JÚLIO CÉZAR ARAÚJO DO ESPÍRITO SANTO

APERFEIÇOAMENTO DA FERMENTAÇÃO DE SACAROSE ATRAVÉS DA MODIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS GENES *SUC2* E *AGT1* EM LINHAGENS DIPLOIDES DE *Saccharomyces cerevisiae*

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, para obtenção do Título de Doutor em Biotecnologia.

São Paulo
2012

JÚLIO CÉZAR ARAÚJO DO ESPÍRITO SANTO

APERFEIÇOAMENTO DA FERMENTAÇÃO DE SACAROSE ATRAVÉS DA MODIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS GENES *SUC2* E *AGT1* EM LINHAGENS DIPLOIDES DE *Saccharomyces cerevisiae*

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, para obtenção do Título de Doutor em Biotecnologia.

Área de concentração:
Biotecnologia

Orientador:
Prof. Dr. Boris U. Stambuk

Versão original

São Paulo
2012

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Espirito Santo, Julio Cezar Araujo do.
Aperfeiçoamento da fermentação de sacarose através da modificação da expressão dos genes *SUC2* e *AGT1* em linhagens diploides de *Saccharomyces cerevisiae* / Julio Cezar Araujo do Espirito Santo. -- São Paulo, 2012.

Orientador: Boris Juan Carlos Ugarte Stambuk.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan. Área de concentração: Biotecnologia. Linha de pesquisa: Melhoramento genético de microrganismos de interesse industrial

Versão do título para o inglês: Improvement of sucrose fermentation by modifying the expression of *SUC2* and *AGT1* genes in diploid *Saccharomyces cerevisiae* strains.

Descritores: 1. Melhoramento genético 2. *Saccharomyces* 3. Sacarose 4. Fermentação alcoólica 5. Regulação gênica
I. Stambuk, Boris Juan Carlos Ugarte II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan
III. Título.

ICB/SBIB016/2012

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia
Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

---

Candidato(a): Julio Cezar Araujo do Espirito Santo.

Título da Tese: Aperfeiçoamento da fermentação de sacarose através da modificação da expressão dos genes *SUC2* e *AGT1* em linhagens diploides de *Saccharomyces cerevisiae*.

Orientador(a): Boris Juan Carlos Ugarte Stambuk.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a ...../...../....., considerou

( ) Aprovado(a) **( ) Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Presidente: Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Aos meus pais e meus irmãos pelos valores, amizade, carinho e apoio durante toda a vida!

Aos meus filhos por me darem motivação só por existirem!

Á minha esposa Carolina, meu amor eterno! Esta merece todo o meu esforço!

AGRADECIMENTOS

Sou muito grato ao Prof. Dr. Boris U. Stambuk não somente pela orientação, mas também por tudo o que me ensinou durante estes 5 anos. Espero poder transmitir todos os seus ensinamentos em breve.

À Profa. Dra. Ana Clara Guerrini Schenberg e à Profa. Dra. Elisabete José Vicente, por terem sido incrivelmente gentis e se disponibilizado a estarem presentes em todas as bancas examinadoras das quais eu já passei na USP.

Aos demais membros da banca examinadora.

Ao Prof. Dr. Johan M. Thevelein, por me proporcionar a rica experiência de trabalhar por um ano em seu laboratório na Bélgica.

Ao Prof. Dr. Hernán F. Terenzi, por contribuir com seus equipamentos para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos colegas do laboratório na UFSC, pela amizade e contribuições ao longo deste período juntos. Em especial aos colegas Marcelo G. Dario, por ter me recebido e passado todo o seu conhecimento durante meus primeiros meses no laboratório; Sérgio L. Alves Jr, pelas excelentes discussões e análises que me deram base criteriosa para interpretar os dados; e Augusto Bücker, pela parceria e grande amizade durante os últimos anos.

Aos colegas do laboratório MCB, da K. U. Leuven, na Bélgica, por terem me recebido tão bem e me tratado como um verdadeiro integrante do grupo durante os 12 meses que passamos juntos. Em especial aos colegas Thiago M. Pais, Tom Adriany, Beatriz M. Bonini, pela amizade, e aos colegas Nelson Avonce, Beatriz Escorcia e Evy Vanderheyden, por tudo o que me ajudaram durante meu período lá, e por fim à Griet Van Zeebroeck, pelo excelente trabalho que fizemos juntos durante os 12 meses.

Ao Dr. Guilherme L. Asmus e à Dra. Rosa M. F. Asmus, pelos conselhos, ajuda, "investimentos" e, principalmente, carinho que

tiveram durante todos esses anos. Ah, e claro, obrigado por deixarem sua filha casar-se comigo!!!

Aos meus avós, tios, primos, ..., quer estejam no Rio Grande do Sul, quer estejam no Espírito Santo, quer estejam no Mato Grosso do Sul. Muito obrigado por tudo.

Aos meus irmãos, por todas as coisas que nós vivemos juntos. Amo muito vocês!

Aos meus pais, simplesmente por TUDO o que me ensinaram e me proporcionaram durante toda a minha vida. O que eu sou hoje é reflexo do trabalho e dedicação de vocês como pais. Isso aqui só foi possível graças a vocês!

Ao meu pequeno grande amigo Hugo Henrique (e filho também), pelas mais espetaculares partidas de FIFA no videogame após um cansativo dia de trabalho, além dos divertidos revezamentos em UNCHARTED 2 em modo *on-line*;

À minha pequena filha dengosa Lívia Carolina, que apesar de não falar nada ainda, deixa muito claro o quanto eu sou especial para ela. Sou honrado por ser o único a te acalmar e fazer sorrir instantaneamente quando te ponho em meu colo;

À minha esposa Carolina. O teu valor para mim é imensurável e a tua ajuda e paciência foram fundamentais para o sucesso desta tese.

Ao CNPq, CAPES, FAPESP e Grupo Cerradinho, pelo apoio financeiro.

Ao Grupo Cerradinho e à CAPES pelas bolsas durante estes anos e ao CNPq pela bolsa de estágio-sanduíche no exterior.

"Nossas dúvidas são traidoras e nos fazem perder o que, com frequência, poderíamos ganhar, por simples medo de arriscar."

William Shakespeare

RESUMO

ESPIRITO SANTO, J. C. A. **Aperfeiçoamento da fermentação de sacarose através da modificação da expressão dos genes *SUC2* e *AGT1* em linhagens diploides de *Saccharomyces cerevisiae*.** 2012. 136 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

Na produção de álcool combustível pela levedura *S. cerevisiae* a sacarose presente no caldo de cana é primeiramente hidrolisada pela enzima invertase extracelular em glicose e frutose, que serão captados e fermentados pelas células. Como a fermentação industrial é um processo sem assepsia, este perfil de metabolização da sacarose é visto como um fator negativo, pois a hidrólise extracelular disponibiliza glicose e frutose para organismos contaminantes, além de causar estresse osmótico na levedura. Contudo, já foi demonstrado que o gene *SUC2* presente em leveduras é responsável por expressar duas formas da invertase: a enzima glicosilada extracelular, e outra forma intracelular não-glicosilada. Esta levedura apresenta também em seu genoma o gene *AGT1*, que codifica uma proteína capaz de transportar a sacarose com alta afinidade para o interior da célula. Considerando que as linhagens utilizadas na produção de álcool combustível no Brasil são leveduras diplóides, o objetivo deste trabalho foi criar linhagens diplóides de *S. cerevisiae* que consomem a sacarose apenas por intermédio da sua captação pela permease *AGT1* e sua posterior hidrólise no interior da célula pela invertase intracelular. Foram inicialmente desenvolvidas linhagens haplóides, usando técnicas de engenharia genômica baseadas em PCR, para a inserção de promotores fortes constitutivos de forma a modificar a estrutura e expressão do gene *SUC2*, resultando em linhagens que não apresentam atividade invertase extracelular, mas que sobre-expressam a forma intracelular da enzima (alelo p*ADH1*::*iSUC2*). Além disso, a expressão do gene *AGT1* também foi modificada visando incrementar a atividade da permease nas células, seja pela inserção de um promotor forte constitutivo no local genômico do gene (alelo p*ADH1*::*AGT1*), seja pela inserção do gene p*GPD*::*AGT1*::t*PGK* nos elementos *Ty1* do genoma da levedura. A seguir, através de cruzamentos das linhagens haplóides, foram obtidas linhagens diplóides com o perfil desejado de captação direta e hidrólise intracelular da sacarose. Além da confirmação por PCR das modificações realizadas no genoma, as regiões cromossômicas foram também sequenciadas para identificar as alterações introduzidas na sua estrutura. Os fenótipos das linhagens modificadas foram confirmados através das atividades enzimáticas e de transporte presentes nas células, bem como através da quantificação da expressão dos genes por qRT-PCR. A capacidade fermentativa das novas linhagens foi avaliada através de fermentações em batelada com altas densidades celulares em meios contendo diferentes concentrações de sacarose. Nossos resultados mostram que a captação direta da sacarose, com alta velocidade de transporte e sua posterior hidrólise intracelular, permitiu às células de levedura não só consumir a sacarose eficientemente, mas também aumentar a produção de etanol, quando comparadas às suas linhagens parentais não modificadas ou linhagens utilizadas na indústria, abrindo novos horizontes para tornar a produção de etanol no Brasil ainda mais eficiente.

Palavras-chave: Engenharia genômica. *Saccharomyces*. *AGT1*. *SUC2*. Etanol. Sacarose.

ABSTRACT

ESPIRITO SANTO, J. C. A. **Improvement of sucrose fermentation by modifying the expression of *SUC2* and *AGT1* genes in diploid *Saccharomyces cerevisiae* strains.** 2012. 136 p. PhD thesis (Biotechnology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

In the production of fuel ethanol by *S. cerevisiae* yeasts the sucrose present in cane juice is first hydrolyzed by the extracellular enzyme invertase into glucose and fructose, which will be captured and fermented by the cells. As the industrial fermentation process is not sterile, this sucrose metabolizing profile is viewed as a negative factor, because the extracellular hydrolysis provides glucose and fructose for contaminating organisms, and can cause osmotic stress in yeasts. However, it has been demonstrated that the *SUC2* gene present in yeasts is responsible for the expression of two forms of invertase: a glycosilated extracellular enzyme, and another non-glycosilated intracellular form. This yeast also presents in its genome the *AGT1* gene, which encodes for a protein capable to transport sucrose with high affinity into the cell. Considering that the strains used for fuel ethanol production in Brazil are diploid yeasts, the objective of this work was to create diploid *S. cerevisiae* strains that will consume sucrose only through its capture by the *AGT1* permease and its further hydrolysis within the cell by the intracellular invertase. Initially haploid strains were developed, using PCR-based genomic engineering techniques, to insert strong constitutive promoters in order to modify the structure and expression of the *SUC2* gene, resulting in strains that do not have extracellular invertase activity, but that overexpress the intracellular form of the enzyme (p*ADH1*::*iSUC2* allele). In addition, the expression of the *AGT1* gene was also modified to increase the permease activity in the cells, either through insertion of a strong constitutive promoter in the gene's chromosomal place (p*ADH1*::*AGT1* allele), or through insertion of the p*GPD*::*AGT1*::t*PGK* gene into the *Ty1* elements present in the yeast genome. After crossing the haploid strains, diploid strains were obtained showing the desired profile of direct uptake and intracellular hydrolysis of sucrose. In addition of confirming by PCR the changes made in the genome, the chromosomal regions were also sequenced to identify the modifications introduced in their structure. The phenotypes of the modified strains were confirmed through the enzymatic and transport activities present in the cells, as well as through quantifying the expression of the genes by qRT-PCR. The fermentation capacity of the new strains was evaluated in batch fermentations with high cell densities in media containing different concentrations of sucrose. Our results clearly show that the direct uptake of sucrose, with high transport velocity and its further intracellular hydrolysis, allowed the yeast cells not only to consume sucrose efficiently, but also increased the production of ethanol, when compared with their parental non-modified strains or industrial strains, opening new horizons to turn ethanol production in Brazil even more efficient.

Key-words: Genome engineering. *Saccharomyces*. *AGT1*. *SUC2*. Ethanol. Sucrose.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

cDNA - do inglês "Complementary DNA" (DNA complementar)

DNA - do inglês "deoxyribonucleic acid" (ácido desoxirribonucleico)

DNAse - enzima que cataliza a degradação de moléculas de DNA

DO_{570} - densidade ótica mensurada pela absorbância da luz em comprimento de onda de 570 nanômetros.

DO_{600} - densidade ótica mensurada pela absorbância da luz em comprimento de onda de 600 nanômetros.

EDTA - do inglês "Ethylenediamine tetraacetic acid" (ácido etilenodiamino tetra-acético)

Km - do inglês "Michaelis-Menten kinetics" (constante de Michaelis-Menten)

oe - do inglês "over expressed" (sobre-expressada)

ORF - do inglês "Open reading frame" (quadro de leitura aberta)

P.A. - Padrão Analítico - indica alto grau de pureza

p*ADH1* - promotor forte constitutivo obtido no lócus do gene *ADH1*

PCR - do inglês "Polymerase chain reaction" (reação em cadeia da polimerase)

p*GPD* - promotor forte constitutivo obtido no lócus do gene *GPD*

pH - potencial de hidrogênio

*p*NPαG - *p*-nitrofenil-α-D-glicosídeo

qRT-PCR - do inglês "Polymerase chain reaction in real time quantitative" (reação em cadeia da polimerase em tempo real quantitativo)

RNAm - do inglês "ribonucleic acid" (ácido ribonucleico) mensageiro

RNAse - Ribonuclease - enzima que cataliza a degradação de moléculas de RNA

rpm - rotação(ões) por minuto

SDS - do inglês "Sodium dodecyl sulfate" (Dodecil sulfato de sódio)

t*PGK* - terminador obtido no lócus do gene *PGK*

UAS_{mal} - do inglês "Upstream Activating Sequence" (sequência de ativação a montante do gene *MAL*)

YNB - do inglês "Yeast Nitrogen Base" (Nitrogenio Levedura Base)

YP - do inglês "Yeast extract and Peptone" (Extrato de Levedura e Peptona)

LISTA DE SÍMBOLOS

[^{14}C] - carbono-14 ou radiocarbono - isótopo radioativo natural do elemento carbono

~ - aproximadamente

± - variação de mais ou menos o valor que se segue.

°C - grau(s) Celsius

µg - micrograma(s)

µL - microlitro(s)

µm - micrometro(s)

dL - decilitro(s)

G - giro(s)

g - grama(s)

g/L - grama(s) por Litro

h - hora(s)

H^+ - íon de hidrogênio (próton)

M - molar

L - litro(s)

mg - miligrama(s)

mg/mL - miligrama(s) por mililitro

min - minuto(s)

mL - mililitro(s)

mM - milimolar

mU - mili unidade(s) (proteínas)

nm - nanômetro(s)

s - segundo(s)

U/mL - unidade(s) por mililitro (proteínas)

Δ - indica deleção (gene)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação do perfil de consumo de sacarose via hidrólise extracelular em *S. cerevisiae* 29

Figura 2 - Estrutura dos genes *MAL* 32

Figura 3 – Estrutura dos genes *MAL* e *AGT1* 33

Figura 4 – Estrutura dos genes *SUC* e tradução das formas intra e extracelular da invertase de *S. cerevisiae* 36

Figura 5 - Representação do perfil de consumo da sacarose apresentado pela linhagem *Wild Type* 39

Figura 6 - Representação do novo perfil de consumo da sacarose proposto neste trabalho 40

Figura 7 - Estratégia de modificação dos genes *SUC2* e *AGT1* nas linhagens de *S. cerevisiae*.. 59

Figura 8 - Estratégia de sobre-expressão da forma intracelular da enzima invertase em *S. cerevisiae* (vide Figura 7) 60

Figura 9 - Estratégia de sobre-expressão da permease Agt1p em *S. cerevisiae* (vide Figura 7) 60

Figura 10 - Estratégia de inserção nos elementos TY e sobre-expressão da permease Agt1p nas linhagens de *S. cerevisiae*..... 61

Figura 11 - Obtenção da linhagem BSY021-34B 62

Figura 12 - Obtenção da linhagem HCJ003 62

Figura 13 - Obtenção das linhagens diplóides geneticamente modificadas 63

Figura 14 - Confirmação por PCR da inserção do módulo de sobre-expressão na região do gene *SUC2* no genoma de linhagens de *S. cerevisiae,* utilizando um único par de primers..... 64

Figura 15 - Confirmação por PCR da inserção do módulo de sobre-expressão na região do gene *SUC2* no genoma de linhagens de *S. cerevisiae,* utilizando dois pares de primers..... 65

Figura 16 - Confirmação por PCR da inserção do módulo de sobre-expressão na região do gene *AGT1* no genoma de linhagens de *S. cerevisiae* 66

Figura 17 - Confirmação por PCR da inserção do módulo de sobre-expressão do gene *AGT1*

nos elementos *Ty1* genoma de linhagens de *S. cerevisiae* 67

Figura 18 - Atividade invertase nas linhagens de *S. cerevisiae* 69

Figura 19 - Eletroforese em gel de poliacrilamida da invertase presente nas células 70

Figura 20 - Atividade invertase nas linhagens de *S. cerevisiae* 72

Figura 21 - Atividade de transporte pela permease Agt1p 73

Figura 22 - Atividade de hidrólise pela maltase 74

Figura 23 - Crescimento das linhagens em diferentes fontes de carbono 76

Figura 24 - Crescimento das linhagens diplóides em meio YP com sacarose 2% 78

Figura 25 - Fermentação em batelada com 20 g/L de sacarose pela linhagem CAT-1 79

Figura 26 - Fermentação em batelada com 20 g/L de sacarose pelas linhagens haplóides 80

Figura 27 - Fermentação em batelada com 20 g/L de sacarose pelas linhagens diplóides 81

Figura 28 - Fermentação em batelada com >200 g/L de sacarose pela linhagem industrial CAT-1 83

Figura 29 - Fermentação em batelada com >200 g/L de sacarose pelas linhagens haplóides 84

Figura 30 - Fermentação em batelada com >200 g/L de sacarose pelas linhagens diplóides 86

Figura 31 - Produção de etanol em função do glicerol produzido pelas linhagens indicadas durante as fermentações em batelada de >200 g/L de sacarose 87

Figura 32 - Produção de açúcares redutores (glicose e frutose) no meio em função do glicerol produzido pelas linhagens indicadas durante as fermentações em batelada de >200 g/L de sacarose 87

Figura 33 – Análise da expressão do gene *SUC2* 88

Figura 34 - Análise da expressão do gene *AGT1* 90

Figura 35 - Atividade de transporte de [^{14}C]-sacarose pela permease *AGT1* 91

Figura 36 - Representação da sequência de DNA nos alelos *SUC2*, presente na linhagem CEN.PK2-1C, e *iSUC2*, presente na linhagem HCJ005-2 93

Figura 37 - Representação dos alelos *AGT1*, presente na linhagem CEN.PK2-1C, e p*ADH1*::*AGT1*, presente na linhagem PSY003 95

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Linhagens de levedura *Saccharomyces cerevisiae* utilizadas 44

Tabela 2 - Oligonucleotídeos (Primers) utilizados 46

Tabela 3 - Plasmídeos utilizados 48

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 17

1.1 Produção de Etanol 18

1.2 Desafios do Processo de Produção Industrial de Etanol 20

1.3 A Levedura *Saccharomyces cerevisiae* 23

1.4 Utilização dos Açucares pela *S. cerevisiae* 29

2 OBJETIVOS 41

2.1 Objetivo Principal 41

2.2 Objetivos Específicos 41

3 MATERIAIS E MÉTODOS 42

3.1 Linhagens Utilizadas 42

3.2 Meios de Cultura e Condições de Crescimento 42

3.3 Construção das Linhagens Diplóides 43

3.4 Ensaios de Fermentação em Batelada 49

3.5 Determinação da Concentração Celular 49

3.6 Determinações de Glicose, Glicerol, Frutose, Sacarose e Etanol 49

3.7 Determinação da Atividade Invertase (Extra e Intracelular) 50

3.8 Determinação da Atividade α-Glicosidase 52

3.9 Determinação da Atividade de Transporte com *p*NPαG. 53

3.10 Determinação da Atividade de Transporte Utilizando [^{14}C]-Sacarose 53

3.11 Eletroforese de Invertase em Gel Não Denaturante 54

3.12 PCR 55

3.13 Análise de Expressão Gênica Através de RT-PCR em Tempo Real Quantitativo (qRT-PCR) 56

3.14 Sequenciamento dos Alelos **57**

4 RESULTADOS **58**

4.1 Obtenção das Linhagens Geneticamente Modificadas **58**

4.2 Caracterização das Linhagens Geneticamente Modificadas **68**

4.3 Metabolização de Açúcares pelas Linhagens **74**

4.4 Análise do Perfil Fermentativo em Baixas Concentrações de Sacarose **78**

4.5 Análise do Perfil Fermentativo em Altas Concentrações de Sacarose **82**

4.6 Análise da Expressão dos Genes *SUC2* e *AGT1* nas Linhagens **85**

4.7 Sequenciamentos dos Genes *SUC2* e *AGT1* nas Linhagens **92**

5 DISCUSSÃO **96**

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS **107**

REFERÊNCIAS **109**

APENDICES **128**

A - Sequenciamento do Gene *SUC2* nas Linhagens Abaixo **129**

B - Sequenciamento do Gene *AGT1* nas Linhagens Abaixo **133**

1 INTRODUÇÃO

Em termos globais, a economia mundial está extremamente dependente da disponibilidade do fornecimento de energia, em grande parte proveniente de combustíveis fósseis. Este cenário energético traz muitas oportunidades para a agricultura e biotecnologia. Além disso, há uma crescente pressão de órgãos ambientais e da opinião pública, para que sejam reduzidas as emissões de gases poluentes. Assim, uma grande parte dos países está focada na necessidade de aumentar a segurança energética, ampliar e diversificar o fornecimento de energia, assegurar a qualidade do meio ambiente e modernizar a sua infra-estrutura energética (FARRELL et al., 2006; HAHN-HÄGERDAL et al., 2006; HILL et al., 2006).

Partindo-se do princípio estabelecido de proporcionar o progresso diminuindo a agressão ao ambiente, a alternativa do combustível à base de álcool como substituto à gasolina, esta originária de fonte não renovável, é uma vitória ambiental. O principal álcool utilizado é o etanol, que na sua queima produz emissões de CO_2 em menor quantidade que outros combustíveis obtidos a partir do petróleo. É menos inflamável e tóxico que a gasolina e no caso de derramamentos ou vazamentos, o etanol causará menos impacto ambiental que qualquer outro combustível fóssil (POOLE, 1979; BIONDI, MONTEIRO, GLASS, 2008; FRANÇA, 2008; MINISTÉRIO DE MINAS E ENERGIA, 2011a).

Apesar de o etanol possuir uma queima menos poluente que a da gasolina, sua real vantagem se dá durante a obtenção de sua matéria-prima: a cana-de-açúcar. A combustão do etanol retira da atmosfera 1.660 g de O_2 por litro de etanol e libera 1.530 g/L de CO_2. Já a combustão da gasolina retira 2.590 gramas de O_2 por litro de gasolina e libera 2.280 g/L de CO_2. O cultivo da cana-de-açúcar consome 2.350 g de CO_2 por litro de etanol produzido e libera 1.700 g/L de O_2 na atmosfera. Na soma geral, do plantio da cana-de-açúcar até a combustão do etanol, retiram-se 820 g de CO_2 por litro de etanol da atmosfera e liberam-se 40 g/L de O_2. Apesar de não dispor de dados matemáticos sobre o processo de obtenção da

gasolina, sabe-se que da extração do petróleo ao beneficiamento da gasolina todas as etapas consomem O_2 e liberam CO_2 (POOLE, 1979; BNDES, 2008).

O Brasil é o único país do mundo onde uma grande parte do combustível consumido pelos automóveis é renovável, e a maioria dos novos automóveis produzidos pode usar esse combustível. Portanto, tem larga experiência na produção de álcool combustível e domina, mundialmente, a tecnologia e infra-estrutura de produção, transporte e distribuição do etanol. As indústrias de açúcar e de álcool sempre estiveram correlacionadas desempenhando um papel importante na economia brasileira (BNDES, 2008; MME, 2011a,b).

No Brasil, a atual infra-estrutura energética centralizada basicamente em duas fontes de energia (hidroelétricas e petróleo), tem se mostrado causadora de diversos problemas sociais e ambientais. Desta forma, o etanol pode ser uma das soluções para minimizar impactos ambientais e problemas energéticos, além de criar novos empregos, entre outras vantagens (BENTLEY, DERBY, 2002; VERTÈS, INUI, YUKAWA, 2006). Entretanto, a própria produção de etanol tem sido alvo de duras críticas quanto ao aumento da área de plantio da cana-de-açúcar no Brasil. As críticas questionam uma aparente invasão de áreas de proteção ambiental pelas lavouras de cana-de-açúcar, além de uma possível substituição de lavouras destinadas ao cultivo de produtos alimentícios pelas de cana (VIAN, MORAES, GONÇALVES, 2006).

Em vista dos argumentos apresentados acima, é fundamental dar continuidade ao estudo da produção do etanol, para usufruir deste recurso abundante no Brasil associando alta produtividade com sustentabilidade. Sendo assim, este trabalho desenvolveu um novo perfil metabólico em linhagens de levedura *Saccharomyces cerevisiae*, visando aumentar o rendimento da produção de etanol a partir de sacarose da cana-de-açúcar.

1.1 Produção de etanol

Na produção do etanol, a escolha da matéria-prima é realizada a

partir de alguns aspectos, tais como o volume de produção, o rendimento industrial e o custo de fabricação. No Brasil, o álcool combustível é obtido a partir da cana-de-açúcar, que oferece grande quantidade de sacarose, um dissacarídeo formado por uma molécula de α-D-glicose e outra de β-D-frutose (CAMPBELL, 2001; LIMA, BASSO, AMORIM, 2001; MME, 2011a,b). Entretanto, o álcool pode ser produzido também a partir de inúmeras fontes de carboidratos presentes em matérias-primas vegetais, como milho, beterraba, batata e sorgo doce, entre outras (BERG, 2004). Todas estas fontes contêm, em diferentes quantidades e proporções, diferentes tipos de carboidratos, usualmente uma mistura de açucares mono e dissacarídeos (OLSSON, NIELSEN, 2000).

Da cana-de-açúcar é possível obter dois produtos ricos em sacarose: o melaço e o caldo de cana-de-açúcar (WHEALS et al., 1999; LIMA, BASSO, AMORIM, 2001). Este último geralmente é constituído de 74% de água, 12,5% de sacarose, 0,9% de D-glicose, 0,6% de D-frutose, 10% de fibras e o restante dividido entre matérias minerais e outros compostos. Já a composição química do melaço, resíduo da fabricação do açúcar, contém em torno de 62% de açúcares (predominantemente sacarose), 20% de água, e 18% de outros compostos (LIMA, BASSO, AMORIM, 2001). Entretanto, a composição do melaço pode variar de acordo com o tipo, a qualidade e o tempo de estocagem da cana bruta utilizada, os métodos de manufatura do açúcar e a região de plantio (LIMA, BASSO, AMORIM, 2001; ANDRIETTA et al., 2007).

As leveduras presentes nas dornas de fermentação (reatores industriais onde acontecem os processos fermentativos da produção de álcool combustível) são responsáveis pela transformação dos açúcares em etanol (BARNETT, 1981; AMORIM, BASSO, ALVES, 1996). Segundo Silva Filho e colaboradores (2005), dois dos principais fatores que influenciam no processo de fermentação alcoólica para a produção de combustíveis são a capacidade fermentativa das leveduras utilizadas no processo e a resistência destas às condições de estresses submetidas.

Como os substratos adicionados às dornas de fermentação (melaço e/ou caldo de cana-de-açúcar) não recebem um tratamento de assepsia, a

fermentação alcoólica para a produção de combustíveis é considerada um processo complexo, com presença de várias linhagens de leveduras e até mesmo de bactérias (AMORIM, BASSO, LOPES, 2004). Isso favorece ao crescimento de linhagens de leveduras selvagens de *Saccharomyces cerevisiae* e não-*Saccharomyces cerevisiae*, que podem causar a diminuição da produtividade e outros problemas operacionais. A estabilidade das populações (e consequentemente da eficiência de produção) depende da utilização de linhagens resistentes e bem adaptadas ao processo industrial. Esta estabilidade ajuda a manter a taxa de produção de etanol alta e estável (AMORIM, BASSO, LOPES, 2004; SILVA FILHO et al., 2005; ANDRIETTA et al., 2007).

Ultimamente, diferentes linhagens de *Saccharomyces* têm sido isoladas durante os processos fermentativos em destilarias brasileiras e vêm sendo utilizadas como pré-inóculo em diversas unidades industriais (AMORIM, 2005; BASSO et al., 2008). Após a caracterização como boas fermentadoras e capazes de dominar o processo fermentativo durante toda a safra, elas são utilizadas como biomassa tanto na unidade em que foram isoladas, assim como, em outras unidades (BASSO et al., 2008). Essas linhagens receberam nomes referentes às iniciais das unidades onde foram isoladas, como: BG-1 (Usina Barra Grande), CR-1 (Usina Cresciumal), SA-1 (Usina Santa Adélia), CAT-1 (Usina VO de Catanduva), PE-2 (Usina da Pedra), entre outras. Com isso, a utilização de leveduras isoladas no processo e posteriormente selecionadas, constitui uma alternativa interessante para o bom controle e condução do processo fermentativo (AMORIM, 2005; ANDRIETTA et al., 2007; BASSO et al., 2008). Geralmente, estas leveduras industriais são diplóides, característica que é apontada como responsável por tornar estes microorganismos mais resistentes às condições de estresse e mutação (AA et al., 2006; LANDRY et al., 2006; QUEROL, BOND, 2009).

1.2 Desafios do processo de produção industrial de etanol

Os processos fermentativos podem ser classificados em três grandes

grupos, segundo a maneira através do qual o substrato é adicionado e o produto retirado: contínuo, descontínuo (batelada) ou semicontínuo. No processo contínuo, mosto novo é adicionado à dorna de fermentação com a mesma vazão em que o mosto fermentado é removido. (BORZANI et al., 2001). Nos processos descontínuos (batelada), o mosto é inicialmente carregado na dorna de fermentação, seguido pela adição do microrganismo e, ao término do processo fermentativo, o mosto fermentado é removido totalmente, e, após limpeza e esterilização da dorna, é iniciado novamente o processo (BORZANI et al., 2001). Já nos processos semicontínuos, a fermentação se inicia da mesma forma que no processo descontínuo, porém ao fim do processo de fermentação, retira-se da dorna até 80% do volume de mosto fermentado e adiciona-se igual volume de mosto novo, recomeçando o procedimento, realizado às vezes por vários meses consecutivos (BORZANI et al., 2001). No caso dos processos descontínuos e semicontínuos, ainda existe uma variação denominada "alimentada", onde o meio não é inicialmente adicionado até completar o volume útil da dorna, e sim adicionado lentamente na medida em que o processo fermentativo vai se desenvolvendo. Esta é uma forma de diminuir a repressão/inibição catabólica causada pelo produto ou substrato ás células, uma vez que eles vão sofrendo o efeito da diluição na medida em vão sendo adicionados ao volume crescente do mosto fermentado na dorna, podendo, dependendo da vazão de entrada, ser mantidos constantes até o total preenchimento do volume útil da dorna (BORZANI et al., 2001).

Na produção de álcool combustível duas peculiaridades podem afetar o rendimento final do etanol: a primeira é que o mosto a ser fermentado não é submetido a um tratamento prévio para a remoção total da microbiota nativa da cana-de-açúcar. A segunda depende do método escolhido para conduzir o processo fermentativo (descontínuo ou semicontínuo), onde grandes volumes de células de levedura podem ser reutilizados inúmeras vezes durante toda a safra (AMORIM, BASSO, ALVES, 1996; AMORIM, 2005).

No processo brasileiro, são utilizados mostos contendo

aproximadamente 180 g/L de açúcares totais, em sistemas de fermentação contínua ou descontínua (batelada) (AMORIM, 2005; ANDRIETTA et al., 2007; BASILIO et al., 2008). Os processos de fermentação em batelada representam cerca de 75% das destilarias do país, produzindo até 87 g/L de etanol, representando uma eficiência de 92%. Ambos os processos apresentam vantagens e desvantagens entre si, como: tempo de fermentação, instalações e equipamentos necessários, automatização, manutenção das condições de assepsia por longos períodos de tempo, etc. (WHEALS et al., 1999; BORZANI et al., 2001; AMORIM, 2005). Com isto, dependendo do processo adotado pela usina, a forma e velocidade de alimentação das dornas de fermentação com o caldo de cana, pode ocorrer uma grande concentração de sacarose no meio e que, devido à alta atividade de hidrólise pelas células de levedura, pode resultar na rápida quebra desta sacarose e formação de monossacarídeos. Este fato gera um significativo estresse osmótico na levedura, devido às altas concentrações de glicose e frutose produzidas (ocorrido principalmente nos processos em batelada e reduzido no contínuo). Isto causa alterações significativas na expressão de genes e revela diversas adaptações metabólicas, incluindo a produção de compostos com função protetora e reserva energética celular (trealose, glicerol e glicogênio), além da produção de ácidos (acético e succínico), causando gasto energético e diminuição no rendimento da fermentação (ALCARDE, BASSO, 1997; MYERS, LAWLOR, ATTFIELD, 1997; ERASMUS, VAN DER MERWE, VAN VUUREN, 2003). Outra forma de perda no rendimento da produção de etanol é a fermentação incompleta da frutose existente no meio, uma vez que algumas linhagens de *S. cerevisiae* não captam eficientemente este açúcar (BERTHELS et al., 2004). Todos estes fatores podem contribuir para a proliferação de bactérias e leveduras contaminantes, resultando em baixa produtividade.

Apesar de a seleção ter favorecido linhagens com genótipos e características desejadas, melhorias ainda são necessárias para aumentar a produtividade e diminuir custos nas aplicações industriais dessa levedura. Por exemplo, no processo realizado em cervejarias, altas concentrações de açúcares (predominantemente maltose e maltotriose) são fermentadas

eficientemente devido à captação direta destes açúcares pelas células (sem ocorrer hidrólise extracelular), gerando um rápido equilíbrio entre a concentração dos açúcares no interior e exterior da célula, impedindo o estresse osmótico (THOMAS, HYNES, INGLEDEW, 1996; ZASTROW et al., 2001). Considerando que a sacarose pode ser eficientemente fermentada através do transporte ativo do açúcar (BATISTA, MILETTI, STAMBUK, 2004; BADOTTI, BATISTA, STAMBUK, 2006; DÁRIO, 2007), seria interessante desenvolver, por exemplo, leveduras incapazes de hidrolisar a sacarose extracelularmente, mas que continuem fermentando este açúcar eficientemente.

1.3 A levedura *Saccharomyces cerevisiae*

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é atualmente o principal microrganismo utilizado na produção de álcool combustível a partir da cana de açúcar no Brasil (BARNETT, 1981; AMORIM, BASSO, ALVES, 1996; BASILIO et al., 2008). O uso desta levedura na produção de cerveja, vinho, saquê e indústria panificadora tem sido uma prática muito comum por vários séculos. Na verdade, a produção de bebidas alcoólicas por *S. cerevisiae* usando extratos de malte foi o primeiro processo industrial a ser desenvolvido para a produção de um metabólito microbiano (VITTI, 2001). Os conhecimentos do perfil fisiológico e genético da *S. cerevisiae* são extremamente avançados fazendo sua manipulação genética simples e rápida (CLARE, 1995). As leveduras se reproduzem quase tão rápido quanto bactérias, com uma maquinaria de tradução típica de eucariotos e com um genoma que é apenas 1/100 do de mamíferos (GOFFEAU et al., 1996).

Com tantas vantagens, foram desenvolvidos muitos processos visando à produção de linhagens melhoradas da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, responsável pela produção de etanol. Linhagens mais produtivas, com características desejáveis para produção de etanol e com monitoramento na indústria por técnicas de marcação molecular, foram desenvolvidas em vários laboratórios (SCHMIDELL et al., 2001). Pela

tecnologia do DNA recombinante, alguns laboratórios de pesquisa brasileiros, como os da Universidade de Brasília e da Universidade de São Paulo, desenvolveram em conjunto linhagens de leveduras contendo genes de amilases, capazes de utilizar o amido de mandioca ou batata-doce na produção de etanol (TAVARES, 2004).

Linhagens de *S. cerevisiae* são os microrganismos mais tolerantes ao etanol dentre os conhecidos na natureza, podendo proliferar-se em meios contendo 14-16% v/v de etanol. Tendo em vista a habilidade desta levedura de produzir etanol e sua alta tolerância a este, foi proposto que esta característica de *S. cerevisiae* permitiria inibir o crescimento de organismos competitivos nos ambientes ricos em açúcar onde normalmente são encontrados (VERSTREPEN, DERDELINCKX, VERACHTERT, 2003; PIŠKUR et al., 2006). Além disso, células de *Saccharomyces* apresentam crescimento rápido, eficiente metabolização de açúcares, habilidade na produção e consumo de etanol, tolerância a altas concentrações de etanol e baixos níveis de oxigênio, osmotolerância, tolerância a grandes variações de temperatura, além de ser capaz de manter sua atividade celular em ambientes ácidos, o que é fundamental na sua utilização industrial (VERSTREPEN, DERDELINCKX, VERACHTERT, 2003; PIŠKUR et al., 2006; ANDRIETTA et al., 2007).

A facilidade na produção de etanol pela *S. cerevisiae* é tão evidente que ela executa fermentação alcoólica até mesmo sob condições altamente aeróbias (REED, PEPPLER, 1973). Na fermentação ela pode utilizar diferentes fontes de carbono, como açúcares redutores monossacarídeos (glicose, frutose e galactose) e açúcares redutores (maltose) e não-redutores (sacarose) dissacarídeos, além de outros polissacarídeos (FLORES et al., 2000). Um açúcar redutor é um hidrato de carbono, que possui um ou mais grupos cetona ou aldeído livres ou potencionalmente livres, e que em meio alcalino têm a capacidade de reduzir agentes oxidantes. Açúcares não redutores (como a sacarose) possuem esses grupamentos interligados e tornam-se redutores a partir do momento em que sofrem hidrólise e liberam monossacarídeos com estes grupamentos livres (DEMIATE et al., 2002).

O objetivo primordial da levedura ao metabolizar carboidratos é gerar uma forma de energia química (ATP - Trifosfato de adenosina) que será empregada na realização dos diversos trabalhos fisiológicos e biossínteses, necessários à manutenção da vida, crescimento e multiplicação. O etanol e CO_2 resultantes se constituem em produtos de excreção, sem utilidade metabólica para a célula durante o processo fermentativo. Entretanto, o etanol e outros produtos de excreção podem ser oxidados metabolicamente gerando mais ATP e biomassa, porém apenas em condições de aerobiose (BARNETT, 1981; GANCEDO, SERRANO, 1989; AMORIM, BASSO, ALVES, 1996).

Durante a fermentação, na sequência de reações de produção de ATP, rotas metabólicas alternativas aparecem para propiciar a formação de materiais necessários à produção de biomassa (polissacarídeos, proteínas, ácidos nucléicos). Além destas, surgem também rotas para a formação de outros produtos de interesse metabólico, relacionados direta ou indiretamente com a adaptação e sobrevivência, o que pode vir a reduzir a produção de etanol. O glicerol, os ácidos orgânicos (principalmente o succínico e o acético), que conjuntamente com a biomassa são, quantitativamente, os principais subprodutos metabolicamente relacionados ao equilíbrio redox celular em processos fermentativos em anaerobiose (AMORIM, BASSO, ALVES, 1996). A fermentação alcoólica é um processo não oxidativo, sem a participação do oxigênio molecular, e, portanto, para se manter o equilíbrio redox celular, todo o NADH formado (em reações de oxidação) deve ser consumido (em reações de redução), estas normalmente acopladas à produção de etanol e glicerol (AMORIM, BASSO, ALVES, 1996).

O catabolismo da glicose pela *Saccharomyces cerevisiae* pode se dar pela via aeróbia ou anaeróbia. A via glicolítica é comum às duas e evidentemente que na ausência de O_2 a única possibilidade é a via anaeróbia. Porém, em *S. cerevisiae*, mesmo na presença de oxigênio a via anaeróbia também é escolhida se a concentração de glicose estiver acima de um valor chamado concentração crítica (C_{crit}) (BARNETT, 1981; ENTIAN, BARNETT, 1992). O que determina a via a ser seguida está nos

fenômenos chamados de repressão e/ou indução por glicose. Na presença de concentrações acima da C_{crit}, a glicose reprime a expressão dos genes que codificam enzimas do ciclo de Krebs, enzimas da cadeia respiratória e estruturas mitocondriais, e induzem a expressão de genes envolvidos no metabolismo fermentativo (BARNETT, 1981). Desta forma, encontrando-se diminuída a atividade mitocondrial na célula, a via a ser seguida pelo piruvato é a via anaeróbia com formação de etanol. Por outro lado, em concentrações de glicose abaixo da C_{crit} e na presença de O_2, o piruvato seguirá a via aeróbia porque, ao não se encontrarem reprimidos os genes em questão, a célula apresentará alta atividade mitocondrial (BARNETT, 1981; ENTIAN, BARNETT, 1992; PORRO et al., 1994; RETTORI, VOLPE, 2000).

O mecanismo de repressão baseia-se na interação entre um sinal decorrente da glicose e a(s) proteína(s) regulatória(s) da expressão gênica, ativando proteínas repressoras ou inibindo proteínas ativadoras (GANCEDO, 1992). Ao esgotar-se a glicose, estes genes são desreprimidos e criam-se as condições para que agora a fonte de carbono presente (o etanol - produzido pela própria *S. cerevisiae*) seja metabolizada pela recém reconstituída via aeróbia (ENTIAN, BARNETT, 1992; PORRO et al., 1994; RETTORI, VOLPE, 2000).

Pelo fato dos valores de concentração crítica serem em geral baixos (entre 0,09 e 0,9% em massa de glicose) (BARNET, 1981), num experimento em batelada, após a quantidade de glicose ficar abaixo da concentração crítica, as células acabam degradando a glicose remanescente pela via anaeróbia antes que elas possam recuperar a atividade mitocondrial, o que favorece o esgotamento total do açúcar com rendimento máximo de etanol (RETTORI, VOLPE, 2000).

Durante a fermentação alcoólica as células de leveduras são submetidas a diversas condições de estresse e, então, têm que desenvolver mecanismos moleculares para que resistam a estas situações adversas (IVORRA, PÉREZ-ORTIN, OLMO, 1999; FIDALGO et al., 2006). Em geral, as condições adversas que as leveduras enfrentam afetam principalmente as estruturas celulares, como as membranas, e as

diferentes macromoléculas, especialmente os lipídios, proteínas e ácidos nucléicos, os quais sofrem modificações estruturais que afetam seu funcionamento (FOLCH-MALLOL, GARAY-ARROYO, LLEDIAS, 2004).

Os sistemas de resposta envolvem a rápida síntese de moléculas de proteção e a ativação de sinais que induzem eventos secundários como o engatilhamento de atividades enzimáticas pré-existentes e a transcrição de genes que codificam fatores de proteção. As diferentes habilidades que as leveduras apresentam de resistir às condições de estresse durante a produção de etanol, podem determinar suas propriedades fermentativas e estabelecer critérios para a seleção de futuras leveduras industriais (IVORRA, PÉREZ-ORTIN, OLMO, 1999; CARRASCO, QUEROL, 2001; FIDALGO et al., 2006).

O estresse hiperosmótico é uma condição de estresse importante para as leveduras, pois a alta concentração de açúcares no mosto de fermentação produz um estresse osmótico nas células da levedura ao qual elas devem resistir para conduzirem eficientemente a fermentação. Uma condição de estresse hiperosmótico se define como uma diminuição no potencial hídrico do ambiente no qual se está desenvolvendo o microrganismo. A resposta imediata é uma saída de água intracelular, seguida de um processo adaptativo amplo a fim de levar a um ajuste osmótico. Devido ao movimento de água, as concentrações intracelulares de íons e biomoléculas aumentam resultando em diminuição da atividade celular. Uma vez que o microrganismo se adaptou, retoma o crescimento (FOLCH-MALLOL, GARAY-ARROYO, LLEDIAS, 2004).

Um dos aspectos da resposta ao estresse osmótico inclui o aumento da produção e retenção intracelular do glicerol, que parcialmente envolve o aumento da expressão do gene que codifica a enzima glicerol-3-fosfato desidrogenase (HERSEN et al., 2008). Leveduras osmotolerantes são aptas a reter o glicerol sintetizado para atuar como um soluto compatível ou osmorregulador. Qualquer que seja o mecanismo, a habilidade da levedura *Saccharomyces cerevisiae* em resistir a condições hiperosmóticas de estresse irá depender tanto da produção quanto da retenção intracelular de glicerol (MYERS, LAWLOR, ATTFIELD, 1997).

