MARCELO GOULART DÁRIO

**Efeito da alteração na captação de
sacarose ao metabolismo 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

MARCELO GOULART DÁRIO

**Efeito da alteração na captação de
sacarose ao metabolismo 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 J. C. 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

Dário, Marcelo Goulart.

Efeito da alteração na captação de sacarose ao metabolismo de *Saccharomyces cerevisiae* / Marcelo Goulart Dário. -- 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: Biotecnologia de Leveduras

Versão do título para o inglês: Effect of changing sucrose uptake in *Saccharomyces cerevisiae* metabolism.

Descritores: 1. Sacarose 2. *Saccharomyces* 3. Fermentação 4. Etanol 5. Cana-de-açúcar 6. Levedura 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/SBIB01/2012

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

Candidato(a): Marcelo Goulart Dário.

Título da Tese: Efeito da alteração na captação de sacarose ao
metabolismo 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:

A meus pais, a minha irmã e ao meu amor, Gisele,
pela paciência e pelo apoio nos momentos difíceis.

AGRADECIMENTOS

À minha família por tudo, e aos meus amigos pelo apoio durante a execução deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Boris U. Stambuk pela orientação, pela atenção, pela contribuição à minha formação pessoal e profissional, e pela oportunidade concedida a mim de pertencer ao seu grupo de trabalho nos últimos dez anos.

Ao amigo Dr. Thiago O. Basso pelo apoio, pela troca de conhecimento, pelos momentos filosóficos, pelo companheirismo na realização dos cultivos contínuos e por sua participação direta na realização deste trabalho.

Às amigas e colegas de laboratório, Débora Trichez e Catarina M. Figueiredo, pelo apoio e compreensão nos momentos difíceis, pela troca de conhecimento, pelos momentos filosóficos e de descontração, ao longo dos anos de convívio.

Aos Profs. Dr. Sérgio Luiz Alves Júnior e Dr. Luiz Claudio Miletti, e ao Dr. Paulo Sérgio Schlögl, antigos colaboradores do LBMBL/UFSC, pela atenção, pela amizade e pela troca de conhecimento ao longo dos anos de convívio.

Ao Prof. Dr. Andreas Karoly Gombert, por me conceder a oportunidade de trabalhar em seu laboratório durante nove meses, no início do doutoramento, período que me proporcionou grande crescimento pessoal e profissional, e também aos profs. Dr. Pedro Soares de Araújo e Dr. Hernán F. Terenzi, por permitirem a utilização dos equipamentos de seus laboratórios, bem como pela atenção prestada.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia e aos funcionários da secretaria, pela atenção durante os quatro anos do doutoramento, e também aos funcionários do Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica, em especial à Valéria Pedullo, pela atenção e auxílio prestados.

Aos demais colegas e ex-colegas de laboratório, de Florianópolis e de São Paulo, por contribuírem de forma direta ou indireta à execução deste trabalho.

Ao Conselho Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro para a compra de reagentes e equipamentos utilizados no trabalho, à Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

“Não existe certo, nem errado. Todo mundo tem razão.
O ponto de vista é que é o ponto da questão.”

Caio Gomes

RESUMO

DÁRIO, M. G. **Efeito da alteração na captação de sacarose ao metabolismo de *Saccharomyces cerevisiae***. 2012. 153 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

No Brasil, a levedura *Saccharomyces cerevisiae* é utilizada na produção do etanol combustível, processo em que a sacarose é o principal açúcar a ser fermentado. Essa espécie de levedura apresenta duas vias de utilização para esse dissacarídeo: hidrólise extracelular do açúcar por ação da invertase (β -frutosidase) periplasmática, enzima codificada pelos genes *SUC1* a *SUC10*, produzindo glicose e frutose que são captados e fermentados pelas células; e transporte ativo da sacarose para o interior das células, processo mediado pelos transportadores codificados pelos genes *MAL*, e sua hidrólise por ação de hidrolases intracelulares (invertase intracelular e maltases ou α -glucosidases). Apesar da hidrólise extracelular ser a principal rota de metabolização desse açúcar, essa via resulta em perdas no rendimento da produção de etanol durante o processo industrial, favorecendo inclusive o crescimento de micro-organismos que não utilizam a sacarose como fonte de carbono. Por outro lado, o transporte ativo (simporte sacarose- H^+) e hidrólise intracelular do açúcar constituem uma alternativa interessante, pois as células captariam e fermentariam mais sacarose para compensar o gasto energético oriundo do transporte desse dissacarídeo, incrementando a produção de etanol. Assim, no presente trabalho linhagens de *S. cerevisiae* foram engenhas na forma de utilização da sacarose. Duas estratégias foram utilizadas: remoção do gene *SUC2* do genoma da levedura, obtendo-se uma linhagem *suc2* Δ ; e alteração da região promotora do gene *SUC2*, de forma a sobre-expressar apenas a invertase intracelular, obtendo-se a linhagem *iSUC2*. Os resultados obtidos mostraram que nas leveduras engenhas no gene *SUC2*, a sacarose passou a ser transportada para o interior das células pelo simporte sacarose- H^+ , e hidrolisada intracelularmente pela maltase citoplasmática na linhagem *suc2* Δ , e pela invertase citoplasmática na linhagem *iSUC2*. As linhagens padrão com o gene *SUC2* normal produziram quantidades significativas de glicose e frutose no meio, enquanto que as linhagens engenhas realizaram a fermentação da sacarose sem a produção desses monossacarídeos no meio. O crescimento e o consumo da sacarose foi mais lento nas linhagens *suc2* Δ e *iSUC2*, do que na levedura padrão *SUC2*,

