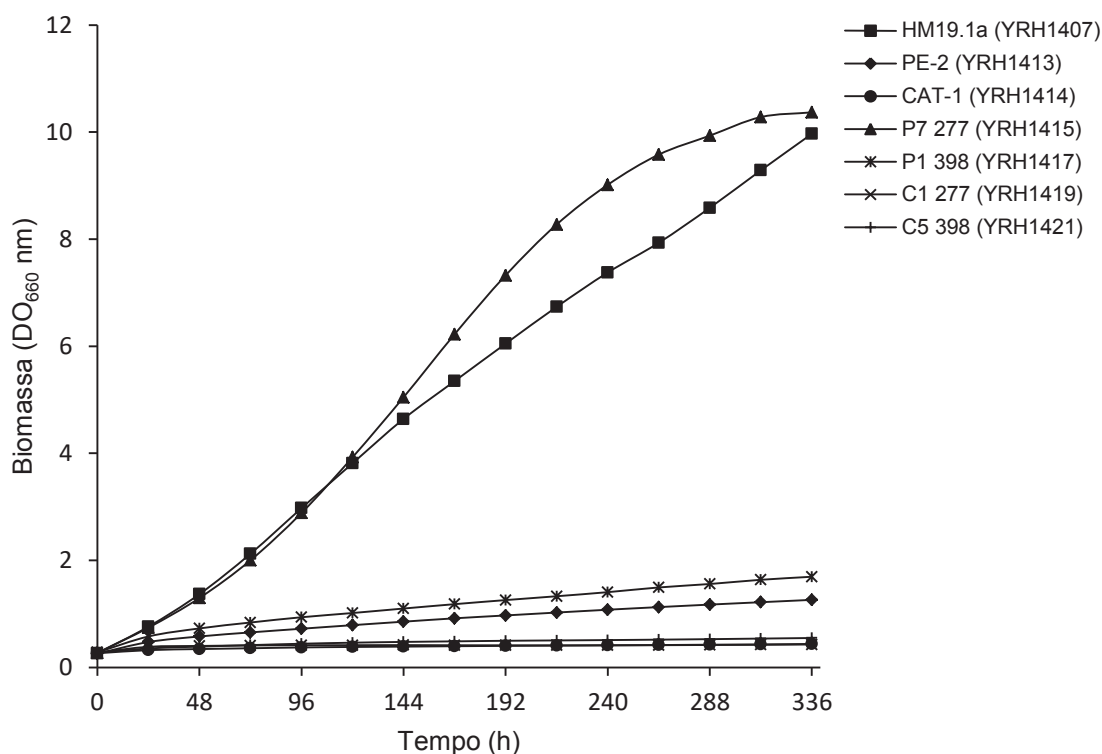


Figura 13. Curvas de crescimento no Bioscreen dos principais isolados de PE-2 (YRH1413) e CAT-1 (YRH1414) com os genes *XYL1/XYL2/XKS1* vs *XII/XK* integrados ao genoma em comparação com as linhagens selvagens e uma levedura fermentadora natural de xilose *S. arborariae* HM19.1a (YRH1407). Crescimento em YPX 2 %.

5.2.2 Avaliação do nível de homozigose da linhagem diploide YRH1415 a respeito do metabolismo da xilose por meio de linhagens haploides

YRH1415 é uma linhagem diploide possuindo apenas uma cópia do cassete de expressão para a fermentação de xilose. Recentemente, foi mostrado que haploides derivados de tétrades da linhagem PE-2 tiveram desempenho idêntico a parental diploide quando cultivada em glicose (Argueso et al., 2009). O mesmo trabalho também mostrou que haploides foram tão tolerantes ao etanol, lavagem ácida e estresse térmico de curta duração, quanto a parental diploide, indicando a homozigose destes traços nesta linhagem. Para investigar o nível de homozigose da linhagem diploide, no que diz respeito ao metabolismo de xilose, YRH1415 foi esporulada e uma triagem com vários isolados haploides foi realizada (Figura 14).

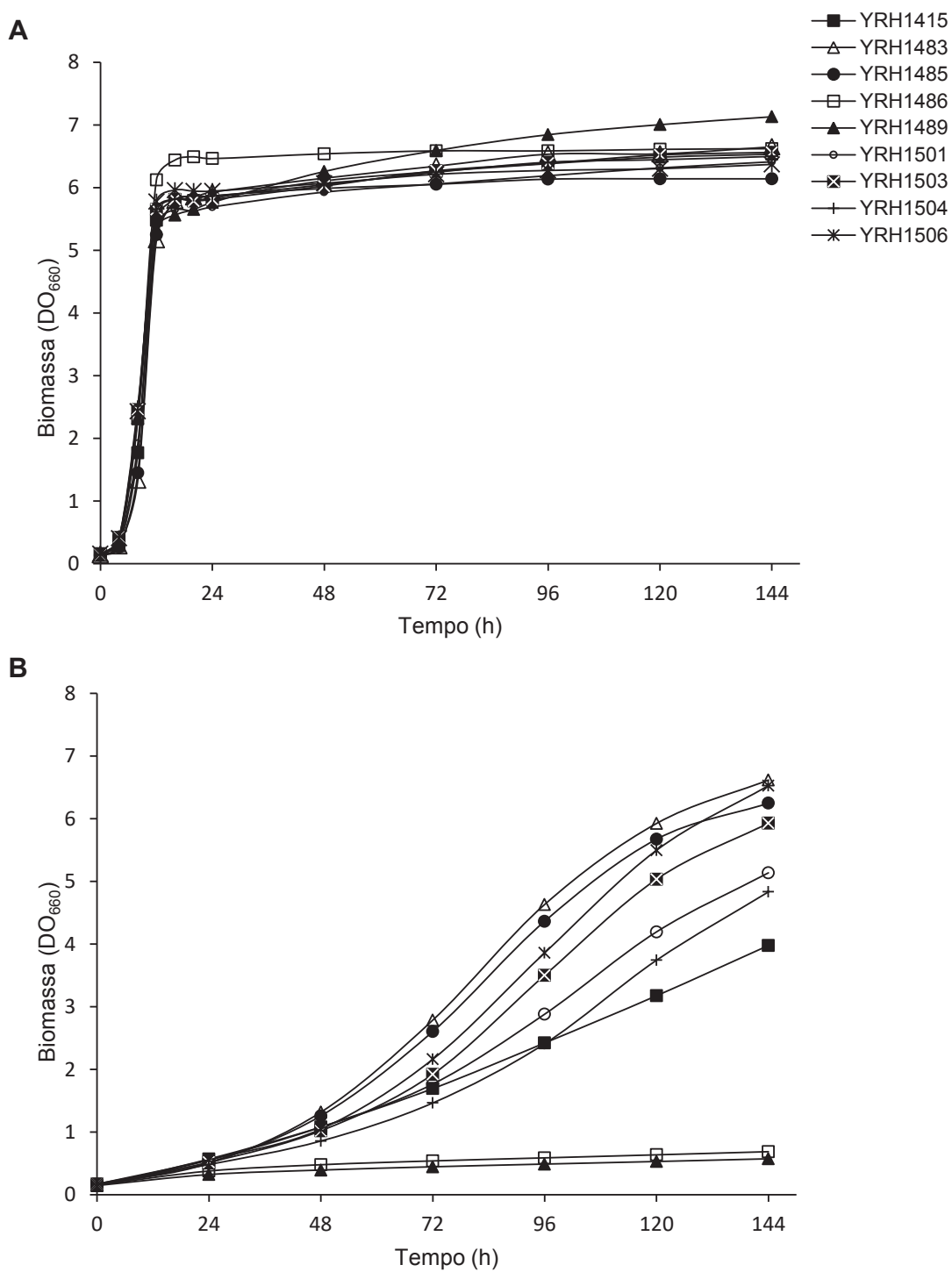


Figura 14. Curvas de crescimento em Bioscreen dos isolados haploides provenientes da esporulação da linhagem YRH1415. (A) Similar crescimento em meio YP + glicose (20 g L^{-1}); (B) crescimento variado em YP + xilose (20 g L^{-1}) com melhor desempenho para as linhagens YRH1483, YRH1485 e YRH1506. Os dados apresentados representam os valores médios do experimento em duplicata.

Os isolados haploides foram obtidos de esporos randômicos e tétrades. Os isolados dos esporos randômicos foram seleccionados ao acaso a partir de placas contendo o antibiótico G418, nas quais células haploides, sem o cassete de genes para a fermentação de xilose, foram eliminadas. Dos isolados haploides dissecados das tétrades, quando submetidos ao antibiótico G418, 50% foram viáveis. Embora PE-2 pareça ser homocigota para fenótipos de glicose e estresse, o sequenciamento desta linhagem mostrou que ela possui um genoma altamente heterocigótico (Argueso et al., 2009), que é característico de linhagens diploides de processos fermentativos, onde a heterocigose preserva a diversidade genética e amplia benefícios para sobreviver em um ambiente industrial (Akao et al. 2011; Borneman et al. 2011; Babrzadeh et al. 2012; da Silva-Filho et al., 2005). O motivo de avaliar as tétrades foi verificar a frequência de distribuição entre isolados haploides com desempenho inferior e superior em metabolizar xilose que a diploide parental. Diferentemente do que ocorreu com os haploides randômicos, todos os isolados das tétrades foram melhores que a parental em diferentes padrões de crescimento. O baixo número de esporos analisados pode ser a causa da não observação do resultado esperado, ou porque mais genes devem estar envolvidos, ou a presença de alelos em homocigose seja o maior contribuidor do fenótipo de metabolismo xilose. Aumentar número de cópias dos genes é uma estratégia bem estabelecida para aumentar a produtividade ou direcionar a uma rápida adaptação ao ambiente estressante (Hahn-Hagerdal et al., 2007; Selmecki et al., 2015). O isolado YRH1483 estava entre os que atingiram maiores curvas de crescimento no Bioscreen e foi selecionado para aumentar o número de cópias dos genes *XYL1/XYL2/XKS1* ou de outros que possivelmente melhoraram o metabolismo de xilose. Para isso, o plasmídeo pRH407 contendo o gene *HO* foi usado para alternar o *mating-type* da

linhagem YRH1483 e criar YRH1490. YRH1483 e YRH1490 foram cruzadas para gerar a diploide YRH1491. O mesmo plasmídeo foi usado para alternar o *MAT a/alfa* da linhagem YRH1491 para *a/a* e *alfa/alfa* e gerar YRH1529 e YRH1530, respectivamente. Dessa forma, um conjunto isogênico geneticamente útil de linhagens haploides e diploides foi criado.

5.2.3 Ensaio de fermentação das linhagens isogênicas

Os isogênicos haploides e diploide (YRH1483, YRH1490 e YRH1491), juntamente com a linhagem parental YRH1415 e a selvagem YRH1413, foram avaliados quanto à capacidade de fermentar glicose e xilose a etanol em meio sintético YP. A fermentação anaeróbia da glicose (80 g L^{-1}) foi monitorada através da medição da produção de CO_2 (Figura 15A). O objetivo foi verificar se as diferenças de ploidia, além da isogenia das linhagens, influenciaram no metabolismo da glicose. No entanto, os valores obtidos no rendimento (Y_{Etanol}) e produtividade do etanol (Q_p) não mostraram diferenças entre as linhagens (Tabela 5). Além disso, a ploidia e a homozigosidade dos genes não afetou a fermentação da glicose, pois todas as linhagens apresentaram uma conversão de etanol (%) próxima ao rendimento teórico (0,51). Também não existiu diferença entre as linhagens diploides YRH1413 e YRH1491 na produção de etanol ($42,5 \pm 0,3$ e $42,3 \pm 0,5$). Isto confirma que a linhagem selvagem é homozigota para os alelos que contribuem para este fenótipo, conforme descrito anteriormente por Argueso et al. (2009) nos estudos com as tétrades de PE-2.

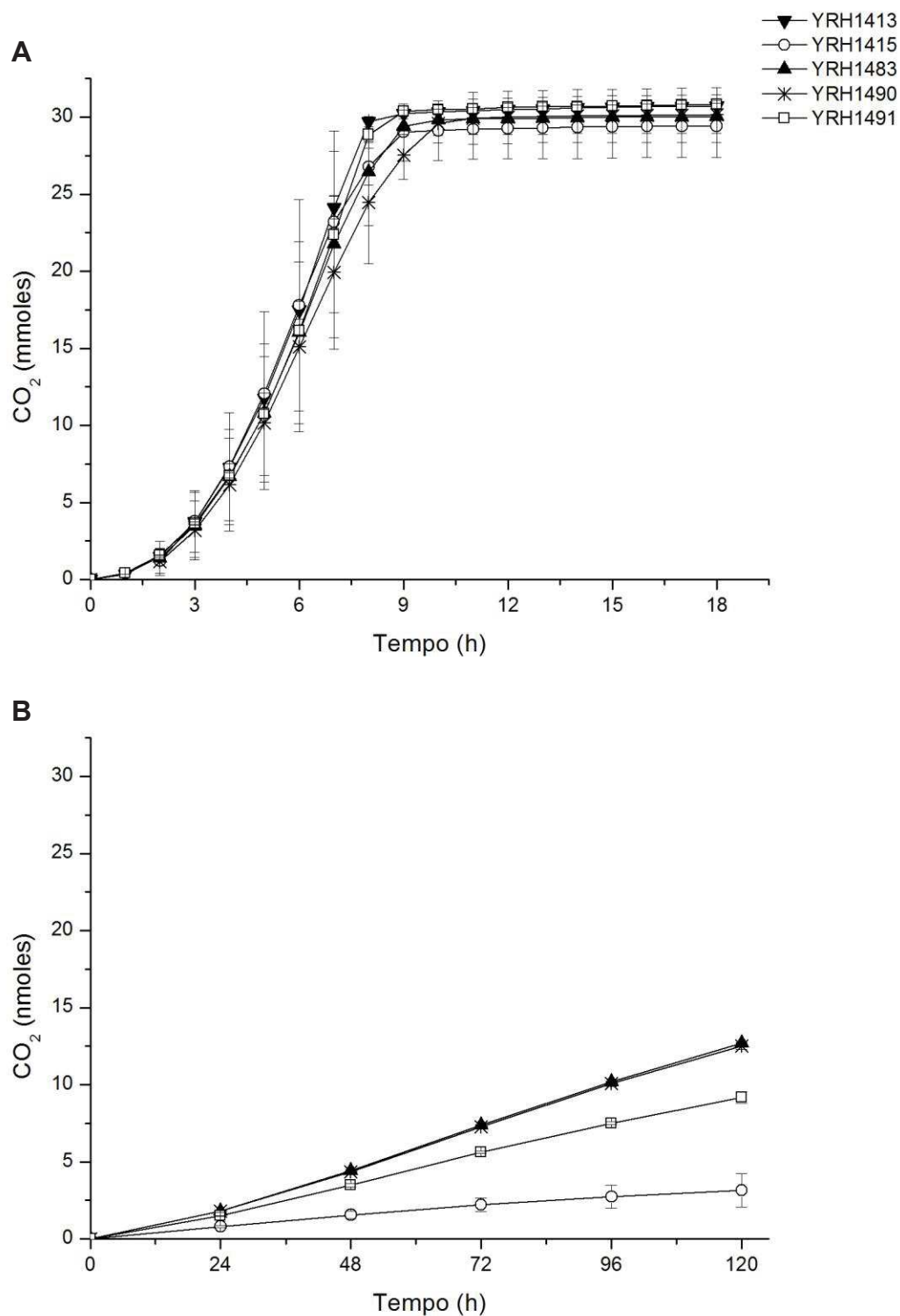


Figura 15. Fermentação anaeróbica das linhagens isogênicas em meio YP + glicose (80 g L^{-1}) (A) e YP + xilose (80 g L^{-1}) (B) por meio da produção de gás medida por Ankom RF. YRH1413 foi usada como controle no experimento em YPD.

Tabela 5. Principais resultados do desempenho de fermentação das linhagens de *S. cerevisiae* construídas neste trabalho e dos controles.

Tratamento	Levedura	¹ Xilose consumida (g L ⁻¹)	¹ Xilose consumida (%)	² Xilitol (g L ⁻¹)	² Glicerol (g L ⁻¹)	² Etanol (g L ⁻¹)	³ Y _{etanol} (g g ⁻¹ sugar)	³ Q _p (g (L h) ⁻¹)	³ Eficiência de conversão (%)	³ Y _{xylitol} (g g ⁻¹ xylose)	² Y _{X/S} (g g ⁻¹)	³ Recuperação do carbono (%)
A	YRH1413	-	-	0.4 ± 0.0	3.1 ± 0.0	41.7 ± 0.6	0.52	5.20	102	-	0.11	106.2 ± 1.4
	YRH1415	-	-	0.3 ± 0.0	2.7 ± 0.5	42.5 ± 0.3	0.52	5.31	103	-	0.09	107.3 ± 0.0
	YRH1483	-	-	0.3 ± 0.1	2.9 ± 0.3	42.7 ± 0.5	0.53	5.34	103	-	0.10	108.3 ± 1.3
	YRH1490	-	-	0.3 ± 0.1	2.9 ± 0.5	42.6 ± 1.0	0.53	5.32	103	-	0.10	107.8 ± 2.5
	YRH1491	-	-	0.3 ± 0.0	3.2 ± 0.0	42.3 ± 0.5	0.53	5.28	104	-	0.11	107.5 ± 1.2
B	YRH1415	19.8 ± 4.9	24	6.9 ± 1.8	0.4 ± 0.0	4.9 ± 1.0	0.25	0.04	48	0.35	0.08	97.4 ± 1.6
	YRH1483	54.0 ± 0.5	66	19.4 ± 0.1	0.8 ± 0.0	14.4 ± 0.1	0.27	0.12	52	0.36	0.08	95.4 ± 0.5
	YRH1490	54.0 ± 1.3	66	20.5 ± 0.3	0.8 ± 0.0	14.3 ± 0.3	0.27	0.12	52	0.38	0.08	96.5 ± 0.5
	YRH1491	40.2 ± 0.6	51	14.7 ± 0.7	0.8 ± 0.0	10.9 ± 0.5	0.26	0.09	51	0.35	0.07	95.8 ± 1.4
C	YRH400	84.8 ± 1.0	97	11.8 ± 0.0	0.2 ± 0.0	23.9 ± 0.2	0.28	0.20	55	0.14	-	76.9 ± 0.5
	YRH1415	81.4 ± 0.9	96	17.7 ± 1.0	0.5 ± 0.1	21.0 ± 1.3	0.26	0.18	51	0.22	0.21	76.5 ± 5.3
	YRH1483	78.6 ± 0.0	99	21.1 ± 0.5	1.2 ± 0.0	23.7 ± 0.3	0.32	0.33	62	0.28	0.22	91.5 ± 0.2
	YRH1490	78.5 ± 0.0	99	20.9 ± 0.3	1.1 ± 0.1	20.5 ± 0.4	0.30	0.28	58	0.30	0.21	90.7 ± 0.3
	YRH1491	74.8 ± 0.0	98	22.1 ± 0.4	1.4 ± 0.1	21.9 ± 0.3	0.31	0.30	61	0.31	0.22	89.5 ± 0.9
D	YRH400	15.2 ± 3.8	57	3.9 ± 0.3	1.3 ± 0.2	20.1 ± 0.3	0.35	0.84	68	0.16	-	90.8 ± 7.7
	YRH1413	12.5 ± 1.0	29	11.9 ± 0.4	1.2 ± 0.1	19.4 ± 0.5	0.44	2.43	85	0.97	0.19	100.8 ± 2.0
	YRH1415	41.6 ± 0.9	95	4.5 ± 0.3	1.5 ± 0.2	28.3 ± 1.1	0.36	0.39	71	0.13	0.15	83.7 ± 5.2
	YRH1483	40.2 ± 0.1	99	7.0 ± 0.5	2.0 ± 0.2	33.2 ± 0.2	0.42	0.69	83	0.18	0.15	96.1 ± 0.9
	YRH1490	40.2 ± 0.0	99	7.2 ± 0.3	2.1 ± 0.0	33.9 ± 0.1	0.43	0.71	85	0.19	0.15	99.0 ± 0.7
	YRH1491	38.0 ± 0.0	100	8.1 ± 0.2	2.0 ± 0.0	32.9 ± 0.2	0.45	0.69	88	0.23	0.17	97.1 ± 0.8
E	YRH1413	7.3 ± 0.0	20	4.2 ± 0.1	1.8 ± 0.1	29.1 ± 0.9	0.49	1.21	96	0.57	0.10	99.6 ± 3.0
	YRH1415	33.2 ± 0.3	88	2.3 ± 0.2	1.9 ± 1.0	37.2 ± 0.5	0.45	0.52	88	0.07	0.12	93.4 ± 2.7
	YRH1483	32.3 ± 0.3	86	3.3 ± 0.4	2.9 ± 0.0	38.0 ± 1.0	0.48	0.53	95	0.10	0.07	97.8 ± 2.8
	YRH1490	31.7 ± 0.5	84	3.3 ± 0.2	2.9 ± 0.0	37.2 ± 0.8	0.48	0.52	94	0.11	0.06	99.9 ± 2.4
	YRH1491	31.7 ± 0.4	84	4.4 ± 0.2	2.6 ± 0.4	36.2 ± 0.8	0.44	0.50	86	0.16	0.07	94.7 ± 2.2

1. Valor obtido ao fim do período de fermentação; 2. Produção máxima; 3. Valor obtido quando a produção de etanol ou xilitol foi máxima.

A. Meio: YP + 80 g L⁻¹ de glicose; Condição: anaeróbia; Tempo de fermentação 8 h.

B. Meio YP + 80 g L⁻¹ de xilose; Condição anaeróbia; Tempo de fermentação 120 h.

C. Meio YP + 80 g L⁻¹ de xilose; Condição micro-aeróbia; Tempo de fermentação 120 h.

D. Meio YP + 40 g L⁻¹ e 40 g L⁻¹ de xilose. Condição micro-aeróbia; Tempo de fermentação 120 h.

E. Meio: SGH; Condição micro-aeróbia; Tempo de fermentação 120 h.

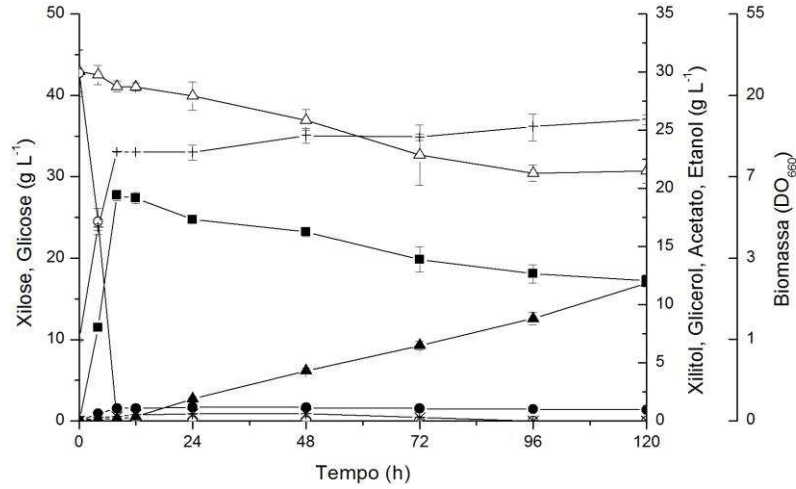
A formação de biomassa das linhagens não foi incluída nos cálculos de recuperação do carbono.