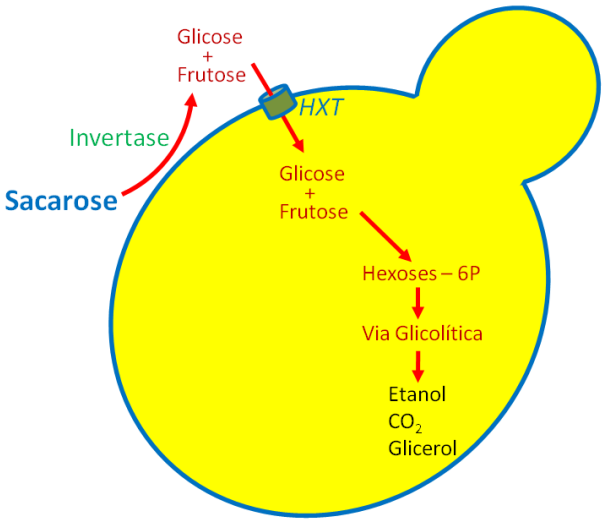
A produção de glicerol é um fator que afeta o desempenho fermentativo, uma vez que parte do glicerol formado está acoplada à manutenção do equilíbrio redox intracelular. Como a biossíntese de glicerol utiliza o poder redutor (NADH), a produção do mesmo é aumentada quando há excesso de NADH na célula. Isto ocorre quando processos oxidativos se desenvolvem, sejam decorrentes da produção de biomassa ou formação de ácidos orgânicos. Em consequência disto, a produção de etanol é desviada para a produção de glicerol. Outros fatores, como o ácido succínico, ácido acético, produção de biomassa e carboidratos de reserva também podem vir a afetar o desempenho da fermentação, uma vez que, ao serem produzidos ou consumidos, irão alterar o equilíbrio metabólico da célula (VAN DIJKEN, SCHEFFERS, 1986; BLOMBERG, ADLER, 1989; AMORIM, BASSO, ALVES, 1996; MYERS, LAWLOR, ATTFIELD, 1997; NISSEN et al., 2000b; HERSEN et al., 2008).

A resposta da levedura ao estresse osmótico é desencadeada pela via HOG (high osmolarity glycerol). A via HOG consiste em dois receptores de membrana, Sln1p e Sho1p (talvez até um terceiro chamado Msb2p, mas que ainda não tem função claramente definida (HERSEN et al., 2008)) que são estimulados pelas alterações osmóticas do meio. Este fenômeno desencadeia uma cascata de sinalização que envolve a ativação de proteínas que migram para o núcleo e se ligam a vários promotores, induzindo ou reprimindo a expressão de determinados genes, como os genes envolvidos na produção do glicerol. A via HOG é responsável pela adaptação á alta osmolaridade, e uma de suas respostas é a indução do metabolismo de solutos que contrabalanceiam a perda da água (VAN DIJKEN, SCHEFFERS, 1986; BLOMBERG, ADLER, 1989; BREWSTER et al., 1993; MAEDA, WURGLER-MURPHY, SAITO, 1994; MAEDA, TAKEKAWA, SAITO, 1995; MYERS, LAWLOR, ATTFIELD, 1997; HOHMANN, 2002; TATEBAYASHI et al., 2006; HERSEN et al., 2008).

1.4 Utilização dos açucares pela *S. cerevisiae*

Conforme descrito por Lagunas (1993), o passo inicial para o processo de fermentação é a captação dos açúcares para o interior da célula. Na fermentação do caldo-de-cana pela *S. cerevisiae* a sacarose contida no meio é primeiramente hidrolisada pela enzima invertase (β-d-frutosidase), presente no periplasma desta levedura. Desta forma, obtêm-se glicose e frutose, dois monossacarídeos que são transportadas do meio para o interior da célula, via difusão facilitada através de transportadores de hexoses (codificada pelos genes *HXT*), e metabolizados até etanol, CO_2, além de gerar glicerol (Figura 1) e vários outros produtos (BARNETT, 1981; LAGUNAS, 1993). Entretanto, em geral a frutose é captada mais lentamente que a glicose, o que frequentemente ocasiona fermentações lentas e/ou incompletas, com consequentes perdas de produtividade (BERTHELS et al., 2004).

Figura 1 - Representação do perfil de consumo de sacarose via hidrólise extracelular em *S. cerevisiae*.



FONTE: (ESPÍRITO SANTO, 2012)

Este sistema de transporte de monossacarídeos é composto por uma família de aproximadamente 20 genes (*HXT1 – 17*, *GAL2*, *SNF3* e *RGT2*), diferindo uns dos outros tanto pela função e regulação, quanto pela afinidade aos açúcares presentes no meio (BOLES, HOLLEMBERG,

1997). Sabe-se que os genes *HXT1–7* codificam as principais permeases responsáveis pelo transporte de hexoses (glicose, frutose e manose), e geralmente possuem afinidades menores pela frutose e manose do que pela glicose, motivo pelo qual este último carboidrato é captado mais rapidamente. Já o gene *GAL2* codifica um transportador de galactose e glicose, porém induzido apenas pela galactose (OZCAN, JONHSTON, 1999). Acredita-se que os demais genes desta família são responsáveis por codificar proteínas transportadoras envolvidas na captação de açúcares em condições específicas, ou ainda codificam proteínas sensoriais dos níveis de carboidratos presentes no meio extracelular, como os sensores de membrana *SNF3* e *RGT2*, que mediam a regulação da expressão dos genes *HXT* (BOLES, HOLLEMBERG, 1997; DIDERICH et al., 1999; KRUCKEBERG et al., 1999; OZCAN, JONHSTON, 1999).

Como o processo industrial de fermentação é um processo conduzido sem assepsia, o perfil de consumo demonstrado na Figura 1 tem sido apontado como um fator negativo, pois a disponibilização da glicose e frutose no meio permite o consumo de grande parte destes monossacarídeos por microrganismos contaminantes indesejáveis, que normalmente seriam incapazes de utilizar sacarose como fonte de carbono para o crescimento (AMORIM et al., 2004; SILVA FILHO et al., 2005; ANDRIETTA et al., 2007; MACLEAN et al., 2010; KOSCHWANEZ, FOSTER, MURRAY, 2011). Isto diminui a disponibilidade de açúcares que de fato serão consumidos pelas células que produzem etanol.

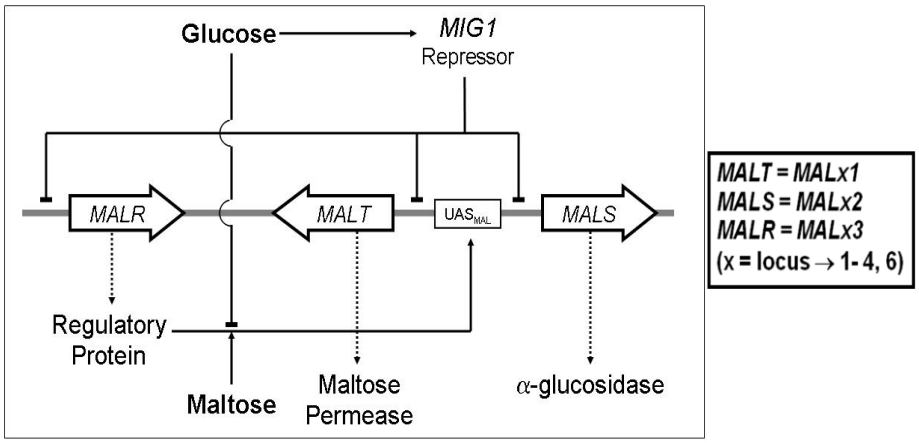
A hidrólise de altas concentrações de sacarose, produzindo consequentemente altas concentrações de glicose e frutose no meio extracelular, causa também um estresse osmótico muito grande na célula (TAKESHIGE, OUCHI, 1995; MYERS, LAWLOR, ATTFIELD, 1997; IVORRA, PÉREZ-ORTIN, OLMO, 1999; FIDALGO et al., 2006; HERSEN et al., 2008). Com o objetivo de contrabalancear a perda da água, a célula passa a sintetizar e reter glicerol, o que exige o desvio de carbono da produção de etanol para a produção deste glicerol, diminuindo o rendimento alcoólico (AMORIM, BASSO, ALVES, 1996; MYERS, LAWLOR, ATTFIELD, 1997).

Estes fatores têm afetado negativamente o rendimento final da produção de etanol a partir de sacarose pela levedura *S. cerevisiae*. Porém, alguns trabalhos têm descrito uma outra via metabólica para a sacarose, onde este açúcar não é hidrolisado no exterior da célula, mas transportado ativamente para o interior da célula e hidrolisado no citoplasma (MWESIGYE, BARFORD, 1994, 1996).

Além do transporte de monossacarídeos via um sistema de difusão facilitada, existe um sistema de transporte ativo de dissacarídeos, e até mesmo trissacarídeos, envolvendo o co-transporte com H^+. A maltose e a maltotriose são um dissacarídeo e trissacarídeo de glicose, respectivamente, unidas por uma ligação osídica α1-4, sendo levados para o interior da célula através de um co-transporte com prótons H^+, onde são hidrolisados pela maltase, liberando moléculas de glicose que serão metabolizadas (ZASTROW et al., 2000, 2001).

Para que *S. cerevisiae* seja capaz de fermentar estes açúcares é necessária a presença no genoma das leveduras dos genes *MAL*. Esses genes podem ser encontrados em cinco diferentes loci, localizados nas regiões teloméricas de cromossomos distintos: *MAL1* (cromossomo VII), *MAL2* (III), *MAL3* (II), *MAL4* (XI) e *MAL6* (VIII). Conforme demonstra a Figura 2, em cada um desses loci podem ser encontrados três diferentes genes que codificam proteínas com diferentes funções: o gene *MALT* ou *MALx1* (*x* representa o lócus) codifica o transportador de maltose, o gene *MALS* ou *MALx2* codifica a maltase, e o gene *MALR* ou *MALx3 que* codifica uma proteína reguladora responsável pela indução da expressão dos demais genes na presença de maltose ou outros α-glicosídeos, ligando-se à região UAS_{MAL}, presente entre os genes *MALT* e *MALR*. Por outro lado, a atividade de fosforilação da glicose pela enzima hexoquinase *HXK2*, induz a atividade repressora da proteína regulatória Mig1p, que se liga ao redor das regiões promotoras UAS_{MAL}, reprimindo a expressão gênica (NEEDLEMAN, 1991; HORÁK, 1997; NOVAK, ZECHNER-KRPAN, MARIÉ, 2004; JOHNSTON, KIM, 2005; VERMA, BHAT, VENKATESH, 2005).

Figura 2 - Estrutura dos genes *MAL*. As setas maiores indicam a organização cromossômica de cada gene *MAL* (telômero à direita, centrômero à esquerda), as linhas pontilhadas indicam os produtos da transcrição e tradução de cada gene, a linha contínua com seta indica indução e as linhas contínuas com pontas rombas indicam repressão.



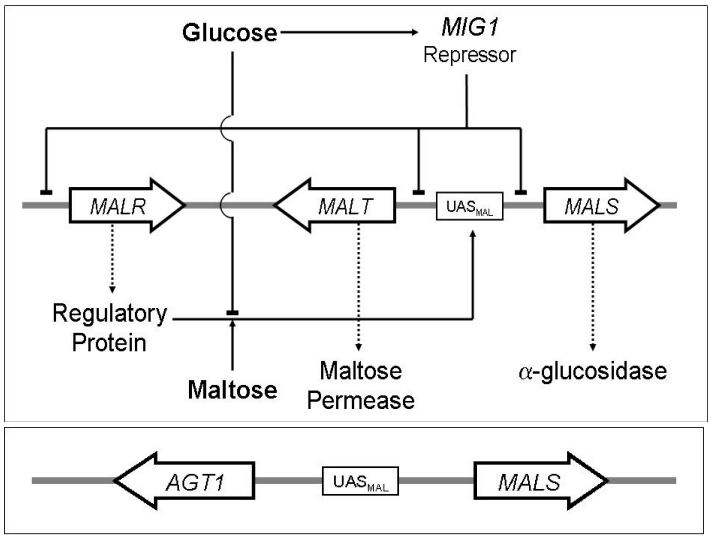
FONTE: (NEEDLEMAN, 1991; HORÁK, 1997)

Entretanto, um trabalho publicado recentemente demonstrou que apenas a presença dos genes *MALx1* (*MAL11*, *MAL21*, *MAL31*, *MAL41 e MAL61*) no genoma da linhagem de levedura, não são suficientes para permitir o eficiente consumo e fermentação da maltotriose em *S. cerevisiae*, sendo necessária a presença do gene *AGT1* (DUVAL et al., 2010). Isso contraria o que foi dito por Day et al. (2002a,b), que afirmaram que a fermentação da maltotriose também poderia ser eficientemente conduzida por linhagens que possuíam apenas as permeases Mal31p e/ou Mal61p.

Quando algum dos loci *MAL* não possui o gene regulador *MALR* (*MALx3*), ele recebe a denominação *malg* para indicar que é parcialmente funcional (NAUMOV et al., 1994). Ao analisarem alelos naturais do transportador de maltose presentes em locus *mal1g*, Han et al. (1995) caracterizaram um gene que passou a ser chamado *AGT1* (*α-glucoside transporter*), que codifica uma permease responsável pelo transporte ativo de uma série de α-glicosídeos, através de um simporte com H^+, sendo aparentemente regulado pelos mesmos mecanismos de regulação gênica dos demais genes *MAL*, uma vez que possui uma sequencia UAS_{mal} na sua região promotora (Figura 3) (HAN et al., 1995; STAMBUK et al., 1998,

1999, 2000). Conforme descrito por Stambuk et al. (2000) e Stambuk, de Araujo (2001), a permease *AGT1* é um transportador de alta afinidade (K_m ~7 mM) para sacarose e trealose e menor afinidade (K_m ~20 mM) para maltose, maltotriose, isomaltose, palatinose, melezitose e α–metil-glicosídeo, enquanto os transportadores *MALx1* possuem alta afinidade (K_m 2-5 mM) pela maltose (BUSTURIA, LAGUNAS, 1985; CHENG, MICHELS, 1991; VAN LEEWEN et al., 1992; WEUSTHUIS et al., 1993; HAN et al., 1995; VAN DER REST et al., 1995; STAMBUK, BATISTA, DE ARAÚJO, 2000; STAMBUK, DE ARAÚJO, 2001; TESTE, FRANÇOIS, PARROU, 2010).

Figura 3 – Estrutura dos genes *MAL* e *AGT1*.



FONTE: (NEEDLEMAN, 1991; HAN et al., 1995; HORÁK, 1997)

A sacarose é um dissacarídeo formado por uma molécula de glicose ligada a uma de frutose, através de uma ligação osídica de conformação Gli α1-β2 Fru (CAMPBELL, 2001). Este tipo de ligação confere à este carboidrato a possibilidade de sofrer a ação de hidrolases capazes de clivarem tanto a ligação osídica "α", pela maltase (α-D-glicosidase), quanto a ligação "β", neste caso catalisada pela enzima invertase ou β-D-frutosidase (GROSSMANN, ZIMMERMANN, 1979).

A invertase tem sido extensivamente caracterizada bioquimicamente, e na levedura *S. cerevisiae* vários genes responsáveis pela sua síntese tem

sido caracterizados. Os genes da família *SUC* codificam esta enzima, sendo que o lócus ancestral (aquele encontrado em todas as leveduras *Saccharomyces*) é o denominado *SUC2*, normalmente localizado na região sub-telomérica do cromossomo IX. Através de processos de recombinação e amplificação gênica, este gene pode também ser encontrado nos telômeros de diferentes cromossomos, dando lugar aos genes *SUC1* (VII), *SUC3* (II), *SUC4* (XIII), *SUC5* (IV), *SUC7* (VIII), *SUC8* (X), *SUC9* (XIV) e *SUC10* (XVI e XIII) (CARLSON, BOTSTEIN, 1982; NAUMOV et al., 1996; KORSHUNOVA, NAUMOVA, NAUMOV, 2005; NAUMOV, NAUMOVA, 2010). Apesar de haver um consenso a respeito da localização dos genes da família *SUC* nos respectivos cromossomos citados acima, Naumov, Naumova (2011) demonstraram que a localização do gene *SUC2* pode variar drasticamente entre linhagens de *S. cerevisiae*, tanto dentro do cromossomo quanto entre cromossomos. A análise deste processo de amplificação gênica em leveduras isoladas em diferentes ambientes industriais revelou que leveduras geralmente expostas a meios contendo sacarose (como o caldo-de-cana) ou onde a sacarose é o principal açúcar a ser fermentado, apresentam alta atividade invertase e vários loci *SUC* em seu genoma. Isto inclui leveduras de panificação, cervejeiras e utilizadas na produção de destilados, enquanto que leveduras utilizadas na produção de vinho geralmente não apresentam esta amplificação gênica, uma vez que na produção desta bebida alcoólica a glicose é o principal açúcar a ser metabolizado (BIDENNE et al., 1992; BENITEZ, CODON, 1995; BENITEZ, MARTINEZ, CODON, 1996; CODON, BENITEZ, KORHOLA, 1997, 1998; NADAL et al., 1999).

De fato, as células de *S. cerevisiae* possuem dois tipos de invertase: uma forma extracelular (ou periplasmática) altamente glicosilada, e outra intracelular não-glicosilada (GROSSMANN, ZIMMERMANN, 1979; WILLIAMS et al., 1985; REDDY et al., 1988). Como descrito por Carlson, Botstein (1982), dois tipos de RNAs mensageiros são transcritos a partir dos genes *SUC*, sendo um transcrito maior (1,9 kb) que contém uma sequencia responsável por codificar um peptídeo sinal (20 aminoácidos) responsável por direcionar a proteína para fora da célula

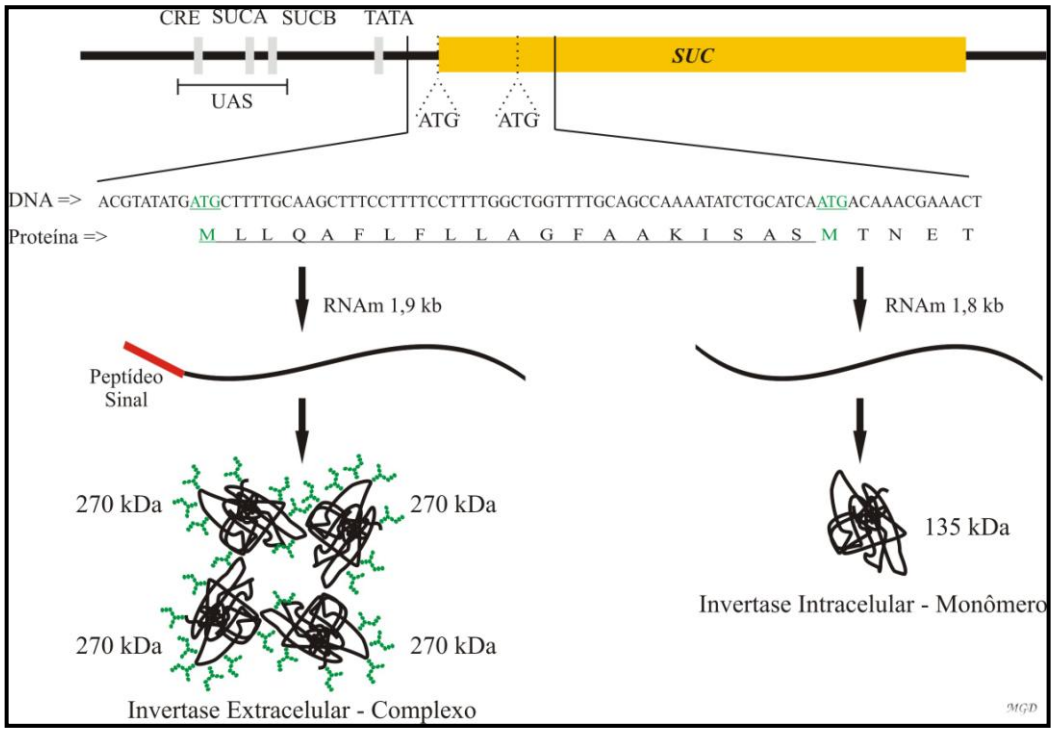
(espaço periplasmático), e um outro transcrito menor (1,8 kb) sem essa sequência sinalizadora, que permite a síntese da enzima intracelular (Figura 4). Ambas as enzimas possuem o mesmo pH ótimo acídico (pH 4,6-5,0) e mesma temperatura ótima (35-50 °C) e embora a sequencia protéica seja idêntica, o peso molecular da forma intracelular é de 135 kDa e da invertase extracelular é superior a 270 kDa (podendo chegar a complexos com mais de 800 kDa). Esta diferença na massa se deve as glicosilações adicionadas à forma extracelular durante sua síntese e tráfego pela via secretória das células, modificações que conferem proteção contra a ação de proteases (não interferindo na ação invertásica), contribuindo para a formação de complexos protéicos na forma de tetrâmeros, hexâmeros e até mesmo octâmeros da enzima, garantindo sua retenção no espaço periplasmático da célula (REDDY et al., 1988; ALVARADO et al., 1990; ARRUDA, VITOLO, 1999).

A regulação da expressão gênica do gene *SUC2* é muito complexa, e depende da ativação de várias cascatas de regulação. Enquanto a invertase intracelular é expressa constitutivamente, a expressão da forma extracelular é reprimida por altas concentrações de sacarose e seus produtos de hidrólise (glicose e frutose), ou inclusive outros açúcares como manose ou até xilose. Foi também estabelecido que a eficiente expressão de invertase requer baixos níveis de glicose e frutose no meio (REDDY et al., 1988; BU, OZCAN et al., 1997; SCHMIDT, 1998; DYNESEN et al., 1998; ECHEGARAY et al., 2000; HERWING et al., 2001; HAQ, SHAFIQ, ALI, 2003; BELINCHÓN, GANCEDO, 2006).

A complexidade do controle da expressão gênica do *SUC2* ocorre devido a um grande número de proteínas que atua reprimindo sua transcrição. Essas proteínas dependem do funcionamento das vias de sinalização pelo AMP cíclico (AMPc), que é ativada pela presença da sacarose e/ou glicose no meio; pela via HOG, que é ativada pela pressão hiperosmótica no meio; pela via repressora *MIG1*, ativada pela atividade de fosforilação da glicose e/ou frutose pela Hxk2p no interior da célula; e, indiretamente, pela via de sinalização que ativa a expressão das permeases *HXT*, que é ativada pela presença de glicose no meio

extracelular permitindo a eficiente captação da glicose e/ou frutose para o interior da célula (LOBO, MAITRA, 1977; NEIGEBORN et al., 1986; TODA, UNO, ISHIKAWA, 1985; ÖZCAN et al., 1996; BOLES, HOLLENBERG, 1997; YUN et al., 1997; MORIYA, JOHNSTON, 2004; KRESNOWATI, VAN WINDEN, ALMERING, 2006; PEETERS et al., 2006; AHUATZI et al., 2007; GANCEDO, 2008).

Figura 4 – Estrutura dos genes *SUC* e tradução das formas intra e extracelular da invertase de *S. cerevisiae*. Localização da região de ativação da transcrição dos genes *SUC* (UAS – *Upstream Activating Sequence*) e os sítios de ligação de proteínas reguladoras (CRE, SUCA e SUCB), incluindo o TATA-box. Os códons que permitem o início da transcrição em cada RNAm estão representados em verde, e a sequência do peptídeo sinal sublinhada.



FONTE: (DÁRIO, 2007)

Como descrito acima (Figura 4), o gene do *SUC* é precedido por 4 regiões de ligação de fatores de transcrição: os sítios CRE, A e B, e a região TATA. A via HOG (cascata de proteínas ativadas por osmosensores de membrana) reduz a expressão do gene *SUC* por meio da fosforilação e desligamento da proteína ativadora Sko1p no sítio CRE, sítio usualmente relacionado à resposta pelo estresse. A via sinalizadora do AMPc ,cascata

de proteínas ativadas pela Gpr1p, um sensor de alta afinidade para a sacarose e baixa afinidade para glicose (LEMAIRE et al., 2004), controla a expressão do *SUC* pela ligação da proteína repressora Sfl1p na região TATA e pela suposta ligação de proteínas ativadoras nos sítios A e B. (MATSUMOTO et al., 1982; VAN DE VELDE, THEVELEIN, 2008).

Já na via repressora *MIG1* (cascata de proteínas ativadas pela atividade de fosforilação da glicose, exercida pela Hxk2p) sua regulação se dá pela ligação do complexo de proteínas repressoras formado pela Mig1p e Hxk2p nos sítios A e B da região promotora do *SUC*, competindo com as supostas proteínas ativadoras, supostamente reguladas pela via de sinalização pelo AMP cíclico. Alguns trabalhos citam também a participação da proteína Rgt1p associada à Mig1p no processo de repressão pela glicose, pela ligação deste complexo apenas no sítio B. Para que estas proteínas possam atuar como repressoras elas precisam estar associadas às proteínas Med8p, Cyc8p e Tup1p, que atuam no complexo como fatores de ligação na fita de DNA e mantém a estabilidade do complexo durante a sinalização celular (KIM, JOHNSTON, 2006; GANCEDO, 2008).

Por outro lado, a análise da captação direta de sacarose por *S. cerevisiae* revelou a presença de um transporte ativo de sacarose acoplado a um simporte de H^+ (BARFORD, PHILLIPS, ORLOWSKI, 1992; MWESIGYE, BARFORD, 1994; STAMBUK et al., 1999), que mostrou-se ser mediado por dois sistemas diferentes: um sistema de captação de alta afinidade (Km ~7 mM) mediado pela permease Agt1p, e um sistema de baixa afinidade (Km > 100 mM) mediado pelo transportador de maltose expresso pelo gene *MALx1* (STAMBUK, BATISTA, DE ARAÚJO, 2000; STAMBUK, DE ARAÚJO, 2001). Desta forma, o transporte ativo de sacarose, mediado pela Agt1p, justifica a existência da invertase intracelular constitutiva, embora a sacarose possa também ser hidrolisada por outras glicosidases intracelulares, como a α-glicosidase (maltase), que tem a mesma afinidade e atividade com sacarose e maltose (KAHN, ZIMMERMANN, EATON, 1973). De fato, recentemente foi demonstrado que leveduras sem transportadores de hexoses (portanto incapazes de

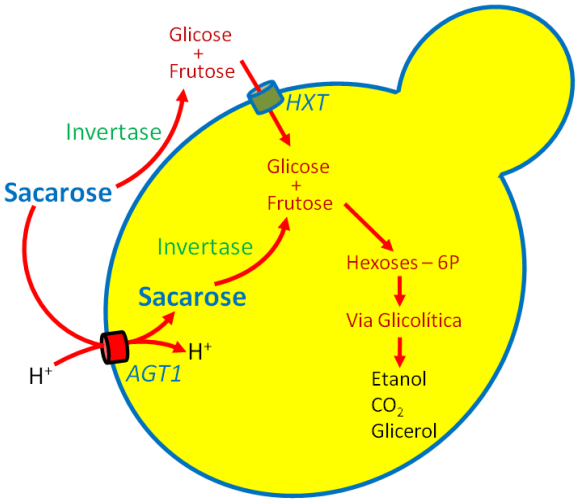
fermentar glicose ou frutose), ou mesmo leveduras sem atividade invertase, fermentam a sacarose através da captação direta desse carboidrato a partir do meio pelo transporte ativo mediado pela permease Agt1p e posterior hidrólise intracelular pela maltase e/ou invertase intracelular (STAMBUK, BATISTA, DE ARAÚJO, 2000; STAMBUK, DE ARAUJO, 2001; BATISTA, MILETTI, STAMBUK, 2004; BADOTTI, BATISTA, STAMBUK, 2006; DÁRIO, 2007; BADOTTI et al., 2008). Entretanto, para o sistema de transporte de sacarose pela Agt1p funcionar eficientemente, é necessário que as linhagens utilizadas possuam os genes da família *MAL* sendo expressos constitutivamente em seu genoma, uma vez que em linhagens onde este sistema é induzível, é necessária a presença de maltose e/ou maltotriose para ocorrer a expressão dos genes da família. A sacarose não é capaz de regular (induzir) a expressão dos genes *MAL* (BATISTA, MILETTI, STAMBUK, 2004; BADOTTI, BATISTA, STAMBUK, 2006; BADOTTI et al., 2008).

Existem alguns alelos para alguns dos genes da família *MAL* que apresentam expressão gênica independente da indução pela maltose. À este fenótipo é dado o nome de *MAL* constitutivo (MAL^C). Estes alelos são mutações dos loci *MAL* (WANG, NEEDLEMAN, 1995; GIBSON et al., 1997). Normalmente, a indução da expressão dos genes MAL ocorre a partir da ligação da maltose à proteína reguladora Malx3p, causando uma mudança conformacional desta, resultando na sua ativação. Assim, a proteína reguladora se torna capaz de se ligar a região UAS_{MAL}, resultando na transcrição dos genes que codificam o transportador e a α-glicosidase. Porém, no caso dos alelos constitutivos dos genes *MALx3*, as mutações neles existentes resultam em uma conformação distinta capaz de induzir a expressão dos genes *MAL* independentemente da presença da maltose (WANG, NEEDLEMAN, 1995; GIBSON et al., 1997). Linhagens *MAL* constitutivas podem apresentar tanto a sensibilidade como a insensibilidade à repressão pela glicose (GIBSON et al., 1997; HIGGINS et al., 1999).

Portanto, duas vias de utilização de sacarose são conhecidas na levedura *S. cerevisiae* (Figura 5): pela ação da invertase extracelular a

sacarose é hidrolisada em glicose e frutose, sendo seus produtos de hidrólise captados pelos transportadores *HXT* e fermentados, ou alternativamente a sacarose pode ser captada diretamente através do co-transporte com H^+ e hidrolisada internamente pela invertase intracelular ou maltase (BARFORD, PHILLIPS, ORLOWSKI, 1992; ORLOWSKI, BARFORD, 1991; MWESIGYE, BARFORD, 1996; STAMBUK, BATISTA, DE ARAÚJO, 2000; STAMBUK, DE ARAUJO, 2001; BATISTA, MILETTI, STAMBUK, 2004; BADOTTI, BATISTA, STAMBUK, 2006; DÁRIO, 2007; BADOTTI et al., 2008).

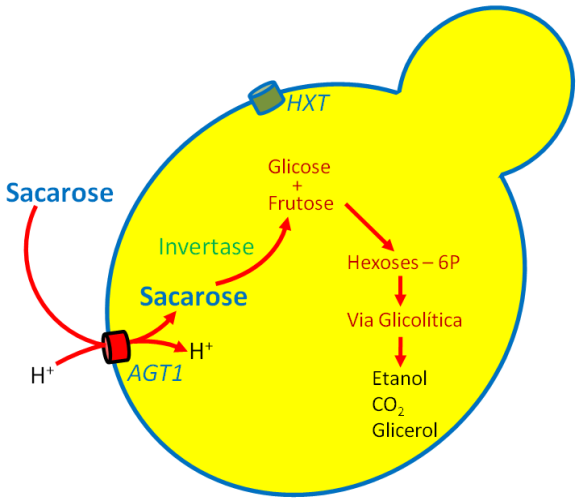
Figura 5 - Representação do perfil de consumo da sacarose apresentado pela linhagem *Wild Type*.



FONTE: (ESPÍRITO SANTO, 2012)

No presente trabalho foram desenvolvidas várias linhagens haplóides de *S. cerevisiae*, pela modificação na estrutura e expressão do gene *SUC2*, resultando em linhagens que não apresentam atividade invertase extracelular, mas que sobre-expressam a forma intracelular da enzima. Além disso, a expressão do gene *AGT1* também foi modificada de forma a incrementar (ou não) a atividade da permease Agt1p. A partir destas linhagens haplóides e após cruzamentos entre as mesmas, foram obtidas linhagens diplóides com o perfil de captação direta e hidrólise intracelular da sacarose (Figura 6), e seu perfil de fermentação do açúcar avaliado em condições que simulam as fermentações industriais.

Figura 6 - Representação do novo perfil de consumo da sacarose proposto neste trabalho.



FONTE: (ESPÍRITO SANTO, 2012)

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Principal

Visando aumentar o rendimento da produção de etanol no Brasil, o presente trabalho tinha como objetivo obter linhagens diplóides da levedura *Saccharomyces cerevisiae* que consomem a sacarose apenas pela captação direta e hidrólise intracelular do açúcar, sendo estas linhagens modificadas através de técnicas de engenharia genômica.

2.2 Objetivos Específicos

1. Modificar a expressão dos genes *SUC2* e *AGT1* em linhagens haplóides, com a finalidade de obter células capazes de metabolizar a sacarose apenas por intermédio da captação direta e hidrólise intracelular do dissacarídeo;
2. Realizar vários cruzamentos entre estas linhagens, no intuito de obter células diplóides com várias combinações dos genes *SUC2 e AGT1*, modificados ou não;
3. Avaliar a atividade invertase e de transporte ativo de açúcares pelas linhagens, bem como a expressão dos genes correspondentes;
4. Avaliar o desempenho fermentativo e rendimento alcoólico destas células em meios contendo baixas e altas concentrações de sacarose;

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Linhagens utilizadas

As linhagens de *S. cerevisiae*, os primers e plasmídeos utilizadas neste trabalho se encontram nas Tabelas 1, 2 e 3, respectivamente. A linhagem haplóide de laboratório CEN.PK2-1C foi utilizada para a obtenção das diferentes linhagens modificadas através de transformações e cruzamentos, conforme será descrito em detalhes.

3.2 Meios de cultura e condições de crescimento

As células foram pré-inoculadas em tubos de ensaio, contendo 3 mL de meio líquido YP (2 % Peptona e 1 % extrato de levedura – ambos da SIGMA) contendo 2 % de glicose, e incubadas por 48 h em temperatura ambiente sob agitação de 40 rpm em uma incubadora giratória para tubos de ensaio (DIST – 431). Todos os meios tiveram seu pH ajustado para 5,0 com ácido clorídrico e foram esterilizados por autoclave, a 120 °C por 20 min.

Para os ensaios de fermentação e determinação das atividades enzimáticas e de transporte, uma alíquota do pré-inóculo (0,05 mL) foi transferida para frascos erlenmeyers contendo 1/5 do seu volume de meio líquido YP contendo 2 % sacarose, glicose ou maltose, para pré-crescimento das células. Os meios tiveram seu pH ajustado para 5,0 com ácido clorídrico e foram esterilizados por autoclave, a 120 °C por 20 min. As culturas foram colocadas em uma incubadora orbital de frascos (Nova Ética 430) a 28 °C e 160 rpm por 16-20 h até as células atingirem o início da fase exponencial de crescimento (OD_{570} ±3,7). As células de levedura foram removidas do meio de cultivo por centrifugação a 3.000 g por 5 min, lavadas três vezes com água destilada a 4 °C e ressuspensas em água

destilada a 4 °C, de forma a atingir uma concentração celular de 20 g/L (± 1).

Os meios sólidos foram constituídos de meio líquido rico YP contendo 2 % de bacto-ágar e de glicose, maltotriose ou sacarose, dependendo do foco do experimento. Quando necessário, foram adicionados aos meios 0,0003 % de Antimicina A (um inibidor da cadeia respiratória, usado para induzir o crescimento celular apenas por fermentação).

Para os ensaios de crescimento celular, após pré-cultivo por 48 h as células foram inoculadas em placas de Elisa de 96 poços contendo 100 µL de meio total por poço e incubadas à temperatura de 28 °C sob agitação de 100 rpm em uma leitora de placas (TECAN – Infinite 200). Os meios eram constituídos por YP contendo 2 % de glicose, maltose, maltotriose, sacarose ou rafinose, dependendo do foco do experimento As placas foram seladas com filme selador de placas (E & K Scientific), e a densidade ótica a 600 nm foi registrada a cada 15 min.

3.3 Construção das linhagens diplóides

As condições para a construção e seleção das linhagens diplóides foram já descritas na literatura (AUSUBEL et al., 1992), onde as linhagens haplóides, com as características de interesse e de sexos diferentes (*MAT***a** e *MAT*α), foram misturadas em um tubo de ensaio contendo aproximadamente 0,5 mL de água destilada estéril. Após agitar o tubo suficientemente para promover a mistura e o contato entre as células de sexos diferentes, toda a mistura foi transferida para uma placa contendo meio mínimo sólido para crescimento seletivo, contendo 2 % ágar, 2 % glicose, e 0,7 % “Yeast Nitrogen Base” (SIGMA). Após o cruzamento, necessidades auxotróficas dos haplóides são compensadas pela diploidia, permitindo o crescimento das células diplóides neste meio sem adição de qualquer outro nutriente.

Tabela 1 - Linhagens de levedura *Saccharomyces cerevisiae* utilizadas.

Linhagem	Genótipo ou informação	Fonte
CEN.PK2-1C	*MAT***a** *MAL2-8^{C} AGT1 MAL12 mal13 SUC2 ura3-52 his3Δ1 leu2-3_112 trp1-289*	Euroscarf
CEN.PK122	*MAT***a***/MATα MAL2-8^{C} AGT1 MAL12 mal13 SUC2* (Diplóide Prototrófica)	Euroscarf
PSY003	CEN.PK2-1C *TRP1*-pADH1*::AGT1 suc2Δ::URA3*	LBMBL[1]
PSY004	CEN.PK2-1C *agt1Δ::kan^{r} TRP1*-pADH1*::iSUC2*	LBMBL[1]
BSY021-34B	*MAT***a** *MAL2-8^{C} AGT1 MAL12 mal13 TRP1*-pADH1*::iSUC2 trp1-289 ura3-52*	LBMBL[1]
BSY021-17C	*MATα MAL2-8^{C} AGT1 MAL12 mal13 TRP1*-pADH1*::iSUC2 trp1-289 ura3-52*	LBMBL[1]
BSY022-26C	*MATα MAL2-8^{C} agt1Δ::kan^{r} MAL12 mal13 TRP1*-pADH1*::iSUC2 trp1-289 ura3-52*	LBMBL[1]
BSY021-16D	*MAT***a** *MAL2-8^{C} agt1Δ::kan^{r} MAL12 mal13 TRP1*-pADH1*::iSUC2 trp1-289* (Prototrófica)	LBMBL[1]
BSY021-15B	*MAT***a** *MAL2-8^{C} AGT1 MAL12 mal13 TRP1*-pADH1*::iSUC2 trp1-289 his3Δ1*	LBMBL[1]
BSY021-2B	*MATα MAL2-8^{C} AGT1 MAL12 mal13 TRP1*-pADH1*::iSUC2 trp1-289 ura3-52*	LBMBL[1]
BSY022-6B	*MATα MAL2-8^{C} AGT1 MAL12 mal13 TRP1*-pADH1*::iSUC2 trp1-289 leu2-3_112*	LBMBL[1]
HCJ001	Diplóide PSY003 + BSY021-17C *MAT***a***/MATα MAL2-8^{C} AGT1 MAL12 mal13 suc2Δ::URA3 TRP1-pADH1::iSUC2 TRP1-pADH1::AGT1 trp1-289 ura3-52*	LBMBL[1]
HCJ002	Diplóide PSY003 + BSY022-26C *MAT***a***/MATα MAL2-8^{C} agt1Δ::kan^{r} MAL12 mal13 suc2Δ::URA3 TRP1-pADH1::iSUC2 TRP1-pADH1::AGT1 trp1-289 ura3-52*	LBMBL[1]
HCJ003	Diplóide BSY021-15B + BSY021-2B *MAT***a***/MATα MAL2-8^{C} AGT1 MAL12 mal13 TRP1-pADH1::iSUC2 trp1-289*	LBMBL[1]
HCJ004	Diplóide BSY021-15B + BSY022-6B *MAT***a***/MATα MAL2-8^{C} AGT1 MAL12 mal13 TRP1-pADH1::iSUC2 trp1-289*	LBMBL[1]

continua

Tabela 1 - Linhagens de levedura *Saccharomyces cerevisiae* utilizadas.

HCJ005-2	BSY22-26C *TY-pGPD::AGT1::tPGK-TY*	LBMBL[1]
HCJ006	Diplóide HCJ005-2 + BSY021-15B *MAT***a***/MATα MAL2-8^{C} agt1Δ::kan^{r} AGT1 MAL12 mal13 TRP1-pADH1::iSUC2 pGPD::AGT1::tPGK trp1-289*	LBMBL[1]
HCJ007	Diplóide HCJ005-2 + BSY021-16D *MAT***a***/MATα MAL2-8^{C} agt1Δ::kan^{r} MAL12 mal13 TRP1-pADH1::iSUC2 pGPD::AGT1::tPGK*	LBMBL[1]
HCJ008	Diplóide BSY022-26C + BSY021-15B *MAT***a***/MATα MAL2-8^{C} agt1Δ::kan^{r} AGT1 MAL12 mal13 TRP1-pADH1::iSUC2 trp1-289*	LBMBL[1]
CAT-1	Utilizada na produção de álcool combustível – Isolada na Usina VO de Catanduva, São Paulo/SP	Fermentec Ltda
PE-1	Utilizada na produção de álcool combustível – Isolada na Usina da Pedra, São Paulo/SP	Fermentec Ltda

[1]LBMBL: Laboratório de Biologia Molecular e Biotecnologia de Leveduras – Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) – Florianópolis/SC

FONTE: (ESPIRITO SANTO, 2012)

conclusão

Tabela 2 - Oligonucleotídeos (Primers) utilizados.

Primer	**Sequência (Sentido 5' → 3')**	**Proposta**
Ty-pGRSd-F	CAAATGATGAGAAATAGTCATCTAAATTAGTGGA AGCTGAAACTC**GAGTTTATCATTATCAATAC**[2]	Inserção do *AGT1* regulado pelo *pGPD* nos elementos transponíveis do DNA
Ty-pGRSd-R	TTATCATCATTTTATATGTTTATATTCATTGATCCT ATTACA**CGCAGAATTTTCGAGTTATT**[2]	Inserção do *AGT1* regulado pelo *pGPD* nos elementos transponíveis do DNA
SUC2-F5	TTTCCTTTTGGCTGGTTTTGCAGCCAAAATATCTG CATCA**GAATTCGAGCTCGTTTAAAC**[2] (18 a 57)[1]	Troca do Promotor do gene *SUC2* pelo do *ADH1*
SUC2-R4	GTGTGAAGTGGACCAAAGGTCTATCGCTAGTTTCG TTTGT**CATTGTATATGAGATAGTTG**[2] (100 a 61)[1]	Troca do Promotor do gene *SUC2* pelo do *ADH1*
AGT1 – F5	TACATAGAAGAACATCAAACAACTAAAAAAATAG TATAAT**GAATTCGAGCTCGTTTAAA**[2] (-40 a -1)[1]	Troca do Promotor do gene *AGT1* pelo do *ADH1*
AGT1 – R4	CAGCCTTCTTCTTGCTTACCAATGAAATGATATTT TT**CATTGTATATGAGATAGTTG**[2] (40 a 3)[1]	Troca do Promotor do gene *AGT1* pelo do *ADH1*
Ty-LTR-F	TGGAATAGAAATCAACTATC	Verificação
Ty-LTR-R	ATGGGTGAATGTTGAGATAA	Verificação
V-SUC2, F	GAAATTATCCGGGGGCGAAG (-447 a -428)[1]	Verificação
V-SUC, 100-R	GTGGACCAAAGGTCTATCGC (96 a 76)[1]	Verificação
V-ADH1, F	CTCCCCCGTTGTTGTCTCAC (-382 a -362)[1]	Verificação
V-TRP1, 40-F	GTCCATTGGTGAAAGTTTGCG (31 a 51)[1]	Verificação
V-TRP1, 530-R	CGTCAGTCCACCAGCTAACA (546 a 526)[1]	Verificação
V-AGT1, P-F	GCGAGAGTTTAAGCGAGTTGC (-389 a -368)[1]	Verificação
V-AGT1, 145-R	GTGGTCTAGCTCAAAGGCAC (162 a 142)[1]	Verificação

continua

Tabela 2 - Oligonucleotídeos (Primers) utilizados.