porém, as linhagens modificadas apresentaram maior produção de etanol. Cultivos contínuos em condição de anaerobiose e utilizando sacarose como substrato limitante confirmaram o maior rendimento na conversão de açúcar a etanol ($Y_{Eth/S}$), com valores 6% e 5% maiores para as linhagens *suc2Δ* e *iSUC2*, respectivamente, em comparação a levedura padrão. Alterações morfológicas foram observadas durante os cultivos contínuos sob limitação de sacarose, indicando que este açúcar pode ter desencadeado a via de sinalização, mediada pelo AMPc, responsável pela filamentação das células. De fato, os resultados mostraram também que o gene *CYR1* (gene que codifica a enzima responsável pela síntese de AMPc) permite uma fermentação mais eficiente da sacarose pelas leveduras. As estratégias de modificação genética, reportadas neste trabalho, possibilitarão melhorar a performance fermentativa das leveduras utilizadas no processo industrial, permitindo à cadeia produtiva obter mais álcool combustível, sem necessitar ampliar o plantio da cana-de-açúcar.

Palavras-chave: Cana-de-açúcar. Etanol. Fermentação. Levedura. Sacarose. *Saccharomyces*.

ABSTRACT

DÁRIO, M. G. **Effect of changing sucrose uptake in *Saccharomyces cerevisiae* metabolism.** 2012. 153 p. Ph.D thesis (Biotechnology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

In Brazil, the yeast *Saccharomyces cerevisiae* is used for fuel ethanol production, a process where sucrose is the major fermented sugar. This yeast presents two pathways for utilization of this disaccharide: extracellular hydrolysis of the sugar by the periplasmic invertase (β -fructosidase), an enzyme encoded by the *SUC1* to *SUC10* genes, producing glucose and fructose that are transported and fermented by the cells; and sucrose active transport into the cells, a process mediated by transporters encoded by the *MAL* genes, and its hydrolysis by cytoplasmic enzymes (intracellular invertase and maltases or α -glucosidases). Although extracellular hydrolysis is the main utilization route for this sugar, this pathway results in losses in the ethanol yield during industrial processes, and can even allow growth of microorganism that do not use sucrose as carbon source. On the other hand, active transport (sucrose- H^+ symport) and intracellular sugar hydrolysis is an interesting alternative, because the cells would transport and ferment more sucrose to compensate for the energy lost due to the transport of the disaccharide, improving ethanol production. Therefore, in the present work *S. cerevisiae* strains were engineered on the way they utilize sucrose. Two strategies were used: the *SUC2* gene was deleted from the genome of the yeast, obtaining a *suc2 Δ* strain; and the promoter region of the *SUC2* gene was changed, so that only the intracellular invertase is overexpressed, obtaining the *iSUC2* strain. The results showed that in the *SUC2* engineered strains sucrose was transported into the cells by sucrose- H^+ symport, and intracellularly hydrolyzed by cytoplasmic maltases on the *suc2 Δ* strain, and by cytoplasmic invertase on the *iSUC2* strain. The standard strains with an unmodified *SUC2* gene produced significant amounts of glucose and fructose in the medium, whereas the engineered strains fermented sucrose without producing these monosaccharides into the medium. Growth on and consumption of sucrose were slower in the *suc2 Δ* and *iSUC2* strains, compared to the *SUC2* standard strain, although the modified strains showed more ethanol production. Sucrose limited chemostats cultivation in anaerobic conditions confirmed the higher yield in sugar to ethanol conversion ($Y_{Eth/S}$), with

values 6% and 5% higher for the *suc2Δ* and *iSUC2* strains, respectively, when compared with the standard strain. Morphological changes were observed in sucrose-limited chemostat cultures, indicating that this sugar may have activated the cAMP signaling pathway, responsible for cell filamentation. Indeed, the results also showed that the *CYR1* gene (a gene that encodes for the enzyme responsible for cAMP synthesis) allowed more efficient sucrose fermentation by the yeasts. The genetic modification strategies presented in this work will allow the improvement of the fermentative performance of yeasts used in the industrial process, ensuring the productive chain to obtain more fuel ethanol, without expanding sugarcane planting

Keywords: Ethanol. Fermentation. *Saccharomyces*. Sucrose. Sugarcane. Yeast.