A fermentação da xilose (80 g L^{-1}) e a co-fermentação das misturas de glicose e xilose ($40 + 40 \text{ g L}^{-1}$) ocorreram sob condições de micro-aerofilia (Figura 16). A linhagem industrial YRH400 (Hector et al., 2011), contendo a mesma via de metabolismo da xilose, foi incluída neste trabalho para avaliar a influência do genótipo da PE-2 na fermentação de xilose. Os valores de rendimento obtidos na co-fermentação e na fermentação da xilose como única fonte de carbono mostraram que as linhagens isogênicas construídas no presente estudo foram melhores que YRH400 (Tabela 5). A linhagem selvagem foi capaz de assimilar pequenas quantidades de xilose quando estavam em meio com glicose + xilose. A mesma capacidade não foi observada em YRH1414 (CAT-1) e na parental de YRH400 (Hector et al., 2011). Genes ortólogos que codificam XR e XDH funcionais foram identificados em *S. cerevisiae* (Richard et al., 1999; Traff et al., 2002). No entanto, as leveduras não são capazes de crescer apenas em xilose, o que também foi observado no presente trabalho. A capacidade intrínseca de PE-2 em fermentar a xilose na presença de glicose foi responsável pelo melhor desempenho desta linhagem após a inserção da via da xilose. Com relação ao aumento da ploidia, foi relatado que a estratégia resulta em aumento da produção específica de etanol (Dilorio et al., 1987). Porém, não foram observadas diferenças entre as linhagens isogênicas haploides e diploides, que mostraram cinéticas semelhantes na fermentação da xilose. No entanto, houveram diferenças relevantes quando comparadas à diploide parental. YRH1483, YRH1490 e YRH1491 precisaram de menos tempo para completar a fermentação e produziram, em média, 8 g L^{-1} mais etanol do que YRH1415 no período de 48 h. Os resultados sugerem que ploidia não influencia na fermentação da xilose pelas linhagens isogênicas porque YRH1415 possui genes heterozigotos com característica semidominate para este fenótipo. Isso

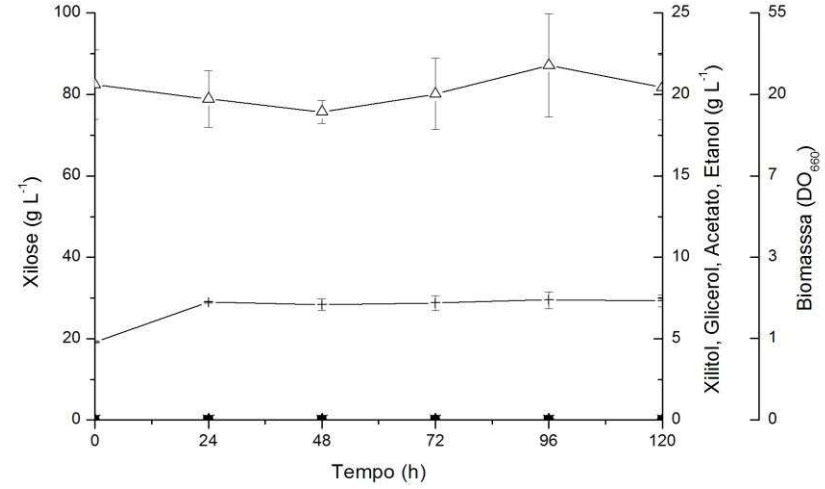
responde a questão levantada durante o crescimento em xilose dos isolados haploides no Bioscreen, onde os alelos que não contribuíram para o metabolismo da xilose foram eliminados do genoma por uma simples distribuição meiótica. Em YPX, também foi observado o consumo mais rápido da xilose pelas linhagens isogênicas, apresentando maiores valores de rendimento e produtividade do etanol que YRH400 e YRH1415. No entanto, a conversão da xilose foi desviada para produção do xilitol, pois a quantidade de etanol obtida não variou significativamente, ao contrário do rendimento do xilitol. Resultados semelhantes foram observados na fermentação da xilose sob condições anaeróbias através do monitoramento de CO₂ (Figura 15B).

Como se trata de um ambiente sem oxigênio, a produção de xilitol foi mais significativa (Tabela 5). Embora tenha sido relatado que a ploidia não influencia na produção do etanol por se tratar de um traço totalmente dominante (Argueso et al., 2009), as linhagens haploides consumiram mais xilose e produziram mais etanol que a diploide isogênica YRH1491. Outros fatores envolvidos na fermentação da xilose sob condições anaeróbias devem ter influenciado esse resultado e, por isso, mais estudos nessas condições devem ser realizados. Além disso, futuras modificações nas linhagens poderão ser realizadas para aumentar a produção do etanol em detrimento da formação do xilitol.

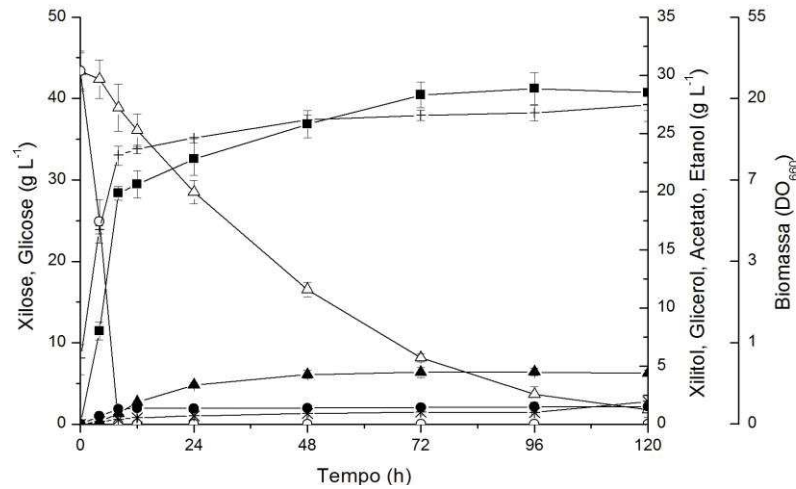
I.A



II.A



I.B



II.B

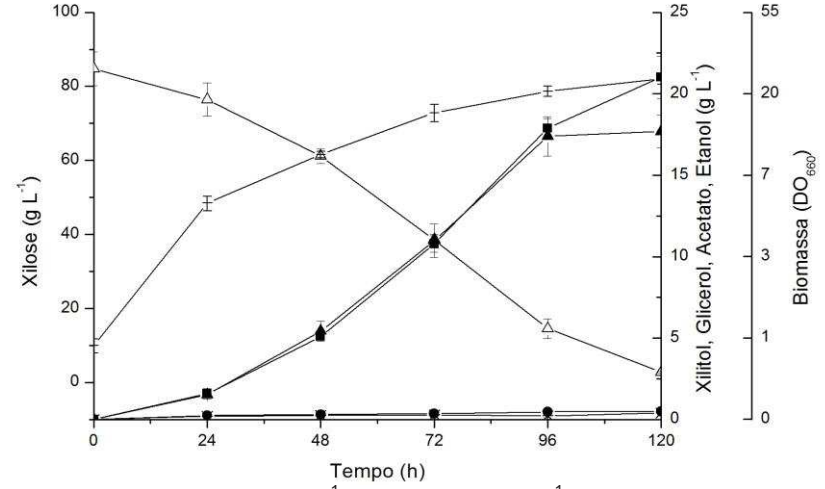


Figura 16. Cinética da fermentação em meio sintético sob condições de micro-aerofilia. I. Meio YP + 40 g L⁻¹ de glicose e 40 g L⁻¹ de xilose; II. Meio YP + 80 g L⁻¹ de xilose; A. YRH1413; B. YRH1415; C. YRH1483; D. YRH1491 e F. YRH400 - Xilose (Δ); Glicose (○); Xilitol (▲); Glicerol (●); Acetato (×); Etanol (■), Biomassa (+). Eixo y da formação de biomassa está em escala logarítmica natural. (Continua)

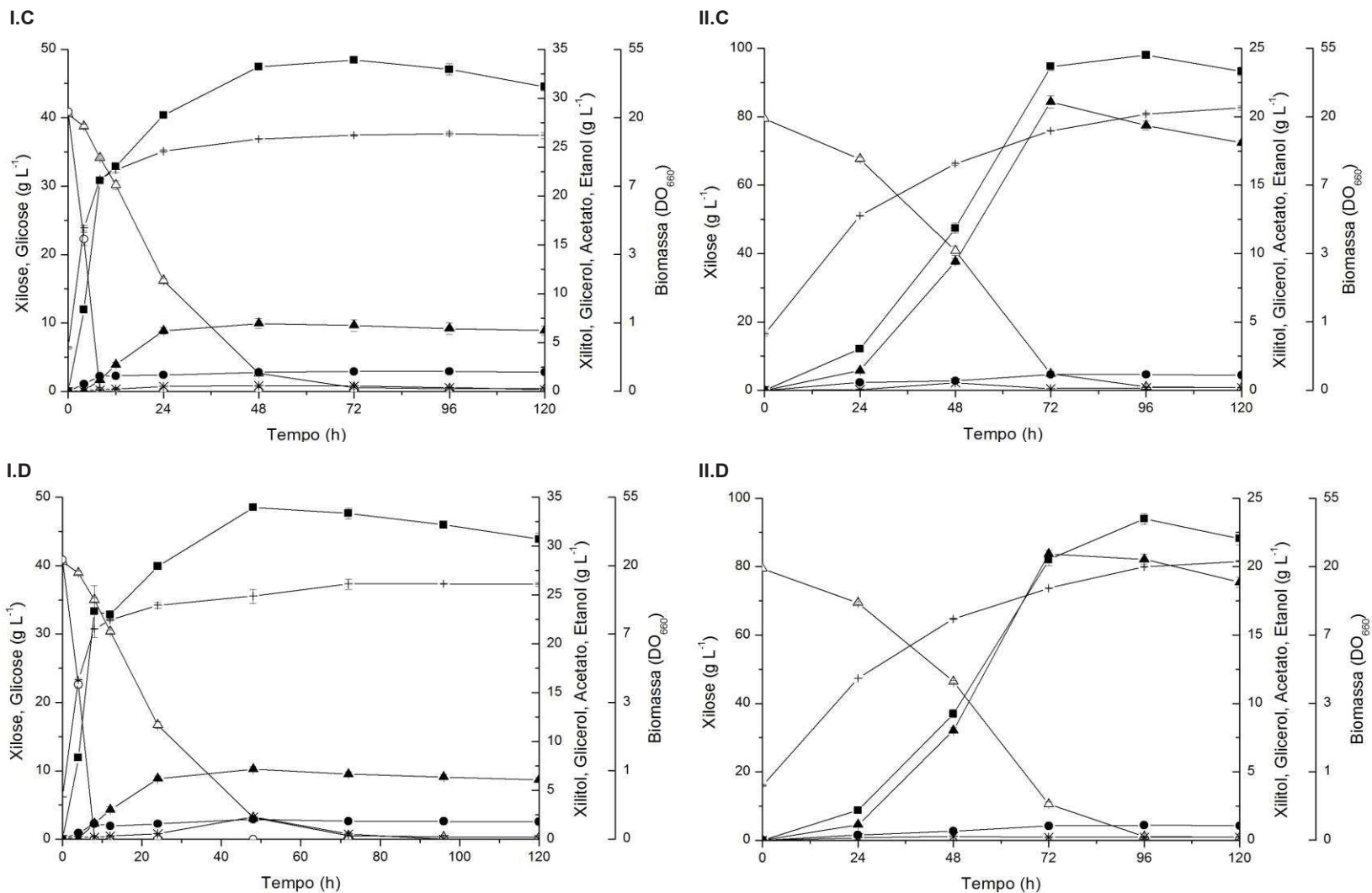


Figura 16. Cinética da fermentação em meio sintético sob condições de micro-aerofilia. I. Meio YP + 40 g L⁻¹ de glicose e 40 g L⁻¹ de xilose; II. Meio YP + 80 g L⁻¹ de xilose; A. YRH1413; B. YRH1415; C. YRH1483; D. YRH1490; E. YRH1491 e F. YRH400 - Xilose (Δ); Glicose (○); Xilitol (▲); Glicerol (●); Acetato (×); Etanol (■), Biomassa (+). Eixo y da formação de biomassa está em escala logarítmica natural. (Continua)

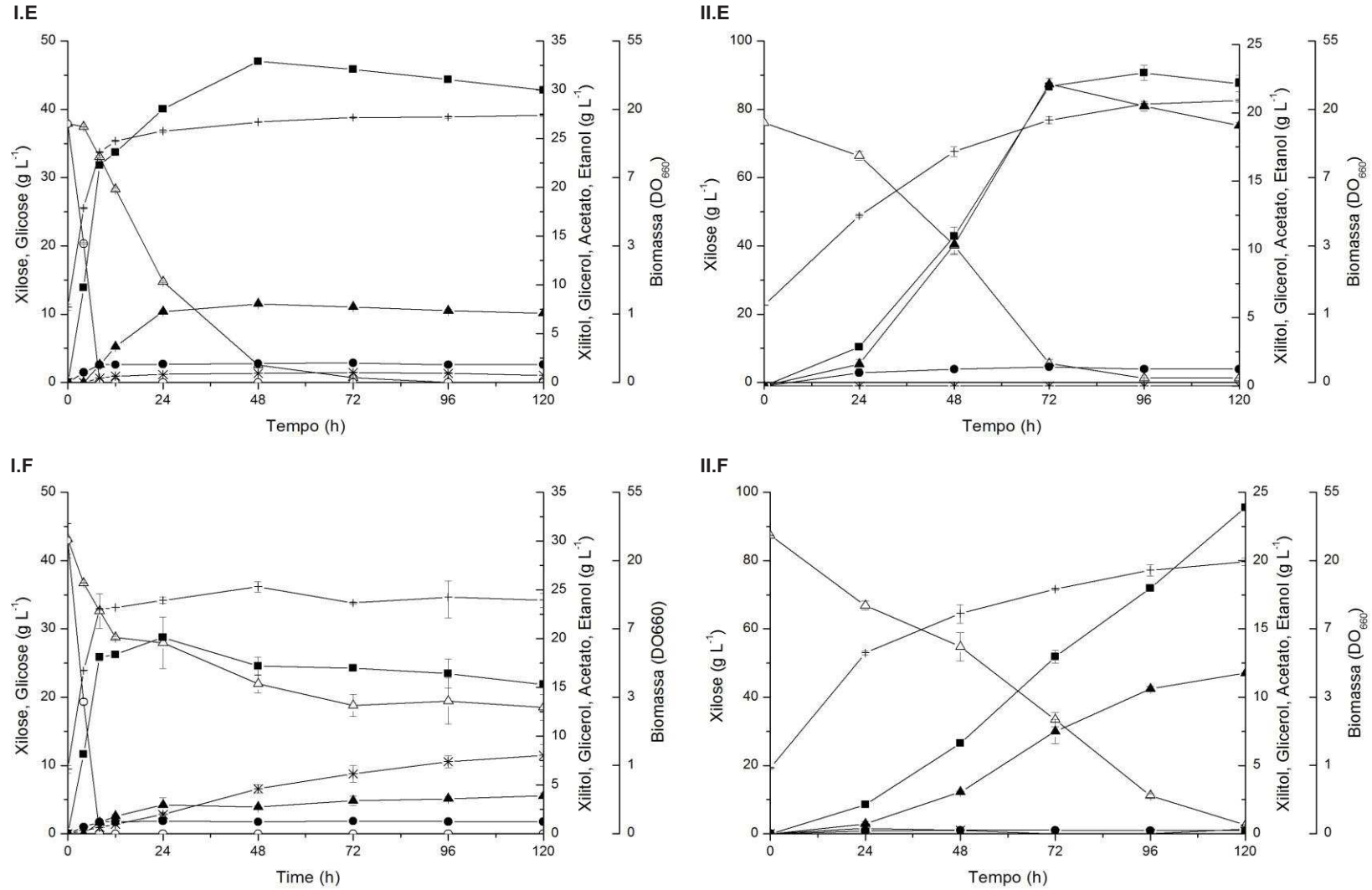


Figura 16. Cinética da fermentação em meio sintético sob condições de micro-aerofilia. I. Meio YP + 40 g L⁻¹ de glicose e 40 g L⁻¹ de xilose; II. Meio YP + 80 g L⁻¹ de xilose; A. YRH1413; B. YRH1415; C. YRH1483; D. YRH1491 e F. YRH400 - Xilose (Δ); Glicose (○); Xilitol (▲); Glicerol (●); Acetato (×); Etanol (■), Biomassa (+). Eixo y da formação de biomassa está em escala logarítmica natural. (Conclusão)

5.2.4 Fermentação do hidrolisado de *Switchgrass* (SGH)

As linhagens foram em seguida avaliadas quanto à sua capacidade para converter a xilose a etanol, na presença de compostos inibidores do hidrolisado. SGH (90%) foi composto por (em g L⁻¹): glicose, 56,8; xilose, 37,7; arabinose, 4,2; ácido acético, 5,2; HMF, 0,5 e furfural, 1,5. Uréia (38 mM) foi adicionada como fonte de nitrogênio. As cinéticas de fermentação sob micro-aerofilia podem ser observadas na Figura 17 (por ser geneticamente idêntica, a não ser pelo *mating-type*, e apresentar mesmo perfil cinético que a linhagem YRH1483, a cinética da linhagem YRH1491 está apresentada no tópico 9.2 dos Apêndices, Figura A1). A selvagem foi usada apenas como controle. A quantidade de xilose consumida e as concentrações de produtos são mostrados na Tabela 5. Embora as linhagens tenham sido capazes de assimilar glicose e xilose e convertê-los em etanol e xilitol, o tempo de consumo destes açúcares foi maior em comparação com meio sintético, o que sugere que o metabolismo redox foi perturbado. Foi necessário mais de 24 h para a glicose ser consumida, e o tempo requerido para o consumo da xilose não foi diferente entre as linhagens isogênicas e a parental. A arabinose não foi consumida. Foi observado que a conversão dos açúcares a etanol foi mais afetada nas primeiras 12 h de fermentação, principalmente para as linhagens haploides, que apresentaram maior fase lag e menor taxa de crescimento específico que as estirpes diploides, incluindo a selvagem YRH1413 (Figura 18; Tabela 6). Fase lag prolongada é consequência da redução dos co-factores redox usados em numerosas reações intracelulares, mas que também são necessários para a desintoxicação de HMF e furfural. Estudos mostraram que a glicose não é consumida até que níveis adequados de furfural e/ou HMF sejam reduzidos (Liu et al. 2004; Wahlbom e Hahn-

Hägerdal 2002), e a linhagem PE-2 foi capaz de reduzir HMF e furfural do hidrolisado (Pereira et al. 2014). A superexpressão de vários genes de oxidoredutases relacionadas com a desintoxicação do HMF e furfural mostraram diminuir a fase lag do crescimento celular e/ou aumentar a degradação do HMF e furfural em comparação com as linhagens controle (Gorsich et al., 2006; Liu et al., 2008; Petersson et al., 2006). Assim, a presença de dois alelos dos genes nas diploides poderia ter favorecido um tempo lag mais curto em comparação às linhagens haploides. Um ensaio adicional onde as curvas de crescimento foram avaliadas através do aumento da concentração de inibidores no Bioscreen mostrou que a ploidia influenciou na tolerância do furfural quando a concentração foi superior a 20 mM (ver Figura A2 na seção Anexos) (J. Mertens, USDA-ARS, NCAUR, Peoria, IL, USA). Na presença de HMF não foi observada diferença. Embora a influência de ploidia só possa ser observada em uma concentração de furfural 4 vezes maior do que estava presente no SGH, foi relatado que o efeito sinérgico de furfural e HMF prolonga a fase lag ou a inibição do crescimento (da Cunha-Pereira et al., 2011; Liu et al., 2004). O consumo de xilose pelas linhagens diploides foi pouco superior (principalmente para a linhagem YRH1415), além de todas as linhagens com a via do metabolismo da xilose produzirem a mesma quantidade de etanol, porém mais do que a selvagem YRH1413. Também foi observado que as diploides produziram mais biomassa do que as linhagens haploides. Foi relatado que o traço para acúmulo de biomassa na linhagem PE-2 é semidominante (Argueso et al., 2009). O mesmo comportamento ocorreu na fermentação em meio sintético, só que de forma menos expressiva. YRH1415 produziu mais biomassa, porém menos xilitol que as demais linhagens.

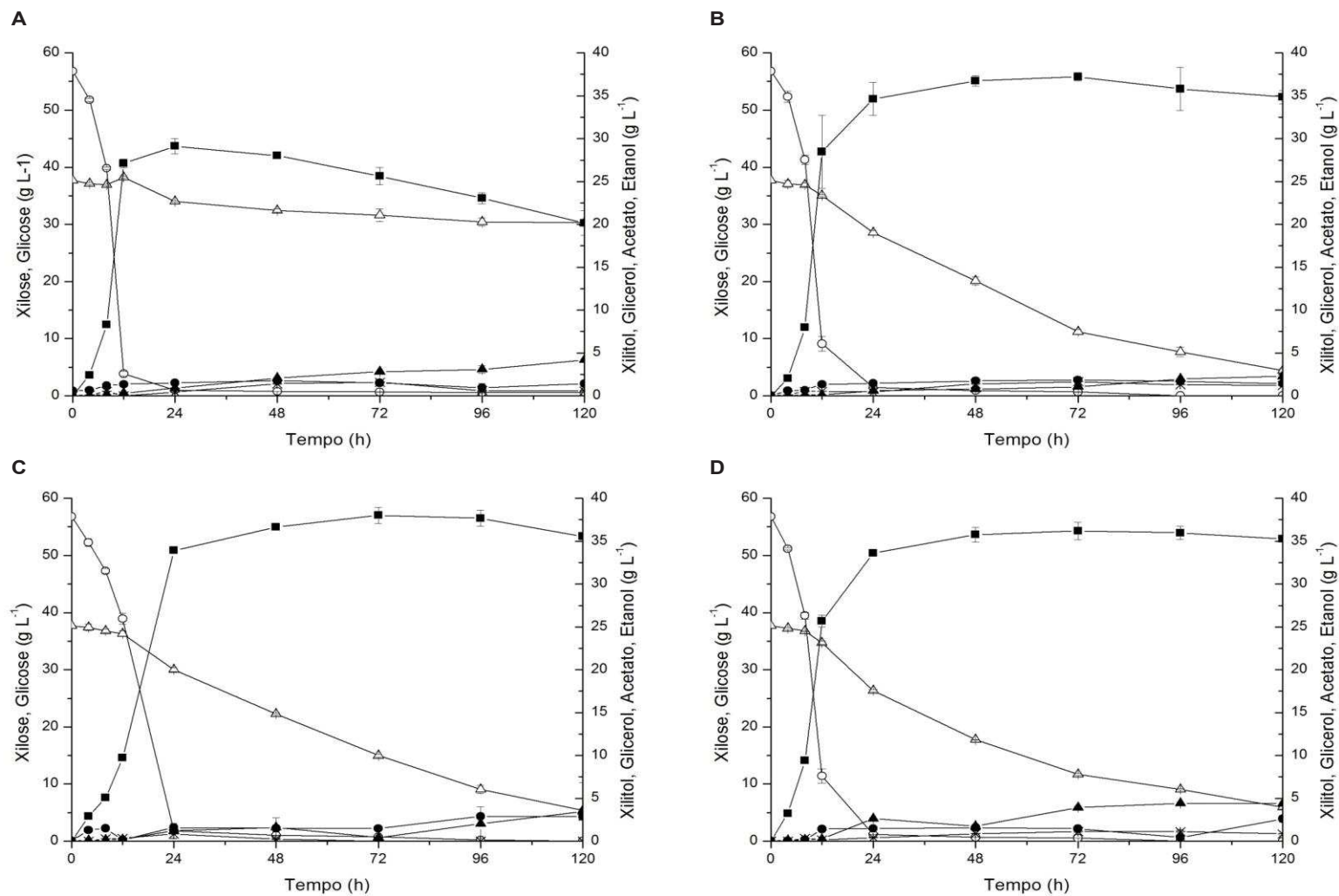


Figura 17. Cinética da fermentação das linhagens isogênicas em comparação com a selvagem em SGH sob condições de micro-aerofilia. A. YRH1413; B. YRH1415; C. YRH1483; D. YRH1491. Xilose (Δ); Glicose (○); Xilitol (▲); Glicerol (●); Acetato (×); Etanol (■). SGH (90%) foi composto por (em g L⁻¹): glicose, 56,8; xilose, 37,7; arabinose, 4,2; ácido acético, 5,2; HMF, 0,5 e furfural, 1,5. Uréia (38 mM) foi adicionada como fonte de nitrogênio.

