



NOVOS TRANSPORTADORES DE POLIÓIS EM *Debaryomyces hansenii*

Iliana Bento Pereira

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em

Engenharia Alimentar

Orientador: Doutora Catarina Paula Guerra Geoffroy Prista

Co-orientador: Doutora Maria da Conceição da Silva Loureiro Dias

Júri:

Presidente: Doutora Maria da Conceição da Silva Loureiro Dias, Professora Catedrática Convidada do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa.

Vogais: Doutora Margarida Gomes Moldão Martins, Professora Auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa.

Doutor Manuel José de Carvalho Pimenta Malfeito Ferreira, Professor Auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa.

Doutora Catarina Paula Guerra Geoffroy Prista, Investigadora Auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa.

Lisboa, 2011

AGRADECIMENTOS

Uma vez finalizado este trabalho, gostaria de agradecer a todos os que contribuíram, de alguma forma, para a sua realização:

Começo por duas pessoas muito especiais e que marcaram definitivamente a minha vida. À Professora Doutora Maria da Conceição Loureiro Dias, por me ter trazido de volta ao mundo da Microbiologia e me ter proporcionado voltar a vestir a bata. Pelo voto de confiança, carinho e sabedoria partilhada ao longo da minha permanência no seu laboratório. E, claro, à Doutora Catarina Prista que nunca lhe poderei retribuir tudo o que me ensinou, toda a paciência, dedicação e amizade. A ela, um agradecimento especial, pela sua orientação, força de vontade e incentivo nos dias “menos bons”. Por me ajudar a entender que em Ciência é preciso lidar com a inexistência de resultados (por todos os PCR, electroforeses e transformações “azaradas”). Obrigada, a ambas, pelo vosso contributo no meu desenvolvimento profissional mas também pessoal.

Aos colegas do laboratório de Bioenergética Microbiana do Instituto Superior de Agronomia, pela partilha de conhecimentos, companheirismo, bom humor e amizade. À Maria José Leandro e Ana Madeira pela troca de experiências, resultados e ideias em torno do projecto. Ao Tiago Viana pelos novos conhecimentos e experiências que adquiri no grande mundo da cerveja. À Cláudia Valente e Mafalda Torres pelos momentos vividos fora do laboratório. E todos aqueles que tive a sorte de conhecer e partilhar a bancada: Vanessa Salvador, Luís Leitão, Sara Cabral, Andreia de Almeida e a Paula Martins. Não esquecendo a equipa da Cooking.Lab em especial à Susana Dias, Joana Viegas e Joana Moura por demonstrarem que na cozinha se pode inovar, criar e estimular os sentidos.

Um agradecimento também aos colegas dos laboratórios de Microbiologia, Fisiologia Vegetal e Genética do Instituto Superior de Agronomia, pela respectiva cooperação e partilha de equipamento.

À Doutora Sara Monteiro e à Doutora Alexandra Carreira pela compreensão e apoio demonstrado nestes últimos meses.

E finalmente, aos meus pais e a minha irmã pela paciência nos meus dias de mau humor e pelo ombro amigo sempre presente.

A todos o meu MUITO OBRIGADA.

RESUMO

Novos transportadores de polióis em *Debaryomyces hansenii*

A utilização de bioetanol lignocelulósico é uma das alternativas aos combustíveis fósseis embora ainda seja economicamente inviável, devido à incapacidade de *Saccharomyces cerevisiae* para metabolizar pentoses presentes na fracção hemicelulósica e ao baixo rendimento obtido.

Neste trabalho, seguiu-se uma abordagem molecular com o objectivo de construir estirpes de *S. cerevisiae* geneticamente modificadas expressando genes que codificam transportadores de polióis, rentabilizando o uso da fracção hemicelulósica, produzindo não só bioetanol mas também outros produtos de maior valor acrescentado, tal como xilitol.

A pesquisa bibliográfica para espécies de levedura capazes de assimilar polióis revelou um número restrito de espécies ascomicetas pertencentes aos géneros *Candida*, *Pichia* e *Debaryomyces* com potencial interesse para o melhoramento da produção de bioetanol.

A fim de identificar transportadores de polióis, realizou-se uma pesquisa BlastP no genoma *D. hansenii* CBS 767, seleccionando ORFs que foram clonadas e caracterizadas em *S. cerevisiae*. A presença de actividade de simporte poliol(açúcar)/H⁺ foi avaliada para 18 substratos com base na alcalinização externa de uma suspensão não-tamponizada de células após um pulso de poliol(açúcar).

Neste trabalho, foram clonadas quatro ORFs e caracterizados dez possíveis transportadores. Quatro destes mostram actividade de simporte (glicerol/H⁺, galactitol/H⁺, sorbitol/manitol/ribitol/arabitol/H⁺). Os restantes não revelaram simporte para nenhum dos polióis/açúcares testados.

Palavras-chave: Resíduos lignocelulósicos, Bioetanol, Polióis, *Debaryomyces hansenii*.

*Orientador: Catarina Prista, PhD – Instituto Superior de Agronomia; Universidade Técnica de Lisboa

ABSTRACT**New polyol transporters from *Debaryomyces hansenii***

Bioethanol production from lignocellulosic residues is a promising alternative for fossil fuels. However, it is still economically unviable due to the incapability of the main fermentative yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, to ferment pentoses from hemicelluloses.

In this work, a molecular approach was followed, as a contribution to construct genetically modified strains of *S. cerevisiae* expressing putative polyol transporters, in order to upgrade the hemicelluloses fermentation by producing simultaneously plus-valuable dietetical polyols for food industry, such as xylitol.

A bibliographic screening for yeast species able to assimilate polyols revealed a restricted number of ascomycetes among the genus *Candida*, *Debaryomyces* and *Pichia* with potential interest as sinks of useful genes to improve polyol release.

To identify polyol transporters, a BlastP search on *D. hansenii* CBS 767 genome was performed, followed by cloning and characterization in *S. cerevisiae*. The presence of polyol(sugar)/H⁺ symport activity was evaluated for 18 substrates based on the external alkalinization of unbuffered cell suspensions upon polyol(sugar) addition.

In the present work 4 ORFs were cloned and 10 were characterized. Polyol/H⁺ symport activity (glycerol/H⁺, galactitol/H⁺, sorbitol/mannitol/ribitol/arabitol/H⁺) was detected in some of the strains tested.

Key-words: Lignocellulosic waste, Bioethanol, Polyols, *Debaryomyces hansenii*

*Supervisor: Catarina Prista, PhD – Instituto Superior de Agronomia; Technical University of Lisbon

ABSTRACT**New polyol transporters in *Debaryomyces hansenii***

Due to increasing prices of fossil fuels and to the exhaustion of the natural resources, bioethanol produced by biorefineries is an interesting alternative energy source. Cell factories involved in ethanol production use fermentative processes for full conversion of lignocellulosic materials (forestry and agro-industrial by-products) into ethanol.

Nevertheless, one of the major fractions of lignocellulosic residues (hemicellulosic fraction, rich in pentoses such as xylose and arabinose) is not completely fermented by the main fermentative yeast *Saccharomyces cerevisiae*. This leads to low bioethanol yields and, consequently, to the economical unviability of the process, being particularly relevant in the case of xylan-rich lignocellulosic residues.

Genetically modified *S. cerevisiae* strains have already been tentatively used in these processes, but molecular improvements are still necessary for an efficient fermentation process. The step of transport of nutrients and final products through the plasma membrane certainly deserves more attention.

Xylitol comes up as a valuable by-product from xylan-rich lignocellulosic residues fermentation due to its sweetening power and its dietetic and anticariogenic properties. Ethanol is efficiently produced from hexoses by *S. cerevisiae* and xylose-assimilating enzymes from other organisms have been successfully cloned in *S. cerevisiae* generating strains able to produce xylitol from xylose. Nevertheless, the uptake of xylose and release of xylitol from the engineered cells of *S. cerevisiae* is certainly limited by the transport step, and strains with more efficient transporters are required. An interesting approach is to use natural pentoses fermentors, like *Candida intermedia* that has a polyol/H⁺ symport and *Debaryomyces hansenii* that can metabolize D-xylose into xylitol.

This work was part of the project "XILITOLOUT - To promote xylitol release to improve bioethanol business" conceived with the broad objective of improving the feasibility of the overall process of bioethanol production and the specific objective of constructing improved *S. cerevisiae* strains able to transport polyols, in order to upgrade the hemicellulosic fraction fermentation by producing simultaneously plus-valuable and dietetical polyols for food industry, such as xylitol.

A molecular approach was followed to construct genetically modified strains of *S. cerevisiae* expressing genes encoding putative polyol transporters from the natural pentose fermentors. A preliminary bibliographic screening among all the yeast species described in the literature was performed in order to identify natural polyol assimilating yeast potentially interesting as a sink of genes for polyol transporters.

This screening revealed a restricted number of ascomycete and basidiomycete species able to assimilate a large range of polyols. This number is even more restricted for species capable to assimilate xylitol and arabitol, the two main by-products of bioethanol production from hemicellulosic residues. Among the genera more represented are *Candida* (37 species), *Pichia* (21 species) and *Debaryomyces* (8 species) from the group of ascomycete yeasts, and *Rhodotorula* (9 species), *Trichosporon* (7 species) and *Cryptococcus* (6 species) from the group of basidiomycete yeasts.

Among these species, *Debaryomyces hansenii* is a xylitol assimilating yeast whose genome sequence and annotation is available at Genolevure Consortium, being particularly attractive for gene search.

To identify putative polyol transporters, a BlastP search on *D. hansenii* CBS767 genome was performed. Ten ORFs were selected and cloned (4 cloned in the present work) into pUG35 shuttle vector with C-terminal GFP tagging and expressed in *S. cerevisiae* YSH 1172 strain, that was previously shown not to transport sorbitol.

After observing the correct co-localization and expression of “putative transporter”-GFP in the plasma membrane by fluorescence microscopy, the presence of polyol(sugar)/H⁺ symport activity in the ten cloned transporters was evaluated. A wide multiplicity of both sugars (7) and polyols (11) was tested.

Four of these strains present polyol/H⁺ symport activity. Two strains, display polyols/H⁺ symporters with a broad variety of substrates, sorbitol/mannitol/ribitol/arabitol for strain MLY12 and sorbitol/mannitol/ribitol/arabitol plus galactitol for strain MLY9. Two others polyol/H⁺ symporters presented a narrow substrate specificity, for glycerol (MLY8) and for the unusual substrate galactitol (MLY22). No symport activity was detected in six strains for the 18 substrates tested. The kinetic characterization of the symporters revealed a symporter presenting low capacity for galactitol (MLY22) and two symporters with low capacity for sorbitol/mannitol/ribitol/arabitol and much higher affinity for mannitol and D-arabitol than for the other two polyols (respectively, MLY9 and MLY12).

The presented work represents a contribution for the annotation of several genes from *D. hansenii* whose function had not yet been identified, improving the characterization of polyol transport through the plasma membrane of this biotechnologically interesting yeast.

Key-words: Lignocellulosic waste, Bioethanol, Polyols, *Debaryomyces hansenii*

*Supervisor: Catarina Prista, PhD – Instituto Superior de Agronomia; Technical University of Lisbon

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS	I
RESUMO	II
ABSTRACT	III
ÍNDICE	VI
LISTA DE TABELAS	IX
LISTA DE FIGURAS	X
LISTA DE ABREVIATURAS	XII
INTRODUÇÃO GERAL	1
1. Apresentação e enquadramento do tema	1
2. Microrganismos produtores	6
2.1 Bactérias	7
2.2 Leveduras	8
2.3 Fungos	9
2.4 Algas	10
2.5 Modificação de microrganismos	11
3. Bioconversão de pentoses em etanol por <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	13
4. Polióis	15
4.1 Produção microbiana de polióis	18
4.1.1 Microrganismos produtores	18
4.1.2 Transporte de xilitol	19
5. <i>Debaryomyces hansenii</i>	20
6. Objectivos da dissertação	22
MATERIAL E MÉTODOS	23
1. Microrganismos, meios de cultura e condições de crescimento.....	23
1.1 Quantificação da biomassa	24
1.2 Congelação de material biológico	24
2. Clonagem e expressão heteróloga dos genes de <i>Debaryomyces hansenii</i>	25
2.1 Extracção de DNA genómico	25
2.2 Extracção de DNA plasmídico.....	26
2.2.1 Extracção com kit “QIAprep Spin Miniprep”	26
2.2.2 <i>Insert Analysis</i>	26
2.2.3 <i>Clone analysis</i>	27
2.2.4 DNA plasmídico de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> para PCR de colónia.....	27

2.3	Reacção em cadeia da polimerase - PCR.....	27
2.3.1	<i>Primers</i>	28
2.3.2	PCR gradiente	29
2.3.3	PCR rotina	29
2.3.4	PCR confirmação dos fragmentos	30
2.4	Purificação de DNA.....	30
2.5	Clonagem dos fragmentos de <i>Debaryomyces hansenii</i> amplificados	30
2.5.1	Hidrólise com enzimas de restrição.....	30
2.5.2	Construção pUG35-fragmento	31
2.5.3	Transformação de <i>Escherichia coli</i>	32
2.5.3.1	Preparação de células competentes de <i>Escherichia coli</i> DH5 α	32
2.5.3.2	Transformação de células competentes de <i>Escherichia coli</i> DH5 α	32
2.5.4	Transformação de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	33
2.6	Análise de DNA.....	34
2.6.1	Electroforese.....	34
2.6.2	Quantificação.....	34
2.6.3	Sequenciação automática.....	35
2.6.4	Bioinformática	35
3.	Ensaio Fisiológicos.....	36
3.1	Microscopia de fluorescência.....	36
3.2	Ensaio de crescimento.....	36
3.3	Avaliação do influxo de protões através da membrana	36
	RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
1.	Pesquisa bibliográfica – assimilação de polióis	39
2.	Clonagem e expressão heteróloga dos genes de <i>Debaryomyces hansenii</i>	43
2.1	Seleção dos genes de <i>Debaryomyces hansenii</i>	43
2.2	Desenhos dos <i>primers</i>	44
2.3	Optimização da reacção de PCR.....	48
2.4	Construção dos plasmídeos recombinantes	50
2.5	Transformação de <i>Escherichia coli</i> DH5 α	51
2.5.1	Seleção das colónias contendo o produto amplificado	52
2.6	Transformação de <i>S. cerevisiae</i> YSH 1172 e seleção de transformantes	54
2.7	Análise de presença de codões ambíguos das sequências obtidas	57
3.	Estudos fisiológicos.....	57

3.1 Detecção da presença de actividade de simporte polióis/H ⁺	57
3.2 Cinéticas	62
CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS	63
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67
ANEXO I	78
ANEXO II	80
ANEXO III	82
ANEXO IV	83
ANEXO V	99
ANEXO VI	107

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Diferentes tipos de biorefinarias e respectivas características	2
Tabela 2 – Composição geral dos resíduos lignocelulósicos	4
Tabela 3 – Vantagens e desvantagens de microrganismos naturais na produção industrial de etanol	6
Tabela 4 – Produção industrial de polióis	15
Tabela 5 – Polióis autorizados na União Europeia	16
Tabela 6 – Características de alguns polióis	17
Tabela 7 – Classificação Taxonómica de <i>D. hansenii</i>	20
Tabela 8 – Microrganismos e plasmídeo utilizados no trabalho	24
Tabela 9 – Primers utilizados na amplificação dos genes de <i>D. hansenii</i>	28
Tabela 10 – Primers utilizados na PCR de confirmação dos fragmentos clonados	28
Tabela 11 – Composição reaccional para uma reacção de PCR num volume de 50 µL	29
Tabela 12 – Composição reaccional para a realização de uma digestão enzimática	31
Tabela 13 – Composição reaccional para a realização da reacção ligação	31
Tabela 14 – Componentes da mistura de transformação de <i>S. cerevisiae</i>	33
Tabela 15 – Substratos testados nos ensaios de simporte com H ⁺	38
Tabela 16 – Percentagem de espécies de leveduras que assimilam polióis	40
Tabela 17 – Géneros a que pertencem as espécies que assimilam L-Arabitól e Xilitól	41
Tabela 18 – Assimilação de diversos polióis por leveduras	42
Tabela 19 – Informações sobre os genes de <i>D. hansenii</i> CBS 767 seleccionados neste trabalho	44
Tabela 20 – Primers utilizados na PCR de confirmação dos fragmentos clonados	46
Tabela 21 – Primers utilizados na amplificação dos genes de <i>D. hansenii</i>	47
Tabela 22 – Tamanho dos fragmentos de DNA esperados e enzimas utilizadas no perfil enzimático de cada construção	53
Tabela 23 – Número de codões CUG nos genes de <i>D. hansenii</i> estudados neste trabalho e a sua provável posição na topologia da proteína	57
Tabela 24 – Rastreio dos transformantes <i>S. cerevisiae</i> obtidos no âmbito do projecto PTDC/AGR-CFL/71792/2006	61
Tabela 25 – Actividade de simporte nos transformantes de <i>S. cerevisiae</i> e respectivos parâmetros de cinética	62
Tabela 26 – Assimilação de polióis pelas leveduras do Filo Ascomiceta	83
Tabela 27 – Assimilação de polióis pelas leveduras do Filo Basidiomiceta	94

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Distribuição geográfica da produção de biodiesel e bioetanol no mundo no ano de 2009 .	1
Figura 2 – Processo de produção de bioetanol a partir de resíduos lignocelulósicos .	5
Figura 3 – Utilização dos açúcares existentes nos resíduos hemicelulósicos por microrganismos na produção de biocombustíveis .	7
Figura 4 – Vias metabólicas da D-xilose em bactérias e leveduras .	7
Figura 5 – Estirpes construídas através de engenharia genética para a produção de etanol a partir de pentoses .	12
Figura 6 – Árvore filogenética de genes de <i>Candida glabrata</i> , <i>Kluyveromyces lactis</i> , <i>Debaryomyces hansenii</i> , <i>Yarrowia lipolytica</i> , <i>Ashbya gossypii</i> , <i>Candida albicans</i> , <i>Scheffersomyces stipitis</i> e <i>Saccharomyces cerevisiae</i> cuja função continua indeterminada .	22
Figura 7 – Representação esquemática do programa de PCR gradiente utilizado na amplificação dos genes de <i>D. hansenii</i> .	29
Figura 8 – Esquema de montagem utilizada para observar/caracterizar simportes com H ⁺ presentes na membrana plasmática dos transformantes de <i>S. cerevisiae</i> .	37
Figura 9 – Exemplo da reconstituição do pUG35 com o fragmento 0902 amplificado, após digestão com as enzimas de restrição <i>SpeI</i> e <i>Clal</i> .	47
Figura 10 – Perfil de amplificação por PCR gradiente .	49
Figura 11 – Representação esquemática do programa de PCR utilizado na amplificação dos genes de <i>D. hansenii</i> .	50
Figura 12 – Perfil de ampliação dos fragmentos em estudo obtido através de PCR .	50
Figura 13 – Gel de electroforese destacando os fragmentos obtidos após digestão enzimática .	51
Figura 14 – Exemplo dos padrões obtidos por Insert Analysis de alguns transformantes de <i>E. coli</i> .	52
Figura 15 – Amplificação dos fragmentos por PCR dos transformantes de <i>E. coli</i> .	53
Figura 16 – Perfis de restrição dos transformantes de <i>E. coli</i> .	54
Figura 17 – Reações de PCR para confirmação da clonagem dos fragmentos nos transformantes de <i>S. cerevisiae</i> analisadas em gel de agarose .	56
Figura 18 – Efeito sobre o pH extracelular provocada pela adição de maltose .	58
Figura 19 – Efeito sobre o pH extracelular provocada pela adição de eritritol, galactitol e xilitol .	59
Figura 20 – Efeito sobre o pH extracelular provocada pela adição de A) xilose, xilitol, L-arabitol, ribitol, manitol e maltose (setas) a uma concentração final de 10 mM em células <i>S. cerevisiae</i> 6490-19, na ausência de 1M KCl quando cultivadas em YNB com maltose e B) xilitol, sorbitol e manitol (setas) a uma concentração final de 10 mM em células <i>S. cerevisiae</i> MLY9, na presença de 1M KCl quando cultivadas em YNB com maltose. .	60
Figura 21 – Sequência completa do plasmídeo pUG35 .	81
Figura 22 – Mapa de restrição do vector pUG35 .	81

Figura 23 – Especificações e tamanhos de fragmentos dos marcadores de DNA utilizados neste trabalho	82
Figura 24 – Alinhamento da sequência DEHA2G06490g de <i>D. hansenii</i> com o resultado da sequenciação do plasmídeo extraído de <i>E. coli</i> da colônia 6490-1 e 6490-53	100
Figura 25 – Alinhamento da sequência DEHA2E00902g de <i>D. hansenii</i> com o resultado da sequenciação do plasmídeo extraído de <i>E. coli</i> da colônia 902-94	102
Figura 26 – Alinhamento da sequência DEHA2E00726g de <i>D. hansenii</i> com o resultado da sequenciação do plasmídeo extraído de <i>E. coli</i> da colônia 0726-63 e 0726-95	104
Figura 27 – Alinhamento da sequência DEHA2B00528g com o resultado da sequenciação do plasmídeo extraído de <i>E. coli</i> da colônia 0528-40 com a construção pUG35- DEHA2B00528g	106
Figura 28 – Alinhamento do resultado da sequenciação do transformante de <i>S. cerevisiae</i> 0528-26/0528-31 com a base de dados da NCBI	108
Figura 29 – Alinhamento do resultado da sequenciação do transformante de <i>S. cerevisiae</i> 0726-13 com a base de dados da NCBI	110
Figura 30 – Alinhamento do resultado da sequenciação do transformante de <i>S. cerevisiae</i> 6490-19 com a base de dados da NCBI	112

LISTA DE ABREVIATURAS

ABREVIATURAS	DESIGNAÇÕES COMPLETAS
°C	Graus Celsius
atm	Atmosfera
ATP	Adenosina-5'-trifosfato
Blast	<i>Basic local alignment search tool</i>
CBS	<i>Centraalbureau voor Schimmelcultures</i>
CBP	<i>Consolidated bioprocessing</i>
C-G	Citosina-Guanina
D.O. _{640nm}	Densidade óptica medida ao comprimento de onda de 640nm
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxinucleósido 5'-trifosfatos
EDTA	Ácido etilenodiaminotetraacético
ETBE	Bioéter etil-ter-butílico
EUA	Estados Unidos da América
g	Força gravitacional ou aceleração da gravidade
GFP	Proteína fluorescente verde
H ⁺	Ião hidrogénio
HCl	Ácido clorídrico
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
KCl	Cloreto de potássio
K _m	Constante de <i>Michaelis</i>
L	Litro
LB	Meio <i>Luria-Bertani</i>
M	Molar
MFS	<i>Major Facilitator Superfamily</i>
fwd	Directo
mg	Miligrama
milliQ	Ultra pura
mL	Mililitro
mM	Milimolar
MTBE	Bioéter etil-terc-metílico
NAD ⁺	Dinucleótido de nicotinamida e adenina (oxidado)
NADH	Dinucleótido de nicotinamida e adenina (reduzido)
NaOH	Hidróxido de sódio

NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
ORF	<i>Opening Read Frame</i>
pb	Pares de bases
PCR	Reacção em Cadeia da Polimerase
PEG	Polietilenoglicol
pH	Potencial hidrogeniónico
pmol	Picomoles
PP	Via das pentoses fosfato
p.s.	Peso seco
p/v	Peso por volume
PYCC	<i>Portuguese Yeast Culture Collection</i>
rev	Inverso
rpm	Rotações por minuto
SDS	Dodecilsulfato de sódio
SHF	<i>Separated Hydrolysis and Fermentation</i>
SOB	<i>Super Optimal Broth</i>
SOC	<i>Super Optimal broth with Catabolite repression</i>
SE	Sorbitol-EDTA
SSF	<i>Simultaneous saccharification and fermentation</i>
SS-carrier DNA	<i>Single-stranded carrier DNA</i>
SSCF	<i>Simultaneous saccharification and co-fermentation</i>
sp.	<i>Specie</i>
TAE	Tris-Acetato-EDTA
TE	Tris-EDTA
T _m	<i>Primer Melting Point</i>
TMD	Domínio transmembranar
Triton X-100	Éter p-t-octilfenil polioxietileno
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
U	Unidade enzimática
UV	Ultravioleta
V	Volts
v/v	Volume por volume
V _{max}	Velocidade máxima
var.	Variedade
XDH	Xilitol desidrogenase
XI	Xilose isomerase
XR	Xilose redutase

XK	Xilulocinase
YNB	<i>Yeast Nitrogen Base</i>
YPD	<i>Yeast Extract Peptone Dextrose</i>
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µm	Micrometro

ABREVIATURAS DE NOMES DE GÉNEROS

<i>C.</i>	<i>Candida</i>
<i>Cl.</i>	<i>Clostridium</i>
<i>D.</i>	<i>Debaryomyces</i>
<i>E.</i>	<i>Escherichia</i>
<i>Pa.</i>	<i>Pachysolen</i>
<i>S.</i>	<i>Saccharomyces</i>
<i>Sc.</i>	<i>Scheffersomyces</i>
<i>Y.</i>	<i>Yarrowia</i>
<i>Z.</i>	<i>Zymomonas</i>

INTRODUÇÃO GERAL

1. APRESENTAÇÃO E ENQUADRAMENTO DO TEMA

A utilização de fontes de energia alternativas tem sido uma das grandes prioridades da sociedade actual na tentativa de reduzir a dependência de combustíveis fósseis como o petróleo e gás natural [Spronsen *et al.*, 2011]. Na União Europeia foi estabelecido uma meta para 2010 de 5,75% de incorporação (em conteúdo energético) de biocombustíveis líquidos e, mais recentemente, uma incorporação obrigatória de 10% em 2020 [Hahn-Hägerdal *et al.*, 2006; Antoni *et al.*, 2007; Directiva 2003/30/CE]. Esta preocupação deve-se à crescente procura de energia para aquecimento, transportes e processos industriais. Só na União Europeia, o sector dos transportes representa mais de 30% do consumo total de energia e dependente dos combustíveis fósseis em 98%, com uma elevada percentagem de importações [Directiva 2003/30/CE], ficando extremamente vulnerável às perturbações do mercado de petróleo.

Dos combustíveis de origem renovável, os que constituem alternativas aos combustíveis convencionais são o etanol e seus derivados (ETBE – bioéter etil-ter-butílico e MTBE – bioéter etil-ter-metílico), bem como os ésteres metílicos de óleos vegetais – biodiesel. Através da Figura 1 é possível ter uma perspectiva da distribuição geográfica da produção de biocombustíveis à escala global, sendo o biodiesel produzido principalmente no Brasil e nos EUA, mas também em diversos países Europeus, com especial relevância para a Alemanha, França, Itália e Espanha. No caso do bioetanol, os maiores produtores são Brasil (a partir de cana-de-açúcar) e EUA (a partir de milho), contribuindo com 88% do total produzido [ENERS Energy Concept, www.eners.ch].

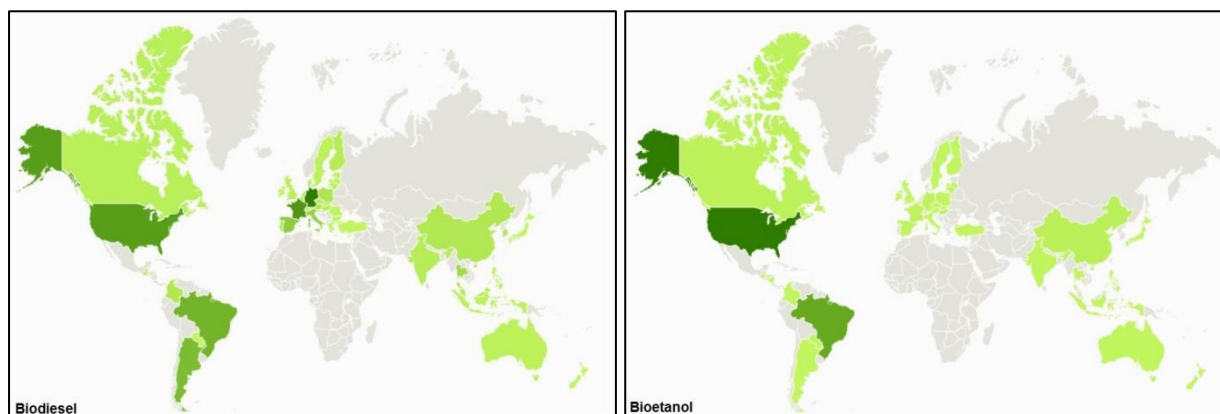


Figura 1 – Distribuição geográfica da produção de biodiesel e bioetanol no mundo no ano de 2009. Quanto maior a produção, mais intensa é a cor verde [ENERS Energy Concept, www.eners.ch].

No caso dos biocombustíveis, a classificação (popularizada) inclui os termos "primeira geração" e "segunda geração". A principal diferença entre eles é a matéria-prima utilizada. Os biocombustíveis de 1ª geração são produzidos a partir de cana-de-açúcar (açúcares), grãos ou sementes sobretudo ricos em amido. Os três principais tipos de biocombustíveis de 1ª geração utilizados comercialmente a nível mundial são o biodiesel (bio-ésteres), o bioetanol e o biogás. A 2ª geração de combustíveis é produzida a partir de uma ampla gama de recursos, tais como resíduos lignocelulósicos resultantes da agricultura (por exemplo, palha, espigas e talos de milho, bagaço, resíduos de trigo, palha de arroz), resíduos florestais e resíduos das indústrias de madeira e papel [Demirbas, 2009; Naik *et al.*, 2010].

Dentro dos diferentes tipos de biorefinaria para a produção de bioetanol actualmente disponíveis (termoquímica e bioquímica) a mais atractiva é a bioquímica (Tabela 1) por fermentação de materiais lignocelulósicos. No entanto, ainda não é utilizada comercialmente em nenhum país, encontrando-se em fase investigação ou em fase piloto [Carvalho *et al.*, 2008; Naik *et al.*, 2010].

Tabela 1 – Diferentes tipos de biorefinarias e respectivas características [Carvalho *et al.*, 2008].

Plataforma de biorefinaria	Matérias-primas	Processo	Produtos	Estado de desenvolvimento
Bioquímica	Biomassa lignocelulósicas e de amido	Hidrólise química e enzimática	Produtos químicos de valor acrescentado (a partir de açúcar e lenhina)	Laboratório
		Fermentação Biotransformação	Etanol combustível	Planta-piloto em larga escala
		Processos químicos e catalíticos	Calor e electricidade (a partir lenhina)	Comercial (à base cana de açúcar e amido)

Os biocombustíveis de 1ª geração constituem, de momento, a única alternativa disponível e aplicável, mas apresentam como desvantagens o uso de culturas alimentares (milho, soja, cana de açúcar, etc.) que conduz ao aumento do preço dos alimentos [Antoni *et al.*, 2007], ao agravamento da desflorestação para satisfazer a crescente procura, o impacto sobre a biodiversidade e o uso do solo [Naik *et al.*, 2010]. Por isso, a médio prazo, existe a intenção de os substituir gradualmente pelos biocombustíveis de 2ª geração e por outras formas de energia ambientalmente mais favoráveis.

Os biocombustíveis de 2ª geração, ao utilizarem “biomassa vegetal”, isto é recursos não alimentares, baratos, abundantes, não tóxicos, biodegradáveis e renováveis, estão associados a diversas vantagens [Demirbas, 2005; Naik *et al.*, 2010]:

- ambientais (redução das emissões poluentes);

- económicas (utilização de recursos baratos, redução da factura energética, promoção de actividades capazes de gerar riqueza local);
- sociais (criação de emprego, fixação de populações, combate à desertificação);
- estratégicas (diminuição da dependência energética, promoção dos recursos energéticos endógenos).

No entanto, até agora não foi possível a sua produção em larga escala de forma rentável dadas as condicionantes que se colocam à obtenção de elevados rendimentos em bioetanol que tornem estes processos lucrativos. Assim, o desafio que agora se coloca é aumentar substancialmente a produção de biocombustíveis, nomeadamente, etanol e seus derivados, através de tecnologias de produção, em larga escala, desenvolvidas ao longo dos últimos anos, a partir de matéria-prima vegetal não alimentar [Lin e Tanaka, 2006], bem como o melhoramento das estirpes produtoras.

Os materiais lignocelulósicos são mais baratos que as matérias-primas agrícolas convencionais, podem ser produzidos com menor aplicação de fertilizantes, pesticidas e energia e são uma fracção substancial dos resíduos agrícolas [Demirbas, 2005]. São compostos por três fracções formando um complexo tridimensional cuja composição varia consoante os diferentes tipos de resíduos [Hendriks e Zeeman, 2009; Sánchez, 2009; Spronsen *et al.*, 2011] (Tabela 2):

- Celulose: a unidade repetitiva é composta por duas moléculas de glucose esterificadas por ligações β -1,4-glicosídicas formando a celobiose. As moléculas de celulose unidas através de ligações de hidrogénio formam regiões cristalinas que, associadas com outros compostos da planta, tornam a celulose altamente resistente à hidrólise;
- Hemicelulose: complexo composto por uma mistura de hexoses (D-glucose, D-manose, D-galactose, L-ramnose e L-frutose), pentoses (D-xilose e L-arabinose) e ácidos urónicos (ácido D-glucurónico e ácido D-galacturónico). Os açúcares encontram-se ligados através de ligações β -1,4-glicosídicas e às vezes por ligações β -1,3-glicosídicas;
- Lenhina: polímero, aromático e hidrofóbico, que apresenta resíduos fenólicos na sua constituição, variando a sua composição com a fonte de biomassa. Surge como principal fonte de inibidores microbianos.

O processo de produção de etanol a partir de resíduos lignocelulósicos exige uma série de operações unitárias básicas, incluindo um pré-tratamento para separação dos principais componentes da biomassa e tornar as fracções, hemicelulósica e celulósica, susceptíveis ao tratamento posterior. A hidrólise (sacarificação) pode ser química e/ou enzimática, e quebra as cadeias das fracções hemicelulósica e celulósica nos seus componentes

monossacarídeos. Os açúcares serão então fermentados produzindo o bioetanol que posteriormente será recuperado por destilação [Demirbas, 2005; Lin e Tanaka, 2006; Hahn-Hägerdal *et al.*, 2007]. Além disso, a fracção correspondente à lenhina pode ser utilizada para gerar calor/energia que poderá ser utilizada durante o processo ou comercializada como um subproduto, acrescentando uma mais-valia ao processo [Wingren *et al.*, 2003; Carvalheiro *et al.*, 2008].

Tabela 2 – Composição geral dos resíduos lignocelulósicos
(adaptado de [Hendriks e Zeeman, 2009; Sánchez, 2009; Spronsen *et al.*, 2011]).

Fracção	Conteúdo (%)	Composição
Celulose	35-50%	glucose
Hemicelulose	20-35%	glucose, manose, galactose, ramnose, xilose, arabinose, ácido D-glucurónico e ácido D-galacturónico
Lenhina	5-30%	Álcoois aromáticos

A produção de bioetanol (Figura 2) engloba dois passos principais, um passo de hidrólise e um de fermentação que podem ser efectuados separadamente (SHF) ou em simultâneo (SSF). Em ambos os casos, é necessário efectuar um pré-tratamento à biomassa para tornar a celulose e a hemicelulose acessíveis [Hamelinck *et al.*, 2005].

O processo SSF, para além de reduzir o número de bioreactores no processo é o mais utilizado na produção de bioetanol de 1ª geração (a partir de milho). Nos últimos anos foram desenvolvidas diversas aplicações do processo SSF na produção de bioetanol a partir de resíduos lignocelulósicos [Olofsson *et al.*, 2008]. Uma das estratégias actuais consiste na hidrólise e co-fermentação em simultâneo (SSCF) de xilose e glucose através da utilização de estirpes *S. cerevisiae* geneticamente modificadas [Hamelinck *et al.*, 2005].

O bioprocessamento consolidado (CBP) consiste num processo onde todas as etapas de bioconversão (hidrólise e co-fermentação) são englobadas num só bioreactor usando um ou mais microrganismos [Hahn-Hägerdal *et al.*, 2006; Dashtban *et al.*, 2009] reduzindo os custos de produção. Até ao momento, não existem microrganismos ou combinações de microrganismos compatíveis disponíveis para a produção de bioetanol com altos rendimentos através do processo CBP [Hamelinck *et al.*, 2005].

A conversão biotecnológica de hidrolisados hemicelulósicos, constituídos por hexoses e pentoses, tem sido estudada com vista ao desenvolvimento de processos de produção quer de bioetanol quer de metabolitos de valor acrescentado, como o xilitol [Nobre e Lucas, 2003]. No entanto, ao contrário do que acontece na produção de etanol a partir de açúcares

e amido (biocombustíveis de 1ª geração), nos biocombustíveis de 2ª geração a fermentação ocorre num misto de diversos açúcares e na presença de inibidores - ácidos orgânicos de baixo peso molecular, derivados de furanos, compostos fenólicos e compostos inorgânicos - formados durante o pré-tratamento e/ou na hidrólise da matéria-prima [Larsson *et al.*, 2000; Nobre e Lucas, 2003].

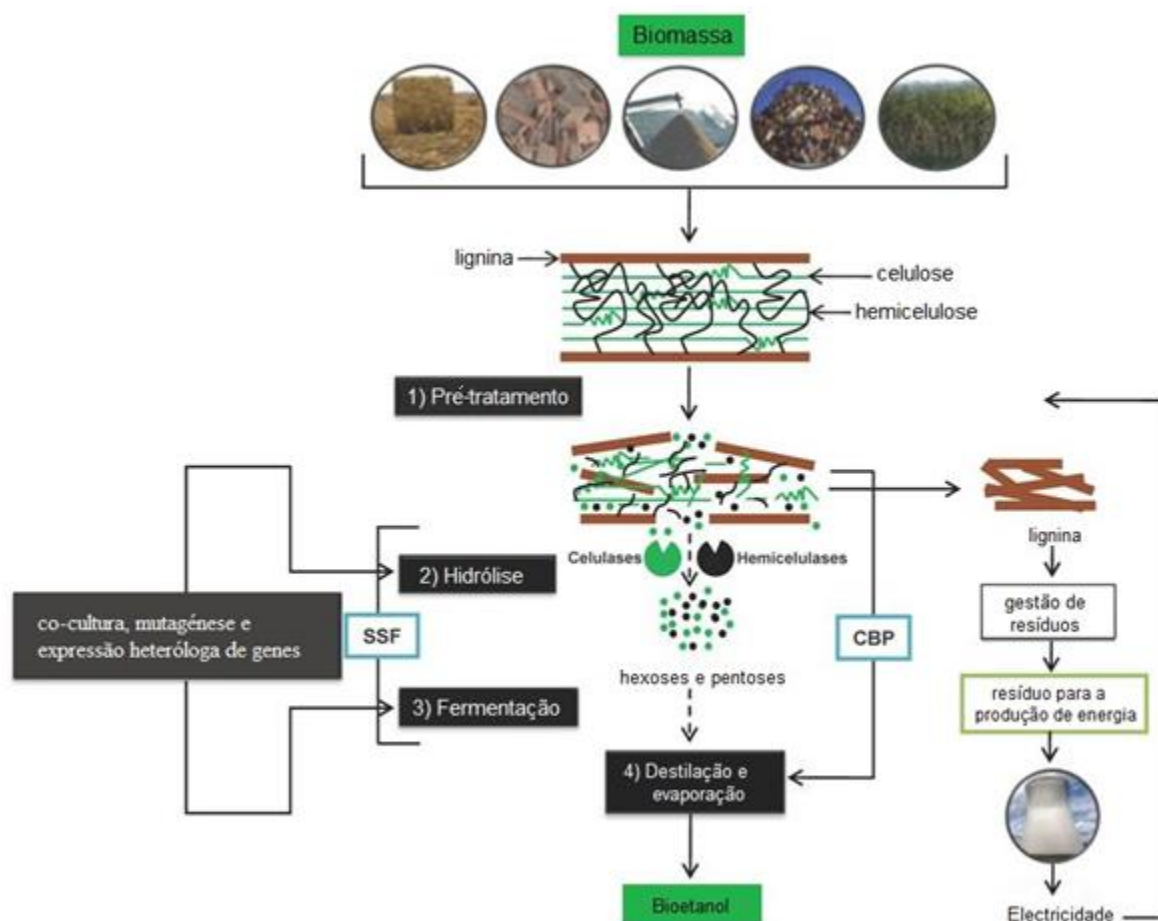


Figura 2 – Processo de produção de bioetanol a partir de resíduos lignocelulósicos (adaptado de [Dashtban *et al.*, 2009]).

Assim, a produção de bioetanol, a nível industrial, precisa ter em conta alguns dos factores que mais influenciam o preço de produção de bioetanol a partir de resíduos lignocelulósicos [Wingren *et al.*, 2003]:

- Quantidade de água utilizada no processo – minimizar a entrada de água potável no processo, tentando recircular água e assim minimizar os custos de produção;
- Tolerância aos inibidores – os microrganismos a utilizar na etapa de fermentação devem ser tolerantes aos inibidores libertados nas fases de pré-tratamento e hidrólise;
- Rendimento na produção do etanol – para a rentabilidade do processo é importante a conversão de todos os açúcares (pentoses e hexoses) presentes nas fracções celulósicas e hemicelulósicas em bioetanol.

Assim sendo, um dos requisitos mais importante é a eficácia de encontrar/desenvolver microrganismos capazes de fermentar uma variedade de açúcares, tolerar condições de stress e ter uma elevada produtividade de etanol [Zaldivar *et al.*, 2001].

2. MICRORGANISMOS PRODUTORES

Existem microrganismos que naturalmente conseguem converter açúcares em etanol, entre eles bactérias, leveduras e fungos filamentosos [Hahn-Hägerdal *et al.*, 2007]. Cada um destes grupos de microrganismos possui vantagens e desvantagens que se encontram resumidas na Tabela 3. Actualmente existem inúmeros estudos relacionados com a conversão microbiana de açúcares – pentoses e hexoses – em etanol à escala laboratorial. No entanto, a sua conversão ao nível industrial continua ainda a ser um desafio [Hahn-Hägerdal e Pamment, 2004].

Tabela 3 – Vantagens e desvantagens de microrganismos naturais na produção industrial de etanol (adaptado de [Hahn-Hägerdal *et al.*, 2007]).

Organismos	Utilização natural de açúcares					Produtos produzidos		Tolerância			O ₂	pH
	Glu	Man	Gal	Xil	Ara	EtOH	outros	Álcoois	Ácidos	Hidrolisados		
Bactérias anaeróbias	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	Neutro
<i>Escherichia coli</i>	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	Neutro
<i>Zymomonas mobilis</i>	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	Neutro
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	+	+	+	-	-	+	-	++	++	++	-	Ácido
<i>Scheffersomyces stipitis</i>	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	Ácido
Fungos filamentosos	+	+	+	+	+	+	-	++	++	++	-	Ácido

Glu – glucose, Man – manose, Gal – galactose, Xil – xilose, Ara – arabinose, EtOH – etanol, O₂ – oxigénio.

A Figura 3 mostra esquematicamente a conversão metabólica de vários açúcares presentes nos materiais hemicelulósicos. Estes açúcares são convertidos para as formas fosforiladas xilose-5-fosfato, glucose-6-fosfato, frutose-6-fosfato e glucose-1-fosfato. Posteriormente estas moléculas são eventualmente convertidas em gliceraldeído-3-fosfato, piruvato e formato. Diversos biocombustíveis podem ser produzidos, desde o biodiesel, etanol, butanol entre outros.

Sendo a D-xilose o segundo açúcar mais abundante nos materiais lignocelulósicos (logo a seguir à glucose) a sua fermentação é essencial para a rentabilização do processo de produção de bioetanol de 2^a geração [Hahn-Hägerdal *et al.*, 2007; Matsushika *et al.*, 2009].

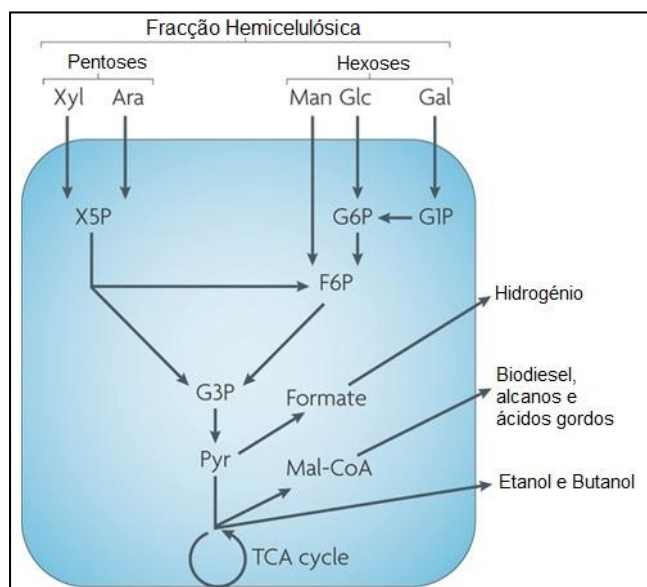


Figura 3 – Utilização dos açúcares existentes nos resíduos hemicelulósicos por microrganismos na produção de biocombustíveis (Xyl-xilose, Ara -arabinose, Glc-glucose, Man-manose, Gal-galactose, X5P-xilose-5-fosfato, G6P-glucose-6-fosfato, F6P-frutose-6-fosfato, G1P-glucose-1-fosfato, G3P -gliceraldeído-3-fosfato e Pyr-piruvato) (adaptado de [Alper e Stephanopoulos, 2009]).

Os microrganismos utilizam duas vias distintas para a conversão de xilose em xilulose (Figura 4). Uma via envolve xilose redutase (XR) e xilitol desidrogenase (XDH), enquanto a outra via envolve xilose isomerase (XI).