LISTA DE SIMBOLOS

$\approx$	Aproximadamente
μ_x	Velocidade específica de crescimento celular (h^{-1})
D	Vazão específica de alimentação (h^{-1})
Eth	Etanol
g Glu eq	Gramas de glicose equivalentes; onde 1 g de sacarose é equivalente a 1,053 g de glicose
gDW	Gramas em massa seca de células ("dry weight")
Glu	Glicose
Gly	Glicerol
K_m	Constante de Michaelis-Menten
mmol GLU eq	mmol de glicose equivalentes; onde 1 mmol de sacarose é equivalente a 2 mmol de glicose
P_{Eth}	Produtividade em etanol ($\text{g ETH} \cdot (\text{L.h})^{-1}$)
q_{CO_2}	Velocidade específica de produção de CO_2 [$\text{mmol ETH} \cdot (\text{g DW.h})^{-1}$]
q_{Eth}	Velocidade específica de produção de etanol [$\text{mmol ETH} \cdot (\text{g DW.h})^{-1}$]
q_{Gly}	Velocidade específica de produção de glicerol [$\text{mmol GLY} \cdot (\text{g DW.h})^{-1}$]
q_{O_2}	Velocidade específica de consumo de oxigênio [$\text{mmol O}_2 \cdot (\text{g DW.h})^{-1}$]
q_{Sac}	Velocidade específica de consumo de sacarose [$\text{mmol.GLU eq} \cdot (\text{g DW.h})^{-1}$]
Sac	Sacarose
t_g	Tempo de geração celular (h)
V	Velocidade/Atividade de transporte ou de hidrólise [$\text{nmol} \cdot (\text{mg DW.min})^{-1}$]
X	Concentração celular (g DW)
$Y_{Eth/s}^{Exp}$	Fator de, ou rendimento na, conversão de substrato a etanol, calculado na fase exponencial de crescimento ($\text{g ETH.g substrato}^{-1}$)
$Y_{Eth/s}^{Glo}$	Fator de, ou rendimento na, conversão de substrato a etanol, calculado no momento da obtenção máxima de etanol ($\text{g ETH.g substrato}^{-1}$)
$Y_{x/s}^{EXP}$	Fator de, ou rendimento na, conversão de substrato a células, calculado na fase exponencial de crescimento ($\text{g DW.g substrato}^{-1}$)
μ_{Eth}	Velocidade específica de produção de etanol (h^{-1})
μ_s^{Exp}	Velocidade específica de consumo de substrato (h^{-1})

LISTA DE ABREVIATURAS

Abs	Absorbância
ADP	Adenosina difosfato
AMP	Adenosina monofosfato
AMPc	Adenosina monofostato cíclica
ATP	Adenosina trifosfato
cpm	Contagens por minuto
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay</i>
ESALQ/USP	Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz da Universidade de São Paulo
kDa	Quilo Dalton
LBMBL/UFSC	Laboratório de Biologia Molecular e Biotecnologia de Leveduras da Universidade Federal de Santa Catarina
LEB/USP	Laboratório de Engenharia Bioquímica da Universidade de São Paulo
Meio LB	Meio Luria-Bertani
Meio SC	Meio sintético completo
Meio SC ^{-Drop out}	Meio sintético Drop out
Meio YP	Meio rico
P _{ADH1}	Promotor do gene ADH1 (Álcool desidrogenase)
pb	Pares de bases nitrogenada
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
pH	Potencial hidrogeniônico
PKA	proteína quinase A
pNFαG	<i>p</i> -nitrofenil-α-D-glucopiranosídeo
q.s.p	quantidade suficiente para
SGD	<i>Saccharomyces Genome Database</i>
UAS	<i>Upstream Activating Sequence</i>
VHGF	<i>Very High Gravity Fermentation</i>