V-GPD-F	CAACCATCAGTTCATAGGTC (promotor GPD)	Verificação
AGT1-389-R	GAAAAACTGGCAGGGCATAC (409 a 389)[1]	Verificação
iSUC2-FW01	TTCCCTACAGAAGTAGCTGTAAA	Sequenciamento do gene *iSUC2*
iSUC2-FW02	TGACGAGGAATGTGATTATAAATCC	Sequenciamento do gene *iSUC2*
iSUC2-FW03	CGGAATCTAGAGCACATTCTGC	Sequenciamento do gene *iSUC2*
iSUC2-FW04	CCAGTCAGAAATCGAGTTCCAA	Sequenciamento do gene *iSUC2*
iSUC2-FW05	AGATGTCGTTGTTCCAGAGCTG	Sequenciamento do gene *iSUC2*
iSUC2-FW06	TCCGATGATTTGACTAATTGGG	Sequenciamento do gene *iSUC2*
iSUC2-FW07	TTGATTGAAGTCCCAACTGAGC	Sequenciamento do gene *iSUC2*
iSUC2-FW08	CCTAGAGTTTGAGTTGGTTTACGC	Sequenciamento do gene *iSUC2*
iSUC2-RV	CCATCCTAGTAGTGTAAGGCAAC	Sequenciamento do gene *iSUC2*
AGT1-oe-FW01	CAAACCCAAATAGCATCAACGC	Sequenciamento do gene *AGT1-oe*
AGT1-oe-FW02	CCACGATCCAAATCATGTTACC	Sequenciamento do gene *AGT1-oe*
AGT1-oe-FW03	CGCAAACTTTCACCAATGGA	Sequenciamento do gene *AGT1-oe*
AGT1-oe-FW04	CCAGTCAGAAATCGAGTTCCAA	Sequenciamento do gene *AGT1-oe*
AGT1-oe-FW05	TGTCTCACCATATCCGCAATG	Sequenciamento do gene *AGT1-oe*
AGT1-oe-FW06	TTGGTAAGCAAGAAGAAGGCTG	Sequenciamento do gene *AGT1-oe*
AGT1-oe-FW07	TGCAAATCACGACTTATATGGTTG	Sequenciamento do gene *AGT1-oe*
AGT1-oe-FW08	GAAGAACGAGACTTGCATGTTTAAC	Sequenciamento do gene *AGT1-oe*
AGT1-oe-FW09	CGCCCTATATGCTAAACGTGAG	Sequenciamento do gene *AGT1-oe*
AGT1-oe-RV	GAGAATACGGTTGACCTGGCAT	Sequenciamento do gene *AGT1-oe*

continuação

Tabela 2 - Oligonucleotídeos (Primers) utilizados.

SUC2-F2	GGTAAGGACTACTATGCCTTGCAAA (847 a 871)[1]	Análise da expressão gênica por qRT-PCR
SUC2-R2	GCCCAGGCAATACCTAATGCT (923 a 903)[1]	Análise da expressão gênica por qRT-PCR
AGT1-F1	CGCACTACTGAGCGCACTGT (372 a 392)[1]	Análise da expressão gênica por qRT-PCR
AGT1-R1	CCCGTTCAAAGTACCGAATTT (435 a 414)[1]	Análise da expressão gênica por qRT-PCR

[1] Correspondente a posição dos nucleotídeos homólogos ao genoma da linhagem a partir do início do gene.
[2] As sequências em negrito são homólogas aos plasmídeos utilizados no estudo.

FONTE: (ESPIRITO SANTO, 2012)

Tabela 3 - Plasmídeos utilizados.

Plasmídeo	**Descrição**	**Fonte**
pFA6a-TRP1-pADH1	*Amp^r ori TRP1-pADH1*	M. S. Longtine
pGRSd	*Amp^r ori CEN6 URA3 pGPD:: - ::tPGK*	M. Jules
pGRSd-AGT1	*Amp^r ori CEN6 URA3 pGPD::AGT1::tPGK*	M. Jules
YCplac33	*Amp^r ori CEN4 URA3 lacZ*	J. M. Thevelein
pSA3.14	*Amp^r ori CEN4 URA3 lacZ::AGT1*	S. L. Alves Jr

FONTE: (ESPIRITO SANTO, 2012)

conclusão

3.4 Ensaios de fermentação em batelada

As células de levedura foram misturadas com meio YP de forma a atingir uma concentração final de 10 g/L de células, 10 g/L de extrato de levedura, 20 g/L de Peptona e 20 ou 200 g/L de sacarose. Os frascos foram incubados a 28 °C e 160 rpm, e alíquotas de 0,5 mL foram removidas em tempos pré-estabelecidos e processadas como descrito a seguir. Para quantificação dos açúcares e produtos da fermentação, os meios foram centrifugados (5.000 g, 1 min) e os sobrenadantes congelados a -20 °C até sua análise.

3.5 Determinação da Concentração Celular

A concentração celular foi determinada pela leitura da Densidade Óptica (DO) em espectrofotômetro a 570 nm (Beckman DU-7), e correlacionada com o peso de células secas.

3.6 Determinações de glicose, glicerol, frutose, sacarose e etanol.

A glicose e glicerol foram quantificados utilizando-se kits enzimáticos comerciais (BioTécnica e/ou Analisa) seguindo as instruções dos fabricantes: 10 µL de amostra incubado com 1 mL de Reagente de Cor em estufa a 37 °C, por 20 minutos. Em seguida foi feito a leitura da absorbância da amostra a 505 nm para as reações com glicose e 500 nm para as com glicerol. As concentrações de glicose e glicerol foram determinadas, correlacionando a absorbância apresentada pela amostra, com a absorbância apresentada por uma solução padrão contendo uma concentração conhecida do componente em análise.

A sacarose foi quantificada utilizando o protocolo adaptado de Holmes (1996). Um volume de 20 µL das amostras foram incubados com 80 µL de uma solução de invertase (1 mg/mL de enzima invertase em tampão CPB (0,05 M Ácido Cítrico; 0,09 M Fosfato Dibásico de Sódio pH 4,5)) a 37 °C, por 30 min e em seguida a 100 °C, por 5 min. Assim, a

sacarose nas amostras, hidrolisada pela invertase, foi determinada quantificando-se a glicose antes e depois da adição da invertase.

A frutose foi calculada pela diferença da concentração de glicose e dos açúcares redutores totais. Os açúcares redutores foram determinados por método químico adaptado de Miller (1959), utilizando 50 µL de amostra e incubada com 150 µL de Reagente DNS (1 % de Ácido Dinitrosalicílico, 2 % de NaOH; 20 % de Tartarato de Sódio e Potássio e 0,2 % de Fenol) a 100 °C, por 10 min, sendo em seguida adicionados 800 µL de água destilada. Através de espectrofotometria a 540 nm, foram feitas as determinações de absorbância, correlacionando as absorbâncias apresentadas pelas amostras, com a equação de reta extraída de uma Curva Padrão, construída a partir de uma solução de glicose 0,2 % (2 g/L).

O etanol foi quantificado enzimaticamente através da reação com a álcool oxidase (AOD) e peroxidase (POD), como descrito por Herberts (2006) e adaptado dos protocolos descritos por Rodionov, Keppen, Sukhacheva (2002) e Salgado et al. (2000). Uma alíquota das amostras (10 µL) foi incubada em placas de ELISA (96 poços de fundo plano) mantidas sobre o gelo, com 200 µL de Reagente Enzimático (0,5 U/mL de Álcool Oxidase (AOD, de *P. pastoris*, SIGMA), 4,0 U/mL de Peroxidase (POD, de raiz-forte, Toyobo, Brasil), 14 mM de 4-Aminoantipirina e 60 mM de Fenol em Tampão Fosfato de Sódio 0,1 M pH 7,5). Após incubação de 1 h a 37 °C foi determinada a absorbância em 415 nm utilizando um leitor para placas de ELISA (TECAN – Infinite 200). A concentração de etanol foi determinada pela correlação de absorbância apresentada pelas amostras, com a equação de reta extraída de uma Curva Padrão, construída com soluções padrão de etanol 1-10 g/L.

3.7 Determinação da Atividade Invertase (Extra e intracelular)

A atividade da invertase extracelular foi determinada como descrito por Silveira, Carvajal, Bon (1996), utilizando-se células íntegras (não permeabilizadas), pré-crescidas em meio YP com 2 % de sacarose ou 2 % de glicose, até o início da fase exponencial de crescimento (OD_{570} ~3,7).

Um volume de 100 µL da suspensão celular foi misturado a 100 µL de Tampão NaF (150 mM de Succinato - Tris pH 5,0; 150 mM de NaF) e incubado em banho maria por 30 min, a 30 °C. Após o término do tempo, foi adicionado 100 µL de sacarose 300 mM e novamente incubados em banho maria por 5 min, a 30 °C. Em seguida, as amostras foram colocadas a 100 °C, por 5 min, seguida por centrifugação a 5.000 g por 3 minutos. Assim, a glicose formada, presente no sobrenadante, foi determinada utilizando kit comercial como descrito acima. Todas as determinações foram realizadas em triplicata e utilizando controles negativos com células fervidas em duplicata. A atividade específica da invertase foi expressa em nmoles de glicose liberada por min^{-1} (correspondente a uma mU), por mg^{-1} de células (peso seco).

A atividade invertase total foi determinada como descrito por Stambuk (1999), utilizando-se células permeabilizadas, pré-crescidas em meio YP com 2 % de sacarose ou 2 % de glicose, até o início da fase exponencial de crescimento (OD_{570} ~3,7). Um volume de 100 µL de células foi centrifugado por 3 min a 5.000 g, lavadas com 500 µL de Tampão A (Mops-NaOH 50 mM pH 6,8) e ressuspensas em 200 µL de Tampão B (Glicerol 20 %, EDTA 1 mM, DTT 1 mM em Tampão Mops-NaOH 50 mM pH 6,8). Para permeabilizar as células foram adicionados 12 µl do Tampão C (Tolueno P.A., Etanol P.A. e Triton X-100 10 %, (1:4:1, v:v:v)) e homogeneizou-se os tubos vigorosamente por 1 min. As células foram centrifugadas por 3 min, a 5.000 g e lavadas com 1 mL do Tampão B e em seguida ressuspensas em 1 mL do Tampão A. Um volume de 50 µL dessa suspensão de células permeabilizadas foi adicionado a 50 µL de uma solução de sacarose (Sacarose 200 mM em Tampão Succinato-Tris 300 mM pH 5,0). As amostras foram incubadas a 30 °C, por 5 min, e em seguida a 100 °C, por 5 min. Utilizou-se o sobrenadante para determinar a atividade enzimática através da determinação da glicose formada. As amostras foram feitas em triplicata e os controles em duplicata com células previamente incubadas a 100 °C por 5 min. A atividade da invertase foi expressa em nmoles de glicose liberada por min^{-1} (correspondente a uma mU), por mg^{-1} de células (peso seco).

A atividade invertase Intracelular foi determinada subtraindo-se o valor da atividade invertase extracelular do valor da atividade invertase total, uma vez que esta última compreende a soma das atividades invertase intra e extracelular. A atividade específica da invertase foi expressa em nmoles de glicose liberada por min^{-1} (correspondente a uma mU), por mg^{-1} de células (peso seco).

3.8 Determinação da Atividade α-glicosidase

A atividade da α-glicosidase (enzima maltase) foi determinada como descrito por Stambuk (1999), utilizando-se células permeabilizadas, pré-crescidas em meio YP com 2 % de sacarose ou 2 % de glicose, até o início da fase exponencial de crescimento (OD_{570} ~3,7). Um volume de 100 µL de células foi centrifugado por 3 min a 5.000 g, lavadas com 500 µL de Tampão A (Mops-NaOH 100 mM pH 6,8) e posteriormente ressuspensas em 200 µL de Tampão B (Glicerol 20 %, EDTA 1 mM, DTT 1 mM em Tampão Mops-NaOH 100 mM pH 6,8). Para permeabilizar as células foram adicionados 12 µL do Tampão C (Tolueno P.A., Etanol P.A. e Triton X-100 10 %, (1:4:1, v:v:v)) e homogeneizou-se os tubos vigorosamente por 1 min. As células foram centrifugadas por 3 min, a 5.000 g e lavadas com 1 mL do Tampão B e em seguida ressuspensas em 1 mL do Tampão A. Um volume de 50 µL dessa suspensão de células permeabilizadas foi adicionado a 950 µL de uma solução de *p*NPαG (*p*-nitrofenil-α-D-glicosídeo) (*p*NPαG 2 mM em Tampão A) ou alternativamente, 40 µL de células foram adicionados à 60 µL de solução de maltose (maltose 200 mM em Tampão A). As amostras foram incubadas a 30 °C, por 1 min (para as amostras com *p*NPαG) ou 5 min (para as amostras com maltose), e em seguida a 100 °C, por 5 min. Utilizou-se o sobrenadante para determinar a atividade enzimática através da determinação do *p*-nitrofenol liberado pela hidrólise do *p*NPαG e a glicose liberada na hidrólise da maltose. O *p*-nitrofenol foi estimado a 400 nm e a glicose foi determinada utilizando um kit comercial, como descrito acima. As amostras foram feitas em triplicata e os controles em duplicata com

células previamente incubadas a 100 °C por 5 min.

3.9 Determinação da Atividade de Transporte com *p*NPαG

A atividade de transporte de α-glicosídeos pela permease Agt1p foi determinada como descrito por Hollatz, Stambuk (2001), utilizando-se células pré-crescidas em meio YP com 2 % de sacarose ou 2 % de glicose, até o início da fase exponencial de crescimento (OD_{570} ±3,7) e o substrato *p*-nitrofenil-α-D-glicosídeo (*p*NPαG). Brevemente, um volume de 100 µL de células (20 g/L) foi misturado a 100 µL de Substrato de Transporte (100 mM de succinato-tris pH 5,0; 10 mM de *p*NPαG) e incubados à temperatura ambiente por 5-10 min. As reações foram interrompidas pela adição de 1 mL de bicarbonato de sódio 2 M e as amostras foram centrifugadas a 5.000 g por 3 min. Em seguida foram retirados 800 µL do sobrenadante e fez-se a estimativa da absorbância do *p*-nitrofenol liberado a 400 nm ($\Delta\varepsilon$ = 14,8 mM^{-1}. cm^{-1}, em pH > 9,0). Todas as determinações foram realizadas em triplicata e utilizando controles negativos com células fervidas em duplicata. As atividades de transporte foram expressas em nmoles de *p*-nitrofenol liberado por mg^{-1} de células por min^{-1}.

3.10 Determinação da atividade de transporte utilizando [^{14}C]-sacarose

O ensaio de transporte pela permease Agt1p, utilizando substrato marcado radioativamente ([^{14}C]-sacarose (Amerscham Biosciences)), foi determinado como descrito anteriormente (SANTOS et al., 1982; MWESIGYE, BARFORD, 1994; STAMBUK et al., 1998; BATISTA, MILETTI, STAMBUK, 2004). Utilizando-se células pré-crescidas em meio YP com 2 % de sacarose, até o início da fase exponencial de crescimento (OD_{570} ~3,7), foi feita uma suspensão celular de 90 g/L em 50 mM de succinato-tris pH 5,0. Após 10 minutos a 30 °C em banho Maria, foi adicionada uma solução de [^{14}C]-sacarose para obter uma concentração

final de 60 g/L de células, 5 mM de [^{14}C]-sacarose, além de glicose e frutose não marcadas radioativamente a 2 mM cada. Após 30 segundos, as células foram rapidamente filtradas em membranas com poros de 0,22 µm de diâmetro e lavadas 3 vezes com uma solução de 0,5 M de sacarose em 0,1 M de succinato-tris pH 5,0. Os filtros foram colocados em tubos de borosilicato, próprios para cintilação, contendo 10 mL do líquido de cintilação. A radioatividade foi medida em equipamento medidor de cintilação Beckman Counter LS6500 (USA). As amostras foram subtraídas dos controles, que foram fervidos por 5 minutos antes de iniciar o experimento. A atividade de transporte foi correlacionada com o peso seco das células, onde 1 mL da suspensão celular a 90 g/L foi filtrada em membranas pré pesadas. Em seguida foram submetidas à secagem em estufa a 65 °C por 60 minutos, e pesados novamente. A diferença entre os pesos das membranas sem as células e após a adição das células é referente ao peso seco celular, e foi utilizado nos cálculos.

3.11 Eletroforese de invertase em gel não denaturante

A corrida eletroforética em gel não denaturante (gel nativo) foi realizada de acordo com Grossmann, Zimmermann (1979). As amostras foram obtidas de acordo com o protocolo de Determinação da Atividade da Invertase Total usando extrato celular, descrito por Stambuk (1999), onde foi feita uma suspensão celular em Mops-NaOH 50 mM pH 6,8 a 20 g/L (±1). Um volume de 500 µL da suspensão foi transferido para um tubo eppendorf juntamente com aproximadamente 200 µL de bolinhas de vidro pré-tratadas com ácido. O tubo foi levado ao vortex por 1 minuto, seguido de repouso no gelo por mais 1 minuto. Este procedimento foi repetido por 5 vezes. Posteriormente, foi coletada a parte líquida, transferida para outro tubo e centrifugada por 3 minutos a 10.000 rpm. Foram coletados 10 µL do sobrenadante do tubo e transferido para outro tubo contendo 40 µL de água e 50 µL de Solução de Carboidrato (200 mM de sacarose em Tampão Succinato-Tris 300 mM pH 5,0). As amostras foram incubadas a 30 °C, por 5 min, e em seguida a 100 °C, por 5 min. Utilizou-se o

sobrenadante para determinar a atividade enzimática através da determinação da glicose formada. As amostras foram feitas em triplicata e os controles em duplicata com células previamente incubadas a 100 °C por 5 min. A atividade da invertase é expressa em nmoles de glicose produzida por mg^{-1} de células por min^{-1}.

Uma alíquota dos extratos celulares com atividade invertase correspondente a 80 mU foram aplicadas em géis de poliacrilamida 7,5 % (acrilamida:bisacrilamida, 37,5:1), e a corrida foi realizada a 150 volts (~60 mili Amperes) a 4 °C por 90 minutos. Após a corrida, o gel foi imerso em uma solução de 200 mM de sacarose em 150 mM Succinato-Tris (pH 5,0) por 45 minutos a 30 °C. O gel foi então lavado em água destilada e imerso em uma solução 0,05% de 2,3,5-trifenil tetrazolium cloridio em 0,5 M NaOH, em banho Maria a 100 °C até a formação da cor vermelha nas regiões contendo açúcares redutores (~2 min).

3.12 PCR

A extração de DNA foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Ausubel et al. (1992), onde foi coletada uma alçada de células no meio sólido e colocadas em um eppendorf contendo 200 µL de DEB ("DNA Extraction Buffer" – 1 % SDS, 100 mM NaCl, 10 mM Tris pH 8,0, 1 mM EDTA pH 8,0, 0,2 % Triton X-100, H_2O MilliQ Autoclavada), e ressuspensa em vortex. Em seguida, adicionou-se bolinhas de vidro até a marca de 700 µL no tubo e 200 µL de Fenol- Clorofórmio (25:24:1 Fenol-clorofórmio-Álcool Isoamílico, em 10 mM Tris pH 8,0 e 1 mM EDTA pH 8,0) seguido por forte agitação dos tubos em vortex por 4 minutos. Em seguida, foram adicionados 200 µL de $T_{10}E_1$ (10 mM Tris pH 7,5, 1 mM EDTA pH 8,0, H_2O MilliQ Autoclavada) e vortexado fortemente por 30 segundos, seguido por centrifugação a 12.000 rpm por 10 minutos. A seguir foram transferidos 300 µL do sobrenadante para outro tubo contendo 750 µL de etanol absoluto gelado (Álcool Etílico Absoluto (99,5 %) P. A.) e vortexado novamente por 1 minuto, seguido por centrifugação a 12.000 rpm por 10 minutos e descarte de todo o sobrenadante. Este

passo foi repetido novamente para retirar qualquer resquício de etanol que tenha ficado nas paredes do tubo. Posteriormente, o tubo foi deixado aberto por 10 minutos para secar o DNA, seguido pela ressuspensão do DNA com 50 µL de H_2O milliQ autoclavada. Em seguida foi feita uma reação para eliminar todo o RNA presente, adicionando RNAse e incubando a 37 °C em estufa por 1 hora. Enfim, a amostra foi guardada em freezer a -20 °C para ser utilizada posteriormente em reações de PCR.

As reações de PCR foram realizadas por meio do kit de PCR STRATAGEN® utilizando 20 pmol de cada primer verificador (primer F e primer R, vide Tabela 2). Foi utilizado um termociclador Mastercycler Gradient® (Eppendorf), com um passo inicial de 2 min a 95 °C, seguido por 30 ciclos de 20 s a 95 °C; 40 s a 54 °C e 3 min a 72 °C. Ao final dos ciclos foi realizada uma extensão de 10 min, a 72 °C. Em seguida, a reação de PCR foi analisada através de eletroforese em gel de agarose 0,7 % em Tampão TBE (45 mM Tris-borato, 1 mM EDTA pH 8,0) contendo 2,5 µg/mL de brometo de etídio para observação das bandas em luz U.V..

3.13 Análise de expressão gênica através de RT-PCR em tempo real quantitativo (qRT-PCR)

Para efetuar as análises da expressão dos genes *AGT1* e *SUC2*, modificados ou não, nas linhagens estudadas, as células foram pré-crescidas em meio YP contendo 2 % de sacarose ou 2 % de glicose, até o início da fase exponencial de crescimento (OD_{570} ~3,7), quando então foram rapidamente coletadas, lavadas com água destilada gelada (4 °C) e congeladas em nitrogênio líquido. A seguir as células foram armazenadas a -80 °C para posterior análise. O RNA total das células foi extraído pelo método de TRIzol (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante. Posteriormente, o RNA extraído foi tratado com a enzima DNAse (Roche) para eliminar os fragmentos de DNA potencialmente restantes. Em seguida foi realizado a síntese de cDNA utilizando o kit Reverse Transcription System (Promega) de acordo com as instruções dos fabricantes. Para a execução do processo de PCR em tempo real, foi utilizado o kit KAPA

SYBR FAST qPCR (KAPABiosystems) também de acordo com as especificações do fabricante. Na reação foram empregados os respectivos oligonucleotídeos (Tabela 2) com homologia específica aos genes em questão. Uma curva padrão com cinco pontos foi realizada para cada gene a ser analisado. Todo o processo de reação e análise dos dados foi feito no equipamento StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems) com software próprio. Em cada ensaio foi gerada uma curva de dissociação para confirmar a amplificação de apenas um produto. Todas as amostras foram avaliadas em triplicata.

3.14 Sequenciamento dos alelos

As análises de sequenciamento foram feitas com os genes *AGT1* da linhagem CEN.PK2-1C, com a sua forma modificada com a inserção do gene *TRP1* e do promotor da *ADH1* entre o promotor natural e a ORF, *AGT1*-oe, da linhagem PSY003; do gene *SUC2*, também da linhagem CEN.PK2-1C e da sua forma modificada com a inserção do gene *TRP1* e do promotor *ADH1* entre o peptídeo sinal e a ORF, *iSUC2*, da linhagem HCJ005-2. Todas as 4 linhagens são haplóides e apresentam apenas um alelo de cada gene (vide Tabela 1).

Para o sequenciamento foi extraído o DNA genômico de cada linhagem segundo o protocolo descrito por Ausubel et al. (1992). Em seguida, os genes foram amplificados por PCR utilizando os primers AGT1-oe-FW01 e AGT1-oe-RV, no caso do *AGT1* e da sua variante modificada *AGT1*-oe, e os primers iSUC2-FW01 e iSUC2-RV, no caso do *SUC2* e da sua variante modificada *iSUC2*. Após a amplificação, as amostras foram purificadas utilizando o kit Wizard (Promega) e encaminhadas juntamente com os respectivos primers (Tabela 2) ao VIB Genetic Service Facility (Bélgica) para serem sequenciados. Os resultados foram analisados e alinhados utilizando o software Vector NTI Advance 11.0 (Invitrogen).

4 RESULTADOS

4.1 Obtenção das linhagens geneticamente modificadas

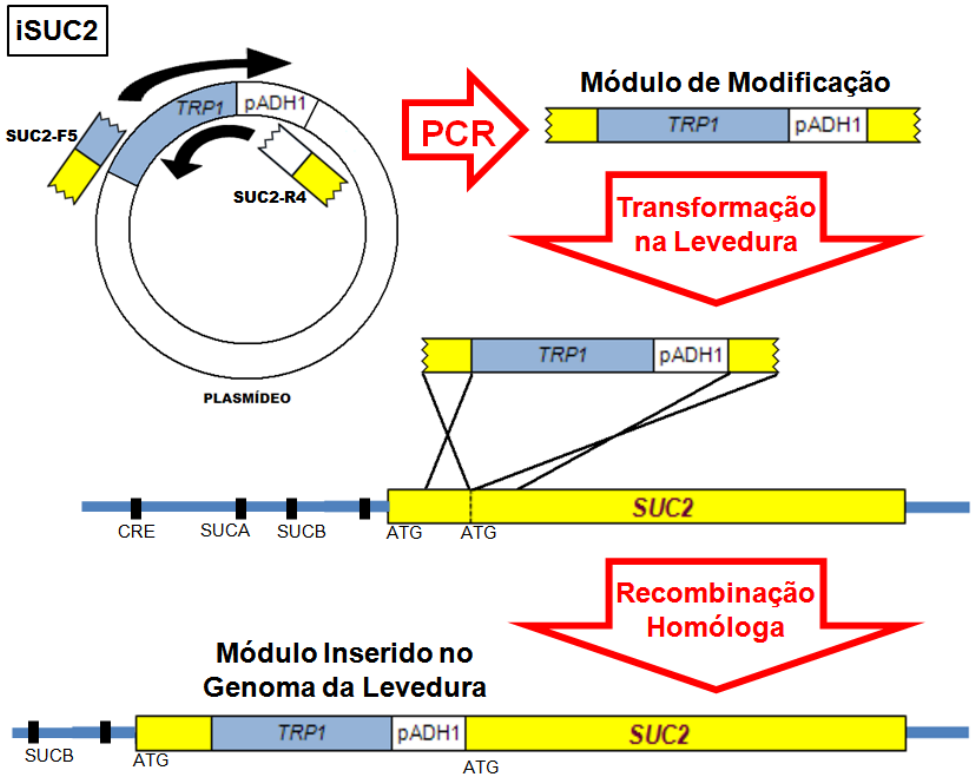
Todas a linhagens desenvolvidas neste estudo são oriundas da família de linhagens CEN.PK, linhagens de laboratório indicadas para estudos fisiológicos por serem mais próximas das leveduras industriais, além de possuir a capacidade de fermentar maltose e expressar os genes *MAL* constitutivamente (VAN DIJCKEN et al., 2000).

Os genes *AGT1* e *SUC2* foram sobre-expressados e/ou inseridos no genoma das linhagens de levedura pelo processo de recombinação homóloga, através de metodologias baseadas em PCR, como descrito por Puig et al. (1998), Petracek, Longtine (2002) e Batista, Miletti, Stambuk (2004). Inicialmente foi produzido um fragmento linear de DNA que apresenta extremidades (30 – 60 pares de bases) com homologia ao alvo de interesse no genoma da levedura, fragmento este chamado "módulo de modificação". Para isto, plasmídeos contendo as sequências de interesse foram utilizados em uma reação de PCR, juntamente com oligonucleotídeos iniciadores (primers) construídos de forma a conter regiões de homologia às regiões de interesse no plasmídeo e às regiões alvo no DNA da levedura (ver Tabela 2). Quando as células foram transformadas com este módulo, ele se integrou por recombinação homóloga ao DNA da levedura, resultando em uma linhagem com a nova sequência de DNA inserida na região de interesse. Após a transformação, os mutantes foram então selecionados em placas de Petri, contendo meio de cultivo confeccionado com a suplementação requerida pelos marcadores inseridos juntamente com a sequência de interesse, sendo posteriormente realizada a confirmação por PCR utilizando primers que permitem verificar se houve ou não a inserção correta do módulo no genoma da levedura.

A Figura 7 demonstra como foi realizada a sobre-expressão dos genes

AGT1 (*AGT1-oe*) e a forma intracelular do *SUC2* (*iSUC2*).

Figura 7 - Estratégia de modificação dos genes *SUC2* e *AGT1* nas linhagens de *S. cerevisiae*. A mesma estratégia apresentada acima para o gene *SUC2* foi utilizada na sobre-expressão do gene *AGT1*, porém substituindo-se os primers SUC2-F5 e SUC2-R4 pelos primers AGT1-F5 e AGT1-R4, respectivamente (Tabela 2).

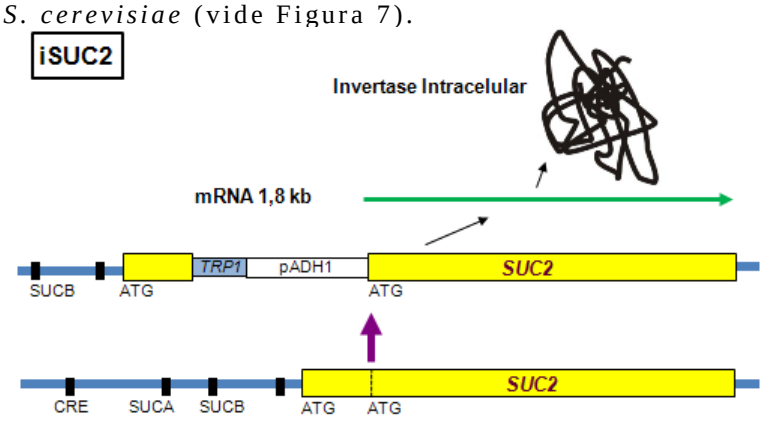


FONTE: (ESPIRITO SANTO, 2012)

Como descrito na introdução, o gene *SUC2* expressa duas formas da enzima invertase. O propósito da intervenção na expressão deste gene se baseia no interesse de que a forma extracelular da invertase não seja mais expressa nas linhagens. Ainda mais, é de alto interesse neste trabalho que as linhagens apresentem alta expressão da forma intracelular da enzima. No caso do gene *SUC2*, a inserção do marcador auxotrófico de seleção *TRP1* e o promotor forte constitutivo do gene homólogo *ADH1* no seu interior, exatamente após a sequência de sinalização da forma extracelular da enzima, permitiu a transcrição de um mRNA sem esta sequência sinalizadora, expressando de forma constitutiva apenas a forma intracelular *iSUC2* (Figura 8). Estratégia semelhante foi utilizada para sobre-expressar o gene *AGT1* em algumas linhagens, porém, neste caso, o

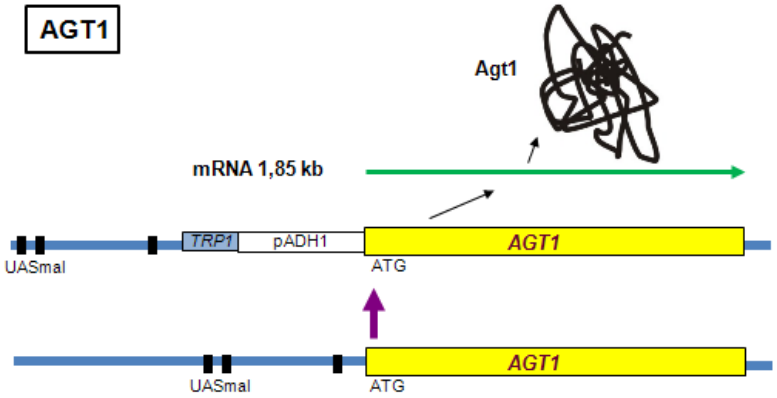
local de inserção separa apenas o promotor natural do gene e preserva toda a ORF (ing - *open reading frame*) (Figura 9).

Figura 8 - Estratégia de sobre-expressão da forma intracelular da enzima invertase em *S. cerevisiae* (vide Figura 7).



FONTE: (ESPIRITO SANTO, 2012)

Figura 9 - Estratégia de sobre-expressão da permease Agt1p em *S. cerevisiae* (vide Figura 7).

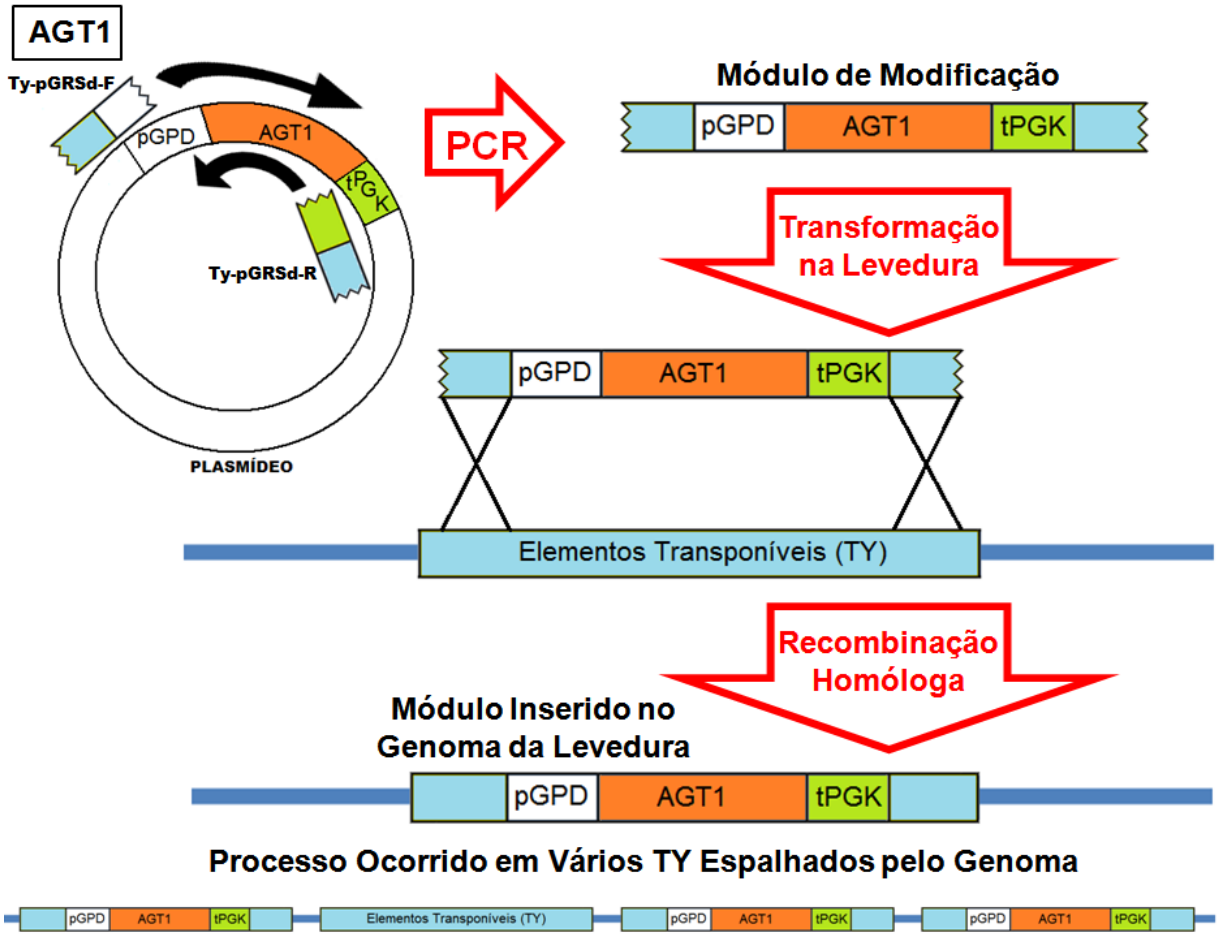


FONTE: (ESPIRITO SANTO, 2012)

Em outras linhagens, a estratégia escolhida para sobre-expressar o gene *AGT1* foi diferente. O promotor forte constitutivo empregado foi o do gene da gliceraldeído-3P-desidrogenase (*pGPD*) (Figura 10). Além disso, todo o gene *AGT1* foi amplificado dentro do módulo de modificação. Isso nos permitiu lançar mão de uma estratégia de inserção deste módulo nas regiões dos elementos de transposições do genoma de *S. cerevisiae*, estratégia descrita por Guerra et al. (2006). Esta estratégia não utilizou a inserção de nenhum marcador auxotrófico de seleção, obrigando a realização do procedimento de transformação em uma

linhagem de *S. cerevisiae* que não apresentava o gene *AGT1* em seu genoma. A seleção desta linhagem foi realizada em meios contendo maltotriose como fonte de carbono e antimicina A (ALVES JUNIOR et al., 2008).

Figura 10 - Estratégia de inserção nos elementos TY e sobre-expressão da permease Agt1p nas linhagens de *S. cerevisiae*.



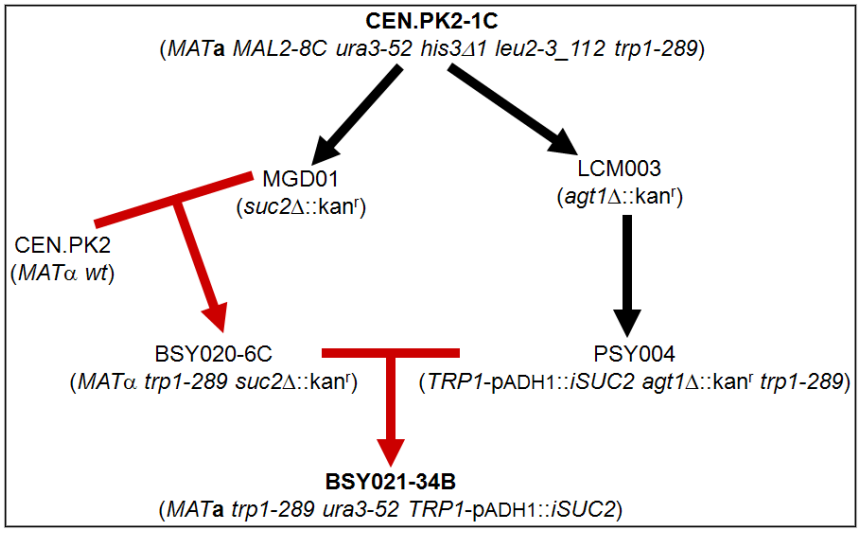
FONTE: (ESPIRITO SANTO, 2012)

Após uma série de transformações e cruzamentos, a linhagem CEN.PK2-1C deu origem a uma grande variedade de novas linhagens com características definidas. A Figura 11 apresenta, por exemplo, como a linhagem BSY021-34B foi obtida. Esta linhagem foi utilizada neste estudo como representante do grupo de várias linhagens haplóides que apresentam a sobre-expressão do *iSUC2* em seu genoma (STAMBUK et al., 2009a).

Já a Figura 12 apresenta como a linhagem diplóide HCJ003 foi

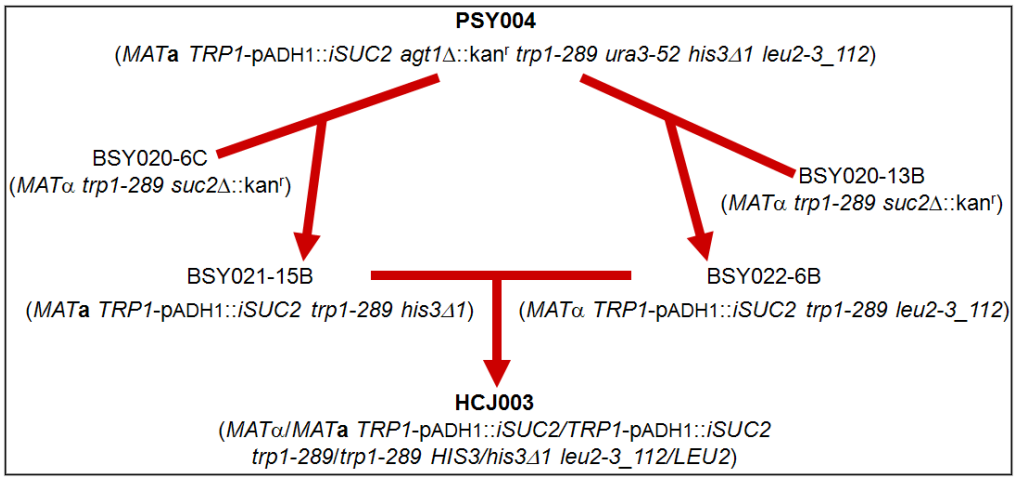
criada. Na Figura 13 pode ser compreendido como todas as linhagens diplóides utilizadas neste estudo foram obtidas.

Figura 11 - Obtenção da linhagem BSY021-34B. As linhagens sofreram transformações (setas pretas) e cruzamentos (setas vermelhas) até alcançarem os perfis de interesse para o estudo, conforme descrito em Materiais e Métodos.



FONTE: (ESPIRITO SANTO, 2012)

Figura 12 - Obtenção da linhagem HCJ003. As linhagens sofreram cruzamentos (setas vermelhas) até alcançarem os perfis de interesse para o estudo, conforme descrito em Materiais e Métodos.

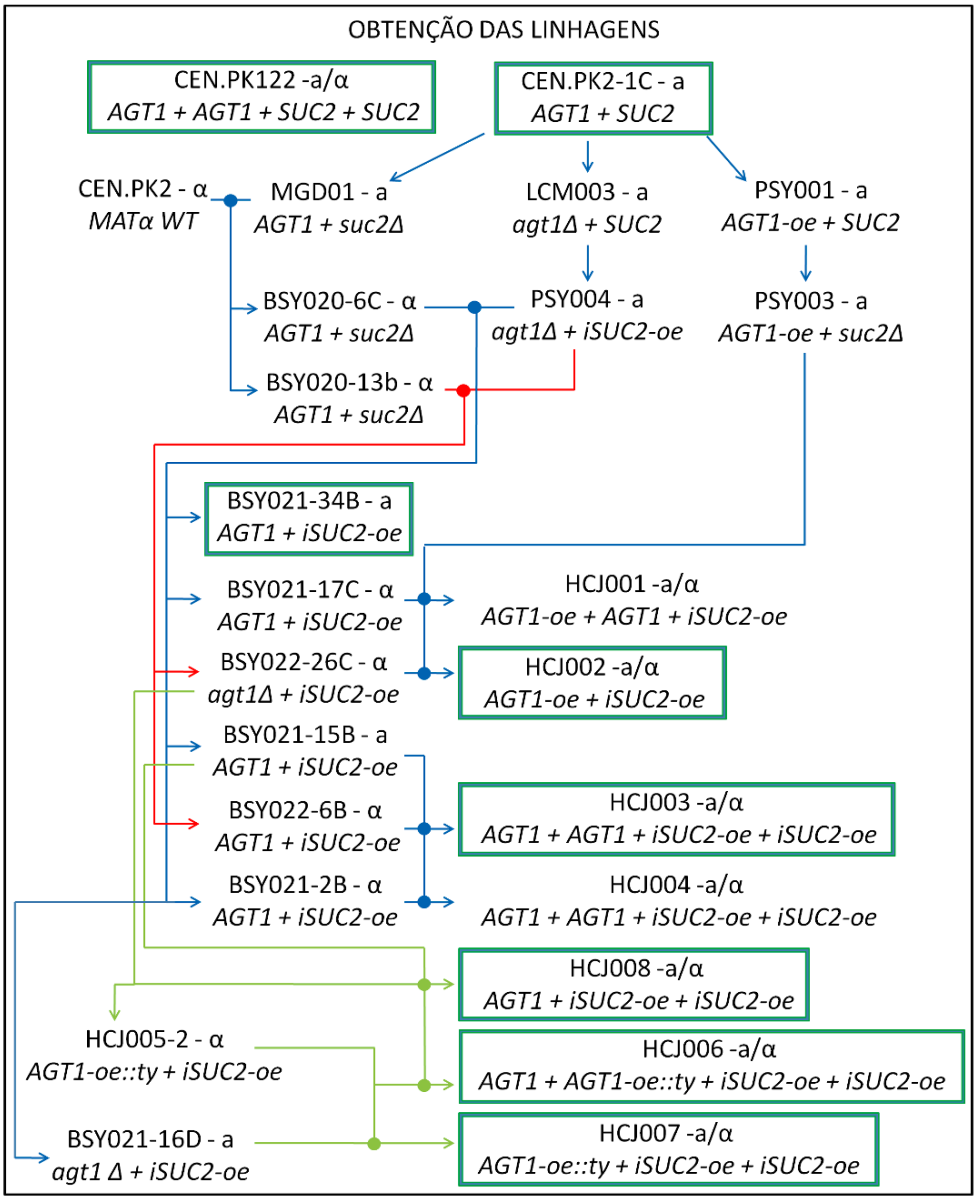


FONTE: (ESPIRITO SANTO, 2012)

A linhagem diplóide CEN.PK122 é uma linhagem da família da CEN.PK2-1C, e possui o mesmo background genético desta (Tabela 1). A CEN.PK122 foi utilizada neste trabalho como parâmetro de comparação para as novas linhagens de laboratório diplóides modificadas. As

linhagens diplóides industriais CAT-1 e PE-2 são linhagens isoladas de dornas de fermentação em processos industriais de produção de etanol (BASSO et al., 2008; STAMBUK et al., 2009b), e foram utilizadas neste trabalho como parâmetro de comparação.