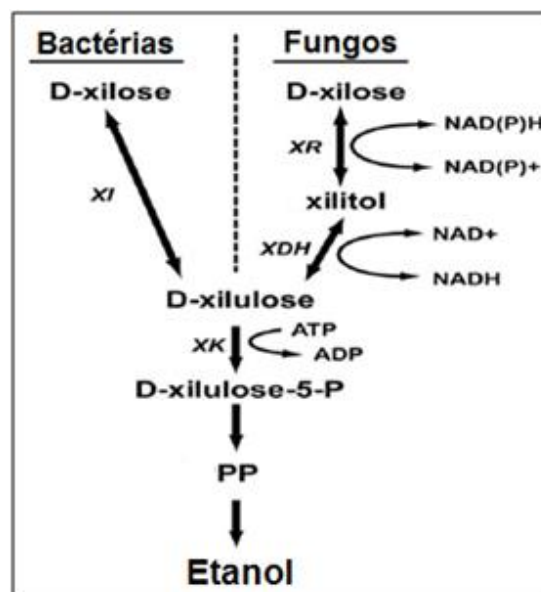


Figura 4 – Vias metabólicas da D-xilose em bactérias e leveduras (XR – xilose redutase, XDH – xilitol desidrogenase, XI – xilose isomerase, XK – xilulocinase e PP – via das pentoses fosfato) [Chandel *et al.*, 2011].

2.1 BACTÉRIAS

As bactérias anaeróbicas conseguem utilizar diversos açúcares (Tabela 3) existentes na fração hemicelulósica e produzir etanol entre outros subprodutos (ácido acético, ácido láctico, dióxido de carbono e 2,3-butanodiol). Entre elas destacam-se algumas espécies dos géneros *Klebsiella*, *Clostridium*, *Aeromonas*, *Aerobacter*, *Erwinia* e *Lactobacillus* [Chandel *et al.*, 2011].

Zymomonas mobilis é uma bactéria gram-negativa que possui algumas características interessantes no que diz respeito à produção de etanol (Tabela 3), entre elas: a sua elevada produtividade e tolerância ao etanol e o facto de não requerer a adição controlada de oxigénio durante a fermentação [Lin e Tanaka, 2006; Hahn-Hägerdal *et al.*, 2007]. No entanto *Z. mobilis* tem também algumas limitações no que diz respeito à utilização de diversas fontes de carbono já que a mesma é restrita apenas a glucose, sacarose e frutose e é pouco tolerante aos inibidores presentes nos hidrolisados hemicelulósicos [Olofsson *et al.*, 2008].

Para além de *Z. mobilis*, a bactéria termotolerante *Clostridium thermocellum*, também foi identificada como boa produtora de etanol mas é sensível a altas concentrações de etanol e produz uma gama de subprodutos pouco desejáveis. No caso da produção de bioetanol a partir de gás de síntese, já são utilizadas espécies dos géneros *Clostridium*, *Moorella* e *Carboxydocella*. A nível industrial já se encontra em desenvolvimento o processo de fermentação de gás de síntese em etanol com base na bactéria *Clostridium ljungdahlii* [Antoni *et al.*, 2007].

2.2 LEVEDURAS

As leveduras são os microrganismos mais adequados para a produção de etanol e têm sido o centro da investigação para a produção deste desde os primórdios da biorefinaria. Estes microrganismos conseguem utilizar diversos açúcares como fonte de carbono e energia, possuem uma elevada taxa de fermentação, toleram etanol, são resistentes aos inibidores, estáveis e com elevados rendimentos [Hahn-Hägerdal *et al.*, 2007].

Tradicionalmente, *Saccharomyces cerevisiae* tem sido utilizada em larga escala na produção de etanol a partir de glucose e manose. No entanto, *S. cerevisiae* tem o inconveniente de não ser capaz de utilizar as pentoses – xilose e arabinose (compostos presentes na fracção hemicelulósica) [Matsushika e Sawayama, 2008].

Foi identificado um pequeno grupo de leveduras que fermenta directamente xilose a etanol, entre as quais: *Scheffersomyces stipitis* (anteriormente *Pichia stipitis*), *Pichia segobiensis*, *Candida shehatae*, *Pachysolen tannophilus* [Demirbas, 2005; Jeffries, 2006] e *Candida tropicalis* [Lin e Tanaka, 2006]. *Sc. stipitis* aparentemente não produz xilitol durante a fermentação de pentoses [Nigam, 2001]. Além disso, a utilização em larga escala das espécies *Sc. stipitis*, *C. shehatae* e *Pa. tannophilus* é dificultada pela sensibilidade a altas

concentrações de etanol, a necessidade de manter controladas as condições microaerofilia exigidas, elevada sensibilidade aos inibidores e a incapacidade para fermentar xilose em meio ácido [Zaldivar *et al.*, 2001].

Candida succiphila (capaz de fermentar D-xilose e L-arabinose) e *Kluyveromyces marxianus* (que assimila mas não fermenta pentoses) também têm sido alvo de estudos no que diz respeito ao transporte de xilose [Stambuk *et al.*, 2003].

As leveduras capazes de fermentar de D-xilulose identificadas até à data são espécies pertencentes aos géneros *Brettanomyces*, *Candida*, *Hansenula* e *Torulospora* [Skoog e Hahn-Hägerdal, 1988]. Já em 1981, Chiang e colaboradores observaram que algumas leveduras eram capazes de produzir etanol a partir da D-xilose na presença das enzimas responsáveis pela conversão de D-xilose a D-xilulose [Chiang *et al.*, 1981].

Nas leveduras, a enzima XR é a responsável pela primeira etapa no metabolismo da xilose [Chiang e Knight, 1960] (Figura 4). Nesta reacção a xilose é reduzida a xilitol. Este, por sua vez, pode ser reduzido a xilulose pela enzima XDH ou libertado para o ambiente, consoante as condições de cultura e o microrganismo utilizado [Kern *et al.*, 1997]. Ainda assim é necessário que os substratos entrem na célula, ocorram as respectivas reacções enzimáticas e que os produtos resultantes atravessem a célula para o exterior.

Em 1988, Loureiro-Dias detectou-se a presença de um transportador específico para polióis em *Candida intermedia*, nomeadamente de sorbitol, manitol e xilitol através de um mecanismo de simporte com protões [Loureiro-Dias, 1988].

Debaryomyces hansenii é outra das leveduras que tem vindo a ser alvo de estudos, já que se tem revelado uma potencial candidata para a utilização de hidrolisados hemicelulósicos. Durante o projecto PTDC/AGR-CFL/71792/2006 foi possível detectar simporte de xilitol, sorbitol, manitol e arabitól em *D. hansenii* CBS 767 (dados não publicados).

2.3 FUNGOS

Na Natureza, os fungos possuem um papel importante na degradação de resíduos lignocelulósicos através da produção de diversas enzimas lignocelulolíticas [Dashtban *et al.*, 2009].

O fungo *Trichoderma reesei* produz enzimas capazes de hidrolisar a lignocelulose, metaboliza pentoses e hexoses e não é inibido pelos compostos gerados a partir do material lignocelulósico porque os mesmos estão normalmente presentes em seu ambiente natural. Para além desta espécie, existem outros fungos filamentosos (*Monilia* sp., *Neurospora crassa*, *Trichoderma viride* e *Paecilomyces* sp.) capazes de produzir etanol celulósico [Lin e Tanaka, 2006] e outros capazes de fermentar pentoses (espécies pertencentes aos géneros *Fusarium*, *Rhizopus*, *Monilia*, *Neurospora* e *Paecilomyces*) [Chandel *et al.*, 2011]. Também existem fungos que produzem uma grande variedade de hemicelulases, como *Trichoderma* e *Aspergillus* [Shallom e Shoham, 2003].

Como já foi referido, uma das estratégias que tem vindo a ser desenvolvidas é a integração de etapas de bioconversão, nomeadamente, nos processos SSF e CBP utilizando microrganismos. Na etapa de pré-tratamento, algumas enzimas de fungos Basidiomicetas (*Phanerochaete chrysosporium*, *Phlebia radiata*, *Phlebia floridensis*, *Daedalea flavida*) têm demonstrado eficácia na degradação da lenhina dos resíduos lignocelulósicos. Outros (*Trichoderma*, *Penicillium*, *Aspergillus*) são capazes de produzir grandes quantidades de celulasas e hemicelulasas extracelulares úteis na etapa de hidrólise. Para além destes, espécies termofílicas (*Sporotrichum thermophile*, *Thermoascus aurantiacus* e *Thielavia terrestris*) têm vindo a ser propostas como bons candidatos à bioconversão de resíduos lignocelulósicos em ambiente industrial por produzirem enzimas termoestáveis - enzimas com maior estabilidade e actividade lignocelulolítica específica [Dashtban *et al.*, 2009].

Mesmo apresentando características interessantes para a sua utilização na produção de etanol, os fungos filamentosos possuem algumas limitações que dificultam a sua utilização, nomeadamente longo tempo de fermentação, baixa tolerância aos subprodutos, baixos rendimentos e secreção de ácidos orgânicos, o que os torna pouco atraentes para a produção de etanol [Hahn-Hägerdal *et al.*, 2007; Chandel *et al.*, 2011].

2.4 ALGAS

Os combustíveis produzidos por algas encontram-se, tal como a maioria dos outros processos de obtenção de biocombustíveis de 2ª geração, em processo de demonstração e fase laboratorial.

Nos últimos anos, as algas têm atraído a atenção dos investigadores sobre os seus possíveis potenciais. As suas principais vantagens são: síntese e acumulação de óleos,

altas taxas de crescimento, tolerância a diversas condições ambientais, produção de diversos produtos de valor acrescentado (como por exemplo biopolímeros, proteínas, polissacarídeos, pigmentos, ração animal e adubo) e podem ser cultivadas em fotobioreactores ao longo de todo o ano [Naik *et al.*, 2010]. Sem esquecer o aspecto ambiental, uma vez que as algas consomem dióxido de carbono e podem ser cultivadas utilizando águas residuais e salgadas [Radakovits *et al.*, 2010].

Os biocombustíveis obtidos a partir de algas representam uma alternativa para o futuro. Diversas formas de energia podem ser obtidas desta matéria-prima, nomeadamente etanol, hidrogénio, metano, biomassa para combustão e gaseificação [Chisti, 2007].

Entre as espécies mais promissoras para a produção de etanol, destacam-se *Sargassum* sp., *Glacilaria* sp., *Prymnesium parvum* e *Euglena gracillis*.

O processo de produção baseia-se em quatro etapas: 1) crescimento em meio de aquacultura e recolha das algas; 2) decomposição da biomassa e sacarificação; 3) fermentação da biomassa e 4) separação do etanol [Chisti, 2007].

Apesar dos estudos desenvolvidos demonstrarem que as (micro)algas poderão apresentar-se como uma plataforma promissora para a produção de biocombustíveis, ainda existem aspectos que precisam de ser melhorados. Foram atingidos recentemente avanços significativos no desenvolvimento de ferramentas de manipulação genética e engenharia metabólica que estão a ser utilizados no melhoramento de espécies e compreensão dos metabolismos associados na produção dos diversos biocombustíveis a partir de algas [Radakovits *et al.*, 2010].

2.5 MODIFICAÇÃO DE MICRORGANISMOS

Actualmente já foram realizados diversos melhoramentos em bactérias e leveduras com o objectivo de obter estirpes capazes de produzir, com elevada eficácia, bioetanol a partir de açúcares provenientes de matéria-prima lignocelulósica [Zaldivar *et al.*, 2001; Chandel *et al.*, 2011]. Estes melhoramentos têm-se centrado em dois focos principais: 1) utilização de pentoses e 2) aumento da tolerância ao etanol e outros tóxicos.

Diversas técnicas têm vindo a ser aplicadas na obtenção de estirpes que apresentem características favoráveis na produção de bioetanol de 2ª geração, desde mutagénese, co-

cultura, clonagem e expressão heteróloga, otimização dos parâmetros de fermentação, assim como técnicas aplicadas ao próprio processo fermentativo, como reciclagem e imobilização de células, e a adaptação dos microrganismos aos hidrolisados lignocelulósicos [Chandel *et al.*, 2011].

Por meio da engenharia genética, algumas estirpes de bactérias e leveduras, tais como estirpes de *Saccharomyces cerevisiae*, *Zymomonas mobilis* e de *Escherichia coli* (Figura 5) foram modificadas, construindo-se estirpes capazes de satisfazer os requisitos da produção de etanol a partir de material lignocelulósico [Demirbas, 2005; Hahn-Hägerdal *et al.*, 2006]. Para além destes, *Scheffersomyces stipitis*, *Kluveromyces* e *Stearothrermophilus* são fortes candidatos na corrida à engenharia metabólica [Demirbas, 2005].

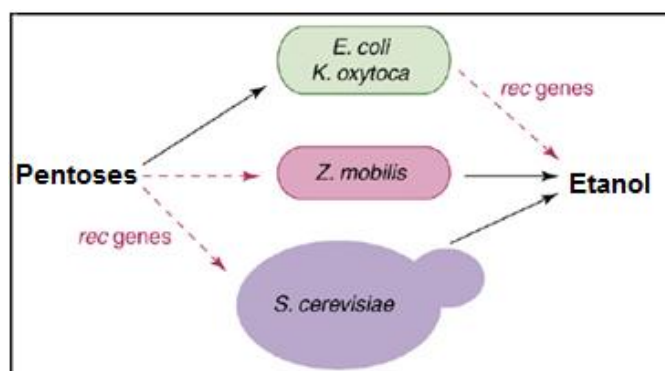


Figura 5 – Estirpes construídas através de engenharia genética para a produção de etanol a partir de pentoses [Hahn-Hägerdal *et al.*, 2006] (rec genes – genes recombinantes).

E. coli é capaz de metabolizar uma grande variedade de substratos (incluindo hexoses, pentoses e lactose), porém a estirpe selvagem é uma pobre produtora de etanol. Mas fermentações a partir de *E. coli* [Ingram *et al.*, 1987; Olofsson *et al.*, 2008] e *Klebsiella oxytoca* [Burchhardt e Ingram, 1992] têm sido possíveis graças à introdução de genes de *Z. mobilis* (Figura 5).

Em *S. cerevisiae* foram também introduzidos com sucesso diversos genes de *Sc. stipitis* [Matsushika e Sawayama, 2008; Chandel *et al.*, 2011] e também foram construídas estirpes capazes de utilizar arabinose através da introdução simultânea de genes que codificam enzimas envolvidas no metabolismo de arabinose provenientes de várias bactérias e fungos [Hahn-Hägerdal *et al.*, 2006].

3. BIOCONVERSÃO DE PENTOSSES EM ETANOL POR *Saccharomyces cerevisiae*

O consumo de xilose em leveduras é influenciado por diversas etapas: entrada de xilose na célula, conversão de xilose em xilulose, fosforilação de xilulose para xilulose-5-fosfato, e a conversão de xilulose-5-fosfato através da via das pentoses fosfato (PP) seguido da produção de etanol a partir de piruvato após a glicólise (Figura 4) [Ostergaard *et al.*, 2000].

S. cerevisiae é um candidato promissor para a produção de bioetanol industrial devido à sua “robustez”, tolerância a inibidores e a alta produtividade em etanol, no entanto não fermenta naturalmente pentoses (açúcares mais abundantes na fração hemicelulósica) [Eliasson *et al.*, 2000].

Para que *S. cerevisiae* consiga converter eficientemente xilose em etanol, necessita de dois requisitos importantes: i) expressão heteróloga de genes que permitam a conversão de xilose em xilulose; e ii) consumo de xilulose para rentabilizar a produção de etanol [Ostergaard *et al.*, 2000].

A principal estratégia usada para o consumo de xilose em *S. cerevisiae* foi a expressão heteróloga de XR e XDH (através da introdução dos genes *XYL1* e *XYL2*, respectivamente) a partir de *Scheffersomyces stipitis* [Kötter *et al.*, 1990]. Esta estratégia não tem sido bem-sucedida para a produção de etanol devido ao crescimento limitado da levedura em xilose e da excreção de xilitol. Este poderá resultar do desequilíbrio redox da relação NAD⁺/NADH e da influência do equilíbrio termodinâmico entre as reações XR e XDH [Ostergaard *et al.*, 2000]. Outra etapa que também tem sido descrita como limitante do consumo de xilose por estirpes de *S. cerevisiae* recombinantes é a via das pentoses fosfato [Ostergaard *et al.*, 2000].

Resultados promissores foram obtidos quando se expressarem os genes *XYL1* e *XYL2* de *Sc. stipitis* em simultâneo com a sobre-expressão do gene *XKS1* (responsável pela xilulocinase - XK) em *S. cerevisiae* [Eliasson *et al.*, 2000; Olofsson *et al.*, 2008].

Uma alternativa para reduzir a saída de xilitol e aumentar a produção de etanol passou pela expressão de XI em *S. cerevisiae* em vez de XR/XDH. XI não requer cofactores redox e não produz um desequilíbrio redox intracelular durante a fermentação de xilose. Mas a expressão do gene *XYLA* (que codifica a XI) tem-se revelado uma tarefa difícil, devido a obtenção de XI inactiva. Em estudos recentes foi expressa com sucesso a enzima XI de

Clostridium phytofermentans em *S. cerevisiae* mostrando estirpes com um menor rendimento em xilitol e um maior rendimento de etanol [Matsushika *et al.*, 2009].

Para além da introdução de diversas vias de conversão xilose-xilulose em *S. cerevisiae*, outras estratégias para melhorar a fermentação de xilose em etanol têm sido abordadas, entre as quais o incremento do transporte de xilose.

Em *S. cerevisiae*, a xilose é transportada pelos transportadores de hexoses, embora com afinidade muito baixa. O transporte de xilose é inibido competitivamente por glucose e, portanto, a xilose só é normalmente consumida após o esgotamento da glucose [Meinander e Hahn-Hägerdal, 1997].

Os estudos sobre os mecanismos envolvidos no transporte de xilose fornecem uma ferramenta para o desenvolvimento de estirpes com altas taxas de utilização de xilose [Matsushika *et al.*, 2009].

Na tentativa de incrementar o transporte de xilose em *S. cerevisiae* (que não é eficiente em estirpes de *S. cerevisiae* não modificadas) o gene *SUT1* que codifica para um transportador de açúcar de *Sc. stipitis*, foi expresso com sucesso em *S. cerevisiae* (Katahira *et al.*, 2008) e a expressão heteróloga de transportadores envolvidos na absorção de xilose de *Trichoderma reesei* (Xlt1, Saloheimo *et al.*, 2007) e *Arabidopsis thaliana* (At5g59250 e At5g17010, Hector *et al.*, 2008) foi também utilizada. Estas e outras expressões heterólogas de transportadores de xilose fornecem estirpes de *S. cerevisiae* onde ocorreu um aumento das taxas de utilização da xilose.

Outros estudos foram realizados sobre transportadores de alta afinidade de xilose em diversas leveduras, entre as quais se destaca *Candida intermedia* que demonstrou ter dois sistemas diferentes de transporte para xilose, um de alta capacidade e baixa afinidade (*GXF1* - difusão facilitada) e um de alta afinidade (*GXS1* - simporte xilose/H⁺). Ambos os sistemas aceitam glucose como substrato. Os genes que codificam os dois transportadores foram isolados, clonados em *S. cerevisiae* e os parâmetros cinéticos para o transporte de glucose e xilose determinados. A comparação da sequência de *GXS1* com outras leveduras publicadas demonstrou semelhanças com outros possíveis transportadores de açúcares, nomeadamente de *Debaryomyces hansenii*, *Candida albicans* e *Yarrowia lipolytica* [Leandro *et al.* 2006].

4. POLIÓIS

Polióis, também conhecidos por álcoois de açúcar, são hidratos de carbono que resultam da hidrogenação catalítica do grupo redutor (açúcar), onde o grupo aldeído ou cetona é convertido em álcool, transformando as estruturas cíclicas em lineares. Estes têm a fórmula geral $H(HCHO)_n+H$, enquanto os açúcares têm $H(HCHO)_nHCO$.

Alguns polióis podem ser encontrados na Natureza enquanto outros são obtidos industrialmente (Tabela 4). Os mais comuns são: arabitol, eritritol, galactitol (dulcitol), glicerol, iditol, isomalte, lactitol, manitol, maltitol, ribitol, sorbitol e xilitol.

Tabela 4 – Produção industrial de polióis [Revista Ingredientes e Aditivos http://www.insumos.com.br/aditivos_e_ingredientes/edicoes_materias.php?id_edicao=16].

Origem	Resíduos celulósicos	Milho, batata, arroz, etc	Açúcar de cana, açúcar de beterraba	leite (soro)	Madeira, pericarpo de milho
Polissacarídeos		amido			hemicelulose
Dí e oligossacarídeos	xarope de glucose	(hidrólise) xarope de maltose	sacarose	(isomerização) lactose lactulose	
			(isomerização) isomaltulose		
Monossacarídeos			(isomerização-inversão) isoglucose invertido		
			(separação) glucose frutose	(hidrólise) galactose glucose	(hidrólise) xilose
Açúcares álcoois hidrogenados	licasina	Maltitol	Sorbitol	Manitol Isomalte	Galactitol Lactitol Xilitol

Estes apresentam diversas propriedades, desde resistência ao escurecimento (reações Maillard), diminuição da susceptibilidade à fermentação, maior resistência à cristalização, maior estabilidade, maior afinidade para a água, e previnem a formação de cáries [Mussatto e Roberto, 2002]. Actuam como emulsionantes, estabilizantes, redutores do ponto de congelação, espessantes, diluentes e principalmente como edulcorantes [Polyols Information Source, <http://www.polyol.org/index.html>].

Devido às suas propriedades e funções, os polióis podem ser aplicados em diversas áreas, desde à Indústria Alimentar, Farmacêutica, Química, Têxtil, Tintas, Higiene oral e até ao fabrico de ésteres, resinas, entre outros. Mas a sua maior aplicação é na Indústria Alimentar como aditivos.

Os edulcorantes – aditivos alimentares adicionados aos alimentos em substituição do açúcar e os que são comercializados como edulcorantes de mesa – não são degradados pelos

microrganismos causadores de cáries e placa bacteriana (ao contrário da sacarose), e têm um baixo índice glicémico, podendo ser consumidos pelos doentes diabéticos. Estes distinguem-se em dois tipos, fundamentalmente pelo poder adoçante:

- Açúcares reduzidos (açúcares/polióis que têm um poder adoçante igual ou menor que a sacarose e um valor calórico próximo da sacarose),
- Edulcorantes intensos, designadamente o aspartame ou a sacarina que têm um poder adoçante muito superior ao da sacarose, aproximadamente 200 vezes ou 300-500 vezes, respectivamente [Autoridade de Segurança Alimentar e Económica, <http://www.asae.pt/>].

A autorização e o emprego de aditivos alimentares na União Europeia baseiam-se na Directiva 89/107/CEE relativa a aditivos alimentares. Com base nesta Directiva foram adoptadas três directivas específicas pelo Conselho e pelo Parlamento Europeu:

- ✓ Directiva 94/35/CE - relativa a edulcorantes
- ✓ Directiva 94/36/CE - relativa a corantes
- ✓ Directiva 95/2/CE - relativa a aditivos com a excepção de corantes e edulcorantes.

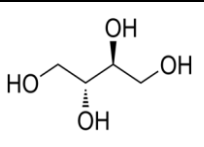
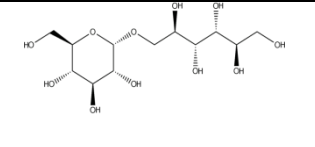
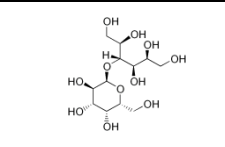
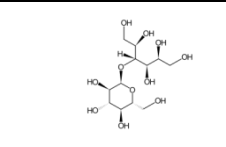
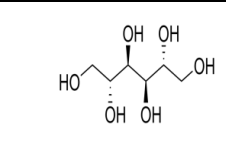
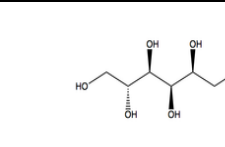
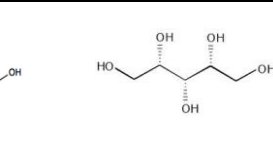
Desde a adopção da última directiva, em 1995, a legislação em matéria de aditivos alimentares foi completamente harmonizada no âmbito da União Europeia.

Os polióis utilizados como aditivos alimentares e autorizados na União Europeia encontram-se na Tabela 5 e algumas das suas características na Tabela 6.

Tabela 5 – Polióis autorizados na União Europeia [Directiva 94/35/CE].

E420	Sorbitol	E965	Maltitol
E421	Manitol	E966	Lactitol
E422	Glicerol	E967	Xilitol
E953	Isomalte	E968	Eritritol

Tabela 6 – Características de alguns polióis.

Estrutura							
Nome sistemático	Eritritol	Isomalte	Lactitol	Maltitol	Manitol	Sorbitol	Xilitol
Nome IUPAC	(2R,3S)-butane-1,2,3,4-tetraol	(2R, 3R, 4R, 5R) -6 - [[(2S, 3R, 4S, 5S, 6R) - 3,4,5-tri-6-(hidroximetil) - 2-tetrahidropiraniil] oxil] hexano-1, 2,3,4,5-pentol	4-O-α-D-Galactopiranosil-D-glucitol	4-O-α-D-Glucopiranosil-D-glucitol	(2R,3R,4R,5R)-Hexano-1,2,3,4,5,6-hexol	(2S,3R,4R,5R)-Hexano-1,2,3,4,5,6-hexol	(2R,3R,4S)-Pentano-1,2,3,4,5-pentol
Fórmula química	C ₄ H ₁₀ O ₄	C ₁₂ H ₂₄ O ₁₁	C ₁₂ H ₂₄ O ₁₁	C ₁₂ H ₂₄ O ₁₁	C ₆ H ₁₄ O ₆	C ₆ H ₁₄ O ₆	C ₅ H ₁₂ O ₅
Onde se encontra na Natureza	Frutas, algas, cogumelos, vinho, cerveja, queijos e molhos de soja	beterraba	-	-	Aipo, cebola, beterraba, azeitonas, figos, cogumelos e algas marinhas	Maças, peras, pêssegos, ameixas, cerejas, algas marinhas e bebidas fermentadas (cida)	Frutos e vegetais, milho, framboesa, ameixa e couve-flor; Materiais hemicelulósicos
Solubilidade em água	Baixa	Sim	Elevada	Elevada	Sim	Elevada	Elevada
Grau de doçura em relação à sacarose	68%	45-60%	30-40%	75-90%	40-70%	50%	100%
Estabilidade	- Excelente: térmica e pH ácido	Química, térmica, enzimática e microbiológica	- Alta: química, térmica e microbiológica	- Boa: química, térmica e enzimática - Excelente: térmica		- Excelente: térmica, química e bacteriológica	- Boa: química e microbiológica
Características	- Agente redutor de actividade de água e plastificante - Não cariogénico	- Intensificador do sabor dos alimentos - Aumenta o tempo de prateleira de produtos - Adoçante	- Efeito refrescante - Estabilizador de aromas - Baixa cariogenicidade - Confere viscosidade	- Edulcorante	- Edulcorante - Espessante e diluente	- Espessante - Edulcorante - Inibidor da cristalização - Estabilizante - Crioprotector e anticongelante - Fixa aromas e cores - Acção antioxidante - Não cariogénico, mutagénico ou tóxico	- Efeito de frescura - Intensificador de sabores - Não cariogénico
Algumas aplicações	- Pastilhas, chocolates e gomas - Adoçante	- Pastelaria: esculturas decorativas - Geleias, pudins, sobremesas, chocolates, bebidas e rebuçados	- Produtos farmacêuticos - Pasta de dentes - Bebidas, sorvetes, sopas instantâneas	- Chocolates, geleias, sorvetes, gelatinas e rebuçados	- Indústrias química, alimentar e farmacêutica - Pastilhas, sorvetes, conservas de frutas	- Diversas indústrias, desde química, têxtil, alimentar, tintas, farmacêutica e cosmética - Produtos para diabéticos	- Pastilhas, rebuçados, chocolates, geleias e gelatinas

4.1 PRODUÇÃO MICROBIANA DE POLIÓIS

A produção de polióis por leveduras foi descrita pela primeira vez por volta de 1870. A produção de glicerol foi observada durante o fabrico de vinhos e cervejas. Após esta descoberta, vários estudos foram dedicados aos polióis, principalmente ao glicerol e ao D-arabitol produzidos por diferentes espécies de leveduras [Tokuoka, 1993].

A acumulação de polióis em leveduras tem vindo a ser associado à tolerância a altas concentrações de açúcar ou sal [Tokuoka, 1993]. As leveduras quando expostas ao *stress* osmótico, são capazes de produzir diversos solutos compatíveis, álcoois polihídricos (polióis), tais como glicerol, arabitol, eritritol e manitol para equilibrar a pressão osmótica através da membrana celular [Koganti *et al.*, 2011].

4.1.1 MICRORGANISMOS PRODUTORES

Apesar dos polióis se encontrarem amplamente distribuídos nos reinos Vegetal e Animal, a sua extracção através dessa fonte é economicamente inviável devido aos baixos teores em que se encontram. Assim, os polióis são produzidos industrialmente (Tabela 4) envolvendo processos químicos, enzimáticos ou biotecnológicos.

O arabitol é conhecido por ser produzido por leveduras osmofílicas dos géneros *Debaryomyces*, *Candida*, *Pichia*, *Hansenula*, *Zygosaccharomyces*, *Saccharomyces* [Koganti *et al.*, 2011]. Recentemente, Zhu e colaboradores (2010) isolaram uma nova espécie *Kodamaea ohmeri*, capaz de produzir D-arabitol a partir de glucose [Zhu *et al.*, 2010].

O xilitol é um poliol que possui aplicações em diferentes segmentos industriais e a sua produção através da fermentação da xilose poderá ser economicamente interessante, uma vez que não requer a xilose tão pura como na produção química [Zhu *et al.*, 2010]. Outra potencial matéria-prima interessante para utilizar na produção de xilitol são os hidrolisados hemicelulósicos, por serem ricos em xilose. As leveduras que utilizam xilose na produção de xilitol são *Debaryomyces hansenii*, *Candida guilliermondii* e *Candida parapsilosis*.

Diferentes microrganismos como bactérias, leveduras, fungos e também algas e alguns protozoários são mencionados na literatura como produtores de glicerol [Taherzadeh *et al.*, 2002]. A produção de glicerol também é realizada por leveduras osmofílicas, pois estas são capazes de produzir altos rendimentos deste álcool e outros polióis na ausência de sulfito ou agentes alcalinos (carbonato de sódio) [Rehm, 1988]. Outras leveduras como *Candida*

boidinni, *Candida shehatae*, *Pichia stipitis*, *Pachysolen tannophilus* [Vandeska *et al.*, 1995; Hahn-Hägerdal *et al.*, 1994] e *Candida tropicalis* [Yahashi *et al.*, 1996] conseguem produzir glicerol a partir de xilose.

A produção microbiológica de eritritol a partir da fermentação de sacarose foi também identificada em leveduras osmofílicas *Trichosporon* sp., *Trichosporonoides* sp. e *Aureobasidium pullulans* [Park *et al.*, 2001].

4.1.2 TRANSPORTE DE XILITOL

O metabolismo de polióis tem sido extensivamente estudado em diferentes espécies de leveduras, contrariamente ao seu transporte através da membrana plasmática. Em geral, os sistemas de transporte de simporte são expressos em baixas concentrações de substratos enquanto os sistemas de transporte de difusão facilitada são expressos quando o substrato é abundante, como no caso dos transportes de açúcares [Leandro *et al.*, 2009].

Candida intermedia demonstrou possuir um sistema específico de simporte poliol/H⁺ quando cultivada em sorbitol, sendo capaz de transportar sorbitol, xilitol, D-arabitol e manitol [Loureiro-Dias, 1987]. Foram recentemente clonados e caracterizados, desta levedura, dois transportadores de açúcar, o *GXF1* que codifica um transportador de tipo difusão facilitada de glucose/xilose e o *GXS1* que codifica um simporte glucose/xilose-H⁺ [Leandro *et al.*, 2006].

O transporte de glicerol foi descrito pela primeira vez em eucariontes por Castro e Loureiro-Dias (1991) no fungo filamentoso *Fusarium oxisporum* var. *lini* [Castro e Loureiro-Dias, 1991].

Em *Debaryomyces hansenii* no GenBank está disponível a sequência parcial de *XylHP* - proteína hipotética de um permease de xilose (EMBL AAR06925) [Leandro *et al.*, 2009] que foi caracterizada por Young e colaboradores. Entre as 26 proteínas de transporte de açúcares analisadas por Young e colaboradores, *XylHP* mostrou ser um transportador de hexoses com afinidade por xilose fortalecendo a ideia que *D. hansenii* é uma forte candidata para uma investigação mais aprofundada para a fermentação de biomassa lignocelulósica [Young *et al.*, 2011].

5. *Debaryomyces hansenii*

O género *Debaryomyces* engloba quinze espécies e podem ser encontradas em diferentes habitats naturais, tais como ar, solo, pólen, plantas, frutas e insetos [Kurtzman e Fell, 1998]. Nove destas espécies, *D. carsonii*, *D. etchellsii*, *D. hansenii*, *D. maramus*, *D. melissophilus*, *D. polimorfo*, *D. pseudopolymorphus*, *D. robertsiae* e *D. vanrijiae*, foram encontrados em diferentes alimentos processados, desde sumos de frutas e refrigerantes, vinho, cerveja, produtos açucarados, produtos de panificação, laticínios e carnes processadas. A presença de espécies do género *Debaryomyces* em alimentos geralmente não tem efeitos prejudiciais e, em alguns casos é benéfica para os alimentos, como por exemplo na maturação de alimentos como queijo, carnes processadas (presunto, salsichas e salame) e pickles.

A levedura *D. hansenii*, cuja classificação taxonómica se encontra resumida na Tabela 7 é caracterizada como crio e osmotolerante e tem um papel importante em vários processos agro-alimentares. É uma das leveduras que podem ser encontradas em ambientes salinos, como a água do mar ou alimentos salgados, consegue tolerar altas concentrações de sal e pH alcalino [Butinar *et al.*, 2005].

Tabela 7 – Classificação Taxonómica de *D. hansenii*.

Super Reino	<i>Eukaryota</i>
Reino	<i>Fungi</i>
Subreino	<i>Dikarya</i>
Filo	<i>Ascomycota</i>
Subfilo	<i>Saccharomycotina</i>
Classe	<i>Saccharomycetes</i>
Ordem	<i>Saccharomycetales</i>
Família	<i>Saccharomycetaceae</i>
Género	<i>Debaryomyces</i>
Espécie	<i>Debaryomyces hansenii</i>

De forma a valorizar a produção de etanol a partir de resíduos lignocelulósicos é extremamente importante encontrar e estudar estirpes que consigam fermentar a xilose. Neste âmbito diversas estirpes têm vindo a ser alvo de estudo ao longo dos últimos anos, desde estirpes selvagens a estirpes recombinantes [Nobre *et al.*, 2002]. Dentro destas, a espécie *D. hansenii* tem vindo a captar a atenção dos investigadores, não só pela sua capacidade de crescer em meios com elevados teores de sal [Prista *et al.*, 1997], como pela sua capacidade de produzir polióis, tendo apresentado um transporte de alta afinidade para assimilar xilose [Gírio *et al.*, 2000].

D. hansenii é uma levedura que utiliza xilose e que exibe uma relação de produção industrial xilitol/etanol bastante interessante [Parajó *et al.*, 1995]. Para além disso, tem-se revelado também uma levedura bastante atraente para a produção de outros polióis tais como glicerol e arabitol [Adler e Gustafsson, 1980].

A disponibilização do genoma de *D. hansenii* CBS 767 pelo consórcio Génolevures [Dujon *et al.*, 2004] trouxe novas perspectivas para futuros estudos moleculares nesta levedura. O interesse na publicação destes resultados resultou do facto de esta ser uma levedura altamente tolerante a sal e apresentar características que a aproximam de algumas leveduras patogénicas, nomeadamente *C. albicans*, com a qual partilha a utilização de um código genético alternativo em que o codão CUG (leucina) é descodificado com um codão de serina em 98% dos casos. Este facto faz com que a heterogeneidade da população aumente.

Os resultados obtidos por Nobre e colaboradores (1999) apoiam a hipótese de que *D. hansenii* é um bom candidato para a biodegradação de hidrolisados hemicelulósicos e, portanto, uma ferramenta útil para a engenharia metabólica a fim de melhorar estirpes a nível do consumo de xilose e na produção de xilitol [Nobre *et al.*, 1999].

Noutro estudo, desenvolvido por Palma e colaboradores, publicado em 2007 foi determinada a relação filogenética da família dos transportadores de açúcares em oito leveduras: *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida glabrata*, *Kluyveromyces lactis*, *Ashbya gossypii*, *Debaryomyces hansenii*, *Yarrowia lipolytica*, *Candida albicans* e *Scheffersomyces stipitis* cujos genomas se encontram disponíveis. Dos *clusters* cuja função se conhece a respectiva função, *D. hansenii* possui 8 genes no cluster do simporte glicerol/H⁺, o que é compreensível dada à sua característica halotolerante e ao papel desempenhado pelo glicerol enquanto soluto compatível [Palma *et al.*, 2007]. De entre os genes analisados, 22 dos 51 genes analisados não foi possível determinar a sua função. Na Figura 6 encontram-se os quatro grupos que ainda não foram caracterizados, no qual se encontra o transportador de xilose identificado por Nobre e colaboradores (1999) – grupo 2.A.1.1.Z26 [Nobre *et al.*, 1999]. Futuras análises experimentais terão de ser realizadas de forma a identificar os diferentes substratos de cada um dos transportadores cuja função permanece desconhecida.

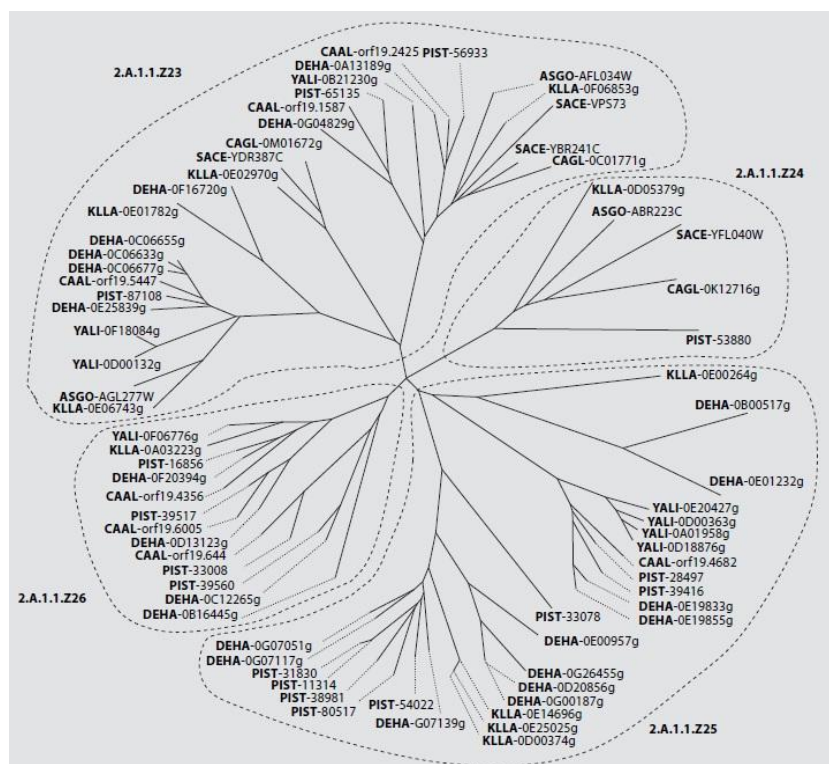


Figura 6 – Árvore filogenética de genes de *Candida glabrata* (CAGL), *Kluyveromyces lactis* (KLLA), *Debaryomyces hansenii* (DEHA), *Yarrowia lipolytica* (YALI), *Ashbya gossypii* (ASGO), *Candida albicans* (CAAL), *Scheffersomyces stipitis* (PIST) e *Saccharomyces cerevisiae* (SACE) cuja função continua indeterminada [Palma et al., 2007].

6. OBJECTIVOS DA DISSERTAÇÃO

De forma a ultrapassar as limitações da produção de bioetanol a partir de material lignocelulósico dois grupos de investigadores (Laboratório Nacional de Energia e Geologia e Instituto Superior de Agronomia) uniram esforços a fim de seleccionarem estirpes de *Debaryomyces hansenii* com elevada capacidade de produção de xilitol e identificar os genes envolvidos no transporte de polióis [projecto “XILITOL-OUT: Facilitar a libertação de xilitol, para otimizar a economia de bioetanol” (PTDC/AGR-CFL/71792/2006)].

A detecção e clonagem de transportadores de polióis em *Saccharomyces cerevisiae* com vista à rentabilização do processo de produção de bioetanol a partir de materiais lignocelulósicos. Tendo em conta este objectivo geral, pretendeu-se neste trabalho realizar:

- Identificação de espécies com potencial para a detecção de genes de interesse para a produção de xilitol e outros polióis. Nomeadamente de espécies com capacidade para assimilar polióis e mais especificamente com capacidade para utilizar xilose;
- Caracterização cinética de vários transportadores previamente clonados no âmbito do projecto.

MATERIAL E MÉTODOS

1. MICRORGANISMOS, MEIOS DE CULTURA E CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO

Os microrganismos e plasmídeos utilizados neste trabalho estão listados na Tabela 8.

Os meios de cultura e soluções utilizados foram preparados de acordo com os procedimentos correntes no Laboratório de Bioenergética Microbiana (Anexo I).

A estirpe *Debaryomyces hansenii* var. *hansenii* CBS 767 foi rotineiramente mantida em meio sólido YPD a 28°C.

A estirpe receptora *Saccharomyces cerevisiae* YSH 1172 foi rotineiramente mantida em YPD e também, quando necessário, em meio sólido YNB com 2% (p/v) maltose suplementado com as concentrações necessárias dos aminoácidos uracilo, leucina, triptofano e histidina. A estirpe foi cultivada a 28°C com agitação orbital 150 rpm.

No caso dos transformantes de *S. cerevisiae*, as condições de manutenção foram idênticas à da estirpe receptora à excepção do facto de não ter sido adicionado uracilo uma vez que este corresponde à marca de selecção do plasmídeo pUG35.

Para a manutenção, crescimento e transformação de *Escherichia coli* DH5 α utilizou-se meio LB suplementado com ampicilina (10 mg/mL) quando exigido. No caso do meio sólido foi adicionado 2% (p/v) agar comercial.

Os suplementos dos meios foram preparados em concentrações dez vezes superiores às concentrações finais pretendidas no meio e esterilizadas por filtração através de filtros Millipore TYPE GSWP, de 0,22 μ m de porosidade. A esterilização do agar e dos meios YPD e LB foi realizada por autoclavagem (Presoclave75, Sellecta) durante vinte minutos a 121°C e 1 atm.

O crescimento das culturas foi habitualmente seguido por leitura da DO a 640nm (espectrofotómetro Ultrospec2100pro, Amersham Biosciences®).

Utilizaram-se produtos químicos das marcas Sigma, BDH, Difco, Roche e Finnzymes.

Tabela 8 – Microrganismos e plasmídeo utilizados neste trabalho.

	Características relevantes	Origem/Referência
Microrganismos		
<i>D. hansenii</i> var. <i>hansenii</i> CBS 767 (PYCC 2968)	Estirpe tipo	Genolevúres
<i>E. coli</i> DH5 α	F- endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG Φ 80dlacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF)U169, hsdR17(rK- mK+), λ -	Stratagene
<i>S. cerevisiae</i> YSH 1172	10560-6B <i>aqy1::kanMX4 aqy2::HIS3 MATα</i> <i>leu2::hisG trp1::hisG his3::hisG ura3-52</i> <i>aqy1Δ::kanMX4 aqy2::HIS3</i>	Tanghe <i>et al.</i> , 2002
IPY6490	YSH 1172 + pUG35-DEHA2G06490g	Este trabalho
IPY902	YSH 1172 + pUG35-DEHA2E00902g	
IPY726	YSH 1172 + pUG35-DEHA2E00726g	
IPY528	YSH 1172 + pUG35-DEHA2B00528g	
MLY10	YSH 1172 + pUG35	
MLY7	YSH 1172 + pUG35-DEHA2C06380g	
MLY8	YSH 1172 + pUG35-DEHA2E01386g	
MLY9	YSH 1172 + pUG35-DEHA2C05896g	
MLY12	YSH 1172 + pUG35-DEHA2C05918g	
MLY20	YSH 1172 + pUG35-DEHA2F15444g	
MLY22	YSH 1172 + pUG35-DEHA2E24310g	
Plasmídeo		
pUG35	origem de replicação centromérica, GFP na extremidade C-terminal; resistência à ampicilina; auxotrofia para uracilo; promotor Met25; local de clonagem múltipla	Niedenthal <i>et al.</i> , (1996)

1.1 Quantificação da biomassa

Para calcular a quantidade de biomassa de cada ensaio realizado procedeu-se à determinação do peso seco. Pesou-se numa balança analítica a biomassa correspondente a 100 μ L de suspensão celular densa (em triplicado) após secagem numa estufa, a 80°C durante 24/48 horas, utilizando pequenas cápsulas de papel de alumínio previamente pesadas.

1.2 Congelação de material biológico

A conservação de estirpes foi efectuada por congelação a -80°C. Para tal, usou-se glicerol a 30% (v/v) no mesmo volume que a suspensão que se queria conservar. Em seguida foi misturado de modo a ter uma concentração final de glicerol 15% (v/v), congelado rapidamente com o auxílio de azoto líquido e depois armazenado a -80°C.