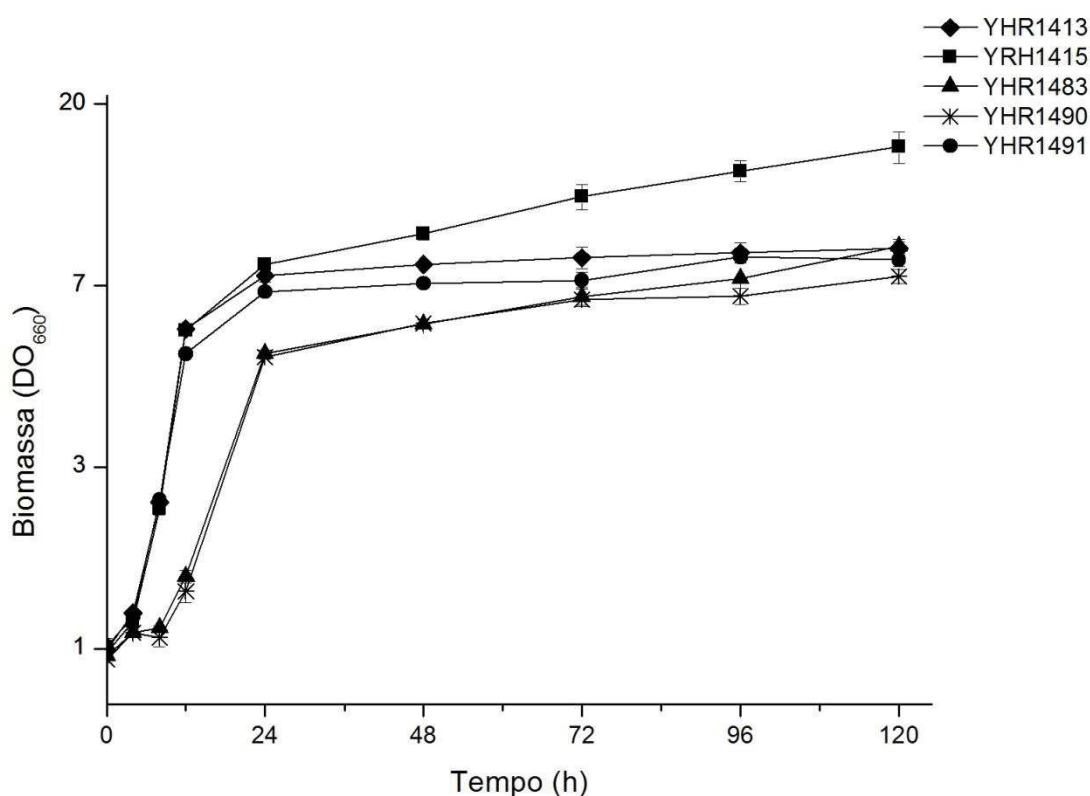


Figura 18. Formação de biomassa (DO_{660}) em SGH sob condições de micro-aerofilia das linhagens isogênicas em comparação com a selvagem YRH1413 e a parental YRH1415. O eixo y está em escala logarítmica natural.

Os resultados neste estudo sugerem que, apesar da diferença no tempo de adaptação entre as linhagens haploides e diploides no SGH, as linhagens isogênicas podem ser cultivadas em hidrolisado contendo uma elevada concentração de compostos inibidores. De acordo com Selmecki et al. (2015), tetraploides são significativamente mais rápidas na adaptação. Pode-se propor que as linhagens diploides YRH1529 e YRH1530 homocigotas para o *MAT* (*a/a* e *alfa/alfa*) construídas neste trabalho podem ser usadas para gerar uma linhagem tetraploide que seria capaz de se adaptar mais rapidamente ao SGH ou qualquer outro tipo de hidrolisado. Além disso, modificações genéticas a fim de resolver o desequilíbrio redox podem ser facilmente realizadas e avaliadas nas linhagens haploides.

Tabela 6. Tempo da fase lag e taxa de crescimento específico das linhagens crescendo em SGH.

Linhagem	Tempo lag (h)	μ (h ⁻¹)
YRH1413	3,27	0,20
YRH1415	3,46	0,20
YRH1483	6,83	0,10
YRH1490	7,99	0,10
YRH1491	3,24	0,18

5.3 Expressão fenotípica dos transportadores exógenos em *S. cerevisiae* geneticamente modificada

As linhagens de *S. cerevisiae* contendo a via de metabolismo da xilose construídas neste estudo e mutantes os transportadores de hexoses Hxt1-7, foram usadas para expressar os possíveis transportadores de xilose provenientes das linhagens selvagens YRH1405 e YRH1406 que naturalmente fermentam pentoses. Os plasmídeos foram transformados nas leveduras e os transportadores foram testados através da análise do crescimento em xilose ou pela determinação da atividade de transporte da xilose nas linhagens com o gene *xynB*.

5.3.1 Análise de crescimento no Bioscreen

Os plasmídeos pRH755-758 (ver Tabela 2) contendo os *contigs* 126, 226, 226.1 e 3 foram primeiramente inseridos nas linhagens industriais YRH1415 (PE-2) e YRH400 e a expressão verificada em YPD (20 g L⁻¹) e em YPX nas concentrações em g L⁻¹ de 20, 5 e 0,5, sempre em duplicata e na presença de ClonNat (100 µg/mL), com exceção das linhagens parentais. A Figura 19 mostra as curvas de crescimento obtidas das linhagens YRH1426-33 contendo transportadores (ver

Tabela 1). O crescimento em YPD foi semelhante entre as linhagens, o que mostra que o consumo da glicose não melhorou e nem foi afetado pela inserção dos plasmídeos. Em YPX, embora as linhagens com os diferentes genótipos apresentassem resultados distintos, em todas as concentrações testadas as curvas de crescimento no Bioscreen não foram afetadas pelos transportadores inseridos quando comparadas com a das linhagens parentais. Os mesmos transportadores, incluindo os contidos nos plasmídeos pRH780-81/84-85, também foram testados na linhagem haploide YRH1483, já que esta mostrou-se superior à linhagem YRH1415. O fato da linhagem YRH1483 metabolizar a xilose mais rapidamente poderia responder se o melhor consumo da xilose teria sido limitado anteriormente pela ausência dos transportadores exógenos. Um teste inicial no Bioscreen foi realizado com as oito linhagens YRH1531-38, e outro teste, com as linhagens que foram superiores no teste anterior, foi repetido em duplicata (Figura 20). As curvas de crescimentos apresentadas mostraram que não existiu superioridade das linhagens contendo os plasmídeos em relação a parental. Embora não seja possível afirmar, a não observação de mais rápido crescimento entre as linhagens contendo os transportadores pode ter sido causada por fatores (ou transportadores) pré-existentes nessas linhagens.

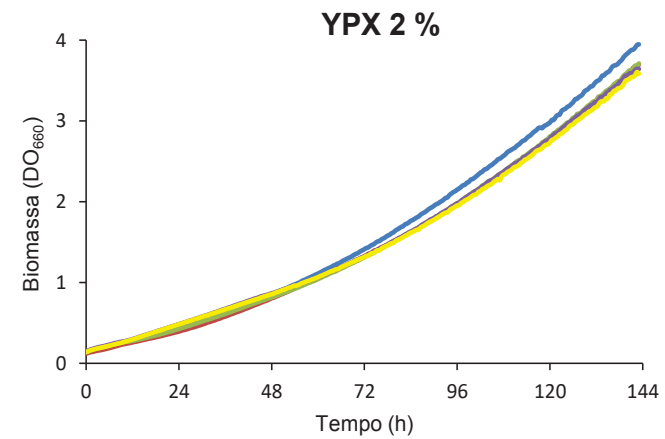
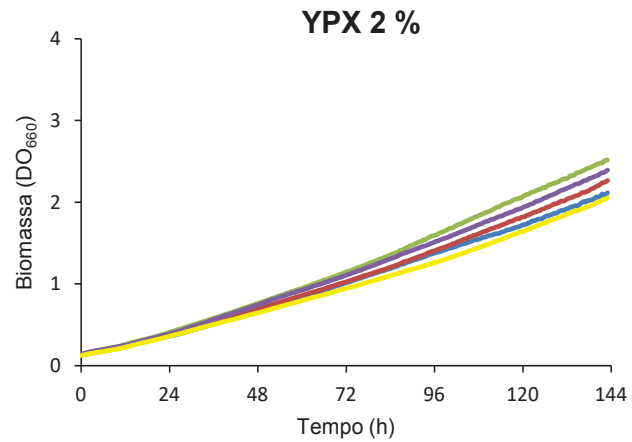
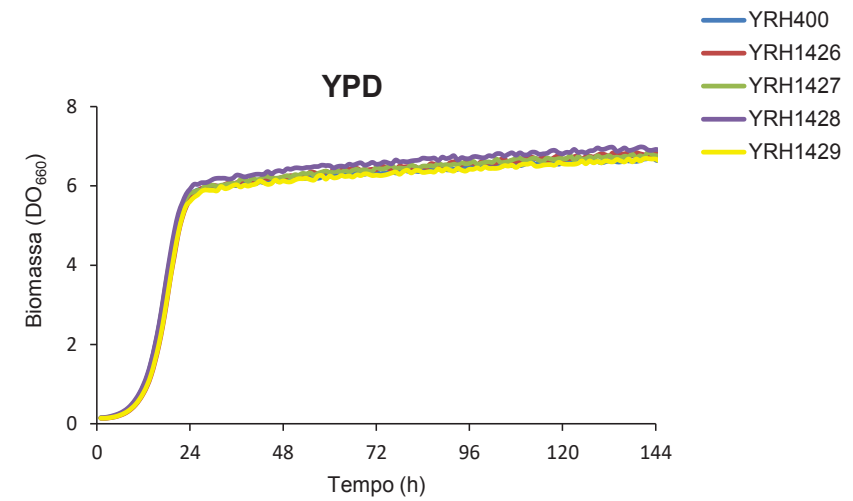
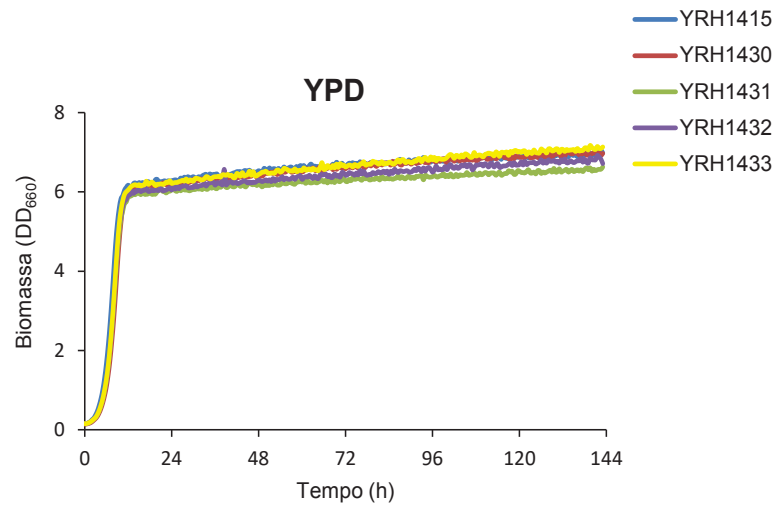


Figura 19. Curvas de crescimento no Bioscreen das linhagens YRH400 e YRH1415 com os plasmídeos contendo os possíveis transportadores de xilose. Os dados apresentados representam os valores médios do experimento em duplicata. (Continua)

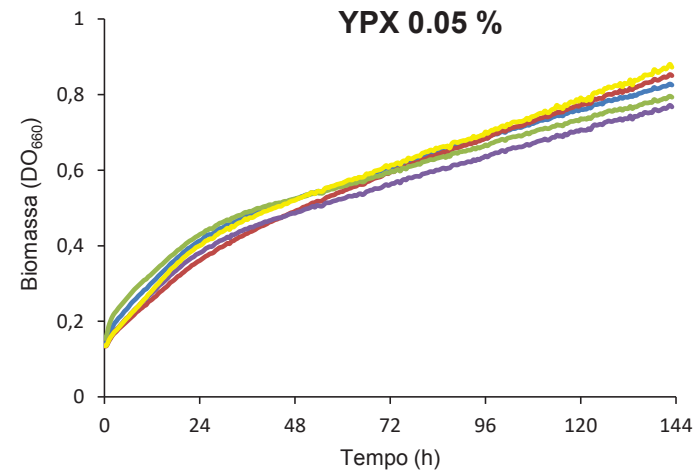
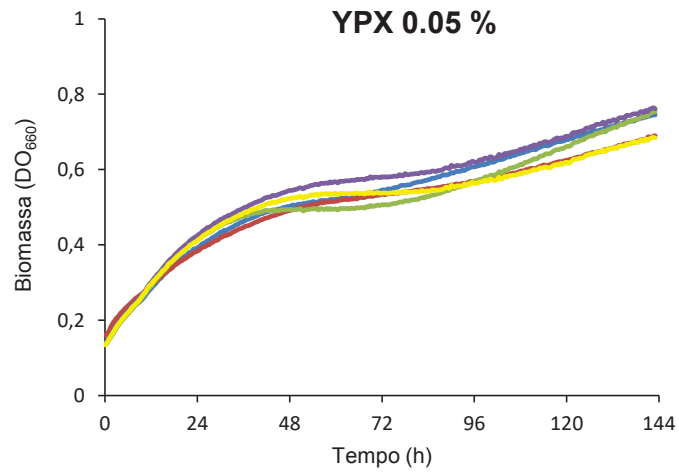
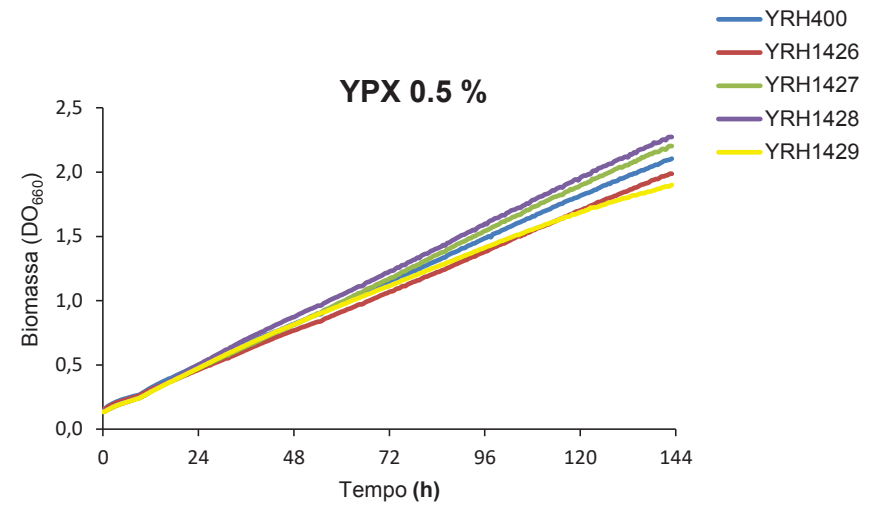
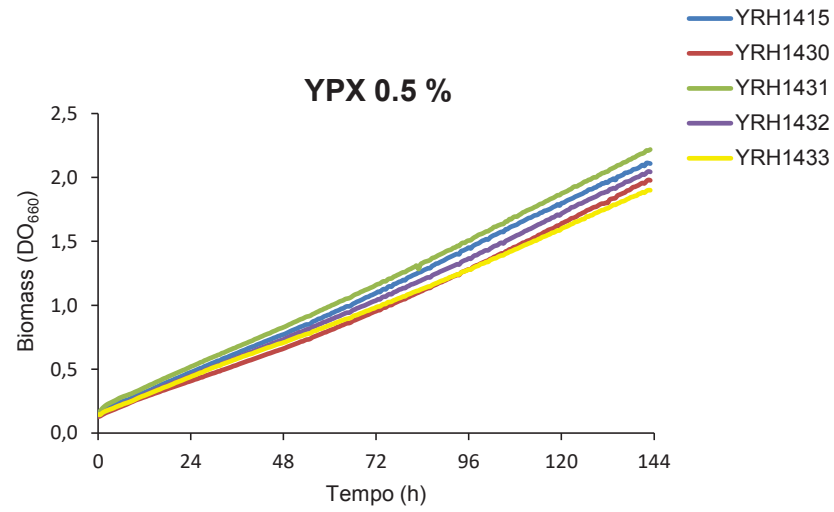


Figura 19. Curvas de crescimento no Bioscreen das linhagens YRH400 e YRH1415 com os plasmídeos contendo os possíveis transportadores de xilose. Os dados apresentados representam os valores médios do experimento em duplicata. (Conclusão)

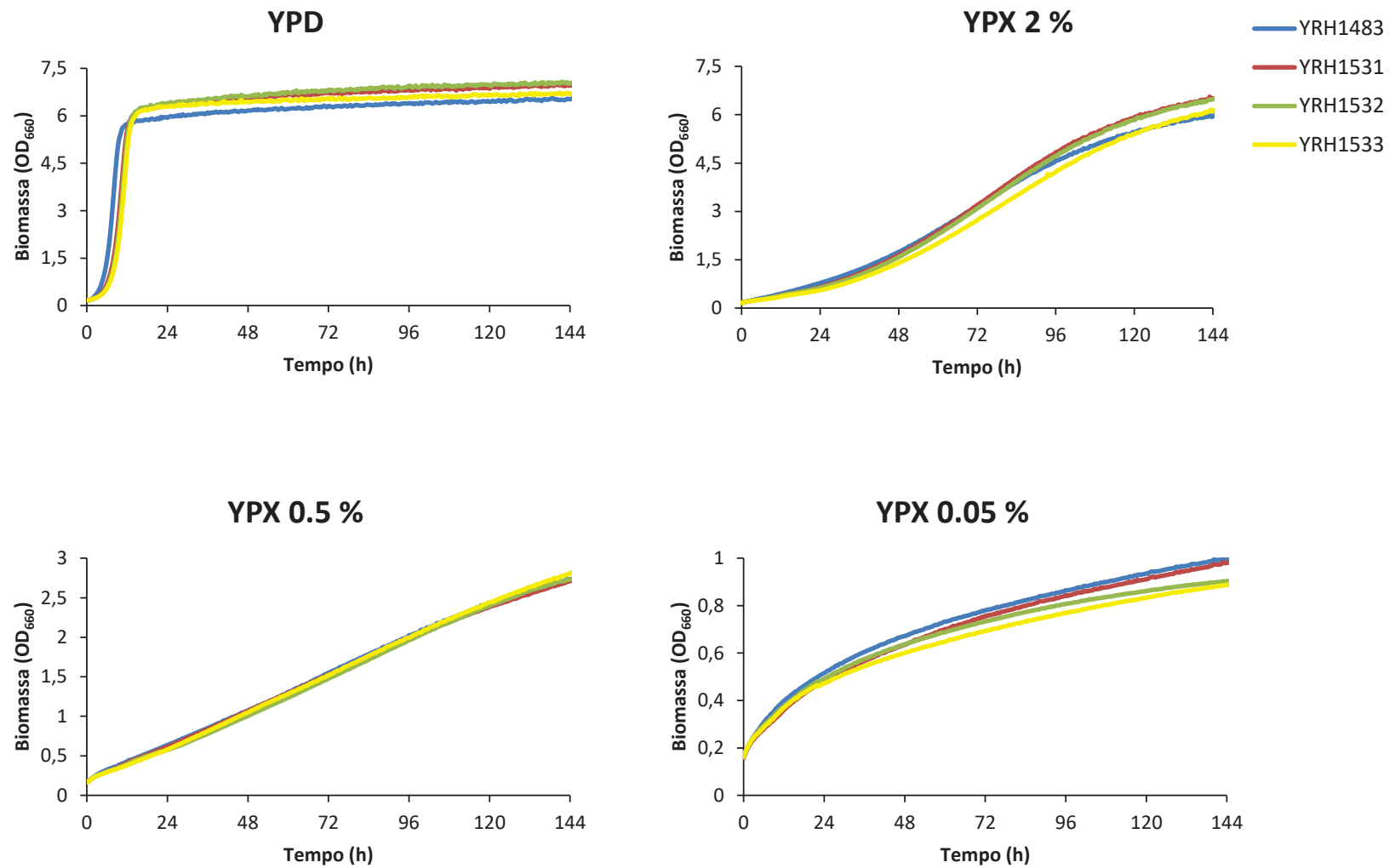


Figura 20. Curvas de crescimento no Bioscreen da linhagem YRH1483 com os plasmídeos contendo os possíveis transportadores de xilose. Os dados apresentados representam os valores médios do experimento em duplicata.

A seguir, os plasmídeos com os transportadores foram transformados na linhagem YRH1442, uma CEN.PK2-1C mutante para os transportadores de hexoses Hxt1-7, mas que possuindo a via metabólica da xilose XR/XDH. O objetivo foi verificar a expressão dos transportadores sem a influência de transportadores que foram deletados, uma vez que foi relatado que esses transportadores presentes na *S. cerevisiae* também transportam xilose, mas de uma maneira menos eficiente que a glicose (Hamacher et al., 2002; Jeffries, 2006; Sedlak e Ho, 2004). O facilitador glicose/xilose Gxf1 de *Candida intermedia* PYCC 4715 (Leandro et al., 2006) também foi transformado na linhagem e usado como transportador controle. Os testes em Bioscreen foram realizados em YP nas mesmas condições citadas nos experimentos anteriores. Todas as linhagens cresceram bem em glicose, o que mostra que os plasmídeos estavam sendo expressos. No entanto, nenhuma linhagem, incluindo o controle, foi capaz de crescer em xilose, mesmo após a inclusão de maltose para dar início ao crescimento (dados não mostrados). Assim, como ocorreu com a linhagem CAT-1 (YRH1414), a *S. cerevisiae* com genótipo CEN.PK pode não ser eficiente em fermentar a xilose, mesmo possuindo os genes da via do metabolismo.

5.3.2 Ensaios de atividade de transporte em *S. cerevisiae*

Para determinar a atividade de transporte do pNP β X em *S. cerevisiae*, os plasmídeos foram transformados nas linhagens YRH1388 e YRH1400, ambas CEN.PK contendo o gene *xynB*, com a diferença que a segunda é mutante para Hxt1-7. Os ensaios foram realizados conforme descrito por Wang et al. (2013) e linhagens parentais e com plasmídeos contendo o gene Gxf1 (YRH1396 e YRH1401) foram os controles. As linhagens YRH1434-37 com genótipo YRH1388

foram colhidas por centrifugação durante metade da fase exponencial de crescimento em YPD, enquanto as linhagens YRH1438-41 e YRH1525-28 em YPM. As células foram ressuspensas em tampão-fosfato pH6 para concentração final da reação de 0,2-0,5 mg/mL (peso seco) e o substrato *pNPβX* dissolvido no mesmo tampão para concentração final da reação de 25 mM. O teste era finalizado após 30 min com a adição do tampão de parada (pH 10). Os resultados desse experimento foram inconclusivos para todas as linhagens, incluindo os controles (dados não mostrados). O experimento foi realizado em triplicata e em cada ensaio eram obtidos resultados diferentes. O motivo por não ter alcançado o resultado esperado é desconhecido, mas o fato das linhagens possuírem o genótipo CEN.PK pode ter contribuído para isso.

6. CONCLUSÃO

Este trabalho objetivou estudar a funcionalidade de genes envolvidos no transporte da xilose em espécies novas do gênero *Spathaspora*. Ensaios de cinética e de atividade de transporte resultaram na seleção de duas linhagens da espécie *S. xylofermentans*, que neste estudo foram renomeadas para YRH1405 e YRH1406. Como se tratam de espécies novas, os possíveis genes transportadores de xilose não se encontram disponíveis no banco de dados do GenBank. Dessa forma, os genomas dessas linhagens foram sequenciados e a procura de genes foi realizada com a ferramenta Blastn usando como referência diversos genes de transportadores de xilose já descritos. ORFs presentes nos *contigs* obtidos do sequenciamento foram identificados, dos quais sete possíveis genes de transportadores foram selecionados, clonados e transformados em diferentes linhagens de *S. cerevisiae* para serem analisados.