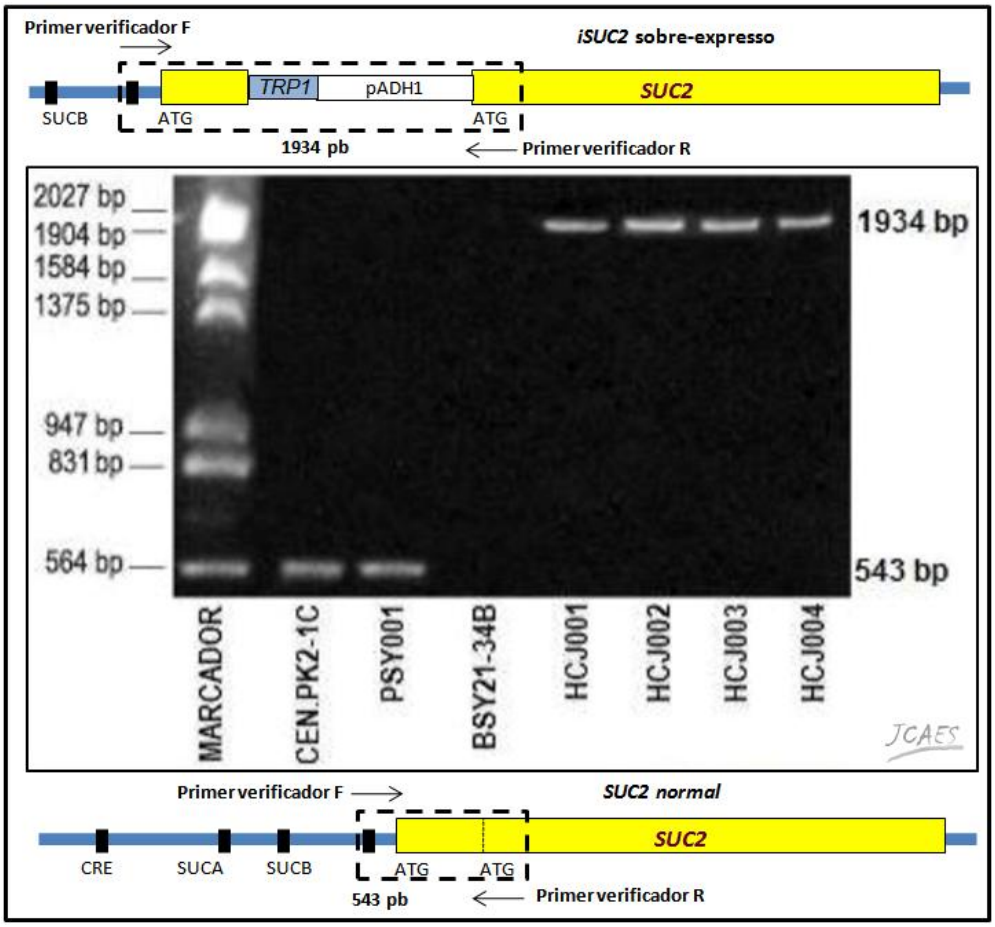
Figura 13 - Obtenção das linhagens diplóides geneticamente modificadas. Esta figura apresenta de modo básico a origem de cada linhagem utilizada neste estudo. As características de interesse neste trabalho estão citadas de forma resumida abaixo do nome de cada linhagem. Legendas: a = *MAT*a, α = *MAT*α, oe = "overexpressed" (sobre-expressada), *TY1* = construção gênica inserida nas regiões dos elementos transponíveis. As setas de diferentes cores foram usadas apenas para distinguir as setas que se sobrepõem. Os cruzamentos ocorrem apenas nos círculos fechados.



FONTE: (ESPIRITO SANTO, 2012)

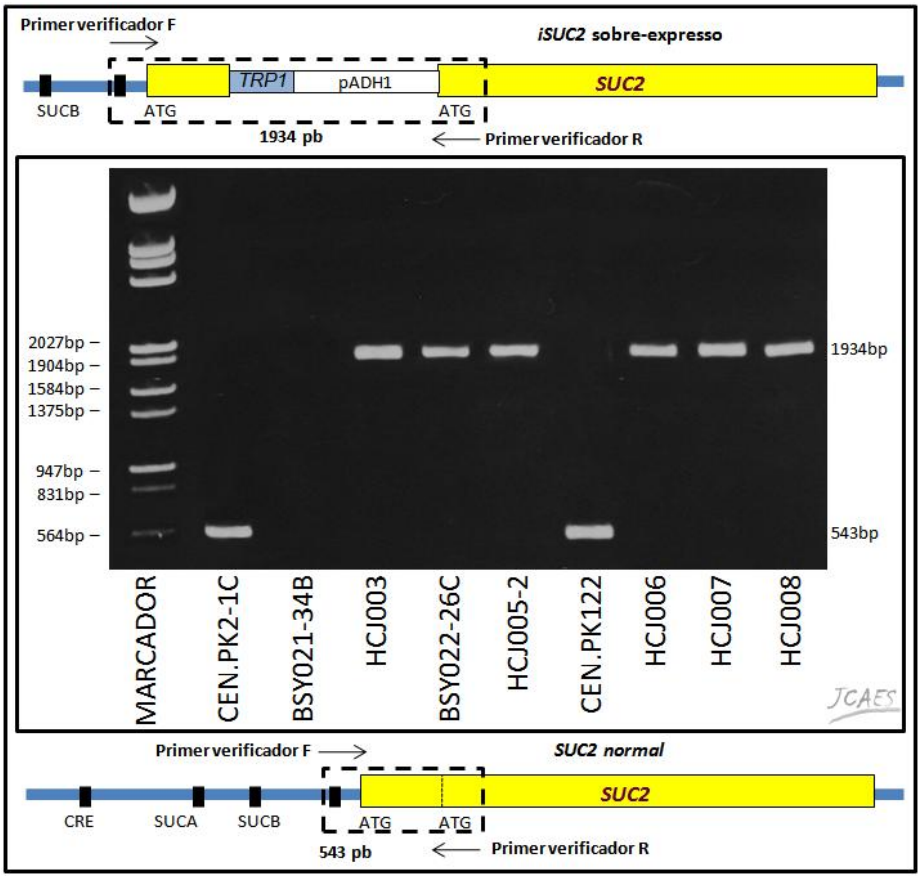
Como o objetivo deste trabalho foi o de obter linhagens com a capacidade de consumir a sacarose apenas por meio da sua captação direta pela permease Agt1p e sua posterior hidrólise apenas pela forma intracelular da enzima invertase, foi necessária a intervenção nas formas de expressão dos seus respectivos genes, *AGT1* e *SUC2*, conforme descrito acima. As Figuras 14 e 15 apresentam os resultados da análise por PCR visando a confirmação da inserção de um fragmento de DNA contendo o gene marcador auxotrófico *TRP1* e o promotor forte constitutivo p*ADH1* à frente do gene *SUC2*, produzindo o alelo *iSUC2* nas linhagens de interesse.

Figura 14 - Confirmação por PCR da inserção do módulo de sobre-expressão na região do gene *SUC2* no genoma de linhagens de *S. cerevisiae*, utilizando um único par de primers. Os tamanhos dos fragmentos obtidos indicam a presença da construção desejada.



FONTE: (ESPIRITO SANTO, 2012)

Figura 15 - Confirmação por PCR da inserção do módulo de sobre-expressão na região do gene *SUC2* no genoma de linhagens de *S. cerevisiae*, utilizando dois pares de primers. Os tamanhos dos fragmentos obtidos indicam a presença da construção desejada.



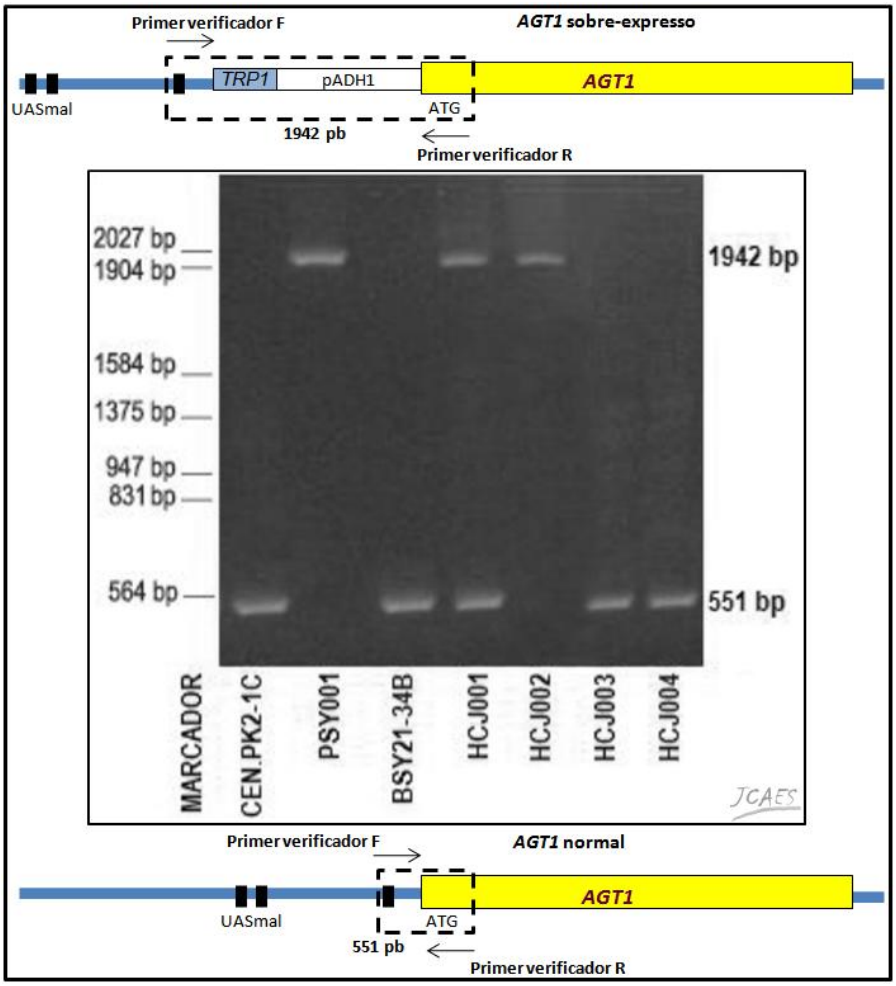
FONTE: (ESPIRITO SANTO, 2012)

Para as linhagens *wt* (*wild-type*), que não sofreram qualquer intervenção genética em laboratório no gene *SUC2*, com o par de primers utilizado (Tabela 2) esperava-se a formação de um fragmento de 543 pb, enquanto que nas linhagens *iSUC2*, esperava-se um fragmento bem maior, de 1934 pb. O tamanho dos fragmentos apresentados nas Figuras 14 e 15 é condizente com a modificação genetica introduzida na linhagem estudada, exceto pela linhagem BSY021-34B, na qual por motivos ainda não esclarecidos não apresentou amplificação de nenhum fragmento por PCR específico para a construção do alelo *iSUC2*, embora os experimentos que serão apresentados adiante confirmam a sobre-expressão do *iSUC2* nesta linhagem.

Uma análise semelhante visando confirmar a modificação da região promotora e sobre-expressão do gene *AGT1* esta mostrada na Figura 16.

Os resultados de PCR, utilizando os respectivos primers (Tabela 2), mostram que as linhagens sem alteração no gene *AGT1* apresentam um fragmento de 551 pb, enquanto que aquelas linhagens nas quais foi inserido o módulo *TRP1*+p*ADH1* à frente do *AGT1* apresentam um fragmento de 1942 pb. Inclusive, pode ser verificada a existência dos dois alelos na linhagem HCJ001 (vide Figura 16 e Figura 13 acima).

Figura 16 - Confirmação por PCR da inserção do módulo de sobre-expressão na região do gene *AGT1* no genoma de linhagens de *S. cerevisiae*. Os tamanhos dos fragmentos obtidos indicam a presença da construção desejada.

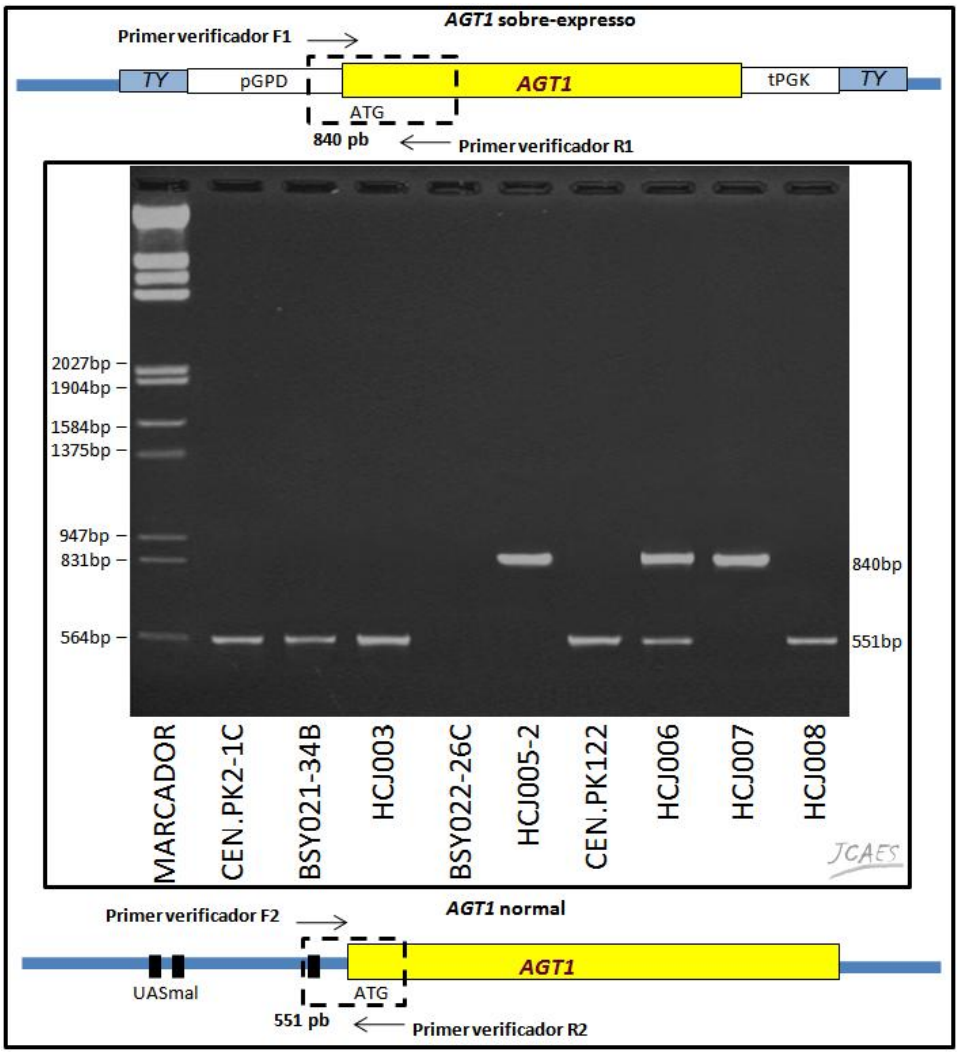


FONTE: (ESPIRITO SANTO, 2012)

A Figura 17 apresenta a confirmação por PCR da sobre-expressão do gene *AGT1*, utilizando a estratégia de inserção do módulo contendo o promotor forte constitutivo p*GPD* seguido pelo gene *AGT1* com seu terminador trocado pelo t*PGK*, nas regiões dos elementos *Ty1*. Pela região

de ligação dos oligonucleotídeos, esperava-se a obtenção de um fragmento de 551 pb para as linhagens que possuíssem o gene *AGT1* na sua forma normal (selvagem), enquanto que as linhagens que apresentassem o gene *AGT1* regulado pelo promotor p*GPD*, deveriam apresentar um fragmento de 840 pb. Linhagens que não possuíam no seu genoma qualquer forma do gene *AGT1* não deveriam apresentar amplificação, como ocorrido na linhagem BSY022-26C.

Figura 17 - Confirmação por PCR da inserção do módulo de sobre-expressão do gene *AGT1* nos elementos *Ty1* genoma de linhagens de *S. cerevisiae*. Os tamanhos dos fragmentos obtidos indicam a presença da construção desejada. Foram utilizados 2 pares de primers em diferentes reações de PCR para cada linhagem. Após a reação, as amostras foram misturadas e pipetadas no poço referente a cada linhagem no gel de corrida eletroforética.



FONTE: (ESPIRITO SANTO, 2012)

É importante ressaltar que neste caso a técnica de PCR permite apenas a confirmação de que houve a recombinação homóloga e que as sequências agora se encontram presentes nas regiões esperadas. Porém, é necessário verificar a correta funcionalidade das modificações introduzidas no genoma de cada linhagem, ou seja, se ocorre a expressão da proteína conforme o esperado. No intuito de confirmar as modificações genéticas, foram realizados experimentos bioquímicos capazes de identificar fenotipicamente a funcionalidade dos genes em estudo.

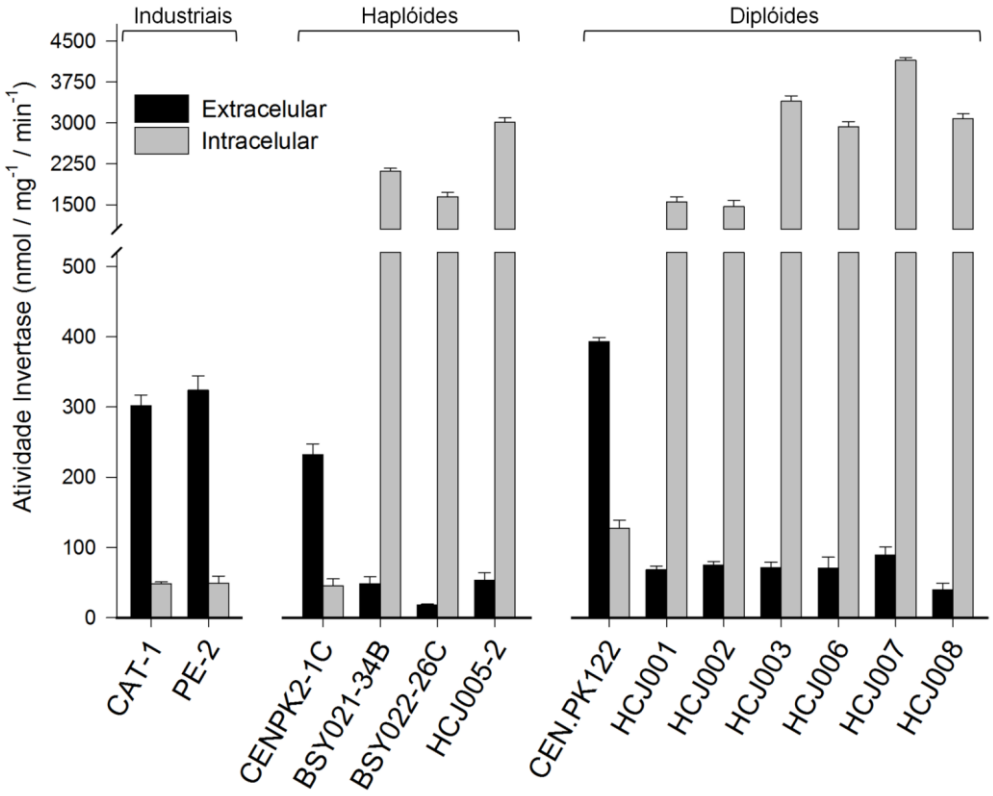
4.2 Caracterização das linhagens geneticamente modificadas

Em *S. cerevisiae* o gene *SUC2* permite a síntese das formas intra e extracelular da enzima invertase (GROSSMANN, ZIMMERMANN, 1979; CARLSON, BOTSTEIN, 1982). A atividade da enzima invertase nas diferentes linhagens, após crescimento em sacarose, está mostrada na Figura 18. As linhagens *wt* CEN.PK2-1C e CEN.PK122 apresentam, como esperado, alta atividade da invertase extracelular e baixa atividade da forma intracelular da enzima, e resultado semelhante foi obtido com as linhagens industriais CAT-1 e PE-2. Por outro lado, as linhagens das séries BSY e HCJ apresentaram altos níveis de atividade invertase intracelular. Inclusive, as linhagens diplóides HCJ003, 006, 007 e 008, que possuem duas cópias do alelo modificado *iSUC2*, apresentaram níveis de invertase intracelular maiores do que as linhagens diplóides HCJ001 e 002, ambas com apenas uma cópia do gene *iSUC2* (vide Figura 13).

Um detalhe que deve ser ressaltado é o fato de que é possível notar na Figura 18 que as linhagens com o gene *iSUC2* apresentam uma suposta atividade invertase extracelular. Como qualquer outra técnica, a técnica utilizada para estimar a atividade invertase extracelular possui limitações. Uma das etapas no ensaio enzimático é a utilização do fluoreto de sódio (NaF) para evitar que a glicose formada a partir da sacarose seja metabolizada pela via glicolítica. O fluoreto se liga ao magnésio (Mg^{2+}) e inibi a ação da enzima enolase, que tem o papel de desidratar o 2-fosfoglicerato, formando uma molécula de água e fosfoenolpiruvato. Com

a via glicolítica parada, a glicose que é formada a partir da sacarose pela ação da forma extracelular da enzima invertase não pode ser metabolizada pelas células de levedura, que é então quantificada para calcular a atividade específica da enzima (SILVEIRA, CARVAJAL, BON, 1996). Porém, como as condições utilizadas para determinar a hidrólise e o transporte utilizam o mesmo pH para incubar as células, nas linhagens que não possuem atividade invertase extracelular a sacarose pode ser captada rapidamente para o interior da célula. A seguir, a grande quantidade de glicose liberada pela hidrólise intracelular da sacarose pode sofrer escape para o exterior da célula por meio dos transportadores de hexoses *HXT*s, capazes de transportar açúcares nos dois sentidos (BOLES, HOLLEMBERG, 1997). Isso pode levar a detecção de glicose no meio, resultando na falsa impressão de uma atividade invertase extracelular.

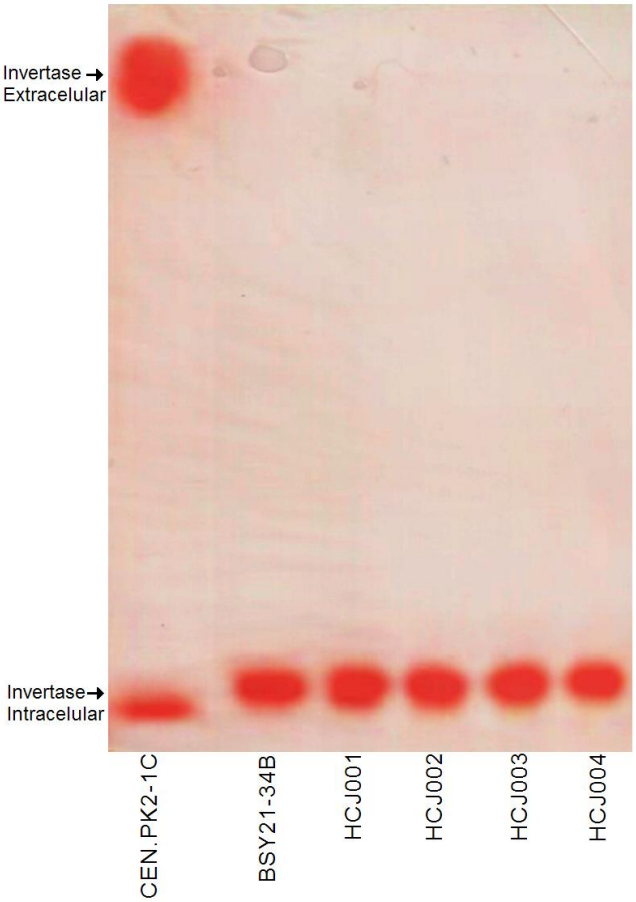
Figura 18 - Atividade invertase nas linhagens de *S. cerevisiae*. Após crescimento em meio YP-2% sacarose, as atividades invertase intra e extracelular foram determinadas nas células das linhagens indicadas como descrito em Materiais e Métodos.



FONTE: (ESPIRITO SANTO, 2012)

Contudo, o resultado do experimento de determinação da atividade da invertase em gel de poliacrilamida após corrida eletroforética, mostrada na Figura 19, mostra claramente que as linhagens contendo o gene *iSUC2* expressam apenas a forma intracelular (~135 kDa) não-glicosilada e não-oligomérica da enzima, enquanto que nas linhagens *SUC2 wt* a forma extracelular (>>270 kDa) é também visível no topo do gel (GROSSMANN, ZIMMERMANN, 1979; WILLIAMS et al., 1985; REDDY et al., 1988). Note que a linhagem BSY021-34B, que não teve sua modificação do *iSUC2* confirmada por PCR, apresentou apenas a forma intracelular da invertase.

Figura 19 - Eletroforese em gel de poliacrilamida da invertase presente nas células. Extratos celulares das linhagens indicadas foram submetidos à eletroforese, e a atividade invertase determinada colorimetricamente no gel como descrito em Materiais e Métodos. As posições das duas isoformas da invertase estão indicadas à esquerda da figura.

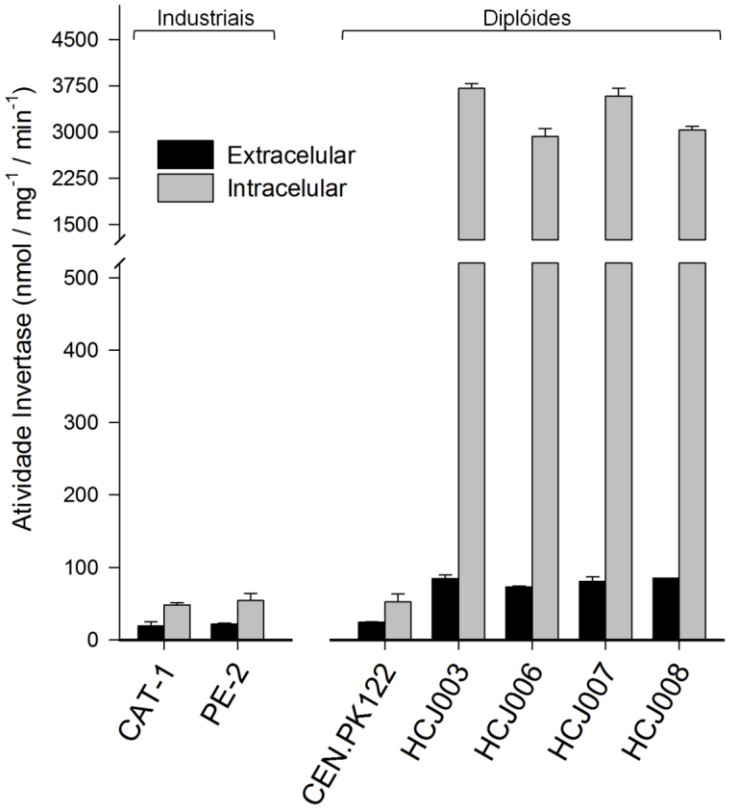


FONTE: (ESPIRITO SANTO, 2012)

Por outro lado, como a expressão da invertase extracelular é sabidamente reprimida pela glicose (REDDY et al., 1988; OZCAN et al., 1997; DYNESEN et al., 1998; SCHMIDT, 1998; BU, ECHEGARAY et al., 2000; HERWING et al., 2001; HAQ, SHAFIQ, ALI, 2003; BELINCHÓN, GANCEDO, 2006), as modificações introduzidas no gene *SUC2*, que posicionaram um promotor forte e constitutivo regulando a expressão da forma intracelular da invertase (alelo *iSUC2*), podem ser melhor visualizadas após crescimento das linhagens em glicose (Figura 20). Enquanto que as linhagens industriais e a linhagem *wt* CEN.PK122 apresentaram baixíssimos níveis de atividade invertase, tanto da forma intracelular mas principalmente da forma extracelular, as linhagens que sofreram modificação no gene *SUC2* continuaram apresentando elevados níveis de atividade da invertase intracelular, mesmo após crescimento em glicose. Estes resultados indicam que a estratégia utilizada para a sobre-expressão do alelo *iSUC2* está, de fato, conduzindo a expressão constitutiva deste gene com um aumento significativo na produção da invertase intracelular, independentemente da presença de repressores e/ou ativadores classicamente envolvidos na regulação da expressão dos genes *SUC*, além de estar impedindo a produção da forma extracelular da enzima.

A atividade do transportador Agt1p foi avaliada através do transporte de *p*-nitrofenil-α-D-glicosídeo (*p*NPαG) pelas células, um substrato análogo à maltose e específico para a permease codificada pelo gene *AGT1* (HOLLATZ, STAMBUK, 2001). A Figura 21 mostra que as linhagens PSY003, HCJ001 e 002, que possuem o gene *AGT1* regulado pelo promotor constitutivo p*ADH1*, e as linhagens HCJ005-2, 006 e 007, que possuem este gene regulado pelo promotor constitutivo p*GPD*, apresentaram uma atividade de transporte maior que as outras linhagens.

Figura 20 - Atividade invertase nas linhagens de *S. cerevisiae*. Após crescimento em meio YP-2% glicose, as atividades invertase intra e extracelular foram determinadas nas células das linhagens indicadas como descrito em Materiais e Métodos.

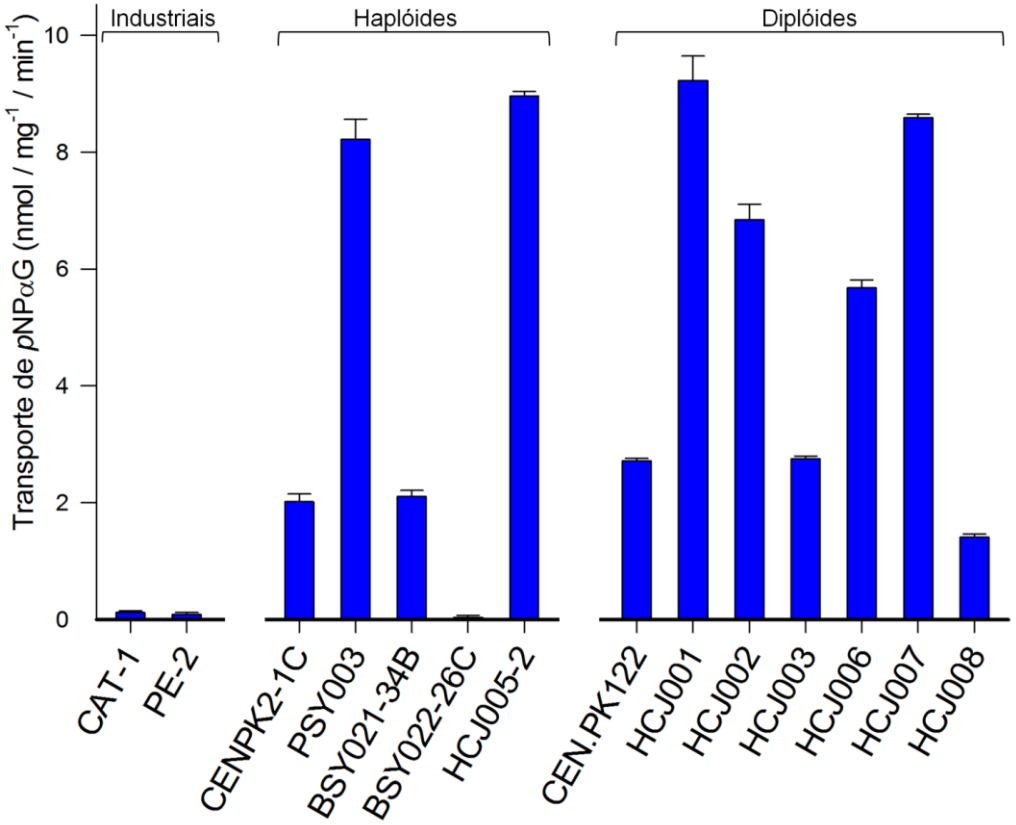


FONTE: (ESPIRITO SANTO, 2012)

A linhagem HCJ003, que possui duas cópias normais do gene, apresentou uma atividade de transporte semelhante à da linhagem *wt* CEN.PK122, o mesmo se aplicando às linhagens haplóides BSY021-34B e CEN.PK2-1C. A linhagem diplóide HCJ008, que possui apenas uma cópia do gene *AGT1*, apresentou a metade da atividade de transporte encontrada na linhagem CEN.PK122. Como esperado, a linhagem BSY022-26C (*agt1*Δ) não apresentou transporte do substrato. Sabe-se que as linhagens industriais CAT-1 e PE-2 possuem o gene *AGT1*, mas este gene é aparentemente não-funcional nestas linhagens já que estas células são incapazes de fermentar eficientemente a maltotriose, uma característica já descrita para outras linhagens industriais (ZASTROW et al., 2000, 2001; VIDGREN, RUOHONEN, LONDESBOROUGH, 2005; STAMBUK et al., 2006; ALVES JUNIOR, 2010; DUVAL et al. 2010). Recentemente Alves

Junior (2010) realizou uma análise por sequenciamento do gene *AGT1* nestas linhagens, e ficou claro que embora o gene apresente polimorfismos na sequência, ele codifica uma proteína inteira, mas com uma região promotora muito diferente dos genes *MAL* conhecidos (VIDGREN et al., 2011).

Figura 21 - Atividade de transporte pela permease Agt1p. Após crescimento em meio YP-2% sacarose, foi determinada a atividade de transporte do substrato *p*NPαG pelas células das linhagens indicadas, conforme descrito em Materiais e Métodos.

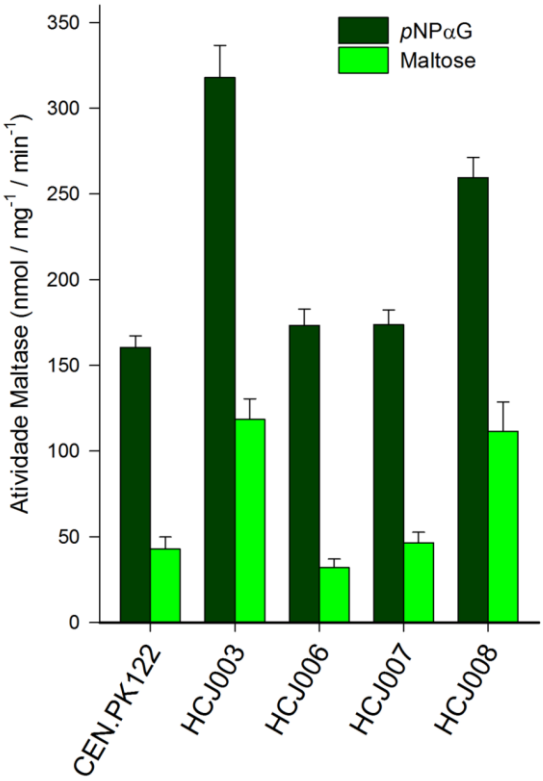


FONTE: (ESPIRITO SANTO, 2012)

No experimento apresentado na Figura 21 os dados de transporte são definidos a partir do produto (*p*-nitrofenol) liberado durante a hidrólise do *p*NPαG pela enzima maltase (α-glicosidase) após o transporte. Sendo assim, este experimento depende diretamente da atividade enzimática da maltase nas células de levedura, uma vez que a ausência desta enzima ou sua baixa atividade de hidrólise pode subestimar ou até mesmo impedir a determinação da atividade de transporte do *p*NPαG pela permease Agt1p.

A Figura 22 mostra os resultados da atividade enzimática da maltase com os substratos maltose e *p*NPαG em algumas das linhagens analisadas. Apesar da variação existente entre as linhagens, todas apresentam considerável atividade maltase, e portanto a menor atividade de transporte apresentada pelas linhagens HCJ003 e 008 não são consequência de uma menor atividade de hidrólise do *p*NPαG (comparar as Figuras 21 e 22).

Figura 22 - Atividade de hidrólise pela maltase. Após crescimento em meio YP-2% sacarose, as atividades de hidrólise dos substratos *p*NPαG e maltose pelas células das linhagens indicadas foram determinadas conforme descrito em Materiais e Métodos.



FONTE: (ESPIRITO SANTO, 2012)

4.3 Metabolização de açúcares pelas linhagens

A Figura 23 apresenta o perfil de crescimento em várias fontes de carbono para cada combinação possível dos genes *SUC2* e *AGT1* analisados neste trabalho. Nesta figura é possível notar que a linhagem *wt* apresentou bom crescimento em glicose, maltose, maltotriose, sacarose e

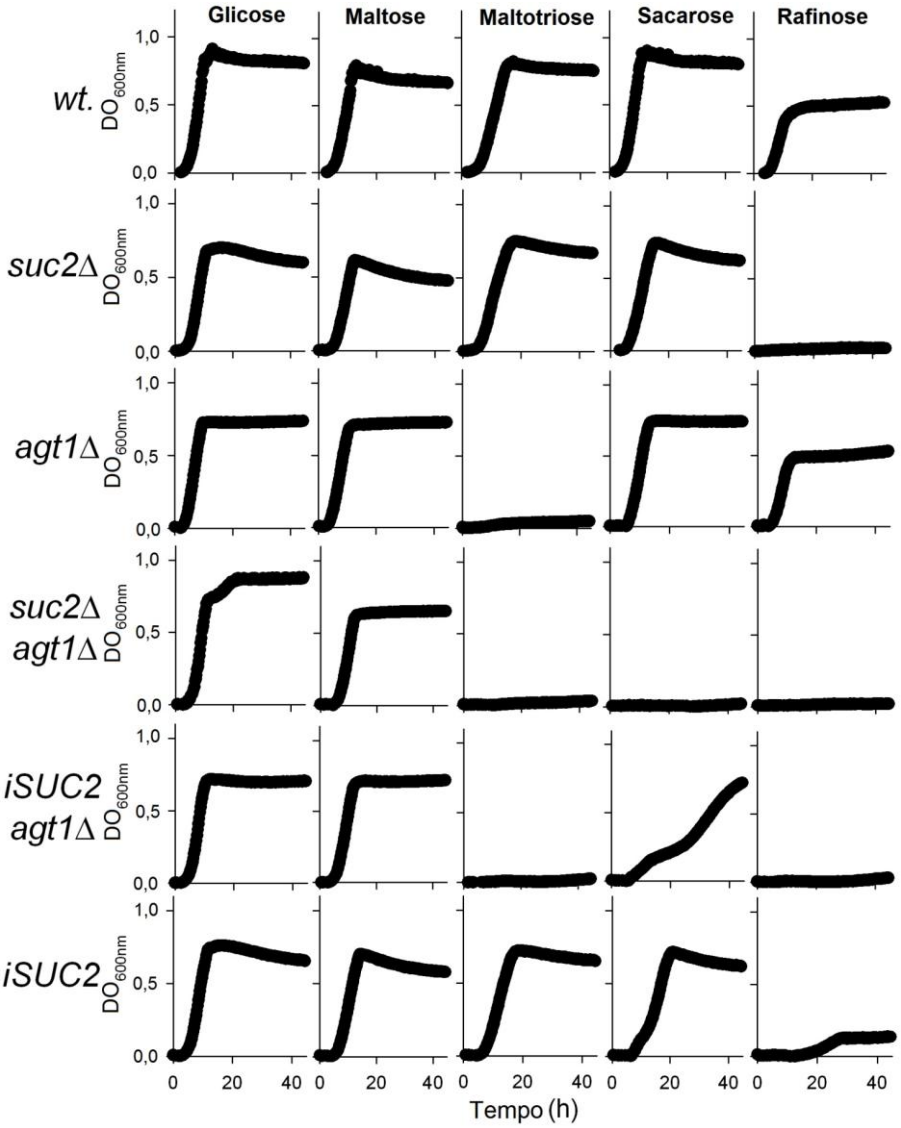
rafinose. O crescimento em rafinose foi menor do que nas outras fontes de carbono, o que pode ser explicado pelo fato da rafinose ser um trissacarídeo formado por uma molécula de α-D-galactose ligada a uma molécula de α-D-glicose ligada a uma molécula de β-D-frutose. Para consumir todo este açúcar, a célula precisa expressar duas enzimas diferentes: a invertase extracelular, para hidrolisar a ligação entre a frutose e a glicose, e a melibiase (α-D-galactosídase), para hidrolisar a ligação entre a galactose e glicose (ALBON, GROSS, 1950; WILLIAMS, BEVENUE, 1951; FLETCHER, DIEHL, 1952). Como linhagens de *S. cerevisiae* não possuem melibiase, as células consomem apenas a frutose liberada no meio graças à atividade da invertase extracelular.

Por outro lado, a deleção do gene *SUC2* continua permitindo o crescimento em sacarose (Figura 23), porém torna a célula incapaz de utilizar a rafinose. Isso ocorre devido ao transporte do açúcar e à presença da maltase (α-glicosidase), uma enzima expressa pelo gene *MAL22* e que é capaz de hidrolisar tanto a maltose quanto a sacarose (KAHN, ZIMMERMANN, EATON, 1973; NEEDLEMAN, 1991; BADOTTI, BATISTA, STAMBUK, 2006; DARIO, 2007; BADOTTI et al., 2008).

Já a deleção do gene *AGT1* (transportador de alta afinidade para sacarose, e baixa para maltose e maltotriose) afeta apenas a metabolização da maltotriose, como já descrito anteriormente (ALVES JUNIOR et al., 2008). Finalmente, as linhagens que apresentam a deleção de ambos os genes *AGT1* e *SUC2*, passaram a não metabolizar não só a maltotriose e rafinose, mas também a sacarose (Figura 23). Esta característica foi utilizada na estratégia de obtenção da linhagem com o gene *SUC2* modificado para sobre-expressar a forma intracelular da invertase (linhagem *iSUC2* PSY004), como mostrado na Figura 11 acima. Foi postulado que uma linhagem que não apresenta o gene *AGT1*, porém expressa o gene *iSUC2*, também não cresceria em meios contendo rafinose e maltotriose, embora seu comportamento na presença de sacarose era uma incógnita. De fato, esta linhagem ainda consegue apresentar crescimento em sacarose, apesar de ser claramente mais lento (Figura 23). Como mostrado por Badotti et al. (2008), células de *S. cerevisiae* com deleção

do *AGT1* continuaram transportando e utilizando o dissacarídeo, transporte provavelmente mediado pelos transportadores de maltose codificado pelo(s) gene(s) *MALx1*, que possuem baixa afinidade pela sacarose (STAMBUK, BATISTA, DE ARAÚJO, 2000; STAMBUK, DE ARAÚJO, 2001).

Figura 23 - Crescimento das linhagens em diferentes fontes de carbono. A densidade ótica das culturas inoculadas com as linhagens indicadas no meio YP com as diversas fontes de carbono foi determinada ao longo do tempo numa placa de 96 poços como descrito em Materiais e Métodos.



FONTE: (ESPIRITO SANTO, 2012)

Após a obtenção da linhagem *agt1*Δ + *iSUC2*, e cruzamento com linhagens *AGT1* + *suc2*Δ (vide Figura 11 acima), foi possível obter as

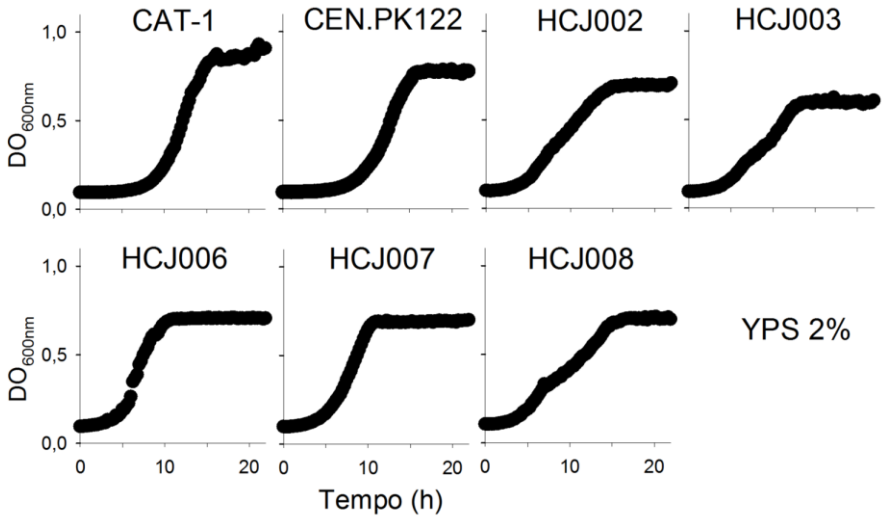
linhagens contendo apenas a forma intracelular da invertase sobre-expressa (*iSUC2*) e nenhum problema no transporte de sacarose (*AGT1*), permitindo a utilização eficiente da sacarose presente no meio pela sua captação direta e hidrólise intracelular (Figura 23). As várias linhagens haplóides obtidas nos cruzamentos descritos nesta figura foram posteriormente cruzadas com outras linhagens haplóides que sobre-expressam (ou não) o gene *AGT1*, permitindo a obtenção de outros conjuntos de linhagens diplóides com características desejadas (vide Figura 13 acima).