2. CLONAGEM E EXPRESSÃO HETERÓLOGA DOS GENES DE *Debaryomyces hansenii*

A extracção de DNA foi efectuada a partir de culturas em fase exponencial de crescimento.

2.1 Extracção de DNA genómico

O DNA genómico de *D. hansenii* CBS 767 utilizado como molde para amplificação de fragmentos *in vitro* por PCR foi obtido através do protocolo descrito por Cryer e colaboradores (1975) após digestão enzimática com liticase.

Inocularam-se 10 mL de YPD com algumas colónias de *D. hansenii*. Incubou-se durante a noite a 28°C com agitação. Como controlo da esterilidade do meio de cultura utilizou-se um tubo com 3 mL de meio sem inóculo e incubado nas mesmas condições. Centrifugou-se (Centrifuge 5810R, Eppendorf) a 12000 rpm durante 5 minutos. Ressuspendeu-se o sedimento em 500 µL SE e transferiu-se para um novo microtubo. Adicionou-se 10 µL liticase (10mg/mL, Sigma) e incubou-se 1 hora a 37°C com agitação (banho termostaticado da Kottermann). Centrifugou-se 1 minuto a 14000 rpm e desprezou-se o sobrenadante. Adicionou-se 500 µL de TE e 50 µL de SDS 10% (p/v). Agitou-se vigorosamente e incubou-se 30 minutos a 65°C sem agitação (banho termoestático de precisão Grant OLS200).

Adicionou-se 200 µL de acetato de potássio 5 M e incubou-se em gelo durante 1 hora. Centrifugou-se durante 5 minutos a 14000 rpm, 4°C (Centrifuge 5810R, Eppendorf). Transferiu-se o sobrenadante para um novo microtubo. Adicionou-se um volume igual de isopropanol (Merck) à temperatura ambiente e agitou-se invertendo o tubo 2-4 vezes até se observar a formação de um novelo branco. Incubou-se durante 5 minutos à temperatura ambiente.

Centrifugou-se (14000 rpm, 10 minutos a 4°C) e desprezou-se o sobrenadante. Secou-se o sedimento à temperatura ambiente. Adicionaram-se 300 µL de TE e 15 µL de RNase (1 mg/mL, RNase DNase-free, Roche Applied Science) e deixou-se a incubar a 37°C durante 30 minutos. Foram adicionados 30 µL de acetato de potássio 3 M e 750 µL de isopropanol e centrifugou-se a 14000 rpm durante 10 minutos a 4°C. Deixou-se o DNA a secar no tubo com a tampa aberta à temperatura ambiente e por fim ressuspendeu-se o DNA em 100 µL de água milliQ estéril e quantificou-se por electroforese em gel de agarose.

2.2 Extracção de DNA plasmídico

2.2.1 Extracção com kit “QIAprep Spin Miniprep”

Na extracção do plasmídeo pUG35 e nos casos em que se pretendia obter DNA plasmídico com um elevado grau de pureza com vista a clonagem e/ou sequenciação automática, empregou-se o kit de extracção de DNA plasmídico “QIAprep Spin Miniprep Kit” da Qiagen, segundo as recomendações do fornecedor.

Os clones de interesse foram inoculados em 4 mL de meio de cultura a partir de uma colónia isolada, incubou-se durante a noite a 37°C com agitação. Centrifugou-se a 13000 rpm durante 2 minutos. Eliminou-se o sobrenadante e, com o auxílio de uma micropipeta, ressuspendeu-se o sedimento, transferindo-o para um microtubo. Adicionou-se 250 µL de tampão P1 com RNase e 250 µL de tampão P2. Inverteu-se suavemente até a solução ficar viscosa. Adicionou-se 350 µL de tampão N3 e inverteu-se imediatamente até à formação de um novelo branco. Centrifugou-se (Centrifuge 5415D, Eppendorf) a 13000 rpm durante 10 minutos. Transferiu-se o sobrenadante para a coluna QIAprep. Centrifugou-se, novamente, um minuto para se eliminar toda a solução que atravessou a coluna. Em seguida, lavou-se a coluna com 750 µL de tampão PE com etanol. Centrifugou-se uma vez mais nas condições anteriormente descritas para garantir a remoção total do tampão residual. Transferiu-se a coluna para um novo microtubo e procedeu-se à eluição do DNA adicionando 50 µL de ddH₂O/Tris pH 8, incubou-se 2 minutos à temperatura ambiente e centrifugou-se (1 minuto 13000rpm). Quantificou-se o DNA plasmídeo por electroforese em gel de agarose.

2.2.2 *Insert Analysis*

A selecção e identificação dos clones contendo o fragmento de DNA foi realizada através do procedimento descrito por Sambrook e colaboradores (1989), em que se recolheu células de uma colónia isolada para um microtubo com 100 µL de BT. Adicionou-se 100 µL de fenol-clorofórmio (solução de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico 25:24:1, pH 8). Agitou-se até obter uma mistura homogénea e não se observarem aglomerados celulares. Em seguida, centrifugou-se a 14000 rpm durante 5 minutos e recolheu-se a fase aquosa para posterior análise em gel de agarose por electroforese.

2.2.3 Clone analysis

A integração dos produtos de PCR no plasmídeo pUG35 foi verificada por extracção de DNA plasmídico [Birnboim e Doly, 1979] e observação em gel de agarose.

Inoculou-se cada colónia de interesse em 5 mL de meio LB com ampicilina (100 µg/mL) e incubou-se durante a noite a 37°C com agitação. Centrifugou-se a 5000 rpm durante 6 minutos. Desprezou-se o sobrenadante e transferiu-se as células para um microtubo. Voltou-se a centrifugar, 4 minutos a 6000 rpm, e eliminou-se todo o sobrenadante.

Ressuspenderam-se as células em 100 µL de solução I com lisozima (4 mg/mL) e incubou-se durante 5 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, adicionou-se 200 µL de solução II preparada de fresco e misturou-se suavemente. Incubou-se por mais 5 minutos em gelo. Adicionou-se 150 µL de solução III fria, homogeneizou-se suavemente e incubou-se 60 minutos em gelo. Centrifugou-se durante 10 minutos a 13000 rpm e transferiu-se o sobrenadante para um novo microtubo contendo 1 mL de etanol absoluto frio. Deixou-se precipitar a -80°C (durante 15 minutos). Voltou-se a centrifugar nas condições anteriores e secou-se o sedimento em vácuo sem calor (aproximadamente 10 minutos no concentrador por centrifugação e vácuo - Univap100H, Uniequip). Depois de seco, adicionou-se 100 µL de solução IV e 200 µL de etanol absoluto frio. Incubou-se a -80°C durante 15 minutos. Após a centrifugação de 10 minutos a 13000 rpm secou-se novamente o sedimento em vácuo. Por último, ressuspendeu-se o DNA em 35 µL de água milliQ estéril e observou-se por electroforese em gel de agarose.

2.2.4 DNA plasmídico de *Saccharomyces cerevisiae* para PCR de colónia

DNA plasmídico dos transformantes de *S. cerevisiae* foi extraído a partir de uma colónia de *S. cerevisiae* transformada e transferiu-se a biomassa para a parede de um microtubo. Adicionou-se 50 µL de solução de lise e homogeneizou-se. Em seguida, efectuou-se um choque térmico, 15 segundos a 100°C e colocou-se imediatamente em gelo. Por último juntou-se 250 µL de água milliQ estéril a cada tubo eppendorf.

2.3 Reacção em cadeia da polimerase - PCR

A reacção PCR é um processo cíclico em que os seguintes passos são repetidos durante um número determinado de vezes: a cadeia dupla de DNA é desnaturada por aquecimento;

os *primers* ligam-se com zonas homólogas em cada uma destas cadeias e a DNA polimerase catalisa a produção de novas cadeias complementares.

2.3.1 Primers

Os *primers* utilizados para amplificação dos genes de interesse de *D. hansenii* encontram-se na Tabela 9. Os *primers* utilizados para o controlo de inserção nos transformantes de *E. coli* e de *S. cerevisiae* encontram-se listados na Tabela 10.

Os *primers* foram sintetizados pela empresa STAB VIDA, Investigação e Serviços em Ciências Biológicas, Lda. (Caparica, Portugal).

Tabela 9 – *Primers* utilizados na amplificação dos genes de *D. hansenii* (os locais de restrição estão assinalados a negrito).

Nome	Sequência (5' – 3')	Enzima
Dh6490f	GGACTAGT CCAGGAAAGAAACACTTGTCTTTGGTGGT	<i>Spe</i> I
Dh6490r	CC ATCGAT GGCAGTTTCTATATGCCCAAC	<i>Cla</i> I
Dh6468f	G CTCTAGAG CACGAGGGGCATATGGAAAATGAG	<i>Xba</i> I
Dh6468r	CC ATCGAT GGTCATTTTTAATTCTGGCAA	<i>Cla</i> I
Dh6402f	G CTCTAGAG CAAGTTAACTTAAGCAGAACATGGGAGGCCA	<i>Xba</i> I
Dh6402r	CC GCTCGAG CGGAACATTTTCGATATGATCAAA	<i>Xho</i> I
Dh0902f	GACTAGT CTCATGTCAAAGCTAATTCCTTCGCCCA	<i>Spe</i> I
Dh0902r	CC ATCGAT GGCTTCAATATGTTCAACTTC	<i>Cla</i> I
Dh0726f	GGACTAGT CCTCACAGTGAACAGTTAGAGCA	<i>Spe</i> I
Dh0726r	CC ATCGAT GGTTTTATCTACTTTCTCTTC	<i>Cla</i> I
Dh0528f	GACTAGT CCTCTCCAGAAAATTTGTACGGT	<i>Spe</i> I
Dh0528r	CC ATCGAT GGTTTCCTCGACATGAAGAGT	<i>Cla</i> I

Tabela 10 – *Primers* utilizados na PCR de confirmação dos fragmentos clonados.

Nome	Sequência (5' – 3')
Dh6490sc_f	GGAAAGAAACACTTGTCTTTGGTGGT
Dh6490sc_r	AACAGTTTCTATATGCCCAAC
Dh6468sc_f	CGACGAGGGGCATATGGAA AATGAGC
Dh6468sc_r	TTTC ATTTTTAATTCTGGCAA
Dh6402sc_f	AGTTAACTTAAGCAGAACATGGGAGGCCA
Dh6402sc_r	AACATTTTCGATATGATCAAA
Dh0902sc_f	TTCATGTCAAAGCTAATTCCTTCGCCCA
Dh0902sc_r	AGCTTCAATATGTTCAACTTC
Dh0726sc_f	CACAGTGAACAGTTAGAGCA
Dh0726sc_r	GTTTTTATCTACTTTCTCTTC
Dh0528sc_f	TTCACTCTCCAGAAAATTTGTACGGT
Dh0528sc_r	AATTCCTCGACATGAAGAGT

2.3.2 PCR gradiente

Os primeiros ensaios de PCR foram realizados em volumes de reacção de 10 μ L e testadas diversas temperaturas de *annealing* dos *primers* (PCR gradiente – C1000™ Thermal Cycler da BioRad) de forma a determinar a temperatura de hibridação que melhores resultados apresentava. Utilizando como programa base o descrito na Figura 7.

Os reagentes necessários são, para além da enzima (Phusion DNA Polymerase da Finnzymes), *primers* e do DNA molde (DNA genómico de *D. hansenii*), os nucleótidos livres (dNTPs mix da NZYTech) para construção das cadeias e a solução-tampão da reacção que estabelece as condições óptimas para a enzima.

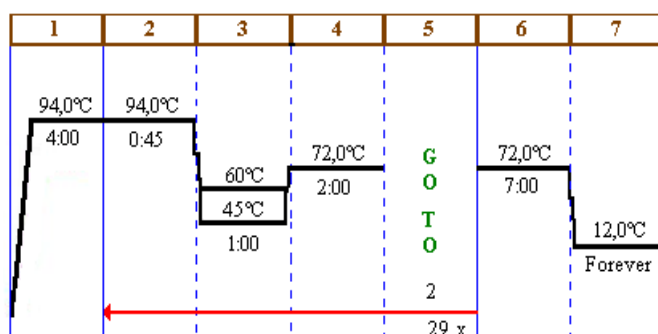


Figura 7 – Representação esquemática do programa de PCR gradiente utilizado na amplificação dos genes de *D. hansenii*.

Etapas: 1-desnaturação inicial, 2-desnaturação, 3-hibridação, 4-extensão, 5-nº de ciclos (neste caso reacção de 30 ciclos), 6-extensão final e 7-manutenção.

2.3.3 PCR rotina

As reacções de PCR foram realizadas rotineiramente em volumes 50 μ L (Tabela 11) sob as seguintes condições: 94°C durante 4 minutos, 30 ciclos: 94°C durante 45 segundos, 54,5°C durante 1 minuto e 72°C durante 2 minutos, e por último, a etapa de extensão final foi realizada a 72°C durante 7 minutos num Mastercycler personal da Eppendorf.

Tabela 11 – Composição reaccional para uma reacção de PCR num volume de 50 μ L.

Água	29,5 μ l
5x Phusion® HF Buffer	10 μ L
dNTPs (10 mM)	1 μ L
<i>primer fwd</i> (10 pmol/ μ L)	2 μ L
<i>primer rev</i> (10 pmol/ μ L)	2 μ L
DNA molde	5 μ L
Phusion® DNA Polymerase (2 U/ μ L)	0,5 μ L

Os fragmentos amplificados por PCR foram visualizados em gel de agarose, excisados do gel e purificados com o auxílio do kit “Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System” (Promega) de acordo com as indicações do fabricante.

2.3.4 PCR confirmação dos fragmentos

No controlo de inserção dos fragmentos clonados foram realizadas reacções de PCR de 10 µL de volume final. No caso dos transformantes de *E. coli* foi utilizado como molde 1 µL do DNA plasmídico extraído de acordo com o procedimento descrito no ponto 2.2.3 e no caso dos transformantes de *S. cerevisiae* utilizou-se 1 µL do lisado obtido segundo o processo descrito no ponto 2.2.4.

Nestes casos, as reacções de PCR foram realizadas utilizando o programa descrito em 2.3.3 modificando-se a temperatura de hibridação para 49,5°C.

2.4 Purificação de DNA

Nos casos em que era necessário a purificação de fragmentos de DNA a partir de géis de agarose ou os produtos PCR e produtos da digestão enzimática foi utilizado o kit “Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System” da Promega, de acordo com as indicações do fabricante.

2.5 Clonagem dos fragmentos de *Debaryomyces hansenii* amplificados

2.5.1 Hidrólise com enzimas de restrição

A digestão enzimática teve como finalidade detectar a presença do fragmento inserido, analisar o polimorfismo de cada clone e/ou preparar o DNA e o plasmídeo para clonagem.

Os produtos amplificados por PCR e o vector de expressão pUG35 foram digeridos com os respectivos pares de enzimas de restrição (Tabela 9). Em seguida as amostras foram aplicadas num gel de agarose 1% (p/v) para separação das bandas contendo os fragmentos de interesse. A purificação do material foi feita utilizando o kit referido no ponto 2.4.

A digestão enzimática foi também realizada para o DNA plasmídico extraído de *E. coli* de forma a verificar se o fragmento em estudo foi ou não inserido, recorrendo, a outros pares de enzimas de restrição localizados na região de clonagem múltipla do vector pUG35.

A escolha do tampão foi feita de forma a garantir que a combinação tinha 100% de actividade para as duas enzimas, neste caso tampão H. A digestão com as enzimas de restrição foi feita a 37°C durante duas horas respeitando as indicações do fabricante (Tabela 12).

Tabela 12 – Composição reaccional para a realização de uma digestão enzimática.

Componentes	Concentração final
DNA	1 µg
10x Tampão	2,5 µL
Água estéril	Até volume total 25 µL
Enzima(s)	1 U/cada

As enzimas de restrição e os tampões de reacção utilizados foram fornecidos pela Roche Diagnostics®.

2.5.2 Construção pUG35-fragmento

Após digestão e purificação dos fragmentos e do plasmídeo, procedeu-se à ligação de ambos, utilizando a enzima DNA T4 ligase (Roche) para ligar covalentemente as extremidades coesivas complementares dos fragmentos amplificados e do plasmídeo. A reacção de ligação ocorreu durante a noite a 16°C, segundo as indicações do fabricante.

A mistura reaccional para efectuar a reacção de ligação dos produtos de PCR com o plasmídeo pUG35 encontra-se descrita na Tabela 13.

Como controlo de re-ligação foi usado o fragmento de pUG35 linearizado sem adição de produto de PCR.

Tabela 13 – Composição reaccional para a realização da reacção ligação.

Componentes	Volumes
Produto PCR	X* µL
pUG35	Y* µL
Tampão de ligação (10x)	5 µL
T4 DNA Ligase (1 U/ µL)	4 µL
Água estéril	Até volume total 50 µL

Nota: X* e Y* - quantidade de produto PCR e vector necessária para a ligação dependendo da razão molar pretendida.

A ligação entre o fragmento de DNA que foi amplificado e o plasmídeo alvo foi calculada com base na relação: *tamanho inserto/tamanho pUG35*. A expressão traduz uma razão de 1:3 entre o inserto e o plasmídeo, sendo que também foram testadas as razões de 1:1, 1:2, 2:1 e 3:1. Para o cálculo foi considerado que o tamanho do pUG35 era 6231 pb (Anexo II) e os do inserto de \approx 1700 pb (variam entre 1600-1800 pb).

2.5.3 Transformação de *Escherichia coli*

2.5.3.1 Preparação de células competentes de *Escherichia coli* DH5 α

Para a preparação de células competentes de *E. coli* DH5 α foi utilizado o método descrito por Inoue e colaboradores (1990), com pequenas alterações. Foi inoculada uma colônia isolada de *E. coli* em 5 mL de meio SOB (37°C com agitação) durante 12-16 horas. Utilizou-se 10 μ L deste crescimento e inoculou-se 250 mL de meio SOB que ficou a 18°C com agitação (250 rpm) até que o valor de absorvância a 600 nm estivesse entre 0,55-0,60. Atingido este valor as células foram recolhidas (em tubos de centrifuga previamente arrefecidos) por centrifugação a 2500 rpm durante 15 min a 4°C. O sobrenadante foi removido e o sedimento ressuspendido em 33 mL de tampão TB. Esta suspensão celular foi mantida em gelo durante 15 min após os quais foi centrifugada a 2500 rpm durante 15 min a 4°C. Eliminou-se o sobrenadante e as células foram ressuspendidas em 8 mL de tampão TB a 4°C suplementado com 280 μ L de DMSO. Misturou-se suavemente e colocou-se em gelo durante 5 minutos. Em seguida, adicionou-se outro volume igual de DMSO e voltou-se a incubar em gelo mais 5 minutos. Por fim, as células foram divididas por alíquotas de volumes variados, congeladas imediatamente em azoto líquido e armazenadas a -80°C.

2.5.3.2 Transformação de células competentes de *Escherichia coli* DH5 α

O protocolo da transformação de *E. coli* foi adaptado de Bignell e Evans (1996). A transformação das células foi efectuada utilizando uma alíquota (50 μ L) de células competentes às quais foi adicionado 10 μ L de produto de ligação. Foram feitos três controlos: controlo negativo (água), positivo (pUG35 não digerido) e controlo negativo da ligação (pUG35 digerido após adição de ligase).

Incubou-se em gelo durante 30 minutos. Em seguida, efectuou-se o choque térmico durante 45 segundos a 42°C e voltou a colocar-se em gelo. Adicionaram-se 900 μ L de solução SOC e incubou-se durante 1 hora a 37°C com agitação suave. Posteriormente, efectuou-se uma

centrifugação a 3000 rpm durante 5 minutos e eliminou-se o sobrenadante. Plaqueou-se o conteúdo de cada microtubo em placas de LB suplementadas com ampicilina. Incubou-se 24/48 horas a 37°C.

2.5.4 Transformação de *Saccharomyces cerevisiae*

S. cerevisiae YSH 1172 foi transformada com o plasmídeo construído, através do método de acetato de lítio descrito por Gietz e Woods (2002). Utilizou-se o protocolo “High Efficiency Transformation Protocol”, com ligeiras modificações, de acordo com “The Gietz Lab Yeast Transformation Home Page”, <http://home.cc.umanitoba.ca/~gietz/>.

De uma cultura em fase exponencial, determinou-se o número de células através de um hemocítmetro de Neubauer. De seguida, fez-se uma diluição de modo a obter uma concentração de $2,5 \times 10^8$ células em 50 mL de meio e deixou-se duplicar duas vezes (aproximadamente 5 horas) até se obter uma concentração final de 2×10^7 células/mL. Centrifugou-se a 3000 g durante 5 minutos e lavaram-se as células em 25 mL de água estéril fria. Ressuspendeu-se em 1 mL de água estéril e transferiu-se a suspensão celular para um microtubo estéril. Ferveu-se 1 mL de DNA de esperma de salmão (*SS-carrier* DNA) e colocou-se imediatamente em gelo.

Para cada reacção utilizou-se 100 µL de suspensão celular (corresponde a 1×10^8 células) que, em seguida, foi centrifugada durante 30 segundos à velocidade máxima (13000 rpm) para eliminar todo o sobrenadante. Posteriormente, adicionou-se a mistura de transformação em que os componentes foram adicionados, respeitando a ordem descrita na Tabela 14.

Tabela 14 – Componentes da mistura de transformação de *S. cerevisiae*.

PEG 3350 (50% p/v)	240 µL
Acetato de lítio 1 M	36 µL
<i>SS-carrier</i> DNA (2 mg/mL)	50 µL
DNA plasmídico (2 µg)	X µL
Água estéril	34-X µL
Volume total	360 µL

Para além da transformação com o plasmídeo construído, *S. cerevisiae* foi também transformada com pUG35 (controlo positivo) e com água (controlo negativo). Misturou-se e incubou-se em banho-maria a 30°C durante uma hora. Depois deste tempo, adicionou-se em cada eppendorf 40 µL DMSO e voltou-se a incubar mais 30 minutos a 42°C.

Centrifugou-se por breves instantes, de modo a depositar o sedimento. Retirou-se todo o sobrenadante com a ajuda de uma micropipeta e ressuspenderam-se as células em 1 mL de água milliQ estéril. Plaquearam-se os transformantes em placas de YNB com glucose 20 g/L suplementadas com leucina, histidina e triptofano, colocando um volume de 100 μ L em cada placa. Incubou-se a 28°C até ao aparecimento de colónias.

2.6 Análise de DNA

2.6.1 Electroforese

Os géis de agarose (SeaKem[®] LE agarose) foram efectuados (com diferentes percentagens de agarose) em tampão TAE 1x tendo-se adicionado directamente 2,5 μ L GreenSafe (NZYTech) por cada 100 mL de solução de agarose. Correu-se a electroforese em tinas de electroforese BioRad com fonte de alimentação Power λ Pac300 da BioRad de acordo com os princípios de Sambrook *et al.* (1989).

Dependendo do objectivo de cada situação, variou-se o tamanho da tina e os parâmetros de corrida, como o tempo e a voltagem. Nos casos de determinação da concentração de DNA, utilizou-se um gel com 0,8% (p/v) agarose e nos casos de visualização e/ou determinação do tamanho de fragmentos utilizou-se 1,0% (p/v).

Às amostras foi adicionado azul de carga para aumentar a densidade destas e para melhor visualizar a corrida.

2.6.2 Quantificação

O DNA foi quantificado por electroforese em géis de agarose, comparando a intensidade de fluorescência da amostra com a de um padrão de tamanhos de bandas e concentração de DNA conhecidos. Como padrões utilizou-se o marcador DNA λ digerido com *Hind*III e o marcador I da NZYTech (Anexo III).

A observação do gel foi realizada sob luz UV utilizando o equipamento 2000 BioRad provido com o programa Quantity One 4.2.1 da BioRad.

2.6.3 Sequenciação automática

Os produtos de PCR, assim como o plasmídeo contendo o fragmento, foram sequenciados por sequenciação automática (STAB VIDA, Investigação e Serviços em Ciências Biológicas, Lda).

Todos os dados provenientes das sequenciações foram analisados utilizando o programa BioEdit versão 7.0.5 [Hall, 1999].

2.6.4 Bioinformática

Ao longo do trabalho, recorreu-se a vários programas informáticos disponíveis nas seguintes páginas Web:

Align Sequences using clustalW – EBI [Larkin *et al.*, 2007],

<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>

BCM Search Launcher: Sequence Utilities [Smith *et al.*, 1996],

<http://searchlauncher.bcm.tmc.edu/seq-util/seq-util.html>

ExpASY: SIB Bioinformatics Resource Portal – Proteomics Tools [Gasteiger *et al.*, 2003],

<http://expasy.org/tools/>

Génolevures: Blast [Sherman *et al.*, 2009],

<http://www.genolevures.org/blast.html#>

National Center for Biotechnology Information [Sayers *et al.*, 2009],

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

Primer designing tool [Rozen e Skaletsky, 2000],

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>

Sequence Manipulation Suite - Codon Usage [Stothard, 2000]

http://www.bioinformatics.org/sms2/codon_usage.html

Tm calculator – Finnzymes [Breslauer *et al.*, 1986],

http://www.finnzymes.fi/tm_determination.html

Em todos os programas bioinformáticos utilizados, os parâmetros dos programas foram mantidos na sua configuração por defeito.

3. ENSAIOS FISIOLÓGICOS

3.1 Microscopia de fluorescência

A análise de expressão e localização dos transportadores clonados (por co-visualização com GFP) foi observada em células em fase exponencial utilizando microscópio de epifluorescência (Leitz Biomed[®] Wetzlar Germany 513558) equipado com uma lâmpada de mercúrio (Leitz[®] Wetzlar Germany Type 307-148002 514687) e um conjunto de filtros de excitação (BP 340-380; BP 450-490; BP 515-560) que permite a observação de diversos fluorocromos. Para o registo fotográfico foi utilizada uma câmara fotográfica AxioCam MRc5 Zeiss e o programa AxioVision 40 versão 4.8.2.0.

3.2 Ensaio de crescimento

O crescimento celular dos transformantes de *S. cerevisiae* seleccionados foi acompanhado através da leitura da densidade óptica das culturas, a um comprimento de onda de 640 nm ($D.O_{640nm}$) utilizando um espectrofotómetro Ultrospec2100pro (Amersham Biosciences[®]).

Os balões com uma densidade inicial idêntica foram incubados num agitador orbital (Gallenkamp Orbital Incubator) a 28°C com agitação (150 rpm) onde permaneceram durante toda a experiência. Foram retiradas amostras em intervalos de tempo adequados e sempre que a $D.O_{640nm}$ excedia 0,45 foram efectuadas diluições, de forma a manter a $D.O_{640nm}$ na gama de linearidade.

3.3 Avaliação do influxo de protões através da membrana

As células foram recolhidas em fase exponencial ($D.O_{640nm}$ 0,8-1,0) centrifugadas a 10000 rpm durante 3 minutos, a 4°C, e lavadas, duas vezes, com água fria. O sedimento foi ressuspenso em água de modo a obter uma suspensão celular com uma concentração próxima de 40 mg/mL de peso seco. As células foram incubadas em gelo, uma hora antes do ensaio, e mantidas nestas condições durante o decorrer do mesmo.

A medição de movimentos de prótons foi realizada conforme descrito em Loureiro-Dias e Peinado (1984) e Loureiro-Dias (1987). O dispositivo utilizado encontra-se na Figura 8.

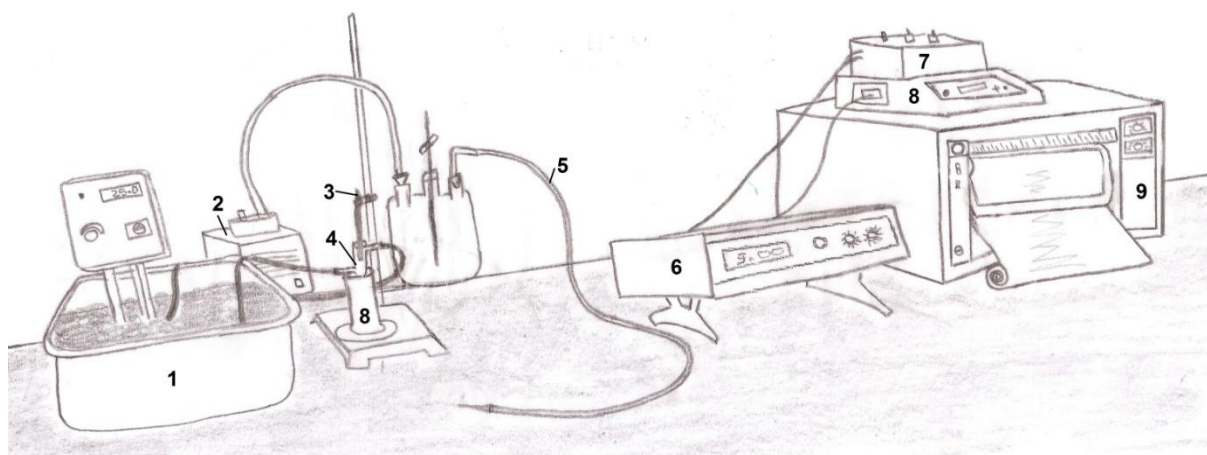


Figura 8 – Esquema de montagem utilizada para observar/caracterizar simportes com H^+ presentes na membrana plasmática dos transformantes de *S. cerevisiae*. 1- Banho 26/28°C; 2- Sistema vácuo; 3- electrodo pH; 4- reactor de 2mL; 5- Sistema lavagem; 6- Potenciômetro; 7- Dispositivo de amplificação de sinal; 8- Agitador magnético; 9- Registrador.

O electrodo combinado de pH de vidro (Broadley-James pH Electrodes) foi colocado num reactor de 2 mL de capacidade, mantido a uma variação térmica de 26/28°C com agitação magnética (Electronic Stirrer Model 300). O electrodo encontrava-se ligado a um potenciômetro (PHM82 Standard pH Meter Radiometer Copenhagen), e este, por sua vez, estava ligado a um registrador linear (BBC SE 460, Goerz Metrawatt). De forma a permitir um ajuste da sensibilidade do sinal foi incorporado entre o potenciômetro e o registrador, um dispositivo de amplificação de sinal.

No reactor colocou-se 680 μL de água desmineralizada e 300 μL da suspensão celular. Ajustou-se o valor de pH a um valor próximo de 5.0 com uma solução de HCl (10 mM ou 100 mM) ou NaOH (10 mM ou 100 mM) e fez-se o registo da linha base. Em seguida, adicionou-se 20 μL do composto a testar a 500 mM (no caso do rastreio dos 18 compostos – Tabela 15) e registaram-se as alterações de pH. Quando necessário o ensaio era realizado na presença de 1 M KCl. Entre cada ensaio o reactor foi cuidadosamente lavado com água destilada. Sempre que se justificou, procedeu-se a calibração do sinal através da adição de volumes conhecidos de uma solução de HCl (10 mM).

Após a detecção de polióis transportados através do mecanismo de simporte foi necessário proceder a respectiva caracterização, determinando-se parâmetros cinéticos (K_m e V_{max}).

Realizaram-se ensaios semelhantes variando a concentração inicial de polioliol entre 0,5 e 400 mM.

Tabela 15 – Substratos testados nos ensaios de simporte com H⁺.

Polióis	Açúcares
2,3-Butanediol	Arabinose
D-Arabitol	Frutose
L-Arabitol	Galactose
Eritritol	Glucose
Galactitol	Ribose
Glicerol	Sorbose
Inositol	Xilose
Maltose	
Manitol	
Ribitol	
Sorbitol	
Xilitol	

Para cada caso calculou-se a velocidade para cada concentração de substrato utilizado, traçando a tangente de cada curva de alcalinização (posterior à adição do polioliol) e registou-se o declive. Este valor associado a uma calibração (com adição de X nmol de H⁺), relaciona variações de pH com quantidades de prótons adicionadas ao sistema, num determinado instante. Cada ponto representado nos gráficos das velocidades *versus* concentração substrato constitui a média das velocidades registadas. Os dados foram tratados através do programa GraphPad Prism e os valores de K_m e V_{max} foram calculados através da Equação de Michaelis-Menten.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. PESQUISA BIBLIOGRÁFICA – ASSIMILAÇÃO DE POLIÓIS

Uma das dificuldades encontradas na utilização de resíduos lignocelulósicos por microrganismos na produção de bioetanol é a sua capacidade de utilizar as diversas pentoses que compõem esses resíduos já que a maioria dos microrganismos consegue apenas utilizar as hexoses (D-glucose, D-frutose e D-manose).

Durante os últimos anos, tem-se vindo a destacar a importância de conhecer os transportadores e os mecanismos associados ao metabolismo de D-xilose e L-arabinose, já que são os componentes maioritários nos hidrolisados de lignocelulose [Leandro *et al.*, 2009].

As leveduras têm vindo a ser alvo de estudos de forma a melhorar e encontrar vias mais favoráveis na produção de combustíveis alternativos e renováveis. Estas encontram-se amplamente distribuídas na Natureza e podem ser encontradas em vários substratos. São classificadas entre os filos *Ascomycota* e *Basidiomycota* e estão contidas num ramo que representa o sub-reino *Dikarya* [Hibbett *et al.*, 2007]. Os basidiomicetas são capazes de utilizar uma maior variedade de compostos que os ascomicetas devido ao amplo perfil assimilativo de fonte de carbono que os basidiomicetas possuem, diferente dos ascomicetas, que se restringem a poucas fontes de carbono [Kurtzmann e Fell, 1998].

O primeiro passo metabólico na fermentação de açúcares por leveduras é a absorção através da membrana plasmática, e vários relatos têm mostrado que o transporte é o passo limitante para a sua utilização [Goffrini *et al.*, 2002].

De forma a reunir a informação existente a nível bibliográfico sobre a assimilação de polióis pelas leveduras foi feita uma compilação de 464 leveduras Ascomicetas e 216 leveduras Basidiomicetas (Anexo IV) através da informação disponível em Kurtzman e Fell (1998) e Kreger-van Rij (1984). A partir compilação bibliográfica foi possível concluir que nas leveduras ascomicetas, o poliól mais assimilado é o glicerol, seguido do D-glucitol (=sorbitol) e D-manitol. Situação diferente se observou quando analisámos as leveduras basidiomicetas, onde a ordem dos polióis se inverte (1º: D-manitol, 2º: D-glucitol e 3º: glicerol) (Tabela 16). Em relação ao xilitol ambas possuem uma percentagem similar de leveduras que o assimilam, 39,3% nas ascomicetas e 33,6% nas basidiomicetas, o mesmo se passa com o L-arabitol, 21,6% nas basidiomicetas contra os 19,4% das ascomicetas.

Tabela 16 – Percentagem de espécies de leveduras que assimilam polióis.

Ascomycetas		Basidiomycetas	
Polióis	%	Polióis	%
Glicerol	73,6	Glicerol	54,8
Eritritol	23,3	Eritritol	27,6
Ribitol	37,6	Ribitol	46,5
Galactitol	6,3	Galactitol	21,2
D-Manitol	65,6	D-Manitol	85,2
D-Glucitol	66,1	D-Glucitol	77,4
Mio-inositol	6,0	Mio-inositol	38,7
L-Arabitól	19,4	L-Arabitól	21,6
Xilitol	39,3	Xilitol	33,6
L-Arabitól + Xilitol	18,6	L-Arabitól + Xilitol	19,3
Glucitol + Ribitol	36,1	Sorbitol + Ribitol	44,7
L-Arabitól + Xilitol + Glucitol + Ribitol	11,1	L-Arabitól + Xilitol + Glucitol + Ribitol	14,7

A partir da análise efectuada, foram ainda pesquisados quais os géneros de leveduras basidiomicetas e ascomycetas que eram capazes de assimilar os dois polióis resultantes dos açúcares maioritariamente presentes nos materiais lignocelulósicos. Esta análise permitiu verificar que, contrariamente à noção do que os basidiomicetas são capazes, em geral, de utilizar uma maior variedade de compostos, quando se trata de xilitol e arabitól, o número de espécies ascomycetas com capacidade para assimilar ambos os polióis é superior (86 espécies) face ao número registado de basidiomicetas (42 espécies).

No caso das leveduras ascomycetas as espécies detectadas pertencem a 11 géneros diferentes, estando maioritariamente representadas as espécies dos géneros *Candida*, *Pichia* e *Debaryomyces* com 37, 21 e 8 espécies respectivamente. Por outro, existem 5 géneros que apresentam apenas 1 espécie capaz de assimilar ambos os polióis (*Dipodascopsis tothii*, *Saccharomycopsis selenospora*, *Sympodiomyces parvus*, *Williopsis salicorniae* e *Zygozoma suomiensis*).

No caso das leveduras basidiomicetas, o número de géneros com espécies capazes de assimilar xilitol e arabitól é superior (13 géneros), mas a sua distribuição é menos concentrada, destacando-se apenas o género *Rhodotorula* (com 9 espécies), *Trichosporon* (com 7 espécies) e *Cryptococcus* (com 6 espécies). Muito inferior ao número de espécies dos 2 géneros dominantes de ascomycetas (Tabela 17). O que leva a pensar que a assimilação destes polióis é uma característica mais específica de determinados géneros de ascomycetas que de basidiomicetas onde a sua distribuição está mais generalizada. É

curioso que todas as espécies capazes de assimilar arabitol também assimilam xilitol, não sendo no entanto o inverso válido.

Tabela 17 – Géneros a que pertencem as espécies que assimilam L-arabitol e xilitol.

Ascomicetas		Basidiomicetas	
Género	Nº de espécies	Género	Nº de espécies
<i>Ambrosiozyma</i>	4	<i>Agaricostilbum</i>	1
<i>Debaryomyces</i>	8	<i>Cystofilobasidium</i>	2
<i>Dipodascopsis</i>	1	<i>Filobasidium</i>	1
<i>Lipomyces</i>	4	<i>Rhodospordium</i>	5
<i>Pichia</i>	21	<i>Sporidiobolus</i>	1
<i>Saccharomycopsis</i>	1	<i>Bullera</i>	5
<i>Williopsis</i>	1	<i>Cryptococcus</i>	6
<i>Zygozyma</i>	1	<i>Fellomyces</i>	2
<i>Candida</i>	37	<i>Rhodotorula</i>	9
<i>Myxozyma</i>	7	<i>Sporobolomyces</i>	1
<i>Sympodiomyces</i>	1	<i>Sterigmatomyces</i>	1
		<i>Trichosporon</i>	7
		<i>Tsuchiyaea</i>	1

Curiosamente, tendo em conta os nove polióis analisados neste rastreio bibliográfico, ao contrário do que se observou para xilitol e arabitol, apenas cinco espécies possuem a capacidade para assimilar os nove polióis. Uma é de afinidade ascomiceta (*Candida aurangiensis*), sendo as restantes quatro de afinidade basidiomiceta (*Bullera sinensis*, *Cryptococcus humicolus*, *Trichosporon jirovecii* e *Trichosporon mucoides*).

No entanto, quando se exclui o inositol, considerando os restantes polióis o número de espécies de afinidade ascomiceta capazes de assimilar vários polióis aumenta significativamente. Neste caso existem 3 espécies do género *Candida* (*C. friedrichii*, *C. membranifaciens* e *C. nemodendra*), 3 do género *Debaryomyces* (*D. hansenii* var. *fabryii*, *D. pseudopolymorphus* e *D. vanriijae* var. *vanriijae*) e 4 do género *Pichia* (*Pichia castillae*, *Pichia haplophila*, *Pichia heimii* e *Pichia methanolica*) capazes de assimilar 8 dos polióis considerados excepto o inositol. Esse facto poderá eventualmente estar relacionado com o facto de este poliól apresentar uma estrutura aromática (o que não acontece com os restantes polióis considerados), dificultando a sua utilização.

Duas espécies de *Rhodospordium* (*R. lusitaniae* e *R. paludigenum*) são capazes de assimilar 7 polióis (se não considerarmos o inositol e nem o eritritol).

Tabela 18 – Assimilação de diversos polióis por leveduras.

(Abreviaturas: Gli – Glicerol; Eri – Eritritol; Rib – Ribitol; Gal – Galactitol; Man – D-Manitol; Glu – D-Glucitol; Ino – Mio-inositol; Ara –L-Arabitol e Xil –Xilitol) [Kurtzman e Fell, 1998; Kreger-van Rij, 1984].

Nome	Gli	Eri	Rib	Gal	Man	Glu	Ino	Ara	Xil
Ascomycetas									
<i>Candida aurangiensis</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Candida friedrichii</i>	+	+	+	+	+	+	-	+	+
<i>Candida membranifaciens</i>	+	+	+	+	+	+	-	+	+
<i>Candida nemodendra</i>	+	+	+	+	+	+	-	+	+
<i>Debaryomyces hansenii</i> var. <i>fabryii</i>	+	+	+	+	+	+	-	+	+
<i>Debaryomyces pseudopolymorphus</i>	+	+	+	+	+	+	-	+	+
<i>Debaryomyces vanriijiae</i> var. <i>vanriijiae</i>	+	+	+	+	+	+	-	+	+
<i>Pichia castillae</i>	+	+	+	+	+	+	-	+	+
<i>Pichia haplophila</i>	+	+	+	+	+	+	-	+	+
<i>Pichia heimii</i>	+	+	+	+	+	+	-	+	+
<i>Pichia methanolica</i>	+	+	+	+	+	+	-	+	+
Basidiomicetas									
<i>Bullera sinensis</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Cryptococcus humicolus</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Trichosporon jirovecii</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Trichosporon mucoides</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Rhodospordium lusitaniae</i>	+	-	+	+	+	+	-	+	+
<i>Rhodospordium paludigenum</i>	+	-	+	+	+	+	-	+	+

Nota: Assimilação (+) e Não assimila (-)

Fazendo uma análise mais global de alguns géneros do filo *Ascomycota* analisados nesta pesquisa bibliográfica podemos verificar:

- Género *Candida* – grupo que se apresenta muito heterogéneo, o que poderá refletir os problemas de identificação associados a este género. Os quatro polióis mais assimilados são glicerol, ribitol, manitol e glucitol apesar de muitas espécies manifestarem uma resposta positiva após alguns dias de incubação. Em relação ao xilitol aproximadamente metade das leveduras o conseguem assimilar;
- Género *Debaryomyces* – tal como o género *Candida*, os polióis mais assimilados são glicerol, ribitol, manitol e glucitol. Apenas um terço das espécies analisadas conseguem assimilar galactitol e nenhuma consegue assimilar inositol. Em relação ao xilitol existem apenas duas espécies (*Debaryomyces melissophilus* e *Debaryomyces occidentalis* var. *personii*) que não conseguem assimilar este polioli;
- Géneros *Hanseniaspora*, *Issatchenkia*, *Kluyveromyces*, *Lipomyces* e *Saccharomyces* – são exemplo de géneros de espécies de leveduras ascomicetas que não assimilam polióis;
- Género *Pichia* – género das leveduras ascomicetas que apresenta a mais elevada heterogeneidade de resposta em relação à assimilação de polióis, existindo 4 espécies

(*Pichia castillae*, *Pichia haplophila*, *Pichia heimii* e *Pichia methanolica*) capazes de assimilar 8 polióis (excepto o inositol); apenas 1 (*Pichia inositovora*) capaz de assimilar inositol; 22 espécies capazes de assimilar arabitól contra as 43 capazes de assimilar xilitól e 13 espécies capazes de assimilar apenas um poliól (glicerol).

Em relação ao filo *Basidiomycota*, a heterogeneidade entre as espécies dentro de cada género é imensa não sendo possível definir grupos de espécies com características comuns.

Dada a capacidade de 1) algumas espécies do género *Debaryomyces* de assimilar xilitól e arabitól; 2) de *D. hansenii* estar entre as sequências das dezenas de genomas (parciais ou completos) de leveduras publicadas ao longo dos últimos anos e 3) do desenvolvimento recente de ferramentas para manipulação molecular apropriada de genes *D. hansenii* [Minhas *et al.*, 2009] têm permitido a construção de estirpes recombinantes e tem proporcionado novas vias para avaliar o papel individual dos seus transportadores.

2. CLONAGEM E EXPRESSÃO HETERÓLOGA DOS GENES DE *Debaryomyces hansenii*

2.1 Selecção dos genes de *Debaryomyces hansenii*

A publicação do genoma de *D. hansenii* CBS 767 (Génolevures Consortium, <http://cbi.labri.fr/Genolevures/>) em 2004 abriu caminho para novos estudos e desde então o mesmo tem vindo a ser progressivamente anotado [Sherman *et al.*, 2009]. Esta espécie apresenta a particularidade de possuir 22 genes com características típicas de transportadores de membrana plasmática cuja função não foi atribuída [Palma *et al.*, 2007]. No âmbito do projecto PTDC/AGR-CFL/71792/2006 foram seleccionados treze destes genes cuja informação se encontra reunida na Tabela 19.

Tabela 19 – Informações sobre os genes de *D. hansenii* CBS 767 seleccionados neste trabalho (Génolevures Consortium, <http://cbi.labri.fr/Genolevures/>) [Sherman *et al.*, 2009].