Um dos objetivos específicos deste estudo foi criar linhagens de *S. cerevisiae* eficientes no metabolismo da xilose para que fosse possível testar os transportadores identificados. As linhagens industriais brasileiras para produção de etanol PE-2 e CAT-1 (YRH1413 e YRH1414, respectivamente) foram escolhidas devido às qualidades intrínsecas das linhagens, já conhecidas no ambiente industrial, além da baixa quantidade de trabalhos na área usando linhagens industriais. Ambas foram geneticamente modificadas para metabolizar xilose, o que resultou em uma eficiente fermentadora de xilose com a linhagem PE-2 (YRH1415). Posteriores modificações foram realizadas com o objetivo de melhorar a eficiência e conhecer um pouco mais sobre a melhor habilidade da linhagem. Boa produtividade de etanol em meio sintético foi atingida e as linhagens foram capazes de co-

fermentar glicose e xilose na presença de altas concentrações de inibidores do hidrolisado.

Os transportadores identificados neste estudo foram inseridos nas linhagens industriais mas não foi possível confirmar diferenças no crescimento em xilose. Os transportadores pré-existentes nas linhagens testadas podem ter influenciado neste resultado. Dessa forma, foi necessário realizar estudos mais específicos sobre a eficiência dos transportadores em linhagens de laboratório mutantes para transportadores de hexoses. Porém, os resultados foram inconclusivos, possivelmente porque as linhagens de laboratório não são eficientes no metabolismo da xilose.

Este trabalho foi um estudo inicial dos fatores envolvidos no metabolismo da xilose e todo o conhecimento obtido, linhagens e plasmídeos contruídos poderão se tornar base para que futuros trabalhos sejam realizados com o objetivo de se obter uma linhagem eficiente para produção de etanol de segunda geração. Mais pesquisas que envolvam identificação, caracterização e modificações genéticas em enzimas relacionadas no metabolismo da xilose utilizando linhagens industriais de *S. cerevisiae* como modelo de estudo devem ser realizadas, pois pouco se sabe sobre o quanto o genótipo dessas linhagens recombinantes poderiam afetar no metabolismo da xilose.

7. PERSPECTIVAS

Este trabalho apresentou a possibilidade de produção de etanol 2G com o emprego de linhagens industriais geneticamente modificadas para o metabolismo da xilose. Os resultados mostraram que as linhagens isogênicas (haploides e diploide), além da parental YRH1415 construídas neste estudo, podem ser cultivadas em hidrolisado contendo uma elevada concentração de compostos tóxicos. Por isso, futuras modificações genéticas a fim de resolver o desequilíbrio redox e outros problemas que prejudicam a fermentação poderão ser facilmente realizadas e avaliadas nas linhagens haploides. Além disso, a introdução de genes da via da xilose isomerase (XI) de bactérias poderá ser mais bem explorada nessas linhagens.

Para melhorar o aproveitamento do hidrolisado, propõem-se também que as linhagens diploides YRH1529 e YRH1530 homozigotas para o *MAT* (*a/a* e *alfa/alfa*) construídas neste trabalho, ou outras provenientes dos cruzamentos entre as dezenas de linhagens haploides obtidas, sejam usadas para gerar linhagens tetraploides. Maior produção do etanol em decréscimo da formação do xilitol sob anaerobiose poderá ser otimizado nessas linhagens por evolução adaptiva.

A *S. cerevisiae* com genótipo CEN.PK não foi eficiente em fermentar a xilose, mesmo possuindo os genes da via do metabolismo. Dessa forma, a linhagem haploide YRH1485 proveniente da esporulação de YRH1415 foi usada para deletar os transportadores de hexoses Hxt3,6/7, Hxt5,1,4 e Hxt2. Devido a deficiência de YRH1483 no crescimento em maltose, YRH1485 foi selecionada após uma triagem das linhagens haploides crescendo em YPM. A linhagem com os Hxt1-7 removidos foi obtida recentemente, e uma avaliação em diferentes concentrações de xilose em comparação com a linhagem parental será realizada no Bioscreen.

Os 7 genes de transportadores identificados nas leveduras selvagens fermentadoras de pentoses YRH1405 e YRH1406 e inseridos nos vetores de expressão serão testados na linhagem haploide YRH1485 com os transportadores Hxt1-7 removidos. O gene *xynB* da beta-xilosidase também será inserido na linhagem para determinar a atividade de transporte dos mesmos usando o substrato $pNP\beta X$. Mais transportadores que foram identificados nos *contigs*, mas que não foram selecionados neste estudo poderão ser avaliados em futuros trabalhos.

8. REFERÊNCIAS

- AKAO, T.; YASHIRO, I.; HOSOYAMA, A.; KITAGAKI, H.; HORIKAWA, H.; WATANABE, D.; AKADA, R.; ANDO, Y.; HARASHIMA, S.; INOUE, T.; INOUE, Y.; KAJIWARA, S.; KITAMOTO, K.; KITAMOTO, N.; KOBAYASHI, O.; KUHARA, S.; MASUBUCHI, T.; MIZOGUCHI, H.; NAKAO, Y.; NAKAZATO, A.; NAMISE, M.; OBA, T.; OGATA, T.; OHTA, A.; SATO, M.; SHIBASAKI, S.; TAKATSUME, Y.; TANIMOTO, S.; TSUBOI, H.; NISHIMURA, A.; YODA, K.; ISHIKAWA, T.; IWASHITA, K.; FUJITA, N.; SHIMOI, H. Whole-genome sequencing of sake yeast *Saccharomyces cerevisiae* Kyokai no. 7. **DNA Res.**, v., n.6, p.423-434, 2011.
- AMBERG, B. C.; BURKE, D. J.; STRATHERN, J. N. **Methods in yeast genetics: a Cold Spring Harbor laboratory course manual**. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2005.
- ARGUESO, J. L.; CARAZZOLE, M. F.; PIORT, A.; MIECZKOWSKI, P. A.; DUARTE, F. M.; NETTO, O. V. C.; MISSAWA, S. K.; GALZERANI, F.; COSTA, G. G. L.; VIDAL, R. O.; NORONHA, M. F.; DOMINSKA, M.; ANDRIETTA, M. G. S.; ANDRIETTA, S. R.; CUNHA, A. F.; GOMES, L. H.; TAVARES, F. C. A.; ALCARDE, A. R.; DIETRICH, F. S.; McCUSKER, J. H.; PETES, T. D.; PEREIRA, G. A. G. Genome structure of a *Saccharomyces cerevisiae* strain widely used in bioethanol production. **Genome Research.**, v.19, p.2258-2270, 2009.
- BABRZADEH, F.; JALILI, R.; WANG, C.; SHOKRALLA, S.; PIERCE, S.; ROBINSON-MOSHER, A.; NYREN, P.; SHAFER, R. W.; BASSO, L. C.; de AMORIM, H. V.; de OLIVEIRA, A. J.; DAVIS, R. W.; RONAGHI, M.; GHARIZADEH, B.; STAMBUK, B. U. Whole-genome sequencing of the efficient industrial fuel-ethanol fermentative *saccharomyces cerevisiae* strain CAT-1. **Mol. Genet. Genomics**, v.287, n.6, p.485-494, 2012.
- BALAT, M. Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review. **Energy Conversion and Management**, v.52. n.2. p.858-875, 2011.
- BANTA, S.; SWANSON, B. A.; WU, S.; JARNAGIN, A.; ANDERSON, S. Alteration of the specificity of the cofactor-binding pocket of *Corynebacterium* 2,5-diketo-D-gluconic acid reductase A. **Protein engineering**, v.15, p.131-140, 2002.
- BISSON, L. F.; COONS, D. M.; KRUCKEBERG, A. L.; LEWIS, D. A. Yeast sugar transporters. **Crit Rev Biochem Mol Biol.**, v.28, p.259-308, 1993.
- BORNEMAN, A. R.; DESANY, B. A.; RICHES, D.; AFFOURTIT, J. P.; FORGAN, A. H.; PRETORIUS, I. S.; EGHOLM, M.; CHAMBERS, P. J. Whole-genome comparison reveals novel genetic elements that characterize the genome of industrial strains of *Saccharomyces cerevisiae*. **PLoS Genet.**, v.7, n.2, p.e1001287, 2011.

- BÖSCH, P.; WALLBERG, O.; JOELSSON, E.; GALBE, M.; ZACCHI, G. Impact of dual temperature profile in dilute acid hydrolysis of spruce for ethanol production. **Biotechnol. Biofuels**, v.3, p.1-12, 2010.
- BRAT, D.; BOLES, E.; WIEDEMANN, B. Functional expression of a bacterial xylose isomerase in *Saccharomyces cerevisiae*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.75, p.2304-2311, 2009.
- CADETE, R. M.; MELO, M. A.; ZILLI, J. E.; VITAL, M. J. S.; MOURO, A.; PROMPT, A. H.; GOMES, F. C. O.; STAMBUK, B. U.; LACHANCE, M. A.; ROSA, C. A. *Spathaspora brasiliensis* sp. nov., *Spathaspora suhii* sp. nov., *Spathaspora roraimanensis* sp. nov. and *Spathaspora xylofermentans* sp. nov., four novel d-xylose-fermenting yeast species from Brazilian Amazonian forest. **Antonie van Leeuwenhoek Int. J. Gen. Mol. Microbiol.**, v.103, p.421-431, 2012.
- CADETE, R. M.; SANTOS, R. O.; MELO, M. A.; MOURO, A.; GONÇALVES, D. L.; STAMBUK, B. U.; GOMES, F. C.; LACHANCE, M. A.; ROSA, C. A. *Spathaspora arborariae* sp. nov., a d-xylose-fermenting yeast species isolated from rotting wood in Brazil. **FEMS Yeast Res.**, v.9, n.8, p.1338-42, 2009.
- CHEN, T.; ZHANG, J.; LIANG, L.; YANG, R.; LIN, Z. An in vivo, label-free quick assay for xylose transport in *Escherichia coli*. **Analytical Biochemistry**, v.390, n.1, p.63-67, 2009.
- COLABARDINI, A. C.; NICOLAS, L.; RIES, A.; BROWN, N. A.; DOS REIS, T. F.; SAVOLDI, M.; GOLDMAN, M. H. S.; MENINO, J. F.; RODRIGUES, F.; GOLDMAN, G. H. Functional characterization of a xylose transporter in *Aspergillus nidulans*. **Biotechnol. Biofuels**, v.7, p.1-19, 2014.
- Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB). **Acompanhamento da Safra Brasileira: Cana-de-açúcar**, v.2, n.2, Agosto/2015.
- Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB). **Acompanhamento da Safra Brasileira: Grãos**, v.2, n.4, Janeiro/2015.
- CHRISTIANSON, T. W.; SIKORSKI, R. S.; DANTE, M.; SHERO, J. H.; HIETER, P. Multifunctional yeast high-copy-number shuttle vectors. **Gene**, v.110, p.119-122, 1992.
- da CUNHA-PEREIRA, F., HICKERT, L. R., SEHNEM, N. T., de SOUZA-CRUZ, P. B., ROSA, C. A., AYUB, M. A. Conversion of sugars present in rice hull hydrolysates into ethanol by *Spathaspora arborariae*, *Saccharomyces cerevisiae*, and their co-fermentations. **Bioresour. Technol.**, v.102, n.5, p.4218-25, 2011.
- da SILVA-FILHO, E. A.; SANTOS, S. K. B.; RESENDE, A. M.; de MORAIS, J. O. F.; de MORAIS Jr, M. A.; SIMÕES, D. A. Yeast population dynamics of industrial fuel-ethanol fermentation process assessed by PCR-fingerprinting. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.88, p.13-23, 2005.

- das NEVES, M. A.; KIMURA, T.; SHIMIZU, N.; NAKAJIMA, M. State of the art and future trends of bioethanol production. **Dyn. Biochem. Process Biotech. Mol. Biol.** v.1, p.1-14, 2007.
- DELLA-BIANCA, B. E.; BASSO, T. O.; STAMBUK, B. U.; BASSO, L. C.; GOMBERT, A. K. What do we know about the yeast strains from the Brazilian fuel ethanol industry?. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** v.97, p.979-991, 2013.
- DEMEKE, M. M.; DUMORTIER, F.; LI, Y.; BROECKX, T., FOULQUIÉ-MORENO, M.; THEVELEIN, J. M. Combining inhibitor tolerance and D-xylose fermentation in industrial *Saccharomyces cerevisiae* for efficient lignocellulose-based bioethanol production. **Biotechnol. Biofuels**, v.6, p.120, 2013.
- DIAO, L.; LIU, Y.; QIAN, F.; YANG, J.; JIANG, Y.; YANG, S. Construction of fast xylose-fermenting yeast based on industrial ethanol-producing diploid *Saccharomyces cerevisiae* by rational design and adaptive evolution. **BMC Biotechnology**, v.13, p.110, 2013.
- DILORIO, A. A.; WEATHERS, P. J.; CAMPBELL, D. A. Comparative enzyme and ethanol production in an isogenic yeast ploidy series. **Curt. Genet.**, v.12, p.9-14, 1987.
- DU, J.; LI, S.; ZHAO, H. Discovery and characterization of novel D-xylose-specific transporters from *Neurospora crassa* and *Pichia stipitis*. **Molecular Biosystems**, v.6, p.2081-2340, 2010.
- FARRELL, A.E.; PLEVIN, R.J.; TURNER, B.T.; JONES, A.D.; O'HARE, M.; KAMMEN, D.M. Ethanol can contribute to energy and environmental goals. **Science**, v.311, p.506–508, 2006.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (OECD-FAO). **OECD-FAO Agricultural Outlook 2016-2025**. Paris: OEDC Publishing, 2016.
- GANCEDO, C.; FLORES, C. L. Moonlighting proteins in yeasts. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.72, n.1, p.197-210, 2008.
- GÁRDONYI, M; ÖSTERBERG, M.; RODRIGUES, C.; SPENCER-MARTINS, I.; HAHN-HÄGERDAL. High capacity xylose transport in *Candida intermedia* PYCC 4715. **FEMS Yeast Research**, v.3, p.45-52, 2003.
- GIETZ, D.; WOODS, R. A. Transformation of yeasts by the lithium acetate/single-stranded carrier/polyethylene glycol method. **Methods Enzymol.**, v.350, p.87-96, 2002.
- GONÇALVES, D. L.; MATSUSHIKA, A.; DE SALES, B. B.; GOSHIMA, T.; BON, E. P.; STAMBUK, B. U. Xylose and xylose/glucose co-fermentation by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strains expressing individual hexose transporters. **Enzyme Microb. Technol.**, v.63, p.13-20, 2014.
- GORSICH, S. W.; DIEN, B. S.; NICHOLS, N. N.; SLININGER, P. J.; LIU, Z. L.;

- SKORY, C. D. Tolerance to furfural-induced stress is associated with pentose phosphate pathway genes ZWF1, GND1, RPE1, and TKL1 in *Saccharomyces cerevisiae*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v.71, p.339–349, 2006.
- HAHN-HÄGERDAL, B.; WAHLBORM, C. F.; GÁRDONYI, M, van ZYL, W. H.; CORDERO-OTERO, R. R.; JONSSON, L. J. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for xylose utilization. **Adv. Biochem. Eng. Biot.**, v.73, p.53-84, 2001.
- HAHN-HÄGERDAL, B.; KARHUMA, K.; FONSECA, C.; SPENCER-MARTINS, I.; GORWA-GRAUSLUND, M. F. Towards industrial pentose-fermenting yeast strains. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v.74, n.5, p.937-953, 2007.
- HAMACHER, T.; BECKER, J.; GÁRDONYI, M.; HAHN-HÄGERDAL, B.; BOLES, E. Characterization of the xylose-transporting properties of yeast hexose transporters and their influence on xylose utilization. **Microbiology**, v.148, p.2783-2788, 2002.
- HASUNUMA, T., OKAZAKI, F., OKAI, N., HARA, K.Y., ISHII, J., KONDO, A. A review of enzymes and microbes for lignocellulosic biorefinery and the possibility of their application to consolidated bioprocessing technology. **Bioresour. Technol.**, 2012.
- HAYN, M.; STEINER, W.; KLINGER, R.; STEINMÜLLER, H.; SINNER, M.; ESTERBAUER, H. Basic research and pilot studies on the enzymatic conversion of lignocellulosics. In: Saddler JN (ed) Bioconversion of forest and agricultural plant residues. **CAB International**, Wallingford, UK, p.33-72, 1993.
- HECTOR, R. E.; QURESHI, N.; HUGHES, S. R.; COTTA, M. A. Expression of a heterologous xylose transporter in a *Saccharomyces cerevisiae* strain engineered to utilize xylose improves aerobic xylose consumption. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v.80, p.675-684, 2008.
- HECTOR, R. E.; DIEN, B. S.; COTTA, M. A. Engineering industrial *Saccharomyces cerevisiae* strains for xylose fermentation and comparison for switchgrass conversion. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.**, v.38, p.1193-1202, 2011.
- HECTOR, R. E.; DIEN, B. S.; COTTA, M. A.; MERTENS, J. A. Growth and fermentation of D-xylose by *Saccharomyces cerevisiae* expressing a novel D-xylose isomerase originating from the bacterium *Prevotella ruminicola* TC2-24. **Biotechnol. Biofuels**, v.6, n.1, p.84, 2013.
- HICKERT, L. R; De SOUZA-CRUZ, P. B.; ROSA, C. A.; AYUB, M. A .Z. Simultaneous saccharification and co-fermentation of un-detoxified rice hull hydrolysate by *Saccharomyces cerevisiae* ICV D254 and *Spathaspora arborariae* NRRL Y-48658 for the production of ethanol and xylitol. **Bioresour. Technol.**, v.43, p.112-116, 2013.

- HOLLATZ, C.; STAMBUK, B. U. Colorimetric determination of active α -glucoside transport in *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Microbiol. Methods**, v.46, p.253-259, 2001.
- HOU, X. Anaerobic xylose fermentation by *Spathaspora passalidarum*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v.94, n.1, p.205-214, 2012.
- HOWARD, R. L.; ABOTSI, E.; JANSEN van RENSBURG, E. L.; HOWARD, S. Lignocellulose biotechnology: issues of bioconversion and enzyme production. **Afr. J. Biotechnol.**, v.2, p.602-619, 2003.
- JEFFRIES, T. W.; JIN, Y. S. Metabolic engineering for improved fermentation of pentoses by yeasts. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v.63. p.495-509, 2004.
- JEFFRIES, T. W. Engineering yeasts for xylose metabolism. **Current Opinion in Biotechnology**, v.17, p.320-326, 2006.
- JOHNSTON, M.; KIM, J.-H. Glucose as a hormone: receptor-mediated glucose sensing in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochemical Society Transactions**, v.33, p.247-252, 2005.
- KARHUMAA, K.; SANCHEZ, R. G.; HAHN-HAGERDAL, B.; GORWA-GRAUSLUND, M. F. Comparison of the xylose reductase-xylytol dehydrogenase and the xylose isomerase pathways for xylose fermentation by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. **Microb. Cell Fact.**, v.6, p.1, 2007.
- KATAHIRA, S.; ITO, M.; TAKEMA, H.; FUJITA, Y.; TANINO, T.; TANAKA, T.; FUKUDA, H.; KONDO, A. Improvement of ethanol productivity during xylose and glucose co-fermentation by xylose-assimilating *S. cerevisiae* via expression of glucose transporter Sut1. **Enzyme and Microbial Technology**, v.43, n.2, p.115-119, 2008.
- KLINKE, H. B.; THOMSEN, A. B.; AHRING, B. K. Inhibition of ethanol-producing yeast and bacteria by degradation products produced during pre-treatment of biomass. **Appl. Microbiol. Biot.**, v.66, p.10-26, 2004.
- KUMAR, R.; SINGH, S.; SINGH, O. V. Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular perspectives. **Journal of Industrial Microbiology Biotechnology**, v.35, p.377-391, 2008.
- KUYPER, M.; HARHANGI, H. R.; STAVE, A. K.; WINKLER, A. A.; JETTEN, M. S.; DE LAAT, W. T.; DEN RIDDER, J. J.; OP DEN CAMP, H. J.; VAN DIJKEN, J. P.; PRONK, J. T. High-level functional expression of a fungal xylose isomerase: the key to efficient ethanolic fermentation of xylose by *Saccharomyces cerevisiae*?. **FEMS Yeast Res.**, v.4, p. 69-78, 2003.
- LEANDRO, M. J.; GONÇALVES, P.; SPENCER-MARTINS, I. Two glucose/xylose transporter genes from the yeast *Candida intermedia*: first molecular characterization of a yeast xylose-H⁺ symporter. **Biochemical Journal**, v.395, p.543-549, 2006.

- LEANDRO, M. J.; FONSECA, C.; GONÇALVES, P. Hexose and pentose transport in ascomycetous yeasts: an overview. **FEMS Yeast Research**, v.9, p.511-525, 2009.
- LIU, Z. L.; MOON, J.; ANDERSH, B. J.; SLININGER, P. J.; WEBER, S. Multiple gene-mediated NAD(P)H-dependent aldehyde reduction is a mechanism of in situ detoxification of furfural and 5-hydroxymethylfurfural by *Saccharomyces cerevisiae*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v.81, p.743-753, 2008.
- LIU, Z. L.; SLININGER, P. J.; DIEN, B. S.; BERHOW, M. A.; KURTZMAN, C. P.; GORSICH, S. W. Adaptive response of yeasts to furfural and 5-hydroxymethylfurfural and new chemical evidence for HMF conversion to 2,5-bis-hydroxymethylfuran. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.**, v.31, p.345-352, 2004.
- MARGARITIS, A.; BAJPAI, P. Direct fermentation of D-xylose to ethanol by *Kluyveromyces marxianus* strains. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.44, p.1039-1041, 1982.
- MATSUSHIKA, A.; NAGASHIMA, A.; GOSHIMA, T.; HOSHINO, T. Fermentation of Xylose Causes Inefficient Metabolic State Due to Carbon/Energy Starvation and Reduced Glycolytic Flux in Recombinant Industrial *Saccharomyces cerevisiae*. **PLoS One**, v.8, n.7, p.e69005, 2008.
- MATSUSHIKA, A.; INOUE, H.; MURAKAMI, K.; TAKIMURA, O.; SAWAYAMA, S. Bioethanol production performance of five recombinant strains of laboratory and industrial xylose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae*. **Bioresour. Technol.**, v.100, p.2392-2398, 2009.
- Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). **Produção brasileira de etanol: Safra 2015-2016**, 2016.
- Ministério de Minas e Energia, Empresa de Pesquisa Energética (MME/EPE). **Balanco Energético Nacional**, 2013.
- MOON, J.; LIU, Z. L.; MA, M.; SLININGER, P. J. New genotypes of industrial yeast *Saccharomyces cerevisiae* engineered with YXI and heterologous xylose transporters improve xylose utilization and ethanol production. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v.2, n.3, p.247-254, 2013.
- MOYSÉS, D. N.; REIS, V. C. B.; de ALMEIDA, J. R. M.; de MORAES, L. M. P.; TORRES, F. A. G. Xylose Fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*: Challenges and Prospects. **Int. J. Mol. Sci.**, v.17, p.207, 2016.
- OECD-FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Agricultural Outlook 2015-2024**, 2015.
- PAO, S.; PAULSEN, I.; SAIER-JR, M. H. Major Facilitator Superfamily. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.62, n.1, p.1-34, 1998.