Finalmente, cabe salientar que até o momento não há estudos indicando alguma forma de transporte da rafinose para o meio intracelular em *S. cerevisiae*, característica que foi inclusive utilizada para a expressão de um transportador codificado por um gene heterólogo (*MBT1*) obtido de um fungo fitopatogeno, e que transporta com sucesso a rafinose e melibiose nas células de levedura (LINGNER et al., 2011). Entretanto, nossos resultados indicam que a permease *AGT1* provavelmente transporta rafinose, provavelmente com baixa atividade, uma vez que a linhagem *iSUC2* + *AGT1* apresenta um crescimento marginal em rafinose, enquanto que a linhagem *iSUC2* + *agt1*Δ é totalmente incapaz de usar este trisaccarídeo (Figura 23).

A Figura 24 apresenta o perfil de crescimento das linhagens diplóides em meio rico YP contendo 2% sacarose, onde as linhagens *wt* CEN.PK122, e a linhagem industrial CAT-1, foram utilizadas como controle. Enquanto estas duas linhagens iniciam a fase exponencial de crescimento por volta de 10 horas de incubação, as linhagens diplóides modificadas do grupo HCJ alcançam esta fase mais cedo, por volta de 5 horas, demonstrando maior habilidade em meios contendo sacarose. Contudo, as linhagens HCJ002, HCJ003 e HCJ008 apresentaram uma velocidade de crescimento menor que as linhagens *wt* CEN.PK122 e CAT-1. Mesmo possuindo um alelo p*ADH1*::*AGT1*, a linhagem HCJ002 não demonstrou diferenças notáveis no seu perfil de crescimento em comparação com as linhagens HCJ003 e 008, que possuem apenas alelos normais do gene *AGT1* (Figura 13). Em contrapartida, as linhagens diplóides HCJ006 e HCJ007

apresentaram notável habilidade de crescimento em meio contendo sacarose, iniciando e encerrando sua fase exponencial de crescimento mais rapidamente que as outras linhagens. A presença do alelo p*GPD*::*AGT1*::t*PGK* nas linhagens HCJ006 e 007 induziu um aumento na velocidade de crescimento em sacarose frente as outras linhagens, principalmente se comparadas à linhagem HCJ008, que é isogênica à linhagem HCJ006, porém sem o alelo p*GPD*::*AGT1*::t*PGK* (vide Figura 13).

Figura 24 - Crescimento das linhagens diplóides em meio YP com sacarose 2%. A densidade ótica das culturas inoculadas com as linhagens indicadas foi determinada ao longo do tempo numa placa de 96 poços como descrito em Materiais e Métodos.



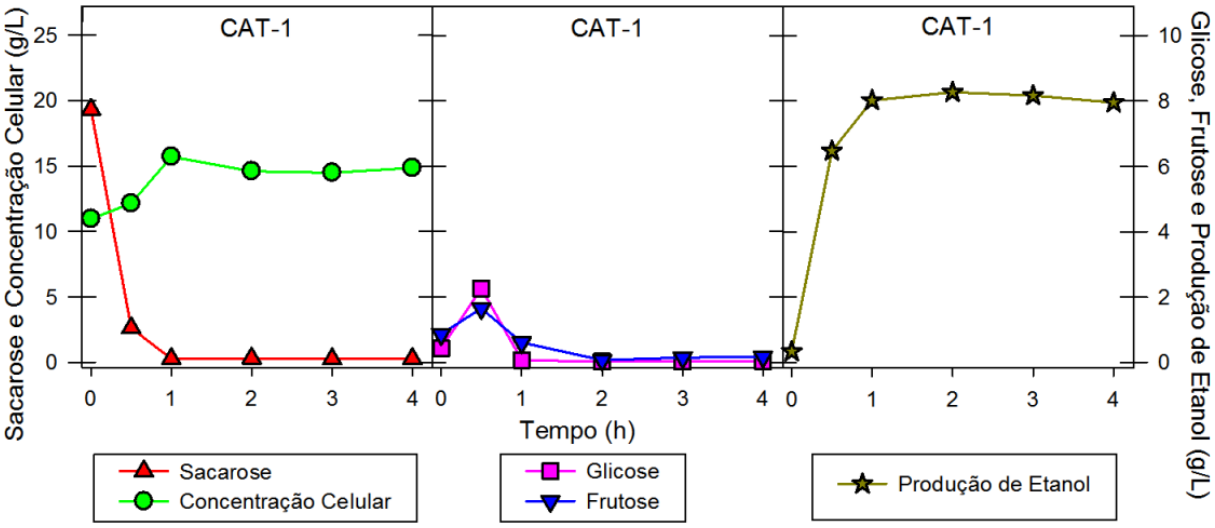
FONTE: (ESPIRITO SANTO, 2012)

4.4 Análise do perfil fermentativo em baixas concentrações de sacarose

Para avaliar os efeitos da sobre-expressão dos genes *iSUC2* e *AGT1* no perfil fermentativo das novas linhagens em meios com sacarose e simulando as condições existentes nos processos industriais, foram realizadas fermentações em batelada com altas concentrações de células (aproximadamente 10 g/L de peso seco, 30 g/L de peso úmido), como descrito em Materiais e Métodos. Inicialmente foram realizados experimentos de fermentação em batelada contendo 20 g/L de sacarose, que é considerada uma concentração baixa para a indústria (WHEALS et

al., 1999; BORZANI et al., 2001). A Figura 25 demonstra o perfil fermentativo da linhagem industrial CAT-1. Esta linhagem esgotou os açúcares em pouco mais de uma hora, com produção de ~5 g/L de glicose e frutose, e alcançando um pico de 8 g/L de etanol em 1 hora.

Figura 25 - Fermentação em batelada com 20 g/L de sacarose pela linhagem CAT-1. O consumo de sacarose, produção de glicose, frutose e etanol, bem como a concentração celular, foram determinados ao longo do tempo conforme descrito em Materiais e Métodos.



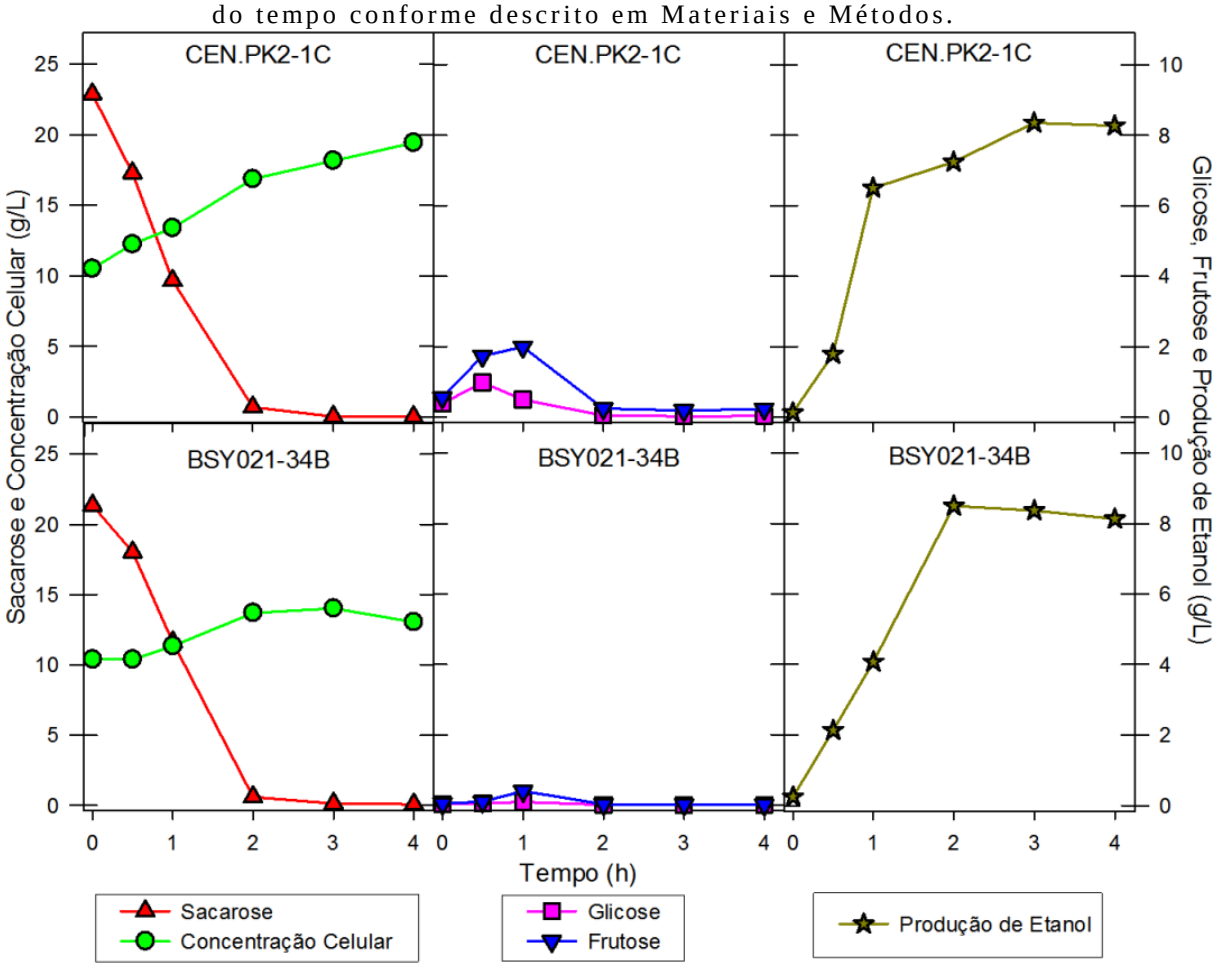
FONTE: (ESPIRITO SANTO, 2012)

Na Figura 26, a linhagem CEN.PK2-1C consome rapidamente a sacarose nas primeiras 2 hs, produzindo 3-4 g/L de glicose e frutose no meio, devido á hidrólise causada pela atividade invertase extracelular que esta linhagem possui. A seguir todos os açúcares foram fermentados até etanol, enquanto que a biomassa praticamente dobrou durante o processo de fermentação.

Um perfil de fermentação distinto foi observado quando a linhagem haplóide BSY021-34B foi utilizada. Esta linhagem apresenta em seu genoma um alelo do gene *iSUC2*, e neste caso a sacarose contida no meio também foi consumida e fermentada em ~2 hs, porém praticamente não foi detectado glicose ou frutose extracelularmente (Figura 26), refletindo a ausência da invertase extracelular nesta linhagem. Apesar do novo comportamento demonstrado por esta linhagem, a produção de etanol e o tempo de consumo da sacarose não foram afetados, o que já caracteriza

uma vantagem para esta linhagem, uma vez que foi diminuída a disponibilidade de glicose e frutose no meio para eventuais microrganismos indesejáveis.

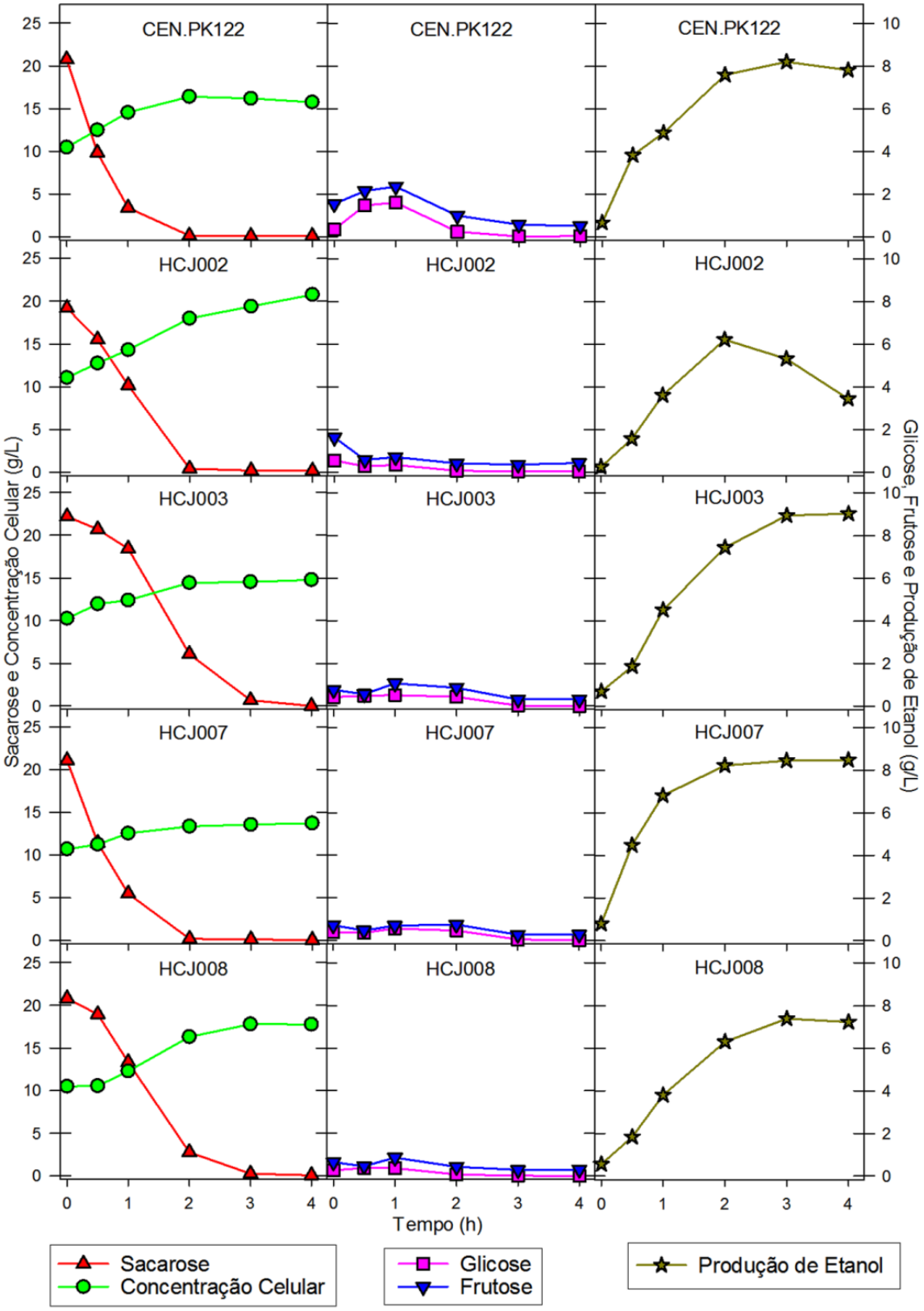
Figura 26 - Fermentação em batelada com 20 g/L de sacarose pelas linhagens haplóides. O consumo de sacarose, produção de glicose, frutose e etanol, bem como a concentração celular, foram determinados ao longo do tempo conforme descrito em Materiais e Métodos.



FONTE: (ESPIRITO SANTO, 2012)

Os resultados obtidos com as linhagens diplóides estão apresentados na Figura 27. Enquanto que a linhagem wt CEN.PK122 consumiu toda a sacarose em 2 hs, produzindo 3-4 g/L de glicose e frutose no meio, de forma semelhante à linhagem haplóide CEN.PK2-1C (Figura 26), as linhagens diplóides geneticamente modificadas apresentaram perfis de consumo e fermentação de sacarose distintos (vide Figura 27), embora o perfil de captação direta e hidrólise intracelular da sacarose esteja claramente presente.

Figura 27 - Fermentação em batelada com 20 g/L de sacarose pelas linhagens diplóides. O consumo de sacarose, produção de glicose, frutose e etanol, bem como a concentração celular, foram determinados ao longo do tempo conforme descrito em Materiais e Métodos.



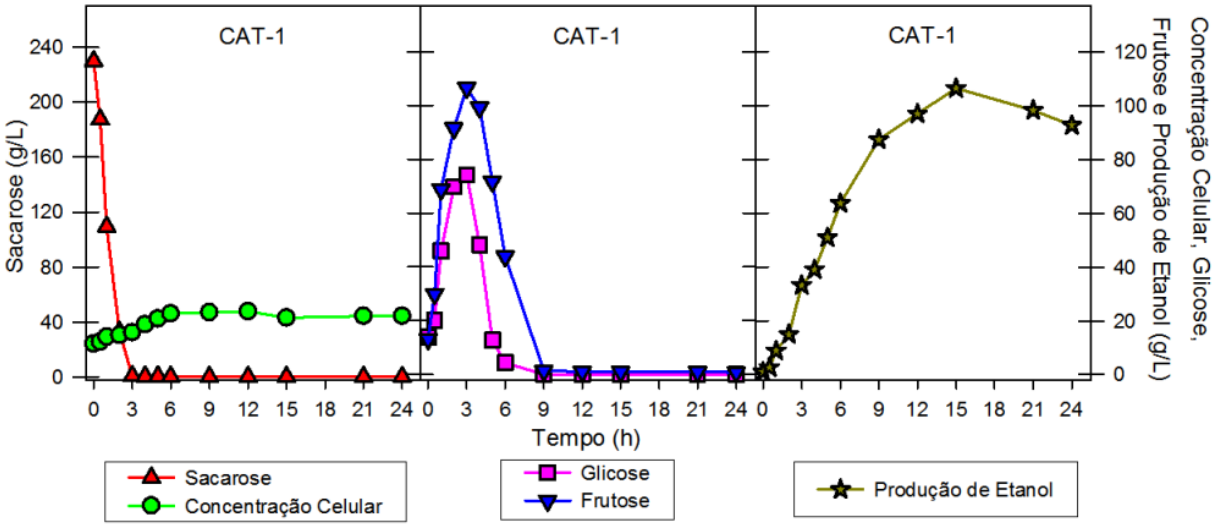
FONTE: (ESPIRITO SANTO, 2012)

Em termos gerais, é possível verificar que as linhagens que apresentam o gene *AGT1* normal (a HCJ003 com duas cópias, e a HCJ008 com apenas uma cópia) fermentaram a sacarose mais lentamente, levando ~3 hs para o consumo total do açúcar (Figura 27). Um consumo mais rápido da sacarose foi observado com a linhagem HCJ002, que possui uma cópia do *iSUC2* e do p*ADH1*::*AGT1* no seu genoma, e principalmente com a linhagem HCJ007 que possui duas cópias do gene *iSUC2* e possivelmente várias cópia(s) do gene p*GPD*::*AGT1*::t*PGK* inseridas nos elementos *Ty1* do seu genoma (Figura 27). Assim, os resultados sugerem que a sobre-expressão do *AGT1* contribui para o aumento da velocidade da captação da sacarose, apesar de que as baixas concentrações de sacarose utilizadas podem não ser suficientes para refletir um incremento na sua captação pela permease Agt1p. É importante salientar que a linhagem HCJ007 possui duas cópias do gene *iSUC2*, enquanto que a linhagem HCJ002 possui apenas uma cópia deste alelo.

4.5 Análise do perfil fermentativo em altas concentrações de sacarose

A seguir analisamos o desempenho destas linhagens em fermentações em batelada contendo 200 g/L de sacarose, ensaio experimental que se assemelha mais às condições industriais de produção de álcool combustível no Brasil (WHEALS et al., 1999; BORZANI et al., 2001). Na Figura 28 encontra-se o perfil fermentativo da linhagem industrial CAT-1 (dados semelhantes foram obtidos com a linhagem industrial PE-2). Nestas linhagens industriais a formação de glicose mais frutose no meio alcançou picos de até ~190 g/L, confirmando a hidrólise extracelular da sacarose presente no meio, e o esgotamento destes açúcares se deu em ~9 horas, produzindo ~100 g/L de etanol. Como pode ser observado na Figura 29, a linhagem haplóide CEN.PK2-1C consome rapidamente a sacarose nas primeiras 9 hs de fermentação. Porém, a hidrólise extracelular da sacarose produziu até 100 g/L de glicose e frutose no meio, que só foram completamente consumidas e fermentadas em ~21 hs.

Figura 28 - Fermentação em batelada com >200 g/L de sacarose pela linhagem industrial CAT-1. O consumo de sacarose, produção de glicose, frutose e etanol, bem como a concentração celular da cultura, foram determinados ao longo do tempo conforme descrito em Materiais e Métodos.



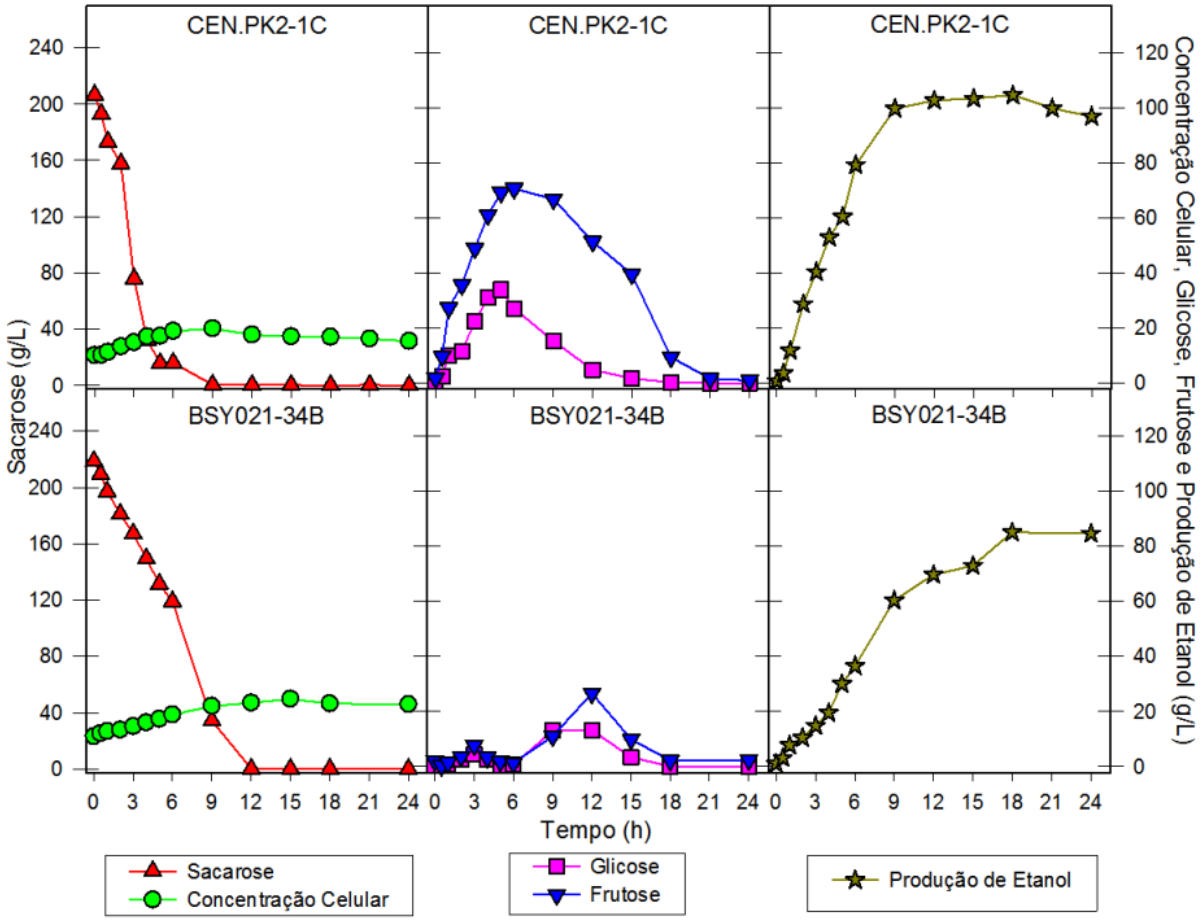
FONTE: (ESPIRITO SANTO, 2012)

A linhagem haplóide BSY021-34B (Figura 29), que possui o gene *iSUC2* no seu genoma, apresentou um perfil fermentativo diferente, e apesar do esgotamento da sacarose ter ocorrido em ~12 hs, é possível notar que a partir de ~9 hs de fermentação ocorre produção de glicose e frutose no meio (~40 g/L), exatamente no período em que ocorre uma rápida captação de sacarose pelas células. Apesar de o esgotamento total dos açúcares ter ocorrido em ~18 hs, menor tempo do que sua parental, a produção de etanol pela linhagem BSY021-34B não foi eficiente.

No caso das linhagens diplóides (Figura 30), a linhagem *wt* CEN.PK122 apresentou perfil fermentativo semelhante ao da linhagem CEN.PK2-1C (Figura 29), porem é possível perceber que tanto a velocidade de hidrólise da sacarose quanto à velocidade de consumo dos açúcares totais foram muito maiores do que na linhagem haplóide, e assim a linhagem diplóide consegue fermentar todos os açúcares em ~12 hs. Entretanto, os picos de produção de glicose e frutose no meio e a produção de etanol se mostraram muito semelhantes nas duas linhagens. A linhagem diplóide CEN.PK122 apresenta, portanto, uma velocidade e capacidade fermentativa parecida à das linhagens industriais CAT-1

(Figura 28) e PE-2 (dados não mostrados).

Figura 29 - Fermentação em batelada com >200 g/L de sacarose pelas linhagens haplóides. O consumo de sacarose, produção de glicose, frutose e etanol, bem como a concentração celular da cultura, foram determinados ao longo do tempo conforme descrito em Materiais e Métodos.



FONTE: (ESPIRITO SANTO, 2012)

No caso das linhagens diplóides geneticamente modificadas, apesar de todas produzirem pouca glicose e frutose no meio, como seria esperado por possuírem o gene *iSUC2*, o consumo da sacarose foi diferente para cada linhagem (Figura 30). As linhagens HCJ003 e 008 novamente foram as que consumiram e fermentaram a sacarose mais lentamente, resultado semelhante ao já observado com 20 g/L do açúcar (Figura 27). No caso da linhagem HCJ002, que fermentou bem baixas concentrações de sacarose (Figura 27), a fermentação de >200 g/L deste açúcar foi tão lenta como as observadas para as linhagens HCJ003 e HCJ008 (Figura 30). Por outro

lado, as linhagens que apresentaram o melhor perfil fermentativo foram a HCJ006 e 007, novamente ressaltando a importância da expressão constitutiva do gene *AGT1* para a eficiente fermentação da sacarose.

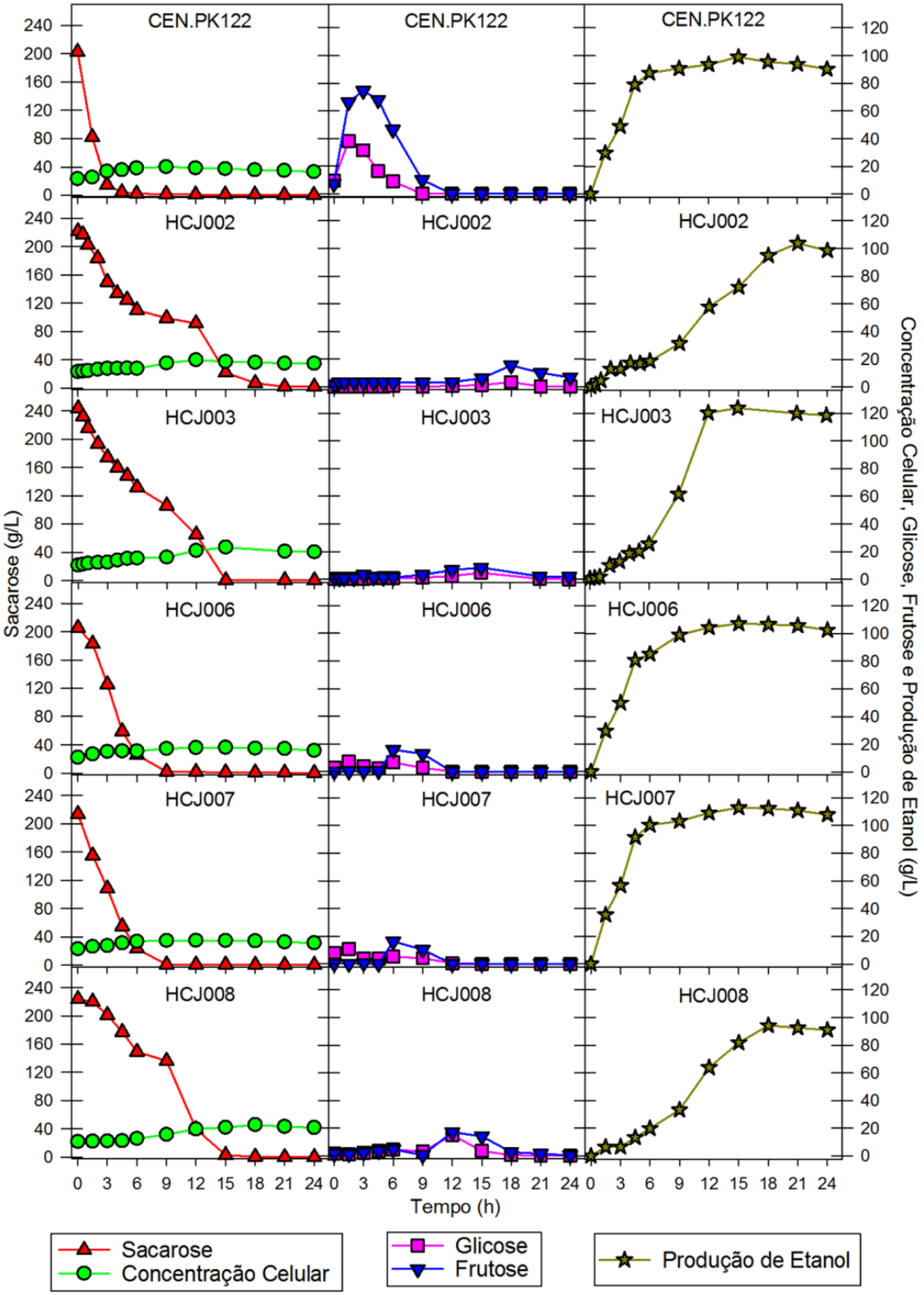
Tanto a linhagem HCJ006 (duas cópias do *iSUC2*, uma cópia do *AGT1* normal e cópias do p*GPD*::*AGT1*::t*PGK* inserido nos elementos *Ty1* do seu genoma), quanto a linhagem HCJ007 (duas cópias do *iSUC2*, e cópias do p*GPD*::*AGT1*::t*PGK* inserido nos elementos *Ty1* do seu genoma), consumiram e fermentaram toda a sacarose em ~9 horas. É importante salientar que estas duas linhagens foram construídas a partir de uma mesma linhagem haplóide (HCJ005-2), que teve inserido nos elementos *Ty1* do seu genoma o módulo p*GPD*::*AGT1*::t*PGK* (Figura 13).

Quando a sacarose é hidrolisada no meio extracelular ocorre uma alteração osmótica muito brusca devido às altas concentrações de glicose e frutose liberadas no meio. Para evitar a saída da água, a célula sinaliza para o aumento da produção e retenção do glicerol, que, neste caso, mantém o equilíbrio osmótico dentro da célula (HERSEN et al., 2008). Porém, a produção de glicerol compete diretamente pelos carbonos do açúcar com a produção de etanol (MYERS, LAWLOR, ATTFIELD, 1997). Nossos resultados indicam de fato uma possível correlação inversa entre a produção de etanol e de glicerol pelas linhagens (Figura 31), e uma correlação direta entre a produção de glicose e frutose no meio com a produção de glicerol pelas linhagens (Figura 32), corroborando a teoria do estresse osmótico provocado pela rápida hidrólise extracelular de altas concentrações de sacarose (MYERS, LAWLOR, ATTFIELD, 1997; HERSEN et al., 2008).

4.6 Análise da expressão dos genes *SUC2* e *AGT1* nas linhagens

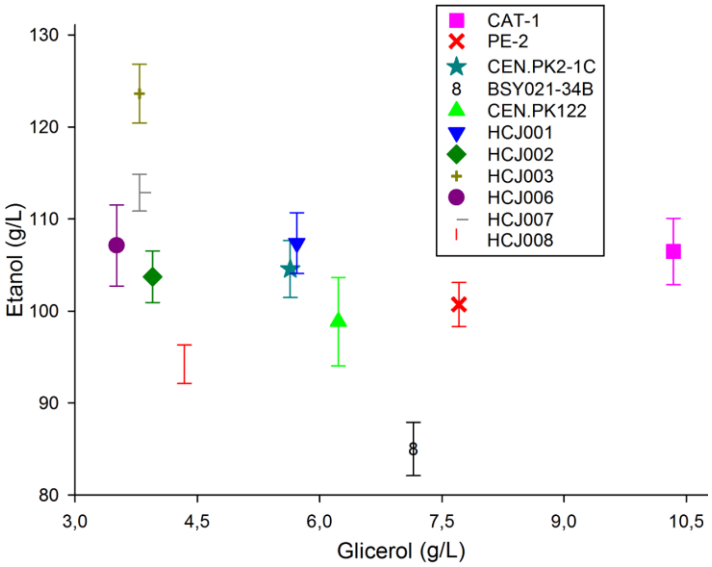
No intuito de entender as diferenças observadas na capacidade fermentativa das diferentes linhagens geneticamente modificadas (Figuras 27 e 30), analisamos a expressão dos genes *SUC2* e *AGT1* em linhagens representativas de cada modificação introduzida no genoma das leveduras.

Figura 30 - Fermentação em batelada com >200 g/L de sacarose pelas linhagens diplóides. O consumo de sacarose, produção de glicose, frutose e etanol, bem como a concentração celular da cultura, foram determinados ao longo do tempo conforme descrito em Materiais e Métodos.



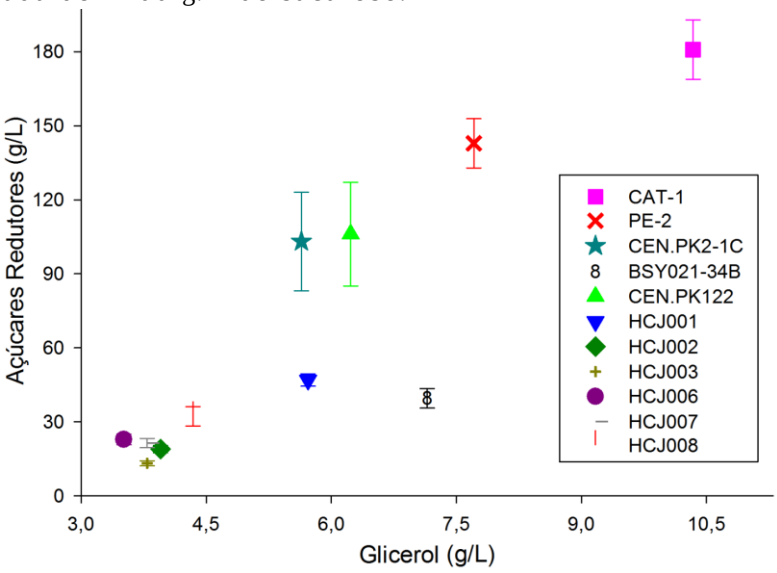
FONTE: (ESPIRITO SANTO, 2012)

Figura 31 - Produção de etanol em função do glicerol produzido pelas linhagens indicadas durante as fermentações em batelada de >200 g/L de sacarose.



FONTE: (ESPIRITO SANTO, 2012)

Figura 32 - Produção de açúcares redutores (glicose e frutose) no meio em função do glicerol produzido pelas linhagens indicadas durante as fermentações em batelada de >200 g/L de sacarose.

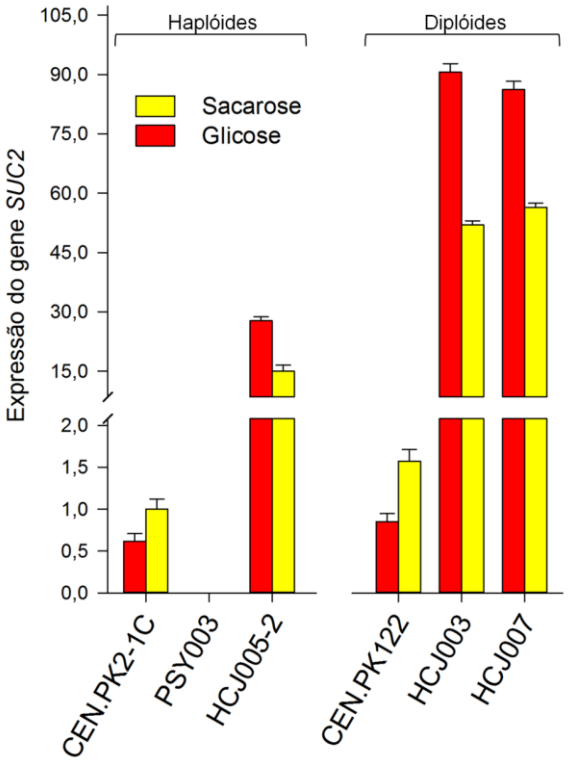


FONTE: (ESPIRITO SANTO, 2012)

Como pode ser observado na Figura 33, nas linhagens que apresentam o gene *SUC2* normal (CEN.PK2-1C e CEN.PK122) a expressão deste gene é baixa quando as células estão consumindo glicose como fonte de carbono, sendo que e a expressão deste gene aumenta ~2 vezes quando as células foram cultivadas na presença de sacarose (Figura 33). Nas leveduras que possuem o alelo p*ADH1*::*iSUC2* (linhagens HCJ005-2, 003 e

007) a expressão deste gene é claramente alta, e geralmente maior quando a glicose foi a fonte de carbono, em comparação às células metabolizando a sacarose (Figura 33). Isto pode ser explicado pelo fato do promotor do gene *ADH1* ser fortemente induzido pela presença de glicose no meio (BEIER, YOUNG, 1982; RUOHONEN, AALTO, KERÄNEN, 1995, ELBING et al., 2004). Por outro lado, é possível perceber que a presença de dois alelos modificados aumenta mais a expressão do gene *SUC2* (p.ex. linhagens HCJ003 e 007, Figura 33), em comparação com linhagens que apresentam apenas um alelo (p. ex. linhagem HCJ005-2, Figura 33). A linhagem PSY003 foi incluída como controle negativo, já que esta linhagem é deletada no gene da invertase (*suc2*Δ), e de fato não apresentou expressão do gene *SUC2* (Figura 33).

Figura 33 – Análise da expressão do gene *SUC2*. Células das linhagens indicadas, crescidas em meios YP contendo 2% sacarose ou glicose, foram coletadas para extração de RNA e análise da expressão por RT-qPCR, como descrito em Materiais e Métodos. Os valores representam a expressão relativa do gene *SUC2* em relação ao gene *ACT1*.



FONTE: (ESPIRITO SANTO, 2012)

É importante salientar que os resultados da análise da expressão do

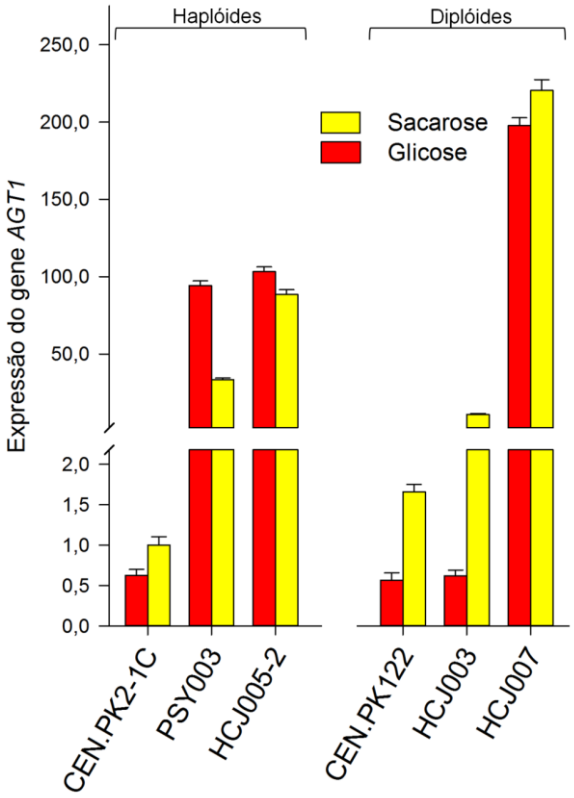
gene *SUC2* (Figura 33) estão de acordo com os níveis de atividade invertase intra- e extracelular no caso das linhagens *wt*, e da invertase intracelular nos caso das linhagens *iSUC2* (Figuras 18 e 20), embora diferenças na atividade invertase provocadas pelo número de cópias do gene não sejam tão aparentes.

No caso do gene *AGT1* a situação é um pouco mais complexa, uma vez que foram utilizadas duas estratégias para sobre-expressar este gene: troca do promotor no lócus do gene no caso das linhagens p*ADH1*::*AGT1*, ou inserção do módulo p*GPD*::*AGT1*::t*PGK* nos elementos *Ty1* presentes no genoma das leveduras. É importante ressaltar que as linhagens contendo esta última modificação fermentaram a sacarose melhor do que aquelas que possuíam o alelo p*ADH1*::*AGT1* (Figuras 27 e 30). Nas linhagens *wt* CEN.PK2-1C e CEN.PK122 a expressão do gene *AGT1* foi baixa quando as células utilizavam glicose como fonte de carbono, e a expressão deste gene aumenta 2-3 vezes quando as células foram cultivadas na presença de sacarose (Figura 34), provavelmente refletindo uma menor repressão pela sacarose nestas linhagens *MAL* constitutivas. A linhagem diplóide HCJ003 apresenta duas cópias do gene *AGT1* normais, mas a presença do gene *iSUC2* no seu genoma faz com que a expressão do gene *AGT1* aumente de forma significativa quando estas células estão metabolizando a sacarose através da hidrólise intracelular, indicando que a repressão da expressão do gene *AGT1* provavelmente ocorre pela presença de glicose (e frutose) no meio extracelular, e não no interior da célula (Figura 34).

Ainda na Figura 34 é possível observar que o alelo p*ADH1*::*AGT1* (presente na linhagem PSY003) de fato induz uma maior expressão do gene, com um padrão de expressão semelhante ao do gene *SUC2* nas linhagens contendo o alelo p*ADH1*::*iSUC2*, isto é, a expressão do gene *AGT1* foi maior quando a glicose foi a fonte de carbono, em comparação às células metabolizando a sacarose. No caso das linhagens que possuem o módulo p*GPD*::*AGT1*::t*PGK* nos elementos *Ty1* presentes no genoma das células (p.ex. nas linhagens HCJ005-2 e 007) a expressão do gene foi alta quando as células foram crescidas em ambas as fontes de carbono (Figura

34). Inclusive, é importante salientar que os níveis de expressão do gene *AGT1* foram semelhantes no caso das linhagens haplóides PSY003 (p*ADH1*::*iSUC2*) e HCJ005-2 (p*GPD*::*AGT1*::t*PGK* nos elementos *Ty1*), indicando que ambas as estratégias de substituição do promotor do gene *AGT1* funcionaram.

Figura 34 - Análise da expressão do gene *AGT1*. Células das linhagens indicadas, crescidas em meios YP contendo 2% sacarose ou glicose, foram coletadas para extração de RNA e análise da expressão por RT-qPCR, como descrito em Materiais e Métodos. Os valores representam a expressão relativa do gene *AGT1* em relação ao gene *ACT1*.