Nome	Outros nomes	Tamanho inserto	Similaridade
DEHA2G06490g	DEHA-CDS2071.1 DEHA-IPF4453 DEHA0G07139g	1611 pb	Semelhante ao <i>HXT3</i> de <i>S. cerevisiae</i> , transportador de glucose de baixa afinidade da família MFS, cuja expressão é induzida em condições de baixa ou alta glucose
DEHA2G06468g	DEHA-CDS2333.1 DEHA-IPF4454 DEHA0G07117g	1503 pb	Semelhante ao <i>HXT3</i> de <i>S. cerevisiae</i> , transportador de glucose de baixa afinidade da família MFS, cuja expressão é induzida em condições de baixa ou alta glucose
DEHA2G06402g	DEHA-CDS2123.1 DEHA-IPF4459 DEHA0G07051g	1587 pb	Semelhante ao <i>HXT4</i> de <i>S. cerevisiae</i> , transportador de glucose de alta afinidade da família MFS, cuja expressão é induzida por baixos níveis de glucose e reprimido por altos níveis de guise
DEHA2E00902g	DEHA-CDS2045.1 DEHA-IPF5729 DEHA0E01232g	1620 pb	Semelhante ao <i>MAL11</i> de <i>S. cerevisiae</i> , (transportador alfa-glucosídeo)
DEHA2E00726g	DEHA-CDS1929.1 DEHA-IPF5749 DEHA0E00957g	1665 pb	Semelhante a proteína transportadora de hexoses de <i>Neurospora crassa</i>
DEHA2B00528g	DEHA-CDS1976.1 DEHA-IPF9148 DEHA0B00517g	1647 pb	Semelhante ao <i>MAL11</i> <i>S. cerevisiae</i> (transportador alfa-glucosídeo)
DEHA2E01386g	DEHA-CDS1963.1 DEHA-IPF5676 DEHA0E01936g	1650 pb	Semelhante ao P39932 de <i>S. cerevisiae</i> e ao <i>STL1</i> - simporte glicerol/H ⁺ da membrana plasmática
DEHA2C05896g	IPF_2063	1950 pb	Algumas semelhanças ao <i>HXT3</i> , transportador de glucose de baixa afinidade
DEHA2C05874g	DEHA-CDS1362.1 DEHA-IPF2067 DEHA0C06633g	1947 pb	Algumas semelhanças ao <i>HXT3</i> , transportador de glucose de baixa afinidade
DEHA2C05918g	DEHA-CDS1359.1 DEHA-IPF2060 DEHA0C06677g	1950 pb	Algumas semelhanças ao <i>HXT3</i> , transportador de glucose de baixa afinidade
DEHA2F15444g	DEHA-CDS1848.1 DEHA-IPF7793 DEHA0F16720g	1701 pb	Fracamente semelhante ao <i>HXT11</i> tem semelhança com superfamília MFS
DEHA2C06380g	DEHA-CDS1909.1 DEHA-IPF2026 DEHA0C07161g	1671 pb	Semelhante ao transportador de mio-inositol da superfamília transportador de açúcar
DEHA2E24310g	DEHA-CDS1485.1 DEHA-IPF10903 DEHA0E25839g	1881 pb	Algumas semelhanças ao <i>HXT3</i> , transportador de glucose de baixa afinidade

2.2 Desenhos dos primers

Com vista à amplificação por PCR e clonagem dos genes de *Debaryomyces hansenii* seleccionados no vector pUG35 procedeu-se, numa primeira fase, ao desenho dos primers a utilizar para amplificar toda a sequência codificante dos mesmos (ORF) no sentido directo

e inverso. Estes *primers* foram desenhados tendo em conta os seguintes pressupostos estabelecidos [Innis e Gelfand, 1990]:

- I. Amplificação da totalidade do gene desde o seu codão de iniciação,
- II. Eliminação do codão Stop de forma a permitir a co-tradução da sequência de interesse e da GFP, possibilitando a observação de expressão e sua localização por fluorescência,
- III. Presença de caudas contendo locais de corte para enzimas de restrição (do local de clonagem no vector pUG35) que permitam a inserção da sequência na orientação correcta e em linha com a sequência da GFP na extremidade C-terminal,
- IV. Tamanho dos *primers* entre 17-28pb (assegurando que o *primer* tenha um número suficiente de nucleótidos para ser único em todo o genoma),
- V. Temperatura dos *primers* sempre que possível, aproximadamente idêntica para ambos,
- VI. Conteúdo em G-C aproximadamente 50-60%,
- VII. Preferência de temperaturas T_m entre 55-80°C,
- VIII. Ligação da sequência amplificada de forma a estar em linha com a sequência GFP,
- IX. Evitar a formação de estruturas secundárias intramoleculares (*hairpin* ou *loops*) estáveis,
- X. Evitar *primers* complementares, especialmente na extremidade 3', para impedir a formação de dímeros do *primer* e consequentemente amplificação de produtos inespecíficos,
- XI. Máxima especificidade.

Para o desenho do *primer* directo teve-se em conta a região a montante da sequência codificante. O *primer* inverso, foi definido como sendo a sequência complementar reversa dos últimos 21 nucleotídeos da região codificante (sem o codão Stop).

Com vista a cumprir os pressupostos estabelecidos foi tido em conta a ORF bem como a região contígua ao codão iniciação procurando uma região altamente específica para cada uma das ORFs a amplificar. Os *primers* foram assim desenhados manualmente e confirmados com o auxílio de programas informáticos: *Primer designing tool* [Rozen e Skaletsky, 2000] e *Tm calculator* – Finnzymes [Breslauer *et al.*, 1986]. O programa *Primer designing tool* determina o conjunto de *primers* (iniciadores) mais adequados à reacção de amplificação com base no seu comprimento, nas homologias das extremidades 3' e comprimento dos fragmentos a amplificar [Sambrook *et al.*, 1989] e o programa *Tm calculator* calcula a respectiva temperatura de *melting* (T_m).

Para cada ORF, escolhendo a região a amplificar, procuraram-se *primers* com tamanhos adequados, temperaturas de hibridação próximas e uma composição média de C-G próxima de 50%. Foram assim seleccionados aqueles que melhor cumpriam os pressupostos anteriormente mencionados, sendo escolhidos os *primers* indicados na Tabela 20.

Tabela 20 – *Primers* utilizados na PCR de confirmação dos fragmentos clonados.

Nome	Sequência (5' – 3')	Tamanho (pb)	C-G (%)	Tm (°C)
Dh6490sc_f	GGAAAGAAACACTTGTCTTTGGTGGT	26	42	58
Dh6490sc_r	AACAGTTTCTATATGCCCAAC	21	38	46
Dh6468sc_f	CGACGAGGGGCATATGGAA AATGAGC	26	53	66
Dh6468sc_r	TTTC ATTTTAAATTCTGGCAA	21	23	48
Dh6402sc_f	AGTTAACTTAAGCAGAACATGGGAGGCCA	29	44	63
Dh6402sc_r	AACATTTTCGATATGATCAAA	21	23	44
Dh0902sc_f	TTCATGTCAAAGCTAATTCCTTCGCCCA	28	42	65
Dh0902sc_r	AGCTTCAATATGTTCAACTTC	21	33	43
Dh0726sc_f	CACAGTGAACAGTTAGAGCA	20	45	43
Dh0726sc_r	GTTTTATCTACTTTCTCTTC	21	28	37
Dh0528sc_f	TTCACTCTCCAGAAAATTTGTACGGT	26	38	56
Dh0528sc_r	AATTCCTCGACATGAAGAGT	21	38	47

Os *primers* utilizados nas reacções de PCR de confirmação dos fragmentos (Tabela 20) possuem entre 21 a 27 nucleótidos com uma composição média C-G de 37% e com uma diferença média de 14°C entre as Tm de cada par de *primers*.

De seguida, verificou-se a especificidade dos *primers* com vista a garantir que tanto quanto possível não haveria uma elevada probabilidade de amplificar outros genes de *D. hansenii* que não os genes de interesse. Para tal fez-se uma pesquisa de homologia entre cada *primer* e a sequência do genoma de *D. hansenii* disponível através de *Blastx*. Os resultados da pesquisa do alinhamento dos *primers* com o genoma de *D. hansenii* permitiram verificar a especificidade dos *primers* desenhados para a respectiva região codificante.

Após a escolha das sequências específicas dos *primers* foram adicionadas bases para a construção de locais de restrição que permitissem digerir o fragmento amplificado com elevada eficiência obtendo extremidades coesivas para que a possibilidade de ligação fosse maior. Escolheram-se as enzimas de restrição que obedecessem aos seguintes critérios:

- i. Enzimas do local de clonagem múltipla ou enzimas compatíveis com as enzimas do local de clonagem múltipla,
- ii. Os locais de corte no vector pUG35 fossem únicos e localizados no local de clonagem múltipla,

- iii. Não existissem locais de corte no interior da sequência a amplificar (não cortassem o fragmento de interesse),
- iv. De preferência enzimas que cortassem com extremidades coesivas,
- v. Permitssem a clonagem do fragmento a amplificar com a orientação correcta, em linha com o promotor e com a sequência de GFP, de modo a que após clonagem toda a construção ficasse *in frame* (Figura 9).

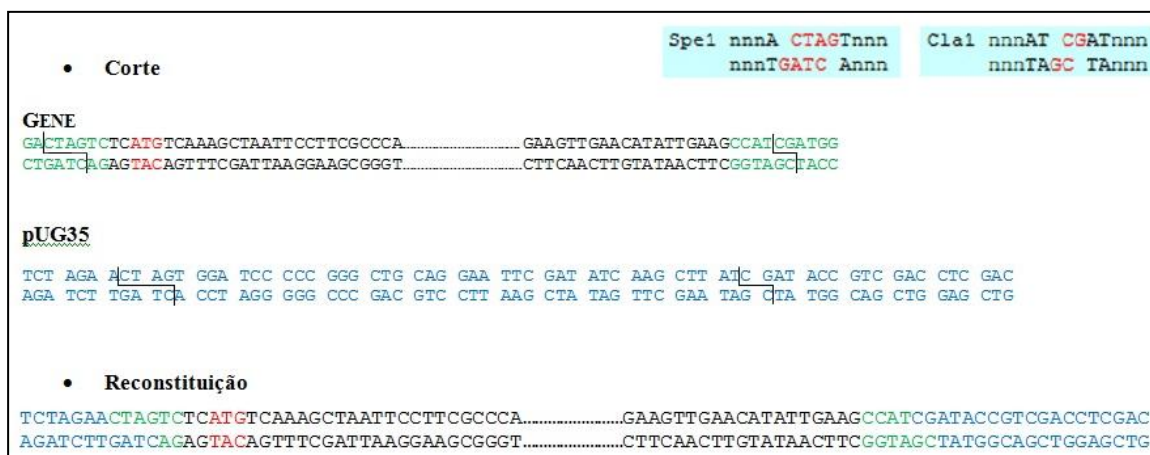


Figura 9 – Exemplo da reconstituição do pUG35 com o fragmento 0902 amplificado, após digestão com as enzimas de restrição *SpeI* e *ClaI*. Verde – local corte fragmento, Vermelho - codão iniciação (ATG), Preto – gene de interesse e Azul – pUG35.

Após determinar o conjunto de enzimas de restrição que obedecessem aos critérios anteriormente enumerados, escolheram-se as enzimas: *ClaI*, *PstI*, *SpeI*, *XbaI* e *XhoI* combinadas nos pares *ClaI/ SpeI*, *ClaI/ XbaI* e *XbaI/XhoI*, e desenharam-se os *primers* completos para as reacções de PCR para amplificação dos genes selecionados (Tabela 21).

O tamanho médio dos *primers* utilizados foi de 33 nucleótidos e com uma composição média C-G de 44% (Tabela 21). A diferença média da *Tm* entre eles foi de 4°C.

Tabela 21 – *Primers* utilizados na amplificação dos genes de *D. hansenii* (os locais de restrição estão assinalados a negrito).

Nome	Sequência (5' – 3')	Enzima	Tamanho (pb)	C-G (%)	Tm (°C)
Dh6490f	GG ACTAGT CCAGGAAAGAAACACTTGTCTTTGGTGGT	<i>Spe I</i>	37	45	69
Dh6490r	CCAT CGAT GGCAGTTTCTATATGCCCAAC	<i>Cla I</i>	29	48	66
Dh6468f	GCT CTAG AGCACGAGGGGCATATGGAAAATGAG	<i>Xba I</i>	34	52	71
Dh6468r	CCAT CGAT GGTCATTTTTAATTCTGGCAA	<i>Cla I</i>	29	37	64
Dh6402f	GCT CTAG AGCAAGTAACTTAAGCAGAACATGGGAGGCCA	<i>Xba I</i>	40	47	72
Dh6402r	CCG CTCG AGCGGAACATTTTCGATATGATCAAA	<i>Xho I</i>	33	45,4	63
Dh0902f	GACTAGT CTCATGTCAAAGCTAATTCTTCGCCCA	<i>Spe I</i>	35	45	68
Dh0902r	CCAT CGAT GGCTTCAATATGTTCAACTTC	<i>Cla I</i>	29	41	63
Dh0726f	GG ACTAGT CCTCACAGTGAACAGTTAGAGCA	<i>Spe I</i>	31	48	61
Dh0726r	CCAT CGAT GGTTTTATCTACTTTCTCTTC	<i>Cla I</i>	29	37	57
Dh0528f	GACTAGT CCACTCTCCAGAAAATTTGTACGGT	<i>Spe I</i>	32	43	62
Dh0528r	CCAT CGAT GGTTTCCTCGACATGAAGAGT	<i>Cla I</i>	29	48	66

2.3 Optimização da reacção de PCR

Como abordagem inicial com vista à optimização das condições de reacção de PCR relacionados com a temperatura de hibridação dos *primers* para obtenção de amplificações com maior rendimento e especificidade, procedeu-se à reacção de PCR usando um gradiente de temperatura.

O número, tempo e temperatura das diferentes fases de um PCR dependem do equipamento que se usa, dos *primers*, da composição dos fragmentos a amplificar e da própria cadeia molde. A temperatura de hibridação dos *primers* tem um grande impacto na especificidade da reacção, e devendo esta temperatura por norma ser inferior 5-10°C da temperatura de *melting* dos mesmos.

O intervalo de temperaturas de hibridação testado para o gradiente foi entre 45°C e 60°C. A escolha deste gradiente deveu-se às diferenças significativas entre as T_m de cada par de *primers* e também ao facto dos primeiros ciclos de reacção de amplificação, o emparelhamento ocorrer essencialmente entre o DNA genómico de *D. hansenii* e a sequência específica do *primer*, só depois existindo um número suficiente de cópias contendo a sequência completa para hibridação com todo o *primer*.

Na Figura 10, apresentam-se os resultados obtidos na reacção de PCR com gradiente. Tal como se pode observar todas as 8 temperaturas testadas (45°C; 46°C; 48°C; 50,8°C; 54,5°C; 57,5°C; 59,1°C e 60°C) em cada par de *primers* permitiram amplificar os fragmentos em estudo, excepto em dois casos:

- ORF 6490 – na primeira temperatura testada (45°C) ocorreu uma amplificação do fragmento mas com pouca intensidade, e nas duas temperaturas seguintes (46°C e 48°C) verificou-se o aparecimento de fragmentos não específicos;
- ORF 6468 – observou-se o aparecimento de inúmeros fragmentos não específicos e até mesmo temperaturas onde não ocorreu qualquer amplificação.

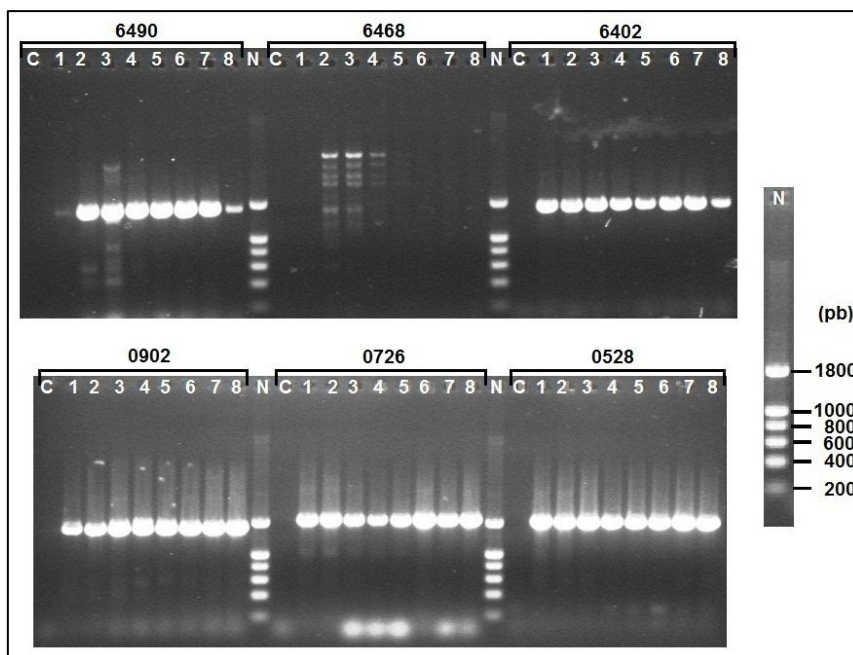


Figura 10 – Perfil de amplificação por PCR gradiente, onde as temperaturas testadas foram: 1–45°C; 2–46°C; 3–48°C; 4–50,8°C; 5–54,5°C; 6–57,5°C; 7–59,1°C e 8–60°C (condições de electroforese: gel agarose 0,8% (p/v), TAE 1x, 120V durante 75 minutos). C – controlo negativo da reacção. N – marcador molecular I da NZYTech.

Foi assim possível determinar as melhores condições para amplificação de 5 dos 6 genes seleccionados, e escolher para temperatura de hibridação 54,5°C visto ser comum a todos e permitir realizar simultaneamente numa única reacção PCR a amplificação dos vários genes. O programa utilizado foi o descrito na Figura 11 e permitiu amplificar em larga escala os fragmentos (Figura 12) com o tamanho esperado: 6490 – 1650pb, 6402 – 1600pb, 0902 – 1620pb, 0726 – 1840pb e 0528 – 1800pb em quantidade suficiente de fragmento amplificado que permitisse o passo de clonagem no vector pUG35.

Em relação à ORF DEHA2G06468g, foram realizados mais ensaios com o objectivo de reduzir os fragmentos não específicos e intensificar a amplificação do fragmento alvo. Foram testados outras condições, nomeadamente, adição de iões de magnésio, diferentes gradientes de temperaturas e até mesmo quatro outras enzimas (NZYDNACchange polymerase, NZYLong DNA polymerase, NZYPremium DNA polymerase e NZYTAq DNA polymerase) da NZYTech. Em todos estes ensaios, observaram-se diversos fragmentos de tamanhos muito próximos, resultantes de amplificação não específica. O facto de terem tamanhos semelhantes impossibilitou a adopção de uma estratégia baseada na separação dos fragmentos por electroforese em gel de agarose seguida de re-amplificação, de forma a isolar o mais possível o fragmento de interesse de outros produtos que pudessem ser amplificados de forma inespecífica durante a reacção. Estes fragmentos podem resultar de hibridação do par de *primers* Dh6468f/Dh6468r a outros locais do genoma de *D. hansenii*

amplificando diversos genes similares, embora se tenha procurado desenhar *primers* o mais específico possível.

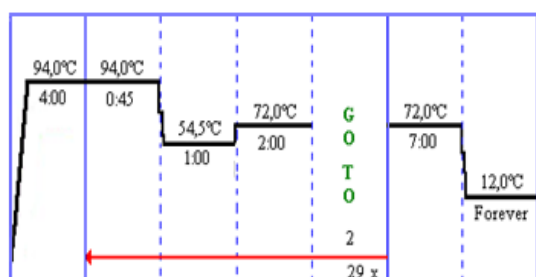


Figura 11 – Representação esquemática do programa de PCR utilizado na amplificação dos genes de *D. hansenii*.

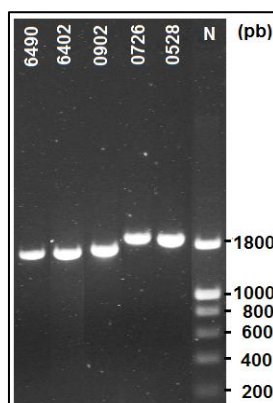


Figura 12 – Perfil de ampliação dos fragmentos em estudo obtido através de PCR (condições de electroforese: gel agarose 0,8% (p/v), TAE 1x, 70V durante 60 minutos). N - marcador I da NZYTech.

2.4 Construção dos plasmídeos recombinantes

Após a amplificação por PCR, o produto de PCR foi quantificado, purificado e posteriormente digerido com as respectivas endonucleases (Tabela 9) de modo a originar extremidades coesivas para ligar ao vector.

Simultaneamente com a digestão dos fragmentos amplificados procedeu-se à digestão do vector pUG35 de forma a originar extremidades que permitissem ligar o fragmento ao vector em linha com GFP e na orientação correcta. As enzimas de restrição usadas para digestão do vector pUG35 foram idênticas às usadas para digestão dos fragmentos amplificados (*SpeI* e *Clal*) (Figura 13 - A) à excepção do ORF DEHA2G06402g. Neste caso, utilizaram-se *XbaI* e *XhoI* para o fragmento e *XbaI* e *SalI* para o pUG35 (Figura 13 - B), uma vez que a ORF 6402 apresentava locais de corte para as restantes enzimas de restrição que permitiam a orientação correcta e as enzimas de restrição *XhoI* e *SalI* produzem extremidades coesivas compatíveis uma com a outra, por simples emparelhamento das bases azotadas permitindo a clonagem deste fragmento ao plasmídeo.

Após a digestão purificou-se o produto de digestão de forma a remover pequenos oligonucleotídeos e outras impurezas que possam interferir nos passos seguintes, e procedeu-se à reacção de ligação usando T4 DNA ligase que catalisa a ligação covalente fosfodiéster entre dois nucleótidos, promovendo a ligação entre o fragmento e o plasmídeo pUG35. Efectuou-se também o controlo de digestão procedendo-se à ligação do vector linearizado sem o fragmento de interesse.

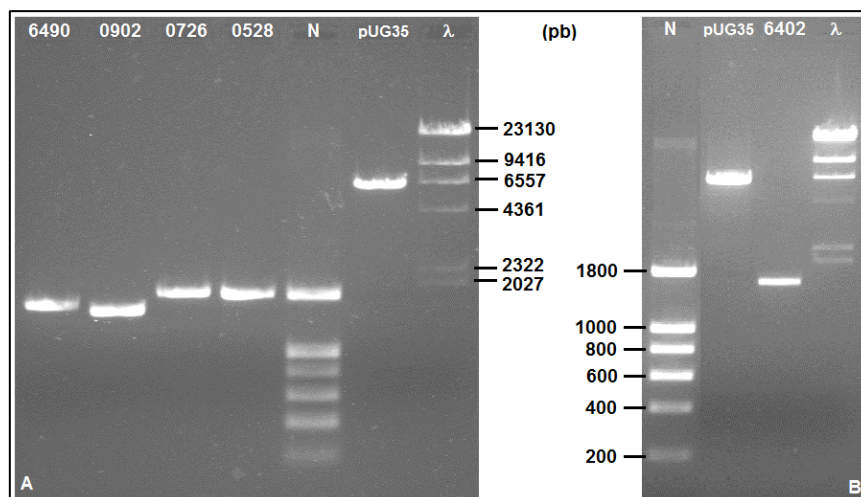


Figura 13 – Gel de electroforese destacando os fragmentos obtidos após digestão enzimática.

Marcadores utilizados: N - marcador I da NZYTech e λ – digestão DNA λ com a enzima *HindIII*. **A** - Digestão dos fragmentos 6490,0902,0726 e 0528 e o pUG35 com as enzimas *SpeI* e *ClaI* (condição de corrida: 70V durante 60 minutos). **B** - Digestão do fragmento 6402 com as enzimas *XbaI* e *XhoI* e o pUG35 com as enzimas *XbaI* e *SaI* (condição de corrida: 90V durante 45 minutos).

2.5 Transformação de *Escherichia coli* DH5α

O produto da reacção de ligação foi usado para transformar bactérias competentes de *E. coli* DH5α. O plasmídeo construído foi adicionado e as células foram sujeitas a um choque térmico. Após breve incubação em meio não selectivo para recuperação das células, centrifugou-se e inoculou-se em placas LB suplementadas com ampicilina. Como controlo positivo utilizou-se o plasmídeo pUG35 purificado não linearizado e como controlo negativo água. Para além dos controlos de transformação foi também efectuado o controlo da digestão, onde as células competentes foram transformadas com pUG35 linearizado e ligado sem o fragmento de interesse.

A transformação de *E. coli* DH5α com os plasmídeos recombinantes permitiu obter um número significativo de colónias, excepto na construção pUG35-DEHA2G06402g. O insucesso desta transformação poderá dever-se ao facto da ligação do fragmento ao plasmídeo não ter ocorrido correctamente devido a diversos factores tais como: presença de contaminantes, temperatura e tempo da reacção de ligação e a razão molar inserto:vector. Ou porque a própria construção pUG35-DEHA2G06402g seja tóxica para *E. coli*.

Após 24 horas de incubação a 37°C, todos os transformantes de *E. coli* foram repicados para novas placas do mesmo meio para diminuir a probabilidade do aparecimento de colónias satélites que surgem em placas com incubações prolongadas. As colónias satélites caracterizam-se por serem mais pequenas que as colónias de transformantes e de

crecerem à sua volta devido a difusão da enzima que degrada a ampicilina (β -lactamase) produzida por estas.

Foram recolhidas 55 colónias na construção pUG35-DEHA2G06490g, 55 na pUG35-DEHA2E00902g, 61 na pUG35-DEHA2E00726g e 45 na pUG35-DEHA2B00528g. Em relação ao controlo negativo de digestão foi obtido um número elevado de transformantes com o plasmídeo “vazio” – sem o fragmento de DNA de interesse. Este número elevado poderá ter ocorrido devido a uma digestão incompleta do pUG35 que caso necessário se pode corrigir aumentando o tempo de incubação das enzimas durante a digestão.

2.5.1 Selecção das colónias contendo o produto amplificado

Numa primeira análise, efectuou-se uma extracção orgânica do plasmídeo com fenol-clorofórmio-álcool isoamílico em todos transformantes de *E. coli* obtidos, cujo protocolo (Material e Métodos, ponto 2.2.2) é rápido e permite a selecção de potenciais colónias com a inserção do fragmento em estudo. O DNA extraído foi observado num gel de agarose (Figura 14) e após a análise das colónias que apresentavam um plasmídeo de tamanho superior ao tamanho do pUG35, indicando a presença de um fragmento de DNA adicional inserido neste, foram seleccionados 2 transformantes da construção pUG35-DEHA2G06490g, 2 da construção pUG35-DEHA2E00902g, 8 da construção pUG35-DEHA2E00726g e 8 da construção pUG35-DEHA2B00528g.

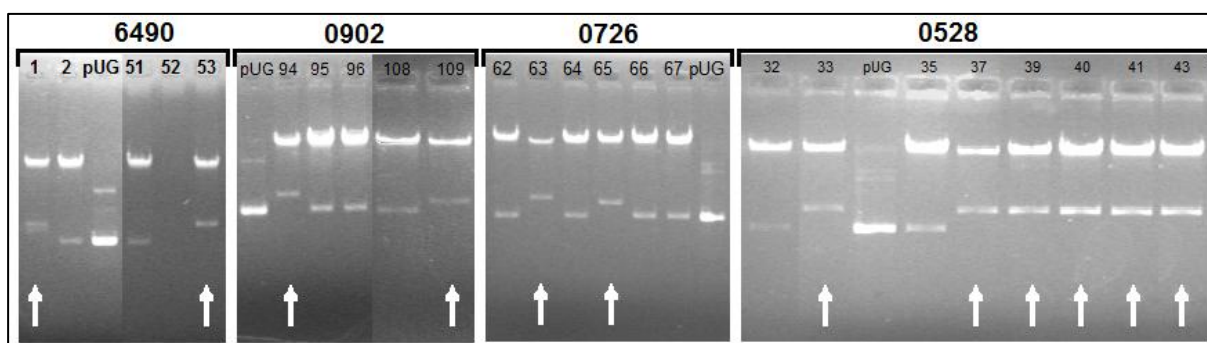


Figura 14 – Exemplo dos padrões obtidos por *Insert Analysis* de alguns transformantes de *E. coli* com as construções pUG35-DEHA2G06490g, pUG35-DEHA2E00902g, pUG35-DEHA2E00726g e pUG35-DEHA2B00528g e o plasmídeo pUG35. Seta (↑) – indica as colónias seleccionadas (condições de corrida: 100V durante 60 minutos).

Para uma análise mais fina de forma a confirmar a presença do fragmento, o DNA plasmídico das colónias seleccionadas (num total de 20) foi extraído pelo método *Clone Analysis* (Material e Métodos, ponto 2.2.3) e analisado com mais pormenor. Procedeu-se a

uma nova reacção de PCR tendo como DNA molde o DNA plasmídico extraído e utilizando os *primers* referidos na Tabela 17. Da análise da figura 15 foi possível observar a obtenção de amplificação para as colónias 1 (amplificação muito fraca da banda) e 53 resultantes da transformação com a construção pUG35-DEHA2G06490g; as colónias 37, 39, 40, 41 e 43 da transformação com a construção pUG35-DEHA2B00528g e as colónias 63 e 95 da transformação com a construção pUG35-DEHA2E00726g. No que diz respeito às colónias (94 e 109) que resultaram da transformação de *E. coli* com a construção pUG35-DEHA2E00902g não foi obtida qualquer amplificação.

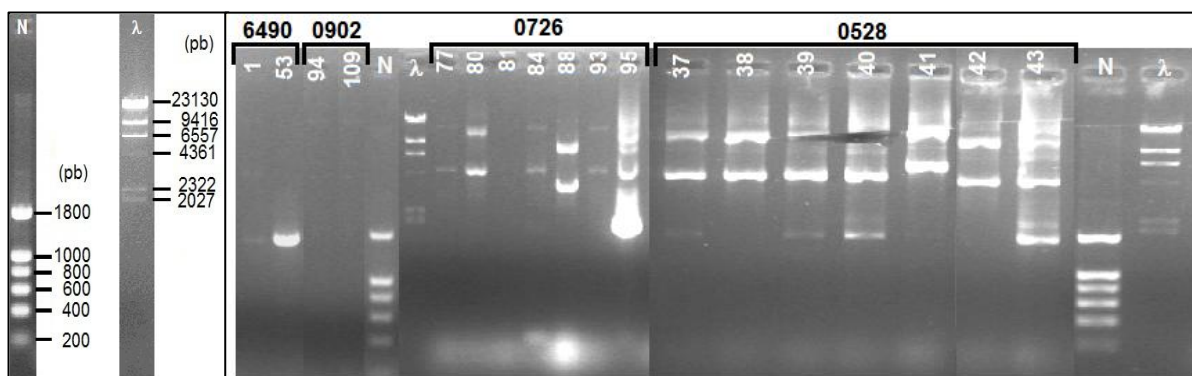


Figura 15 – Amplificação dos fragmentos por PCR dos transformantes de *E. coli* das construções pUG35-DEHA2G06490g (1 e 53), pUG35-DEHA2E00902g (94 e 109), pUG35-DEHA2E00726g (77, 80, 81, 84, 88, 93 e 95) e pUG35-DEHA2B00528g (37, 38, 39, 40, 41, 42 e 43). N - marcador I da NZYTech e λ – digestão DNA λ com a enzima *HindIII* (condições de corrida: 100V durante 80 minutos).

A par da reacção de amplificação por PCR procedeu-se à digestão enzimática com enzimas de restrição com vista a verificar se o mapa de restrição obtido correspondia ao padrão de restrição previsto com base nas sequências disponíveis na base de dados (Tabela 22).

Tabela 22 – Tamanho dos fragmentos de DNA esperados e enzimas utilizadas no perfil enzimático de cada construção.

Construções	Enzimas de restrição	Tamanhos dos fragmentos esperados após digestão enzimática (pb)
pUG35-DEHA2G06490g	<i>XbaI</i> e <i>SaII</i>	6230, 915 e 735
pUG35-DEHA2E00902g	<i>PstI</i>	3065, 4135 e 650
pUG35-DEHA2E00726g	<i>XbaI</i> e <i>SaII</i>	6174, 1050, 545 e 245
pUG35-DEHA2B00528g	<i>XbaI</i> e <i>SaII</i>	6174 e 1800
pUG35	<i>XbaI</i> e <i>SaII</i>	6174 e 57
	<i>PstI</i>	3600 e 2630

Os fragmentos obtidos foram separados por electroforese em gel de agarose e determinado o tamanho de cada banda (Figura 16). O cálculo do tamanho dos diferentes fragmentos da análise de restrição foi efectuado através da comparação do tamanho dos fragmentos com os marcadores utilizados e o plasmídeo digerido com as respectivas enzimas.

Através da análise da Figura 16 foram detectadas colónias que apresentavam o padrão de bandas esperado mas também outras (41, 58, 88 e 109) em que o padrão de bandas detectado foi diferente do previsto. Para a etapa de sequenciação foram seleccionados 7 clones em que foi possível observar simultaneamente amplificar por reacção de PCR e fragmentos com tamanhos esperados após digestão enzimática com as enzimas apropriadas.

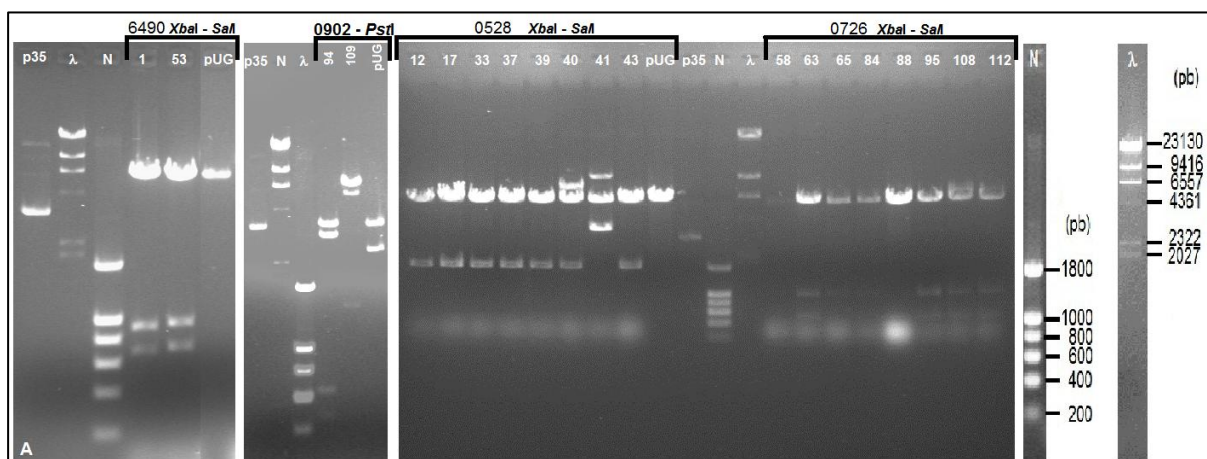


Figura 16 – Perfis de restrição dos transformantes de *E. coli*.

A) Linha p35 – pUG35 não digerido, linha λ – marcador molecular DNA λ digerido com *Hind*III, linha N – marcador I da NZYTech, linhas 1 e 53 – colónias 6490 digeridos com *Xba*I-*Sa*I e linha pUG – pUG35 digerido com *Xba*I-*Sa*I (condição corrida: 70V durante 60 minutos);

B) Linha p35 – pUG35 não digerido, linha λ – marcador molecular DNA λ digerido com *Hind*III, linha N – marcador I da NZYTech, linhas 94 e 109 – colónias 0902 digeridos com *Pst*I (condição corrida: 70V durante 90 minutos);

C) Linhas 12, 17, 33, 37, 39, 40, 41 e 43 – colónias 0528 digeridos com *Xba*I-*Sa*I, e linha pUG – pUG35 digerido com *Xba*I-*Sa*I, linha p35 – pUG35 não digerido, linha N – marcador I da NZYTech, linha λ – marcador molecular DNA λ digerido com *Hind*III, linhas 58, 63, 65, 84, 88, 95, 108 e 112 – colónias 0726 digeridos com *Xba*I-*Sa*I (condição corrida: 70V durante 80 minutos).

Os plasmídeos seleccionados foram extraídos, purificados e sequenciados por sequenciação automática. As sequências obtidas foram analisadas recorrendo ao programa BioEdit [Hall, 1999] tendo-se verificado a similaridade de cada gene de *D. hansenii* seleccionado com o respectivo resultado da sequenciação do plasmídeo presente nos transformantes de *E. coli* (Tabela 16 e Anexo V) recorrendo ao programa ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>) [Larkin *et al.*, 2007], e confirmando-se que as 4 construções em estudo tinham inserido o fragmento correspondente.

2.6 Transformação de *S. cerevisiae* YSH 1172 e selecção de transformantes

Após confirmação da presença do fragmento correcto no plasmídeo, avançou-se com a transformação de *S. cerevisiae* YSH 1172 com os plasmídeos recombinantes oriundos das

colônias 1, 94, 43 e 63 (correspondem as construções pUG35-DEHA2G06490g, pUG35-DEHA2E00902g, pUG35-DEHA2E00726g e pUG35-DEHA2B00528g, respectivamente).

Como controlo da transformação de *S. cerevisiae* foi efectuado o controlo positivo – C+ – onde se utilizou o DNA genómico de *D. hansenii* e o controlo negativo – C- – água, verificando a não ocorrência de qualquer contaminação nas amostras e soluções envolvidas na transformação.

Para transformação de *S. cerevisiae* com 1µg DNA plasmídeo recombinante foram obtidos as seguintes frequências de transformação:

6490: $7,62 \times 10^2$ transformantes/ 1×10^8 células;

0902: $1,08 \times 10^3$ transformantes/ 1×10^8 células;

0726: $2,26 \times 10^2$ transformantes/ 1×10^8 células;

0528: $6,65 \times 10^2$ transformantes/ 1×10^8 células.

De entre os transformantes obtidos seleccionaram-se 128 colônias de *S. cerevisiae* (32 transformantes por cada construções) para a confirmação da presença do fragmento inserido através da reacção de PCR conforme descrito no Material e Métodos ponto 2.3.4.

Analisando os resultados obtidos a partir da reacção de PCR (Figura 17) foi possível confirmar a amplificação do fragmento em alguns dos plasmídeos extraídos. Seleccionaram-se para a observação ao microscópio de fluorescência todos os transformantes onde ocorreu a amplificação do fragmento.

Os transformantes de *S. cerevisiae* seleccionados para a visualização ao microscópio foram cultivados em YNB suplementado com glucose (2% p/v), como única fonte de carbono e energia, a 28°C com agitação orbital. Após crescimento durante a noite, as células foram visualizadas por microscopia de fluorescência e luz visível. Por comparação entre as imagens de microscopia de fluorescência e luz visível foi possível verificar, tal como esperado, que na maioria dos transformantes a fluorescência aparece localizada na periferia da célula, na zona correspondente à membrana plasmática indicando um transportador associado à proteína GFP (resultados não apresentados).

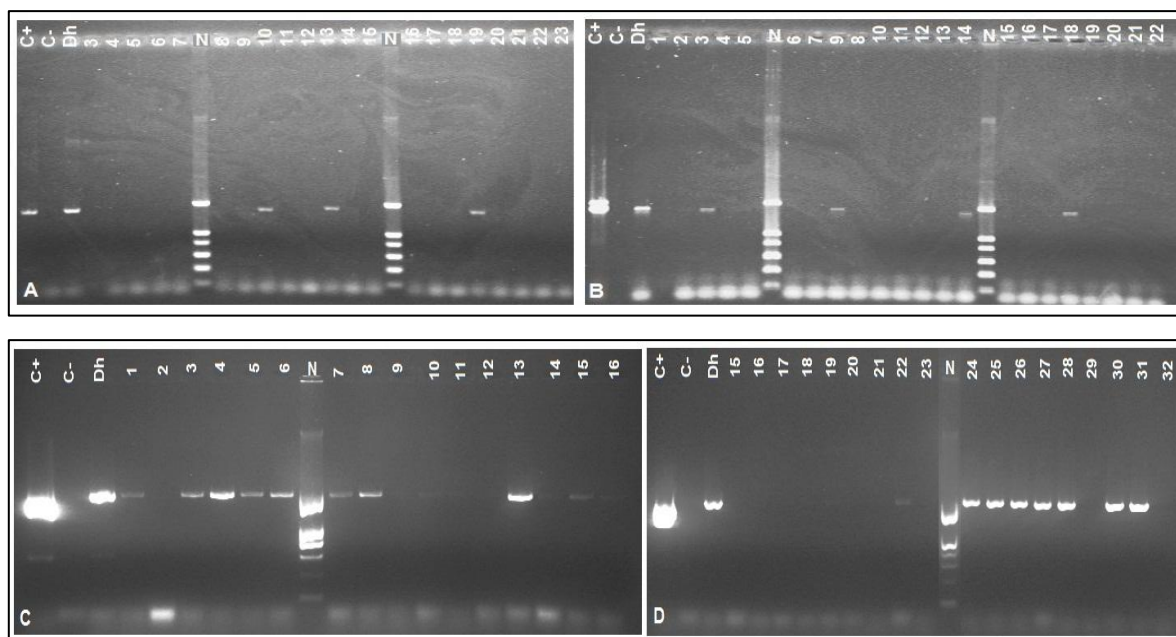


Figura 17 – Reacções de PCR para confirmação da clonagem dos fragmentos nos transformantes de *S. cerevisiae* analisadas em gel de agarose. Controlos utilizados: controlo positivo do PCR (C+), controlo negativo do PCR (C-) e controlo positivo da extracção (Dh). E o marcador molecular I da NZYTech (N) (condições de corrida: 100V durante 50 minutos). **A** – transformantes de *S. cerevisiae* com a construção pUG35-DEHA2G06490g; **B** – transformantes de *S. cerevisiae* com a construção pUG35-DEHA2E00902g; **C** – transformantes de *S. cerevisiae* com a construção pUG35-DEHA2E00726g; **D** – transformantes de *S. cerevisiae* com a construção pUG35-DEHA2B00528g.

De forma a confirmar a presença da proteína co-expressa com GFP que se pretendia clonar foram seleccionados dois transformantes de *S. cerevisiae* de cada construção para a sequenciação, designadamente as colónias 10 e 19 para o plasmídeo recombinante pUG35-DEHA2G06490g, 9 e 14 para pUG35-DEHA2E00902g, 4 e 13 para pUG35-DEHA2E00726g e 26 e 31 para pUG35-DEHA2B00528g e procedeu-se a reacção PCR directamente a partir de colónia. No entanto, apenas foi possível obter amplificação para os transformantes 19, 4, 13, 26 e 31. O fragmento amplificado foi sequenciado por sequenciação automática.

As sequências nucleotídicas obtidas da sequenciação foram analisadas através do programa BioEdit [Hall, 1999] e submetidas à ferramenta informática BLASTn (disponível no site *National Center for Biotechnology Information*, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) [Altschul *et al.*, 1990]. Os resultados (Anexo VI) foram os esperados, confirmando o sucesso da clonagem dos genes de interesse de *D. hansenii* em *S. cerevisiae*.

2.7 Análise de presença de codões ambíguos das sequências obtidas

Para além da análise da similaridade das sequências obtidas com o genoma de *D. hansenii*, também foi feita uma análise ao nível dos codões, especificamente ao codão CUG, uma vez que *D. hansenii*, tal como *Candida albicans*, usa um código genético alternativo em que o codão CUG (leucina) é descodificado em serina. A análise foi realizada através do programa informático Codon Usage (*Sequence Manipulation Suite*, http://www.bioinformatics.org/sms2/codon_usage.html) [Stothard, 2000]. E o programa HMMTOP versão 2.0 (*Prediction of transmembrane hélices and topology of proteins*, <http://www.enzim.hu/hmmtop/>) [Tusnády e Simon, 2001] para visualizar a posição da respectiva serina na possível topologia da proteína.

Na breve análise do número de codões CUG e da respectiva posição da serina na hipotética tipologia da proteína (Tabela 23) não foi possível encontrar nenhuma correspondência entre a presença dos codões CUG com a incapacidade de atribuir função aos respectivos genes em estudo.

Tabela 23 – Número de codões CUG nos genes de *D. hansenii* estudados neste trabalho e a sua provável posição na topologia da proteína (TMD – domínio transmembranar).

Genes de <i>D. hansenii</i> CBS 767	Nº codões CUG	Posição da Serina
DEHA2E01386g	1	TMD 3
DEHA2C05896g	1	Dentro do terminal-N
DEHA2C05874g	1	Dentro do terminal-N
DEHA2C05918g	0	-
DEHA2F15444g	0	-
DEHA2E24310g	2	Dentro do terminal-N, TMD 8
DEHA2C06380g	0	-
DEHA2B00528g	0	-
DEHA2E00902g	1	Exterior, entre TMD 7 e TMS 8
DEHA2E00726g	1	TMD 10
DEHA2G06490g	1	Exterior, entre TMD 1 e TMD 2
DEHA2G06402g	0	-
DEHA2G06468g	0	-

3. ESTUDOS FISIOLÓGICOS

3.1 Detecção da presença de actividade de simporte polióis/H⁺

Em ensaios anteriores, realizados no Laboratório de Bioenergética Microbiana, foi detectada a presença de transportes de polióis/açúcares em *Debaryomyces hansenii* CBS 767 quando cultivada em diferentes fontes de carbono. A actividade de simporte só foi detectada na

presença de 1 M KCl e em células submetidas a 3 horas de incubação em gelo [M. J. Leandro, comunicação pessoal].

D. hansenii CBS 767 exibiu sinais de simporte de xilitol, sorbitol e manitol, após 3 h de incubação sem fonte de carbono (jejum), quando cultivada em xilose, glucose, xilitol, glicerol e manitol. Também foram detectados sinais de simporte de glucose, xilose, galactose e frutose, após 3 horas sem fonte de carbono, quando as células foram cultivadas em glucose, mas não quando foram cultivadas em xilose, xilitol, glicerol ou manitol [M. J. Leandro, comunicação pessoal].

De forma a averiguar a presença ou não de transporte de polióis/açúcares por simporte com prótons nos transformantes previamente sequenciados realizaram-se ensaios de simporte tendo por base a observação da alcalinização do meio extracelular após a adição da fonte de carbono (açúcar/poliol) [Loureiro-Dias e Peinado, 1984].