- PEREIRA, F. B.; ROMANI, A.; RUIZ, H. A.; TEIXEIRA, J. A.; DOMINGUES, L.. Industrial robust yeast isolates with great potential for fermentation of lignocellulosic. **Bioresour. Technol.** v.161, p.192-199, 2014.
- PETERSSON, A.; ALMEIDA, J. R.; MODIG, T.; KARHUMAA, K.; HAHN-HAGERDAL, B.; GORWA-GRAUSLUND, M. F.; LIDEN, G. A 5-hydroxymethyl furfural reducing enzyme encoded by the *Saccharomyces cerevisiae* ADH6 gene conveys HMF tolerance. **Yeast**, v.23, p.455-464, 2006.
- PETSCHACHER, B.; NIDETZKY, B. Engineering *Candida tenuis* xylose reductase for improved utilization of NADH: antagonistic effects of multiple side chain replacements and performance of site directed mutants under simulated in vivo conditions. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.71, p.6390-6393, 2005.
- RABELO, S. C.; MACIEL FILHO, R.; COSTA, A. C. Lime pretreatment of sugarcane bagasse for bioethanol production. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.153, n.1-3, p.139-150, 2009.
- REN, C.; CHEN, T.; ZHANG, J.; LIANG, L.; LIN, Z. An evolved xylose transporter from *Zymomonas mobilis* enhances sugar transport in *Escherichia coli*. **Microbial Cell Factories**, v.8, p.66-75, 2009.
- Renewable Fuels Association (RFA). **World Fuel Ethanol Production**, 2015.
- RICHARD, P; TOIVARI, M. H.; PENTTILA, M. Evidence that the gene *YLR070c* of *Saccharomyces cerevisiae* encodes a xylitol dehydrogenase. **FEBS Lett.**, v.457, p.135-138, 1999.
- ROMANÍ, A.; PEREIRA, F.; JOHANSSON, B.; DOMINGUES, L. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* ethanol strains PE-2 and CAT-1 for efficient lignocellulosic fermentation. **Bioresour. Technol.**, v.179, p.150-158, 2015.
- RUNQUIST, D.; FONSECA, C.; RADSTRÖM, P.; SPENCER-MARTINS I.; HAHN-HÄGERDAL, B. Expression of the Gxf1 transporter from *Candida intermedia* improves fermentation performance in recombinant xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v.82, n.1, p.123-130, 2009.
- SALOHEIMO, A.; RAUTA, J.; STASYK, O. V.; SIBIRNY, A. A.; PENTTILÄ, M.; RUOHONEN, L. Xylose transport studies with xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae* strains expressing heterologous and homologous permeases. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v.74, n.5, p.1041-1052, 2007.
- SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. **Molecular cloning: a laboratory manual**, 3^a ed., Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- SANZ, P. Snf1 protein kinase: a key player in the response to cellular stress in yeast. **Biochemical Society Transactions**, v.31, p.178–181, 2003.

- SEDLAK, M.; HO, N. W. Characterization of the effectiveness of hexose transporters for transporting xylose during glucose and xylose co-fermentation by a recombinant *Saccharomyces* yeast. **Yeast**, v.21, n.8, p.671-684, 2004.
- SEHNEM, N. T; DA SILVA-MACHADO, A.; LEITE, F.C.B.; DE BARROS-PITA, W.; de MORAIS-Jr, M. A.; AYUB, M. A. Z. 5-Hydroxymethylfurfural induces ADH7 and ARI1 expression in tolerant industrial *Saccharomyces cerevisiae* strain P6H9 during bioethanol production. **Bioresour. Technol.**, v.133, p.190-196, 2013.
- SELMECKI, A. M.; MARUVKA, Y. E; RICHMOND, P. A.; GUILLET, M.; SHORESH, N.; SORENSON, A. L.; DE, S.; KISHONY, R.; MICHOR, F.; DOWELL, R.; PELLMAN, D. Polyploidy can drive rapid adaptation in yeast. **Nature**, v.519, n.7543, p.349-352, 2015.
- SILVERMAN, S.; HICKMAN, M. *Saccharomyces cerevisiae* Sporulation and Tetrad Dissection. 2011. Princeton, NY. Disponível em: <http://www.princeton.edu/genomics/botstein/protocols/Sporulation_and_Tetrad_Dissection.pdf>. Acesso em 04 nov. 2015.
- SLININGER, P. J.; SHEA-ANDERSH, M. A.; THOMPSON, S. R.; DIEN, B. S.; KURTZMAN, C. P.; BALAN, V.; SOUSA, L. C.; UPPUGUNDLA, N.; DALE, B. E.; COTTA, M. A. Evolved strains of *Scheffersomyces stipitis* achieving high ethanol productivity on acid-and base-pretreated biomass hydrolyzate at high solids loading. **Biotechnol Biofuels**, v.8, p.60, 2015.
- SOARES, P. A.; ROSELL, C. E. V. **Conversão da celulose pela tecnologia Organosolv**. São Paulo: Nova Série, 2009.
- SONDEREGGER, M.; JEPSSON, M.; LARSSON, C.; GORWA-GRAUSLUND, M.-F.; BOLES, E.; OLSSON, L.; SPENCER-MARTINS, I.; HAHN-HÄGERDAL, B.; SAUER, U. Fermentation performance of engineered and evolved xylose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae* strains. **Biotechnology and Bioengineering**, v.87, n.1, p.90-98, 2004.
- TAN, K. T.; LEE, K. T.; MOHAMED, A. R. Role of energy policy in renewable energy accomplishment: The case of second-generation bioethanol. **Energy Policy**, v.9, p.3360-3365, 2008.
- TIAN, S.; ZHOU, G.; YAN, F.; YU, Y.; YANGO, X. Yeast strains for ethanol production from lignocellulosic hydrolysates during in situ detoxification. **Biotechnology Advances**. v.27, p.656-60, 2009.
- TOMÁS-PEJÓ, E.; BALLESTEROS, M.; OLIVA, J. M.; OLSSON, L. Adaptation of the xylose fermenting yeast *Saccharomyces cerevisiae* F12 for improving ethanol production in different fed-batch SSF processes. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v.37, n.11, p.1211-1220, 2010.

- TRAFF, K. L.; JONSSON, L. J.; HAHN-HÄGERDAL, B. Putative xylose and arabinose reductases in *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, v.19, p.1233-1241, 2002.
- United States Department of Agriculture (USDA), Foreign Agricultural Service. **Sugar Annual Report**, 2013.
- VOTH, W. P.; RICHARDS, J. D.; SHAW, J. M.; STILLMAN, D. J.. Yeast vectors for integration at the HO locus. **Nucleic Acids Res.**, v.29, p.e59, 2001.
- YE, L.; BERDEN, J. A.; van DAM, K.; KRUCKEBERG, A. L. Expression and activity of the Hxt7 high-affinity hexose transporter of *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, v.18, n.13, p.1257-1267, 2001.
- YOSHIKAWA, K.; YAMAMOTO, K.; OKADA, S. Classification of some α -glucosidases and α -xylosidases on the basis of substrate specificity. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v.58, p.1392-1398, 1994.
- YOUNG, E.; POUCHER, A.; COMER, A.; BAILEY, A.; ALPER, H. Functional survey for heterologous sugar transport proteins, using *Saccharomyces cerevisiae* as a host. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.77, n.10, p.3311-3319, 2011.
- WAHLBOM, C. F.; HAHN-HÄGERDAL, B. Furfural, 5-hydroxymethylfurfural, and acetone act as external electron acceptors during anaerobic fermentation of xylose in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnol. Bioeng.**, v.78, p.172-178, 2002.
- WANG, C.; SHEN, Y.; HOU, J.; SUO, F.; BAO, X. An Assay for Functional Xylose Transporters in *Saccharomyces Cerevisiae*. **Anal. Biochem.**, v.442, p.241-248, 2013.
- WATANABE, S.; ABU SALEH, A.; PACK, S. P.; ANNALURU, N.; KODAKI, T.; MAKINO, K. Ethanol production from xylose by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* expressing protein-engineered NADH-preferring xylose reductase from *Pichia stipitis*. **Microbiology**, v.153. p.3044-3054, 2007.
- ZALDIVAR, J.; BORGES, A.; JOHANSSON, B.; SMITS, H. P.; VILLAS-BOAS, S. G.; NIELSEN, J.; OLSSON, L. Fermentation performance and intracellular metabolite patterns in laboratory and industrial xylose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v.59. p.436-442, 2002.
- ZAMAN, S.; LIPPMAN, S. I.; ZHAO, X.; BROACH, J. R. How *Saccharomyces* responds to nutrients. **Annual Review of Genetics**, v.42, p.27-81, 2008.

9. APÊNDICES

9.1 Sequências dos *Contigs*

LOCUS 23.3_Contig_126 4000 bp DNA linear SYN 28-JUN-2016
 DEFINITION
 ACCESSION 23.3_Contig_126
 KEYWORDS
 SOURCE Ron Hector
 ORGANISM
 REFERENCE 1 (bases 1 to 4000)
 AUTHORS Self
 JOURNAL Unpublished
 COMMENT SECID/File created by SciEd Central, Scientific & Educational Software
 FEATURES Location/Qualifiers
 CDS 1067..2788
 /gene="Possible xylose transporter"
 /SECDrawAs="Gene"

ORIGIN

```

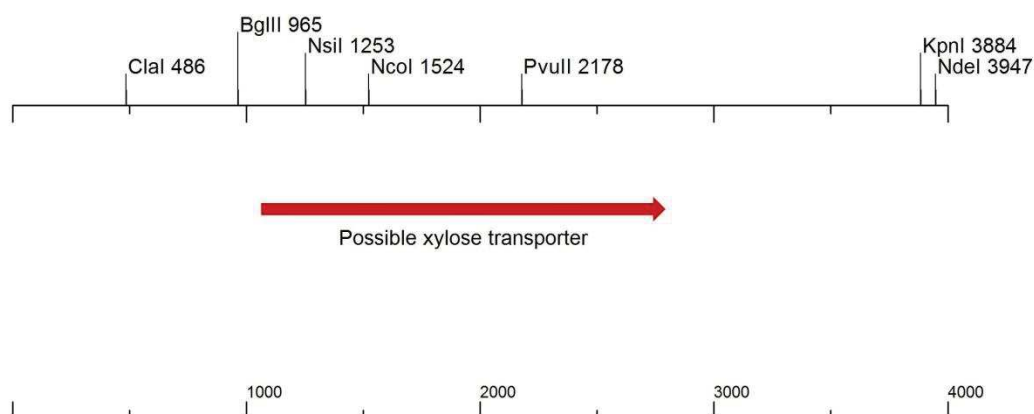
1 ggaatcaacg gacaagtatc ggtttcccga tagttactag aactaccgag cgattcccta
61 ctcttctcca aattccagga aaatgtatat agacaaagag ccatgaaagc cctgaagttt
121 tggcaaatta aactaacatg attgaatgcg tagatttcac gctctttttc caacgaattc
181 actatctcat agactgggat tctagcaagt cctctatatg accactagat cgagattgaa
241 ggaagtatcg gtacaaagaa tatagcactt tgtgaaacaa catactttat agctagagcc
301 gtaatgggct cagtggagta catggcgtaa caaaactttg cgtacctttt ctcgttagca
361 cttttctttt atttttaaga cttcttaatt attccagaat tggctatttc tggattgttc
421 cgacctggaa atatcgctca aggaagctga acctacacat ctgtatttca ctttcccttg
481 tttctatcga tcttaggtac actttctgca aatgtgtaac cgtgttttca gattaattat
541 gcgtctccag aattgttaat tgttcccgcac aacatatttt ttccagcgaa caatcaattc
601 cccagaaaa taataacgtg gatatttttt taaacatatt ccatgctcaa aaaataacca
661 ggaaaaatta caccttgaaa aagaaattcc gaaatatttg tacttccagg aaggttgacc
721 cattttcgtg ggggaaatgc agacattttt tttggggtgt gcggtttatt attaagacat
781 gacacatagg tagaaaattt tttaacacta aagatgacgg cccagattat tttttaatgc
841 acgttattat ttttttagat tctttttaa aaattaatgc ggtttttcca aaagtacata
901 ctctctaatt gatgtttatt gagggaattt tctttttgtg tggggagaat gacccttgaa
961 atagagatct tcgaaactat aaatatgctt ccatatcccc agtaattcgt ttcaaaattt
1021 tgtaatccca tcaatacatt ttacatcaa tacattataa taaaaaatgc acggcgggtgg
1081 tgatggaaat gatgtgcaag aactcattgc acaaaagcgt ttacaagttg ctggtaagcc
1141 aggtatctct ggtttagttg caaacagaaa gtccttcttt attgctatct ttgcttccct
1201 tgggtggtta gtctatggtt ataaccaagg tatgttcggt caaatttccg gtagtcattc
1261 tttctcggaa gctgctggtg ttggtaagat tcaagataat ccaaccttac aaggtttatt
1321 gacttctatt ttggaattgg gtgcctgggt tgggtgtccta atgaacggtt acgttgctga
1381 tagagtaggt agaagatggt ccgtcgtatt tgggtgtcatc tggtttattg tcgggtgttat
1441 tattcaagct tgtaccacg gtggtaacta cgatttcatt cttgccggtg gattaattgt
1501 cgggtgtgggt gtcggtgttc tttccatggt tgtcccatta tataacgctg aagtctcccc
1561 accagaaatt agaggttctt tagttgcttt acaacaatta gccattactt tcgggtattat
1621 gatttcatat tggattactt acggtactaa ctttattggt ggtactgggt aagggtcaaag
1681 ttctgccagt tggttagttc caatttgtat tcaaatggtt ccagctttaa tcttaggttc
1741 ctgtattttc ttaatgcctg aatctccaag atggttgatg aacgaaggtc aagaagaaag
1801 atgttttagat gttttagcta acttaagagg attagacaga aacaacgatt tagttcaaat
1861 ggaattcctt gaaatgaagg ctcaaaagtt attcgaagaa gaattagaag tcactgctta
1921 cccagactta caagatggtt ctgcttcttc taaattcaag attggtttct tacaatataa
1981 gtctatgatt actcactact ctacctcaa gagagttgct gttgcttgtt taattatgac
2041 tttccaacaa tggactgggg ttaactttat tttgtactat gctccattca ttttcaaatc
  
```

```

2101 tttaggttta tctggtcaaa ctaactcttt gttagcttct ggtggttgcg gtattgtcat
2161 gttccttgct actattccag ctgtcttatg ggtcgcgcaa ttaggtagaa aaccagtctt
2221 aatctctggt gctcttatca tgggtatgtg tcatttcatt gtcggtggta tcttaggtgg
2281 ttacgggtgt gactttacgg gtcactccgg agctggttgg gctgccgttg tctttatttg
2341 ggttttcgcc attgctttcg gttactcttg gggccatgt gcttgggtca ttggtgccga
2401 agtcttccca ttaggtttaa gagctaaggg tgtttccatc ggtgcatctg ctaactgggt
2461 aaataacttc gctgttgcca tgtctacccc agatttcgtt gctcgtgcca cctatgggtc
2521 ttacatcttc ttaggtttga tgtgtgtttt cggtgctgct tacgttctct tcttcactcc
2581 agaaacccaa ggtagaacct tagatgaaat tgatgaatta ttcggtgata cttctggtac
2641 ttccaagaga gaagctgaaa ttcacaaccg tatccttaga gaagtcggat tattagaatt
2701 gatgggtatt gaagatttag aatccgacca caagaatgaa gtagcttacg ctgaaggtaa
2761 ggctgttgct gaatctgaaa gtaactaaga gaactggatt cttttaacca ttaagtagtt
2821 tacttctttt tcttactatt ttaaacatac cattgcatag atatgttact aattatattg
2881 ttataatatt aattacattt aataaattha aagcttaatc taatcgaaat ttggggcaat
2941 tgactaacgc ctaaacctta ccgcaactcg tcattaagtt aataaattha gaatattttt
3001 tccggactaa ttcaatcaac cactcgatca tacaattcc tcgatgatca atgaatgaaa
3061 caaacgctcc ccacaattcg aatttcaagt cagccgtaat gatatttttc gatcataaaa
3121 cgttattatt taagacaata cctgaaactt ccaattatgt aatatattca catcatgcac
3181 tttgattgct tttgtccttg ggacaagaac aatagaacgt gaataacact accacattac
3241 gagcctccat tttatcattc ctattgtaag taaataaata gcaaacaaga gttgttcaca
3301 gcaattcaac cacctcccag gatattttta agtgggaatc gctcgttact gtatcgggga
3361 aaaaattcct ttggttcttt ttgctagttt ggtcatatth cttgtataaa actgcccttc
3421 cccaatcag acatthtgcg gaaaaactat gactttcgac tcggataatt ctttcatacg
3481 ccgtctatca attgaaaaga aacctgtac acaaatccgt caaagtttct ttttaagtaat
3541 ttcatthctg cthttacca tctcatttca agagaaatta aataacagaa atgatgtata
3601 tagaggggaa aaattgtact gtggtcaggc aaaactaacg ccagaagggt tccatgaaaa
3661 tctcaaatgt ttacgtgaaa caaataccga aattatctaa gaagctcagg tcaaattatc
3721 aagtgggagt cgatgagaag actctaaaac ggcatthaac cthtgaagga gtatgccgta
3781 gaagattcgg taagatttht gccaaaggaa cgataaggat thcttggcag ggcagaacc
3841 tccgatcatt tcctaaaaga gatagcttga tagagctac taggttacct thtttctcac
3901 aagccgttga cgtaacaaaa gaaatcaacg cagccttctt gaataacata tgatttctgc
3961 attcgaacgt caatacccca agaaataaaa tctctaatac

```

//



23.3 Contig 126 (4000 bps)

LOCUS 23.3_Contig_226 5998 bp DNA linear SYN 16-JUN-2016
 DEFINITION
 ACCESSION 23.3_Contig_226
 KEYWORDS .
 SOURCE Unknown.
 ORGANISM Unknown
 Unclassified.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 5998)
 AUTHORS Self
 JOURNAL Unpublished.
 COMMENT SECID/File created by SciEd Central, Scientific & Educational Software
 COMMENT SECNOTES|GenBank 5998 bp DNA linear UNA
 FEATURES Location/Qualifiers
 CDS 2048..3688
 /gene="ORF-1"
 /SECDrawAs="Gene"
 misc_feature 2048..3688
 /gene="Possible sugar transporter"
 /SECDrawAs="Region"
 CDS complement (3982..4998)
 /gene="ORF-2"
 /SECDrawAs="Gene"
 CDS 5171..5998
 /gene="ORF-3"
 /SECDrawAs="Gene"
 ORIGIN
 1 gtatatgtgc tgaagcgaat gatttgatca ctagatcaca tggttccaaa ctagtaaagt
 61 tgatatgggt tattaagaa tacaagagta tatgttggtt ttatgaagaa ttattaactt
 121 taacgggaaa gaatatagat gtttctgtat atgtcacacg accagaaacc cctgcaacca
 181 gtaaggatta tgacatgagg tatttgcagt tccagcattg ttctagttca agcgatgcat
 241 tcgctcttc atcaacaccc gatacagggt ttgacgaaga aaacacaaaa ttttcaaadc
 301 ggaccacatc acgccatcag gatgtggctg aggaagagat tgagcaacac attcatgggt
 361 atggcgatca gctaaagccg cttatgtccc agtctaataa tttgtttggt tacaattcca
 421 cctctgagtg ttcgcaagat attacccttg aatttcaagg cgattgtacg cctagcctga
 481 actcacaatt tttgctgcaa gaacaacata cacaaattat taacaaaatc aagaaggaat
 541 tgttgacatc taacttccgt gaagggaaac caaatattga cttgttagta aaggagaata
 601 tagaagaatc gccaggatct acgtgttttg tgacatgcgg acatccagcg atggttgatg
 661 atatacgagc actggttggt cataatatag acaaacacaa tggaaaaaga gtggactact
 721 tcgagcaact tcaggtatgg gcataggtac aggttttata gagtatttaa taatagatat
 781 atttagatgt ggaatgaaat gaacttagat taactaacia gggtgaagat ggagtagaat
 841 ggagtggaaat ggagtaagcg acggctgcta tttcatgcga atctagttac agttgagacg
 901 tgtattactt ttctgaattc aattagctgt tcaatttgca tttttttgac atcgggttct
 961 tggccaagaa ccacgagatt gaatttttaa aaggcatttt tcttggcttt tcttttagat
 1021 ggcagagaaa caatataaac aatttttcac tatgcataat cttgatgtaa catcaatcta
 1081 gacaagacaa tttttctttt ctactaattc acacccaac taccaaacac acaaacatca
 1141 cttcgacaac aattagacat acatagatca tagatctatg atcaactgag cattgatttc
 1201 tttttaaagg aaggatgaag gtgatttctt attcgggtgc atttaacttg ggatcttcgg
 1261 ataaacttgg ctggcaaggt tgtgatcatt cgctgagtat ttttttgtgt tacgaacttc
 1321 ggaaaaactt ttcgaacgta gagagaacga aaaatcgtaa ttccattaat aatcgagtgt
 1381 gctattaggt ttaactcata ttcatgatac gtgaatggcc agcacctgca cgtttaccca
 1441 tcaggtgctt gaaattacgc catatctggg gcataaatag caaaaccctc agatgttcga
 1501 tggttacatt tttttctagt ttcattgcta tttttctggt attatgcttc ccgaaacaac
 1561 aagaaacggc gttgatggga tattttttta agatagtttt tccgaaaagt aaaaaatatt
 1621 atttttttaa aaaaatcaca ttattccatg gattttgtgc catgaaatgg acttagtttt
 1681 tccgtgggct catcgcaatg taacctttcc gcgtttatga ctctccatt tgtttcattt
 1741 gtatgacatc aagtgcctt attactaaaa caatagttcg ggggattcca ctctgaagtg
 1801 aattattccg atgattctaa taattaatta aaaaataatt ctttcatgca tgagttaagt
 1861 ctggtggtaa cacttggtt ggtttgtgta actaaaatag ttctttgata tgccttaatt
 1921 gcaacatccc atggcatccc ccattcatgt ataaatacca ttgaaatatt cccaagggg