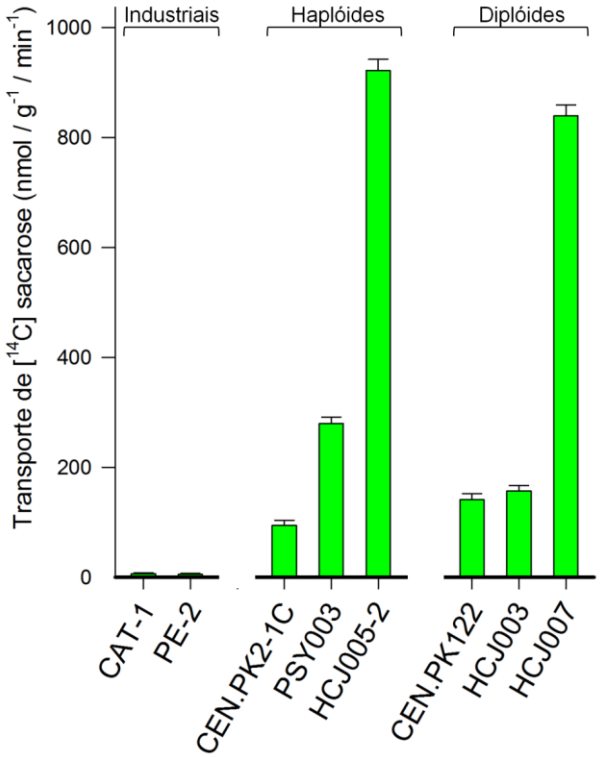


FONTE: (ESPIRITO SANTO, 2012)

É importante salientar que os resultados de expressão do gene *AGT1* reportados na Figura 34 estão de acordo com a atividade de transporte de *p*NPαG pelas mesmas células (Figura 21). No intuito de encontrar possíveis explicações para o aparente insucesso da modificação do *AGT1* com o promotor p*ADH1* nos experimentos de fermentação de sacarose (Figuras 27 e 30), foi realizado uma análise do transporte de [^{14}C]-sacarose pelas diferentes linhagens (Figura 35). É possível perceber que

mesmo possuindo o alelo p*ADH1*::*AGT1*, a linhagem PSY003 apresentou uma capacidade de transporte de sacarose apenas um pouco maior que as linhagens CEN.PK2-1C, CEN.PK122 e HCJ003, que não possuem modificações no gene *AGT1*, em contraste com as altas atividades de transporte de [^{14}C]-sacarose verificadas nas linhagens HCJ005-2 e HCJ007, que possuem o alelo p*GPD*::*AGT1*::t*PGK* nos seus genomas. Portanto, apesar das linhagens que possuem o alelo p*ADH1*::*AGT1* no seu genoma apresentarem alta atividade de transporte de *p*NPαG (Figura 21), e alta expressão do gene *AGT1* (Figura 34), o transporte de sacarose não está sendo realizado de forma eficiente pela proteína Agt1p, sintetizada à partir deste alelo.

Figura 35 - Atividade de transporte de [^{14}C]-sacarose pela permease *AGT1*. Após crescimento em meio YP-2% sacarose, foi determinada a atividade de transporte do substrato [^{14}C]-sacarose pelas células conforme descrito em Materiais e Métodos.



FONTE: (ESPIRITO SANTO, 2012)

Corroborando os dados já obtidos pelo nosso grupo de pesquisa (ALVES JUNIOR, 2010), as linhagens CAT-1 e PE-2 não apresentaram transporte de [^{14}C]-sacarose quando crescidas em sacarose (Figura 35).

Como o transporte de sacarose pela linhagem PSY003 difere daquele apresentado na Figura 21 com substrato o *p*NPαG, um análogo à maltose específico para a permease Agt1p (HOLLATZ, STAMBUK, 2001), este substrato difere estruturalmente da sacarose. Portanto, uma possibilidade seria que o alelo p*ADH1*::*AGT1* possa ter sofrido alguma mutação na sua sequencia, alteração que poderia estar reduzindo a atividade de transporte de sacarose por esta permease. Assim, foi realizado o sequenciamento dos genes *SUC2* e *AGT1*, e suas versões geneticamente modificadas, presentes no genoma das linhagens em estudo.

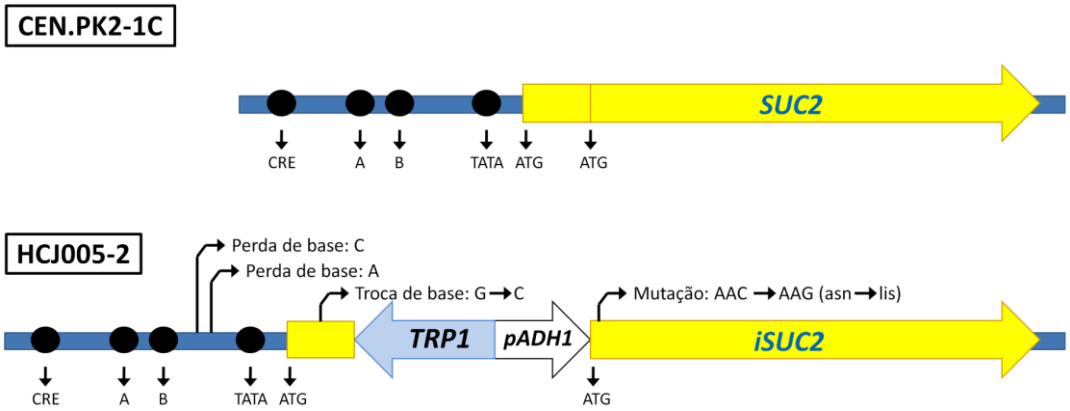
4.7 Sequenciamentos dos genes *SUC2* e *AGT1* nas linhagens

No intuito de entender as diferenças fenotípicas observadas na capacidade das diferentes leveduras fermentarem e transportarem a sacarose, os alelos normais (*SUC2* e *AGT1*) e os alelos modificados com o promotor p*ADH1* (*TRP1*-p*ADH1*::*iSUC2* e *TRP1*-pADH1::*AGT1*) presentes nas linhagens *wt* CEN.PK2-1C, e nas geneticamente modificadas HCJ005-2 e PSY003, tiveram sua sequência determinada (vide Anexo 1).

A Figura 36 mostra os resultados obtidos para o sequenciamento do lócus *SUC2* presente na linhagem CEN.PK2-1C, e do alelo *TRP1*-p*ADH1*::*iSUC2* presente na linhagem HCJ005-2. É importante salientar que a região que compreende o gene *SUC2* (e 1000 nucleotídeos da região promotora) na linhagem *wt* CEN.PK2-1C é 100% idêntica a este lócus presente no genoma da linhagem já sequenciada S288C (GOFFEAU et al., 1996), e 100% idêntica a este lócus na recentemente sequenciada linhagem CEN.PK113-7D (OTERO et al., 2010), um outro membro das linhagens da família CEN.PK. Como já descrito em detalhes no início deste trabalho, a região promotora do gene *SUC2* inclui 4 regiões de ligação de proteínas: os sítios CRE, região regulada pela ligação da proteína Sko1p controlada pela via HOG; os sítios A e B, controlados pela ligação de um complexo de proteínas envolvendo principalmente a Mig1p e eventualmente a Rgt1p e/ou a Hxk2p; e a região "TATA", sítio de reconhecimento e início da transcrição pela enzima polimerase, além de

sítio de ligação da proteína repressora Sfl1p, controlada pela via cAMP. Em seguida encontra-se o primeiro ATG, que dará origem ao peptídeo sinal. Após 60 pares de base do primeiro ATG, encontra-se o segundo ATG, que dá origem á enzima invertase. Mais detalhes podem ser encontrados na introdução deste trabalho.

Figura 36 - Representação da sequência de DNA nos alelos *SUC2*, presente na linhagem CEN.PK2-1C, e *iSUC2*, presente na linhagem HCJ005-2. Os dados foram obtidos após o sequenciamento dos produtos de PCR obtidos com os primers iSUC2-FW01 e iSUC2-RV (Tabela 2), a partir do DNA genômico das respectivas linhagens, como descrito em Materiais e Métodos.



FONTE: (ESPIRITO SANTO, 2012)

Por outro lado, a sequencia de DNA do alelo *TRP1*-p*ADH1*::*iSUC2* presente na linhagem HCJ005-2 não só confirmou a inserção do módulo de modificação entre o peptídeo sinal e o segundo ATG do gene da invertase, permitindo a sobre-expressão da forma intracelular da enzima (alelo *iSUC2*), como também revelou a existência de quatro mutações na sequencia obtida (Figura 36). Este resultado indica que a modificação genética das leveduras pode levar ao aparecimento de outras mutações inespecíficas no genoma das células, e ressalta a importância de realizar estudos e controles apropriados para verificar a funcionalidade do(s) gene(s) envolvido(s).

Três destas mutações estão presentes na região promotora natural e na sequencia do peptídeo sinal, e portanto não devem causar nenhuma influencia na expressão gênica e síntese da invertase intracelular regulada pelo promotor p*ADH1* do alelo p*ADH1*::*iSUC2*. Entretanto, uma das

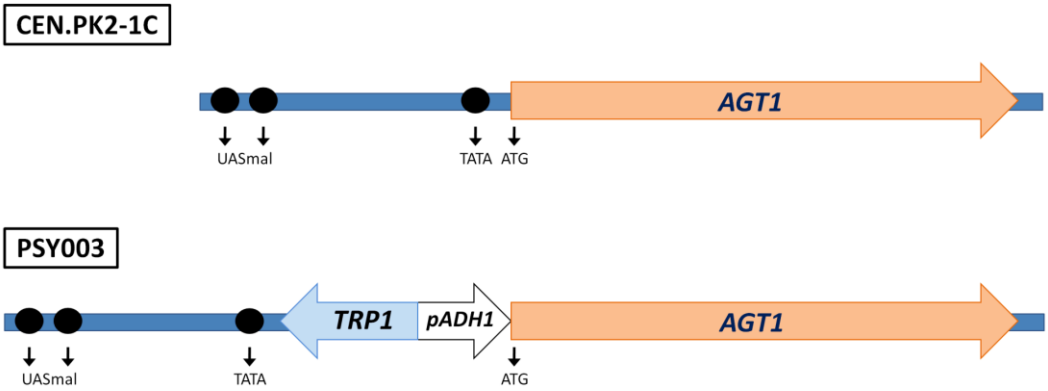
mutações situa-se na nona base da ORF *iSUC2*, alterando o terceiro aminoácido da proteína, com a troca de um aminoácido polar neutro, asparagina, por um aminoácido básico, a lisina (Figura 36). Esta alteração de aminoácidos poderia explicar a pequena diferença nas posições das formas intracelulares da invertase no gel de corrida eletroforética (Figura 19). A troca de um aminoácido polar neutro por um aminoácido básico pode ter resultado numa alteração da carga elétrica da proteína nas linhagens *iSUC2*, alterando a força da corrente elétrica sobre a mesma, resultando numa velocidade de migração no gel diferente da enzima extraída da linhagem *wt*. Contudo, aparentemente essa troca de aminoácido não provocou mudanças significativas na atividade e/ou afinidade da enzima invertase pelo substrato, como pode ser observado em todos os resultados de determinação da atividade invertase apresentados neste trabalho. Recentemente Oda e colaboradores (2010) mostraram que o gene *SUC2* é altamente polimórfico entre linhagens de *S. cerevisiae*, podendo inclusive ser utilizado para identificar e/ou discriminar linhagens de *S. cerevisiae* e *S. paradoxus*. Apesar do número elevado de polimorfismos nas sequencias do gene *SUC2*, estes autores mostraram que todas as enzimas codificadas por estes diferentes alelos são funcionais (ODA et al., 2010).

Considerando que foram identificadas mutações inespecíficas no alelo p*ADH1*::*iSUC2*, a seguir sequenciamos o locus *AGT1* presente na linhagem CEN.PK2-1C, e o alelo *TRP1*-p*ADH1*::*AGT1* presente na linhagem PSY003 (Figura 37). É importante salientar que a região que compreende o gene AGT1 (e 1000 nucleotídeos da região promotora) na linhagem wt CEN.PK2-1C é 100 % idêntica a este lócus presente no genoma da linhagem já sequenciada S288C (GOFFEAU et al., 1996), e 100 % de identidade com este lócus presente na linhagem CEN.PK113-7D (OTERO et al., 2010).

O lócus do gene *AGT1* não modificado consiste em um promotor, com regiões de ligação da proteína de ativação, regiões estas chamadas de UAS_{mal}, e uma região *"TATA"*, região de início da transcrição do gene (NEEDLEMAN, 1991; HORÁK, 1997; NOVAK, ZECHNER-KRPAN,

MARIÉ, 2004; JOHNSTON, KIM, 2005; VERMA, BHAT, VENKATESH, 2005). Em seguida, situa-se a ORF, que dará origem ao mRNA necessário para a síntese da proteína Agt1p.

Figura 37 - Representação dos alelos *AGT1*, presente na linhagem CEN.PK2-1C, e p*ADH1*::*AGT1*, presente na linhagem PSY003. Os dados foram obtidos após o sequenciamento dos produtos de PCR obtidos com os primers AGT1-oe-FW01 e AGT1-oe-RV (Tabela 2), a partir do DNA genômico das respectivas linhagens, como descrito em Materiais e Métodos.



FONTE: (ESPIRITO SANTO, 2012)

Em comparação ao gene não modificado, o alelo apresenta, exatamente entre o promotor e a ORF, a sequência do gene *TRP1*, utilizado como marcador auxotrófico para seleção dos transformantes, e a sequência do promotor do gene *ADH1*, tudo conforme esperado.

Apesar do gene *AGT1* e o novo promotor p*ADH1* apresentarem suas sequências molde na fita líder (ing – *leading*), o gene *TRP1* apresenta sua sequência molde na fita tardia (ing – *lagging*). Entretanto, isto não interfere na expressão do gene, uma vez que a sequência do gene *TRP1* não participa da regulação do gene *AGT1*.

De qualquer forma, os resultados do sequenciamento demonstraram que o alelo p*ADH1*::*AGT1* não apresenta nenhuma diferença na estrutura da ORF em comparação com o alelo não modificado. Isto anula a hipótese de uma mutação genética e, consequentemente, não esclarece o motivo da baixa atividade de transporte apenas da sacarose nas linhagens que possuem este alelo. A sequência completa e o alinhamento destes genes podem ser obtidos nas páginas em anexo a este documento.

5 DISCUSSÃO

Vários estudos já se propuseram a aumentar o rendimento da conversão açúcar-etanol. Um dos principais desafios relacionados à estequiometria da conversão dos açúcares em etanol pela levedura *S. cerevisiae* se deve às consideráveis quantidades de glicerol, invariavelmente formado como um produto secundário da fermentação (NISSEN et al., 2000b). Foi estimado que, em um típico processo industrial de produção de etanol, por volta de 4% dos açúcares são convertidos em glicerol (NISSEN et al., 2000b). Apesar do glicerol também servir como um soluto compatível para manter o equilíbrio osmótico celular em condições de alta osmolaridade extracelular (BLOMBERG, ADLER, 1989), o glicerol está primordialmente relacionado ao equilíbrio redox entre as reações bioquímicas de biossíntese celular (VAN DIJKEN, SCHEFFERS, 1986).

Durante o crescimento anaeróbio por células de *S. cerevisiae*, a oxidação dos açúcares se dá pela fermentação alcoólica. Neste processo, o NADH formado durante a oxidação da molécula de glicose pela via glicolítica, é reoxidado pela conversão do acetaldeído a etanol, dependente de NADH. Este padrão fixo de reciclagem do cofator NADH nas vias glicolítica e fermentativa tem como consequência a formação de produtos como o glicerol, já que na célula existe uma produção líquida de NADH, resultante das várias reações de biossíntese (ou anabólicas) envolvidas no crescimento celular, como o ciclo do ácido cítrico, a β-oxidação, as reações de síntese de aminoácidos, e outras, que resultam na redução do NAD^+ em NADH. Em condições anaeróbicas, a reoxidação do excesso de NADH em *S. cerevisiae* é estritamente dependente da conversão do açúcar presente no meio em glicerol (VAN DIJKEN, SCHEFFERS, 1986).

Em vista de suas desvantagens energéticas e econômicas, várias estratégias de engenharia metabólica têm sido exploradas para reduzir ou

eliminar a produção de glicerol em culturas anaeróbias de *S. cerevisiae*. Nissen et al. (2000b) desenvolveram uma linhagem de levedura que sobre-expressava as enzimas glutamato sintase e glutamina sintetase, além de ter sofrido deleção do gene que codifica a enzima glutamato desidrogenase NADPH-dependente, a enzima de maior envolvimento na assimilação de amônia em *S. cerevisiae*, e que utiliza o NADPH como co-fator. Estas modificações induziram á substituição do consumo do NADPH na biossíntese do glutamato pelo consumo do NADH e ATP nesta biossíntese. Esta estratégia reduziu notavelmente a produção de glicerol em cultivos anaeróbios usando amônia como fonte de nitrogênio e aumentou o rendimento do etanol. Entretanto, não obteve o sucesso esperado, já que as novas linhagens passaram a apresentar um crescimento muito lento quando crescidas em amônia. Tentativas de reduzir ainda mais a produção de glicerol por meio da expressão de uma transhidrogenase heteróloga, visando converter NADH e $NADP^+$ em NAD^+ e NADPH, também não tiveram sucesso (NISSEN et al., 2000a), pois as concentrações intracelulares dos cofatores NADP e NADPH acabavam por induzir a reação reversa (NISSEN et al., 2001).

Entretanto, recentemente foi publicada uma nova estratégia que resultou não só na eliminação da produção do glicerol, mas também no aumento da produção de etanol e no consumo parcial do tão indesejado acetato (MEDINA et al., 2010), um forte inibidor do metabolismo de leveduras obtido durante a hidrólise da biomassa lignocelulósica para a produção do etanol de segunda geração (PALMQVIST et al., 1999; ALMEIDA et al., 2007; BELLISSIMI et al., 2009). Este estudo investigou a possibilidade de se eliminar completamente a produção de glicerol utilizando uma estratégia de reoxidação do NADH por meio da redução do acetato em etanol, através de reações dependentes deste cofator. O genoma de *S. cerevisiae* já contém os genes codificadores das enzimas acetil coenzima A sintetase (VAN DEN BERG et al., 1996) e de algumas álcool desidrogenases, dependentes de NADH, expressas pelos genes *ADH1-5* (CIRIACY, 1975). Sendo assim, para completar o percurso linear para a redução do acetato, eles expressaram, por meio de técnicas de

biologia molecular, o gene heterólogo mhpF da bactéria *E. coli* (FERRÁNDEZ, GARCÍA, DÍAZ, 1997), e que codifica a enzima acetaldeído desidrogenase, dependente de NADH em *S. cerevisiae*. Estes pesquisadores utilizaram uma linhagem de laboratório de *S. cerevisiae* que teve os genes *GPD1* e *GPD2* deletados no seu genoma, e que, portanto, é incapaz de produzir glicerol, além de não conseguir crescer anaerobicamente, uma vez que boa parte da produção do NADH se dá no metabolismo de aminoácidos e lipídeos durante o crescimento anaeróbico, exigindo a existência de uma via de regeneração deste NADH. Com isto, foi possível restaurar o crescimento anaeróbio nas linhagens pela suplementação do meio com 2 gramas por litro de ácido acético, com aumento da produção de etanol (~5 %) e ausência de produção do glicerol. De acordo com os autores, a estequiometria do crescimento celular e do consumo de acetato foi consistente com a substituição completa da formação do glicerol pela redução do acetato até etanol como a via de reoxidação do NADH.

Este estudo abriu caminho para um novo panorama no desenvolvimento de linhagens industriais com potencial para melhorar o rendimento da conversão de açúcares em etanol em processos de segunda geração. Entretanto, a estratégia utilizada por Medina et al., (2010) resulta em linhagens que não produzem glicerol e, portanto, a princípio seriam inviáveis na industrial da produção de etanol a partir da sacarose, já que não possuem formas de se protegerem contra o forte estresse osmótico existente nas dornas de fermentação industriais devido a hidrólise extracelular da sacarose. Contudo, o nosso trabalho abriu uma nova perspectiva na diminuição do estresse osmótico sofrido pelas células, já que na hidrólise intracelular da sacarose não ocorre uma mudança brusca na osmolaridade do meio, o que diminui muito a necessidade da síntese do glicerol como osmorregulador. Assim, um estudo futuro muito promissor seria a aplicação da estratégia descrita por Medina et al. (2010) nas nossas linhagens *iSUC2*. Isso permitiria um incremento ainda maior no rendimento da conversão sacarose-etanol, uma vez que parte da fonte de carbono que ainda é destinada á sintetize do

glicerol pelas linhagens *iSUC2*, passaria a ser totalmente direcionada á produção do etanol nestas novas linhagens.

Após a avaliação das linhagens em meios YP contendo 2% de sacarose, é possível destacar os rendimentos alcoólicos maiores nas linhagens *iSUC2*. Entretanto, um resultado inesperado apresentado pelas linhagens modificadas foi a detecção de glicose e frutose no meio durante o processo fermentativo. Uma hipótese é que a captação ativa e rápida da sacarose do meio, aliada à eficiente hidrólise intracelular da sacarose pelos altos níveis de invertase sintetizados a partir do gene *iSUC2*, esteja produzindo grandes quantidades de glicose e frutose no interior da célula, de tal forma que a célula não consegue metabolizar e nem reter essas moléculas em seu interior, lembrando que os transportadores de hexoses *HXT* permitem o transporte bi-direcional dos açúcares a favor do gradiente de concentração (OZCAN, JONHSTON, 1999). Esta hipótese foi comprovada por Jansen, De Winde, Pronk (2002), que estudaram este fenômeno comparando linhagens isogênicas com e sem os transportadores da família *HXT*. Eles demonstraram que as linhagens que possuíam estes genes apresentavam grande efluxo de glicose após a administração de grandes quantidades de maltose às células. Porém as linhagens sem estes transportadores não apresentavam efluxo de glicose, e ainda apresentavam no seu interior as mesmas quantidades de glicose-6-fosfato e ATP que as linhagens que ainda possuíam os transportadores, indicando que não houve aumento da atividade de fosforilação destas moléculas, e sim a sua retenção física devido à ausência de transporte transmembrana. Foi investigada também a hipótese de lise celular, que foi descartada após eles não detectarem qualquer alteração nas quantidades de proteínas e outras moléculas presentes no meio durante a experimentação. Eles ainda descreveram que as quantidades de glicose excretadas variavam entre diferentes linhagens. Desta forma, o fenômeno do efluxo de monossacarídeos descrito pelo trabalho acima pode explicar a detecção de glicose e frutose no meio extracelular durante as fermentações com as novas linhagens *iSUC2*.

Outra hipótese que poderia ser formulada para a detecção de

monossacarídeos no meio é a da eventual ocorrência de hidrólise extracelular da sacarose. Contudo, usando os nossos próprios dados, é possível concluir que nas linhagens com o gene *iSUC2* sobre-expresso a detecção de glicose e frutose no meio não significa hidrólise extracelular da sacarose. Uma evidência disto é que nas linhagens normais os produtos de hidrólise são detectados logo que o nível de sacarose começa a diminuir, demonstrando que a sacarose não esta sendo captada diretamente para o interior da célula, e sim hidrolisada extracelularmente. Já nas linhagens com sobre-expressão do *iSUC2*, a detecção dos monossacarídeos no meio ocorre horas após a concentração de sacarose diminuir, as vezes até mesmo quando já está sendo totalmente esgotada do meio. Ao utilizarem maltose em seus experimentos, Jansen, De Winde, Pronk (2002) também eliminaram a hipótese de formação de monossacarídeos no meio pela hidrólise extracelular da maltose, já que esta molécula só pode ser hidrolisada intracelularmente (KAHN, ZIMMERMANN, EATON, 1973; ZASTROW et al., 2000, 2001; ALVES JUNIOR et al., 2008; ALVES JUNIOR, 2010).

Um resultado que deve ser ressaltado e explicado é que as linhagens que possuem os alelos modificados pelo p*ADH1*, tanto do *SUC2* quanto do *AGT1*, apresentaram maior expressão gênica quando crescidas em meios contendo glicose, enquanto que as linhagens não modificadas apresentaram maior expressão destes dois genes na presença da sacarose. Este comportamento pode ser explicado pelo fato do promotor do gene *ADH1* ser fortemente induzido pela presença de glicose no meio (BEIER, YOUNG, 1982; RUOHONEN, AALTO, KERÄNEN, 1995; ELBING et al., 2004), enquanto que os promotores dos genes *SUC2* e *AGT1* são reprimidos na presença desta molécula (REDDY et al., 1988; NEEDLEMAN, 1991; HORÁK, 1997; OZCAN et al., 1997).

Apesar de não termos identificado as causas para o comportamento inesperado das linhagens que apresentam o alelo p*ADH1*::*AGT1*, ainda existem algumas hipóteses que poderão ser estudadas futuramente. Uma delas é a possibilidade do transportador Agt1p estar sendo inativado. Esta descrito na literatura que transportadores Malx1p (codificados pelo gene

MALx1, da família dos genes *MAL*) sofrem inativação catabólica pela glicose, causando sua fosforilação e ubiquitinação, conduzindo-os à endocitose e degradação vacuolar (MEDINTZ et al., 1996; JIANG et al., 2000a, 2000b; GADURA, MICHELS, 2006; GADURA, ROBINSON, MICHELS, 2006; HATANAKA et al., 2009). No caso do transportador Malx1p, a hidrólise da maltose e a fosforilação das moléculas de glicose formadas no interior da célula, promovem a rápida ativação de uma cascata de regulação que induz a fosforilação das várias permeases Malx1p espalhadas pela membrana celular, causando perda drástica de suas atividades (GANCEDO et al., 1998; JIANG et al., 2000a; GADURA, ROBINSON, MICHELS, 2006; SANTANGELO et al., 2006). Sendo o gene *AGT1* da mesma família dos genes *MAL* e regulado pelos mesmos mecanismos gerais de regulação, é possível que a hidrólise intracelular da sacarose, e a consequente liberação de moléculas de glicose, esteja induzindo a uma inativação da permease Agt1p na membrana, apesar de que até o momento ainda não foi comprovado que a permease Agt1p sofra a inativação da mesma forma que as outras permeases da família *MAL*.

Interessante observar que mesmo a linhagem HCJ003 (fermentação da sacarose apenas por captação direta e hidrólise intracelular) possuindo dois alelos do gene *AGT1* normal, a expressão gênica apresentada na Figura 36 foi muito maior em comparação à linhagem diplóide CEN.PK122 (produção de glicose e frutose no meio extracelular), quando crescidas em sacarose. Isto contribui para reforçar uma hipótese de que na verdade a repressão catabólica da permease Agt1p pela glicose poderia ocorrer apenas quando este monossacarídeo fosse formado ainda no exterior da célula, e não no interior da célula, como no caso das linhagens *iSUC2*. Esta é uma hipótese que precisa de maiores investigações, especificamente utilizando a sacarose como a fonte de glicose. Seria interessante avaliar a expressão de genes que possuem expressão influenciada pela presença da glicose, como os genes das famílias *SUC*, *MAL* e *HXT*, utilizando as linhagens *iSUC2* em meios contendo sacarose ou glicose, e verificar se a expressão destes genes é muito diferente quando crescida em sacarose ou glicose.

Também é possível notar na Figura 36 que, depois de crescida em sacarose, a expressão gênica da linhagem PSY003, que apresenta o alelo p*ADH1*::*AGT1*, foi menor que a metade da expressão gênica da linhagem HCJ005-2, que possui o alelo p*GPD*::*AGT1*::t*PGK*. Além disto, a efetiva expressão de um gene não significa que as proteínas sintetizadas a partir daqueles mRNAs estarão ativas na membrana. Como explicado acima, a inativação catabólica pode ocorrer independentemente de uma forte expressão gênica, já que ocorre após a síntese da proteína. Isso nos induz a supor que a presença de apenas um alelo p*ADH1*::*AGT1* no genoma pode não ser suficiente para visualizar os efeitos esperados. É possível que a estratégia utilizada para inserir o alelo p*GPD*::*AGT1*::t*PGK* no genoma tenha resultado na inserção de inúmeras cópias do alelo, e que o número de cópias do alelo associado á alta expressão do gene, pode estar gerando uma quantidade tão grande de transportadores que a inativação catabólica não chega a ser suficiente para interferir no transporte do substrato.

De qualquer forma, o aumento da velocidade do consumo da sacarose foi alcançado utilizando o alelo p*GPD*::*AGT1*::t*PGK*, e, associado com a sobre-expressão da forma intracelular da invertase, foi possível alcançar melhores rendimentos alcoólicos em comparação com as linhagens parentais.

O aumento da produção de etanol nas novas linhagens só foi possível devido ao efetivo gasto de energia pela célula para realizar o transporte ativo da sacarose. Na fermentação da glicose e frutose em condições anaeróbicas, 2 moléculas de ATP são formadas por molécula de hexose. Portanto, a fermentação da sacarose resulta em 4 moléculas de ATP, quando a sacarose é hidrolisada extracelularmente. Porém, quando a sacarose é metabolizada intracelularmente, o próton que entra junto com a molécula de sacarose durante sua captação ativa precisa ser excretado pela ATPase (Pma1p) para evitar a acidificação intracelular (VAN DIJKEN, SCHEFFERS, 1986; WEUSTHUIS et al. ,1993). Para efetuar a extrusão deste próton, a ATPase gasta uma molécula de ATP. Assim, a hidrólise intracelular da sacarose produz apenas 3 moléculas de ATP por molécula do dissacarídeo. Em crescimentos fermentativos a partir de

açúcares, parte desta fonte de carbono é usada para a produção de biomassa celular e glicerol, necessário para regenerar o NADH formado durante as reações de biossíntese (VAN DIJKEN, SCHEFFERS, 1986). Contudo, essa produção de biomassa e glicerol necessita de certas quantidades de ATP, que é provida pela fermentação alcoólica dos açúcares. Assim, uma diminuição na produção de ATP durante a fermentação resultará no aumento da quantidade de moléculas de sacarose sendo convertidas em etanol, na tentativa de compensar a diminuição da produção de biomassa pela perda de ATP disponível. Então, a fermentação da sacarose via captação direta e hidrólise intracelular proporciona maior produção de etanol em relação à fermentação a partir da sua hidrólise extracelular (VAN DIJKEN, SCHEFFERS, 1986; WEUSTHUIS et al. ,1993).

Weusthuis et al. (1993) estudaram o impacto do simporte dissacarídeo-H^+ na produção de biomassa e outras moléculas em *S. cerevisiae*, por meio da comparação entre crescimentos anaeróbios em glicose e maltose (que é transportada ativamente e hidrolisada intracelularmente pela enzima maltase). Eles demonstraram que a produção de biomassa em crescimentos anaeróbicos em meios com maltose foi 25% menor, e a produção de etanol 8% maior, que nos meios com glicose, corroborando o modelo descrito acima.

Nossos resultados ficam em torno destes dados. O rendimento da produção de etanol pela linhagem HCJ007, em meios contendo 20% de sacarose, foi de aproximadamente 10% maior quando comparado com o rendimento da linhagem *wt* CEN.PK122 (Figura 30). Em relação à produção de biomassa, a linhagem HCJ007 produziu em média 30% menos biomassa em comparação com a linhagem *wt* CEN.PK122 em meios com 20% de sacarose. Isso confirma que o modelo mostrado por Weusthuis et al. (1993) também pode ser aplicado ao metabolismo da sacarose em um perfil de captação direta e hidrólise intracelular.

Recentemente foi publicado um trabalho realizado em paralelo pelo mesmo grupo de pesquisa onde este trabalho foi desenvolvido, onde foi demonstrado cineticamente que a captação direta e hidrólise intracelular

da sacarose permitiram um incremento de até 11% no rendimento da conversão sacarose-etanol por linhagens de *S. cerevisiae* (BASSO et al., 2011). Este trabalho estudou a cinética fermentativa da linhagem BSY021-34B (haplóide e que apresenta uma cópia do gene *iSUC2* e *AGT1* normal no seu genoma - vide Figura 13), em meios contendo sacarose como fonte de carbono. Inicialmente, em estudos teóricos, Basso et al. (2011) estabeleceram que a mudança total do metabolismo da sacarose para o interior da célula permitiria um incremento de aproximadamente 9 % na produção de etanol. Em comparação, este incremento é praticamente o mesmo que o observado por Weusthuis et al. (1993), quando comparado o perfil fermentativo das células em meios contendo maltose. Porém, nos testes preliminares de fermentação de sacarose em regime de anaerobiose plena em quimiostato, esta linhagem apresentou um rendimento de etanol apenas 4% maior em comparação com a linhagem parental, além de grandes quantidades de sacarose residual. Entretanto, ao submeterem esta linhagem á um processo de engenharia evolutiva em meios contendo a sacarose como o fator limitante em condições de anaerobiose, foi observado que após 90 gerações esta linhagem passou a consumir a sacarose em altas velocidades. Após uma detalhada caracterização genética, foi constatado que esta linhagem duplicou espontaneamente o número de cópias do gene *AGT1* no seu genoma, resultando num transporte ativo da sacarose 20 vezes maior que na linhagem original, e passou a apresentar um rendimento 11% maior na produção de etanol, além de uma drástica redução da sacarose residual.

Ao deletarem uma cópia do gene *AGT1* da nova linhagem *iSUC2* evoluída, Basso et al. (2011) demonstraram que o perfil fermentativo desta linhagem voltou a ser similar ao da linhagem *iSUC2* original, apresentando aproximadamente a metade da velocidade de transporte da sacarose que a linhagem evoluída apresentava antes da deleção. Ao deletarem as duas cópias do gene *AGT1* da linhagem *iSUC2* evoluída, eles observaram uma drástica diminuição na captação da sacarose pela célula. O perfil fermentativo da linhagem *iSUC2* evoluída com as duas cópias do *AGT1* deletadas, foi igual ao perfil apresentado pela linhagem *wt SUC2*.

Além disso, não foi detectada nenhuma mutação nos loci do gene *AGT1* nesta nova linhagem. Isto significa que o aumento nas velocidades de transporte da sacarose provavelmente deveu-se ao aumento no número de cópias deste gene no genoma e, consequentemente, ao aumento no número de transportadores ativos na membrana, e não á uma mudança na afinidade da proteína pelo substrato. Entretanto, vale ressaltar que uma eventual mutação na proteína regulatória dos loci *MAL* (*MALx3*) também poderia explicar a expressão aumentada do gene *AGT1*.

Corroborando estes dados, as linhagens utilizadas no nosso trabalho só alcançaram um perfil eficiente de metabolização da sacarose após apresentarem o gene *AGT1* sobre-expressado no seu genoma. Estes resultados demonstram que o transportador Agt1p possui um papel fundamental para alcançar maiores conversões da sacarose em etanol. Assim, como observado por Basso et al. (2011) e reforçado pelos nossos dados, apenas a realocação do metabolismo da sacarose para o interior da célula não é suficiente para alcançar um maior rendimento na conversão da sacarose em etanol. É necessário o transporte eficiente das moléculas do açúcar, refletido pelas modificações na região promotora do gene *AGT1*,como no nosso trabalho; ou no número de cópias deste mesmo gene, como demonstrado por Basso et al. (2011).

Ainda de acordo com Basso et al. (2011), a análise do transcriptoma da nova linhagem *iSUC2* evoluída comparada com a linhagem *iSUC2* original, ainda mostrou que ao final do experimento de evolução desta linhagem, 84 genes tiveram sua expressão significativamente aumentada, como os genes *MPH2*, *MPH3* e *MAL31*, relacionados ao transporte de dissacarídeos (NEEDLEMAN, 1991; HORÁK, 1997; DAY et al., 2002a,b), e os genes *HXT8*, *HXT9* e *HXT12*, envolvidos no transporte de hexoses (OZCAN, JONHSTON, 1999). Quase todos os genes presentes nos loci *MAL1* e *MAL3* (*AGT1*, *MAL13*, *MAL31* e *MAL32*) tiveram sua expressão aumentada. Mais uma vez, uma eventual mutação na proteína regulatória dos loci *MAL* poderia explicar o aumento na expressão de quase todos os outros genes *MAL*. Além dos genes acima, também houve aumento da expressão de vários genes envolvidos com o metabolismo e transporte de

carboidratos e, em menor número, com as respostas ao estresse e estímulos externos. Isto mostra que novos estudos com outros genes ainda podem ser conduzidos no intuito de melhorar ainda mais o metabolismo da sacarose.

Neste nosso trabalho, as linhagens da família HCJ alcançaram o perfil de metabolismo da sacarose de acordo com os objetivos propostos. Entretanto, é necessário enfatizar que o rendimento da fermentação da sacarose para a produção de etanol foi maior nas linhagens *iSUC2* diplóides do que nas linhagens *iSUC2* haplóides. Em comparação, a produção de etanol e biomassa foi, respectivamente, em média 30% maior e 8% menor na linhagem diplóide HCJ003 quando comparada à linhagem haplóide BSY021-34B. Na linhagem HCJ007 a produção de etanol e biomassa foi, respectivamente, em média 7% maior e 13% menor quando comparada com a linhagem haplóide HCJ005-2. Desta forma, fica claro que o uso de linhagens diplóides na fermentação da sacarose para a produção de etanol pode incrementar ainda mais o rendimento da conversão sacarose-etanol.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

Os resultados obtidos no presente trabalho permitem concluir que a estratégia de sobre-expressão da invertase intracelular (*iSUC2*), tanto em linhagens haplóides quanto diplóides, permite a eficiente fermentação da sacarose pelas leveduras, incluindo uma menor produção de glicerol e açúcares (glicose e frutose) no meio de cultivo, além do aumento da produção de etanol quando comparadas às linhagens sem a modificação. De fato, os resultados aqui apresentados fazem parte de um pedido de depósito de patente (Processo para modificar geneticamente leveduras *Saccharomyces*, e seu uso em processos fermentativos de produção de metabólitos), que foi depositado pela Universidade Federal de Santa Catarina ao INPI como representante legal do grupo de 13 co-inventores, incluindo este doutorando e seu orientador.

Embora a estratégia de sobre-expressão do *AGT1* com o promotor p*ADH1* apresentou resultados característicos de sobre-expressão da proteína pelos testes de transporte de *p*NPαG, não foi possível perceber a contribuição do alelo p*ADH1*::*AGT1* durante os processos de fermentação com 200 g/L de sacarose. Porém, as linhagens que apresentam o gene *AGT1* regulado com o promotor forte constitutivo p*GPD* (HCJ006 e 007), apresentaram um significativo aumento na velocidade de captação direta da sacarose durante os processos fermentativos realizados com 200 g/L, sem comprometer em demasia a capacidade da célula em reter os produtos de hidrólise interna. Essas linhagens alcançaram um perfil de consumo bastante próximo ao das linhagens industriais (CAT-1 e PE-2), porém com as vantagens da hidrólise intracelular da sacarose.

Como os resultados indicam uma menor produção de glicerol pelas leveduras, o que sugere um menor estresse osmótico nas células *iSUC2*, seria interessante verificar fermentações com maiores concentrações de sacarose (>>250 g/L), o que permitiria a eficiente produção de maiores concentrações de etanol, com interessantes consequências no balanço

energético das usinas pelo menor gasto na destilação e tratamento da vinhaça.

Este estudo promoveu grande avanço nas pesquisas para aumentar o rendimento da produção de etanol no Brasil. Como demonstrado, a hidrólise intracelular da sacarose apresenta grande vantagem metabólica na conversão sacarose-etanol, mas não se limita apenas a isto. A hidrólise extracelular da sacarose em glicose e frutose permite o crescimento de vários organismos indesejáveis que não consumiriam a sacarose (GREIG, TRAVISANO, 2004; GORE, YOUK, VAN OUDENAARDEN, 2009). Além disso, a formação de frutose no meio extracelular pode trazer grandes perdas para a indústria, devido à lenta utilização deste monossacarídeo por linhagens industriais de *S. cerevisiae*, resultando em açúcar residual e redução da produção de etanol (BERTHELS et al., 2004).

O desenvolvimento de linhagens de leveduras capazes de fermentar sacarose sem que ocorra a hidrólise extracelular deste açúcar, poderá trazer significativos benefícios às usinas de produção de álcool combustível no Brasil. Estas leveduras darão uma maior flexibilidade à condução do processo industrial, permitindo alimentar as dornas de fermentação com grandes volumes de mosto contendo concentrações maiores de sacarose, a uma velocidade maior, mas reduzindo o estresse osmótico causado pela hidrólise extracelular do dissacarídeo e impedindo o consumo de glicose e frutose por bactérias e leveduras contaminantes. Desta forma, a produção de etanol poderá ser substancialmente ampliada sem a necessidade do aumento das áreas de plantio da cana.

Com tantas vantagens em potencial, implementar estas modificações genéticas em linhagens industriais se mostra extremamente atraente, apesar de ainda existirem outras características que ainda carecem de ser aprimoradas, como a formação de produtos secundários (NISSEN et al., 2000b; BRO et al., 2006; GUADALUPE MEDINA et al., 2010; GUO et al., 2010) e a tolerância à grandes quantidades de etanol (YANG et al., 2011).

REFERÊNCIAS

AA, E.; TOWNSEND, J. P.; ADAMS, R. I.; NIELSEN, K. M.; TAYLOR, J. W. Population structure and gene evolution in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Yeast Research**, v. 6, p. 706-715, 2006.

AHUATZI, D.; RIERA, A.; PELAEZ, R.; HERRERO, P.; MORENO, F. Hxk2 regulates the phosphorylation state of Mig1 and therefore its nucleocytoplasmic distribution. **Journal of Biological Chemistry,** v. 282, p. 4485–4493, 2007.

ALBON, N.; GROSS, D. the chromatographic determination of raffinose in raw sugars. **Analyst**, v. 75, p. 454-457, 1950.

ALCARDE, A. R.; BASSO, L. C. Efeito da trealose na manutenção da viabilidade de células de leveduras desidratadas por liofilização. **Scientia Agricola**, v. 54, p. 189-194, 1997.

ALMEIDA, J. R. M.; MODIG, T.; PETERSSON, A.; HÄHN-HÄGERDAL, B.; LIDÉN, G.; GORWA-GRAUSLUND, M. F. Increased tolerance and conversion of inhibitors in lignocellulosic hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Chemistry and Technology of Biotechnology**, v. 82, p.340–349, 2007.

ALVARADO, E.; BALLOU, L.; HERNANDEZ, L. M.; BALLOU, C. E. Localization of alpha 1-3-linked mannoses in the N-linked oligosaccharides of *Saccharomyces cerevisiae* mnn mutants. **Biochemistry**, v. 29, p. 2471-2482, 1990.

ALVES JUNIOR, S. L. **Genômica do metabolismo de maltotriose em *Saccharomyces cerevisiae*: o papel determinante do gene *AGT1*.** 2010. 133 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

ALVES JUNIOR, S. L.; HERBERTS, R. A.; HOLLATZ, C.; TRICHEZ, D.; MILETTI, L. C.; DE ARAUJO, P. S.; STAMBUK, B. U. Molecular analysis of maltotriose active transport and fermentation by S*accharomyces cerevisiae* reveals a determinant role for the *AGT1* permease. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, p. 1494-1501, 2008.

De acordo com: Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR 6023: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

AMORIM, H. V.; BASSO, L. C.; ALVES, D. M. G. **Processos de produção de álcool** – controle e monitoramento. 2. ed. Piracicaba: FERMENTEC/FEALQ/ESALQ – USP, 1996. p. 56-59.

AMORIM, H. V.; BASSO, L. C.; LOPES, M. L. 'Evolution of ethanol fermentation in Brazil', In: BRYCE, J. H.; STEWART, G. G. **Tradition and Innovation.** 2. ed. Nottinhan: University Press, 2004. p. 215-221.

AMORIM, V. A. **Fermentação alcoólica: ciência e tecnologia.** Piracicaba: FERMENTEC, 2005. 434 p.

ANDRIETTA, M. G. S.; ANDRIETTA, S. R.; STECKELBERG, C.; STUPIELLO, E. N. A. Bioethanol – 30 years of Proálcool. **International Sugar Journal,** v. 109, p. 195-200, 2007.

ARRUDA, L.; VITOLO, M. Characterization of invertase entrapped into calcium alginate beads. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 81, p. 23-33, 1999.

AUSUBEL, F. M.; BRENT, R.; KINGSTON, R. E.; MOORE, D. D.; SEIDMAN, J. G.; SMITH, J. A.; STRUHL, K. **Short protocols in molecular biology**. 2. ed. New York: Greene Publishing Associates, 1992. 1104 p.

BADOTTI, F.; BATISTA, A. S.; STAMBUK, B. U. Sucrose active transport and fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 49, p. 115-123, 2006.

BADOTTI, F.; DÁRIO, M. G.; ALVES JUNIOR, S. L.; CORDIOLI, M. L. A.; MILETTI, L. C.; ARAUJO, P. S.; STAMBUK, B. U. Switching the mode of sucrose utilization by *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbial Cell Factories**, v. 7, p. 1-11, 2008.

BARFORD, J. P.; PHILLIPS, P. J.; ORLOWSKI, J. H. A new model of uptake of multiple sugars by *S. cerevisiae*. Part 2. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 7, p. 303-307, 1992.

BARNETT, J. A. the utilization of dissaccharides and some other sugars by yeast. **Advances in Carbohydrate Chemistry & Biochemistry**, v. 39, p. 347-404, 1981.

BASÍLIO, A. C. M.; ARAÚJO, P. R. L.; MORAIS, J. O. F.; SILVA FILHO, E. A.; MORAIS, M. A.; SIMÕES, D. A. Jr. Detection and identification of wild yeast contaminants of the industrial fuel ethanol fermentation process. **Current Microbiology**, v. 56, p. 322-326, 2008.

BASSO, L. C.; AMORIM, H. V.; OLIVEIRA, A. J.; LOPES, M. L. Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil. **FEMS Yeast Research**, v. 8, p. 1155-1163, 2008.