Uma vez que no caso de *D. hansenii* o sinal de simporte com H^+ é mais intenso quando as células são incubadas durante 3 horas em gelo e quando o ensaio é realizado em presença de KCl, testaram-se estas condições também em *S. cerevisiae* (Figura 18 e 19). No entanto, no caso desta última estirpe o sinal de simporte foi muito mais acentuado na ausência de KCl, não se verificando diferenças significativas quando incubadas ou não em gelo durante 3 horas. Assim, todos os ensaios realizados no âmbito deste trabalho foram feitos na ausência de KCl e sem jejum.

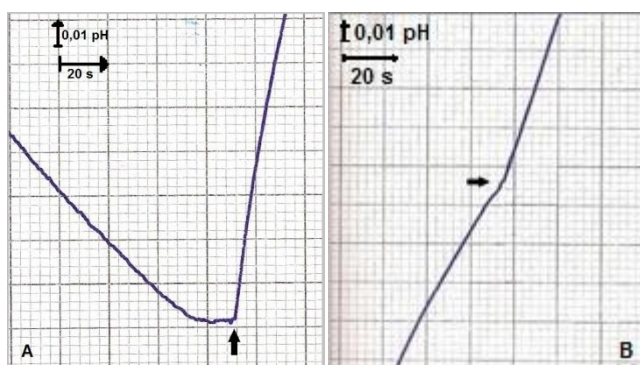


Figura 18 – Efeito sobre o pH extracelular provocada pela adição de maltose (setas) a uma concentração final de 10 mM em células *S. cerevisiae* YSH 1172, na ausência (A) e na presença (B) de 1M KCl, quando cultivadas em YNB com maltose.

Numa primeira abordagem foi efectuado um ensaio de rastreio de uma série de compostos (açúcares e polióis): arabinose, frutose, galactose, glucose, maltose, sorbose, ribose, xilose, 2,3-butanediol, D-arabitol, L-arabitol, eritritol, galactitol, glicerol, inositol, manitol, ribitol, sorbitol e xilitol.

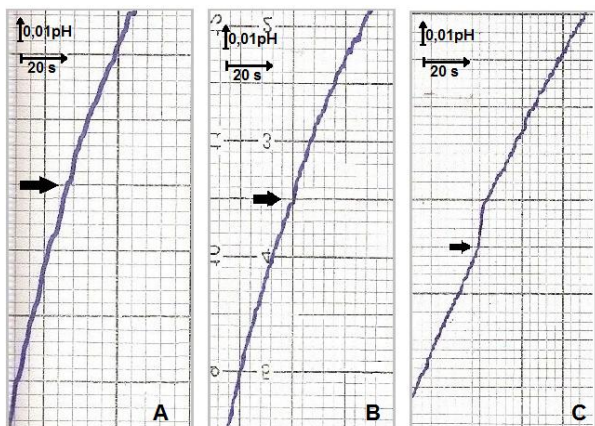


Figura 19 – Efeito sobre o pH extracelular provocada pela adição de eritritol (A), galactitol (B) e xilitol (C) (setas) a uma concentração final de 10 mM em células *S. cerevisiae* YSH 1172, na ausência de 1M KCl quando cultivadas em YNB com maltose.

Este ensaio teve como objectivo detectar quais os possíveis polióis/açúcares transportados através do mecanismo de simporte com H^+ . Foram testados 18 compostos, entre açúcares e polióis, e de entre os disponíveis, não foi possível observar resposta positiva de simporte em nenhum dos compostos testados. Em caso afirmativo, a proteína de *D. hansenii* clonada em *S. cerevisiae* deveria corresponder a um transportador de tipo simporte com H^+ tendo como substrato um dos compostos testados.

Em todas as colónias de *S. cerevisiae* seleccionados no decorrer deste trabalho para os ensaios de simporte (19, 4, 13, 26 e 31), nenhuma apresentou qualquer sinal de transporte dos 18 compostos testados (hexoses, pentoses e polióis) por mecanismo de simporte com H^+ , apenas se observando o sinal esperado no caso da maltose (Figura 20 A).

Não foi possível determinar a função dos genes seleccionados durante o decorrer deste trabalho utilizando a abordagem de medição da alcalinização ou acidificação extracelular sobre a adição do açúcar/poliol numa suspensão de células não tamponada. Outra abordagem possível para medir a absorção/assimilação dos substratos a testar seria a utilização de substratos radiomarcados de acordo com as metodologias utilizadas nas medições de transporte [Lucas e van Uden, 1986; Loureiro-Dias, 1987] mas que neste caso não seria comportável devido à disponibilidade e ao preço dos açúcares e polióis radiomarcados existentes no mercado.

No decorrer do trabalho experimental foi ainda realizado o rastreio dos 18 compostos como substratos de transportadores de outros transformantes de *S. cerevisiae* nos quais foram clonados ORF (DEHA2C06380g, DEHA2E01386g, DEHA2C05896g, DEHA2C05918g, DEHA2F15444g e DEHA2E24310g) de *D. hansenii* em pUG35 previamente obtidos no âmbito do mesmo projecto em que este trabalho foi inserido.

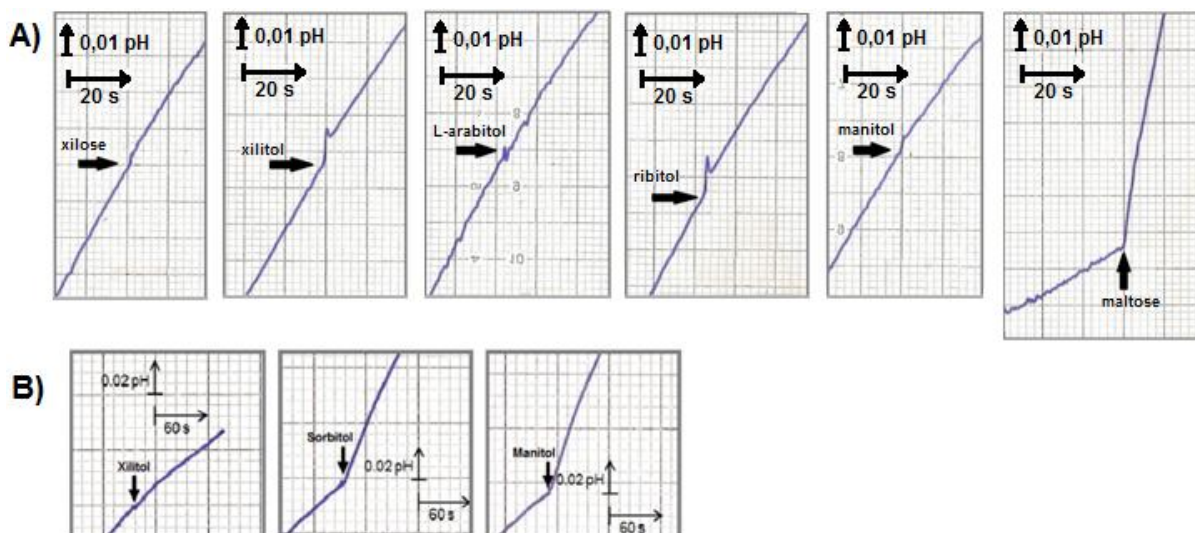


Figura 20 – Efeito sobre o pH extracelular provocada pela adição de **A)** xilose, xilitol, L-arabitol, ribitol, manitol e maltose (setas) a uma concentração final de 10 mM em células *S. cerevisiae* 6490-19, na ausência de 1M KCl quando cultivadas em YNB com maltose e **B)** xilitol, sorbitol e manitol (setas) a uma concentração final de 10 mM em células *S. cerevisiae* MLY9, na presença de 1M KCl quando cultivadas em YNB com maltose.

Como controlo foi usada a estirpe MLY10 contendo o plasmídeo pUG35, no qual se observou como esperado, actividade de simporte maltose/H⁺ não se verificando qualquer outro tipo de actividade de transporte de nenhum dos substratos testados por simporte com H⁺.

Do rastreio realizado aos 13 transformantes de *S. cerevisiae* obtidos no decorrer do projecto PTDC/AGR-CFL/71792/2006 foi possível detectar, para além da presença esperado de um simporte maltose/H⁺, a presença de actividade de simporte com H⁺ para 4 transformantes que possuíam genes de *D. hansenii* expressos e correctamente localizados na membrana plasmática. Dois destes transportadores de *D. hansenii* transportaram por simporte uma variedade de polióis (MLY9 e MLY12) (Figura 20 B) enquanto os outros dois transportaram um poliól específico (MLY8 e MLY22). Para os restantes genes clonados não foi possível detectar actividade de simporte com os substratos testados, podendo-se concluir apenas que não transportam estes 18 substratos testados por um mecanismo de simporte/H⁺. Nenhuma actividade foi detectada quando se utilizou xilitol como substrato.

Em relação aos transformantes nos quais se detectou sinal de simporte com H⁺, a estirpe MLY8 (expressando o gene DEHA2E01386g) apresentou apenas um sinal de simporte glicerol/H⁺. O transportador codificado por este gene apresenta elevada homologia com os genes *STL1* que codificam para transportadores de glicerol de tipo simporte com protões.

Tabela 24 – Rastreamento dos transformantes *S. cerevisiae* obtidos no âmbito do projecto PTDC/AGR-CFL/71792/2006 [M. J. Leandro e A. Madeira].

Estirpe Composto	MLY7	MLY8	MLY9	MLY12	MLY20	MLY22
2,3-Butanediol	-	-	-	-	-	-
Arabinose	-	-	--	-	-	-
D-Arabitól	-	-	✓	✓	-	-
L-Arabitól	-	-	-	-	-	-
Eritritol	-	-	-	-	-	-
Frutose	-	-	-	-	-	-
Galactitol	-	-	✓	-	-	✓
Galactose	-	-	-	-	-	-
Glicerol	-	✓	-	-	-	-
Glucose	-	-	-	-	-	-
Inositol	-	-	-	-	-	-
Maltose	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Manitol	-	-	✓	✓	-	-
Ribitol	-	-	✓	✓	-	-
Ribose	-	-	-	-	-	-
Sorbitol	-	-	✓	✓	-	-
Sorbose	-	-	-	-	-	-
Xilitol	-	-	-	-	-	-
Xilose	-	-	-	-	-	-

No caso da estirpe MLY22 (YSH 1172 + pUG35-DEHA2E24310g) atribui-se uma função a um gene cuja função era desconhecida. Encontrando-se no *cluster* 2.A.1.1Z23 que contém 27 membros dos quais 7 são de *D. hansenii*. Este *cluster* encontra-se filogeneticamente próximo aos transportadores de mio-inositol e inclui um putativo transportador de arabinose de *Sc. stipitis* que mostra ter homologia com o simporte arabinose/H⁺ de *Klebsiella aerogenes* [Palma *et al.*, 2007].

Ambas as estirpes, MLY9 (YSH 1172 + pUG35-DEHA2C05896g) e MLY12 (YSH 1172 + pUG35-DEHA2C05918g), exibiram sinais de simporte/H⁺ para D-arabitól, manitol, sorbitol e ribitol, com a diferença da presença (MLY9) ou não (MLY12) de simporte/H⁺ para galactitol. Os genes que codificam estes dois transportadores também se encontram localizados no *cluster* 2.A.1.1Z23.

3.2 Cinéticas

Nos casos em que se detectou actividade de simporte polioli/H⁺ procedeu-se à caracterização cinética dos transportadores por simporte de *D. hansenii* clonados com sucesso em *S. cerevisiae* e à determinação dos respectivos parâmetros cinéticos. Assim, determinaram-se as velocidades iniciais de entrada de H⁺ por simporte com polióis, para concentrações crescentes dos polióis e analisaram-se os dados através do programa GraphPad Prism 5 onde se calcularam os parâmetros cinéticos através da equação de *Michaelis-Menten*. Analisando a Tabela 25 foi possível observar que os transportadores clonados possuem alta afinidade para o sorbitol e ribitol.

Tabela 25 – Actividade de simporte nos transformantes de *S. cerevisiae* e respectivos parâmetros de cinética (K_m e V_{max}).

Transformante <i>S. cerevisiae</i>	Polióis	K_m (mM)	V_{max} ($\text{mmol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}_{\text{peso seco}}$)
MLY8	Glicerol	nd	nd
	Sorbitol	8.82	1.02
MLY9	Mannitol	0.30	0.47
	Ribitol	11	0.88
	D-Arabitol	0.96	0.44
	Galactitol	nd	nd
MLY12	Sorbitol	2.49	0.28
	Manitol	0.93	0.88
	Ribitol	18.31	0.94
	D-Arabitol	0.96	0.44
MLY22	Galactitol	1.93	0.22

nd – não determinado

Os transportadores caracterizados neste trabalho contribuíram para a anotação de alguns dos genes de *D. hansenii* agrupados num dos quatro ramos da árvore filogenética de genes cuja função era até agora desconhecida [Palma *et al.*, 2007]. Os resultados estabelecem mais conhecimento sobre o transporte de polióis através da membrana plasmática.

CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

Os biocombustíveis podem ser classificados com base na sua produção: biocombustíveis de primeira geração e de segunda geração [Demirbas, 2009].

A procura de biocombustíveis líquidos assumiu uma importância crescente e irreversível ao longo da última década em consequência de três factores. Em primeiro lugar, devido a legislação comunitária que considerou como obrigatória (desde Janeiro de 2005) a incorporação de quantidades crescentes de bioetanol/biodiesel em gasolina/gasóleo. Em segundo, ao aumento do preço do petróleo e da dependência dos combustíveis fósseis. Por último, contribuir para o combate do aquecimento global e aumentar a diversidade de fontes de energia “verdes” reduzindo as emissões de CO₂. No entanto, existem algumas barreiras para o desenvolvimento da produção de biocombustíveis. Entre as quais: barreiras tecnológicas, económicas, abastecimento, armazenamento, segurança, e políticas. A redução destas barreiras é um dos factores determinantes para a pesquisa e desenvolvimento de biocombustíveis.

Os biocombustíveis de primeira geração constituem, de momento, a única alternativa disponível e aplicável, mas apresentam alguns problemas como 1) uso de culturas alimentares (milho, soja, cana de açúcar, etc.) que conduz ao aumento do preço dos alimentos [Antoni *et al.*, 2007], 2) agravamento da desflorestação para satisfazer a crescente procura, 3) impacto sobre a biodiversidade e o uso do solo [Naik *et al.*, 2010]. Por isso, a médio prazo, existe a intenção de os substituir gradualmente pelos biocombustíveis de segunda geração e por outras formas de energia ambientalmente mais favoráveis.

Uma resposta possível a esses problemas é que o etanol seja produzido a partir de material lignocelulósico, também conhecido como etanol de segunda geração. Em vez de só se utilizar açúcares extraíveis de amidos ou óleos (combustíveis primeira geração), os combustíveis de segunda geração permitem o uso de todas as formas de resíduos lignocelulósicos. A produção de etanol a partir de materiais lignocelulósicos ainda não é economicamente viável. Para que seja competitiva são necessários ainda muitos esforços de pesquisa, desenvolvimento e inovação.

Não será fácil a transição de biocombustíveis de primeira geração para os de segunda geração. Os biocombustíveis de segunda geração provavelmente não irão tornar-se plenamente comerciais, nem entrar progressivamente no mercado sem apoio governamental adicional significativo por causa da diversidade das matérias-primas e

produtos. Na produção dos biocombustíveis os benefícios de um sistema integrado são numerosos. Actualmente esses sistemas integrados (biorefinarias) contribuem para a sua sustentabilidade, tanto económica como ambiental [Demirbas, 2009].

Os resíduos lignocelulósicos são compostos principalmente por celulose, hemicelulose e a lenhina. Após pré-tratamento e hidrólise é obtido uma fracção rica em glucose e diversas pentoses, entre as quais xilose e L-arabinose. No entanto, a maioria das leveduras (incluindo *Saccharomyces cerevisiae*) não possui ou possui muito baixa capacidade para utilizar xilose e L-arabinose, o que se torna uma limitação à viabilidade económica do processo e à sua rentabilização dado que, não sendo os açúcares disponíveis aproveitados (ou sendo-o com rendimentos muito baixos) reduz significativamente o rendimento em etanol obtido. Porém diversas leveduras, bactérias e fungos filamentosos (entre elas, a levedura *Debaryomyces hansenii*) foram descritos como naturais utilizadores dessas pentoses podendo ser um ponto de partida para os melhoramentos a introduzir no processo.

Nos últimos anos o estudo dos mecanismos de transporte das pentoses e dos mecanismos associados ao seu metabolismo tem vindo a ganhar relevo como mecanismo importante para a obtenção de um processo eficiente de produção de bioetanol de segunda geração [Leandro *et al.*, 2009].

As leveduras têm vindo a ser alvo de estudos de forma a melhorar e encontrar vias mais favoráveis na produção de combustíveis alternativos e na produção de subprodutos com valor acrescentado.

Através da compilação bibliográfica efectuada foi possível observar que o poliálcool mais assimilado pelas leveduras Ascomicetas é o glicerol, que é também o mais produzido enquanto solutos compatíveis, seguido do glucitol (=sorbitol) e manitol. Situação diferente se observou quando analisámos as leveduras Basidiomicetas, onde a ordem dos poliálcoois se inverte (1º: manitol, 2º: glucitol e 3º: glicerol). Em relação a cada um dos poliálcoois, xilitol e arabitól, ambas possuem uma percentagem idêntica de leveduras que os assimilam. Quando analisados em simultâneo, existem 11 géneros de leveduras Ascomicetas (entre os quais os géneros *Candida*, *Pichia* e *Debaryomyces*) capazes de assimilar os dois poliálcoois, em oposição ao número reduzido de espécies de Basidiomicetas capazes de assimilar xilitol e arabitól em simultâneo. A diversidade é ainda maior no que diz respeito a assimilação de um número mais vasto de poliálcoois, o número de espécies cai drasticamente, existindo apenas 5 com capacidade para assimilar todos os poliálcoois considerados na pesquisa bibliográfica.

Entre as leveduras Ascomicetas, *D. hansenii* tem despertado interesse junto da comunidade científica, uma vez que é uma levedura capaz de assimilar xilitol e arabitól, cujo genoma se encontra disponível no Consórcio Génolevures, o que a torna atraente para a pesquisa genética e metabólica.

D. hansenii é uma levedura halotolerante, possui um código genético alternativo e encontra-se intimamente relacionada com *Candida albicans*, com o qual compartilha algumas características. Têm-se vindo a revelar um bom candidato para a produção de bioetanol e xilitol a partir de hidrolisados de hemiceluloses, valorizando economicamente a produção de bioetanol através da produção produtos secundários (nomeadamente o xilitol) com valor comercial e utilizados como matérias-primas em outras indústrias.

Nesta perspectiva e no âmbito do projecto PTDC/AGR-CFL/71792/2006, o presente trabalho procurou caracterizar transportadores de polióis em *D. hansenii*. Foram seleccionados 10 sequências cuja função era desconhecida a fim de as amplificar por PCR, clonar num vector de expressão e expressar em *S. cerevisiae* e atribuir-lhe determinada função. A confirmação do êxito da clonagem do gene de *D. hansenii* em *S. cerevisiae* foi feita por PCR, hidrólise enzimática e sequenciação automática. Numa primeira abordagem foi realizado um rastreio de 7 açúcares e 11 polióis para verificar a presença de actividade de transportadores de simporte por protões. Nos casos positivos, os parâmetros cinéticos foram posteriormente determinados. Foi possível atribuir função a 4 dos genes em estudo. Dois dos quais caracterizaram-se por transportar através de simporte/H⁺ uma série de polióis (sorbitol/manitol/ribitol/arabitól) enquanto os outros dois revelaram ser bastante específicos, um de glicerol e outro de galactitol. Para os restantes genes clonados não foi possível proceder à sua caracterização, pela afirmativa sabendo-se no entanto que não transportam estes 18 substratos testados por um mecanismo de simporte/H⁺. Nenhuma actividade foi detectada quando utilizado xilitol como substrato.

Os resultados obtidos neste trabalho convergem com a literatura encontrada, já que *D. hansenii* se encontra dentro do grupo das leveduras Ascomicetas que consegue assimilar diversos polióis. *D. hansenii* tem capacidade para transportar xilitol por simporte com H⁺ sem que no entanto se tenha encontrado este transportador dentro das sequências analisadas. Pela análise do genoma desta levedura e com base na estrutura 3D prevista com base na sequência ORF verificou-se possuir um número de transportadores putativos de membrana plasmática relativamente elevado face a outras espécies conhecidas. No entanto, para a grande maioria destas proteínas não existem dados experimentais que confirmem a função nem mesmos dados de caracterização cinética. Entre estas sequências poderá encontrar-se

o gene que codifica o transportador de xilitol. Será pois necessário continuar a pesquisa para tentar compreender o transporte de polióis pelas leveduras e os mecanismos envolvidos para conseguir obter, através de melhoramento genético e metabólico, leveduras capazes de produzir bioetanol a partir de hidrolisados lignocelulósicos com elevados rendimentos e tolerantes aos inibidores presentes nestes hidrolisados.

Para muitos cientistas, a procura e desenvolvimento de microrganismos capazes de produzir biocombustíveis em grande escala, baratos e capazes de competir com o petróleo poderá tornar-se um desafio equiparável ao desafio da codificação do genoma humano [Biello, 2011].

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adler, L., e L. Gustafsson (1980) Polyhydric alcohol production and intracellular amino acid pool in relation to halotolerance of the yeast *Debaryomyces hansenii*. *Archives of Microbiology*, **124**:123–130.

Alper, H. e Stephanopoulos, G. (2009) Engineering for biofuels: exploiting innate microbial capacity or importing biosynthetic potential?. *Nature Reviews Microbiology*, **7**:715–723.

Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. e Lipman, D. J. (1990) Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, **215**:403–410.

Antoni, D., Zverlov, V. V. e Schwarz, W. H. (2007) Biofuels from microbes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **77**:23–35

Biello, D. (2011) The false promise of biofuels. *Scientific American*, 305:58–65.

Bignell, G. R. e Rvans I. H. (1996) Yeast protocols: methods in cell and molecular biology. Chapter 18, pp.155–187. Totowa, New Jersey. Humana Press.

Birnboim, H. C. and Doly, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research*, **7**:1513–1523.

Breslauer, K. J., Frank, R., Blocker, H. e Marky, L. A. (1986) Predicting DNA duplex stability from the base sequence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **83**:3746–3750.

Burchhardt, G. e Ingram, L. O. (1992) Conversion of xylan to ethanol by ethanologenic strains of *Escherichia coli* and *Klebsiella oxytoca*. *Applied and Environmental Microbiology*, **58**:1128–1133.

Butinar, L., Santos, S., Spencer-Martins, I., Oren, A. e Gunde-Cimerman, N. (2005) Yeast diversity in hypersaline habitats. *FEMS Microbiology Letters*, **244**:229–234.

Canh, D. S., Horak, J., Kotyk, A. e Rihova, L. (1975) Transport of acyclic polyols in *Saccharomyces cerevisiae*. *Folia Microbiologica (Praha)* **20**:320–325.

- Carvalho, F., Duarte, L. C. e Gírio, M. F. (2008)** Hemicellulose biorefineries: a review on biomass pretreatments. *Journal of Scientific and Industrial Research*, **67**:849–864.
- Castro, I. M. e Loureiro-Dias, M. C. (1991)** Glycerol utilization in *Fusarium oxysporum* var. *lini*: regulation of transport and metabolism. *Journal of General Microbiology*, **137**:1497–1502.
- Chandel, A. K., Chandrasekhar, G., Radhika, K., Ravinder, R. e Ravindra, P. (2011)** Bioconversion of pentose sugars into ethanol: A review and future directions. *Biotechnology and Molecular Biology Review*, **6**:8–20.
- Chiang, C. e Knight, S. G. (1960)** Metabolism of D-xylose by moulds. *Nature*, **1**:79–81.
- Chiang, L. C., Gong, C. S., Chen, L. F. e Tsao, G. T. (1981)** D-xylulose fermentation to ethanol by *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology*, **42**:284–289.
- Chisti, Y. (2007)** Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances*, **25**:294–306.
- Cryer, D. R., Ecclesmall, R. e Marmur, J. (1975)** Isolation of yeast DNA. In *Methods in Cell Biology*, volume 12, pp.39–44. Edited by D. M. Prescott. New York: Academic Press.
- Dashtban, M., Schraft, H. e Qin, W. (2009)** Fungal bioconversion of lignocellulosic residues; opportunities & perspectives. *International Journal of Biological Sciences*, **5**:578–595.
- Demirbas, A. (2005)** Bioethanol from cellulosic materials: A renewable motor fuel from biomass. *Energy Sources*, **27**:327–337.
- Demirbas, M. F. (2009)** Biorefineries for biofuel upgrading: A critical review. *Applied Energy*, **86**:S151–S161.
- Directiva 89/107/CEE**, do Conselho de 21 de Dezembro de 1988 relativa à aproximação das legislações dos Estados-membros respeitantes aos aditivos que podem ser utilizados nos géneros destinados à alimentação humana. *Jornal Oficial da União Europeia*, **L40**:27–36.

Directiva 94/35/CE, do Parlamento Europeu e do Conselho de 30 de Junho de 1994 relativa aos edulcorantes para utilização nos géneros alimentares. *Jornal Oficial da União Europeia*, **L237**:3–23.

Directiva 94/36/CE, do Parlamento Europeu e do Conselho de 30 de Junho de 1994 relativa aos corantes para utilização nos géneros alimentícios. *Jornal Oficial da União Europeia*, **L237**:13–29.

Directiva 95/2/CE, do Parlamento Europeu e do Conselho de 20 de Fevereiro de 1995 relativa aos aditivos alimentares com excepção dos corantes e dos edulcorantes. *Jornal Oficial da União Europeia*, **L61**:1–56.

Directiva 2003/30/CE, do Parlamento Europeu e do Conselho de 8 de Maio de 2003 relativa à promoção da utilização de biocombustíveis ou de outros combustíveis renováveis nos transportes. *Jornal Oficial da União Europeia*, **L123**:42–46.

Dujon, B. (2006) Yeasts illustrate the molecular mechanisms of eukaryotic genome evolution. *Trends Genetics*, **22**:375–387.

Dujon, B., Sherman, D., Fischer, G., Durrens, P., Casaregola, S., Lafontaine, I., de Montigny, J., Marck, C., Neuveglise, C., Talla, E., Goffard, N., Frangeul, L., Aiglem, M., Anthouard, V., Babour, A., Barbe, V., Barnay, S., Blanchin, S., Beckerich, J. M., Beyne, E., Bleykasten, C., Boisrame, A., Boyer, J., Cattolico, L., Confanioleri, F., DeDaruvar, A., Despons, L., Fabre, E., Fairhead, C., Ferry-Dumazet, H., Groppi, A., Hantraye, F., Hennequin, C., Jauniaux, N., Joyet, P., Kachouri, R., Kerrest, A., Koszul, R., Lemaire, M., Lesur, I., Ma, L., Muller, H., Nicaud, J. M., Nikolski, M., Oztas, S., Ozier-Kalogeropoulos, O., Pellenz, S., Potier, S., Richard, G. F., Straub, M. L., Suleau, A., Swennen, D., Tekaiia, F., Wésolowski-Louvel, M., Westhof, E., Wirth, B., Zeniou-Meyer, M., Zivanovic, I., Bolotin-Fukuhara, M., Thierry, A., Bouchier, C., Caudron, B., Scarpelli, C., Gaillardin, C., Weissenbach, J., Wincker, P. e Souciet, J. L. (2004) Genome evolution in yeasts. *Nature*, **430**:35–44.

Eliasson, A., Christensson, C., Wahlbom, C. F., Hahn-Hägerdal, B. (2000) Anaerobic xylose fermentation by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* carrying *XYL1*, *XYL2*, and *XKS1* in mineral medium chemostat cultures. *Applied and Environmental Microbiology*, **66**:3381–3386.

- Gasteiger, E., Gattiker, A., Hoogland, C., Ivanyi, I., Appel, R. D. e Bairoch, A. (2003)** ExPASy: The proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. *Nucleic Acids Research*, **31**:3784–3788.
- Gietz, R. D. e Woods, R. A. (2002)** Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method. *Methods in Enzymology*, **350**:87–96.
- Gírio, F. M., Amaro, C., Azinheira, H., Pelica, F. e Amaral-Collaço, M. T. (2000)** Polyols production during single and mixed substrate fermentations in *Debaryomyces hansenii*. *Bioresource Technology*, **71**:245–251.
- Goffrini, P., Ferrero, I. e Donnini, C. (2002)** Respiration-dependent utilization of sugars in yeasts: a determinant role for sugar transporters. *Journal of Bacteriology*, **184**:427–432.
- Hahn-Hägerdal, B., Galbe, M., Gorwa-Grauslund M. F., Lidén, G. e Zacchi G. (2006)** Bioethanol - the fuel of tomorrow from the residues of today. *Trends in Biotechnology*, **21**: 549–556.
- Hahn-Hägerdal, B., Jeppsson, H., Skoog, K. e Prior, B. A. (1994)** Biochemistry and physiology of xylose fermentation by yeasts. *Enzyme and Microbial Technology*, **16**:933–943.
- Hahn-Hägerdal, B., Karhumaa, K., Fonseca, C., Spencer-Martins, I. e Gorwa-Grauslund, M. F. (2007)** Towards industrial pentose-fermenting yeast strains. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **74**:937–953.
- Hahn-Hägerdal, B. e Pamment, N. (2004)** Microbial pentose metabolism. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **113-16**:1207–1209.
- Hall, T. A. (1999)** BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, **41**:95–98.
- Hamelinck, C. N., van Hooijdonk, G. e Faaij, A. P. C (2005)** Ethanol from lignocellulosic biomass: techno-economic performance in short-, middle- and long-term. *Biomass and Bioenergy*, **28**:384–410.

Hector, R. E., Qureshi, N., Hughes, S. R. e Cotta, M. A. (2008) Expression of a heterologous xylose transporter in a *Saccharomyces cerevisiae* strain engineered to utilize xylose improves aerobic xylose consumption. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **80**:675–684.

Hendriks, A. M. e Zeeman, G. (2009) Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, **100**:10–18.

Hibbett D. S., Binder, M., Bischoff, J. F., Blackwell, M., Cannon, P. F., Eriksson, O. E., Huhndorf, S., James, T., Kirk, P. M., Lücking, R., H. Lumbsch, T., Lutzoni, F., Matheny, P. B., Mclaughlin, D. J., Powell, M. J., Redhead, S., Schoch, C. L., Spatafora, J. W., Stalpers, J. A., Vilgalys, R., Aime, M. C., Aptroot, A., Bauer, R., Begerow, D., Benny, G. L., Castlebury, L. A., Crous, P. W., Dai, Y.-C., Gams, W., Geiser, D. M., Griffith, G. W., Gueidan, C., Hawksworth, D. L., Hestmark, G., Hosaka, K., Humber, R. A., Hyde, K. D., Ironside, J. E., Klöljalg, U., Kurtzman, C. P., Larsson, K.-H., Lichtwardt, R., Longcore, J., Mi-dlikowska, J., Miller, A. Moncalvo, J.-M., Mozley-Standridge, S., Oberwinkler, F., Parmasto, E., Reeb, V., Rogers, J. D., Roux, C., Ryvarden, L., Sampaio, J. P., Schüßler, A., Sugiyama, J., Thorn, R. G., Tibell, L., Untereiner, W. A., Walker, C., Wang, Z., Weir, A., Weiss, M., White, M. M., Winka, K., Yao, Y.-J., e Zhang, N. (2007) A higher level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycological Research*, **111**: 509–547.

Ingram, L. O., Conway, T., Clark, D. P., Sewell, G. W. e Preston J. F. (1987) Genetic engineering of ethanol production in *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, **53**:2420–2425.

Innis, M.A. e Gelfand, D.H., (1990) Optimization of PCRs. In: INNIS, M.A.; GELFAND, D.H.; SNINSKY, J.J.; WHITE, T.J., (eds.). PCR protocols. A Guide to Methods and Applications. Academic Press, Inc., New York, pp. 3–12.

Inoue, H., Nojima, H. e Okayama, H. (1990) High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene*, **96**:23–28.

Jeffries, T. W. (2006) Engineering yeasts for xylose metabolism. *Current Opinion in Biotechnology*, **17**:320–326

Katahira, S., Ito, M., Takema, H., Fujita, Y., Tanino, T., Tanaka, T., Fukuda, H., e Kondo, A. (2008) 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*, **43**:115–119.

Kern, M., Haltrich, D., Nidetzky, B. e Kulbe, K. D. (1997) Induction of aldose reductase and xylitol dehydrogenase activities in *Candida tenuis* CBS 4435. *FEMS Microbiology Letters*, **149**:31–37.

Koganti, S., Kuo, T. M., Kurtzman, C. P., Smith, N. e Ju, L. K. (2011) Production of arabitol from glycerol: strain screening and study of factors affecting production yield. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **90**:257–267.

Kötter, P., Amore, R., Hollenberg, C. P. e Ciriacy, M. (1990) Isolation and characterization of the *Pichia stipitis* xylitol dehydrogenase gene, *XYL2*, and construction of a xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae* transformant. *Current Genetics*, **18**:493–500.

Kreger-van Rij (1984) The yeasts a taxonomic study - Third revised and enlarged edition. Edited by N.J.W., Elsevier.

Kurtzman, C. P. e Fell, J. W. (1998) Definition, classification and nomenclature of the yeasts. In: The yeasts a taxonomic study, C.P. Kurtzman and J.W. Fell (eds.) Four edition. Elsevier Science B.V., Amsterdam.

Larkin, M.A., Blackshields, G., Brown, N.P., Chenna, R., McGettigan, P.A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I.M., Wilm, A., Lopez, R. Thompson, J.D., Gibson, T.J. e Higgins, D.G. (2007) ClustalW2 and ClustalX version 2.0. *Bioinformatics*, **23**:2947–2948.

Larsson, S., Quintana-Sáinz, A., Reimann, A., Nilvebrant, N. O. e Jönsson, L. J. (2000) Influence of lignocelluloses-derived aromatic compounds on oxygen-limited growth and ethanolic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **84–86**:617–632.

Leandro, M. J., Fonseca, C. e Gonçalves, P. (2009) Hexose and pentose transport in ascomycetous yeasts: an overview. *FEMS Yeast Research* **9**:511–525.

Leandro, M. J., Gonçalves, P. e Spencer-Martins, I. (2006) Two glucose/xylose transporter genes from the yeast *Candida intermedia*: first molecular characterization of a yeast xylose-H⁺ symporter. *Biochemical Journal*, **395**:543–549.

- Lin, Y. e Tanaka, S. (2006)** Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospects. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **69**:627–642.
- Loureiro-Dias, M. C. e Peinado, J. M. (1984)** Transport of maltose in *Saccharomyces cerevisiae*. Effect of pH and potassium ions. *Biochemical Journal*, **222**:293–298.
- Loureiro-Dias, M. C (1987)** Glucose and polyol transport systems in *Candida intermedia* and their regulation. *Journal of General Microbiology*, **133**:2737–2742.
- Loureiro-Dias, M. C (1988)** Movements of protons coupled to glucose transport in yeasts. A comparative study among 248 yeast strains. *Antonie Leeuwenhoek*, **54**:331–343.
- Matsushika, A., Inoue, H., Kodaki, T. e Sawayama, S. (2009)** Ethanol production from xylose in engineered *Saccharomyces cerevisiae* strains: current state and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **84**:37–53
- Matsushika, A. e Sawayama, S. (2008)** Efficient bioethanol production from xylose by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* requires high activity of xylose reductase and moderate xylulokinase activity. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **106**:306–309.
- Meinander, N. Q. e Hahn-Hägerdal, B. (1997)** Influence of cosubstrate concentration on xylose conversion by recombinant, *XYL1*-expressing *Saccharomyces cerevisiae*: a comparison of different sugars and ethanol as cosubstrates. *Applied and Environmental Microbiology*, **63**:1959–1964.
- Minhas, A., Biswas, D. e Mondal, A. K. (2009)** Development of host and vector for high-efficiency transformation and gene disruption in *Debaryomyces hansenii*. *FEMS Yeast Research*. **9**:95–102.
- Mussatto, S. I. e Roberto, I. C. (2002)** Xilitol: Edulcorante com efeitos benéficos para a saúde humana. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, **38**:401–413.
- Naik, S. N., Goudb, V. V., Routb, P. K. e Dalaib, A. K. (2010)** Production of first and second generation biofuels: *A comprehensive review*. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, **14**:578–597.

- Niedenthal, R. K., Riles, L., Johnston, M. e Hegemann, J. H. (1996).** Green fluorescent protein as a marker for gene expression and subcellular localization in budding yeast. *Yeast*, **12**:773–786.
- Nigam, J. N. (2001)** Ethanol production from wheat straw hemicelluloses hydrolysate by *Pichia tipitis*. *Journal of Biotechnology*, **87**:17–27.
- Nobre, A., Duarte, L. C., Roseiro, J. C. e Gírio, F. M. (2002)** A physiological and enzymatic study of *Debaryomyces hansenii* growth on xylose and oxygen limited chemostats. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **59**:509–516.
- Nobre, A. e Lucas, C. (2003)** Utilização de substratos simples e substratos mistos por *Debaryomyces hansenii* - Uma abordagem fisiológica e bioquímica. Poster apresentado no X Congresso Nacional de Biotecnologia, BIOTEC 2003, Lisboa.
- Nobre, A. Cândida, L. e Leão, C. (1999)** Transport and utilization of hexoses and pentoses in the Halotolerant yeast *Debaryomyces hansenii*. *Applied and Environmental Microbiology*, **65**:3594–3598.
- Olofsson, K., Bertilsson, M. e Lidén, G. (2008)** A short review on SSF – an interesting process option for ethanol production from lignocellulosic feedstocks. *Biotechnology for Biofuels*, 1–7.
- Ostergaard, S., Olsson, L. e Nielsen, J. (2000)** Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **64**:34–50.
- Palma, M., Goffeau, A., Spencer-Martins, I. e Baret, P. V. (2007)** A phylogenetic analysis of the sugar porters in hemiascomycetous yeasts. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, **12**:241–248.
- Parajó, J. C., Dominguez, H. e Dominguez, J. M. (1995)** Production of xylitol from raw wood hydrolysates by *Debaryomyces hansenii* NRRL Y-7426. *Bioprocess Engineering*, **13**:125–131.
- Park, Y. K., Suzuki, C., Alencar, S. M. e Aguiar, C. L. (2001)** Isolamento de leveduras osmofílicas produtoras de eritritol e sua produção a partir de sacarose. *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*, **22**:22–24.

Prista, C., Almagro, A., Loureiro-Dias, M. C. e Ramos, J. (1997) Physiological basis for the high salt tolerance of *Debaryomyces hansenii*. *Applied and Environmental Microbiology*, **63**:4005–4009.

Radakovits, R., Jinkerson, R. E, Darzins, A. e Posewitz, M. C. (2010) Genetic engineering of algae for enhanced biofuel production. *Eukaryotic Cell*, **9**:486–501.

Rehm, H. (1988) Microbial production of glycerol and other polyols. *Biotechnology - Special microbial process*. Weinheim: VCH, **6B**:52–64.

Rozen, S. e Skaletsky, H. J. (2000) *Primer3* on the WWW for general users and for biologist programmers. *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*, **132**:365–386.

Saloheimo, A., Rauta, J., Stasyk, O. V., Sibirny, A. A., Penttilä, M. e Ruohonen, L. (2007) Xylose transport studies with xylose utilizing *Saccharomyces cerevisiae* strains expressing heterologous and homologous permeases. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **74**:1041–1052.

Sambrook, J., Fritsch, E. F. e Maniatis, T. (1989) Molecular cloning: a laboratory manual, Second edition. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory.

Sánchez, C. (2009) Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi. *Biotechnology Advances*, **27**:185–194.

Sayers EW, Barrett T, Benson DA, Bryant SH, Canese K, Chetvernin V, Church DM, DiCuccio M, Edgar R, Federhen S, Feolo M, Geer LY, Helmberg W, Kapustin Y, Landsman D, Lipman DJ, Madden TL, Maglott DR, Miller V, Mizrachi I, Ostell J, Pruitt KD, Schuler GD, Sequeira E, Sherry ST, Shumway M, Sirotkin K, Souvorov A, Starchenko G, Tatusova TA, Wagner L, Yaschenko E e Ye J (2009) Database resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic Acids Research*. **37**(Database issue):D5–D15.

Shallom, D. e Shoham, Y. (2003) Microbial hemicellulases. *Current Opinion in Biotechnology*, **6**:219–228.

- Sherman, D.J., Martin, T., Nikolski, M., Caylam C., Souciet, J.L. e Durrens, P. for the Génolevures Consortium (2009)** Génolevures: protein families and synteny among complete hemiascomycetous yeast proteomes and genomes. *Nucleic Acids Research*, **37** (Database issue): D550–D554.
- Skoog, K., e Hähn-Hagerdal, B. (1988)** Xylose fermentation. *Enzyme and Microbial Technology*, **10**:66–80.
- Smith, R. F., Wiese, B. A., Wojzynski, M. K., Davison, D. B. e Worley, K. C. (1996)** BCM Search launcher - an integrated di to molecular biology data base search and analysis services available on the world wide web. *Genome Research*, **6**:454–62.
- Spronsen, J., Cardoso, M., Witkamp, G., Jong, W. e Kroon, M. (2011)** Separation and recovery of the constituents from lignocellulosic biomass by using ionic liquids and acetic acid as cosolvents for mild hydrolysis. *Chemical Engineering and Processing*, **50**:196–199.
- Stambuk, B. U., Franden, M. A., Singh, A. e Zhang, M. (2003)** D-xylose transport by *Candida succiphila* and *Kluyveromyces marxianus*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **106**:255–263.
- Stothard, P. (2000)** The sequence manipulation suite: JavaScript programs for analyzing and formatting protein and DNA sequences. *Biotechniques*, **28**:1102–1104.
- Taherzadeh, J. M., Adler, L. e Liden, G. (2002)** Strategies for enhancing fermentative production of glycerol – a review. *Enzyme and Microbial Technology*, **31**:53–66.
- Tanghe, A., Van Dijck, P., Dumortier, F., Teunissen, A., Hohmann, S. e Thevelein, J. M. (2002)**. Aquaporin expression correlates with freeze tolerance in baker's yeast, and overexpression improves freeze tolerance in industrial strains. *Applied and Environmental Microbiology*, **68**:5981–5989.
- Tokuoka, K. (1993)** A review, sugar and salt-tolerant yeasts. *Journal of Applied Bacteriology*, **74**:101–110.
- Tusnády, G. E. e Simon, I. (2001)** The HMMTOP transmembrane topology prediction server. *Bioinformatics*, **17**:849–850.

Vandeska, E., Amartey, S., Kuzmanova, S. e Jeffries, T. (1995) Effects of environmental conditions on production of xylitol by *Candida boidinii*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **11**:213–218.

Wingren, A., Galbe, M. e Zacchi, G. (2003) Techno-economic evaluation of producing ethanol from softwood: comparison of SSF and SHF and identification of bottlenecks. *Biotechnology Progress*, **19**:1109–1117.

Yahashi, Y., Horitsu, H., Kawai, K., Suzuki, T. e Takamizawa, K. (1996) Production of xylitol from D-xylose by *Candida tropicalis*: the effect of D-glucose feeding. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, **81**:148–152.

Young, E., Poucher, A., Comer, A., Bailey, A. e Alper, H. (2011) Functional survey for heterologous sugar transport proteins, using *Saccharomyces cerevisiae* as a host. *Applied and Environmental Microbiology*, **77**:3311–3319.

Zaldivar, J., Nielsen, J. e Olsson, L. (2001) Fuel ethanol production from lignocellulose: a challenge for metabolic engineering and process integration. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **56**:17–34.

Zhu, H. Y., Xu, H. Dai, X. Y, Zhang, Y., Ying, H. J. e Ouyang P. K. (2010) Production of D-arabitol by a newly isolated *Kodamaea ohmeri*. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, **33**:565–571.