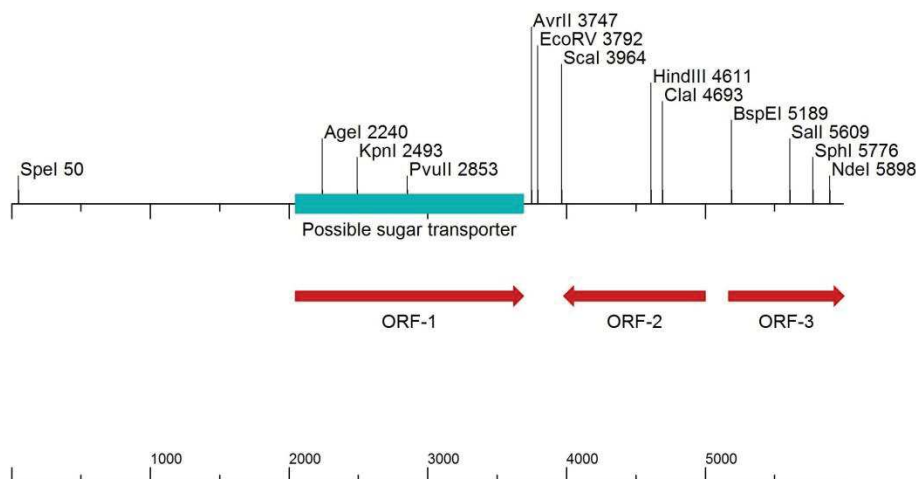
1981 ttcaaatgat tttgtattct tctcatcact atacttcccc agtatataaa tccaatatac
2041 aaatataatg tctgctcaag atcaattacc tggagaacaa actccagaag ttttatccgt
2101 cgtcgaaaaa gaaagtaaat ccgatgacat caatcaagtc gttgctgacg ctttagctaa
2161 taagactttt aaggattatt tcttaatctc ttgtttatgt ttcttggttg ctttggtgg
2221 ttttgTTTTT ggttacgata ccggtactat ttctggtttc gttaacatgt ctgatttcat
2281 cgaaagattc ggttccagag gtgctgatgg tgttgcatct ttatctgcta ttagaattgg
2341 tttaatgatt tctatcttca acattggttg tgctatcggg ggtcttgat tctccaaggt
2401 tggtgatatg aaaggtagaa gaattggttt aatgttctct atggccattt atgttgctgg
2461 tattattggt caaatcgag cccaagataa atggtaccaa attatgattg gacgtttcat
2521 aactggttta tctgttggtta ctgtttccgt ctttctcca atgtttattg gtgaaacttc
2581 tccaaaggct gtcagaggta ctttagtttg ttgtttcaa ttatgtatta cccttggtat
2641 tttcattggt tactgttgta cttatggtac taagtatta ccagattcta gacaatggag
2701 aattccatta ggtttatggt tcctttgggc tatcttctt actgttggtta tgctttttat
2761 gccagaatcc ccaagattct tagttgaaaa gaagagaatt gaagatgcta agaagtctat
2821 tgctaagggt aacaagttat ctccagaaga tccagctgct tatgccgaat tacaattgat
2881 tcaagctggt gtcgatagag aacaattagc tggtaacgct tcatgggggtg aattaatcac
2941 tggtaagcca gccgttttca aaagagtcac tatgggtgct tgtttagcta ctttacaaca
3001 attaactggt aacaattact tcttttactt cgctactacc attttcaagg ctgttggttt
3061 acaagattct ttccaaactt ccattatttt aggtgctggt aactttttat ctacttttgt
3121 taacatttgg gctattgaaa gatttggtag aagactttgt ttattagttg gtgccgctgg
3181 tatgtttggt tgtttcatta tctattctgt ccttggttct aaagcattat acgttactga
3241 tgccttagga aatgaaactt ccaaccttgc tgctggtaga gccatgattt ttgttacttg
3301 tttatacatt ttcttctttg ctctacttg ggctggtggt gtttactgta ttctttccga
3361 aacttatcca ttgctgtgca gatcaaaggc tatggctggt gctattggtt ccaattggtt
3421 gttaggtttc accatttctt taacttctc attcattatt aatgccattc atttctacta
3481 tggttttgtc ttcagtgggt gtattgccgt tgcatttgtc tttgtttact tctgtcttat
3541 ggaaactaag ggtttaagtt tggaaagat tgatgaaatt tatgcacaaa agattcttcc
3601 atggaagtct gctacgtggg tccaccatc tgctgaacac atggctcact ccactgggta
3661 cgccaagcca tctcaagaac atgtttaaat gaactttatt tccaaaacc atttcattag
3721 atttcccccc ttagaatatc atcatgcta gggccattcg aaagaatatg attaatacag
3781 aactttttta tgatatcaat caaaaaaca tttgggacga ttattaacgc atcttttatt
3841 tctcaacaaa ttttaataat tagaactgta caattttatt atacatacaa tttatacaat
3901 gagtttataa gttttactat acaactagaa tacaatacaa aagtttagtg tgttttttat
3961 attagtactt tatgtactta cctaagaaat tgtaatacaa aaattatttc ttgatgatcc
4021 attatataaa ttcttttttg gaaacttctt aattgtctt tttgtcgata ttccattcca
4081 atcaaacaa caataagcaa ctttctttgc ttcataatat ctagtttgtt gaaaacctaa
4141 agaattcata atctcaagta accttttatt atcaaaaat cttgagttgg atatacatgg
4201 aagtggtaac accaagaata agcaacttag agaatcctt gttgtaggtt tcttaagaaa
4261 tttggtcatt ctaattaaca tatctctct ttcttgatga gttggaacaa aatttataac
4321 tagagaacat gatattagat taaatcgttc atcattattc ttaggtaatg gtctatccat
4381 aaagttttgt tctataatta agagatcctg agaattcaaa tctattcgaa caatctctt
4441 gaatatgcc aaggttgaaa ttaaattata aggacttaa caaccaattt ctaatgcgtt
4501 gatatttgtt agtttcaaag aatatgggtc ttctgtaac cactcaatca atttcttca
4561 agaatcaccg cccctctttg atgtttggcc ttgggtggat gctgattgat aagcttctat
4621 cccccctcgc tgttgaactt cagcatctat tttcgctaat gttcttatga gatcttgttt
4681 tgtaagtgta tcatcgattt tatatacttc aagatcagaa tagttcttgg ggagggcaaa
4741 cgtttcaaaa acttctgagt aactcaattg tcatcatgg gagaaatatt ctttatatgt
4801 atcaattcct atttccttat aataatttt aagtcgattg ataattgaat gacgattctt
4861 ttgtaaaata tggaaacttc gtataatttg tcttgttgt tggggtttta gactctttgg
4921 tatattcgat agacccttgc ctgtaatcgt ccttggtctc ttttaataatc cagttgattt
4981 tactttcttc ttggccataa tttgtttctt ggtagtgggt gttttgagaa agattcgata
5041 cttcaaatca atctcatcac actgaaatatt tttttgggt tgcaggtgct tatatgcgat
5101 gagatttctt gaatattcag tatttactct tccttagatt cccaattatt ccgccccag
5161 aacaacaaat atggcagcca ataagaaatc cggaaagaag actggttaaga aacagataaa
5221 accaaggaag gttcctactt taaagcaaaa gctacaaaaa gaatctaag tggttagagt
5281 agataattta aaatggaaac cagttgaaat acctgataat ttgggtgatt atgaagggtt
5341 ttatggatta gaagaaatag atggagtga tgtgcagata gttaatggta gggctgaatt
5401 cattgttaag gattcgtcta aaataaaaga tgatgatgta gtggaaaata aatctgaaca
5461 agttgaagga gatgcagatg aggatgatga agaggaagaa tttactggat ttgacgatga

```

5521 tactaatatt gaagaagaaa atgatgatga agaagttaag ggcgatattt tggaagatgc
5581 tgatcaagaa gaagaattgg aagagggggt cgacgaggaa gaagacaaat cctcaaccaa
5641 aaaagtcaca ggaacggacg aattatcttt aggatcattt gctaaccttg actttaccctt
5701 accagacgat gatgagatcg acttacctaa ttggcaagaa gatcaagttg acttttcttt
5761 aagtccatac acaatgcatg cattatcagt attaaaattt gaaaaaccaa ctcccatcca
5821 aaagagaaca atcccattag cattacaagg aaaagatggt gtaggtaagg ccaccactgg
5881 ttctggtaaa actttagcat atgggtattc aatcttagag aaatatttgc aatctctcac
5941 caaaatcaaa caaataaca aagataaaaa ggттаатсат сctgtaggga ttgttttt

```

//



23.3 Contig 226 (5998 bps)

```

LOCUS      23.3_Contig_226.1          6197 bp    DNA        linear     SYN 16-JUN-2016
DEFINITION
ACCESSION  23.3_Contig_226.1
KEYWORDS   .
SOURCE     Unknown.
  ORGANISM Unknown
            Unclassified.
REFERENCE  1 (bases 1 to 6197)
  AUTHORS  Self
  JOURNAL  Unpublished.
COMMENT    SECID/File created by SciEd Central, Scientific & Educational Software
COMMENT    SECNOTES|GenBank      6197 bp    DNA        linear     UNA
FEATURES   Location/Qualifiers
  CDS       1906..3564
            /gene="Myo-inositol transporter"
            /SECDrawAs="Gene"
  CDS       4036..6039
            /gene="Kinase"
            /SECDrawAs="Gene"
ORIGIN
1  tctggtacta actataacc  ttacttcca  ggtggtgca  ttgctatgg  tcgagttta
61  ttgatgatt  tagttgaat  tgaagatgg  actccagca  ctacttctc  aatggctaag
121  gatgttacta ctttcttaa  ctgggctgt  gaaccagag  atgatgaa  aaagaagtgg
181  ggtttgaagg ctcttattg  tctttcttc  ttatattta  tttctgtct  ggtcaagaga
241  ttcaaatggt ctccactca  ggccagaa  ttcagattg  atccaccaa  gaattaaatt
301  taacccccca aaggaagaa  agagaaaag  aagaaatac  tctaaattg  agatttagaa

```

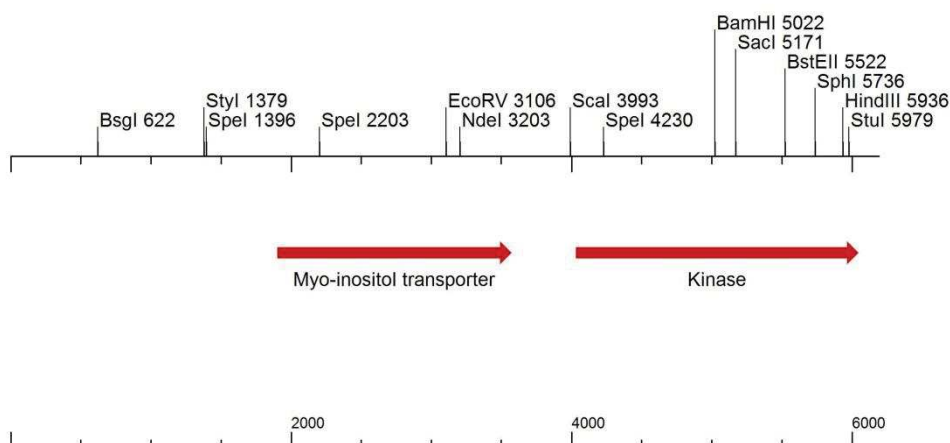
361 gttcagaatc aattgattac acatnttttt attgntttgt aaatataagc agggntttgaa
421 ttttgggtatt ccaaaacttct ttatagtcat ttcttactta tcaggnttcaa gtcattntttt
481 tgcaaaggga agtaagacta cgntttttgct tttttatagg aattattaga catgatgata
541 aagaagagat tacataatgt cttctcccaa cttatgcaaa ccaaaatata ctaatntttca
601 tttttataaa tttataagtt actgcacact gtgattgntt ctttgattntt tattnttagct
661 taatataactt ttatntttgat tgaactctca tttattagta gaatagnttt tgattctttg
721 atggatgaac tacttgtatt ggtcttctct tgaattagcg attgctntttg taacactggg
781 tctttcaatc gattgntcgt tctatgatcc caagnttaat tacgatcaat tcaattgcta
841 atttactgag ttagcaccac ctactnttatg tttacaaaag tacaattgtc cgatctntta
901 ttgagcgggtg atgctagtcc atntttttgt ttaatattgt taggnttttc ttgtagcaaa
961 ttggnttgcaa acgataatta aaatagaaaa caagacaaca cacataaaaa aacacgcatt
1021 ccacctaaac tgaattatntt acgacgcagt ttaataccac tacaagaatg tcaattacag
1081 aagnttaccg aaggacttag ttcagaacta ctaatgatac aaactccaaa gataagnttc
1141 ttcaagnttga taagaaagtc gagtaagtac acagaccagt atcgagaagg cactgctacc
1201 acggntccaaa ttcgatcttg gttacgnttg catctatac gaggaagaac ttcaaaactaa
1261 ttaggaaaaat atactcacia aaacaggcta tcaacattca aattgtagct ccaatnttaat
1321 gattntctatc tattgtcatt ctctccattg tttatcaaat atgggaaaca aaccaacgcc
1381 ttggcggntta agatgactag ttataaantt agaatcagaa taggcntttc atccggcgaa
1441 ataacgnttat gattgaatta cacaaaantt aaataaantg atcgtgtgaa tcttattatt
1501 ggccccatcga aatcaacaag aaaaaataa ggagnttctgc cgaaaaactc cgcaaccaca
1561 caatacaaca caacacaacc ttgtcggntgg cagcgggcat cagggcacac acacagagac
1621 cacaaaacca tatccagntta caatagccaa tttattatta cttattacia ttatacatga
1681 tactgccnta ttaagaaata tttgntttat atnttatantt tattgtgcct cttccttntg
1741 actgnttttat ttcatcgttc acttgcattc tcctacttaa agntttntcca tnttactnta
1801 tnttgacattg acatntttca cccatcatcc tntttatagat cttccaagaa tcatcagntc
1861 attgaaatac accataatat catagnttntg acataaaaagg ggatcattag ttcatcacia
1921 ccaaaacttc agntcaacca aaacatagc atatcaacgg cctcagntgc ctcgaatgaa
1981 tctggcaagg ctttattacc agaaacagnt cgtgaaggta gtaatagtaa tccagcattc
2041 gatgaaacat cgtntcagat aacgacagat gataaacat cctcgtntat tattcattg
2101 actntggntct cgtccatata aggnttatcgt ttcggntatg atacagntta tnttntcatca
2161 gcattagntc aagnttgaac agatntatca gatagactnt taactagntg agaaaaagaa
2221 tnttatcacat cagctacatc acttggntgct attatagntg ccgnttntgg tggattatta
2281 gcaaaacttaa ttggtagaaa gaagntctta ttaggatcta atatagntat tnttnttggg
2341 acaattatac aantggcagc acatactgnt tggacaatga ttgntggntag atntntcctg
2401 gnttggcag gntgtacagc gtcattaant tccccattag tntctntcaga atntggcaccg
2461 gcaaaagnttc gntgtcgtnt aantgnttaca aatgntcatg ttattactgg cggntcaatta
2521 gntgcatant taatcaactg gggnttaaca agagntccac atgnttggag aatatctgnt
2581 gntnttatnta tggntaccac agnttntcaa tntgtctntg tntggntctt acctgatact
2641 ccaaganttt atgnttatnta tggagantta gataaaagcta gagaagntcct tagaaagant
2701 cacaagacac cttcagaaga atnttatnta aacattatcg aagaaatgat cactntcaat
2761 tctcaagntc ctggaantag cgcgattcat aaagntatggg aatcaantaa gataantcat
2821 aaaacccag gaaanttcag ggcnttaant cttgcatgnt gctntacaagg tnttcaacia
2881 tnttactggnt ttaactcatt aatgntactnt agntctacia tnttntgaatc tnttggant
2941 gacaatccta ctgccntatc cattantntt gcagcaacca actntgnttt cacagntatt
3001 gcattagnta ttantgatc cgtntgaaga agaagaatct tnttagntggg gantntcatg
3061 atgntcntat cattaanntg ctgntcgant gcgntccatt ttatggatat cgantntctc
3121 gntgnttctg gntntgtaca atctagagnt atntctgnt gggntantnt tntgattant
3181 gntatgntct tntcgtcgc ctcatatnta atntgntatg gaaacgcagc tntggntagnt
3241 gntagaantat tctcagatnt taatntcgt tctgntgnt caatgntatc aacatntact
3301 aantggcag gntctatgnt tntntcatcc acatntntga caatgntntga aaagantact
3361 ccaaccggca cantntctnt cttntctnta ttatgntnta tntcattnta tntcgtntac
3421 tntntattac cagatactgc tggntntgaa tntgaaagaaa ctacntcgtt cttggntcaat
3481 ggantntaat tntaaagagc aantagant gcaaaacaaa gaaggaaaga atcaagnttt
3541 gntaaaagac acgntaaatc gntaaaagaga tctntatntg gntntgaant atntatctat
3601 gaaantctat agacagntag gntntatac actntaataa atactntnt atacggcaat
3661 gatagntggnt gnttagntgg gntntggaag tntcagntgag tntagntctac catntntaat
3721 tntcgtntcaa tntgacaciaa tntntntat tntgatcgtnt gntntatntc agntntgat
3781 aantntctat tntccaccat tntntaagnt tntgntcatc caaccaciaa ccatctntca
3841 acantngagnt agantntaaa tntcaagnt tctntgaaa gaaaagntc acagntaant


```

3901 agactattca aaacaaataa caaggaattt ttcctattaa tagtattgtc atttaaattc
3961 aaaaatctggg aaacattacc taatntagga gcagtactaa acaataattc ggttttggaa
4021 gaatagcaag taaccatgtc atgtgatata ccgtgtgcta gagcagacca aaacaataaa
4081 aatgcagcag cccaaagact atcatctttc cccgattcca aaggtcatat aaaagaaatg
4141 ggctgtctaa aagaatacgg aattatacaa aagctaggtc aaggttacctt tggggttgtt
4201 cagaaagcaa aaaacaaaaa gtcaggagaa ctagtagctt taaaacagct aattaatcat
4261 tctgcaaagg agggatttcc cataacagcc atgagagaaa taacgatatt aagaaggcta
4321 catcataaga acgtaatcaa catattggat atgatatatg aagaacccaa agtgagcaac
4381 ccagcagagt tgataacgca acgaggagtt ttctatacag ttagtcccta catgtctagc
4441 gatttagtgg gactattaga gaatccgaat gtaaatttgg aattaaatca gattaaatgc
4501 ataatgcaac aattacttca tggaatacaa tatattcatg aacaaagggtt tttacataga
4561 gatataaaag cagcaaattt attgattgat tttagtggag tattaanaat tgccgatttt
4621 ggattggcta gagtttatca cggggatact ccaaagttgg gactggggcc aggaggaggg
4681 gaacgacat acactggatt ggtggttaca agatggtata gacctcctga attgcttttg
4741 ggggagagaa aatatactac agcagttgat ctttggggta tcgggtgtgt gtttgccgag
4801 ttattcactc ggaaaccaat tcttgttggg aaatccgatg cacatcaagc acaacttgta
4861 tttgatttag tggggccacc tttgaactgg ccagaagctg ccaaattacc aaacaagtct
4921 gattttaata ttggattgac aagtaagcgc agtttggaa ctagattcga gaatatcata
4981 ccatcagatg gtatcaaact tttgagcggg ttgttaacgt tggatccatt caagagattt
5041 aatgcattag acgcattaga tcacgaattc ttcgccaaca aacccttgcc aatgaaacct
5101 gaagaattac ctaaatttga agagtgtcat gaaattgata aagaaagggtt taaaaaattg
5161 agacaaaatg gagctcctac aactggattc cataaagtca actctggcat tacagtttca
5221 cagccttatc ctgaaattaa ggttgattca ttcaatggaa aatttgaatc caaagctgat
5281 tcacctgacg gaagatttag ttcaaaatac ggcaatcatc ccaacaggaa agttgatagt
5341 tatattccta aacaagtag tagcactaat ttaacaacgc catcaagaat tcgcgagaac
5401 acagattatg atcatcgacg taggtacgat agctatagga acaatgcagt tagaagccct
5461 actaaatcca gaagtcgcc aaaggtagat agatcacagg tgaagtcatc aagctcatc
5521 gggtcacccc caagtggttt aaaggatctt cctgcaaac caaaatttcc caattcaaat
5581 caaagtacaa tgtcttcggc tccagatcag tctactgctt caagcacagt tgggtctgaa
5641 ataccaacaa aacctttaat gtacgatgaa cattcaaagt caaccgctag tcgtggagtt
5701 gggacggtag ctagtacag gaatagagag gcagcgcacg catccacaac agagaatgaa
5761 gtgggaaggt tagggacagg aaagccaatc aatgtgttta tgaaatctca taagcgtcaa
5821 cgtagtggaa gtgcattgtc aattgctgta gtttccaaac ggaagaaggt tatagaagaa
5881 gctgatgccg agagtgagct aagcgagata gagaatgaaa ttacaaaaac tgatgaagct
5941 tcattggaag ggtttttgga tttgcctggc tttcaaaaag gcctggagta tcgaaagtta
6001 ttaaatgaaa aggtaaggta tataaattcg gaaaagtaaa aatattagaa aagtcataga
6061 aatttttcat aacatttggg gatcaatc taattgtata gaattctttg gatatttata
6121 ttgtaaaagg aatcataag tttcataatt aggtgtaagt tctatctatt gttcccaatt
6181 tgtaagaat tacgaaa

```

//



23.3 Contig 226.1 (6197 bps)

LOCUS 23.3_Contig_3 7686 bp DNA linear SYN 16-JUN-2016
 DEFINITION
 ACCESSION 23.3_Contig_3
 KEYWORDS .
 SOURCE Unknown.
 ORGANISM Unknown
 Unclassified.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 7686)
 AUTHORS Self
 JOURNAL Unpublished.
 COMMENT SECID/File created by SciEd Central, Scientific & Educational Software
 COMMENT SECNOTES|GenBank 7686 bp DNA linear UNA
 FEATURES Location/Qualifiers
 CDS complement (1635..3221)
 /gene="Possible xylose transporter / Similar to GXS1"
 /product="Similar to GXS1"
 /SECDrawAs="Gene"
 CDS complement (6135..7067)
 /gene="ORF-2"
 /SECDrawAs="Gene"
 ORIGIN
 1 aaccatcact ggcaaaggca acagtagaaa aattggaaga aagtcctccc aaggcagcac
 61 ccacaatcac atccgataaa tccggggcat aggaaggttg taaagcagct gcccaagatg
 121 tagcaagcga gcctcccgag aacccccata atgcatatth agcattcaga gctattcctg
 181 tggaaatthgc actthttcatc gtcgcccgga cagaatcaag aattgcatgt gccgattgct
 241 tacctacccc aaatgcagat ttgggtccat tataatcggg actgataaca taataaccaa
 301 gttgtagggc catatgtact aatggcaatt cgatttgatt gaagaatgtg ggaattgthc
 361 caaatagaat cgcataagaa ggccaacagt ctatatgaga tgcattctca tagatttgat
 421 aagataccac thttgacgga tcggcgthaa gtggttcgat gatggttgat actattgcat
 481 ttggatatcc aaatgaatct tcagatctga ctaagacttg ccagatattt tcaactcggg
 541 ttggtaggaa tgagcctaath aaattggthg ggactaatct gaaatctagg atgtctccag
 601 gttgggaath ttctaathct gggggthgga tatagaaact gtcatttgaa ggaaggthca
 661 ctggcagggg ccaathatgat atgattgaaa ataththggc taataccaaa atcaataaac
 721 tatacatcgt gthtagtagt ataaaaath aatgatgaath gtctaataag thttgcatga
 781 agccaagagg gaaaththagg ctaththaaath aathaagthg tgaacaagaa cggggcaata
 841 aatgggthac athththcat cthaacaact thataataaaa gggactathg atcataaggg
 901 gggtagatag thggaacgth aatcaaatag aagagccaga tagtgaatac thaathaatc
 961 tcaggthgth tathctgaga ththaataac thagaathat thgtcttgaa aaccgthct
 1021 actthcatath gathgggccc thgaggctgt ggctthacct cggatgthtc thcactthgtg
 1081 cgtgcatgat thathththc thgathataath cactthacga actgtctath gthctththca
 1141 taagcgaaaa aathagaath thththgaaa thactththca acacacagc aaagcagthg
 1201 aaagaaaaag gactthgaaac catcgggaaac gthaathgth aactathgat gthaaagaca
 1261 thactthcata agctthgath aggagaaggt tcaataath gaaccataath tacataataa
 1321 cththcgathc tcaaaaataa athathggacg athththgca aaaccgthc agathgata
 1381 athctthgct gaagcggctt thththgthc tagathctaa agththcathc acctthgthcct
 1441 tagathctthc athaththccc gthathgath cthaccaaaa thaaaaathc thaaathatg
 1501 aathathgathc aathacccaac acaaaaathc acaaaaaath caththcghaa cthacthaath
 1561 thathaththc athagthaaaa ththaagaga gaacthata athaaththaa aaaaccactc
 1621 caathgathc aagccthaac accathgcca thactathth thcagthgaa thcaactthca
 1681 gcaactthccg gththaccaa tgccaactca thcthaaacg caththccga aggcacaaac
 1741 ccaggactth thcatgctth gththacctth aathacaact cathathctg thcacaagthc
 1801 aaccctthtag thcthaataac gaaaaagth acgaaaagaa thccaathagc athaththca
 1861 ccccaataa agaaaacctth ggathccaaga thggcgthcc cgggaccgga athgaccata
 1921 ththgagthg cathaaccath accgaagthc cagagccaath tagathgathc athathgca
 1981 athgaththth gathcathath aagggcgaag gththcagca cthgagccca acacaaagga
 2041 ccccaagthg cagcaaaccc ggcaathgag acacaagthg aagcaaccaa athathgath
 2101 gcagctaccg aathcgggagc ggcaacgccc aactathcga cathgaththg ggaggtggcc
 2161 athgathcagc agccacaaag aagthaacth cthctaccta agaththcaath thaaagctata