BASSO, T. O.; DE KOK, S.; DARIO, M.; DO ESPIRITO-SANTO, J. C. A.; MÜLLER, G.; SCHLÖLG, P. S.; SILVA, C. P.; TONSO, A.; DARAN, J. M.; GOMBERT, A. K.; VAN MARIS, A. J. A.; PRONK, J. T.; STAMBUK, B. U. Engineering topology and kinetics of sucrose metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* for improved ethanol yield. **Metabolic Engineering**, v. 13, p. 694-703, 2011.

BATISTA, A. S.; MILETTI, L. C.; STAMBUK, B. U. Sucrose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* lacking hexose transport. **Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology**, v. 8, p. 26–33, 2004.

BEIER, D. R.; YOUNG, E. T. Characterization of a regulatory region upstream of the *ADR2* locus of *Saccharomyces cerevisiae*. **Nature**, v. 300, p. 724-728, 1982.

BELINCHÓN, M. M.; GANCEDO, J. M. Different signalling pathways mediate glucose induction of *SUC2*, *HXT1* and pyruvate decarboxylase in yeast. **FEMS Yeast Research**, v. 10, p. 1-8, 2006.

BELLISSIMI, E.; VAN DIJKEN, J. P.; PRONK, J. T.; VAN MARIS, A. J. A. Effects of acetic acid on the kinetics of xylose fermentation by an engineered, xylose-isomerase-based *Saccharomyces cerevisiae* strain. **FEMS Yeast Research**, v. 9, p. 358–364, 2009.

BENITEZ, T.; CODON, A. C. Genetic bases of the chromosomal polymorphism of industrial yeast. **Microbiologia,** v. 11, p. 383-385, 1995.

BENITEZ, T.; MARTINEZ, P.; CODON, A. C. Genetic constitution of industrial yeast. **Microbiologia,**. v. 12, p. 371-384, 1996.

BENTLEY, J.; DERBY, R. **Ethanol & fuel cells:** converging paths of opportunity. Report for the Renewable Fuel Association. Washington-DC, 2002. Disponível em <http://ethanolrfa.3cdn.net/7338b667796f41665f_9qm6i630e.pdf> Acesso em: 14 fev de 2012.

BERG, C. **World fuel ethanol:** analysis and outlook. Abril 2004. Disponível em <http://www.distill.com/World-Fuel-Ethanol-A&O-2004.html> Acesso em: 14 fev de 2012.

BERTHELS, N. J.; OTERO, R. R. C.; BAUER, F. F.; THEVELEIN, J. M.; PRETORIUS, I. S. Discrepancy in glucose and fructose utilization during fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast. **FEMS Yeast Research**, v. 4, p. 683-689, 2004.

BIDENNE, C.; BLONDIN, B.; DEQUIN, S.; VEZINHET, F. Analysis of the chromosomal DNA polymorphism of wine strain of *Saccharomyces cerevisiae*. **Current Genetics,** v. 22, p. 1-7, 1992.

BIONDI, A.; MONTEIRO, M.; GLASS, V. **O Brasil dos agrocombustíveis - CANA**. Relatório do centro de monitoramento de agrocombustíveis - ONG Reporter Brasil, 2008. Disponível em <http://reporterbrasil.org.br/documentos/o_brasil_dos_agrocombustiveis_v3.pdf> Acesso em: 14 fev de 2012.

BLOMBERG, A.; ADLER, L. Physiology of osmotolerance in fungi. **Advances in Microbiological Physiology**, v. 33, p. 145–212, 1992.

BNDES. **Bioetanol de cana-de-açúcar - energia para o desenvolvimento sustentável. BNDES**. v. 1, Novembro 2008. Disponível em: <http://www.bioetanoldecana.org/pt/download/bioetanol.pdf> Acesso em: 14 fev de 2012.

BOLES, E.; HOLLEMBERG, C. the molecular genetics of hexoses transport in yeast. **FEMS Microbiology Review**, v. 21, p. 85-111, 1997.

BORZANI, W; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; SCHIMIDELL, W. **Biotecnologia industrial - Engenharia bioquímica**. São Paulo: Edgard Blücher, v. 2, 2001. p. 179-245.

BREWSTER, J. L.; DE VALOIR, T.; DWYER, N. D.; WINTER, E.; GUSTIN, M. C. An osmosensing signal transduction pathway in yeast. **Science,** v. 259, p. 1760–1763, 1993.

BRO, C.; REGENBERG, B.; FORSTER, J.; NIELSEN, J. In silico aided metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for improved bioethanol production. **Metabolic Engineering,** v. 8, p. 102-111, 2006.

BU, Y.; SCHMIDT, M. C. Identification of *cis*-acting elements in the *SUC2* promoter of *Saccharomyces cerevisiae* required for activation of transcription. **Nucleic Acids Research**, v. 26, p. 1002-1009, 1998.

BUSTURIA, A.; LAGUNAS, R. Identification of two forms of the maltose transport system in *Saccharomyces cerevisiae* and their regulation by catabolite inactivation. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 820, p. 324-326, 1985.

CAMPBELL, M. K. **Bioquímica**, 3ª. ed. São Paulo: Artmed, 2001. 427 p.

CARLSON, M.; BOTSTEIN, D. Two differentially regulated mRNAs with different 5’ ends encode secreted and intracellular forms of yeast invertase. **Cell**, v. 28, p. 145-154, 1982.

CARRASCO, P.; QUEROL. A. Analisys of the stress resistance of commercial wine yeast strains. **Archives of Microbiology**, v. 175, p. 450-457, 2001.

CHENG, Q.; MICHELS, C. A. *MAL11* and *MAL61* encode the inducible high-affinity maltose transporters of *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Bacteriology**, v. 173, p. 1817-1820, 1991.

CIRIACY, M. Genetics of alcohol-dehydrogenase in *Saccharomyces cerevisiae*. 1. Isolation and genetic-analysis of *adh* mutants. **Mutation Research**, v. 29, p. 315–326, 1975.

CLARE, J. J. Expression of cloned genes in the yeasts *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia pastoris*. **Methods In Molecular and Cellular Biology**, v. 5, p. 319-329, 1995.

CODON, A. C.; BENITEZ, T.; KORHOLA, M. Chromosomal polymorphism and adaptation to specific industrial environments of *Saccharomyces* strains. **Applied Microbiology and Biotechnology,** v. 49, p. 154-163, 1998.

CODON, A. C.; BENITEZ, T.; KORHOLA, M. Chromosomal reorganization during meiosis of *Saccharomyces cerevisiae* baker's yeasts. **Current Genetics,** v. 32, p. 247-259, 1997.

CONLAN, R. S.; TZAMARIAS, D. Sfl1 functions via the co-repressor Ssn6-Tup1 and the cAMP-dependent protein kinase Tpk2. **Journal of Molecular Biology**, v. 309, p. 1007-1015, 2001.

DÁRIO, M. G. **Análise molecular do metabolismo de sacarose por linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* utilizadas na produção industrial de álcool combustível.** 2007. 108 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2007.

DAY, R. E.; HIGGINS, V. J.; ROGERS, P. J.; DAWES, I. W. Characterization of the putative maltose transporters encoded by YDL247w and YJR160c. **Yeast**, v. 19, p. 1015–1027, 2002b.

DAY, R. E.; ROGERS, P. J.; DAWES, I. W.; HIGGINS, V. J. Molecular analysis of maltotriose transport and utilization by *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p. 5326–5335, 2002a.

DEMIATE, I. M.; WOSIACKI, G.; CZELUSNIAK, C.; NOGUEIRA, A. Determinação de açúcares redutores e totais em alimentos. Comparação entre método colorimétrico e titulométrico. **Publicatio UEPG. Ciências Exatas e da Terra, Ciências Agrárias e Engenharias**, Ponta Grossa PR, v. 8, p. 65-78, 2002.

DIDERICH, J. A.; SCHEPPER, M.; VAN HOEK, P.; LUTTIK, M. A. H.; VAN DIJKEN, J. P.; PRONK, J. T.; KLAASSEN, P.; BOELENS, H. F. M.; DE MATTOS, M. J. T.; VAN DAM, K.; KRUCKEBERG, A. L. Glucose uptake kinetics and transcription of *HXT* genes in

chemostat cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, p. 15350-15359, 1999;

DUMORTIER, F.; VANHALEWYN, M.; DEBAST, G.; COLOMBO, S.; MA, P.; WINDERICKX, J.; VAN DIJCK, P.; THEVELEIN, J. M. A specific mutation in *Saccharomyces cerevisiae* adenylate cyclase, $Cyr1^{K1876M}$, eliminates glucose and acidification-induced cAMP signalling and delays glucose-induced loss of stress resistance. **International Journal of Food Microbiology**, v. 55, p. 103-107, 2000.

DUVAL, E. H.; ALVES JUNIOR, S. L.; DUNN, B.; SHERLOCK, G. J.; STAMBUK, B. U. Microarray karyotyping of maltose fermenting *Saccharomyces* yeasts with differing maltotriose utilization profiles reveals copy number variation in genes involved in maltose and maltotriose utilization. **Journal of Applied Microbiology**, v. 109, p. 248-259, 2010.

DYNESEN, J.; SMITS, H. P.; OLSSON, L.; NIELSEN, J. Carbon catabolite repression of invertase during batch cultivations of *Saccharomyces cerevisiae*: the role of glucose, fructose, and mannose. **Applied Microbiology and Biotechnology,** v. 50, p. 579-582, 1998.

ECHEGARAY, O. F.; CARVALHO, J. C. M.; FERNANDES, A. N. R.; SATO. S.; AQUARONE, E.; VITOLO, M. Fed-batch culture of *Saccharomyces cerevisiae* in sugar-cane blackstrap molasses: invertase activity of intact cells in ethanol fermentation. **Biomass and Bioenergy**, v. 19, p. 39-50, 2000.

ELBING, K.; STAHLBERG, A.; HOHMANN, S.; GUSTAFSSON, L. Transcriptional responses to glucose at different glycolytic rates in *Saccharomyces cerevisiae*. **European Journal of Biochemistry**, v. 271, p. 4855-4864, 2004.

ENTIAN, K. D.; BARNETT, J. A. Regulation of sugar utilization by *Saccharomyces cerevisiae*. **Trends in Biochemical Sciences**. v. 12, p. 506–510, 1992

ERASMUS, D. J.; VAN DER MERWE, G. K.; VAN VUUREN, H. J. J. Genome-wide expression analyses: metabolic adaptation of *Saccharomyces cerevisiae* to high sugar stress. **FEMS Yeast Research**, v. 3, p. 375-399, 2003.

FARRELL, A. E.; PLEVIN, R. J.; TURNER, B. T.; JONES, A. D.; O'HARE, M.; KAMMEN, D. M. Ethanol can contribute to energy and environmental goals. **Science**, v. 311, p. 506-508, 2006.

FERRÁNDEZ, A.; GARCÍA, J. L.; DÍAZ, E. Genetic characterization and expression in heterologous hosts of the 3-(3-hydroxyphenyl) propionate catabolic pathway of *Escherichia coli* K-12. **Journal of Bacteriology**, v. 179, p. 2573–2581, 1997.

FIDALGO, M.; BARRALES, R. R.; IBEAS, J. I.; JIMENEZ, J. Adaptive evolution by mutations in the *FLO11* gene. **Proceedings of the National Academy of Science of U. S. A.,** v. 103, p. 11228-11233, 2006.

FLETCHER, H. G.; DIEHL, H. W. Improvements in the preparation of melibiose from raffinose - a new form of melibiose. **Journal of the American Chemical Society**, v. 74, p. 5774-5776, 1952.

FLORES, C. L.; RODRIGUEZ, C.; PETIT, T.; GANCEDO, C. Carbohydrate and energy-yielding metabolism in non-conventional yeasts. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 24, p. 507-29, 2000.

FOLCH-MALLOL, J. L.; GARAY-ARROYO, A.; LLEDIAS, F. La respuesta a estrés en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. **Revista Latino Americana de Microbiologia,** v. 46, p. 24-46, 2004.

FRANÇA, R. **70 questões para entender o etanol**. Revista Veja, v. 2052, 19 de março de 2008. Disponível em <http://veja.abril.com.br/190308/p_104.shtml> Acesso em: 14 fev de 2012.

GADURA, N.; MICHELS, C. A. Sequences in the N-terminal cytoplasmic domain of *Saccharomyces cerevisiae* maltose permease are required for vacuolar degradation but not glucose-induced internalization. **Current Genetics**, v. 50, p. 101-114, 2006.

GADURA, N.; ROBINSON, L. C.; MICHELS, C. A. Glc7–Reg1 Phosphatase signals to Yck1,2 Casein Kinase 1 to regulate transport activity and glucose-induced inactivation of *Saccharomyces* maltose permease. **Genetics**, v. 172, p. 1427-1439, 2006.

GANCEDO, C.; SERRANO, R. Energy-yielding metabolism. **Yeast**, v. 3, p. 205-259, 1989.

GANCEDO, J. M. Carbon catabolite repression in yeast. **European Journal of Biochemistry**, v. 206, p. 297–313, 1992.

GANCEDO, J. M. the early steps of glucose signalling in yeast. **FEMS Microbiology Reviews,** v. 32, p. 673–704, 2008.

GANCEDO, J. M. Yeast carbon catabolite repression. **Microbiology and Molecular Biology Reviews,** v. 62, p. 334-361, 1998.

GIBSON, A. W.; WOJCIECHOWICZ, L. A.; DANZI, S. E.; ZHANG, B.; KIM, J. H.; HU, Z.; MICHELS, C. A. Constitutive mutations of the *Saccharomyces cerevisiae MAL*-activator genes *MAL23*, *MAL43*, *MAL63*, and *mal64*. **Genetics**, v. 146, p. 1287-1298, 1997.

GOFFEAU, A.; BARRELL, B. G.; BUSSEY, H.; DAVIS, R. W.; DUJON, B.; FELDMANN, H.; GALIBERT, F.; HOHEISEL, J. D.; JACQ, C.; JOHNSTON, M.; LOUIS, E. J.; MEWES, H. W.; MURAKAMI, Y.; PHILIPPSEN, P.; TETTELIN, H.; OLIVER, S. G. Life with 6000 genes. **Science**, v. 274, p. 563-567, 1996.

GORE, J.; YOUK, H.; VAN OUDENAARDEN, A. Snowdrift game dynamics and facultative cheating in yeast. **Nature**, v. 459, p. 253-256, 2009.

GREIG, D.; TRAVISIANO, M. the prisioner's dilemma and polymorphism in yeast *SUC* genes. **Proceedings of the Royal Society of London - Series B: Biological Sciences**, v. 271, p. S25-S26, 2004.

GROSSMANN, M. K.; ZIMMERMANN, F. K. the structural genes of internal invertases on *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular and General Genetics,** v. 175, p. 223-229, 1979.

GUADALUPE MEDINA, V.; ALMERING, M. J. H.; VAN MARIS, A. J. A.; PRONK, J. T. Elimination of glycerol production in anaerobic cultures of a *Saccharomyces cerevisiae* strain engineered to use acetic acid as an electron acceptor. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, p. 190-195, 2010.

GUERRA, O. G.; RUBIO, I. G. S.; SILVA FILHO, C. G. DA; BERTONI, R. A.; GOVEA, R. C. S.; VICENTE, E. J. A novel system of genetic transformation allows multiple integrations of a desired gene in *Saccharomyces cerevisiae* chromossomes. **Journal of Microbiological Methods**, v. 67, p. 437-445, 2006.

GUO, Z. P.; ZHANG, L.; DING, Z. Y.; SHI, G. Y. Minimization of glycerol synthesis in industrial ethanol yeast without influencing its fermentation performance. **Metabolic Engineering**, v. 13, p. 49-59, 2010.

HAHN-HÄGERDAL, B.; GALBE, M.; GORWA-GRAUSLUND, M. F.; LIDÉN, G.; ZACCHI, G. Bio-ethanol – the fuel of tomorrow from the residues of today. **Trends in Biotechnology**, v. 24, p. 549-556, 2006.

HAN, E. K.; COTTY, F.; SOTTAS, C.; JIANG, H.; MICHELS, C. A. Characterization of *AGT1* encoding a general α-glucoside transporter from *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular Microbiology**, v. 17, p. 1093-1107, 1995.

HAQ, I. U.; SHAFIQ, K.; ALI, S. Substrate-induced repression of invertase synthesis by *Saccharomyces cerevisiae* in submerged culture. **Pakistan Journal of Botany**, v. 35, p. 527-531, 2003.

HATANAKA, H.; OMURA, F.; KODAMA, Y.; ASHIKARI, T. Gly-46 and His-50 of yeast maltose transporter Mal21p are essential for its resistance against glucose-induced degradation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, p. 15448-15457, 2009.

HENSING, M. C. M. Physiological and technological aspects of large-scale heterologous-protein production with yeasts. **Antonie van Leeuwenhoeck Reviews,** v. 67, p. 261-279, 1995.

HERBERTS, R. A. **Transporte ativo de α-glicosídeos: uma metodologia para avaliar a vitalidade de leveduras cervejeiras**. 2006. 72 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2006.

HERSEN, P.; MCCLEAN, M. N.; MAHADEVAN, L.; RAMANATHAN, S. Signal processing by the HOG MAP kinase pathway. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, p. 7165-7170, 2008.

HERWING, C.; DOERRIES, C.; MARISON, I.; VON STOCKAR, U. Quantitative analysis of the regulation scheme of invertase expression in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 76, p. 247-258, 2001.

HIGGINS, V. J.; BRAIDWOOD, M.; BISSINGER, P.; DAWES, I. W.; ATTFIELD, P. V. Leu^{343}Phe substitution in the Malx3 protein of *Saccharomyces cerevisiae* increases the constitutivity and glucose insensitivity of *MAL* gene expression. **Current Genetics**, v. 35, p. 491-498, 1999.

HILL, J.; NELSON, E.; TILMAN, D.; POLASKY, S.; TIFFANY, D. Environmental, economic and energetic coast and benefits of biodiesel and ethanol biofuels. **Proceedings of the National Academy of Science of USA**., v. 103, p. 11206-11210, 2006.

HOHMANN, S. Osmotic stress signaling and osmoadaptation in yeasts. **Microbiology and Molecular Biology Reviews,** v. 66, p. 300–372, 2002.

HOLLATZ, C.; STAMBUK, B. U. Colorimetric determination of active α-glucoside transport in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Microbiological Methods**, v. 46, p. 253-259, 2001.

HOLMES, E. W. Coupled enzymatic assay for the determination of sucrose. **Analytical Biochemistry,** v. 244, p. 103-109, 1996.

HORÁK, J. Yeast nutrient transporters. **Biochimica et Biophysica Acta,** v. 331, p. 41-79, 1997.

IVORRA, C.; PÉREZ-ORTIN, J. E.; OLMO, M. An inverse correlation between stress resistance and stuck fermentations in wine yeasts. A molecular study. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 64, p. 698-708, 1999.

JANSEN, M. L. A.; DE WINDE, J. H.; PRONK, J. T. Hxt-carrier-mediated glucose efflux upon exposure of *Saccharomyces cerevisiae* to excess maltose. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p. 4259-4265, 2002.

JIANG, H.; MEDINTZ, I.; ZHANG, B.; MICHELS, C. A. Metabolic signals trigger glucose-induced inactivation of maltose permease in *Saccharomyces*. **Journal of Bacteriology**, v. 182, p. 647-654, 2000a.

JIANG, H.; TATCHELL, K.; LIU, S.; MICHELS, C. A. Protein phosphatase type-1 regulatory subunits Reg1p and Reg2p act as signal transducers in the glucose-induced inactivation of maltose permease in *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular Genetics and Genomics**, v. 263, p. 411-422, 2000b.

JOHNSTON, M.; KIM, J. H. Glucose as a hormone: receptor-mediated glucose sensing in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochemical Society Transactions**, v. 33, p. 247–252, 2005.

KAHN, N. A.; ZIMMERMANN, F. K.; EATON, N. R. Genetic and biochemical evidence of sucrose fermentation by maltase in yeast. **Molecular and General Genetics,** v. 123, p. 43-50, 1973.

KIM, J. H.; JOHNSTON, M. Two glucose-sensing pathways converge on Rgt1 to regulate expression of glucose transporter genes in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, p. 26144–26149, 2006.

KORSHUNOVA, I. V.; NAUMOVA, E. S.; NAUMOV, G. I. Comparative molecular-genetic analysis of the beta-fructosidases in yeast *Saccharomyces*. **Molecular Biology**, v. 39, p. 413-419, 2005.

KOSCHWANEZ, J. H.; FOSTER, K. R.; MURRAY, A. W. Sucrose utilization in budding yeast as a model for the origin of undifferentiated multicellularity. **PLoS Biology**, v. 9, p. 01-10, 2011.

KRESNOWATI, M. T.; VAN WINDEN, W. A.; ALMERING, M. J. When transcriptome meets metabolome: fast cellular responses of yeast to sudden relief of glucose limitation. **Molecular Systems Biology**, v. 2, p. 49, 2006.

LAGUNAS, R. Sugar transport in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiology Reviews,** v. 104, p. 1107-1112, 1993.

LANDRY, C. R.; TOWNSEND, J. P.; HARTL, D. L.; CAVALIERI, D. Ecological and evolutionary genomics of *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular Ecology**, v. 15, p. 575-591, 2006.

LEMAIRE, K.; VAN DE VELDE, S.; VAN DIJCK, P.; THEVELEIN, J. Glucose and sucrose act as agonist and mannose as antagonist ligands of the G protein-coupled receptor Gpr1 in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular Cell**, v. 16, p. 293–299, 2004.

LIMA, U. A; BASSO, L. C.; AMORIM, H. V. "Produção de Etanol" In: LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. **Biotecnologia Industrial - Processos Fermentativos,** São Paulo: Ed. Edgard Blücher Ltda., 2001. v. 3, p. 01-39.

LINGNER, U.; MÜNCH, S.; SODE, B.; DEISING, H. B.; SAUER, N. Functional characterization of a eukaryotic melibiose transporter. **Plant Physiology**, v. 156, p. 1565-1576, 2011.

LOBO, Z.; MAITRA, P. K. Physiological role of glucosephosphorylating enzymes in *Saccharomyces cerevisiae*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 182, p. 639–645, 1977.

MACLEAN, R. C.; FUENTES-HERNANDEZ, A.; GREIG, D.; HURST, L. D.; GUDELJ, I. A mixture of "cheats" and "co-operators" can enable maximal group benefit. **PLoS Biology**, v. 8, p. 01-11, 2010.

MAEDA, T.; TAKEKAWA, M.; SAITO, H. Activation of yeast *PBS2* MAPKK by MAPKKKs or by binding of an SH3-containing osmosensor. **Science**, v. 269, p. 554–558, 1995.

MAEDA, T.; WURGLER-MURPHY, S. M.; SAITO, H. A two-component system that regulates an osmosensing MAP kinase cascade in yeast. **Nature**, v. 369, p. 242–245, 1994.

MATSUMOTO, K.; UNO, I.; TOH-E, A.; ISHIKAWA, T.; OSHIMA, Y. Cyclic AMP may not be involved in catabolite repression in *Saccharomyces cerevisiae*: evidence from mutants capable of utilizing it as an adenine source. **Journal of Bacteriology**, v. 150, p. 277–285, 1982.

MEDINA, V. G.; ALMERING, M. J. H.; VAN MARIS, A. J. A.; PRONK, J. T. Elimination of glycerol production in anaerobic cultures of a *Saccharomyces cerevisiae* strain engineered to use acetic acid as an electron acceptor. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, p. 190-195, 2010.

MEDINTZ, I.; JIANG, H.; HAN, E. K.; CUI, W.; MICHELS, C. A. Characterization of the glucose-induced inactivation of maltose permease in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Bacteriology**, v. 178, p. 2245-2254, 1996.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalycilic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry,** v. 31, p. 426-429, 1959.

MME - Ministério de Minas e Energia. **Boletim mensal dos combustíveis renováveis**. v. 47, novembro de 2011a. Disponível em <http://www.mme.gov.br/spg/galerias/arquivos/publicacoes/boletim_mensal_combustiveis_renovaveis/Boletim_DCR_nx_047_-_novembro_de_2011.pdf> Acesso em 14 fev de 2012.

MME - Ministério de Minas e Energia. **Boletim mensal dos combustíveis renováveis**. v. 45, setembro de 2011b. Disponível em <http://www.mme.gov.br/spg/galerias/arquivos/publicacoes/boletim_mensal_combustiveis_renovaveis/Boletim_DCR_nx_045_-_setembro_de_2011.pdf> Acesso em 14 fev de 2012.

MORIYA, H.; JOHNSTON, M. Glucose sensing and signaling in *Saccharomyces cerevisiae* through the Rgt2 glucose sensor and casein kinase I. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, p. 1572–1577, 2004.

MWESIGYE, P. K.; BARFORD, J. P. Mechanism of sucrose utilization by *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of General and Applied Microbiology,** v. 42, p. 209-306, 1996.

MWESIGYE, P. K.; BARFORD, J. P. Transport of sucrose by *S. Cerevisiae*. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 77, p. 687-690, 1994.

MYERS, D. K.; LAWLOR, D. T. M.; ATTFIELD, P. V. Influence of invertase activity and glycerol synthesis and retention on fermentation of media with a high sugar concentration by *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, p. 145-150, 1997.

NADAL, D.; CARRO, D.; FERNANDEZ-LARREA, J.; PINA, B. Analysis and dynamics of the chromosomal complements of wild sparkling-wine yeast strains. **Applied and Environmental Microbiology,** v. 65, p. 1688-1695, 1999.

NAUMOV, G. I.; NAUMOVA, E. S. Comparative Genetics of Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Chromosomal Translocations Carrying the *SUC2* Marker. **Russian Journal of Genetics**, v. 47, p. 147–152, 2011.

NAUMOV, G. I.; NAUMOVA, E. S. Polygenic control for fermentation of *β-fructosides* in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: new genes *SUC9* and *SUC10*. **Mikrobiologiya**, v. 79, p. 160-166, 2010

NAUMOV, G. I.; NAUMOVA, E. S.; MICHELS, C. A. Genetic variation of the repeated *MAL* loci in natural population of *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces paradoxus*. **Genetics,** v. 136, p. 803-812, 1994.

NAUMOV, G. I.; NAUMOVA, E. S.; SANCHO, E. D.; KORHOLA, M. P. Polymeric *SUC* genes in natural populations of *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiology Letters,** v. 135, p. 31-35, 1996.

NEEDLEMAN, R. Control of maltase synthesis in yeast. **Molecular Microbiology,** v. 5, p. 2079-2084, 1991.

NEIGEBORN, L.; SCHWARTZBERG, P.; REID, R.; CARLSON, M. Null mutations in the *SNF3* gene of *Saccharomyces cerevisiae* cause a different phenotype than do previously isolated missense mutations. **Molecular and Cellular Biology**, v. 6, p. 3569–3574, 1986.

NISSEN, T. L.; ANDERLUND, M.; NIELSEN, J.; VILLADSEN, J.; KIELLAND-BRANDT, M. C. Expression of a cytoplasmic transhydrogenase in *Saccharomyces cerevisiae* results in formation of 2-oxoglutarate due to depletion of the NADPH pool. **Yeast**, v. 18, p. 19–32, 2001.

NISSEN, T. L.; HAMANN, C. W.; KIELLAND-BRANDT, M. C.; NIELSEN, J.; VILLADSEN, J. Anaerobic and aerobic batch cultivations of *Saccharomyces cerevisiae* mutants impaired in glycerol synthesis. **Yeast**, v. 16, p. 463–474, 2000a.

NISSEN, T. L.; KIELLAND-BRANDT, M. C.; NIELSEN, J.; VILLADSEN, J. Optimization of ethanol production in *Saccharomyces cerevisiae* by metabolic engineering of the ammonium assimilation. **Metabolic Engineering**, v. 2, p. 69–77, 2000b.

NOVAK, S.; ZECHNER-KRPAN, V.; MARIÉ, V. Regulation of maltose transport and metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. **Food Technology and Biotechnology,** v. 42, p. 213-218, 2004.

ODA, Y.; MIKUMO, D.; LEO, F.; URASHIMA, T. Discrimination of *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces paradoxus* strains by the *SUC2* gene sequences. **Journal of General and Applied Microbiology**, v. 56, p. 355-358, 2010

OLSSON, L.; NIELSEN, J. the role of metabolic engineering in the improvement of *Saccharomyces cerevisiae*: utilization of industrial media. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 26, p. 785-792, 2000.

ORLOWSKI, J. H.; BARFORD, J. P. Direct uptake of sucrose by *Saccharomyces cerevisiae* in batch and continuous culture. **Journal of General and Applied Microbiology**, v. 37, p. 215-218, 1991.

OTERO, J.; VONGSANGNAK, W.; ASADOLLAH, M.; OLIVARES-HERNANDES, R.; MAURY, J.; FARINELLI, L.; BARLOCHER, L.; SCHALK, M.; CLARK, A.; NIELSEN, J. Whole genome sequencing of *Saccharomyces cerevisiae*: from genotype to phenotype for

improved metabolic engineering applications. **BioMed Central Genomics**, v. 11, p. 723-729, 2010.

ÖZCAN, S.; DOVER, J.; ROSENWALD, A. G.; WÖLF, S.; JOHNSTON, M. Two glucose transporters in *Saccharomyces cerevisiae* are glucose sensors that generate a signal for induction of gene expression. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, p. 12428–12432, 1996.

ÖZCAN, S.; JOHNSTON, M. Function and regulation of yeast hexose transporters. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 63, p. 554-559, 1999.

ÖZCAN, S.; VALLIER, L. G.; FLICK, J. S.; CARLSON, M.; JOHNSTON, M. Expression of the *SUC2* gene of *Saccharomyces cerevisiae* is induced by low levels of glucose. **Yeast**, v. 13, p. 127-137, 1997.

PALMQVIST, E.; GRAGE, H.; MEINANDER, N. Q.; HÄHN-HÄGERDAL; B. Main and interaction effects of acetic acid, furfural, and p-hydroxybenzoic acid on growth and ethanol productivity of yeasts. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 63, p. 46–55, 1999.

PEETERS, T.; LOUWET, W.; GELADÉ, R.; NAUWELAERS, D.; THEVELEIN, J. M.; VERSELE, M. Kelch-repeat proteins interacting with the Gα protein Gpa2 bypass adenylate cyclase for direct regulation of protein kinase A in yeast. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, p. 13034–13039, 2006.

PETRACEK, M. E.; LONGTINE, M. S. PCR-based engineering of yeast genome. **Methods in Enzymology,** v. 350, p. 445-469, 2002.

PIŠKUR, J.; ROZPEDOWSKA, E.; POLAKOVA, S.; MERICO, A.; COMPAGNO, C. How did *Saccharomyces* evolve to become a good brewer? **Trends in Genetics**, v. 22, p.183-186, 2006.

POOLE, A. **Estudo sobre o etanol e o metanol como alternativas para a substituição do petróleo no brasil.** São Paulo: Instituto de Física - USP, 1979. p. 6-29.

PORRO, D.; SMERALDI, C.; MARTEGANI, E.; RANZI, B. M.; ALBERGHINA, L. Flow-cytometric determination of the respiratory activity in growing *Saccharomyces cerevisiae* populations. **Biotechnology Progress**. v. 10, p. 193-197, 1994

PUIG, O.; RUTZ, B.; LUUKKONEN, B. G. M.; KANDELS-LEWIS, S.; BRAGADO-NILSSON, E.; SERAPHIN, B. New constructs and strategies for efficient PCR-based gene manipulations in yeast. **Yeast**, v. 14, p. 1139-1146, 1998.

QUEROL, A.; BOND, U. the complex and dynamic genomes of industrial yeasts. **FEMS Microbiology Letters**, v. 293, p. 1–10, 2009.

REDDY, A.; JOHNSON, R. S.; BIEMANN, K.; WILLIANS, R. S.; ZIEGLER, F. D.; TRIMBLE, R. B.; MALEY, F. Characterization of the glycosylation sites in yeast external invertase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 263, p. 6978-6985, 1988.

REED, G.; PEPPLER, H. J. **Yeast technology**. Westport, Connecticut: the AVI Publishing Company, Inc., 1973. v. 1, p. 358-361.

RETTORI, D.; VOLPE, P. L. O. Microcalorimetria: uma técnica aplicável ao estudo do diauxismo da *Saccharomyces cerevisiae.* **Química Nova,** v. 23, p. 07-11, 2000.

RIVERA, E. C.; COSTA, A. C.; ATALA, D. I. P.; MAUGERI, F.; MACIEL, M. R. W.; MACIEL, R. F. Evaluation of optimization techniques for parameter estimation: application to ethanol fermentation considering the effect of temperature. **Process Biochemistry**, v. 41, p. 1682–1687, 2006.

RODIONOV, Y. V.; KEPPEN, O. I.; SUKHACHEVA, M. V. A photometric assay for ethanol. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 38, p. 395-396, 2002.

RUOHONEN, L.; AALTO, M. K.; KERÄNEN, S. Modifications to the *ADH1* promoter of *Saccharomyces cerevisiae* for efficient production of heterologous proteins. **Journal of Biotechnology**, v. 39, p. 193-203, 1995

SALGADO, A. M.; FOLLY, R. O. M.; VALDMAN, B.; CÓS, O.; VALERO, F. Colorimetric meted for the determination of etanol by flow injection analysis. **Biotechnology Letters**, v. 22, p. 327-330, 2000.

SANTANGELO, G. M. Glucose signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 70, p. 253-282, 2006.

SANTOS, E.; RODRIGUEZ, L.; ELORZA, M. V.; SENTANDREU, R. Uptake of sucrose by *Saccharomyces cerevisiae*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 216, p. 652-660, 1982.

SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotecnologia Industrial - Fundamentos,** São Paulo: Ed. Edgard Blücher Ltda., 2001. v. 1, p. 113-150.

SILVA FILHO, E. A.; MEOL, H. F.; ANTUNES, D. F.; SANTOS, S. K. B.; RESENDE, A. M.; SIMÕES, D. A.; MORAIS, M. A. JR. Isolation by genetic and physiological characteristics of fuel-ethanol fermentative *Saccharomyces cerevisiae* strain with potential for genetic manipulation. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechonology**, v. 32, p. 481-486, 2005.

SILVEIRA, M. C. F.; CARVAJAL, E.; BON, E. P. S. Assay for in vivo yeast invertase activity using NaF. **Analytical Biochemistry**, v. 238, p. 26-28, 1996.

SONG, W.; CARLSON, M. Srb/mediator proteins interact functionally and physically with transcriptional repressor Sfl1. **EMBO Journal**, v. 17, p. 5757–5765, 1998.

STAMBUK, B. U. A simple experiment illustrating metabolic regulation: induction versus repression of yeast α-glucosidase. **Biochemical Education,** v. 27, p. 178-181, 1999.

STAMBUK, B. U.; ALVES JUNIOR, S. L.; HOLLATZ, C.; ZASTROW, C. R. Improvement of maltotriose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 43, p. 370-376, 2006.

STAMBUK, B. U.; ARAUJO, P. S. de; BASSO, L. C.; AMORIM, H. V.; TRICHEZ, D.; ALVES JUNIOR, S. L.; KLINKOWSTROM, A. M.; MILETTI, L. C.; MACHADO, L. O.; BADOTTI, F.; ESPIRITO-SANTO, J. C. A.; SCHLOGL, P. S.; DÁRIO, M. G. Processo para modificar geneticamente leveduras *Saccharomyces*, e seu uso em processos fermentativos de produção de metabólitos. **INPI PI** 0901254-0. 2009a.

STAMBUK, B. U.; BATISTA, A. S.; DE ARAÚJO, P. S. Kinetics of active sucrose transport in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 89, p. 212-214, 2000.

STAMBUK, B. U.; DA SILVA, M. A.; PANEK, A. D.; DE ARAUJO, P. S. Active α-glucoside transport in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiology Letters,** v. 170, p. 105-110, 1999.

STAMBUK, B. U.; DE ARAÚJO, P. S. Kinetics of active α-glucoside transport by *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Yeast Research**, v. 1, p. 73-8, 2001.

STAMBUK, B. U.; DUNN, B.; ALVES JUNIOR, S. L.; DUVAL, E. H.; SHERLOCK, G. Industrial fuel ethanol yeasts contain adaptive copy number changes in genes involved in vitamin B1 and B6 biosynthesis. **Genome Research**, v. 19, p. 2271-2278, 2009b.

STAMBUK, B. U.; PANEK, A. D.; CROWE, J. H.; CROWE, L. M.; DE ARAUJO, P. S. Expression of high-affinity trehalose-H^+ symport in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochimica et Biophysica Acta,** v. 1379, p. 118-128, 1998.

TAKESHIGE, K.; OUCHI, K. Effects of yeast invertase on ethanol production in molasses. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 79, p. 513-515, 1995.

TATEBAYASHI, K.; YAMAMOTO, K.; TANAKA, K.; TOMIDA, T.; MARUOKA, T.; KASUKAWA, E.; SAITO, H. Adaptor functions of Cdc42, Ste50, and Sho1 in the yeast osmoregulatory HOG MAPK pathway. **EMBO Journal**, v. 25, p. 3033–3044, 2006.

TAVARES, L. Z. **Estudo e modelagem do processo de produção de etanol por levedura amilolítica recombinante.** 2004. 96 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) -

Departamento de Engenharia Química, Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

TESTE, M. A.; FRANÇOIS, J. M.; PARROU, J. L. Characterization of a new multigene family encoding isomaltases in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, the IMA family. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, p. 26815-26824, 2010.

THOMAS, K. C.; HYNES, S. H.; INGLEDEW, W. M. Practical and theoretical considerations in the production of high concentrations of alcohol by fermentation. **Process Biochemistry,** v. 31, p. 321-331, 1996.

TODA, T.; UNO, I.; ISHIKAWA, T. In yeast, RAS proteins are controlling elements of adenylate cyclase. **Cell**, v. 40, p. 27–36, 1985.

VAN DE VELDE, S.; THEVELEIN, J. M. Cyclic AMP-Protein kinase A and Snf1 signaling mechanisms underlie the superior potency of sucrose for induction of filamentation in *Saccharomyces cerevisiae*. **Eukaryotic Cell**, v. 7, p. 286-293, 2008.

VAN DEN BERG, M. A.; DE JONG-GUBBELS, P.; KORTLAND, C. J.; VAN DIJKEN, J. P.; PRONK, J. T.; STEENSMA, H. Y. the two acetyl-coenzyme A synthetases of *Saccharomyces cerevisiae* differ with respect to kinetic properties and transcriptional regulation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, p. 28953–28959, 1996.

VAN DER REST, M. E.; DE VRIES, Y.; POOLMAN, B.; KONINGS, W. N. Overexpression of *Mal61p* in *Saccharomyces cerevisiae* and characterization of maltose transport in artificial membranes. **Journal of Bacteriology**, v. 177, p. 5540-5446, 1995.

VAN DIJKEN, J. P.; BAUER, J.; BRAMBILLA, L.; DUBOC, P.; FRANCOIS, J. M.; GANCEDO, C.; GIUSEPPIN, M. L.; HEIJNEN, J. J.; HOARE, M.; LANGE, H. C.; MADDEN, E. A.; NIEDERBERGER, P.; NIELSEN, J.; PARROU, J. L.; PETIT, T.; PORRO, D.; REUSS, M.; VAN RIEL, N.; RIZZI, M.; STEENSMA, H. Y.; VERRIPS, C. T.; VINDELOV, J.; PRONK, J. T. An interlaboratory comparation of physisological and genetic properties of four *Saccharomyces cerevisiae* strains. **Enzyme and Microbial Technology,** v. 26, p. 706-714, 2000.

VAN DIJKEN, J. P.; SCHEFFERS, W. A.Redox balances in the metabolism of sugars by yeasts. **FEMS Microbiology Letters,** v. 32, p. 199-224, 1986.

VAN LEEWEN, C. C. M.; WEUSTHUIS, R. A.; POSTMA, E.; VAN DEN BROEK, P. J. A.; VAN DIJKEN, J. P. Maltose/proton co-transport in *Saccharomyces cerevisiae*. Comparative study with cells and plasma membrane vesicles. **Biochemical Journal**, v. 284, p. 441-445, 1992.

VANHALEWYN, M.; DUMORTIER, F.; DEBAST, G.; COLOMBO, S.; MA, P.; WINDERICKX, J.; VAN DIJCK, P.; THEVELEIN, J. M. A mutation in *Saccharomyces cerevisiae* adenylate cyclase, Cyr1^{K1876M}, specifically affects glucose- and acidification-induced cAMP signalling and not the basal cAMP level. **Molecular Microbiology**, v. 33, p. 363-376, 1999.

VERMA, M.; BHAT, P. J.; VENKATESH, K. V. Steady-state analysis of glucose repression reveals hierarchical expression of proteins under *Mig1p* control in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochemical Journal,** v. 388, p. 843–849, 2005.

VERSTREPEN, K. J.; DERDELINCKX, G.; VERACHTERT, H. Yeast flocculation: what brewers should know. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 61, p.197-205, 2003.

VERTÈS, A. A.; INUI, M.; YUKAWA, H. Implementing biofuel on a global scale. **Nature Biotechnology**, v. 24, p. 761-764, 2006.

VIAN, C. E. F.; MORAES, M. A. F. D.; GONÇALVES, D. B. Progresso técnico, relações de trabalho e questões ambientais na agroindústria canavieira. In: **XLIV CONGRESSO BRASILEIRO DE ECONOMIA E SOCIOLOGIA RURAL**. Fortaleza: SOBER, 2006. res. n. SCD 078, p. 391-392.

VIDGREN, V.; KANKAINEN, M.; LONDESBOROUGH, J.; RUOHONEN, L. Identification of regulatory elements in the *AGT1* promoter of ale and lager strains of brewer's yeast. **Yeast**, v. 28, p. 579-94, 2011;

VIDGREN, V.; RUOHONEN, L.; LONDESBOROUGH, J. Characterization and functional analysis of the *mal* and *mph* loci for maltose utilization in some ale and lager yeast strains. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, p. 7846-7857, 2005.

VITTI, P. Pão. In: AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A. **Biotecnologia industrial: biotecnologia na produção de alimentos**. São Paulo: Edgard Blücher, 2001. v. 4, p. 365-386.

WANG, J.; NEEDLEMAN, R. Removal of a Mig1p binding site converts a *MAL63* constitutive mutant derived by interchromossomal gene conversion to glucose insensivity. **Genetics,** v. 142, p. 51-63, 1995.

WEUSTHUIS, R. A.; ADAMS, H.; SCHEFFERS, W. A.; VAN DIJKEN, J. P. Energetics and kinetics of maltose transport in *Saccharomyces cerevisiae*: a continuous culture study. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, p. 3102-3109, 1993.

WHEALS, A. E.; BASSO, L. C., ALVES, D. M. G.; AMORIM, H. V. Fuel ethanol after 25 years. **Trends in Biotechnology**, v. 17, p.482-487, 1999.

WILLIAMS, K. T.; BEVENUE, A. A simple technique for the identification of raffinose and sucrose by enzymatic hydrolysis on paper chromatograms and the subsequent separation of the hydrolyzed products by paper chromatography. **Science**, v. 113, p. 582-582, 1951.

WILLIAMS, R. S.; TRUMBLY, R. J.; MACCOLL, R.; TRIMBLE, R. B.; MALEY, F. Comparative properties of amplified external and internal invertase from the yeast *SUC2* gene. **Journal of Biological Chemistry**, v. 260, p. 13334–13341, 1985.

YANG, J.; BAE, J. Y.; LEE, Y. M.; KWON, H.; MOON, H. Y.; KANG, H. A.; YEE, S. B.; KIM, W.; CHOI, W. Construction of *Saccharomyces cerevisiae* strains with enhanced ethanol tolerance by mutagenesis of the TATA-binding protein gene and identification of novel genes associated with ethanol tolerance. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 108, p. 1776-1787, 2011.

YUN, C. W.; TAMAKI, H.; NAKAYAMA, R.; YAMAMOTO, K.; KUMAGAI, H. G-protein coupled receptor from yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 240, p. 287–292, 1997.

ZASTROW, C. R.; HOLLATZ, C.; DE ARAUJO, P. S.; STAMBUK, B. U. Maltotriose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology,** v. 27, p. 34-38, 2001.

ZASTROW, C. R.; MATTOS, M. A.; HOLLATZ, C.; STAMBUK, B. U. Maltotriose metabolism by *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology Letters,** v. 22, p. 455-459, 2000.