Autoridade de Segurança Alimentar e Económica, <http://www.asae.pt/> (consultado em 7 de Agosto de 2011)

ENERS Energy Concept, www.eners.ch (consultado em 20 de Julho de 2011)

Polyols Information Source, <http://www.polyol.org/index.html> (consultado em 6 de Agosto de 2011)

Revista Ingredientes e Aditivos, **58**:35–48 (2008) Artigo: Os Polióis. Autor: desconhecido http://www.insumos.com.br/aditivos_e_ingredientes/edicoes_materias.php?id_edicao=16 (consultado em 6 de Agosto de 2011)

The Gietz Lab Yeast Transformation Home Page”, <http://home.cc.umanitoba.ca/~gietz/> (consultado em 1 de Setembro de 2011)

ANEXO I

- **Meios de cultura**

Meio LB	
Triptona	1% (p/v)
Extracto de levedura	0,5% (p/v)
Cloreto de sódio	1% (p/v)
Agar	1,5% (p/v)

Meio SOC	
Triptona	2% (p/v)
Extracto de levedura	0,5% (p/v)
Glucose	2% (p/v)
NaCl	10 mM
KCl	2,5 mM
MgCl ₂	10 mM
MgSO ₄	10 mM

Meio YNB	
Yeast Nitrogen Base	0,67% (p/v)
Glucose ou Maltose	2% (p/v)
Agar	2% (p/v)
Histidina	20 mg/mL
Leucina	40 mg/mL
Triptofano	30 mg/mL
Uracilo	20 mg/mL

Meio YPD	
Extracto de levedura	0,5% (p/v)
Peptona	1% (p/v)
Glucose	2% (p/v)
Agar	2% (p/v)

- **Soluções para Extração de DNA genómico**

Solução SE	
Sorbitol	1 M
EDTA	100 mM pH 7.5

Tampão TE 50:20	
Tris-HCl	50 mM pH 7.4
EDTA	20 mM

- **Solução para Insert Analysis**

Solução BT	
Triton X-100	2% (v/v) pH 12.4

- **Solução para Clone Analysis**

Solução I	
Glucose	50 mM
Tris-HCl	25 mM pH 8.0
EDTA	10 mM pH 8.0

Solução II	
NaOH	200 mM
SDS	1% (p/v)

Solução III	
NaAc	3 M
HAc	até pH 4.8

Solução IV	
NaAc	100 mM
Tris	50 mM pH 8.0

- **Solução para Extracção DNA plasmídico de *S. cerevisiae***

Solução lise	
SDS	0,25% (p/v)
NaOH	50 mM

- **Solução para Electroforese**

Solução TAE 10x	
Tris	40 mM pH 7.6
EDTA	10 mM
Ácido acético Glacial para acertar pH 8.6	20 mM

Tampão de carga	
Glicerol	60%
EDTA	20 mM pH 8.0
Azul de bromofenol	0,25%
RNase	1 mg/mL

ANEXO II

tcgocgcttt cggatgatgac ggtgaaaacc tctgacacat gcagctcccg gagacgggtca cagcttgtct gtaagcggat
 gccgggagca gacaagcccg tcagggcgcg tcagcgggtg ttggcgggtg tcggggctg cttactatg cggcatcaga
 gcagattgta ctgagagtgc accataccac agcttttcaa ttcaattcat ctttttttt ttattctttt ttttgatttc
 ggtttctttg aaatTTTTTT gatctggtaa tctccgaaca gaaggaagaa cgaaggaag agcacagact tagattggta
 tatatacgca tatgtagtgt tgaagaaca tgaaattgcc cagtattctt aaccactg cacaagaaca aaactgcag
 gaacgaaga taaatcatgt cgaaagctac atataaggaa cgtgctgcta ctcactag tccgtttgct gccaagctat
 ttaatatcat gcacgaaaag caaacaact tgtgtgcttc attggatggt gactgatttt tccatggagg ggaattact
 gaagcattag gtcccaaat ttgtttacta aaaacacatg ttgttatctt ttccgaagaca gaaaatttgc tgacattggg aatacagtca
 gccgctaag gcattatccg ccaagtacaa ttttttactc ttccgaagaca gaaaatttgc tgacattggg aatacagtca
 aattgcagta ctctgcggt gtatacagaa tagcagaatg ggacagacatt acgaaatgcac cgaatgcac acggtgtggt gggcccaggt
 attgttagcg gtttgaagca ggccgagaa gaagtaacaa aggaacctag aggccttttg atgttagcag aattgtcatg
 caaggctcc ctatctactg gagaatatac taagggtact gttgacattg gactgatttt tccatggagg gcacagttaa
 ttattgtctca aagagacatg ggtggaagag atgaaggta cgattgggtg attatgacac ccggtgtggg ttagatgac
 aagggagacg cattgggtca acagtataga accgtggatg atgtggtctc tacaggatct gacattatta ttgttggag
 aggactatt gcaaaggaa gggatgctaa ggttaggggt gaacgttaca taaactcac aaattagagc tcaatttaa
 gatcgccca gcaaacataa aaaactgtat tataagttaa agatgcgtaa ggagaaaata ccgcatcagg aaattgtaa
 ttatatcagt tattacccta tgcggtgtga aataccgcac agatgcgtaa ggagaaaata ccgcatcagg aaattgtaa
 cgttaataat ttgttaaaat tcgctttaa tttttgttaa atcagctcat tttaaacca tttaaacca atagccgaa
 tcccttataa atcaaaagaa tagaccgaga gtaggttgag ttgtttcca gtttgaaca agagtccact attaaagaa
 gtggactcca actctactg gagaataac gctcactgaa gctcactgaa actacgtgaa actacgtgaa actacgtgaa
 ttggggctcg aggtgcccga aagcactaaa tcggaacctt aaagggagcc cccgatttag agcttgacgg ggaagccgg
 cgaacgtggc gagaaaggaa gggaaagaa cgaagggagc gggcgttagg ggcgctggca gtgtagcggg caactgtgc
 gtaaccacca cccggccgcg gcttaatgct cgcgtacagc cgcgctgagc ggggatgtgc tgcaagcga gcaactgtt
 ggaaggcgca tccgtgocgg cctctctcgt attcctcagc ggtcagaaag ggcagtgag cgcgctgaa acgactact
 taacgcaggg gttttccag tcacgacggt gtaaacgcac ggccagtgag agcaaggttt tcagataaat
 ttgggtaccg gccgcaaat aaagccttcg agcgtcccaa aacctctca taaataact tcttaatact aacataact
 tacacgcgct tgtacagaaa aaaaagaaaa atttgaaata taaataact tcttaatact aacataact
 aatagggacc tagctcactg ttgtcctaac tcttctctt tcggttagag cggatgtggg gggagggcgt gaagtgaagc
 gtgacataac taattacatg actcgaccag ttatttgtac aattcatcca taccatgggt aataccagca cagtaacaa
 attotaacaa gaccatgtgg tctctctttt cgtttggatc ttgggataag gcagattgag tggataagta atggttgtct
 ggtaacaaga ctggaccatc accaattgga gtattttgtt gataatggtc ttgtcagccc tgatgtaaac attgtgag
 gtgtctaatt ttgaagttaa ctttgatacc attcctttgt ttgtcagccc tgatgtaaac attgtgag ttatagttgt
 attocaattt gtgacctaaa atgttaccat cttctttaa atcaatacct ttttaattcga ttttattaac taaggatca
 cttcaaaact tgacttccag tctggtcttg tagttaccgt catctttgaa aaaaatagtt ctttcttgaa cataacctc
 tggcatgtca gacttgaana agtcatgttg tttcatatga tctggtatc tagcaaaaaca ttgaacacca taaccgaaag
 tagtgaacta ggttgccca ggaactggca atttaccag agtaaaaata aattttaagg tcaatttacc gtaagtagca
 tcaacttca cttcacggga gacagaaaat ttgtgacct taacatcacc atctaattca accaaaattg ggaatacacc
 agtgaataat tcttccact tagacatgct gaggtcgac gtatcgataa gcttgatac gaattcctgc agcccgggg
 atccactag tctagatgat ggatgggggt aatagaattg tatctatgta tctgacgacc ctgtattaca cgaaggaat
 agtagatgaa aagacaagag agcaagaaaa aggaaaaact tctttctaa cagacgctt acttaacct atatatct
 tttttttt atcagcgtg ttcaattgga caagtgcca cctttctgac acttcggta ttatgttaca cagatctc
 gaggatggc cttgactaa ctttaattag catttgcaa ccaccacgt tccccaat gacagctt acgtgccatt
 tgcattttg cgtatcgtg acctcaagag aaaaagcaaa aataatag agtaagga ttcgaaacct tgcacggga
 gctccagct ttgtccctt tagtgagggt acagtagggg taattgocg cttggcgtaa tcatggtcat agctgtttc
 tgttatccg tcacaattc acacaacata ggagccgaaa ggtcaaaagt taaagcctg taagacacga gttgcaagta
 actcacatta attgcttgc gctcactgct cgtttccag tcgggaaacc tgcgtgcca gctgattaa tgaatcgcc
 aacgcgccc gagagcggt ttgctgattg ggcgtcttc cgtctcctc ctcactgact cgtgcccgc ggtcgttcc
 ctgocggcag cgtatcagc tcaactcaa gggtaatac gggtaatac ggttatccac agaatcagg gataaccgc
 gtgagcaaaa gggcagaaa agccagaaa cgtataagc agagtgggc cgcgctttt tggcgtttt ccaataggc
 acgagcatca caaaaatcga cgctcaagtc agagtgggc aaaccgcaca cctgcccgc gataaccagg gttccccct
 ggaagctccc tctgtgctc tctgttccg acctgcccg ttaaccggata cctgtcccgc tttctccct cgggaagcgt
 ggcgctttc catagctcac gctgtaggta tctcagttc gtgtaggctg tgcgttgcg tgctagggc gctgggctg
 ccccgttca gcccgaccg tgcgcttat cggtaacta cggtaacta cgtctttgag tccaacctg taagacacga
 ctggcagcag cactggtaa caggattagc agagcaggt atgtaggcgg tgctacagag tttctgaagt ggtggcctaa
 ctacggctac actagaagga cagtatttgg tatctgctc atgtaggcgg tgctacagag tttctgaagt ggtggcctaa
 cttgatccgg caaacaac accgctggt ggggtggtt tttgtttg ctcagtgaa atgtaggcgg tgctacagag
 tctcaagaag atcctttgat cttttctac gggctgacg ctcagtgaa atgtaggcgg tgctacagag tttctgaagt
 gagattatca aaaaggatc tcacctagat ctttttaaat taaaatgaa gttttaaat aatctaaagt atatatgagt
 aaacttgct tgacagtac caatgctaa tcagtggag acctatctca gcttaccat gogatctgtc ttttctcgg
 gcctgactcc cgtctgtgta gataactac atacgggag gcttaccatc tggccccag gctgcaatga taccgcaga
 cccagctca cggctccag atttatcagc aataaaccag ggcgagcag gggccgagc cagaagtgtt cctgcaact
 tatccgctc catccagtct attaatggt gccgggaagc tagagtaagt agttcgccag ttaatagttt cctgcaact
 gttgccattg ctacaggcat cgtggtgca cgctcgtcgt ttggtatggc ttcattcagc tccggttccc aacgatcaag
 gcgagttaca tgatccccca tgttgtgca aaaagcgggt agctcctcgt gtcctccgat cgttgtcaga agtaagtgg
 ccgcatggt actactatg ggtatggcag cactcgataa ggttaactact gtcagccat cgttaagga ttttggctg
 actggtgagt actcaacaa gtcattctga gaatagtga tgcggcgacc gagttgctc tgcccggcgt caatacggga
 taataccgag cacatagca gaactttaa agtgctcatc attggaaaac gttcttcgg gcaaaaactc tcaaggatct
 taccgctgt gagatccag tcgatgtaac ccaactcgt gcccaactga tcttcagcat cttttactt caccagcgt
 tctgggtgag caaaaacag aaggcaaat gcccgaaaa agggaataag gccgacacgg tcttcagcat tctactact
 cttctttt caatattat gaagcattta tcagggttat gctctcatga atttgaatgt atttgaaaa
 ataacaat aggggtccg cgcacattt cccgaaaagt gccactggg tccctttcat cactgtctat aaaaataat
 ataatttaa ttttttaata taatatata aattaaaaat agaaagtaa aaaagaaatt aaagaaaaa tagttttgt

```

tttccgaaga tgtaaaagac tctaggggga tcgccaacaa atactacctt ttatcttgct cttcctgctc tcagggtatta
atgccgaatt gtttcatctt gtctgtgtag aagaccacac acgaaaatcc tgtgatttta cattttactt atcgtaaatc
gaatgtatat ctatttaatc tgcttttctt gtctaataaa tatatatgta aagtacgctt tttgttgaaa ttttttaaac
ctttgtttat tttttttctt tcattccgta actcttctac cttctttatt tactttctaa aatccaaata caaaacataa
aaataaataa acacagagta aattcccaaa ttattccatc attaaaagat acgaggcgcg tgtaagttac aggcaagcga
tccgtcctaa gaaaccatta ttatcatgac attaacctat aaaaataggc gtatcaccgag gccttttctg c
    
```

Figura 21 – Sequência completa do plasmídeo pUG35.

A zona assinalada a verde corresponde ao gene EGFP, a zona azul corresponde à sequência do local de clonagem múltipla que contém as sequências de reconhecimento para enzimas de restrição e a zona rosa corresponde à sequência do promotor MET25 [adaptado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/11344888>].

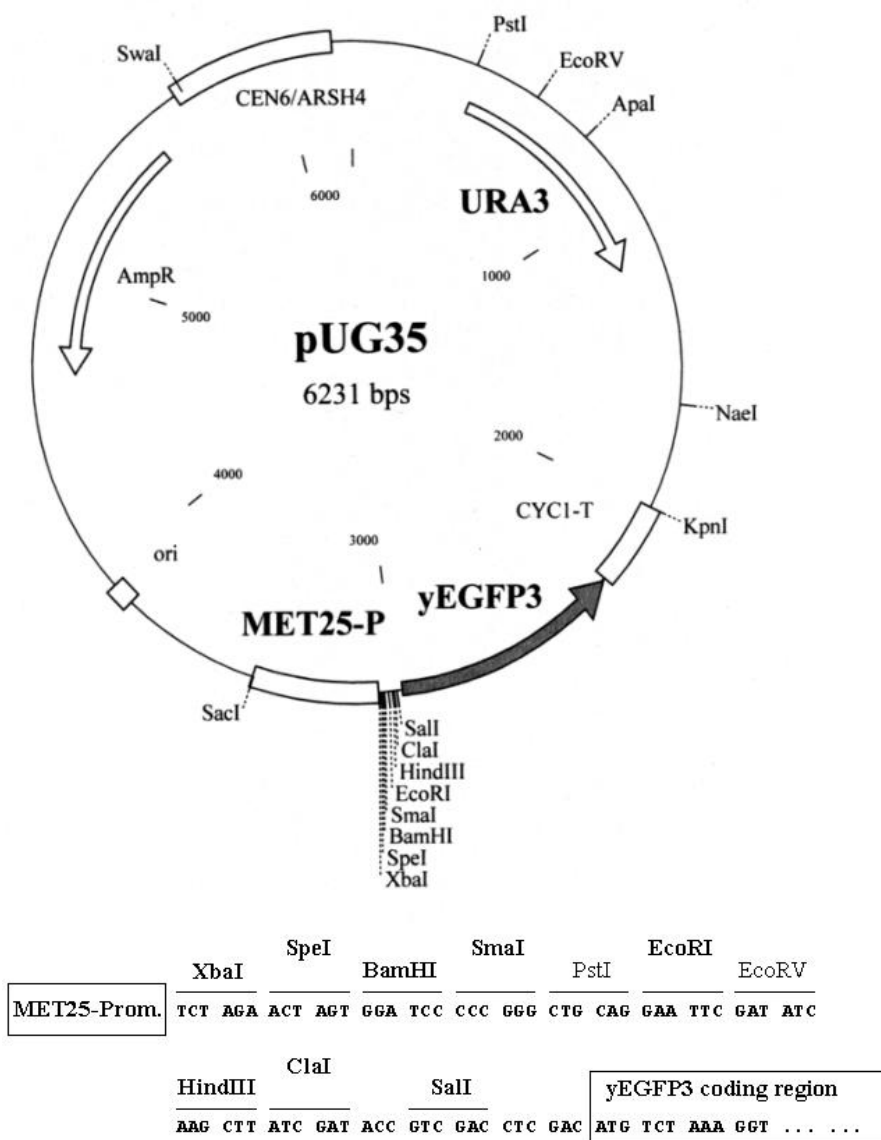


Figura 22 – Mapa de restrição do vector pUG35

[<http://mips.helmholtz-muenchen.de/proj/yeast/info/tools/hegemann/gfp.html>].

ANEXO III

Como marcadores de pesquisa molecular do DNA foram utilizados o marcador DNA λ digerido com *Hind*III e o marcador I da NZYTech.

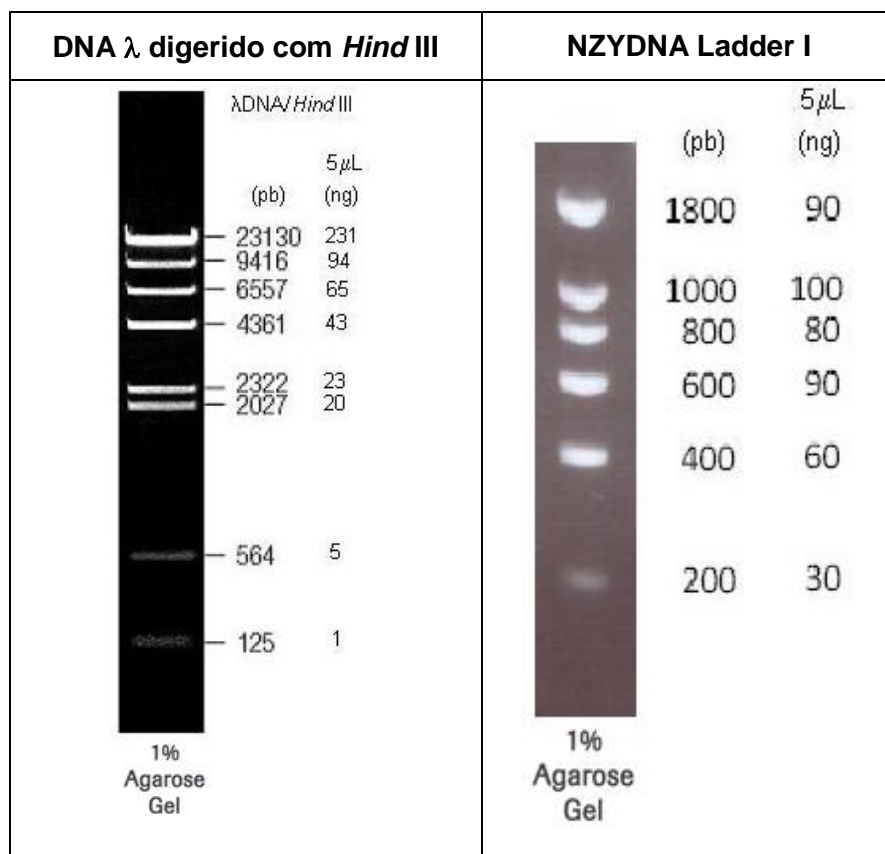


Figura 23 – Especificações e tamanhos de fragmentos dos marcadores de DNA utilizados neste trabalho [adaptado de Biochemicals Catalog – Roche, e NZYTech].

ANEXO IV

Tabela 26 – Assimilação de polióis pelas leveduras do Filo Ascomiceta.

(Abreviaturas: Gli – Glicerol; Eri – Eritritol; Rib – Ribitol; Gal – Galactitol; Man – D-Manitol; Glu – D-Glucitol; Ino – Mio-inositol; Ara –L-Arabitol e Xil –Xilitol) [Kurtzman and Fell, 1998; Kreger-van Rij, 1984].

Assimilação: (+) positiva; (-) negativa; (w) fraca; (v) variável; (s) lenta e (d) retardada.

Nome	Gli	Eri	Rib	Gal	Man	Glu	Ino	Ara	Xil
<i>Aciculoconidium aculeatum</i>	+	-	S	-	+	+	-	-	-
<i>Ambrosiozyma ambrosiae</i>	+	+	+	-	+	+	-	+,d,w	+
<i>Ambrosiozyma cicatricosa</i>	+	+	+	-	+	+	-	+	+
<i>Ambrosiozyma monospora</i>	+	+	+	-	+	+	-	+	+
<i>Ambrosiozyma philentoma</i>	+	+	+	-	+	+	-	+	+
<i>Ambrosiozyma platypodis</i>	+	+	+	-	+	+	-	+	+
<i>Arxiozyma telluris</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Arxula adenivorans</i>	+	+	+	-	+	+	+	d	+
<i>Arxula terrestris</i>	+	+	+	+	+	+	+		
<i>Ascoidea africana</i>	+	-	+		+	+	-	+	
<i>Ascoidea corymbosa</i>	+	-	-		-	+	-	v	
<i>Ascoidea hylecoeti</i>	+	-	W		W	+	W	+	
<i>Ascoidea rubescens</i>	W	+	+		+	W	W	W	
<i>Babjevia anomala</i>	V	-	V	-	-	-	-	-	-
<i>Blastobotrys arbuscula</i>	+	+	+	+	+	+	-		
<i>Blastobotrys aristata</i>	+	+	+	+	+	+	v		
<i>Blastobotrys capitulata</i>	+	+	+	+	+	+	+		
<i>Blastobotrys elegans</i>	+	+	+	v	+	+	-		
<i>Blastobotrys nivea</i>	+	+	+	+	+	+	+		
<i>Blastobotrys proliferans</i>	+	+	+	+	+	+	+		
<i>Botryozyma nematodophila</i>	+	-	-	-	+	+	-	-	-
<i>Brettanomyces custersianus</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Brettanomyces naardenensis</i>	-	-	v	-	v	+	-	-	-
<i>Brettanomyces nanus</i>	-	-	+	-	+	+	-	-	-
<i>Candida aaseri</i>	+	+	+	-	+	+	-	+	+
<i>Candida albicans</i>	v	-	v	-	+	+/d	-	-/d	+
<i>Candida amapae</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Candida anatomiae</i>	-	-	-	-	d	-	-	-	-
<i>Candida ancurdensis</i>	+	-	-	-	d	+	-	-	-
<i>Candida antillancae</i>	+	-	-	-	d	d	-	-	-
<i>Candida apicola</i>	+	-	-/d	-	+	+	-	-/d	-/d
<i>Candida apis</i>	+/d	-	-	-	+	+	-	-	-
<i>Candida atlantica</i>	+	+	+	-	+	+	-	+	+
<i>Candida atmosphaerica</i>	+	+	+	-	+	+	-	+	+
<i>Candida auringiensis</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Candida austromarina</i>	d	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Candida azyma</i>	+	-	+/d	+/d	+	+	-	d	+
<i>Candida beechii</i>	+	-	+	-	+	+	-	-	d
<i>Candida bertae</i>	+	+	+	-	+	+	+	+	+
<i>Candida berthetii</i>	+	-	-	-	-/d	-/d	-	-	-

<i>Candida blankii</i>	+/d	+	+/d	v	+	+	+	+	+/d
<i>Candida boidinii</i>	+/d	+	+	-	+	+	-	+	+
<i>Candida boleticola</i>	+/d	+	+	-	+	+	-	-	+
<i>Candida bombi</i>	+	-	-	-	+	+	-	-	-
<i>Candida bombicola</i>	+	-	-	-	+	+/d	-	-	-
<i>Candida buinensis</i>	d	-	-	-	+	-/d	-	+	+
<i>Candida butyri</i>	+	+	+	-	+	+	-	+	+
<i>Candida cantarellii</i>	+	+	-/d	-	+	+	-	-	+
<i>Candida caseinolytica</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Candida castellii</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Candida castrensis</i>	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>Candida catenulata</i>	+	-	+/d	-	+	+/d	-	-	v
<i>Candida chilensis</i>	+	+	+	-	+	+	-	+	+
<i>Candida chiropterorum</i>	+	+	+	+	+	+	+	-	-
<i>Candida coipomoensis</i>	+	+	+	-	+	+	-	-	+
<i>Candida conglobata</i>	+	+	+	-	+	+	-	+	+
<i>Candida cylindracea</i>	+	-	-	-	+	+	-	-	-
<i>Candida dendrica</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Candida dendronema</i>	+	+	+	+	+	+	-	-	-
<i>Candida diddensiae</i>	+	+	+	-	+	+	-	+	+
<i>Candida diversa</i>	-/d	-	v	-	+	+	-	-	-
<i>Candida drimydis</i>	d	-	d	-	d	d	-	-	-
<i>Candida entomophila</i>	+	+	+	-	+	+	-	+	+
<i>Candida ergastensis</i>	+	+	+	-	+	+	-	-	+
<i>Candida ernobii</i>	+	-	d	-	+	+	-	+	+
<i>Candida etchellsii</i>	v	-	-	-	v	v	-	-	v
<i>Candida ethanolica</i>	-/d	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Candida fennica</i>	+	+	+	-	+	+	-	v	+/d
<i>Candida fermenticarens</i>	+	+	+	d	+	+	-	d	+
<i>Candida floricola</i>	+	-	-	-	+	+	-	-	-/d
<i>Candida fluviatilis</i>	+	-	+	-	+	+	-	-	d
<i>Candida freyschussii</i>	+	-	-	-	+	+	-	-	+
<i>Candida friedrichii</i>	+	+	+	+	+	+	-	+	+
<i>Candida fructus</i>	+	-	+	-	d	+	-	-	+
<i>Candida galacta</i>	d	-	-	-	+	+	-	-	-
<i>Candida geochares</i>	+	-	d	-	+	+	-	-	d
<i>Candida glabrata</i>	+/d	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Candida glabrosa</i>	+	-	+	-	+	+	-	-	+
<i>Candida glucosophila</i>	w	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Candida gropengiesseri</i>	+	-	-	-	+	+	-	-	+/d
<i>Candida haemulonii</i>	+/d	-	d	-/d	+	+	-	-	v
<i>Candida homilentoma</i>	+	+	+	-	+	+	-	+	+
<i>Candida humilis</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Candida incommunis</i>	+	+	-	-	d	+	+	-	+
<i>Candida inconspicua</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-

<i>Candida insectalens</i>	-	-	d	-	+	+	-	-	-
<i>Candida insectamans</i>	-/d	-	+	-	+	+	-	-	-
<i>Candida insectorum</i>	+	+	+	-	+	+	-	+	+
<i>Candida intermedia</i>	-/d	-	+/d	v	+	+	-	-	v
<i>Candida ishiwadae</i>	+	+	+	-/d	+	+	-	d	+/d
<i>Candida karawaiewii</i>	+	-	-/d	-	+	v	-	-	-
<i>Candida krissii</i>	+	-	-	-	+	+	-	-	-
<i>Candida kruisii</i>	+	-	+	-	+	+	-	-	+
<i>Candida lactis-condensi</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Candida laureliae</i>	d	+	+	-	+	+	-	-	+
<i>Candida llanquihuensis</i>	+	+	d	-	+	+	-	+	+
<i>Candida lyxosophila</i>	d	-	+	-	+	+	-	-	+/d
<i>Candida magnoliae</i>	+	-	v	-	+	+	-	-	v
<i>Candida maltosa</i>	+	-	+/d	-	+	+	-	-	+/d
<i>Candida maris</i>	+/d	-	+/d	-	+	+	-	-	+
<i>Candida maritima</i>	+	-	-	-	+	+	-	v	+
<i>Candida melibiosica</i>	+/d	-	+/d	-	+	+	-	-	+
<i>Candida membranifaciens</i>	+	+	+	+	+	+	-	+	+
<i>Candida mesenterica</i>	+	+	+/d	-	+	+	-	-	v
<i>Candida methanosorbosa</i>	+	-	+	-	+	+	-	+	+
<i>Candida milleri</i>	v	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Candida mogii</i>	+	-	-/d	-/d	+	+/d	-	+	+
<i>Candida montana</i>	+	-	-	-	d	-	-	-	-
<i>Candida multigemmis</i>	-	-	+/d	-	-	+	-	-	+
<i>Candida musae</i>	+	-	d	-	+	+	-	-	+
<i>Candida naeodendra</i>	+	+	+	-	+	+	-	+	+
<i>Candida nanaspora</i>	+	+	+	-	+	+	-	+	+
<i>Candida natalensis</i>	+	-	+/d	-	+	+	-	-	-
<i>Candida nemodendra</i>	+	+	+	+	+	+	-	+	+
<i>Candida nitratophila</i>	+	-	+	-	+	+	-	+	+
<i>Candida norvegica</i>	+	-	-	-	+	+/d	-	-	v
<i>Candida odintsovae</i>	+	-	d	-	+	+	-	+	+
<i>Candida oleophila</i>	+	-	+/d	-	+	+	-	-	+/d
<i>Candida oregonensis</i>	-	-	+/d	-	+	+	-	-	v
<i>Candida ovalis</i>	+	+	+	-	+	+	-	+	+
<i>Candida palmioleophila</i>	+	-	+	-	+	+	-	-	+
<i>Candida paludigena</i>	-	-	-	-	-/d	-	+	-	-
<i>Candida parapsilosis</i>	+	-	+/d	-	+	+	-	-/d	+/d
<i>Candida pararugosa</i>	+	-	-	-	+	+	-	-	+
<i>Candida peltata</i>	+	+/d	+	+/d	+	+	-	+	+
<i>Candida petrohuensis</i>	+	-	d	-	d	+	-	-	-
<i>Candida pignaliae</i>	+	-	+	-	+	+	-	+	+
<i>Candida pini</i>	+	+	-	-	+	+	-	+	+
<i>Candida populi</i>	+	-	+	-	+	+	-	+/d	+
<i>Candida pseudointermedia</i>	-	-	+	d	+	+	-	-	+

<i>Candida pseudolambica</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Candida psychrophila</i>	+	+	+/d	-	+	+	-	+	+
<i>Candida pulcherrima</i>	+	-	-/d	-	d	d	-	-	d
<i>Candida quercuum</i>	+	-	-	-	+	+	-	-	+
<i>Candida railenensis</i>	+	-	+	-	+	+	-	-	+
<i>Candida reukaufii</i>	+	+	+	-	+	+	-	+/d	+
<i>Candida rugopelliculosa</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Candida rugosa</i>	+	-	-/d	-	+/d	+/d	-	-	-/d
<i>Candida saitoana</i>	+	-	+	-	+	+	-	v	+
<i>Candida sake</i>	+	-	v	-	+	+	-	-	v
<i>Candida salmanticensis</i>	-	-	d	-	d	-	-	-	+
<i>Candida santamariae</i>	+	-	+	-	+	+	-	-	+
<i>Candida santjacobensis</i>	+	+	+	-	d	d	+	d	d
<i>Candida savonica</i>	+	-	+	-	+	+	-	-	+
<i>Candida schatavii</i>	+	+	+	-	+	+	-	-	d
<i>Candida sequanensis</i>	+	+	+	-	+	+	-	+	+
<i>Candida shechatae</i> var. <i>insectosa</i>	+	-	+	-	+	+	-	-	d
<i>Candida shechatae</i> var. <i>lignosa</i>	+	-,d,w	+	d	+	+	-	-	+
<i>Candida shechatae</i> var. <i>shechatae</i>	+	-	+	-	+	+	-	-	d
<i>Candida silvae</i>	+/d	-	+/d	-	+	+	-	-	-
<i>Candida silvanorum</i>	+	+	+	-	+	+	-	+	+
<i>Candida silvatica</i>	+	-	+	-	+	+	-	-	-
<i>Candida silvicultrix</i>	+	+	+	-	+	+	-	+	+
<i>Candida soboxylosa</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>Candida solani</i>	+	-	-	-	-	+	-	-	+
<i>Candida sonorensis</i>	d	-	+	-	+	+	-	+	+
<i>Candida sophiae-reginae</i>	+	+	+	-	+	+	-	-	+
<i>Candida sorbophila</i>	d	-	-	-	+	+	-	-	d
<i>Candida spandovensis</i>	+	-	+	+	+	+	-	v	+
<i>Candida stellata</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Candida succiphila</i>	+	+	+	v	+	+	-	+	+
<i>Candida suecica</i>	+	-	+	-	+	+	-	-	-
<i>Candida tanzawaensis</i>	+	-	+	-	+	+	-	-	-
<i>Candida tenuis</i>	+	v	+	-	+	+/d	-	v	+/d
<i>Candida tepae</i>	d	-	-	-	d	+	-	-	-
<i>Candida torresii</i>	+	-	+/d	-	+	+	-	-	+
<i>Candida tropicalis</i>	v	-	+/d	-	+	+	-	-	+/d
<i>Candida tsuchiyae</i>	+	-	+	-	+	+	-	-	d
<i>Candida vaccinii</i>	+	-	-	-	+	+	-	-	d
<i>Candida valdiviana</i>	+/d	-	-/d	-/d	+	+	+	-	-
<i>Candida vanderwiltii</i>	+	-	+	d	+	+	-	+	+
<i>Candida vartiovaarae</i>	+	-	-	-	+	+	-	-	+
<i>Candida versatilis</i>	+	-	-/d	-	+	-	-	-/d	-/d
<i>Candida vinaria</i>	+	-	-	-	-/d	-/d	-	-	+
<i>Candida vini</i>	-/d	-	-/d	-	+	+	-	-	v

<i>Candida viswanathii</i>	+	-	+	-	+	+	-	-/d	+/d
<i>Candida wickerhamii</i>	+	-	+	-	+	+	-	-	d
<i>Candida xestobii</i>	+	-	d	-	-	-	-	+	+
<i>Candida zeylanoides</i>	+	-	v	-	+	+	-	-	-
<i>Cephaloascus albidus</i>	+	-	+	-	+	+	-		
<i>Cephaloascus fragrans</i>	+	-	+	-	+	+	-		
<i>Citeromyces matritensis</i>	+/w	-	v	-	+	+	-	-	-
<i>Clavispora lusitaniae</i>	+	-	s	-	+	+	-	-	+
<i>Clavispora opuntiae</i>	s	-	s	-	+	+	-	-	+,d,w
<i>Cyniclomyces guttulatus</i>	-	-	-	-	-	-	-		
<i>D. occidentalis</i> var. <i>occidentalis</i>	d	-	-,d,w	-	+	+,d,w	-	-	+
<i>D. occidentalis</i> var. <i>persoonii</i>	d	-	d	-	+	+,d,w	-	-	-
<i>Debaryomyces carsonii</i>	+	-	+	v	+	+	-	-	+
<i>Debaryomyces castellii</i>	+	-	+	+	+	+	-	d	+
<i>Debaryomyces coudertii</i>	+	+	+	-	+	+	-	+,d,w	+,d,w
<i>Debaryomyces etchellsii</i>	+	-	+	-	+	+	-	+	+
<i>Debaryomyces hansenii</i> var. <i>fabryii</i>	+	+	+	+	+	+	-	+	+
<i>Debaryomyces hansenii</i> var. <i>hansenii</i>	w	w	+	-	+	+	-	+	+
<i>Debaryomyces maramus</i>	+	+	+	-	+	+	-	+	+
<i>Debaryomyces melissophilus</i>	+	+	+	-	+	s	-	-	-
<i>Debaryomyces nepalensis</i>	+	+	+	v	+	+	-	+	+
<i>Debaryomyces polymorphus</i>	+	+	+	+	+	+	-	+,d,w	+
<i>Debaryomyces pseudopolymorphus</i>	+	+	+	+	+	+	-	+	+
<i>Debaryomyces robertsiae</i>	+	+	+	-	+	+	-	+	+
<i>Debaryomyces udenii</i>	+	+	+	-	+	+	-		d
<i>Debaryomyces vanriijae</i> var. <i>vanriijae</i>	+	+	+	+	+	+	-	+	+
<i>Debaryomyces vanriijae</i> var. <i>yarrowii</i>	+,d,w	-	+	-	+	+	-	+,d,w	+
<i>Debaryomyces yamadae</i>	+	-	+	+	+	+	-	d	+
<i>Dekkera anomala</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Dekkera bruxellensis</i>	v	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Dipodascopsis tothii</i>	+	-	+	-	+	+	+	+	+
<i>Dipodascopsis uninucleata</i>	+	-	+	-	+	+	+		
<i>Dipodascus aggregatus</i>	+	-	+	-	+	+	-		
<i>Dipodascus albidus</i>	+	-	-	-	+	+	-		
<i>Dipodascus ambrosiae</i>	+	-	v	-	+	+	-		
<i>Dipodascus armillariae</i>	+	-	-	-	+	v	-		
<i>Dipodascus australiensis</i>	+	-	v	-	+	+	-		
<i>Dipodascus capitatus</i>	+	-	-	-	-	-	-		
<i>Dipodascus geniculatus</i>	+	-	-	-	+	+	-		
<i>Dipodascus ingens</i>	+	-	-	-	-	-	-		
<i>Dipodascus macrosporus</i>	+	-	v	-	+	+	-		
<i>Dipodascus magnusii</i>	+	-	-	-	+	+	-		
<i>Dipodascus ovetensis</i>	+	-	-	-	-	-	-		
<i>Dipodascus spicifer</i>	+	-	-	-	-	-	-		
<i>Dipodascus tetrasperma</i>	+	-	-	-	-	+	-		

<i>Eremothecium ashbyi</i>	+	-	-	-	-	v	-		
<i>Eremothecium coryli</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Eremothecium cymbalariae</i>	+	-	-	-	-	-	-		
<i>Eremothecium gossypii</i>	+	-	-	-	-	v	-		
<i>Eremothecium sinecaudum</i>	+	-	-	-	-	d	-	-	-
<i>Galactomyces citri-aurantii</i>	+	-	+	-	+	+	-		
<i>Galactomyces geotrichum</i>	+	-	v	-	v	+	-		
<i>Galactomyces reessii</i>	+	-	-	-	-	+	-		
<i>Geotrichum clovatum</i>	+	-	-	-	-	-	-		
<i>Geotrichum fermentans</i>	+	-	v	-	+	+	-		
<i>Geotrichum fragrans</i>	+	-	-	-	v	v	-		
<i>Geotrichum klebahnii</i>	+	-	v	-	+	+	-		
<i>Hanseniaspora guilliermondii</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Hanseniaspora occidentalis</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Hanseniaspora osmophila</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	-	-	-	-	-	v	-	-	-
<i>Hanseniaspora valbyensis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Hanseniaspora vineae</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Issatchenkia occidentalis</i>	+/w	-	-	-	-	-	-		
<i>Issatchenkia orientalis</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Issatchenkia scutulata</i> var. <i>exigua</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Issatchenkia scutulata</i> var. <i>scutulata</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Issatchenkia terricola</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Kloeckera lindneri</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Kluyveromyces aestuarii</i>	+	-	-	-	+	+	-	-	-,d,w
<i>Kluyveromyces africanus</i>	w/-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Kluyveromyces bacillisporus</i>	w	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Kluyveromyces blattae</i>	w/-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Kluyveromyces delphensis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Kluyveromyces dobzhanskii</i>	v	-	v	-	s	+	-	-	d
<i>Kluyveromyces lactis</i> var. <i>drosophilae</i>	+	-	d	+	+	-	-	-	+
<i>Kluyveromyces lactis</i> var. <i>lactis</i>	+	-	-	-	+	+	-	-	+
<i>Kluyveromyces lodderae</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	s	-	s	-	v	v	-	-	+
<i>Kluyveromyces phaffii</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Kluyveromyces polysporus</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Kluyveromyces thermotolerans</i>	v	-	v	-	+	v	-	-	+
<i>Kluyveromyces waltii</i>	-	-	s	-	+	+	-	-	+
<i>Kluyveromyces wickerhamii</i>	v	-	-	-	-	ws	-	-	+
<i>Kluyveromyces yarrowii</i>	v	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. kononenkoae</i> ssp. <i>spencer-martinsiae</i>	+	-	-	-	+	+	-	-	+
<i>Lipomyces japonicus</i>	+	-	+	-	+	+	-	+	+
<i>Lipomyces kononenkoae</i>	v	-	-	v	+	+	-		
<i>Lipomyces lipofer</i>	v	+	v	v	+	+	-	+	+
<i>Lipomyces starkeyi</i>	v	v	v	v	v	v	v	+	+

<i>Lipomyces tetrasporus</i>	v	+	+	v	+	+	v	+	+
<i>Lodderomyces elongisporus</i>	+	-	+	-	+	+	-	-	d
<i>M. bicuspidata</i> var. <i>bicuspidata</i>	-	-	-	-	+	+	-	-	+
<i>M. bicuspidata</i> var. <i>californica</i>	+	-	+	-	+	+	-	-	+,d,w
<i>M. bicuspidata</i> var. <i>chathmia</i>	+,d,w	-	d	-	+	+	-	-	d
<i>Metschnikowia agaves</i>	-	-	s	-	+	+	-	-	-
<i>Metschnikowia australis</i>	+	-	-	-	+	+	-	-	+
<i>Metschnikowia gruessii</i>	+	-	-	-	w	-	-	-	+
<i>Metschnikowia hawaiiensis</i>	+	-	w	-	+	+	-	-	+
<i>Metschnikowia krissii</i>	+	-	-	-	+	-	-	-	-
<i>Metschnikowia lunata</i>	s	-	w	-	+	+	-	-	+,d,w
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	+	-	v	-	+	+	-	-	+
<i>Metschnikowia reukaufii</i>	+	-	d	-	+	+	-	-	+
<i>Metschnikowia zobellii</i>	+	-	+	-	+	+	-	-	-
<i>Myxozyma geophila</i>	+	-	+	+	s	+	+	+	+
<i>Myxozyma kluyveri</i>	+	-	+	-	+	+	v	+	+
<i>Myxozyma lipomycoides</i>	+	-	s	-	-	s	-	+	+
<i>Myxozyma melibiosi</i>	+	-	+	-	w/-	s	+	+	+
<i>Myxozyma monticola</i>	+	+	+	-	s	+	+	+	+
<i>Myxozyma mucilagina</i>	+	-	+	-	s	+	-	+	+
<i>Myxozyma udenii</i>	+	-	s	-	s	s	+	d	d
<i>Myxozyma vanderwaltii</i>	+	-	+	-	-	+	-	+	+
<i>Nadsonia commutata</i>	+	-	-	-	-	v	-	-	-
<i>Nadsonia fulvescens</i> var. <i>elongata</i>	+	-	-	-	-	d	-	-	-
<i>Nadsonia fulvescens</i> var. <i>fulvescens</i>	+	-	+	-	+	+	-	-	-
<i>Oosporidium margaritifera</i>	-	-	-	-	v	v	-	-	-
<i>Pachysolen tannophilus</i>	+	-	+	-	+	+	-	-	-
<i>Pichia acaciae</i>	+	+	+	-	+	+	-	d	-
<i>Pichia alni</i>	+	-	v	-	+	+	-	-	d
<i>Pichia americana</i>	+	-	-	-	+	+	-	-	+
<i>Pichia amethionina</i> var. <i>amethionina</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	d
<i>Pichia amethionina</i> var. <i>pachycereana</i>	+	-	-	-	+	-	-	-	-
<i>Pichia amylophila</i>	+	-	-	-	+	+	-	-	d
<i>Pichia angophorae</i>	-	-	+	-	+	+	-	+	+
<i>Pichia angusta</i>	+	+	+	v	+	+	-	+	+
<i>Pichia anomala</i>	+	+	v	-	+	+	-	-	d
<i>Pichia antillensis</i>	+	-	-	-	s	-	-	-	-
<i>Pichia barkeri</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pichia besseyi</i>	-	-	-	-	+	+	-	-	-
<i>Pichia bimundalis</i>	+	-	-	-	+	+	-	-	+,d,w
<i>Pichia bispora</i>	+	-	v	-	v	+/w	-	d	+
<i>Pichia bovis</i>	+	-	-	-	+	+	-	-,d,w	+
<i>Pichia burtonii</i>	+	+	+	-	+	+	-	+	+
<i>Pichia cactophila</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pichia canadensis</i>	+	-	v	-	+/w	+	-	-	+

<i>Pichia capsulata</i>	+	+	+	-	+	+	-		+
<i>Pichia caribaea</i>	+	-	-	-	+	-	-	-	d
<i>Pichia castillae</i>	+	+	+	+	+	+	-	+	+
<i>Pichia chambardii</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pichia ciferrii</i>	+	+	+	-	+	+	-	d	+
<i>Pichia delftensis</i>	-	-	+	-	+	+	-	-	-
<i>Pichia deserticola</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pichia dryadoides</i>	+	-	-	-	+	+	-	-	-,d,w
<i>Pichia euphorbiae</i>	+	-	-	-	+	+	-	+	+
<i>Pichia euphorbiiphila</i>	+	-	-	-	+	+	-	-	d
<i>Pichia fabianii</i>	+	-	-	-	+	+	-	-	+
<i>Pichia farinosa</i>	+	+	+	-	+	+	-	-	d
<i>Pichia fermentans</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pichia finlandica</i>	+	+	+	-	+	+	-	+,d,w	+
<i>Pichia fluxuum</i>	v	-	v	-	+	+	-	-	-
<i>Pichia galeiformis</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pichia glucozyma</i>	+	+	+	-	+	+	-	+	+
<i>Pichia guilliermondii</i>	+	-	+	v	+	+	-	+	+
<i>Pichia hampshirensis</i>	+	-	+/w	-	v	+	-	-	+
<i>Pichia haplophila</i>	+	+	+	+	+	+	-	+	+
<i>Pichia heedii</i>	s	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pichia heimii</i>	+	+	+	+	+	+	-	+	+
<i>Pichia henricii</i>	+	+	+	-	+	+	-		
<i>Pichia holstii</i>	+	v	+	v	+	+	-	+	+
<i>Pichia inositovora</i>	+	-	s	-	+	+	+	-	-
<i>Pichia jadinii</i>	+	-	-	-	+	+	-	-	-,d,w
<i>Pichia japonica</i>	+	-	v	-	+	+	-	+,d,w	d
<i>Pichia kluyveri</i> var. <i>cephalocereana</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pichia kluyveri</i> var. <i>eremophila</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pichia kluyveri</i> var. <i>kluyveri</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pichia kodamae</i>	+	+	+	-	+	+	-	+	+
<i>Pichia lynferdii</i>	+	+	+	-	+	+	-	-	-
<i>Pichia media</i>	+	+	+	v	+	+	-	d	-,d,w
<i>Pichia membranifaciens</i>	v	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pichia methanolica</i>	+	+	+	+	+	+	-	+	+
<i>Pichia methylivora</i>	+	+	+	-	+	+	-	+	+
<i>Pichia mexicana</i>	+	+	+	v	+	+	-	+	+
<i>Pichia meyeræ</i>	+	-	-	-	v	v	-	-	+
<i>Pichia minuta</i> var. <i>minuta</i>	w	-	+	-	+	+	-	-	+
<i>Pichia mississippiensis</i>	+	-	-	-	+	+	-	-	+
<i>Pichia naganishii</i>	+	+	+	-	+	+	-	+	+
<i>Pichia nakasei</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pichia nakazawae</i> var. <i>akitaensis</i>	+	+	+	-	+	+	-	+	+
<i>Pichia nakazawae</i> var. <i>nakazawae</i>	+	+	+	-	+	+	-	d	+
<i>Pichia norvegensis</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-