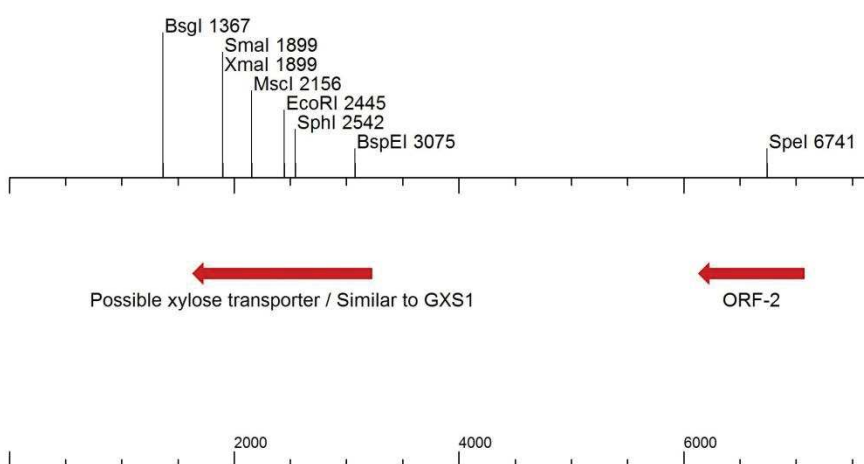
2221 ccagggatgg tcataaagac attgacgata tttgtagcta attggattgt aaatggggtt
 2281 tcaattcctg aattttggaa gaattgggtc ccatagtaaa agatgaaatt aatacctgtt
 2341 aattgttgta acgcttgaat tgtaactccc ataaataatc tctgatgttg cttgttgata
 2401 ttggtaaaga ctttcttcca gctggctttc ccgtactgac tttcgaattc atgattggcc
 2461 ctaatatctt caaattcttc aatcaaatct ggatgatcag tgggtaatth tctcaatcta
 2521 ctcaaagact tttttgcatc agcatgcttg tccttactaa caaagaatct tggagtttca
 2581 ggtaaaacaa ccatcccacc acccaaaatc aatgcccata agaattgtaa agcaattgga
 2641 atcctataag acccggtatc cattctggta gaaactgctt gattaacaca agcggccaaa
 2701 aaaataccca aagtgatagc taactgatag gtggatacga tagcacctct gatccacttg
 2761 ggagtagttt cagcaatata taacggaaca acagccgaga ttaaaccaac acctaacca
 2821 gccagaacc taccggcaac caaaaggggg attgcagtgg cgatggtttg aagaacaata
 2881 ccaatattga atacgatcaa ggtagcgatg attaatgtcc atctacgtcc aagtctatcc
 2941 gagaataatg gggccgaaag ggcaccaata aatgtaccgg cggaaaggat ggatacgata
 3001 agtgaacttt cactagcact aaaagattca tgatcagcgg ggaagagttg cttgacatag
 3061 tccattgcaa ggattccgga aattgtacca gtgtcataac caaagagaaa tccaccaaaa
 3121 gcggcggata atccgacaag aattgatctg gtggttgaac cggctttttt gtcaccgaat
 3181 ttaataaatc gttggagaaa ttgactatct tctaaacca tatttttggg attgccaata
 3241 tataataaga aaggatctta aaattgacca aaattggaga cattgtttcg aggtattttat
 3301 aatttcgggt ttgattttgc aacaggaaaa ttaatggaac cttccgcaac gtattgggggt
 3361 agagcttttt ttgaaatagt tatgacgtgg tcctatagac atatgtagtg gcttgacaca
 3421 ttttcaata tattgttgca acatgatgtt tatatcaaga aaattatatt attgagagaa
 3481 gaagaaatag tgaatcgagt ttttctttc tgtgcaaaag ttcttggcat gaagagtgat
 3541 atctccagcc gtttaacgca ccaaatgaac attcatcatc tatcccacga aagaatagat
 3601 attttgaat ttatgttgca ttggacaagg aaacttaatc aaaagttccc caagcaataa
 3661 tggaatcttt gaattatctt cattttttaa aattgtacgg ctaaattcaa ttacagaaaa
 3721 ttcttgatct tgaccaacc acatcatggg tctttcataa taattccata tcaatttttt
 3781 cttttattct ctccaataac aatacacaaa tcaaactctt tatctttgca aagtgcacta
 3841 ctcaaatag aaggatggaa cgggggctaa caccattaat ttgcatattt ggcagatatt
 3901 tcgaaaggat acatgaatac agttatgaat tattcttcag aataaatcgc aatagctacg
 3961 tgccaatatc tattttcgct actacaataa gtaaaagatt cccttcccca cctatttacc
 4021 caattatgta acatagaatc tccattcca gcccaattaa ttttgggtatt aaagcataaa
 4081 catttaacga aaacttagtg aataattggt attcattcga tagattataa ttattactct
 4141 ttcagcaagt atttacaatt cattttatgc cttttcgggg aaagaatgta ttggattgga
 4201 tagttgctaa acagatcgcc aagaaataga atcaaagtaa attcctctct caactaaacc
 4261 aacttaatta gcaaagatgt ttcttaaaat gtttggacat acaatgacgt ttcaataatc
 4321 caatagacga caattgatga tatgattcat tgtttatgaa agctcaagtt gactctgtgt
 4381 attaacaagt gagatcaacc tcatcagtc ttattgatt gaattgattt tttacaacca
 4441 ttttaacat tgtacacgac cattctatth tgtttctccc acatacaaaa cttgaacaat
 4501 caatttcaat ttcaaggtaa ctttagcaac atacaacata aaagaatcaa taaagaaaga
 4561 agaagtgtag caatggcatt gtttggatct aaagtgttta gaggtaaagc agaacaagca
 4621 gcctatgata aaacatttgc aggaaaatat caaaaattaa tccaaaagaa tcaatttcta
 4681 ttcttaggtc ttccatttat gtttagcagtt gttgctggat cactttatth acaagattc
 4741 acaagtgtta aatgggaaag atatgatgag aaatatagac aaatgaatga ggatgaaatg
 4801 ttggaaatga ttgaaaataa aagagtgttt gataagaagg atgattttta tagactacaa
 4861 ggtcttttga aggatcatgt taaagaagtt gatgcaata atgattatga gatggttaga
 4921 gttaaagaaa aggaaggtga tgaacctgtg tggtagaatt gcttaaccag tctggggatg
 4981 gggtgtctta tttgaaatag gacactaata ctttaagata taactattac tgaatgaaac
 5041 gttttaatga attgagcttt acgctacttg tatatataca tactcctgtc tatagtaatg
 5101 aataaagatg aatatattca tgtattgaat attaactgta gagtgggtgaa tagttaagga
 5161 agaaagagtt ctgcgttatc atattttacat taactccatc aattcttcaa tagttaagct
 5221 catctctcgt cgtataaaat taattttcat tttaatctat ttctttttct ttttatcttt
 5281 atacctaacc ctatacacct taacccccct atccagtcac ctcttaacta ctaatagcaa
 5341 atcaagatgg tctcctttt atgtgaagta tgtaatgaca cagtcatcaa aaagaaatta
 5401 gatcagcact cacaaagatg ttatggggct tattttacat gtatagattg ttccactact
 5461 tttgaaggaa caagttatag acaacatact tcatgtatth ctgaagctga aaagtacgaa
 5521 aaggctttgt ataagggtcc taaaaagaat aacaaacaac aacagcaaca gcaacaacaa
 5581 caaagaagg tagaagaaaa gaaaccagaa ccaaagaagg aagaaccaa gaaagaaaag
 5641 aaacaatcca acaagaagga agataccacc ttaggagcat atttaaagaa caataagtca
 5701 gaaaacttct ataaaatttt aaagaaagct tcaaatgatg attctaaaaa gttgaaagct

```

5761 ttgttaaaga aatgcaaat tatcaaggca gatgacaaac ttattataca atagataaag
5821 ttaatttaga atgtaattat agaatagaat caagaataga aagttcatgt atttttcggt
5881 aaagaaggca aagagaggga tgtgcaagtc taatagaagt ctgtttgcta atgaatgtaa
5941 tcactcctaa cataaccatt cccatattag aagtattaac aatatcagat acagaatcaa
6001 tgtaatgtta attcatttta ttaatcaatg tccttattaa tatacaacag ataaatacgt
6061 atcacttaga aagtccatat taaacacatt gtaagtagaa ccacttcctt tactgtcaaa
6121 ggtgattgcc tcgtttagtg tctcttcta tttatagcct tcgccacctt attataaaac
6181 tgcgccaatg tgttcatagg aaacgtcaaa ttctcacaca aataccccgg caacatcttc
6241 ttcaaccctc tagcattctc aatcaaagct aattcttctt ccagttcata atattccttt
6301 tctaaatcat ccaagaacgt cggctataa ctaatctgag tctcatctcc tattatatcc
6361 ttcgagatta taagttgata gtttatgaac acgttagaac ttgtagacga ctgtttgatg
6421 tcgaaatata accggagttc atcttcggag aaatgtatta tttttatcga ggttaagagt
6481 tcgattagat caaacgtata tcctatattt tccaattctt tagcaaaatc ttcttctcca
6541 atcatacctc gatgtatact cttgttcctg attggacttt catacgtccc tgtactacca
6601 cgacttccaa tttctctaac ctcttttaac tcttttttca aatctgccat ttccttaagt
6661 aaattctgga tctgatcatc ttttacgcca atctcatgct gtaagctttt gatcaaccaa
6721 tgatcccttt ctatctgatc actagctctt tgtttatatt ttgaaaacaa catatcttga
6781 tgcgtattcg tcaactcatt aatcaaccca atcaagtcct cttgatttgt acagtttatg
6841 atatcatggt ctgttataat acttttaccg ccaccagtcg cggtagattt ggatttcttg
6901 atactggtag cggcggagag ggaaagtgaa gatgatggac gggttgaggt ggatgattgg
6961 tgggaggggtg ttgaggagaa gagtttgta gtgggtttgg gtgggtgtgtc tggatcctgg
7021 ctctgggacg atgctgttct tcttcgtgtg tttgttctgg gtggcattac taggggtggtt
7081 gacgttgatt ggcctgtgtc ctgatgttca caaacaatc tcttagttaa aaagtgcacc
7141 aatgaatga attgtaaaca ataaaaattg agagggggaa aaaagcagaa tgtggggagaa
7201 ccaaatggaa ctcatcgaaa tatcaacaa tcaacaacac ccaatcaac tgaaccacc
7261 accccaccac caccacaatt cataacaata tgccttctc accacaatca ttcattcgaa
7321 aattagataa tcttcaagaa acccaagatt caatagtctc aatatcaaat tggatcttat
7381 tccaccaaaa acacacagct gaaatcgcaa agatctggct tacatatact acaaccacca
7441 ccaagagacc aaagaagaaa ttatccttat tatatctatc taatgatgtc gttcaacagg
7501 ctagaagtaa gaggaaacaa acgtttttag acgagtttgg taaagtgtg cctaaggctt
7561 tgggtgaatg ttggagaagt gtaggtgggg atgtaaaacc taagattgaa aggttgggtg
7621 gtgtatggga acaaagaag atttttaacc tgactgaaat tgctaatatg agaaagatta
7681 tgaagg

```

//

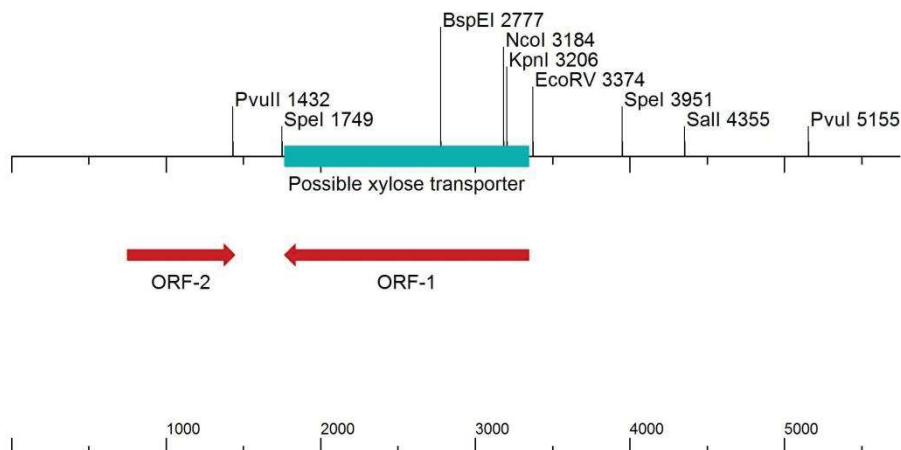


23.3 Contig 3 (7686 bps)

LOCUS 23.3_Contig_284 5749 bp DNA linear SYN 16-JUN-2016
 DEFINITION
 ACCESSION 23.3_Contig_284
 KEYWORDS .
 SOURCE Unknown.
 ORGANISM Unknown
 Unclassified.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 5749)
 AUTHORS Self
 JOURNAL Unpublished.
 COMMENT SECID/File created by SciEd Central, Scientific & Educational Software
 COMMENT SECNOTES|GenBank 5749 bp DNA linear UNA
 FEATURES Location/Qualifiers
 CDS 752..1441
 /gene="ORF-2"
 /SECDrawAs="Gene"
 misc_feature complement (1769..3343)
 /gene="Possible xylose transporter"
 /SECDrawAs="Region"
 CDS complement (1769..3343)
 /gene="ORF-1"
 /SECDrawAs="Gene"
 ORIGIN
 1 ggttacaagc cagtttacag ttagttcttc agagaatgat aactcagatg aatttcgtga
 61 caaattggtg gcttcactga tcaactttac atttggacct agactagaaa ttgattccat
 121 catccaccat cacgtgacac tcttatcttg tccacaagat ttgacataca aatcctttag
 181 tgttgcttct tgtggtttag aagattttac acgaacgggt gaagttgctt gtgataaacg
 241 gagatggggg aaagatgttc ctaacattta tttctatgac gaaacatttt agtaattatc
 301 ataacttctt tacgtttgag ttttatttat atttgctttg taaaatcaaa tcaattgtat
 361 atataaaaaat tgtaaggaaa ggggtgtgtt gttttagtag taataatttc ctataatta
 421 tgggtgggtg tttctttggc tattgtttct tctaattaca acaacaatt gtgtgtttc
 481 taaaatttga aacacatgga gtccccttc atcaacggga atggctctgt agatgcttct
 541 tctacagtcc aggttcgtaa gagtaagtag gtggaagtgt ttggactaac ttaacttgac
 601 ttgtataaaa ctgactttgg tcattcttct cataaatac acaattttga tatgcccaaa
 661 acttctaagt ataaaaatac aagatgttta tctagtaatt cgttatggct attttttggg
 721 tgttagtttg gataacaaaa agaattcaac tatgaccaat agattactca ttttaatttt
 781 attttgcttt ccgttgttta actcagctag ttgtatgaag gttcatttta aggttgataa
 841 aatatacttg ccaaagttga actatgaatt ggatgcgta gaaccattca tttcaaaaga
 901 gattatggag ttacattatc atcaacatca ccaagcctat gtcaacaact acaataccgc
 961 aatggatagt ttagtgcaag ccgaaagtaa aggaaactac aaggccattg tagagttaca
 1021 aaggacgatt gcctttaatg gaggtggaca catcaacatc tcgttattct ggaagaattt
 1081 gactcctgtc tcagaaggag gtggttgctt ccctgacttg aattcaaatt tcgcaaaact
 1141 tgttgctcac caatttgag gttttgatga gttgattaag ttgaccaatg aaaaattggc
 1201 aagtatacaa ggttcaggct gggccttcat agtaaagaat ttgagcaatg gaggaaagtt
 1261 ggatgttata actacttcca accaagaagc tttgtttaaa cctatggctc ctttggttgc
 1321 aattgatgct tgggagcatg catactattt gcagtaccta aatgtcaagg acgattattt
 1381 tgaggccatc tggaaatgtc ttaattggtc tgaagctcaa cgcagatttg acagctgcta
 1441 gttgatttgt atttactcta acctctcctt ttcttttagc gttgttttat tctctctata
 1501 agctttgtta aatagtataa tctctgtttt taaaaatcaa ttcaaaatgt taaaactttt
 1561 gaaggttctc atagtattaa ttgcctgaag tcaaaaatgc tatgttatga gtggggggat
 1621 ttgtaattat taaattgctt ctactgatt tgattggcta caataaatgt ttgttgataa
 1681 tacaatcata aattgttaat tattaanaaga tacagaaaac aagaattata agaattaaat
 1741 aactaattac tagtatggaa gaaactctct aagcagattc agaaacttca acttttagagc
 1801 tgtcggaaaa gtgagcagtt tcttctctga aagcatgttc agaaggaatg aaattgtgag
 1861 attgccaagc tttgtcaact ttcaagtata attcatcaac ttgttctaaa gttaatccct
 1921 tagtttcata aacgaagaag tacacaaaaa ggagaccgat agcgttaca ccaccccaga
 1981 tgaagaaaac cttggaacct aaattagcgt tacctggacc agagtcaacc atgtatggag
 2041 tggcataacc aataccgaag ttccataacc agtttgatgc agtacaaga gcgatagatt
 2101 tttgtctgac attaaagagca aaggtttcag caacaactgc ccaacataat ggaccccaac

2161 tagcagcgaa accagcaatg aagatacaag tgaaggcgac taaacacttg ttggcagctt
 2221 gtgaatctgt agaaaacacca acaatggcaa cgagcaattg agaaaccgcc ataacaatag
 2281 aaccacccat taataacttt cttctaccta ataattcaac catcgcaata cctggaatag
 2341 tcataccgac attgacaatg ttggtagcta attgaataag gaatgggttc ttgataacctg
 2401 atcttaagaa aaattctgta ccatagtaga agataaagtt aattccagtt aattgttgta
 2461 atgcttgaat ggtgacaccc ataaacaatc ttctgtgttg cttgttgacg ttcttgaata
 2521 cttgagacca gctagcagta ccaaattgag attcgtattc aaagttggct ttaatatctt
 2581 gatattcttc aattaagtca ggggtgtcaa ctggaagttt tcttaatctt cctaaagagt
 2641 gcttagcttc gtcttctttg gtttagaga cccagaatct aggggtttct ggcaataaga
 2701 tcataccaat acctaagatt aaagccata agaattgtaa agcaattgga attctgtaag
 2761 aaccagtatc ttgtcttccg gaaacacctt tgtaacaca ggcagcaata aacaaccaa
 2821 tggtaatagc aagttgatat gaagaaaca tagcacctc aatccattta ggtgtcgtt
 2881 ctgcaatata taatggaaga acagcagaca tcaaaccaac acctaaacca gcaatacatc
 2941 taccaacaac aagcaatggg atagtagtag aatggtttg taataaaaca ccaagattga
 3001 aaacacctaa agtagaaatg atcaaggacc atctacgacc gattctatcg gaaaggagtg
 3061 gagcagataa tgaaccaaca aaagtaccta cagataagat ggaaacaata agggaaactt
 3121 cttcagaact gaagtttggg gtagctgaat cacgactaga tgggaattgg tgtttaacaa
 3181 agtccatggc taagatacca gaaatggtac ctgtgtcata accaaataag aaaccaccaa
 3241 aggcagcaaa taaaccgact aagatacttc tgggtgtgga accagcctc ttttcaccga
 3301 aattaataaa cttttgtaag aatttgctat cttctaacc cttttttgg ctttgaatct
 3361 ttgattcttg gatgatatca aatttgagaa cagttctatt caactgacag gaattccaac
 3421 cctatttata ttcttgaggt ttgggtgtct caagaattaa ggtttacctg gggggggaga
 3481 tattgtcaaa agaaatattg ttccagatgt aaaaaaatat ttgcgatttt gtaacgaatg
 3541 gaaaaatfff tacagtaaac aattttgcag attttgcagg tttgaattat tttttgcgga
 3601 cggaataatg tatgaccacc tgtgatacaa cgaattcgga gaaattcca ttgttaaatt
 3661 atccaggttt caaaaattaa accagtcact tttgtgacta taaataatag atcgtacagg
 3721 aacaacgata ctaaagttgc cctcaagtag ttttcctcat ggagtaattt ccacaaagct
 3781 cccaagatat ggtttaatga attgaaatca gtgtctcttt ccaatgagaa ttgattttcg
 3841 cgagtgatgt aattattgga taacttgtaa tttttgggtt agatgttggc taagcgcatt
 3901 ttttgattat aaaaaatfff ccgatttttt ttgaataaat ttattccgta actagttaaa
 3961 taatatttga ggtgggtctt taaaaaatat tttaaataat ccgagaaaaa atccgattga
 4021 ttgccgtatg aaaaatatac gcaaaagaaa tagagcaacc tttatttcaa tcgatttctg
 4081 taatgataca tatacttata tttcaaagaa cataaaagat caaacagtac aaagcagaag
 4141 atcatcaaaa aagttttcgg tttttgaaag agttcgttcc aaaaaaatac tagaatctga
 4201 acgaaaagtc agaggaacag ttgttccgaa aaaatatttt gtaaccatc ggaaattcct
 4261 ttttctccat cccttctttg gtttattttc tttaccaata aatgtgggtt gtttaattgg
 4321 aattaatgcg ttcatggata tttttgattg atatgtcgac ttgtacacgg agtgggggtg
 4381 tgtgttacca catttcgaag ggtgttaaac taagtaggtt ttgtccaac tggagatggt
 4441 aaggaattag aagtcaaact agctatgaat catttgaacc cagtttcttt tgtatttagt
 4501 caatagcaca atatctacca tgtaagttgg ttaaaggacg cgtcgtaaat tcggaaaagg
 4561 aagttctacc ccaatggcaa agaaccaacc ttcggaatct gttgcatgca ttagattata
 4621 cagaaatatg ggtatgcgga gaaattaaag actatftttt acagtttttag gaaaaacttg
 4681 aacaataaat ccgatttaat gtatgattgc ttaaataata tagttttgtg gtgaaataat
 4741 gcggagccag aaatatttta ttgttcttcc actcatttaa tcctgagact attatttctg
 4801 gccgttgatg ctaaggaat actaaatcaa ttacagtta actaattttt cattcaaagt
 4861 acttgttctg gaccacatct attctattta ccccgtagt aaagaagatg aacaatagca
 4921 ttaacgagat tgaactaaa tttagaaaa ctttccgaga attggatggt ggtacaaata
 4981 ctttggaat actttcgaat acgtgtggtt tttctcatat ccaaaggta aacaacaaat
 5041 atcgagagtc aagtcttcgc aatacttttg gattgtaca aaggtaata ctgtattctc
 5101 ccccaacac atgatgtcat gcaagaaatg tgaatattcc gttttagtg tgatcgatcg
 5161 gataaactgg tactgtatcc cttagtttta cttccaagt tctccatctc cataattaga
 5221 tttccttgta agctggatta gctgattat ttttaattat tgtttctttt taaaatgact
 5281 tgcaaattac tactctttta agcgttttga gaaatatgca caagaggcta aattttctat
 5341 ttatgtatct cgttaatttt caccccaacg tatccccaac atttagcaac aaacaaaaac
 5401 aaaagaaatc gtggaggaaac aagcggagggt aattgttat aatggggaga gttgcattga
 5461 tcacaaactc agaaactaat acaaacgaca ttatcccata ggaaggaaat gatgatttgt
 5521 accaacccat tgattatctt acgactttca gttatattaa gccttcttca attatgtttg
 5581 gggggaggat tacccttctg agttccaga agtttgaac ccaaatggaa acctaaaatt
 5641 ggcagtactt gggattatga gctagcaaat ccaattaaac aaatttctaa atccattgat