APÊNDICES

APÊNDICE A - Sequenciamento do gene *SUC2* nas linhagens abaixo

APÊNDICE B - Sequenciamento do gene *AGT1* nas linhagens abaixo

Sequenciamento do gene *SUC2* nas linhagens abaixo:

```
                    1                                                  50
CEN.PK2-1C      (1) CTAGCGTAGTTCTCGCTCCCCCAGCAAAGCTCAAAAAAGTACGTCATTTA
  HCJ005-2      (1) CTAGCGTAGTTCTCGCTCCCCCAGCAAAGCTCAAAAAAGTACGTCATTTA
                    51                                                100
CEN.PK2-1C     (51) GAATAGTTTGTGAGCAAATTACCAGTCGGTATGCTACGTTAGAAAGGCCC
  HCJ005-2     (51) GAATAGTTTGTGAGCAAATTACCAGTCGGTATGCTACGTTAGAAAGGCCC
                    101                                               150
CEN.PK2-1C    (101) ACAGTATTCTTCTACCAAAGGCGTGCCTTTGTTGAACTCGATCCATTATG
  HCJ005-2    (101) ACAGTATTCTTCTACCAAAGGCGTGCCTTTGTTGAACTCGATCCATTATG
                    151                                               200
CEN.PK2-1C    (151) AGGGCTTCCATTATTCCCCGCATTTTTATTACTCTGAACAGGAATAAAAA
  HCJ005-2    (151) AGGGCTTCCATTATTCCCCGCATTTTTATTACTCTGAACAGGAATAAAAA
                    201                                               250
CEN.PK2-1C    (201) GAAAAAACCCAGTTTAGGAAATTATCCGGGGGCGAAGAAATACGCGTAGC
  HCJ005-2    (201) GAAAAAACCCAGTTTAGGAAATTATCCGGGGGCGAAGAAATACGCGTAGC
                    251                                               300
CEN.PK2-1C    (251) GTTAATCGACCCCACGTCCAGGGTTTTTCCATGGAGGTTTCTGGAAAAAC
  HCJ005-2    (251) GTTAATCGACCCCACGTCCAGGGTTTTTCCATGGAGGTTTCTGGAAAAAC
                    301                                               350
CEN.PK2-1C    (301) TGACGAGGAATGTGATTATAAATCCCTTTATGTGATGTCTAAGACTTTTA
  HCJ005-2    (301) TGACGAGGAATGTGATTATAAATCCCTTTATGTGATGT-TAAGACTTTTA
                    351                                               400
CEN.PK2-1C    (351) AGGTACGCCCGATGTTTGCCTATTACCATCATAGAGACGTTTCTTTTCGA
  HCJ005-2    (350) -GGTACGCCCGATGTTTGCCTATTACCATCATAGAGACGTTTCTTTTCGA
                    401                                               450
CEN.PK2-1C    (401) GGAATGCTTAAACGACTTTGTTTGACAAAAATGTTGCCTAAGGGCTCTAT
  HCJ005-2    (399) GGAATGCTTAAACGACTTTGTTTGACAAAAATGTTGCCTAAGGGCTCTAT
                    451                                               500
CEN.PK2-1C    (451) AGTAAACCATTTGGAAGAAAGATTTGACGACTTTTTTTTTTTGGATTTCG
  HCJ005-2    (449) AGTAAACCATTTGGAAGAAAGATTTGACGACTTTTTTTTTTTGGATTTCG
                    501                                               550
CEN.PK2-1C    (501) ATCCTATAATCCTTCCTCCTGAAAAGAAACATATAAATAGATATGTATTA
  HCJ005-2    (499) ATCCTATAATCCTTCCTCCTGAAAAGAAACATATAAATAGATATGTATTA
                    551                                               600
CEN.PK2-1C    (551) TTCTTCAAAACATTCTCTTGTTCTTGTGCTTTTTTTTTACCATATATCTT
  HCJ005-2    (549) TTCTTCAAAACATTCTCTTGTTCTTGTGCTTTTTTTTTACCATATATCTT
                    601                                               650
CEN.PK2-1C    (601) ACTTTTTTTTTTCTCTCAGAGAAACAAGCAAAACAAAAAGCTTTTCTTTT
  HCJ005-2    (599) ACTTTTTTTTTTCTCTCAGAGAAACAAGCAAAACAAAAAGCTTTTCTTTT
                    651                                               700
CEN.PK2-1C    (651) CACTAACGTATATGATGCTTTTGCAAGCTTTCCTTTTCCTTTTGGCTGGT
  HCJ005-2    (649) CACTAACGTATATGATGCTTTTGCAAGCTTTCCTTTTCCTTTTGGCTGCT
                    701                                               750
CEN.PK2-1C    (701) TTTGCAGCCAAAATATCTGCATCA---------------------------
  HCJ005-2    (699) TTTGCAGCCAAAATATCTGCATCACTATTTCTTAGCATTTTTGACGAAAT
                    751                                               800
CEN.PK2-1C    (725) --------------------------------------------------
  HCJ005-2    (749) TTGCTATTTTGTTAGAGTCTTTTACACCATTTGTCTCCACACCTCCGCTT
                    801                                               850
CEN.PK2-1C    (725) --------------------------------------------------
  HCJ005-2    (799) ACATCAACACCAATAACGCCATTTAATCTAAGCGCATCACCAACATTTTC
                    851                                               900
CEN.PK2-1C    (725) --------------------------------------------------
  HCJ005-2    (849) TGGCGTCAGTCCACCAGCTAACATAAAATGTAAGCTTTCGGGGCTCTCTT
                    901                                               950
CEN.PK2-1C    (725) --------------------------------------------------
  HCJ005-2    (899) GCCTTCCAACCCAGTCAGAAACCGAGTTCCAATCCAAAAGTTCACCTGTC
                    951                                              1000
CEN.PK2-1C    (725) --------------------------------------------------
  HCJ005-2    (949) CCACCTGCTTCTGAATCAAACAAGGGAATAAACGAATGAGGTTTCTGTGA
```

[JC1] Comentário: SÍTIO CRE

[JC2] Comentário: SÍTIO "A"

[JC3] Comentário: SÍTIO "B"

[JES4] Comentário: Deleção de base

[JES5] Comentário: Deleção de base

[JC6] Comentário: TATA BOX

[JES7] Comentário: Primeiro ATG

[JES8] Comentário: Troca de Base

[JES9] Comentário: Stop códon do gene *TRP1*

```
                    1001                                              1050
CEN.PK2-1C   (725) --------------------------------------------------
  HCJ005-2   (999) AGCTGCACTGAGTAGTATGTTGCAGTCTTTTGGAAATACGAGTCTTTTAA
                    1051                                              1100
CEN.PK2-1C   (725) --------------------------------------------------
  HCJ005-2  (1049) TAACTGGCAAACCGAGGAACTCTTGGTATTCTTGCCACGACTCATCTCCA
                    1101                                              1150
CEN.PK2-1C   (725) --------------------------------------------------
  HCJ005-2  (1099) TGCAGTTGGACGATATCAATGCCGTAATCATTGACCAGAGCCAAAACATC
                    1151                                              1200
CEN.PK2-1C   (725) --------------------------------------------------
  HCJ005-2  (1149) CTCCTTAGGTTGATTACGAAACACGCCAACCAAGTATTTCGGAGTGCCTG
                    1201                                              1250
CEN.PK2-1C   (725) --------------------------------------------------
  HCJ005-2  (1199) AACTATTTTTATATGCTTTTACAAGACTTGAAATTTTCCTTGCAATAACC
                    1251                                              1300
CEN.PK2-1C   (725) --------------------------------------------------
  HCJ005-2  (1249) GGGTCAATTGTTCTCTTTCTATTGGGCACACATATAATACCCAGCAAGTC
                    1301                                              1350
CEN.PK2-1C   (725) --------------------------------------------------
  HCJ005-2  (1299) AGCATCGGAATCTAGAGCACATTCTGCGGCCTCTGTGCTCTGCAAGCCGC
                    1351                                              1400
CEN.PK2-1C   (725) --------------------------------------------------
  HCJ005-2  (1349) AAACTTTCACCAATGGACCAGAACTACCTGTGAAATTAATAACAGACATT
                    1401                                              1450
CEN.PK2-1C   (725) --------------------------------------------------
  HCJ005-2  (1399) TTTGTTGTTTCCGGGTGTACAATATGGACTTCCTCTTTTCTGGCAACCAA
                    1451                                              1500
CEN.PK2-1C   (725) --------------------------------------------------
  HCJ005-2  (1449) ACCCATACATCGGGATTCCTATAATACCTTCGTTGGTCTCCCTAACATGT
                    1501                                              1550
CEN.PK2-1C   (725) --------------------------------------------------
  HCJ005-2  (1499) AGGTGGCGGAGGGGAGATATACAATAGAACAGATACCAGACAAGACATAA
                    1551                                              1600
CEN.PK2-1C   (725) --------------------------------------------------
  HCJ005-2  (1549) TGGGCTAAACAAGACTACACCAATTACACTGCCTCATTGATGGTGGTACA
                    1601                                              1650
CEN.PK2-1C   (725) --------------------------------------------------
  HCJ005-2  (1599) TAACGAACTAATACTGTAGCCCTAGACTTGATAGCCATCATCATATCGAA
                    1651                                              1700
CEN.PK2-1C   (725) --------------------------------------------------
  HCJ005-2  (1649) GTTTCACTACCCTTTTTCCATTTGCCATCTATTGAAGTAATAATAGGCGC
                    1701                                              1750
CEN.PK2-1C   (725) --------------------------------------------------
  HCJ005-2  (1699) ATGCAACTTCTTTTCTTTTTTTTTCTTTTCTCTCTCCCCCGTTGTTGTCT
                    1751                                              1800
CEN.PK2-1C   (725) --------------------------------------------------
  HCJ005-2  (1749) CACCATATCCGCAATGACAAAAAAATGATGGAAGACACTAAAGGAAAAAA
                    1801                                              1850
CEN.PK2-1C   (725) --------------------------------------------------
  HCJ005-2  (1799) TTAACGACAAAGACAGCACCAACAGATGTCGTTGTTCCAGAGCTGATGAG
                    1851                                              1900
CEN.PK2-1C   (725) --------------------------------------------------
  HCJ005-2  (1849) GGGTATCTCGAAGCACACGAAACTTTTTCCTTCCTTCATTCACGCACACT
                    1901                                              1950
CEN.PK2-1C   (725) --------------------------------------------------
  HCJ005-2  (1899) ACTCTCTAATGAGCAACGGTATACGGCCTTCCTTCCAGTTACTTGAATTT
                    1951                                              2000
CEN.PK2-1C   (725) --------------------------------------------------
  HCJ005-2  (1949) GAAATAAAAAAAAGTTTGCTGTCTTGCTATCAAGTATAAATAGACCTGCA
                    2001                                              2050
CEN.PK2-1C   (725) --------------------------------------------------
  HCJ005-2  (1999) ATTATTAATCTTTTGTTTCCTCGTCATTGTTCTCGTTCCCTTTCTTCCTT
                    2051                                              2100
CEN.PK2-1C   (725) --------------------------------------------------
  HCJ005-2  (2049) GTTTCTTTTTCTGCACAATATTTCAAGCTATACCAAGCATACAATCAACT
```

[JES10] Comentário: Start códon do gene *TRP1*

[JES11] Comentário: Início da sequência promotora do gene *ADH1*

[JES12] Comentário: Final da sequência promotora do gene *ADH1*

```
                      2101                                                2150
CEN.PK2-1C    (725)   ------------ATGACAAACGAAACTAGCGATAGACCTTTGGTCCACTT
  HCJ005-2   (2099)   ATCTCATATACAATGACAAAGGAAACTAGCGATAGACCTTTGGTCCACTT
                      2151                                                2200
CEN.PK2-1C    (763)   CACACCCAACAAGGGCTGGATGAATGACCCAAATGGGTTGTGGTACGATG
  HCJ005-2   (2149)   CACACCCAACAAGGGCTGGATGAATGACCCAAATGGGTTGTGGTACGATG
                      2201                                                2250
CEN.PK2-1C    (813)   AAAAAGATGCCAAATGGCATCTGTACTTTCAATACAACCCAAATGACACC
  HCJ005-2   (2199)   AAAAAGATGCCAAATGGCATCTGTACTTTCAATACAACCCAAATGACACC
                      2251                                                2300
CEN.PK2-1C    (863)   GTATGGGGTACGCCATTGTTTTGGGGCCATGCTACTTCCGATGATTTGAC
  HCJ005-2   (2249)   GTATGGGGTACGCCATTGTTTTGGGGCCATGCTACTTCCGATGATTTGAC
                      2301                                                2350
CEN.PK2-1C    (913)   TAATTGGGAAGATCAACCCATTGCTATCGCTCCCAAGCGTAACGATTCAG
  HCJ005-2   (2299)   TAATTGGGAAGATCAACCCATTGCTATCGCTCCCAAGCGTAACGATTCAG
                      2351                                                2400
CEN.PK2-1C    (963)   GTGCTTTCTCTGGCTCCATGGTGGTTGATTACAACAACACGAGTGGGTTT
  HCJ005-2   (2349)   GTGCTTTCTCTGGCTCCATGGTGGTTGATTACAACAACACGAGTGGGTTT
                      2401                                                2450
CEN.PK2-1C   (1013)   TTCAATGATACTATTGATCCAAGACAAAGATGCGTTGCGATTTGGACTTA
  HCJ005-2   (2399)   TTCAATGATACTATTGATCCAAGACAAAGATGCGTTGCGATTTGGACTTA
                      2451                                                2500
CEN.PK2-1C   (1063)   TAACACTCCTGAAAGTGAAGAGCAATACATTAGCTATTCTCTTGATGGTG
  HCJ005-2   (2449)   TAACACTCCTGAAAGTGAAGAGCAATACATTAGCTATTCTCTTGATGGTG
                      2501                                                2550
CEN.PK2-1C   (1113)   GTTACACTTTTACTGAATACCAAAAGAACCCTGTTTTAGCTGCCAACTCC
  HCJ005-2   (2499)   GTTACACTTTTACTGAATACCAAAAGAACCCTGTTTTAGCTGCCAACTCC
                      2551                                                2600
CEN.PK2-1C   (1163)   ACTCAATTCAGAGATCCAAAGGTGTTCTGGTATGAACCTTCTCAAAAATG
  HCJ005-2   (2549)   ACTCAATTCAGAGATCCAAAGGTGTTCTGGTATGAACCTTCTCAAAAATG
                      2601                                                2650
CEN.PK2-1C   (1213)   GATTATGACGGCTGCCAAATCACAAGACTACAAAATTGAAATTTACTCCT
  HCJ005-2   (2599)   GATTATGACGGCTGCCAAATCACAAGACTACAAAATTGAAATTTACTCCT
                      2651                                                2700
CEN.PK2-1C   (1263)   CTGATGACTTGAAGTCCTGGAAGCTAGAATCTGCATTTGCCAATGAAGGT
  HCJ005-2   (2649)   CTGATGACTTGAAGTCCTGGAAGCTAGAATCTGCATTTGCCAATGAAGGT
                      2701                                                2750
CEN.PK2-1C   (1313)   TTCTTAGGCTACCAATACGAATGTCCAGGTTTGATTGAAGTCCCAACTGA
  HCJ005-2   (2699)   TTCTTAGGCTACCAATACGAATGTCCAGGTTTGATTGAAGTCCCAACTGA
                      2751                                                2800
CEN.PK2-1C   (1363)   GCAAGATCCTTCCAAATCTTATTGGGTCATGTTTATTTCTATCAACCCAG
  HCJ005-2   (2749)   GCAAGATCCTTCCAAATCTTATTGGGTCATGTTTATTTCTATCAACCCAG
                      2801                                                2850
CEN.PK2-1C   (1413)   GTGCACCTGCTGGCGGTTCCTTCAACCAATATTTTGTTGGATCCTTCAAT
  HCJ005-2   (2799)   GTGCACCTGCTGGCGGTTCCTTCAACCAATATTTTGTTGGATCCTTCAAT
                      2851                                                2900
CEN.PK2-1C   (1463)   GGTACTCATTTTGAAGCGTTTGACAATCAATCTAGAGTGGTAGATTTTGG
  HCJ005-2   (2849)   GGTACTCATTTTGAAGCGTTTGACAATCAATCTAGAGTGGTAGATTTTGG
                      2901                                                2950
CEN.PK2-1C   (1513)   TAAGGACTACTATGCCTTGCAAACTTTCTTCAACACTGACCCAACCTACG
  HCJ005-2   (2899)   TAAGGACTACTATGCCTTGCAAACTTTCTTCAACACTGACCCAACCTACG
                      2951                                                3000
CEN.PK2-1C   (1563)   GTTCAGCATTAGGTATTGCCTGGGCTTCAAACTGGGAGTACAGTGCCTTT
  HCJ005-2   (2949)   GTTCAGCATTAGGTATTGCCTGGGCTTCAAACTGGGAGTACAGTGCCTTT
                      3001                                                3050
CEN.PK2-1C   (1613)   GTCCCAACTAACCCATGGAGATCATCCATGTCTTTGGTCCGCAAGTTTTC
  HCJ005-2   (2999)   GTCCCAACTAACCCATGGAGATCATCCATGTCTTTGGTCCGCAAGTTTTC
                      3051                                                3100
CEN.PK2-1C   (1663)   TTTGAACACTGAATATCAAGCTAATCCAGAGACTGAATTGATCAATTTGA
  HCJ005-2   (3049)   TTTGAACACTGAATATCAAGCTAATCCAGAGACTGAATTGATCAATTTGA
                      3101                                                3150
CEN.PK2-1C   (1713)   AAGCCGAACCAATATTGAACATTAGTAATGCTGGTCCCTGGTCTCGTTTT
  HCJ005-2   (3099)   AAGCCGAACCAATATTGAACATTAGTAATGCTGGTCCCTGGTCTCGTTTT
                      3151                                                3200
CEN.PK2-1C   (1763)   GCTACTAACACAACTCTAACTAAGGCCAATTCTTACAATGTCGATTTGAG
  HCJ005-2   (3149)   GCTACTAACACAACTCTAACTAAGGCCAATTCTTACAATGTCGATTTGAG
```

[JES13] Comentário: Segundo ATG

[JES14] Comentário: Troca de Base com troca de aminoácido: asn > lys

```
                        3201                                          3250
CEN.PK2-1C   (1813)  CAACTCGACTGGTACCCTAGAGTTTGAGTTGGTTTACGCTGTTAACACCA
  HCJ005-2   (3199)  CAACTCGACTGGTACCCTAGAGTTTGAGTTGGTTTACGCTGTTAACACCA
                        3251                                          3300
CEN.PK2-1C   (1863)  CACAAACCATATCCAAATCCGTCTTTGCCGACTTATCACTTTGGTTCAAG
  HCJ005-2   (3249)  CACAAACCATATCCAAATCCGTCTTTGCCGACTTATCACTTTGGTTCAAG
                        3301                                          3350
CEN.PK2-1C   (1913)  GGTTTAGAAGATCCTGAAGAATATTTGAGAATGGGTTTTGAAGTCAGTGC
  HCJ005-2   (3299)  GGTTTAGAAGATCCTGAAGAATATTTGAGAATGGGTTTTGAAGTCAGTGC
                        3351                                          3400
CEN.PK2-1C   (1963)  TTCTTCCTTCTTTTTGGACCGTGGTAACTCTAAGGTCAAGTTTGTCAAGG
  HCJ005-2   (3349)  TTCTTCCTTCTTTTTGGACCGTGGTAACTCTAAGGTCAAGTTTGTCAAGG
                        3401                                          3450
CEN.PK2-1C   (2013)  AGAACCCATATTTCACAAACAGAATGTCTGTCAACAACCAACCATTCAAG
  HCJ005-2   (3399)  AGAACCCATATTTCACAAACAGAATGTCTGTCAACAACCAACCATTCAAG
                        3451                                          3500
CEN.PK2-1C   (2063)  TCTGAGAACGACCTAAGTTACTATAAAGTGTACGGCCTACTGGATCAAAA
  HCJ005-2   (3449)  TCTGAGAACGACCTAAGTTACTATAAAGTGTACGGCCTACTGGATCAAAA
                        3501                                          3550
CEN.PK2-1C   (2113)  CATCTTGGAATTGTACTTCAACGATGGAGATGTGGTTTCTACAAATACCT
  HCJ005-2   (3499)  CATCTTGGAATTGTACTTCAACGATGGAGATGTGGTTTCTACAAATACCT
                        3551                                          3600
CEN.PK2-1C   (2163)  ACTTCATGACCACCGGTAACGCTCTAGGATCTGTGAACATGACCACTGGT
  HCJ005-2   (3549)  ACTTCATGACCACCGGTAACGCTCTAGGATCTGTGAACATGACCACTGGT
                        3601                                          3650
CEN.PK2-1C   (2213)  GTCGATAATTTGTTCTACATTGACAAGTTCCAAGTAAGGGAAGTAAAATA
  HCJ005-2   (3599)  GTCGATAATTTGTTCTACATTGACAAGTTCCAAGTAAGGGAAGTAAAATA
                        3651                                          3700
CEN.PK2-1C   (2263)  GAGGTTATAAAACTTATTGTCTTTTTTATTTTTTTCAAAAGCCATTCTAA
  HCJ005-2   (3649)  GAGGTTATAAAACTTATTGTCTTTTTTATTTTTTTCAAAAGCCATTCTAA
                        3701                                          3750
CEN.PK2-1C   (2313)  AGGGCTTTAGCTAACGAGTGACGAATGTAAAACTTTATGATTTCAAAGAA
  HCJ005-2   (3699)  AGGGCTTTAGCTAACGAGTGACGAATGTAAAACTTTATGATTTCAAAGAA
                        3751                                          3800
CEN.PK2-1C   (2363)  TACCTCCAAACCATTGAAAATGTATTTTTATTTTTATTTTCTCCCGACCC
  HCJ005-2   (3749)  TACCTCCAAACCATTGAAAATGTATTTTTATTTTTATTTTCTCCCGACCC
                        3801                                          3850
CEN.PK2-1C   (2413)  CAGTTACCTGGAATTTGTTCTTTATGTACTTTATATAAGTATAATTCTCT
  HCJ005-2   (3799)  CAGTTACCTGGAATTTGTTCTTTATGTACTTTATATAAGTATAATTCTCT
                        3851                                          3900
CEN.PK2-1C   (2463)  TAAAAATTTTTACTACTTTGCAATAGACATCATTTTTTCACGTAATAAAC
  HCJ005-2   (3849)  TAAAAATTTTTACTACTTTGCAATAGACATCATTTTTTCACGTAATAAAC
                        3901    3911
CEN.PK2-1C   (2513)  CCACAATCGTA
  HCJ005-2   (3899)  CCACAATCGTA
```

[JES15] Comentário: Códon terminador "TAG"

Sequenciamento do gene *AGT1* nas linhagens abaixo:

```
                     1                                                  50
CEN.PK2-1C     (1)   GTATGCGTTATCACTCTTCGAGCCAATTCTTAATTGTGTGGGGTCCGCGA
    PSY003     (1)   GTATGCGTTATCACTCTTCGAGCCAATTCTTAATTGTGTGGGGTCCGCGA
                     51                                                100
CEN.PK2-1C    (51)   AAATTTCCGGATAAATCCTGTAAACTTTAACTTAAACCCCGTGTTTAGCG
    PSY003    (51)   AAATTTCCGGATAAATCCTGTAAACTTTAACTTAAACCCCGTGTTTAGCG
                     101                                               150
CEN.PK2-1C   (101)   AAATTTTCAACGAAGCGCGCAATAAGGAGAAATATTATCTAAAAGCGAGA
    PSY003   (101)   AAATTTTCAACGAAGCGCGCAATAAGGAGAAATATTATCTAAAAGCGAGA
                     151                                               200
CEN.PK2-1C   (151)   GTTTAAGCGAGTTGCAAGAATCTCTACGGTACAGATGCAACTTACTATAG
    PSY003   (151)   GTTTAAGCGAGTTGCAAGAATCTCTACGGTACAGATGCAACTTACTATAG
                     201                                               250
CEN.PK2-1C   (201)   CCAAGGTCTATTCGTATTACTATGGCAGCGAAAGGAGCTTTAAGGTTTTA
    PSY003   (201)   CCAAGGTCTATTCGTATTACTATGGCAGCGAAAGGAGCTTTAAGGTTTTA
                     251                                               300
CEN.PK2-1C   (251)   ATTACCCCATAGCCATAGATTCTACTCGGTCTATCTATCATGTAACACTC
    PSY003   (251)   ATTACCCCATAGCCATAGATTCTACTCGGTCTATCTATCATGTAACACTC
                     301                                               350
CEN.PK2-1C   (301)   CGTTGATGCGTACTAGAAAATGACAACGTACCGGGCTTGAGGGACATACA
    PSY003   (301)   CGTTGATGCGTACTAGAAAATGACAACGTACCGGGCTTGAGGGACATACA
                     351                                               400
CEN.PK2-1C   (351)   GAGACAATTACAGTAATCAAGAGTGTACCCAACTTTAACGAACTCAGTAA
    PSY003   (351)   GAGACAATTACAGTAATCAAGAGTGTACCCAACTTTAACGAACTCAGTAA
                     401                                               450
CEN.PK2-1C   (401)   AAAATAAGGAATGTCGACATCTTAATTTTTTATATAAAGCGGTTTGGTAT
    PSY003   (401)   AAAATAAGGAATGTCGACATCTTAATTTTTTATATAAAGCGGTTTGGTAT
                     451                                               500
CEN.PK2-1C   (451)   TGATTGTTTGAAGAATTTTCGGGTTGGTGTTTCTTTCTGATGCTACATAG
    PSY003   (451)   TGATTGTTTGAAGAATTTTCGGGTTGGTGTTTCTTTCTGATGCTACATAG
                     501                                               550
CEN.PK2-1C   (501)   AAGAACATCAAACAACTAAAAAAATAGTATAAT------------------
    PSY003   (501)   AAGAACATCAAACAACTAAAAAAATAGTATAATCTATTTCTTAGCATTTT
                     551                                               600
CEN.PK2-1C   (534)   --------------------------------------------------
    PSY003   (551)   TGACGAAATTTGCTATTTTGTTAGAGTCTTTTACACCATTTGTCTCCACA
                     601                                               650
CEN.PK2-1C   (534)   --------------------------------------------------
    PSY003   (601)   CCTCCGCTTACATCAACACCAATAACGCCATTTAATCTAAGCGCATCACC
                     651                                               700
CEN.PK2-1C   (534)   --------------------------------------------------
    PSY003   (651)   AACATTTTCTGGCGTCAGTCCACCAGCTAACATAAAATGTAAGCTTTCGG
                     701                                               750
CEN.PK2-1C   (534)   --------------------------------------------------
    PSY003   (701)   GGCTCTCTTGCCTTCCAACCCAGTCAGAAATCGAGTTCCAATCCAAAAGT
                     751                                               800
CEN.PK2-1C   (534)   --------------------------------------------------
    PSY003   (751)   TCACCTGTCCCACCTGCTTCTGAATCAAACAAGGGAATAAACGAATGAGG
                     801                                               850
CEN.PK2-1C   (534)   --------------------------------------------------
    PSY003   (801)   TTTCTGTGAAGCTGCACTGAGTAGTATGTTGCAGTCTTTTGGAAATACGA
                     851                                               900
CEN.PK2-1C   (534)   --------------------------------------------------
    PSY003   (851)   GTCTTTTAATAACTGGCAAACCGAGGAACTCTTGGTATTCTTGCCACGAC
                     901                                               950
CEN.PK2-1C   (534)   --------------------------------------------------
    PSY003   (901)   TCATCTCCATGCAGTTGGACGATATCAATGCCGTAATCATTGACCAGAGC
                     951                                              1000
CEN.PK2-1C   (534)   --------------------------------------------------
    PSY003   (951)   CAAAACATCCTCCTTAGGTTGATTACGAAACACGCCAACCAAGTATTTCG
```

[JES1] Comentário: Stop códon do gene *TRP1*

```
                    1001                                              1050
CEN.PK2-1C   (534)  --------------------------------------------------
    PSY003  (1001)  GAGTGCCTGAACTATTTTTATATGCTTTTACAAGACTTGAAATTTTCCTT
                    1051                                              1100
CEN.PK2-1C   (534)  --------------------------------------------------
    PSY003  (1051)  GCAATAACCGGGTCAATTGTTCTCTTTCTATTGGGCACACATATAATACC
                    1101                                              1150
CEN.PK2-1C   (534)  --------------------------------------------------
    PSY003  (1101)  CAGCAAGTCAGCATCGGAATCTAGAGCACATTCTGCGGCCTCTGTGCTCT
                    1151                                              1200
CEN.PK2-1C   (534)  --------------------------------------------------
    PSY003  (1151)  GCAAGCCGCAAACTTTCACCAATGGACCAGAACTACCTGTGAAATTAATA
                    1201                                              1250
CEN.PK2-1C   (534)  --------------------------------------------------
    PSY003  (1201)  ACAGACATTTTTGTTGTTTCCGGGTGTACAATATGGACTTCCTCTTTTCT
                    1251                                              1300
CEN.PK2-1C   (534)  --------------------------------------------------
    PSY003  (1251)  GGCAACCAAACCCATACATCGGGATTCCTATAATACCTTCGTTGGTCTCC
                    1301                                              1350
CEN.PK2-1C   (534)  --------------------------------------------------
    PSY003  (1301)  CTAACATGTAGGTGGCGGAGGGGAGATATACAATAGAACAGATACCAGAC
                    1351                                              1400
CEN.PK2-1C   (534)  --------------------------------------------------
    PSY003  (1351)  AAGACATAATGGGCTAAACAAGACTACACCAATTACACTGCCTCATTGAT
                    1401                                              1450
CEN.PK2-1C   (534)  --------------------------------------------------
    PSY003  (1401)  GGTGGTACATAACGAACTAATACTGTAGCCCTAGACTTGATAGCCATCAT
                    1451                                              1500
CEN.PK2-1C   (534)  --------------------------------------------------
    PSY003  (1451)  CATATCGAAGTTTCACTACCCTTTTTCCATTTGCCATCTATTGAAGTAAT
                    1501                                              1550
CEN.PK2-1C   (534)  --------------------------------------------------
    PSY003  (1501)  AATAGGCGCATGCAACTTCTTTTCTTTTTTTTTCTTTTCTCTCTCCCCCG
                    1551                                              1600
CEN.PK2-1C   (534)  --------------------------------------------------
    PSY003  (1551)  TTGTTGTCTCACCATATCCGCAATGACAAAAAAATGATGGAAGACACTAA
                    1601                                              1650
CEN.PK2-1C   (534)  --------------------------------------------------
    PSY003  (1601)  AGGAAAAAATTAACGACAAAGACAGCACCAACAGATGTCGTTGTTCCAGA
                    1651                                              1700
CEN.PK2-1C   (534)  --------------------------------------------------
    PSY003  (1651)  GCTGATGAGGGGTATCTCGAAGCACACGAAACTTTTTCCTTCCTTCATTC
                    1701                                              1750
CEN.PK2-1C   (534)  --------------------------------------------------
    PSY003  (1701)  ACGCACACTACTCTCTAATGAGCAACGGTATACGGCCTTCCTTCCAGTTA
                    1751                                              1800
CEN.PK2-1C   (534)  --------------------------------------------------
    PSY003  (1751)  CTTGAATTTGAAATAAAAAAAAGTTTGCTGTCTTGCTATCAAGTATAAAT
                    1801                                              1850
CEN.PK2-1C   (534)  --------------------------------------------------
    PSY003  (1801)  AGACCTGCAATTATTAATCTTTTGTTTCCTCGTCATTGTTCTCGTTCCCT
                    1851                                              1900
CEN.PK2-1C   (534)  --------------------------------------------------
    PSY003  (1851)  TTCTTCCTTGTTTCTTTTTCTGCACAATATTTCAAGCTATACCAAGCATA
                    1901                                              1950
CEN.PK2-1C   (534)  ---------------------ATGAAAAATATCATTTCATTGGTAAGCAA
    PSY003  (1901)  CAATCAACTATCTCATATACAATGAAAAATATCATTTCATTGGTAAGCAA
                    1951                                              2000
CEN.PK2-1C   (563)  GAAGAAGGCTGCCTCAAAAAATGAGGATAAAAACATTTCTGAGTCTTCAA
    PSY003  (1951)  GAAGAAGGCTGCCTCAAAAAATGAGGATAAAAACATTTCTGAGTCTTCAA
                    2001                                              2050
CEN.PK2-1C   (613)  GAGATATTGTAAACCAACAGGAGGTTTTCAATACTGAAGATTTTGAAGAA
    PSY003  (2001)  GAGATATTGTAAACCAACAGGAGGTTTTCAATACTGAAGATTTTGAAGAA
                    2051                                              2100
CEN.PK2-1C   (663)  GGGAAAAAGGATAGTGCCTTTGAGCTAGACCACTTAGAGTTCACCACCAA
    PSY003  (2051)  GGGAAAAAGGATAGTGCCTTTGAGCTAGACCACTTAGAGTTCACCACCAA
```

[JES2] Comentário: Start códon do gene *TRP1*

[JES3] Comentário: Início da sequência promotora do gene *ADH1*

[JES4] Comentário: Final da sequência promotora do gene *ADH1*

[JES5] Comentário: Início do gene AGT1

```
                        2101                                          2150
CEN.PK2-1C    (713)  TTCAGCCCAGTTAGGAGATTCTGACGAAGATAACGAGAATGTGATTAATG
    PSY003   (2101)  TTCAGCCCAGTTAGGAGATTCTGACGAAGATAACGAGAATGTGATTAATG
                        2151                                          2200
CEN.PK2-1C    (763)  AGATGAACGCTACTGATGATGCAAATGAAGCTAACAGCGAGGAAAAAAGC
    PSY003   (2151)  AGATGAACGCTACTGATGATGCAAATGAAGCTAACAGCGAGGAAAAAAGC
                        2201                                          2250
CEN.PK2-1C    (813)  ATGACTTTGAAGCAGGCGTTGCTAAAATATCCAAAAGCAGCCCTGTGGTC
    PSY003   (2201)  ATGACTTTGAAGCAGGCGTTGCTAAAATATCCAAAAGCAGCCCTGTGGTC
                        2251                                          2300
CEN.PK2-1C    (863)  CATATTAGTGTCTACTACCCTGGTTATGGAAGGTTATGATACCGCACTAC
    PSY003   (2251)  CATATTAGTGTCTACTACCCTGGTTATGGAAGGTTATGATACCGCACTAC
                        2301                                          2350
CEN.PK2-1C    (913)  TGAGCGCACTGTATGCCCTGCCAGTTTTTCAGAGAAAATTCGGTACTTTG
    PSY003   (2301)  TGAGCGCACTGTATGCCCTGCCAGTTTTTCAGAGAAAATTCGGTACTTTG
                        2351                                          2400
CEN.PK2-1C    (963)  AACGGGGAGGGTTCTTACGAAATTACTTCCCAATGGCAGATTGGTTTAAA
    PSY003   (2351)  AACGGGGAGGGTTCTTACGAAATTACTTCCCAATGGCAGATTGGTTTAAA
                        2401                                          2450
CEN.PK2-1C   (1013)  CATGTGTGTCCTTTGTGGTGAGATGATTGGTTTGCAAATCACGACTTATA
    PSY003   (2401)  CATGTGTGTCCTTTGTGGTGAGATGATTGGTTTGCAAATCACGACTTATA
                        2451                                          2500
CEN.PK2-1C   (1063)  TGGTTGAATTTATGGGGAATCGTTATACGATGATTACAGCACTTGGTTTG
    PSY003   (2451)  TGGTTGAATTTATGGGGAATCGTTATACGATGATTACAGCACTTGGTTTG
                        2501                                          2550
CEN.PK2-1C   (1113)  TTAACTGCTTATATCTTTATCCTCTACTACTGTAAAAGTTTAGCTATGAT
    PSY003   (2501)  TTAACTGCTTATATCTTTATCCTCTACTACTGTAAAAGTTTAGCTATGAT
                        2551                                          2600
CEN.PK2-1C   (1163)  TGCTGTGGGACAAATTCTCTCAGCTATACCATGGGGTTGTTTCCAAAGTT
    PSY003   (2551)  TGCTGTGGGACAAATTCTCTCAGCTATACCATGGGGTTGTTTCCAAAGTT
                        2601                                          2650
CEN.PK2-1C   (1213)  TGGCTGTTACTTATGCTTCGGAAGTTTGCCCTTTAGCATTAAGATATTAC
    PSY003   (2601)  TGGCTGTTACTTATGCTTCGGAAGTTTGCCCTTTAGCATTAAGATATTAC
                        2651                                          2700
CEN.PK2-1C   (1263)  ATGACCAGTTACTCCAACATTTGTTGGTTATTTGGTCAAATCTTCGCCTC
    PSY003   (2651)  ATGACCAGTTACTCCAACATTTGTTGGTTATTTGGTCAAATCTTCGCCTC
                        2701                                          2750
CEN.PK2-1C   (1313)  TGGTATTATGAAAAACTCACAAGAGAATTTAGGGAACTCCGACTTGGGCT
    PSY003   (2701)  TGGTATTATGAAAAACTCACAAGAGAATTTAGGGAACTCCGACTTGGGCT
                        2751                                          2800
CEN.PK2-1C   (1363)  ATAAATTGCCATTTGCTTTACAATGGATTTGGCCTGCTCCTTTAATGATC
    PSY003   (2751)  ATAAATTGCCATTTGCTTTACAATGGATTTGGCCTGCTCCTTTAATGATC
                        2801                                          2850
CEN.PK2-1C   (1413)  GGTATCTTTTTCGCTCCTGAGTCGCCCTGGTGGTTGGTGAGAAAGGATAG
    PSY003   (2801)  GGTATCTTTTTCGCTCCTGAGTCGCCCTGGTGGTTGGTGAGAAAGGATAG
                        2851                                          2900
CEN.PK2-1C   (1463)  GGTCGCTGAGGCAAGAAAATCTTTAAGCAGAATTTTGAGTGGTAAAGGCG
    PSY003   (2851)  GGTCGCTGAGGCAAGAAAATCTTTAAGCAGAATTTTGAGTGGTAAAGGCG
                        2901                                          2950
CEN.PK2-1C   (1513)  CCGAGAAGGACATTCAAGTTGATCTTACTTTAAAGCAGATTGAATTGACT
    PSY003   (2901)  CCGAGAAGGACATTCAAGTTGATCTTACTTTAAAGCAGATTGAATTGACT
                        2951                                          3000
CEN.PK2-1C   (1563)  ATTGAAAAAGAAAGACTTTTAGCATCTAAATCAGGATCATTCTTTAATTG
    PSY003   (2951)  ATTGAAAAAGAAAGACTTTTAGCATCTAAATCAGGATCATTCTTTAATTG
                        3001                                          3050
CEN.PK2-1C   (1613)  TTTCAAGGGAGTTAATGGAAGAAGAACGAGACTTGCATGTTTAACTTGGG
    PSY003   (3001)  TTTCAAGGGAGTTAATGGAAGAAGAACGAGACTTGCATGTTTAACTTGGG
                        3051                                          3100
CEN.PK2-1C   (1663)  TAGCTCAAAATAGTAGCGGTGCCGTTTTACTTGGTTACTCGACATATTTT
    PSY003   (3051)  TAGCTCAAAATAGTAGCGGTGCCGTTTTACTTGGTTACTCGACATATTTT
                        3101                                          3150
CEN.PK2-1C   (1713)  TTTGAAAGAGCAGGTATGGCCACCGACAAGGCGTTTACTTTTTCTCTAAT
    PSY003   (3101)  TTTGAAAGAGCAGGTATGGCCACCGACAAGGCGTTTACTTTTTCTCTAAT
                        3151                                          3200
CEN.PK2-1C   (1763)  TCAGTACTGTCTTGGGTTAGCGGGTACACTTTGCTCCTGGGTAATATCTG
    PSY003   (3151)  TCAGTACTGTCTTGGGTTAGCGGGTACACTTTGCTCCTGGGTAATATCTG
```

```
                        3201                                          3250
CEN.PK2-1C   (1813)  GCCGTGTTGGTAGATGGACAATACTGACCTATGGTCTTGCATTTCAAATG
    PSY003   (3201)  GCCGTGTTGGTAGATGGACAATACTGACCTATGGTCTTGCATTTCAAATG
                        3251                                          3300
CEN.PK2-1C   (1863)  GTCTGCTTATTTATTATTGGTGGAATGGGTTTTGGTTCTGGAAGCAGCGC
    PSY003   (3251)  GTCTGCTTATTTATTATTGGTGGAATGGGTTTTGGTTCTGGAAGCAGCGC
                        3301                                          3350
CEN.PK2-1C   (1913)  TAGTAATGGTGCCGGTGGTTTATTGCTGGCTTTATCATTCTTTTACAATG
    PSY003   (3301)  TAGTAATGGTGCCGGTGGTTTATTGCTGGCTTTATCATTCTTTTACAATG
                        3351                                          3400
CEN.PK2-1C   (1963)  CTGGTATCGGTGCAGTTGTTTACTGTATCGTTGCTGAAATTCCATCAGCG
    PSY003   (3351)  CTGGTATCGGTGCAGTTGTTTACTGTATCGTTGCTGAAATTCCATCAGCG
                        3401                                          3450
CEN.PK2-1C   (2013)  GAGTTGAGAACTAAGACTATAGTGCTGGCCCGTATTTGCTACAATCTCAT
    PSY003   (3401)  GAGTTGAGAACTAAGACTATAGTGCTGGCCCGTATTTGCTACAATCTCAT
                        3451                                          3500
CEN.PK2-1C   (2063)  GGCCGTTATTAACGCTATATTAACGCCCTATATGCTAAACGTGAGCGATT
    PSY003   (3451)  GGCCGTTATTAACGCTATATTAACGCCCTATATGCTAAACGTGAGCGATT
                        3501                                          3550
CEN.PK2-1C   (2113)  GGAACTGGGGTGCCAAAACTGGTCTATACTGGGGTGGTTTCACAGCAGTC
    PSY003   (3501)  GGAACTGGGGTGCCAAAACTGGTCTATACTGGGGTGGTTTCACAGCAGTC
                        3551                                          3600
CEN.PK2-1C   (2163)  ACTTTAGCTTGGGTCATCATCGATCTGCCTGAGACAACTGGTAGAACCTT
    PSY003   (3551)  ACTTTAGCTTGGGTCATCATCGATCTGCCTGAGACAACTGGTAGAACCTT
                        3601                                          3650
CEN.PK2-1C   (2213)  CAGTGAAATTAATGAACTTTTCAACCAAGGGGTTCCTGCCAGAAAATTTG
    PSY003   (3601)  CAGTGAAATTAATGAACTTTTCAACCAAGGGGTTCCTGCCAGAAAATTTG
                        3651                                          3700
CEN.PK2-1C   (2263)  CATCTACTGTGGTTGATCCATTCGGAAAGGGAAAAACTCAACATGATTCG
    PSY003   (3651)  CATCTACTGTGGTTGATCCATTCGGAAAGGGAAAAACTCAACATGATTCG
                        3701                                          3750
CEN.PK2-1C   (2313)  CTAGCTGATGAGAGTATCAGTCAGTCCTCAAGCATAAAACAGCGAGAATT
    PSY003   (3701)  CTAGCTGATGAGAGTATCAGTCAGTCCTCAAGCATAAAACAGCGAGAATT
                        3751                                          3800
CEN.PK2-1C   (2363)  AAATGCAGCTGATAAATGTTAAGTAAAAGGGTTGTTTTTTTTTTTTTGGA
    PSY003   (3751)  AAATGCAGCTGATAAATGTTAAGTAAAAGGGTTGTTTTTTTTTTTTTGGA
                        3801                                          3850
CEN.PK2-1C   (2413)  AGAAATAAGGAATCCCTTTGACTGCTCCCAAAACCCTCAGCTAGCTCGAG
    PSY003   (3801)  AGAAATAAGGAATCCCTTTGACTGCTCCCAAAACCCTCAGCTAGCTCGAG
                        3851                                          3900
CEN.PK2-1C   (2463)  ATTTTATATATATACATTTTTTATTTTTCTGTAAAACATTCATATTTACC
    PSY003   (3851)  ATTTTATATATATACATTTTTTATTTTTCTGTAAAACATTCATATTTACC
                        3901                                          3950
CEN.PK2-1C   (2513)  ATTTTTTAAGCAAAATATTGTTAGTAGTTAGTTAAAATAGCCCAAGCAGC
    PSY003   (3901)  ATTTTTTAAGCAAAATATTGTTAGTAGTTAGTTAAAATAGCCCAAGCAGC
                        3951                                      3995
CEN.PK2-1C   (2563)  AATCAAGCAAATATGAGAGTACTTTTTCTTTAGCACCTGGTACTT
    PSY003   (3951)  AATCAAGCAAATATGAGAGTACTTTTTCTTTAGCACCTGGTACTT
```

[JES6] Comentário: códon terminador "TAA"