<i>Pichia ofunaensis</i>	+	v	+	+	+	+	s	-	+
<i>Pichia ohmeri</i>	+	-	v	-	+	+	-	-	-
<i>Pichia onychis</i>	+	-	-	-	+	+	-	-	-,d,w
<i>Pichia opuntiae</i>	+	-	-	-	s	-	-	-	-
<i>Pichia pastoris</i>	+	-	-	-	+	+	-	-	-
<i>Pichia petersonii</i>	+	-	-	-	+	+	-	-	-
<i>Pichia philodendri</i>	+	+	s	-	+	+	-	-	-
<i>Pichia philogaea</i>	+	+	+	-	+	+	-	+	+
<i>Pichia pijperi</i>	+	-	-	-	+	+	-	-	+
<i>Pichia pini</i>	v	+	+	-	+	+	-	-	w
<i>Pichia populi</i>	+	-	-	-	+	+	-	-	-
<i>Pichia pseudocactophila</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pichia quercuum</i>	+	-	-	-	+	+	-	-	d
<i>Pichia rabaulensis</i>	+	-	+	-	+	+	-	d	+
<i>Pichia rhodanensis</i>	+	-	-	-	+	+	-	-	+
<i>Pichia salicaria</i>	+	-	-	-	+	+	-	-	-
<i>Pichia scolyti</i>	+	+	+	-	+	+	-	+	+
<i>Pichia segobiensis</i>	+	-	+	-	+	+	-	-	+
<i>Pichia silvicola</i>	+	v	+	-	v	+	-	d	+
<i>Pichia spartinae</i>	s	-	+	-	+	+	-	-	+
<i>Pichia strasburgensis</i>	+	-	+	-	+	+	-	+	+
<i>Pichia subpelliculosa</i>	+	+	v	-	+	+	-	+	+
<i>Pichia sydowiorum</i>	+	+	+	-	+	+	-	+	d
<i>Pichia tannicola</i>	+	w/-	+	s	s	+	v	-	-
<i>Pichia thermotolerans</i>	+	-	-	-	+	v	-	-	-
<i>Pichia toletana</i>	+	-	-	-	+	+	-	-	-
<i>Pichia trehalophila</i>	+	+	+	-	+	+	-	+	+
<i>Pichia triangularis</i>	+	+	+	w	+	+	-		
<i>Pichia veronae</i>	+	-	-	-	+	+	-	-	d
<i>Pichia wickerhamii</i>	+	-	+	-	+	+	-	-	+,d,w
<i>Pichia xylosa</i>	+	-	-	-	+	+	-	-	+
<i>Protomyces gravidus</i>	+	-	-	-	s	s	-		
<i>Protomyces inouyei</i>	s	-	s	w/-	s	s	-		
<i>Protomyces inundatus</i>	+	-	d	-	+	+	-		
<i>Protomyces lactucaedebilis</i>	+	-	s	s	+	+	-		
<i>Protomyces macrosporus</i>	+	-	-	-	+	-	-		
<i>Protomyces pachydermus</i>	+	-	v	v	+	+	-		
<i>Saccharomyces barnettii</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Saccharomyces bayanus</i>	v	-	-	-	v	-	-	-	-
<i>Saccharomyces castellii</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Saccharomyces dairenensis</i>	v	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Saccharomyces exiguus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Saccharomyces kluyveri</i>	v	-	-	-	+	+	-	-	+
<i>Saccharomyces paradoxus</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	-

<i>Saccharomyces pastorianus</i>	v	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Saccharomyces rosinii</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Saccharomyces servazzii</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Saccharomyces spencerorum</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Saccharomyces transvaalensis</i>	v	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Saccharomyces unisporus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Saccharomyces ludwigii</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Saccharomycopsis capsularis</i>	+	+	+w	-	+	+	-	d	d
<i>Saccharomycopsis crataegensis</i>	+	-	v	-	+	+	-	-	d
<i>Saccharomycopsis fermentans</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Saccharomycopsis fibuligera</i>	+	v	v	-	v	v	+w		
<i>Saccharomycopsis javanensis</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Saccharomycopsis malanga</i>	+	v	+	-	+	+	-	-	d
<i>Saccharomycopsis schoenii</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	d
<i>Saccharomycopsis selenospora</i>	v	-	s	-	-	-	-	+	+
<i>Saccharomycopsis synnaedendra</i>	+	+	+	-	+	+	+	-	d
<i>Saccharomycopsis vini</i>	+	-	v	-	v	+	-	-	d
<i>Saitoella complicata</i>	+	-	+	-	+	+	-		
<i>Saturnispora ahearnii</i>	-	-	-	-	+	+	-	-	-
<i>Saturnispora dispersa</i>	-	-	+	-	+	+	-	-	-
<i>Saturnispora saitoi</i>	-	-	v	-	+	+	-	-	-
<i>Saturnispora zaruensis</i>	-	-	+	-	+	+	-	-	-
<i>Scheffersomyces stipitis</i>	+	+	+	-	+	+	-	d	+
<i>Schizoblastosporion starkeyi-henricii</i>	v	-	v	-	v	+	-	-	-
<i>Schizosaccharomyces japonicus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Schizosaccharomyces octosporus</i>	v	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Sporopachydermia cereana</i>	+	+	+	-	+	+	+	-	+
<i>Sporopachydermia lactativora</i>	+	-	+	-	v	v	+	d	+
<i>Sporopachydermia quercuum</i>	+	-	-	-	-	-	+	-d,w	+
<i>Stephanoascus ciferrii</i>	+	+	+	+	+	+	+		
<i>Stephanoascus farinosus</i>	+	v	+	v	+	+	-		
<i>Stephanoascus smithiae</i>	+	+	+	+	+	+	+		
<i>Sympodiomyces parvus</i>	+	+	+	-	s	s	s	+	+
<i>Torulasporea delbrueckii</i>	v	-	v	-	+	v	-	-	-
<i>Torulasporea globosa</i>	v	-	-	-	+	-	-	-	-
<i>Torulasporea pretoriensis</i>	v	-	-	-	+	v	-	-	d
<i>Trigonopsis variabilis</i>	+	-	-	-	s	s	-	-	+
<i>Wickerhamia fluorescens</i>	+	-	+	-	+	+	-	-	-
<i>Wickerhamiella domercqiae</i>	s	-	-	-	s	s	-	-	+
<i>Williopsis californica</i>	+	-	-	-	+	v	-	-	d
<i>Williopsis mucosa</i>	+	-	-	-	+w	+	-	-	+
<i>Williopsis pratensis</i>	+	-	-	-	+	+	-	-	+
<i>Williopsis salicorniae</i>	+	s	+	-	+	+	-	+	+
<i>Williopsis saturnus var. mrakii</i>	+	-	-	-	d	+	-	-	-

<i>Williopsis saturnus</i> var. <i>sargentensis</i>	+	-	-	-	d	d	-	-	d
<i>Williopsis saturnus</i> var. <i>saturnus</i>	+	-	-	-	+	+	-	-	+
<i>Williopsis saturnus</i> var. <i>suaveolens</i>	+	-	-	-	d	+ ,d,w	-	-	+
<i>Williopsis saturnus</i> var. <i>subsufficiens</i>	+	-	-	-	d	d	-	-	d
<i>Yarrowia lipolytica</i>	+	+	v	-	+	+	-	-	-
<i>Zygoascus hellenicus</i>	+	-	+	v	+	+	+	+ ,d,w	+
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	+ /w	-	v	-	+	+	-	-	-
<i>Zygosaccharomyces bisporus</i>	+	-	v	-	s	s	-	-	+
<i>Zygosaccharomyces cidri</i>	+	-	-	-	+	+	-	-	+
<i>Zygosaccharomyces fermentati</i>	v	-	-	-	+	+	-	-	+
<i>Zygosaccharomyces florentinus</i>	v	-	-	-	+	+	-	-	d
<i>Zygosaccharomyces mellis</i>	+	-	-	-	s	s	-	-	-
<i>Zygosaccharomyces microellipsoides</i>	v	-	-	-	+	v	-	-	d
<i>Zygosaccharomyces mrakii</i>	s	-	-	-	+	+	-	-	+
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	+ /w	-	v	-	+ /w	+	-	-	-
<i>Zygozoma arxii</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Zygozoma oligophaga</i>	+	-	-	+	-	+	v	-	d
<i>Zygozoma smithiae</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Zygozoma suomiensis</i>	+	-	+	-	s	+	-	+	+

Tabela 27 – Assimilação de polióis pelas leveduras do Filo Basidiomiceta.

(Abreviaturas: Gli – Glicerol; Eri – Eritritol; Rib – Ribitol; Gal – Galactitol; Man – D-Manitol; Glu – D-Glucitol; Ino – Mio-inositol; Ara –L-Arabitól e Xil –Xilitol) [Kurtzman and Fell, 1998; Kreger-van Rij, 1984.

Assimilação: (+) positiva; (-) negativa; (w) fraca; (v) variável; (s) lenta e (d) retardada.

Nome	Gli	Eri	Rib	Gal	Man	Glu	Ino	Ara	Xil
<i>Agaricostilbum hyphaenes</i>	+	+	+	-	+	+	-	+	+
<i>Bensingtonia ciliata</i>	+	-	+	-	+	+	-	-	-
<i>Bensingtonia ingoldii</i>	+	+	+	-	+	+	-	d	+
<i>Bensingtonia intermedia</i>	+	-	+	-	+	+	-	-	d
<i>Bensingtonia miscanthi</i>	+	-	+	-	+	+	-	-	d
<i>Bensingtonia naganoensis</i>	+	-	+	-	+	+	-	-	d
<i>Bensingtonia phyllada</i>	+	-	+	-	+	+	-	-	d
<i>Bensingtonia subrosea</i>	+	-	+	-	+	+	-	-	+,d,w
<i>Bensingtonia yamatoana</i>	+	-	w	-	+	+	-	-	-,d,w
<i>Bensingtonia yuccicola</i>	+	-	+	-	+	+	-	-	+
<i>Bullera armeniaca</i>	+	-	+	+	+	+	+	+	+
<i>Bullera crócea</i>	v	-	+	+	+	+	-	d	+
<i>Bullera dendrophila</i>	+	-	+	+	+	+	s	+	+
<i>Bullera globispora</i>	+	-	+	+	+	+	+	+	+
<i>Bullera megalospora</i>	+	-	+	-	+	+	-	-	d
<i>Bullera miyagiana</i>	-	+	+	-	+	+	+	d	+
<i>Bullera oryzae</i>	-	+	d	+	+	+	+	-	d
<i>Bullera pseudoalba</i>	+	-	+	+	+	+	+	+	+
<i>Bullera punicae</i>	+	-	+	v	+	+	v	d	+
<i>Bullera pyricola</i>	+	-	+	+	+	+	+	-	d
<i>Bullera sinensis</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Bullera variabilis</i>	-/d	v	v	+	+	+	+	-	+
<i>Bulleromyces albus</i>	+	v	v	v	+	+	+		
<i>Chionosphaera apobasidialis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	d
<i>Cryptococcus aerius</i>	s	-	s	+	+	+	+	w	+
<i>Cryptococcus albidosimilis</i>	-	-	-	-	+	+	+	-	w/-
<i>Cryptococcus albidus</i>	v	v	v	v	+	+	+	-	+
<i>Cryptococcus amylolentus</i>	+	+	+	v	+	+	+		
<i>Cryptococcus antarcticus</i>	-	-	-	-	v	+	+	-	-
<i>Cryptococcus aquaticus</i>	v	-	+	-	+	+	-		
<i>Cryptococcus ater</i>	-	-	-	-	+	+	+	-	+
<i>Cryptococcus bhutanensis</i>	-	-	-	-	+	+	-	d	d
<i>Cryptococcus consortionis</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	-
<i>Cryptococcus curvatus</i>	+	+/w	+/w	-	v	v	+/w	w	w
<i>Cryptococcus dimennae</i>	v	-	+	s	+	+	+	+	+
<i>Cryptococcus feraegula</i>	s	-	-	-	+	+	+	-	-
<i>Cryptococcus flavus</i>	-	+	w	w	+	+	+	+	+
<i>Cryptococcus friedmannii</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Cryptococcus fuscescens</i>	-	-	-	-	+	-	+	-	-
<i>Cryptococcus gastricus</i>	v	-	-	-	s	v	+	-	d
<i>Cryptococcus gilvescens</i>	s	-	-	-	s	s	+	-	-

<i>Cryptococcus heveanensis</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Cryptococcus huempfi</i>	-	-	s	s	+	+	-	-	d
<i>Cryptococcus humicolus</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Cryptococcus hungaricus</i>	-	-	v	+	+	+	+	+	+
<i>Cryptococcus kuetzingii</i>	v	-	w	-	+	+	+	-,d,w	+,d,w
<i>Cryptococcus laurentii</i>	v	v	+	+	+	+	+	+	+
<i>Cryptococcus luteolus</i>	v	+	v	+	+	+/w	+	-	+,d,w
<i>Cryptococcus macerans</i>	v	+	-	-	+	+	+	-	-
<i>Cryptococcus magnus</i>	v	-	-	w	+	+	+	-	+
<i>Cryptococcus marinus</i>	+	+	+	-	+	+	+	d	+
<i>Cryptococcus podzolicus</i>	-	-	-	+	s	+	+	-	+
<i>Cryptococcus skinneri</i>	v	w/-	+	+	v	+	+	d	d
<i>Cryptococcus terreus</i>	-	-	v	v	+	+	+	d	+,d,w
<i>Cryptococcus vishniacii</i>	-	-	-	-	v	-	-	-	-
<i>Cryptococcus yarrowii</i>	+	-	-	s	+	+	+	-	-
<i>Cystofilobasidium bisporidii</i>	v	-	v	v	+	+	+	d	+
<i>Cystofilobasidium capitatum</i>	+	-	-	+	+	+	+	+	+
<i>Cystofilobasidium infirmominiatum</i>	v	-	v	+	+	+	+	-	+
<i>Cystofilobasidium lari-marini</i>	+	-	-	+	+	+	+	+	+
<i>Erythrobasidium hasegawianum</i>	+	-	+	-	+	+	-	-	+
<i>Fellomyces fuzhouensis</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	d
<i>Fellomyces horovitziae</i>	-	-	-	-	-	+	-	-	s
<i>Fellomyces penicillatus</i>	w	+	+	s	+	+	+	+	+
<i>Fellomyces polyborus</i>	s	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Fibulobasidium inconspicuum</i>	d	s	+	+	+	+	+		
<i>Filobasidiella neoformans</i>	-	-	v	+	+	+	+		
<i>Filobasidium capsuligenum</i>	+/w	-	+	v	+	+/w	+	+	+
<i>Filobasidium elegans</i>	-	-	-	-	s	v	-		
<i>Filobasidium floriforme</i>	v	-	+/s	v	s	+	+	d	+
<i>Filobasidium globisporum</i>	-	-	-	-	-	-	s		
<i>Filobasidium uniguttulatum</i>	w	-	v	-	s	+/w	+	-	d
<i>Holtermannia corniformis</i>	v	-	+	s	+	+	+		
<i>Hyalodendron lignicola</i>	+	+	+	-	+	+	w/-		
<i>Itersonilia perplexans</i>	v	-	v	-	+	v	v		
<i>Kockovaella thailandica</i>	w/-	-	w/-	-	+	+	-/d	-,d,w	d
<i>Kockovaella imperatae</i>	-	-	w/-	+/d	+	+/w	w	d	+
<i>Kurtzmanomyces nectairei</i>	-	-	w	-	+	+	-	-	-
<i>Kurtzmanomyces tardus</i>	-	-	-	-	+	+	-	-	-
<i>Leucosporidium antarcticum</i>	+/w	-	-	-	v	-	-	-	d
<i>Leucosporidium fellii</i>	+	-	+	-	+	+	-	-	-
<i>Leucosporidium scottii</i>	+	-	v	v	+	+	-	d	+
<i>Moniliella acetoabutens</i>	+	+	v	-	+	+	-		
<i>Moniliella mellis</i>		w	-	-	+	+	-		
<i>Moniliella pollinis</i>	+	+	-	-	+		-		
<i>Moniliella suaveolens</i>	+	+	v	-	+	v	-		

<i>Mrakia frigida</i>	v	-	+	v	+	+	w/-	-	d
<i>Pseudozyma antarctica</i>	+	+	s	-	+	+	+		
<i>Pseudozyma aphidis</i>	s	+	s	-	+	+	+		
<i>Pseudozyma flcculosa</i>	s	+	s	-	+	+	+		
<i>Pseudozyma fusiformata</i>	s	s	s	-	+	+	+		
<i>Pseudozyma profilica</i>	+	+	s	-	+	+	+		
<i>Pseudozyma rugulosa</i>	+	s	s	-	+	+	+		
<i>Pseudozyma tsukubaënsis</i>	+	+	-	-	-	-	+		
<i>Reniforma strues</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	-
<i>Rhodospodium babjevae</i>	+	-	w/-	-	+	+	-	-	w
<i>Rhodospodium dacryoideum</i>	+	-	-	-	v	+/w	-	-	-,d,w
<i>Rhodospodium diobovatum</i>	+	-	+	v	v	+	-	+	+
<i>Rhodospodium fluviale</i>	+	-	+	+	+	+	-	d	d
<i>Rhodospodium kratochvilovae</i>	+	-	+	-	+	+	-	-	-
<i>Rhodospodium lusitaniae</i>	+	-	+	+	+	+	-	+	+
<i>Rhodospodium malvinellum</i>	+	-	v	v	+	v	-	-	d
<i>Rhodospodium paludigenum</i>	+	-	+	+	+	+	-	+	+
<i>Rhodospodium sphaerocarpum</i>	+	-	+	-	v	v	-	+	+
<i>Rhodospodium toruloides</i>	+	-	+	-	+	+	-	+	+
<i>Rhodotorula acheniorum</i>	+	+	w	-	+	+	-	d	+
<i>Rhodotorula acuta</i>	+	+	+	-	+	+	-	+	+
<i>Rhodotorula araucariae</i>	+	-	+	-	+	+	-	-	-
<i>Rhodotorula armeniaca</i>	+	-	w/-	w/-	+	s	-	-	+,d,w
<i>Rhodotorula aurantiaca</i>	s	-	v	v	+	+	-	-	+,d,w
<i>Rhodotorula auriculariae</i>	-	-	-	-	+	s	-	-	-
<i>Rhodotorula bacarum</i>	+	+	s	-	s	+	-	+,d,w	d
<i>Rhodotorula bogoriensis</i>	s	-	+	-	+	+	-	+	+
<i>Rhodotorula buffonii</i>	s	-	+	-	+	+	-		
<i>Rhodotorula diffluens</i>	s	+	+	-	+	+	-	d	-
<i>Rhodotorula ferulica</i>	+	+	-	-	v	v	-	-	+,d,w
<i>Rhodotorula foliorum</i>	s	-	v	-	+	+	-	+	+
<i>Rhodotorula fragaria</i>	v	-	v	-	+	+	-	d	d
<i>Rhodotorula fujisanensis</i>	+	-	+	+	+	+	-	+	+
<i>Rhodotorula futronensis</i>	s	-	+	+	+	+	-	d	+
<i>Rhodotorula glutinis</i>	v	-	v	v	v	v	-		
<i>Rhodotorula glutinis var. dairenensis</i>	+	-	+	-	+	+	-	+	+
<i>Rhodotorula glutinis var. glutinis</i>	+	-	+,d,w	-	+	+	-	-	+
<i>Rhodotorula graminis</i>	v	-	v	v	v	v	-	-	+
<i>Rhodotorula hinnulea</i>	+	+	-	-	+	+	+	d	-
<i>Rhodotorula hordea</i>	+	+	+	-	+	+	-	-	-
<i>Rhodotorula hylophila</i>	+	-	-	-	s	s	-	-	-
<i>Rhodotorula ingeniosa</i>	+	-	-	-	+	+	-	-	-,d,w
<i>Rhodotorula javanica</i>	+	-	+	+	+	+	-	+	+
<i>Rhodotorula lactosa</i>	+	-	s	-	+	+	-	-	+
<i>Rhodotorula lignophila</i>	+	-	-	-	+	+	-	-	d

<i>Rhodotorula marina</i>	+	-	WS	+	+	+	-	d	+
<i>Rhodotorula minuta</i>	+	-	v	-	v	v	-	-,d,w	-
<i>Rhodotorula mucilaginoso</i>	+	-	v	v	v	v	-	+	+
<i>Rhodotorula muscorum</i>	+	-	s	s	+	+	-	d	d
<i>Rhodotorula nothofagi</i>	s	-	+	+	+	+	-	+	+
<i>Rhodotorula philyla</i>	-	-	s	-	+	+	-	-	d
<i>Rhodotorula phylloplana</i>	+	+	-	-	+	+	s	d	-
<i>Rhodotorula pilati</i>	+	-	-	-	+	-	-	-	d
<i>Rhodotorula pustula</i>	s	-	+	-	+	+	-	+	+
<i>Rhodotorula sonckii</i>	s	-	-	-	+	+	-	-	-
<i>Sirobasidium intermedium</i>	d	s	+	s	+	+	+		
<i>Sirobasidium magnum</i>	s	s	+	d	+	+	+		
<i>Sporidiobolus johnsonii</i>	+	-	s	-	+	+	-	-	d
<i>Sporidiobolus pararoseus</i>	s	-	v	-	+	v	-	-	d
<i>Sporidiobolus ruineniae</i>	s	-	+	+	+	+	-	+	+
<i>Sporidiobolus salmonicolor</i>	v	-	+	-	+	+	-	-	d
<i>Sporobolomyces alborubescens</i>	+	-	+	-	+	+	-	+	+
<i>Sporobolomyces elongatus</i>	+	-	-	-	+	+	-	-	d
<i>Sporobolomyces falcatus</i>	+	-	-	-	+	+	-		
<i>Sporobolomyces foliicola</i>	+	-	+	-	+	+	-	d	+
<i>Sporobolomyces gracilis</i>	+	-	+	-	+	v	-	-	+
<i>Sporobolomyces griseoflavus</i>	+	-	+	-	+	+	-		
<i>Sporobolomyces inositophilus</i>	+	-	+	-	+	+	+		
<i>Sporobolomyces kluyveri-niellii</i>	+	-	+	+	+	+	-	-	+
<i>Sporobolomyces lactophilus</i>	+	v	+	-	+	v	-		
<i>Sporobolomyces oryzicola</i>	+	-	+	-	+	+	-		
<i>Sporobolomyces phyllomatis</i>	+	-	+	+	+	+	-	-	+
<i>Sporobolomyces roseus</i>	v	-	v	v	+	v	-	-	-
<i>Sporobolomyces ruber</i>	+	-	+	-	+	+	-		
<i>Sporobolomyces salicinus</i>	+	-	+	+	+	+	-		
<i>Sporobolomyces sasicola</i>	-	-	+	-	+	+	-		
<i>Sporobolomyces singularis</i>	+	-	+	-	+	+	-	-	d
<i>Sporobolomyces subbrunneus</i>	+	-	+	-	+	+	-		
<i>Sporobolomyces tsugae</i>	+	-	v	-	+	+	-	-	d
<i>Sporobolomyces xanthus</i>	-	-	+	-	+	+	-		
<i>Sterigmatomyces elviae</i>	+	+	+	+	+	+	-	+	+
<i>Sterigmatomyces halophilus</i>	+	+	+	w/-	+	+	-	d	d
<i>Sterigmatosporidium polymorphum</i>	w	s	s	+	+	+	+	d	d
<i>Sympodiomyces paphiopedili</i>	+	+	-	-	+	+	+	+	d
<i>Tilletiaria anomala</i>	+	-	-	-	+	-	-		
<i>Tilletiopsis albescens</i>	+	+	+	-	+	+	+		
<i>Tilletiopsis flava</i>	+	-	+	-	+	+	-		
<i>Tilletiopsis fulvescens</i>	+	+	+	-	+	+	-		
<i>Tilletiopsis minor</i>	+	v	+	-	+	+	-		
<i>Tilletiopsis pallescens</i>	v	+	+	-	+	+	v		

<i>Tilletiopsis washingtonensis</i>	+	+	v	-	+	+	-		
<i>Tremella aurantia</i>	s	-	+	v	+	+	+		
<i>Tremella brasiliensis</i>	-	d	+	-	+	+	-		
<i>Tremella cinnabarina</i>	+	+	+	+	+	+	-		
<i>Tremella coalescens</i>	-	-	s	-	+	+	-		
<i>Tremella encephala</i>	d	-	+	s	+	+	+		
<i>Tremella foliácea</i>	+	v	+	v	+	+	+		
<i>Tremella fuciformis</i>	+	+	+	+	+	+	-		
<i>Tremella globispora</i>	+	s	+	+	+	+	-		
<i>Tremella indecorata</i>	v	-	+	d	+	+	+		
<i>Tremella mesentérica</i>	-	d	+	-	+	+	-		
<i>Tremella moriformis</i>	s	-	s	s	+	+	w		
<i>Trichosporon aquatile</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>Trichosporon asahii</i>	v	+	v	-	v	v	v	+	v
<i>Trichosporon asteroides</i>	+	+	v	-	v	v	+	+	+
<i>Trichosporon brassicae</i>	-	-	-	-	+	+	+	-	-
<i>Trichosporon coremiiforme</i>	v	+	-	v	+	v	+	+	+
<i>Trichosporon cutaneum</i>	+	+	+	-	+	+	+	+	+
<i>Trichosporon dulcitum</i>	+	-	-	v	+	+	+	-	+
<i>Trichosporon faecale</i>	+	+	+	v	+	+	+	+	+
<i>Trichosporon gracile</i>	+	-	v	-	+	v	+	-	v
<i>Trichosporon inkin</i>	v	+	-	-	v	-	+	-	-
<i>Trichosporon jirovecii</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Trichosporon laibachii</i>	+	-	v	+	v	v	+	v	v
<i>Trichosporon loubieri</i>	+	-	+	-	+	+	+	+	v
<i>Trichosporon moniliforme</i>	+	+	+	-	+	+	+	+	+
<i>Trichosporon montevideense</i>	+	-	+	+	+	+	+	v	+
<i>Trichosporon mucoides</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Trichosporon ovooides</i>	v	+	-	-	+	v	+	-	v
<i>Trichosporon pullulans</i>	v	+	+	-	+	+	+	-	+
<i>Trichosporon sporotrichoides</i>	+	-	-	-	+	+	+	+	-
<i>Trichosporonoides madida</i>	+	+	-	-	+	+	-		
<i>Trichosporonoides megachiliensis</i>	+	+	-	-	+	v	-		
<i>Trichosporonoides nigrescens</i>	+	+	-	-	+	+	-		
<i>Trichosporonoides oedocephalis</i>	+	+	-	-	+	+	-		
<i>Trichosporonoides spathulata</i>	+	+	-	-	+	+	-		
<i>Trimorphomyces papilionaceus</i>	v	v	+	v	+	+	v		
<i>Tsuchiyaea wingfieldii</i>	+	+	+	-	+	+	+	+	+
<i>Ustilago maydis</i>	+	+	s	+	+	-	+		
<i>Xanthophyllumycetes dendrorhous</i>	s	-	w/-	-	+	w/-	-	-	-

ANEXO V

6490-1	--GGCA-CAGAAGACAA-GAACTCGGAGTCGTAATAACGGATGTTTCGAACTATCTGAG	56
6490-53	-TGGCA-CAGAAGACAA-GAACTCGGAGTCGTAATAACGGATGTTTCGAACTATCTGAG	57
Dh6490	ATGGCAACAGAAAGACAAAGAACTCGGAGTCGTAATAACGGATGTTTCGAACTATCTGAG	60

6490-1	AAGATCGAAGAACAAAACAATATTATCTCCAAAGGAGGATCAGTTGATGATTATTTGTAT	116
6490-53	AAGATCGAAGAACAAAACAATATTATCTCCAAAGGAGGATCAGTTGATGATTATTTGTAT	117
Dh6490	AAGATCGAAGAACAAAACAATATTATCTCCAAAGGAGGATCAGTTGATGATTATTTGTAT	120

6490-1	GAGAAACGACCATGGTGGAAAGTAAATTAAGTACGTTTGAACCTTTTGTATATTTCTA	176
6490-53	GAGAAACGACCATGGTGGAAAGTAAATTAAGTACGTTTGAACCTTTTGTATATTTCTA	177
Dh6490	GAGAAACGACCATGGTGGAAAGTAAATTAAGTACGTTTGAACCTTTTGTATATTTCTA	180

6490-1	ATCACTCTTTCTTCTACTAATAATGGCTATGATGGTTCTATGTTGAACGGTTTGCAATCA	236
6490-53	ATCACTCTTTCTTCTACTAATAATGGCTATGATGGTTCTATGTTGAACGGTTTGCAATCA	237
Dh6490	ATCACTCTTTCTTCTACTAATAATGGCTATGATGGTTCTATGTTGAACGGTTTGCAATCA	240

6490-1	GTTCTGTATTGGCCAGAGAAGATGGGTAATCCACAAGGTAGTGTTTTAGGTGCATTATCT	296
6490-53	GTTCTGTATTGGCCAGAGAAGATGGGTAATCCACAAGGTAGTGTTTTAGGTGCATTATCT	297
Dh6490	GTTCTGTATTGGCCAGAGAAGATGGGTAATCCACAAGGTAGTGTTTTAGGTGCATTATCT	300

6490-1	AACGGAAATGTTTTCGGTGTGTGCTATCGTTTGTGTGTGCATCTTGGTTGGCTGATAAG	356
6490-53	AACGGAAATGTTTTCGGTGTGTGCTATCGTTTGTGTGTGCATCTTGGTTGGCTGATAAG	357
Dh6490	AACGGAAATGTTTTCGGTGTGTGCTATCGTTTGTGTGTGCATCTTGGTTGGCTGATAAG	360

6490-1	TTCGGCAGATGGCGGTGTATTTTTGTTGGACAGACTATTACTATCCTTGGTTCTATTTTA	416
6490-53	TTCGGCAGATGGCGGTGTATTTTTGTTGGACAGACTATTACTATCCTTGGTTCTATTTTA	417
Dh6490	TTCGGCAGATGGCGGTGTATTTTTGTTGGACAGACTATTACTATCCTTGGTTCTATTTTA	420

6490-1	CAAGGTGTTTTCAACAAATTACGGATTCTTCTTGGCTTCCCGCATCATTCTTGGTTTTGGA	476
6490-53	CAAGGTGTTTTCAACAAATTACGGATTCTTCTTGGCTTCCCGCATCATTCTTGGTTTTGGA	477
Dh6490	CAAGGTGTTTTCAACAAATTACGGATTCTTCTTGGCTTCCCGCATCATTCTTGGTTTTGGA	480

6490-1	GTTGGTATTGCAGGCGTTTTCTAGTCTTCAATTAATCTCTGAATTAGCATAATCCAACACAC	536
6490-53	GTTGGTATTGCAGGCGTTTTCTAGTCTTCAATTAATCTCTGAATTAGCATAATCCAACACAC	537
Dh6490	GTTGGTATTGCAGGCGTTTTCTAGTCTTCAATTAATCTCTGAATTAGCATAATCCAACACAC	540

6490-1	AGAGCCACAGCTACAACCTTCTACAATGTCTGTTGGTATTTAGGAGCAATAATTGCAGCT	596
6490-53	AGAGCCACAGCTACAACCTTCTACAATGTCTGTTGGTATTTAGGAGCAATAATTGCAGCT	597
Dh6490	AGAGCCACAGCTACAACCTTCTACAATGTCTGTTGGTATTTAGGAGCAATAATTGCAGCT	600

6490-1	TGGGTTACATACGGAACATTGAACATAGAAAACGATTATAGTTGGAGAATTCCATCTTAT	656
6490-53	TGGGTTACATACGGAACATTGAACATAGAAAACGATTATAGTTGGAGAATTCCATCTTAT	657
Dh6490	TGGGTTACATACGGAACATTGAACATAGAAAACGATTATAGTTGGAGAATTCCATCTTAT	660

6490-1	TTGCAAGCTGCCCTCCCATGCCTCCAAATGCATTCTTTTGGATGGTCCCTGAATCTCCT	716
6490-53	TTGCAAGCTGCCCTCCCATGCCTCCAAATGCATTCTTTTGGATGGTCCCTGAATCTCCT	717
Dh6490	TTGCAAGCTGCCCTCCCATGCCTCCAAATGCATTCTTTTGGATGGTCCCTGAATCTCCT	720

6490-1	CGTTACTTAATCAATAAAGATAGAATCTCTGATGCTGAAAAGGTCTTGAGAAAAGTTTCAC	776
6490-53	CGTTACTTAATCAATAAAGATAGAATCTCTGATGCTGAAAAGGTCTTGAGAAAAGTTTCAC	777
Dh6490	CGTTACTTAATCAATAAAGATAGAATCTCTGATGCTGAAAAGGTCTTGAGAAAAGTTTCAC	780

6490-1	GCAGGTGGTGAAACTCATGAAAGAGCAAATGATTTGGTTAGTTTGAATGAAGAGATT	836
6490-53	GCAGGTGGTGAAACTCATGAAAGAGCAAATGATTTGGTTAGTTTGAATGAAGAGATT	837
Dh6490	GCAGGTGGTGAAACTCATGAAAGAGCAAATGATTTGGTTAGTTTGAATGAAGAGATT	840

```

6490-1      CAAGCAGCGCTCGAGATAGAAAACTATCCTCTAACTCTAGATATTCTGATTTTATTACC 896
6490-53    CAAGCAGCGCTCGAGATAGAAAACTATCCTCTAACTCTAGATATTCTGATTTTATTACC 897
Dh6490     CAAGCAGCGCTCGAGATAGAAAACTATCCTCTAACTCTAGATATTCTGATTTTATTACC 900
*****

6490-1      ATGCCAACATTTAGAAAAAGATTATTTTTGGCAGTTTTTGTTCAGTTATTATGCAATTA 956
6490-53    ATGCCAACATTTAGAAAAAGATTATTTTTGGCAGTTTTTGTTCAGTTATTATGCAATTA 957
Dh6490     ATGCCAACATTTAGAAAAAGATTATTTTTGGCAGTTTTTGTTCAGTTATTATGCAATTA 960
*****

6490-1      TCTGGTAATGGATTGGTTTCTTATTATCTTAATAAAGTTTTGAATTCGATTGGAATTACT 1016
6490-53    TCTGGTAATGGATTGGTTTCTTATTATCTTAATAAAGTTTTGAATTCGATTGGAATTACT 1017
Dh6490     TCTGGTAATGGATTGGTTTCTTATTATCTTAATAAAGTTTTGAATTCGATTGGAATTACT 1020
*****

6490-1      GATCCTCATGAACAATTAATAAATTAATGGTTGTTTAAATGGTTTATAATCTTGCATCTCT 1076
6490-53    GATCCTCATGAACAATTAATAAATTAATGGTTGTTTAAATGGTTTATAATCTTGCATCTCT 1077
Dh6490     GATCCTCATGAACAATTAATAAATTAATGGTTGTTTAAATGGTTTATAATCTTGCATCTCT 1080
*****

6490-1      TCAGTTGTGCTTCTGTTGCTGGTAGATTCAAAGGAGAAGCATGTTTTTAATTTGCACA 1136
6490-53    TCAGTTGTGCTTCTGTTGCTGGTAGATTCAAAGGAGAAGCATGTTTTTAATTTGCACA 1137
Dh6490     TCAGTTGTGCTTCTGTTGCTGGTAGATTCAAAGGAGAAGCATGTTTTTAATTTGCACA 1140
*****

6490-1      ATATTGATGTTGGTTTTCTATGTGATTTGGACGATATTGTCTGCAATCAACCAACAACGT 1196
6490-53    ATATTGATGTTGGTTTTCTATGTGATTTGGACGATATTGTCTGCAATCAACCAACAACGT 1197
Dh6490     ATATTGATGTTGGTTTTCTATGTGATTTGGACGATATTGTCTGCAATCAACCAACAACGT 1200
*****

6490-1      AATTTCGAACAAAAATCATTAGGCAATGGCGTTATTGCCATGATTTTTTCTACTATTTG 1256
6490-53    AATTTCGAACAAAAATCATTAGGCAATGGCGTTATTGCCATGATTTTTTCTACTATTTG 1257
Dh6490     AATTTCGAACAAAAATCATTAGGCAATGGCGTTATTGCCATGATTTTTTCTACTATTTG 1260
*****

6490-1      GCTTATGATATTGGTGCTAATGGCCTACCGTTCTTGTACATTACCGAAATCATGCCTTAC 1316
6490-53    GCTTATGATATTGGTGCTAATGGCCTACCGTTCTTGTACATTACCGAAATCATGCCTTAC 1317
Dh6490     GCTTATGATATTGGTGCTAATGGCCTACCGTTCTTGTACATTACCGAAATCATGCCTTAC 1320
*****

6490-1      AGCCATAGAGCAAAGGTATGAATATTTTCACGGTGAGCCAAAACATTATTATATCTTC 1376
6490-53    AGCCATAGAGCAAAGGTATGAATATTTTCACGGTGAGCCAAAACATTATTATATCTTC 1377
Dh6490     AGCCATAGAGCAAAGGTATGAATATTTTCACGGTGAGCCAAAACATTATTATATCTTC 1380
*****

6490-1      AATGGCTTCGTCAATCCTATTGCCATGGATGCTATTGAATGGAAATACTATATTGTCTAT 1436
6490-53    AATGGCTTCGTCAATCCTATTGCCATGGATGCTATTGAATGGAAATACTATATTGTCTAT 1437
Dh6490     AATGGCTTCGTCAATCCTATTGCCATGGATGCTATTGAATGGAAATACTATATTGTCTAT 1440
*****

6490-1      TGCTGTATCCTTGCTGTGGAAGTTATTACCGTTTTATTACATTCGTCGAAACTTCTGCT 1496
6490-53    TGCTGTATCCTTGCTGTGGAAGTTATTACCGTTTTATTACATTCGTCGAAACTTCTGCT 1497
Dh6490     TGCTGTATCCTTGCTGTGGAAGTTATTACCGTTTTATTACATTCGTCGAAACTTCTGCT 1500
*****

6490-1      TACACCTTGGAAGAAGTAGCCAAAGTCTTTGGTGATGATCCAGGCCAAACATTGATCCAC 1556
6490-53    TACACCTTGGAAGAAGTAGCCAAAGTCTTTGGTGATGATCCAGGCCAAACATTGATCCAC 1557
Dh6490     TACACCTTGGAAGAAGTAGCCAAAGTCTTTGGTGATGATCCAGGCCAAACATTGATCCAC 1560
*****

6490-1      CTT----- 1559
6490-53    CTT----- 1560
Dh6490     CTTTCATCTGCACCCCAAAGCCTGAAGTTGGGCATATAGAAACTGTT 1608
***

```

Figura 24 – Alinhamento da sequência DEHA2G06490g de *D. hansenii* com o resultado da sequenciação do plasmídeo extraído de *E. coli* da colónia 6490-1 e 6490-53. O alinhamento das sequências foi efectuado recorrendo ao programa ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>).

```

Dh0902      ATGTCAAAGCTAATTCCTTCGCCCAAGATCTCAGAAGAGAAAATCGATCAAGAACTATCT 60
0902-94     -----AGAGAAACGCGATCAAGAACTATCT 25
              *****
Dh0902      CAACTTGTGGAAGAAAACCGCAGTTTTTCAACAAACAATCGAGCACAAAGTATACCAGGTAT 120
0902-94     TAACTTGTGGAAGAAAACCGCAGTTTTTCAACAAACAATCGAGCACAAAGTATACCAGGTAT 85
              *****
Dh0902      GAGGCTATTAGAGCGTACCCTAGGACATGCGTTTTATATTTTGATATTATTATGGGTTATG 180
0902-94     GAGGCTATTAGAGCGTACCCTAGGACATGCGTTTTATATTTTGATATTATTATGGGTTATG 145
              *****
Dh0902      ATATTAGTTGGTTATGAAACTCAGGCTGGTGGTATGGTAGTCTCTATTCCCTACATTTAGA 240
0902-94     ATATTAGTTGGTTATGAAACTCAGGCTGGTGGTATGGTAGTCTCTATTCCCTACATTTAGA 205
              *****
Dh0902      CGTGATTTTGGATATTATTTTGAAGGTGATTATGTTTTAGATGGTAAATGGCAATCAGCA 300
0902-94     CGTGATTTTGGATATTATTTTGAAGGTGATTATGTTTTAGATGGTAAATGGCAATCAGCA 265
              *****
Dh0902      ATTTCTGGTGGCCCGAGTGGATCTGTTGTTATAGGCGGGTTTTTAGGCTCCTATATGGCA 360
0902-94     ATTTCTGGTGGCCCGAGTGGATCTGTTGTTATAGGCGGGTTTTTAGGCTCCTATATGGCA 325
              *****
Dh0902      GATTCAATCGGTAGAAAGCTCACACTTTTAATCGCTGTTGGAGCGACAATTGGATTTATC 420
0902-94     GATTCAATCGGTAGAAAGCTCACACTTTTAATCGCTGTTGGAGCGACAATTGGATTTATC 385
              *****
Dh0902      GTTCTTGAGTATGTTTCCACTACGATTGAGGTATTCCTTGCTGGAAAATTCCTAAATGCA 480
0902-94     GTTCTTGAGTATGTTTCCACTACGATTGAGGTATTCCTTGCTGGAAAATTCCTAAATGCA 445
              *****
Dh0902      CTCTCTTTAGGAATTATTGCTGCAGTATCTACGCTTTGATTGCTGAGATTACCCCTTTA 540
0902-94     CTCTCTTTAGGAATTATTGCTGCAGTATCTACGCTTTGATTGCTGAGATTACCCCTTTA 505
              *****
Dh0902      GCTTTAAGAGGATTATCCGTTGCTGCAATTAGTTTGTGCTTATCTTTGGGCCCATTTGTC 600
0902-94     GCTTTAAGAGGATTATCCGTTGCTGCAATTAGTTTGTGCTTATCTTTGGGCCCATTTGTC 565
              *****
Dh0902      TGTTATTTGATTGCAAATACAACATCGACTCGAGATGATAGAATGGCATATAGGAGCTTG 660
0902-94     TGTTATTTGATTGCAAATACAACATCGACTCGAGATGATAGAATGGCATATAGGAGCTTG 625
              *****
Dh0902      TTTTTGAGTCAATGGGCATTTAGTGAACATCTTTTATCATGTTATTTTGTATTCCAGAA 720
0902-94     TTTTTGAGTCAATGGGAATTTAGTGAACATCTTTTATCATGTTATTTTGTATTCCAGAA 685
              *****
Dh0902      TCCCCGTACTATTATGTGTTAAAAAATGCAGACGAAAAGGCTCTAAAACAATTGAGAAAA 780
0902-94     TCCCCGTACTATTATGTGTTAAAAAATGCAGACGAAAAGGCTCTAAAACAATTGAGAAAA 745
              *****
Dh0902      TTGTATAAAGGTGAAGCACTCGCAAAACATCAGTTAACTGTCATTAAAAAACAGTAGAA 840
0902-94     TTGTATAAAGGTGAAGCACTCGCAAAACATCAGTTAACTGTCATTAAAAAACAGTAGAA 805
              *****

```

```

Dh0902      GAAGCTAGACATACTACTATATCGTCATCTTTTGTGGATTGCTTTAGGGGAATTAACHTA 900
0902-94     GAAGCTAGACATACTACTATATCGTCATCTTTTGTGGATTGCTTTAGGGGAATTAACHTA 865
*****

Dh0902      AAAAGAACATTTATTGCAATATCACCTTTCATTATGCAGCCTATGAGTGGTGTGCGCTAC 960
0902-94     AAAAGAACATTTATTGCAATATCACCTTTCATTATGCAGCCTATGAGTGGTGTGCGCTAC 925
*****

Dh0902      GTTGGTTCATACTCTACTTATTTTTTCCAATTAGCTGGGTATAAATACTCACCTGTCGTTT 1020
0902-94     GTTGGTTCATACTCTACTTATTTTTTCCAATTAGCTGGGTATAAATACTCACCTGTCGTTT 985
*****

Dh0902      CAAATAAGTGTGGTCAACAAGCTTTGTCTATTTTAGGTTGCATTGCTTCATGGTTTATC 1080
0902-94     CAAATAAGTGTGGTCAACAAGCTTTGTCTATTTTAGGTTGCATTGCTTCATGGTTTATC 1045
*****

Dh0902      CTTGATAGATTCGGAAGAAGGCATGTTATGCTATACGGTATGATTTCTTTATTTGTACTT 1140
0902-94     CTTGATAGATTCGGAAGAAGGCATGTTATGCTATACGGTATGATTTCTTTATTTGTACTT 1105
*****

Dh0902      AATGTTATTACTGCAGGCTTGGGTTGCAGCAACAAGAAAGCTACTTAACTGGTGCCTCC 1200
0902-94     AATGTTATTACTGCAGGCTTGGGTTGCAGCAACAAGAAAGCTACTTAACTGGTGCCTCC 1165
*****

Dh0902      GCATTCATGACTATGTATAACTTTTTTACAACCAAGCATCGGTCCCCTTTCTTATGTT 1260
0902-94     GCATTCATGACTATGTATAACTTTTTTACAACCAAGCATCGGTCCCCTTTCTTATGTT 1225
*****

Dh0902      ATAAATGCAGAAAATCCTAGTTCCTCAACTAAGGGTTAAAACATCTCAATTGGGTTGGCT 1320
0902-94     ATAAATGCAGAAAATCCTAGTTCCTCAACTAAGGGTTAAAACATCTCAATTGGGTTGGCT 1285
*****

Dh0902      GCGAATAATGGTTTACAATGTATGTGGCAATTCGTTTTGCCTTTCATGTTCAATCCAGAT 1380
0902-94     GCGAATAATGGTTTACAATGTATGTGGCAATTCGTTTTGCCTTTCATGTTCAATCCAGAT 1345
*****

Dh0902      CAAGCAAATATGGGATCTAAGATTAATTTTCATATTTGCTGCTTGTGCTTTATTAGTATA 1440
0902-94     CAAGCAAATATGGGATCTAAGATTAATTTTCATATTTGCTGCTTGTGCTTTATTAGTATA 1405
*****

Dh0902      TTCTGTTTTTATTTCTATTTACCAGAAACTGCAAACAGGTCATTTGATGAAATTGATGAA 1500
0902-94     TTCTGTTTTTATTTCTATTTACCAGAAACTGCAAACAGGTCATTTGATGAAATTGATGAA 1465
*****

Dh0902      ATGTATATAAAAAAGGTCCCAGCCAGGAAGTTTAGGAATTTTATTTTCAGATACGCAAATT 1560
0902-94     ATGTATATAAAAAAGGTCCCAGCCAGGAAGTTTAGGAATTTTATTTTCAGATACGCAAATT- 1524
*****

Dh0902      AAAGCTACTGAACAAAATGATGAGAAAAAGGGACTCGAAGTTGAACATATTGAAGCT 1617
0902-94     AAAGCTACTGAACAAA----- 1541
*****

```

Figura 25 – Alinhamento da sequência DEHA2E00902g de *D. hansenii* com o resultado da sequenciação do plasmídeo extraído de *E. coli* da colónia 902-94. O alinhamento das sequências foi efectuado recorrendo ao programa ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>).