5701 gtttattcta ttgatttggg agaaaactcc aaaaagacaa ttgagaatt
//



23.3 Contig 284 (5749 bps)

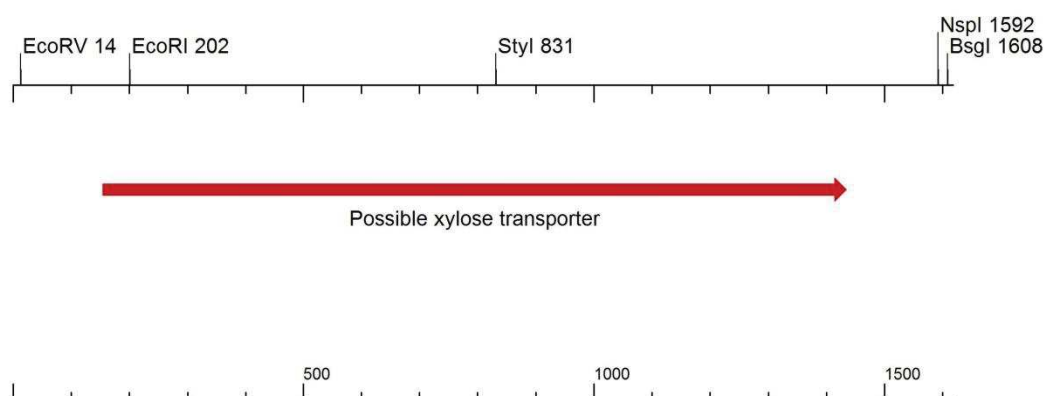
LOCUS 25.1_Contig_794 1619 bp DNA linear SYN 16-JUN-2016
DEFINITION 41_S17_L001_R1_001_(paired)_trimmed_(paired)_contig_794_selection Inverted
ACCESSION 25.1_Contig_794
KEYWORDS .
SOURCE Unknown.
ORGANISM Unknown
Unclassified.
REFERENCE 1 (bases 1 to 1619)
AUTHORS Self
JOURNAL Unpublished.
COMMENT SECID/File created by SciEd Central, Scientific & Educational Software
COMMENT SECNOTES|GenBank 1619 bp DNA linear UNA
FEATURES Location/Qualifiers
CDS 156..1433
/gene="Possible xylose transporter"
/product="Similar to XUT7 - Length: 1278Found at strand:
negativeStart codon: ATG"
misc_signal 567..569
/SECDrawAs="Gene"
/gene="CTG-1"
misc_signal 1269..1271
/SECDrawAs="Label"
/gene="CTG-2"
misc_signal 1296..1298
/SECDrawAs="Label"
/gene="CTG-3"
ORIGIN
1 agattggtgt tttgatatcg atattagaaa tcggagctat gatgagttca ttgatggtgg
61 ccaaaattct ggattcttag ggtaggaaac gaactatitt gatcgaaca gtggtgttta
121 tctttggtgg gagcttaca tctttctgtc ccaataggt agtatttgcg atcgaagaa

```

181 tatttagtgg aattggagtt ggaattctat caactattgt tccatcttat caatgtgaga
241 ttagtcccag cgaagaaaga ggaaaattag tttgtgggga gtttactggg aatgtagcag
301 ggtatgtggt aagtgtgtgg acagattatt tttgttattt tatacaagat ataggagaag
361 ctagaactaa accgcattcg tttttgccc agttgagttg gagattgcca ttatttattc
421 aagtagcatt ggccatcggt ttattcattg gaggtttttt cgtggtcgaa tcaccaagat
481 ggttattaga taacgatatg gaccaacaag ggtttcatgt gcttgcgttg ctttatgatt
541 cagatccaga taataataag ccaaaactgg aattttttgt catcaaaaat tctattctct
601 atgaacgaaa agcaacaccc aaatcggaac ggacttggaa acatttattc aaaaattact
661 tggttcgagt aggtgttggg tgttccgat tattctttgc acaattcaac ggtataaaca
721 ttatttccta ctatgcgcca atggttttcc aagaagctgg ttttaataat gcaaacgcgt
781 tattaatgac agggataaat gcgatcgtat acttgtatc aacacttatt ccttggttcc
841 tagttgataa atggggtaga aaaccaatat tgattactgg aggagcagca atgtgcattt
901 gtttattcct tatcgtctgtt gtaatgtatt tagatcaatc attcacacct acgcttgtgg
961 cgacacttgt gattgtttac aatggtgggt tcgggtatag ttggggtcca attggattcc
1021 ttatcccacc tgaagtatat cccttatcag ttagagccaa aggggtgtcc cttgcagttt
1081 ctaccaattg gttaagtaat tttgttgttg ggttattagc gccaatthtg aaagaggaca
1141 ttggatggaa aatgtatttg tatccagcaa tgcctatggt aataagtata attgtagtga
1201 tggcatacta ccctgaaacg aaagggttg aattagagga aattgatgat atatttcaag
1261 agttttatct ggattcctaa gtactccaaa ggatgctgta tagtcttggg attggggagc
1321 gaagtaagaa taccctaaaag gttggaagct attcgaagat agaagaatcg gatgtggata
1381 ccaatggaat cgaattggac ctcatcgtat atgagaccac acgaatgta taattataga
1441 ataggtatth acacactatg taagtagtag aaatagactg ctaaaggggc aggcatggaa
1501 aggaaggcta gaatagtatg caagacgaaa taattataga ctcggcttaa aataaaatga
1561 aattattgth gagggaccgt gttctgtttg aacatgtcat atthttatgtg cagtctgaa

```

//



25.1 Contig 794 (1619 bps)

```

LOCUS      25.1_Contig_794_          1619 bp    DNA     linear   SYN 16-JUN-2016
DEFINITION
41_S17_L001_R1_001_(paired)_trimmed_(paired)_contig_794_selection
ACCESSION  25.1_Contig_794_
KEYWORDS   .
SOURCE     Unknown.
  ORGANISM Unknown
            Unclassified.
REFERENCE  1 (bases 1 to 1619)
  AUTHORS  Self
  JOURNAL  Unpublished.

```

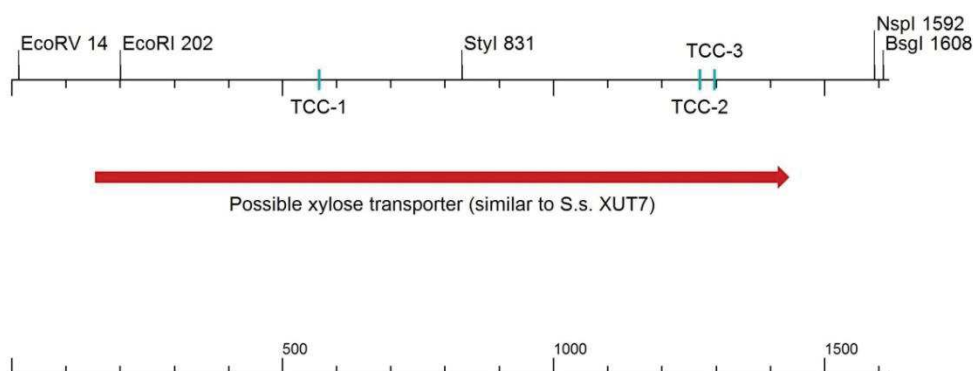


```

COMMENT      SECID/File created by SciEd Central, Scientific & Educational Software
COMMENT      SECNOTES|GenBank      1619 bp      DNA      linear      UNA
FEATURES     Location/Qualifiers
     CDS      156..1433
              /gene="Possible xylose transporter (similar to S.s. XUT7)"
              /product="Similar to XUT7 - Length: 1278Found at strand:
negativeStart codon: ATG"
              /SECDrawAs="Gene"
     misc_feature 567..569
              /gene="TCC-1"
              /SECDrawAs="Region"
     misc_feature 1269..1271
              /gene="TCC-2"
              /SECDrawAs="Region"
     misc_feature 1296..1298
              /gene="TCC-3"
              /SECDrawAs="Region"
ORIGIN
     1 agattggtgt tttgatatcg atattagaaa tcggagctat gatgagttca ttgatggtgg
     61 ccaaaattct ggattcttag ggtaggaaac gaactathtt gatcggaaca gtggtgttta
    121 tcittggtgg gagcttaca tctttctgtc ccaatatggt agtatttgcg atcgaagaa
    181 tatttagtgg aattggagtt ggaattctat caactattgt tccatcttat caatgtgaga
    241 ttagtcccag cgaagaaaga ggaaaattag tttgtgggga gtttactggg aatgtagcag
    301 ggtatgtggt aagtgtgtgg acagattatt tttgttattt tatacaagat ataggagaag
    361 ctagaactaa accgcattcg ttttttgccc agttgagttg gagattgcca ttathtattc
    421 aagtagcatt ggccatcggt ttattcattg gaggtttttt cgtggtcgaa tcaccaagat
    481 ggttattaga taacgatatg gaccaacaag ggtttcatgt gcttgcgttg ctttatgatt
    541 cagatccaga taataataag ccaaaatccg aathttttgt catcaaaaat tctatctct
    601 atgaacgaaa agcaacacc aaatcggaac ggacttggaa acathtattc aaaaattact
    661 tggttcgagt aggtgttgg tgttccgcat tattcttgc acaattcaac ggtataaaca
    721 ttathtccta ctatcgcca atggttttcc aagaagctgg ttttaataat gcaaacgcgt
    781 tattaatgac agggataaat gcgatcgat acttggtatc aacacttatt cttggttcc
    841 tagttgataa atggggtaga aaaccaatat tgattactgg aggagcagca atgtgcattt
    901 gtttattcct tatcgctgtt gtaatgtatt tagatcaatc attcacacct acgcttgtgg
    961 cgacacttgt gattgtttac aatggtggtt tcgggtatag ttgggggtcca attggattcc
   1021 ttatcccacc tgaagtatat cccttatcag ttagagccaa aggggtgttc cttgcagttt
   1081 ctaccaattg gttaagtaat tttgttgttg ggttattagc gccaathttg aaagaggaca
   1141 ttgatggaa aatgtatttg tatccagcaa tgtcatgttt aataagtata attgtagtga
   1201 tggcatacta ccctgaaacg aaagggttg aatttagagga aattgatgat atathtcaag
   1261 agthttattc cgattcfaat gtactccaaa ggatgtccta tagtcttggg attgggggagc
   1321 gaagtaagaa taccaaaag gttggaagct attcgaagat agaagaatcg gatgtggata
   1381 ccaatggaat cgaattggac ctcatcgatg atgagaccac acgaatgtta taattataga
   1441 ataggtatht acacactatg taagtagtag aaatagactg ctaaaggggc aggcattggaa
   1501 aggaaggcta gaatagtatg caagacgaaa taattataga ctcggcttaa aataaaatga
   1561 aattattggt gagggaccgt gttctgtttg aacatgtcat athttatgtg cagtctgaa

```

//



25.1 Contig 794 - CTGs corrected (1619 bps)

LOCUS 25.1_Contig_3097 2688 bp DNA linear SYN 16-JUN-2016
 DEFINITION Similar to stipitis XUT1
 ACCESSION 25.1_Contig_3097
 KEYWORDS .
 SOURCE Unknown.
 ORGANISM Unknown
 Unclassified.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 2688)
 AUTHORS Self
 JOURNAL Unpublished.
 COMMENT SECID/File created by SciEd Central, Scientific & Educational Software
 FEATURES Location/Qualifiers
 CDS 621..2342
 /gene="Similar to stipitis XUT1"
 /SECDrawAs="Gene"

ORIGIN

```

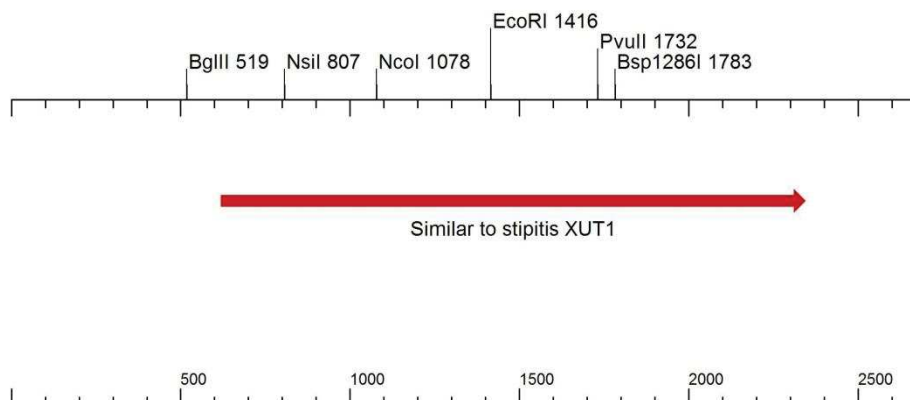
1 ttaagagaca gcatctgtat ttccccttc cttgtttcta tcgttcttag gtacactttc
61 tgcaaatgtg taaccgtggt ttcagattaa ttatgctct ccagaattgt taattgttcc
121 cgacaacata tttttccag cgaacaatca attccccag aaaataataa cgtggatatt
181 tttttaaaca tattccatgc tcaaaaaata accaggaaaa attacacctt gaaaaagaaa
241 ttccgaaata ttgtacttc caggaaggtt gaccatttt cgtgggggaa atgcagacat
301 ttttttggg gtgtgcggtt tattattaag acatgacaca taggtagaaa attttttaac
361 actaaagatg acggcccaga ttatttttta atgcacgta ttattttttt agattctttt
421 taaaaaatta atgcggtttt tccaaaagta catactctct aattgatgtt tattgagggg
481 attttctttt tgtgtgggga gaatgacct tgaaatagag atcttcgaaa ctataaatat
541 gcttccatat cccagtaat tcgtttcaa attttgaat cccatcaata cattttacat
601 caaatacatt ataatacaaa atgcacggcg gtggtgatgg aaatgatgtg caagaactca
661 ttgcacaaaa gcgtttcaa gttgctggta agccaggat ctctggttta gttgcaaaaa
721 gaaagtcctt ctttattgct atctttgctt cccttggtgg tttagtctat ggttataacc
781 aaggatgtt cggtcaaatt tccggtatgc attctttctc ggaagctgct ggtgttggtg
841 agattcaaga taatccaacc ttacaaggtt tattgacttc tttttggaa ttgggtgcct
901 gggttggtgt cttaatgaac ggttacgttg ctgatagagt aggtagaaga tgggtcctcg
961 tatttggtgt catctggttt attgtcgggt ttattattca agcttgatcc cacggtaggt
1021 actacgattt cattcttgcc ggtagattaa ttgtcgggtt ggggtgctcgt gttctttcca
1081 tggttgtccc attatataac gctgaagctt ccccaccaga aattagaggt tcttttagttg
1141 ctttacaaca attagccatt acttcggta ttatgatttc atattggatt acttacggta
1201 ctaactttat tggtggtact ggtgaaggtc aaagtctgc cagttgggta gttccaattt
1261 gtattcaaat ggtccagct ttaatcttag gttcctgtat tttcttaatg cctgaatctc
1321 caagatggtt gatgaacgaa ggtcaagaag aaagatggtt agatgtttta gctaacttaa
  
```

```

1381 gaggattaga cagaaacaac gatttagttc aaatggaatt cttgaaatg aaggctcaaa
1441 agttattcga aaaggaatta gaagtcactg cttaccaga cttacaagat ggttctgctt
1501 cttctaaatt caagattggt ttcttacaat ataagtctat gattactcac tactctacct
1561 tcaagagagt tgctgttgcg tgtttaatta tgactttcca acaatggact ggggttaact
1621 ttattttgta ctatgctcca ttcattttca aatctttagg tttatctggt caaactaact
1681 ctttgtagc ttctgggtgt gtcgggtatt tcatgttcct tgctactatt ccagctgtct
1741 tatgggtcga tcaattaggt agaaaaccag tcttaatctc tgggtgctctt atcatgggta
1801 tgtgtcattt cattgtcggg ggtatcttag gtggttacgg tggtgacttt acgggtcact
1861 ccggagctgg ttgggctgcc gttgtcttta tttgggtttt cgccattgct ttcggttact
1921 cttggggctc atgtgcttgg gtcattgttg ccgaagtctt cccattaggt ttaagagcta
1981 aggggtgttc catcggtgca tctgctaact ggttaaataa cttcgctggt gccatgtcta
2041 cccagattt cgttgctcgt gccacctatg gtgcttacat cttcttaggt ttgatgtgtg
2101 ttttcggtgc tgcttacgtt ctcttctca ctccagaaac caaaggtaga acctagatg
2161 aaattgatga attatcggt gatactctg gtacttcaa gagagaagct gaaattcaca
2221 accgtatcct tagagaagtc ggattattag aattgatggg tattgaagat ttagaatccg
2281 accacaagaa tgaagtagc tacgctgaag gtaaggctgt tgctgaatct gaaagtaact
2341 aagagaactg gattctttta accattaagt agtttacttc ttttcttac tattttaaac
2401 ataccattgc atagatatgt tactaattat attgtttata atttaattac atttaataaa
2461 tttaaagctt aatctaactg aaatttgggg caattgacta acgccctaac cttaccgcaa
2521 ctctcatta agttaataaa tttagaatat ttttccgga ctaattcaat caaccactcg
2581 atcatacaaa ttcctcgatg atcaatgaat gaaacaaacg ctccccacaa ttcgaatttc
2641 aagtcagccg taatgatatt tttcgatcat aaaacgttat tatttaag

```

//



25.1 Contig 3097 (2688 bps)

9.2 Fermentação do SGH da linhagem YRH1490

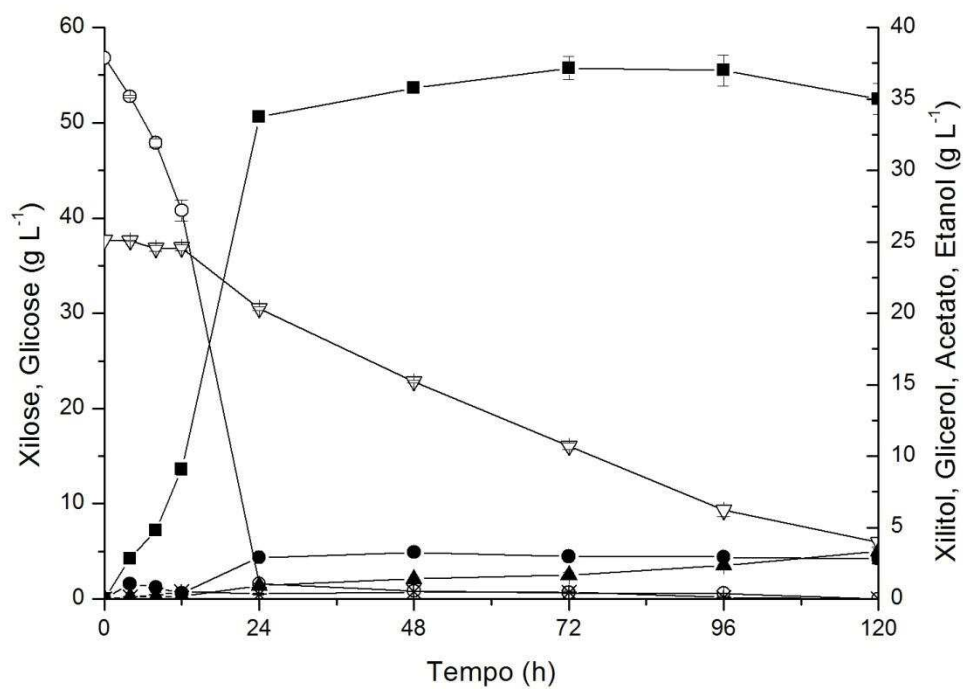


Figura A1. Cinética da fermentação em SGH sob condições de micro-aerofilia da linhagem YRH1490. Xilose (Δ); Glicose (\circ); Xilitol (\blacktriangle); Glicerol (\bullet); Acetato (\times); Etanol (\blacksquare). SGH (90%) foi composto por (em g L^{-1}): glicose, 56,8; xilose, 37,7; arabinose, 4,2; ácido acético, 5,2; HMF, 0,5 e furfural, 1,5. Uréia (38 mM) foi adicionada como fonte de nitrogênio.

10. ANEXOS

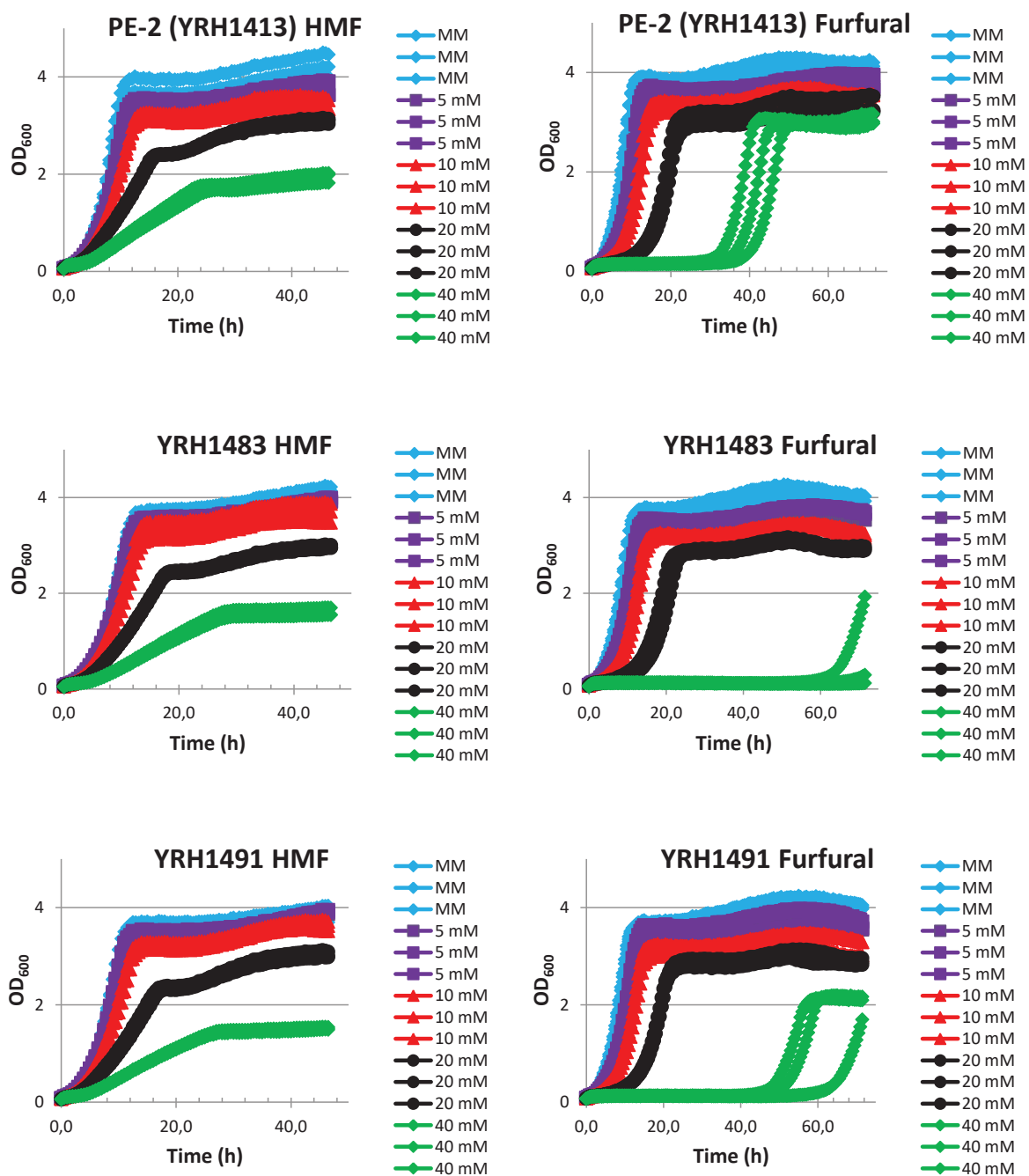


Figura A2. Curvas de crescimento no Bioscreen das linhagens diploide selvagem YRH1413 e haploide e diploide isogênicas YRH1483 e YRH1491 sob aumento da concentração dos inibidores HMF e furfural. Experimento realizado por Jeffrey Mertens, USDA-ARS, NCAUR, Peoria, IL, USA.