Dh0726 ATGAAGATAGTGATAATAAGGGACATTATGGATACTAGATTGAATATGAGTGATAAGGAT 60
0726-95 ATGAAGATAGTGATAATAAGGGACATTATGGATACTAGATTGAATATGAGTGATAAGGAT 60
0726-63 ATGAAGATAGTGATAATAAGGGACATTATGGATACTAGATTGAATATGAGTGATAAGGAT 60

Dh0726 ATTTCTCTAGAAAACCTCGAGGAATGATTCCGGTGAAGACACCTAAAAATGTTTATACTCTA 120
0726-95 ATTTCTCTAGAAAACCTCGAGGAATGATTCCGGTGAAGACACCTAAAAATGTTTATACTCTA 120
0726-63 ATTTCTCTAGAAAACCTCGAGGAATGATTCCGGTGAAGACACCTAAAAATGTTTATACTCTA 120

Dh0726 GCAGATGTTACACCCAAGTTTGAAAAAATATGGTTTAAATATCCTTGGTTGTTACAATTG 180
0726-95 GCAGATGTTACACCCAAGTTTGAAAAAATATGGTTTAAATATCCTTGGTTGTTACAATTG 180
0726-63 GCAGATGTTACACCCAAGTTTGAAAAAATATGGTTTAAATATCCTTGGTTGTTACAATTG 180

Dh0726 AATATTTTTCTTTTAGGAGGTATTTGGCTCAGGTACTTCTGGATATGATGGTAGTATG 240
0726-95 AATATTTTTCTTTTAGGAGGTATTTGGCTCAGGTACTTCTGGATATGATGGTAGTATG 240
0726-63 AATATTTTTCTTTTAGGAGGTATTTGGCTCAGGTACTTCTGGATATGATGGTAGTATG 240

Dh0726 ATGAACAATTTGCAGACGCTTCCAAGTTGGAGAAATTAATTTGATCAACCAACGGGAAGC 300
0726-95 ATGAACAATTTGCAGACGCTTCCAAGTTGGAGAAATTAATTTGATCAACCAACGGGAAGC 300
0726-63 ATGAACAATTTGCAGACGCTTCCAAGTTGGAGAAATTAATTTGATCAACCAACGGGAAGC 300

Dh0726 ATTTTAAGTACTATGGCTAATGGTGTACAAATGGTACCTTAATTTGATCCATTACT 360
0726-95 ATTTTAAGTACTATGGCTAATGGTGTACAAATGGTACCTTAATTTGATCCATTACT 360
0726-63 ATTTTAAGTACTATGGCTAATGGTGTACAAATGGTACCTTAATTTGATCCATTACT 360

Dh0726 TGGTTTGTATGTGATTATTTTGGTAGACGGATAACGATTATGTTCCGGCTGTATTGTTGTC 420
0726-95 TGGTTTGTATGTGATTATTTTGGTAGACGGATAACGATTATGTTCCGGCTGTATTGTTGTC 420
0726-63 TGGTTTGTATGTGATTATTTTGGTAGACGGATAACGATTATGTTCCGGCTGTATTGTTGTC 420

Dh0726 ATTATAGGTGCAGCAATCAAGGTGGTGCAGGTAATTTTGGAAATGTTACCGCCCGGAGA 480
0726-95 ATTATAGGTGCAGCAATCAAGGTGGTGCAGGTAATTTTGGAAATGTTACCGCCCGGAGA 480
0726-63 ATTATAGGTGCAGCAATCAAGGTGGTGCAGGTAATTTTGGAAATGTTACCGCCCGGAGA 480

Dh0726 GTGCTACTTGGTATTGGTTCATGTTTTGCATCAGCAGCTGCTTCACCCTTGTGGCTGAG 540
0726-95 GTGCTACTTGGTATTGGTTCATGTTTTGCATCAGCAGCTGCTTCACCCTTGTGGCTGAG 540
0726-63 GTGCTACTTGGTATTGGTTCATGTTTTGCATCAGCAGCTGCTTCACCCTTGTGGCTGAG 540

Dh0726 ACATCGTATCCATCTCAGAGGCCTGTCGTGACAGCGTGTGTTGTTAGCATCATGGCCATTT 600
0726-95 ACATCGTATCCATCTCAGAGGCCTGTCGTGACAGCGTGTGTTGTTAGCATCATGGCCATTT 600
0726-63 ACATCGTATCCATCTCAGAGGCCTGTCGTGACAGCGTGTGTTGTTAGCATCATGGCCATTT 600

Dh0726 GGATCTTTTGTGCTTCTGTAGTACTTGGGGCCCTTATCATTCAGCATGAAGTATAAT 660
0726-95 GGATCTTTTGTGCTTCTGTAGTACTTGGGGCCCTTATCATTCAGCATGAAGTATAAT 660
0726-63 GGATCTTTTGTGCTTCTGTAGTACTTGGGGCCCTTATCATTCAGCATGAAGTATAAT 660

Dh0726 AATTGGTCCTGGAGAATACCCTCTATTTTGAATGTGCTTTCCCTGCAATTGAATTATTA 720
0726-95 AATTGGTCCTGGAGAATACCCTCTATTTTGAATGTGCTTTCCCTGCAATTGAATTATTA 720
0726-63 AATTGGTCCTGGAGAATACCCTCTATTTTGAATGTGCTTTCCCTGCAATTGAATTATTA 720

Dh0726 CTTGCTTTTTTGGTCCAGAATCACCGAGATGGTTGATCGACAAAGGCAGAAGTGATGAA 780
0726-95 CTTGCTTTTTTGGTCCAGAATCACCGAGATGGTTGATCGACAAAGGCAGAAGTGATGAA 780
0726-63 CTTGCTTTTTTGGTCCAGAATCACCGAGATGGTTGATCGACAAAGGCAGAAGTGATGAA 780

Dh0726 GCTGAAGCTTTTTTTATAAAAATATCATGCTGGAGGCGATTTCGAGTAGTCCGTTAGTGAGT 840
0726-95 GCTGAAGCTTTTTTTATAAAAATATCATGCTGGAGGCGATTTCGAGTAGTCCGTTAGTGAGT 840
0726-63 GCTGAAGCTTTTTTTATAAAAATATCATGCTGGAGGCGATTTCGAGTAGTCCGTTAGTGAGT 840

Dh0726 TATGAAATGGCCGAAATAAAAGCTATTATCGAACAAGAAAAGGTCCAAAAAAGAGCAAA 900
0726-95 TATGAAATGGCCGAAATAAAAGCTATTATCGAACAAGAAAAGGTCCAAAAAAGAGCAAA 900
0726-63 TATGAAATGGCCGAAATAAAAGCTATTATCGAACAAGAAAAGGTCCAAAAAAGAGCAAA 900

```

Dh0726      TGGAGTGAATGGTTCAGGACAAAACAACGCTCTCCGTAGGTTGTTTATTGTTTTGGCAGTC 960
0726-95     TGGAGTGAATGGTTCAGGACAAAACAACGCTCTCCGTAGGTTGTTTATTGTTTTGGCAGTC 960
0726-63     TGGAGTGAATGGTTCAGGACAAAACAACGCTCTCCGTAGGTTGTTTATTGTTTTGGCAGTC 960
*****

Dh0726      CCAGCAATGGCACAACATATGTGGAAATGCACCTATTTTCATATTACTTGCAAATAGTTTTG 1020
0726-95     CCAGCAATGGCACAACATATGTGGAAATGCACCTATTTTCATATTACTTGCAAATAGTTTTG 1020
0726-63     CCAGCAATGGCACAACATATGTGGAAATGCACCTATTTTCATATTACTTGCAAATAGTTTTG 1020
*****

Dh0726      ACCAATATTGGTATCACTGAAACAATGACCAACTTAAAATTAATATTGGAATGACAGTC 1080
0726-95     ACCAATATTGGTATCACTGAAACAATGACCAACTTAAAATTAATATTGGAATGACAGTC 1080
0726-63     ACCAATATTGGTATCACTGAAACAATGACCAACTTAAAATTAATATTGGAATGACAGTC 1080
*****

Dh0726      TACGGTTTAGTATGGTCTGTTGGTTGCGCAACATTTGTCGACAAGTTCAAACGTAAGCAT 1140
0726-95     TACGGTTTAGTATGGTCTGTTGGTTGCGCAACATTTGTCGACAAGTTCAAACGTAAGCAT 1140
0726-63     TACGGTTTAGTATGGTCTGTTGGTTGCGCAACATTTGTCGACAAGTTCAAACGTAAGCAT 1140
*****

Dh0726      ACTTTTATTGGAGGCTATATCCTAATGTGTATTACATATGTTGTTGGACTATATTATCT 1200
0726-95     ACTTTTATTGGAGGCTATATCCTAATGTGTATTACATATGTTGTTGGACTATATTATCT 1200
0726-63     ACTTTTATTGGAGGCTATATCCTAATGTGTATTACATATGTTGTTGGACTATATTATCT 1200
*****

Dh0726      GCAATTAATCAACAGGGTGATTTTCGAAAATAAGGGTCTAGGAAGAGGTGTCGTTGCTATG 1260
0726-95     GCAATTAATCAACAGGGTGATTTTCGAAAATAAGGGTCTAGGAAGAGGTGTCGTTGCTATG 1260
0726-63     GCAATTAATCAACAGGGTGATTTTCGAAAATAAGGGTCTAGGAAGAGGTGTCGTTGCTATG 1260
*****

Dh0726      ATTTATCTTTTCCTGGGGTTTTATCATATTGTATCTCCTGTATCTATGACTTTCGTTATG 1320
0726-95     ATTTATCTTTTCCTGGGGTTTTATCATATTGTATCTCCTGTATCTATGACTTTCGTTATG 1320
0726-63     ATTTATCTTTTCCTGGGGTTTTATCATATTGTATCTCCTGTATCTATGACTTTCGTTATG 1320
*****

Dh0726      GAAGTTTGCCCTTTCATTTGAGAGCACAAGGAGCTACTCTCTATCAACTTTCGGAAT 1380
0726-95     GAAGTTTGCCCTTTCATTTGAGAGCACAAGGAGCTACTCTCTATCAACTTTCGGAAT 1380
0726-63     GAAGTTTGCCCTTTCATTTGAGAGCACAAGGAGCTACTCTCTATCAACTTTCGGAAT 1380
*****

Dh0726      GTAATTGGTTTCTTTAATAAATTATGTGAACAACATTGCGATGCAGGCTATAACTTGGAGA 1440
0726-95     GTAATTGGTTTCTTTAATAAATTATGTGAACAACATTGCGATGCAGGCTATAACTTGGAGA 1440
0726-63     GTAATTGGTTTCTTTAATAAATTATGTGAACAACATTGCGATGCAGGCTATAACTTGGAGA 1440
*****

Dh0726      TACTATATTGTATGGTGTATCTGGCTAGTGGTGCAAATGAACATCGTATACTGGATATTC 1500
0726-95     TACTATATTGTATGGTGTATCTGGCTAGTGGTGCAAATGAACATCGTATACTGGATATTC 1500
0726-63     TACTATATTGTATGGTGTATCTGGCTAGTGGTGCAAATGAACATCGTATACTGGATATTC 1500
*****

Dh0726      CCAGAACTAAAGGTTTGGGTTTAGAAGAAGTTGCCCAAGTATTCGGAGAGGATGTAACC 1560
0726-95     CCAGAACTAAAGGTTTGGGTTTAGAAGAAGTTGCCCAAGTATTCGGAGAGGATGTAACC 1560
0726-63     CCAGAACTAAAGGTTTGGGTTTAGAAGAAGTTGCCCAAGTATTCGGAGAGGATGTAACC 1560
*****

Dh0726      GCCGGCTACAAGGCTGGTGTATCATGCACTTGAATACGGAATTGAGGAGGTAAACAAAGAT 1620
0726-95     GCCGGCTACAAGGCTGGTGTATCATGCACTTGAATACGGAATTGAGGAGGTAAACAAAGAT 1620
0726-63     GCCGGCTACAAGGCTGGTGTATCATGCACTTGAATACGGAATTGAGGAGGTAAACAAAGAT 1620
*****

Dh0726      GATGTGTCTGTGAACACATTGAAGAGAAAGTAGATAAAAAAC 1662
0726-95     GA----- 1622
0726-63     GA----- 1622
**

```

Figura 26 – Alinhamento da sequência DEHA2E00726g de *D. hansenii* com o resultado da sequenciação do plasmídeo extraído de *E. coli* da colónia 0726-63 e 0726-95. O alinhamento das sequências foi efectuado recorrendo ao programa ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>).

Dh0528 ATGACCGAGAAAGTTGATATGATTGGTACGACACAAGACAAGGTACAAACTCCAGTAAAC 60
0528-40 ATGACCGAGAAAGTTGATATGATTGGTACGACACAAGACAAGGTACAAACTCCAGTAAAC 60
0528-43 ATGACCGAGAAAGTTGATATGATTGGTACGACACAAGACAAGGTACAAACTCCAGTAAAC 60

Dh0528 ATGGAACAAGAAGTTATAACTACTGCCATTATACTGAGTATATTGATTCACATACTTCT 120
0528-40 ATGGAACAAGAAGTTATAACTACTGCCATTATACTGAGTATATTGATTCACATACTTCT 120
0528-43 ATGGAACAAGAAGTTATAACTACTGCCATTATACTGAGTATATTGATTCACATACTTCT 120

Dh0528 AAATGGGAAACGATTA AAAAGTTCCCTTTGCATGCTTTTGTATCGGCGTAATGATCTTC 180
0528-40 AAATGGGAAACGATTA AAAAGTTCCCTTTGCATGCTTTTGTATCGGCGTAATGATCTTC 180
0528-43 AAATGGGAAACGATTA AAAAGTTCCCTTTGCATGCTTTTGTATCGGCGTAATGATCTTC 180

Dh0528 ACCTTAGTTTTAACATCATTTGAATCGCAGGCAGGAGGAATTGTTATTTCCATTTCTATG 240
0528-40 ACCTTAGTTTTAACATCATTTGAATCGCAGGCAGGAGGAATTGTTATTTCCATTTCTATG 240
0528-43 ACCTTAGTTTTAACATCATTTGAATCGCAGGCAGGAGGAATTGTTATTTCCATTTCTATG 240

Dh0528 TTTAGAAAACACTTCGGTGTATAACAACCTGATGGTTCATATGTTCTTGAAGCACAATGG 300
0528-40 TTTAGAAAACACTTCGGTGTATAACAACCTGATGGTTCATATGTTCTTGAAGCACAATGG 300
0528-43 TTTAGAAAACACTTCGGTGTATAACAACCTGATGGTTCATATGTTCTTGAAGCACAATGG 300

Dh0528 CAATCTGCTATTTCTGGTGTGCCCTTGGCTGCGCAAATTATTGGACAGTGGACAGGATCT 360
0528-40 CAATCTGCTATTTCTGGTGTGCCCTTGGCTGCGCAAATTATTGGACAGTGGACAGGATCT 360
0528-43 CAATCTGCTATTTCTGGTGTGCCCTTGGCTGCGCAAATTATTGGACAGTGGACAGGATCT 360

Dh0528 TGGTTAGCTGATCATTTTGGTAAGAAGTGGTTCATATATGTATCCATACTTGTATCAACA 420
0528-40 TGGTTAGCTGATCATTTTGGTAAGAAGTGGTTCATATATGTATCCATACTTGTATCAACA 420
0528-43 TGGTTAGCTGATCATTTTGGTAAGAAGTGGTTCATATATGTATCCATACTTGTATCAACA 420

Dh0528 GCCTTCATAGGTATCGAATTTGCTGCCACTACAATCCAAACATTTTTAGCTGGAAAAACA 480
0528-40 GCCTTCATAGGTATCGAATTTGCTGCCACTACAATCCAAACATTTTTAGCTGGAAAAACA 480
0528-43 GCCTTCATAGGTATCGAATTTGCTGCCACTACAATCCAAACATTTTTAGCTGGAAAAACA 480

Dh0528 ATGAATGGATTATGTTTGGGTATTATACAAGCGTCCATTGTCTCATATGTGGCAGATATT 540
0528-40 ATGAATGGATTATGTTTGGGTATTATACAAGCGTCCATTGTCTCATATGTGGCAGATATT 540
0528-43 ATGAATGGATTATGTTTGGGTATTATACAAGCGTCCATTGTCTCATATGTGGCAGATATT 540

Dh0528 ACACCTTTTGCTTTAAGAGGTGCATCTACAGCACTTTGTAATATTTTCATTCTCGATTGGT 600
0528-40 ACACCTTTTGCTTTAAGAGGTGCATCTACAGCACTTTGTAATATTTTCATTCTCGATTGGT 600
0528-43 ACACCTTTTGCTTTAAGAGGTGCATCTACAGCACTTTGTAATATTTTCATTCTCGATTGGT 600

Dh0528 CCGTTAGTTTTGTTTCATTATCAACTATTCTGAGAGTGATAGGCTAGATTCTTGGGCGTAT 660
0528-40 CCGTTAGTTTTGTTTCATTATCAACTATTCTGAGAGTGATAGGCTAGATTCTTGGGCGTAT 660
0528-43 CCGTTAGTTTTGTTTCATTATCAACTATTCTGAGAGTGATAGGCTAGATTCTTGGGCGTAT 660

Dh0528 AGATCCATTTTGTGCTGCCAATGGGGATTTTCTGCTATCTCCTTAATTACACTATTATTT 720
0528-40 AGATCCATTTTGTGCTGCCAATGGGGATTTTCTGCTATCTCCTTAATTACACTATTATTT 720
0528-43 AGATCCATTTTGTGCTGCCAATGGGGATTTTCTGCTATCTCCTTAATTACACTATTATTT 720

Dh0528 GTCCCAGATTCCCCTACGTATTATATATTTAAAAGGAAAGACCGAAAAAGCAGAGGCTTGC 780
0528-40 GTCCCAGATTCCCCTACGTATTATATATTTAAAAGGAAAGACCGAAAAAGCAGAGGCTTGC 780
0528-43 GTCCCAGATTCCCCTACGTATTATATATTTAAAAGGAAAGACCGAAAAAGCAGAGGCTTGC 780

Dh0528 TATGAAAAGTTATTTAAAAGATCCTGTATCAATTCAACAACAAATGGCCGTTGTCAATAAT 840
0528-40 TATGAAAAGTTATTTAAAAGATCCTGTATCAATTCAACAACAAATGGCCGTTGTCAATAAT 840
0528-43 TATGAAAAGTTATTTAAAAGATCCTGTATCAATTCAACAACAAATGGCCGTTGTCAATAAT 840

Dh0528 ACGATAAAAAGAAATCACAACATCGGCAGATAGCTGTACATTCTTGGATTGTTTTAAAGGT 900
0528-40 ACGATAAAAAGAAATCACAACATCGGCAGATAGCTGTACATTCTTGGATTGTTTTAAAGGT 900
0528-43 ACGATAAAAAGAAATCACAACATCGGCAGATAGCTGTACATTCTTGGATTGTTTTAAAGGT 900

```

Dh0528      AATAATTTGAAAAGAACCATGGTCGCGTCCGTTCCATTTATATTTCTGTCCATTTTCTGGT 960
0528-40     AATAATTTGAAAAGAACCATGGTCGCGTCCGTTCCATTTATATTTCTGTCCATTTTCTGGT 960
0528-43     AATAATTTGAAAAGAACCATGGTCGCGTCCGTTCCATTTATATTTCTGTCCATTTTCTGGT 960
*****

Dh0528      GTATATTTTACAGGTAATTATACAACATATTTGGTTCCAATTAGCAGGTTTATCGGATTCT 1020
0528-40     GTATATTTTACAGGTAATTATACAACATATTTGGTTCCAATTAGCAGGTTTATCGGATTCT 1020
0528-43     GTATATTTTACAGGTAATTATACAACATATTTGGTTCCAATTAGCAGGTTTATCGGATTCT 1020
*****

Dh0528      GAATCTTTTAAATACACTATTGGTGCCCAACTTTTGTCCATTGCTGGGTGTGTGGCTACA 1080
0528-40     GAATCTTTTAAATACACTATTGGTGCCCAACTTTTGTCCATTGCTGGGTGTGTGGCTACA 1080
0528-43     GAATCTTTTAAATACACTATTGGTGCCCAACTTTTGTCCATTGCTGGGTGTGTGGCTACA 1080
*****

Dh0528      TTGTTTGTGTTGATAGATTTGGAAGAAGAACTAATATCCTTTTATGGTGTGGGAACATTT 1140
0528-40     TTGTTTGTGTTGATAGATTTGGAAGAAGAACTAATATCCTTTTATGGTGTGGGAACATTT 1140
0528-43     TTGTTTGTGTTGATAGATTTGGAAGAAGAACTAATATCCTTTTATGGTGTGGGAACATTT 1140
*****

Dh0528      ATTGTCGTCGATTTTCATAATTGGAGGCACAGGTTTAGTGAAAGATAATGACCAAGCATT 1200
0528-40     ATTGTCGTCGATTTTCATAATTGGAGGCACAGGTTTAGTGAAAGATAATGACCAAGCATT 1200
0528-43     ATTGTCGTCGATTTTCATAATTGGAGGCACAGGTTTAGTGAAAGATAATGACCAAGCATT 1200
*****

Dh0528      AAAGCTACAATATCATTTATGATGATGATGATGGGTTTTTTTACAACCTTTGGTCTAGGTTCT 1260
0528-40     AAAGCTACAATATCATTTATGATGATGATGATGGGTTTTTTTACAACCTTTGGTCTAGGTTCT 1260
0528-43     AAAGCTACAATATCATTTATGATGATGATGATGGGTTTTTTTACAACCTTTGGTCTAGGTTCT 1260
*****

Dh0528      GTATGTTATCCAATTGCCTCTGAAAACCCCTACAAGTGCATTAAGAACCAAAACATTTGGT 1320
0528-40     GTATGTTATCCAATTGCCTCTGAAAACCCCTACAAGTGCATTAAGAACCAAAACATTTGGT 1320
0528-43     GTATGTTATCCAATTGCCTCTGAAAACCCCTACAAGTGCATTAAGAACCAAAACATTTGGT 1320
*****

Dh0528      CTTGCACTCTCATCGACCAATATAGCGGGGATGGTATGGTCCCTTCGTTTTACCATACATA 1380
0528-40     CTTGCACTCTCATCGACCAATATAGCGGGGATGGTATGGTCCCTTCGTTTTACCATACATA 1380
0528-43     CTTGCACTCTCATCGACCAATATAGCGGGGATGGTATGGTCCCTTCGTTTTACCATACATA 1380
*****

Dh0528      TTTAATCCAGACGAAGGAAACTTTGGGTGCCAGTACGATGTTTCATTTTCGCCGGGTTTTCA 1440
0528-40     TTTAATCCAGACGAAGGAAACTTTGGGTGCCAGTACGATGTTTCATTTTCGCCGGGTTTTCA 1440
0528-43     TTTAATCCAGACGAAGGAAACTTTGGGTGCCAGTACGATGTTTCATTTTCGCCGGGTTTTCA 1440
*****

Dh0528      CTTCTCTTTTGGGTATACTTTTATTTCTGTGTACCCGAAACTGCAAATAGGACCCCTGAA 1500
0528-40     CTTCTCTTTTGGGTATACTTTTATTTCTGTGTACCCGAAACTGCAAATAGGACCCCTGAA 1500
0528-43     CTTCTCTTTTGGGTATACTTTTATTTCTGTGTACCCGAAACTGCAAATAGGACCCCTGAA 1500
*****

Dh0528      GAAGTAGATGAAATGTATTTTAAACAAGTTCCCTTAAGAAATTTTGGGAGCCACGAAACT 1560
0528-40     GAAGTAGATGAAATGTATTTTAAACAAGTTCCCTTAAGAAATTTTGGGAGCCACGAAACT 1560
0528-43     GAAGTAGATGAAATGTATTTTAAACAAGTTCCCTTAAGAAATTTTGGGAGCCACGAAACT 1560
*****

Dh0528      TTTTCTTCAAGAGAAAATGAAGAACTTTTAAAGAATGTGCTGCTAATGAAAAACTAAT 1620
0528-40     TTTTCTTCAAGAGAAAATGAAGAACTTTTAAAGAATGTGCTGCTAATGAAAAACTAAT 1601
0528-43     TTTTCTTCAAGAGAAAATGAAGAACTTTTAAAGAATGTGCTGCTAATGAAAAACTAAT 1602
*****

Dh0528      GAAACTCTTCATGTCGAGGAAATT 1644
0528-40     -----
0528-43     -----

```

Figura 27 – Alinhamento da sequência DEHA2B00528g com o resultado da sequenciação do plasmídeo extraído de *E. coli* da colônia 0528-40 com a construção pUG35- DEHA2B00528g. O alinhamento das sequências foi efectuado recorrendo ao programa ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>).

ANEXO VI

> [ref|XM_456990.1|](#) Debaryomyces hansenii CBS767 DEHA2B00528p (DEHA2B00528g) mRNA, complete cds
Length=1647

GENE ID: 2913088 DEHA2B00528g | DEHA2B00528p [Debaryomyces hansenii CBS767]
(10 or fewer PubMed links)

Score = 2935 bits (1589), Expect = 0.0
Identities = 1589/1589 (100%), Gaps = 0/1589 (0%)
Strand=Plus/Plus

```

Query 103  ATGACCGAGAAAGTTGATATGATTGGTACGACACAAGACAAGGTACAAACTCCAGTAAAC 162
          |||
Sbjct 1    ATGACCGAGAAAGTTGATATGATTGGTACGACACAAGACAAGGTACAAACTCCAGTAAAC 60

Query 163  ATGGAACAAGAAGTTATAACTACTGCCATTATACTGAGTATATTGATTACATACTTCT 222
          |||
Sbjct 61  ATGGAACAAGAAGTTATAACTACTGCCATTATACTGAGTATATTGATTACATACTTCT 120

Query 223  AAATGGGAAACGATTAATAAGTTCCCTTTGCATGCTTTGTATCGGCGTAATGATCTTC 282
          |||
Sbjct 121  AAATGGGAAACGATTAATAAGTTCCCTTTGCATGCTTTGTATCGGCGTAATGATCTTC 180

Query 283  ACCTTAGTTTTAACATCATTGAATCGCAGGCAGGAGGAATTGTTATTTCCATTTCTATG 342
          |||
Sbjct 181  ACCTTAGTTTTAACATCATTGAATCGCAGGCAGGAGGAATTGTTATTTCCATTTCTATG 240

Query 343  TTTAGAAAACACTTCGGTGTATACAACCTGATGGTTCATATGTTCTTGAAGCACAAATGG 402
          |||
Sbjct 241  TTTAGAAAACACTTCGGTGTATACAACCTGATGGTTCATATGTTCTTGAAGCACAAATGG 300

Query 403  CAATCTGCTATTTCTGGTGTGCCCTTGGCTGCGCAAATTATTGGACAGTGGACAGGATCT 462
          |||
Sbjct 301  CAATCTGCTATTTCTGGTGTGCCCTTGGCTGCGCAAATTATTGGACAGTGGACAGGATCT 360

Query 463  TGGTTAGCTGATCATTTTGGTAAGAAGTGGGTTCATATATGTATCCACTTGTATCAACA 522
          |||
Sbjct 361  TGGTTAGCTGATCATTTTGGTAAGAAGTGGGTTCATATATGTATCCACTTGTATCAACA 420

Query 523  GCCTTCATAGGTATCGAATTTGCTGCCACTACAATCCAAACATTTTTAGCTGGAAAAACA 582
          |||
Sbjct 421  GCCTTCATAGGTATCGAATTTGCTGCCACTACAATCCAAACATTTTTAGCTGGAAAAACA 480

Query 583  ATGAATGGATTATGTTTGGGTATTATACAAGCGTCCATTGTCTCATATGTGGCAGATATT 642
          |||
Sbjct 481  ATGAATGGATTATGTTTGGGTATTATACAAGCGTCCATTGTCTCATATGTGGCAGATATT 540

Query 643  ACACCTTTTGCTTTAAGAGGTGCATCTACAGCACTTTGTAATATTTTCATTCTCGATTGGT 702
          |||
Sbjct 541  ACACCTTTTGCTTTAAGAGGTGCATCTACAGCACTTTGTAATATTTTCATTCTCGATTGGT 600

Query 703  CCGTTAGTTTGTTCATTATCAACTATTCTGAGAGTGATAGGCTAGATTCTTGGGCGTAT 762
          |||
Sbjct 601  CCGTTAGTTTGTTCATTATCAACTATTCTGAGAGTGATAGGCTAGATTCTTGGGCGTAT 660

Query 763  AGATCCATTTTGGCTGCCCAATGGGGATTTCTGCTATCTCCTTAATTACACTATTATTT 822
          |||
Sbjct 661  AGATCCATTTTGGCTGCCCAATGGGGATTTCTGCTATCTCCTTAATTACACTATTATTT 720

Query 823  GTCCAGATTCCCCTACGTATTATATATTTAAAAGGAAAGACCGAAAAAGCAGAGGCTTGC 882
          |||
Sbjct 721  GTCCAGATTCCCCTACGTATTATATATTTAAAAGGAAAGACCGAAAAAGCAGAGGCTTGC 780

```

```

Query 883  TATGAAAAGTTATTTAAAAGATCCTGTATCAATTCAACAACAAATGGCCGTTGTCATAAAAT 942
          |||
Sbjct 781  TATGAAAAGTTATTTAAAAGATCCTGTATCAATTCAACAACAAATGGCCGTTGTCATAAAAT 840

Query 943  ACGATAAAAAGAATCACAACATCGGCAGATAGCTGTACATTCTTGGATTGTTTTAAAGGT 1002
          |||
Sbjct 841  ACGATAAAAAGAATCACAACATCGGCAGATAGCTGTACATTCTTGGATTGTTTTAAAGGT 900

Query 1003  AATAATTTGAAAAGAACCATGGTCGCGTCCGTTCCATTTATATTCTGTCCATTTTCTGGT 1062
          |||
Sbjct 901  AATAATTTGAAAAGAACCATGGTCGCGTCCGTTCCATTTATATTCTGTCCATTTTCTGGT 960

Query 1063  GTATATTTTACAGGTAATTATACAACATATTGGTTCCAATTAGCAGGTTTATCGGATTCT 1122
          |||
Sbjct 961  GTATATTTTACAGGTAATTATACAACATATTGGTTCCAATTAGCAGGTTTATCGGATTCT 1020

Query 1123  GAATCTTTTAAATACACTATTGGTGCCCAACTTTTGTCCATTGCTGGGTGTGTGGCTACA 1182
          |||
Sbjct 1021  GAATCTTTTAAATACACTATTGGTGCCCAACTTTTGTCCATTGCTGGGTGTGTGGCTACA 1080

Query 1183  TTGTTTGTGTTGATAGATTTGGAAGAAGAATAATATCCTTTATGGTGTGGGAAGTATT 1242
          |||
Sbjct 1081  TTGTTTGTGTTGATAGATTTGGAAGAAGAATAATATCCTTTATGGTGTGGGAAGTATT 1140

Query 1243  ATTGTCGTCGATTTTATAAATTGGAGGCACAGGTTTAGTGAAAGATAATGACCAAGCATT 1302
          |||
Sbjct 1141  ATTGTCGTCGATTTTATAAATTGGAGGCACAGGTTTAGTGAAAGATAATGACCAAGCATT 1200

Query 1303  AAAGCTACAATATCATTATGATGATGTATGGGtttttttACAACCTTTGGTCTAGGTTCT 1362
          |||
Sbjct 1201  AAAGCTACAATATCATTATGATGATGTATGGGTTTTTTACAACCTTTGGTCTAGGTTCT 1260

Query 1363  GTATGTTATCCAATTGCCTCTGAAAACCTACAAGTGCATTAAGAACCAAAACCTATTGGT 1422
          |||
Sbjct 1261  GTATGTTATCCAATTGCCTCTGAAAACCTACAAGTGCATTAAGAACCAAAACCTATTGGT 1320

Query 1423  CTTGCACTCTCATCGACCAATATAGCGGGGATGGTATGGTCCTTCGTTTTACCATACATA 1482
          |||
Sbjct 1321  CTTGCACTCTCATCGACCAATATAGCGGGGATGGTATGGTCCTTCGTTTTACCATACATA 1380

Query 1483  TTTAATCCAGACGAAGGAAACTTGGGTGCCAGTACGATGTTTTCGCGGGGTTTTCA 1542
          |||
Sbjct 1381  TTTAATCCAGACGAAGGAAACTTGGGTGCCAGTACGATGTTTTCGCGGGGTTTTCA 1440

Query 1543  CTTCTCTTTTGGGTATACTTTTATTTCTGTGTACCCGAAACTGCAAATAGGACCCTTGAA 1602
          |||
Sbjct 1441  CTTCTCTTTTGGGTATACTTTTATTTCTGTGTACCCGAAACTGCAAATAGGACCCTTGAA 1500

Query 1603  GAAGTAGATGAAATGTATTTTAAACAAAGTTCCTTAAGAAATTTGGGAGCCACGAAACT 1662
          |||
Sbjct 1501  GAAGTAGATGAAATGTATTTTAAACAAAGTTCCTTAAGAAATTTGGGAGCCACGAAACT 1560

Query 1663  TTTTCTTCAAGAGAAAATGAAGAACTTT 1691
          |||
Sbjct 1561  TTTTCTTCAAGAGAAAATGAAGAACTTT 1589

```

Figura 28 – Alinhamento do resultado da sequenciação do transformante de *S. cerevisiae* 0528-26/0528-31 com a base de dados da NCBI [<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>].


```

Query 1018 TGAATGGTTCAGGACAAAACAACGTCTCCGTAGGTTGTTTATTGTTTTGGCAGTCCCAGC 1077
          |||
Sbjct 60764 TGAATGGTTCAGGACAAAACAACGTCTCCGTAGGTTGTTTATTGTTTTGGCAGTCCCAGC 60705

Query 1078 AATGGCACAACTATGTGGAAATGCACCTATTTTCATATTACTTGCAAATAGTTTTGACCAA 1137
          |||
Sbjct 60704 AATGGCACAACTATGTGGAAATGCACCTATTTTCATATTACTTGCAAATAGTTTTGACCAA 60645

Query 1138 TATTGGTATCACTGAAACAAATGACCAACTTAAAATTAATATTGGAATGACAGTCTACGG 1197
          |||
Sbjct 60644 TATTGGTATCACTGAAACAAATGACCAACTTAAAATTAATATTGGAATGACAGTCTACGG 60585

Query 1198 TTTAGTATGGTCTGTTGGTTGCGCAACATTTGTCGACAAGTTCAAACGTAAGCATACTTT 1257
          |||
Sbjct 60584 TTTAGTATGGTCTGTTGGTTGCGCAACATTTGTCGACAAGTTCAAACGTAAGCATACTTT 60525

Query 1258 TATTGGAGGCTATATCCTAATGTGTATTACATATGTTGTTGGACTATATTATCTGCAAT 1317
          |||
Sbjct 60524 TATTGGAGGCTATATCCTAATGTGTATTACATATGTTGTTGGACTATATTATCTGCAAT 60465

Query 1318 TAATCAACAGGGTGATTTTCGAAAATAAGGGTCTAGGAAGAGGTGTCGTTGCTATGATTTT 1377
          |||
Sbjct 60464 TAATCAACAGGGTGATTTTCGAAAATAAGGGTCTAGGAAGAGGTGTCGTTGCTATGATTTT 60405

Query 1378 TCTTTTCCTGGGGTTTTATCATATTGTATCTCCTGTATCTATGACTTTTCGTTATGGAAGT 1437
          |||
Sbjct 60404 TCTTTTCCTGGGGTTTTATCATATTGTATCTCCTGTATCTATGACTTTTCGTTATGGAAGT 60345

Query 1438 TTGCCCTTTCCATTTGAGAGCACAAAGGAGCTACTCTCTATCAACTTTCTGGAAATGTAAT 1497
          |||
Sbjct 60344 TTGCCCTTTCCATTTGAGAGCACAAAGGAGCTACTCTCTATCAACTTTCTGGAAATGTAAT 60285

Query 1498 TGGTTTCTTTAATAATCATGTGAACAACATTGCGATGCAGGCTATAAAGTTGGAGATACTA 1557
          |||
Sbjct 60284 TGGTTTCTTTAATAATCATGTGAACAACATTGCGATGCAGGCTATAAAGTTGGAGATACTA 60225

Query 1558 TATTGTATGGTGTATCTGGCTAGTGGTGCAAATGAACATCGTATACTGGATATTTCCAGA 1617
          |||
Sbjct 60224 TATTGTATGGTGTATCTGGCTAGTGGTGCAAATGAACATCGTATACTGGATATTTCCAGA 60165

Query 1618 AACTAAAGGTTTGGGTTTAGAAGAAGTTGCCCAAGTATTCGGAGAGGATGTAACGCCGG 1677
          |||
Sbjct 60164 AACTAAAGGTTTGGGTTTAGAAGAAGTTGCCCAAGTATTCGGAGAGGATGTAACGCCGG 60105

Query 1678 CTACAAGGCTGGTGATCATGCACTTGAATACGGAATTG 1715
          |||
Sbjct 60104 CTACAAGGCTGGTGATCATGCACTTGAATACGGAATTG 60067

```

Figura 29 – Alinhamento do resultado da sequenciação do transformante de *S. cerevisiae* 0726-13 com a base de dados da NCBI [<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>].

> [emb|CR382139.2|](#) **D** Debaryomyces hansenii strain CBS767 chromosome G complete sequence
Length=2051050

Features in this part of subject sequence:

[DEHA2G06490p](#)

Score = 2268 bits (1228), Expect = 0.0
Identities = 1230/1231 (99%), Gaps = 0/1231 (0%)
Strand=Plus/Minus

```

Query 1      TGTATATTTCTAATCACTCTTTCTTCTACTAATAATGGCTATGATGGTTCTATGTTGAAC 60
            |||
Sbjct 562909 TGTATATTTCTAATCACTCTTTCTTCTACTAATAATGGCTATGATGGTTCTATGTTGAAC 562850

Query 61     GGTTCGCAATCAGTTCTGTATTGGCCAGAGAAGATGGGTAATCCACAAGGTAGTGTTTTA 120
            |||
Sbjct 562849 GGTTCGCAATCAGTTCTGTATTGGCCAGAGAAGATGGGTAATCCACAAGGTAGTGTTTTA 562790

Query 121    GGTGCATTATCTAACGGAATGTTTTCCGGTGTGCTATCGTTTGTGTGTCATCTTGG 180
            |||
Sbjct 562789 GGTGCATTATCTAACGGAATGTTTTCCGGTGTGCTATCGTTTGTGTGTCATCTTGG 562730

Query 181    TTGGCTGATAAGTTCGGCAGATGGCGGTGATTTTTTGTGGACAGACTATTACTATCCTT 240
            |||
Sbjct 562729 TTGGCTGATAAGTTCGGCAGATGGCGGTGATTTTTTGTGGACAGACTATTACTATCCTT 562670

Query 241    GGTTCATTTTACAAGGTGTTTCAACAAATTACGGATTCTTCTTGGCTTCCCGCATCATT 300
            |||
Sbjct 562669 GGTTCATTTTACAAGGTGTTTCAACAAATTACGGATTCTTCTTGGCTTCCCGCATCATT 562610

Query 301    CTTGGTTTTGGAGTTGGTATTGCAGGCGTTTCTAGTCCTTCATTAATCTCTGAATTAGCA 360
            |||
Sbjct 562609 CTTGGTTTTGGAGTTGGTATTGCAGGCGTTTCTAGTCCTTCATTAATCTCTGAATTAGCA 562550

Query 361    TATCCAACACACAGAGCCACAGCTACAACCTTTCTACAATGCTGTTGGTATTTAGGAGCA 420
            |||
Sbjct 562549 TATCCAACACACAGAGCCACAGCTACAACCTTTCTACAATGCTGTTGGTATTTAGGAGCA 562490

Query 421    ATAATTGCAGCTTGGGTTACATACGGAACATTGAACATAGAAAACGATTATAGTTGGAGA 480
            |||
Sbjct 562489 ATAATTGCAGCTTGGGTTACATACGGAACATTGAACATAGAAAACGATTATAGTTGGAGA 562430

Query 481    ATTCCATCTTATTTGCAAGCTGCCCTCCCATGCCTCCAATTGCATTCTTTGGATGGTC 540
            |||
Sbjct 562429 ATTCCATCTTATTTGCAAGCTGCCCTCCCATGCCTCCAATTGCATTCTTTGGATGGTC 562370

Query 541    CCTGAATCTCCTCGTTACTTAAATCAATAAAGATAGAATCTCTGATGCTGAAAAGGTCTTG 600
            |||
Sbjct 562369 CCTGAATCTCCTCGTTACTTAAATCAATAAAGATAGAATCTCTGATGCTGAAAAGGTCTTG 562310

Query 601    AGAAAGTTTCACGCAGGTGGTGAAACTCATGAAAGAGCAAATGATTTGGTTAGTTTGA 660
            |||
Sbjct 562309 AGAAAGTTTCACGCAGGTGGTGAAACTCATGAAAGAGCAAATGATTTGGTTAGTTTGA 562250

Query 661    ATTGAAGAGATTCAAGCAGCGCTCGAGATAGAAAACTATCCTCTAACTCTAGATATTCT 720
            |||
Sbjct 562249 ATTGAAGAGATTCAAGCAGCGCTCGAGATAGAAAACTATCCTCTAACTCTAGATATTCT 562190

Query 721    GATTTTATTACCATGCCAACATTTAGAAAAAGATTATTTTTGGCAGTTTTTGTTCAGTT 780
            |||
Sbjct 562189 GATTTTATTACCATGCCAACATTTAGAAAAAGATTATTTTTGGCAGTTTTTGTTCAGTT 562130

Query 781    ATTATGCAATTATCTGGTAATGGATTGGTTTCTTATTATCTTAATAAAGTTTTGAATTCC 840
            |||
Sbjct 562129 ATTATGCAATTATCTGGTAATGGATTGGTTTCTTATTATCTTAATAAAGTTTTGAATTCC 562070

Query 841    ATTGGAATTACTGATCCTCATGAACAATTAATAAATTAATGGTTGTTTAAATGGTTATAAT 900
            |||
Sbjct 562069 ATTGGAATTACTGATCCTCATGAACAATTAATAAATTAATGGTTGTTTAAATGGTTATAAT 562010

```

```

Query 901      CTGTGCATCTCTTCAGTTGTTGCTTCTGTTGCTGGTAGATTCAAAGGAGAAGCATGTTT 960
                |||
Sbjct 562009    CTGTGCATCTCTTCAGTTGTTGCTTCTGTTGCTGGTAGATTCAAAGGAGAAGCATGTTT 561950

Query 961      TTAATTTGCACAATATTGATGTTGGTTTTCTATGTGATTGGACGATATTGCTCGCAATC 1020
                |||
Sbjct 561949    TTAATTTGCACAATATTGATGTTGGTTTTCTATGTGATTGGACGATATTGCTCGCAATC 561890

Query 1021     AACCAACAACGTAATTTGAAACAAAAATCATTAGGCAATGGCGTTATTGCCATGAttttt 1080
                |||
Sbjct 561889    AACCAACAACGTAATTTGAAACAAAAATCATTAGGCAATGGCGTTATTGCCATGATTTTT 561830

Query 1081     ttCTACTATTTGGCTTATGATATTGGTGCTAATGGCCTACCGTTCTTGTACATTACCGAA 1140
                |||
Sbjct 561829    TTCTACTATTTGGCTTATGATATTGGTGCTAATGGCCTACCGTTCTTGTACATTACCGAA 561770

Query 1141     ATCATGCCTTACAGCCATAGAGCAAAGGTATGAATATTTTCACGGTGAGCCAAAACATT 1200
                |||
Sbjct 561769    ATCATGCCTTACAGCCATAGAGCAAAGGTATGAATATTTTCACGGTGAGCCAAAACATT 561710

Query 1201     ATTATTATCTTCAATGGCTTCGTCAATCCTA 1231
                |||
Sbjct 561709    ATTATTATCTTCAATGGCTTCGTCAATCCTA 561679

```

Figura 30 – Alinhamento do resultado da sequenciação do transformante de *S. cerevisiae* 6490-19 com a base de dados da NCBI [<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>].