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Número absoluto de automóveis licenciados no Brasil, segundo tipo de combustível, durante os anos de 1975 a 2010	24
Figura 2 - Representação das vias de captação e dos genes envolvidos na utilização de açúcares por <i>S. cerevisiae</i>	26
Figura 3 - Representação da estrutura dos genes <i>SUC</i> de <i>S. cerevisiae</i>	29
Figura 4 - Representação da estrutura e do controle da expressão dos <i>loci MAL</i>	32
Figura 5 - Gráfico representativo dos resultados obtidos pela técnica de registro de pH ...	65
Figura 6 - Representação esquemática da técnica de engenharia genômica em <i>S. cerevisiae</i>	74
Figura 7 - Engenharia genômica realizada na levedura padrão para obter a linhagem engenhada <i>suc2Δ</i>	84
Figura 8 - Representação da estrutura do gene <i>SUC2</i> na levedura engenhada <i>iSUC2</i>	85
Figura 9 - Engenharia genômica realizada na levedura padrão para obter a linhagem engenhada <i>agt1Δ</i>	87
Figura 10 - Atividade de hidrólise das enzimas invertase (β -frutosidase) e maltase (α -glicosidase), das linhagens CEN.PK113-5D, MTY-01, MGD-02 e BSY21-34B	90
Figura 11 - Atividade de transporte da permease Agt1p pelas linhagens CEN.PK113-5D, MTY-01, MGD-02 e BSY21-34B	94
Figura 12 - Atividades de transporte das linhagens padrão, <i>suc2Δ</i> e <i>iSUC2</i> , avaliada por diferentes técnicas experimentais	96
Figura 13 - Cultivo das linhagens analisadas em placas para ELISA contendo meio rico (YP) e diferentes fontes de carbono	98
Figura 14 - Metabolização da glicose e parâmetros fisiológicos das linhagens analisadas, cultivadas em frascos agitados contendo meio rico (YP) e 2% da fonte de carbono	101
Figura 15 - Metabolização da sacarose e parâmetros fisiológicos das linhagens não modificadas no gene <i>SUC2</i> , cultivadas em frascos agitados contendo meio rico (YP) e 2% da fonte de carbono	103
Figura 16 - Metabolização da sacarose e parâmetros fisiológicos das linhagens modificadas no gene <i>SUC2</i> , cultivadas em frascos agitados contendo meio rico (YP) e 2% da fonte de carbono	105

Figura 17 - Atividades de transporte e da enzima invertase (β -frutosidase) nas linhagens CEN.PK113-5D e BSY21-34B, cultivadas em glicose e maltose	109
Figura 18 - Atividade de hidrólise da enzima invertase (β -frutosidase), das linhagens CEN.PK113-5D e BSY21-34B cultivadas em sistema contínuo	116
Figura 19 - Atividade de transporte das linhagens CEN.PK113-5D e BSY21-34B, cultivadas em sistema contínuo	118
Figura 20 - Imagens obtidas após observação em microscópio óptico, das células coletadas durante o estado estacionário dos cultivos contínuos	120
Figura 21 - Metabolização da sacarose pelas linhagens CEN.PK113-7D, IMK-316, IMI-056 e IMM-007, durante fermentação em frascos agitados contendo meio rico (YP) e concentração superior a 200 g.L ⁻¹ da fonte de carbono	124
Figura 22 - Metabolização da sacarose pelas linhagens <i>suc2Δ</i> , durante fermentação em frascos agitados contendo meio rico (YP) e concentração de 100 g.L ⁻¹ da fonte de carbono	126
Figura 23 - Metabolização da glicose pelas linhagens CEN.PK113-5D, MGD-02 e BSY21-34B, transformadas com plasmídeos, crescidas em frascos agitados contendo meio rico (YP) e 2% da fonte de carbono	130
Figura 24 - Metabolização da sacarose pelas linhagens CEN.PK113-5D, MGD-02 e BSY21-34B, transformadas com plasmídeos, crescidas em frascos agitados contendo meio rico (YP) e 2% da fonte de carbono	131
Figura 25 - Atividade de hidrólise das enzimas invertase (β -frutosidase) e maltase (α -glicosidase), das linhagens CEN.PK113-5D, MGD-02 e BSY21-34B, transformadas com os plasmídeos YCplac33 e YCpCYR1	133
Figura 26 - Atividade de transporte das linhagens CEN.PK113-5D, MGD-02 e BSY21-34B, transformadas com os plasmídeos YCplac33 e YCpCYR1	134

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Linhagens de <i>S. cerevisiae</i> utilizadas no estudo	40
Tabela 2 - Composição dos meios de cultura utilizados no estudo	43
Tabela 3 - Volume da solução 1,5 M de açúcar, e de água destilada, transferidos ao recipiente termostatzado para perfazer a concentração final desejada de açúcar, no ensaio de co-transporte açúcar/H ⁺	64
Tabela 4 - Sequência de nucleotídeos dos iniciadores utilizados na construção dos módulos para modificação genética	75
Tabela 5 - Combinação de iniciadores utilizados na obtenção dos módulos para modificação genética, conforme proposta de modificação, e produtos de PCR esperados após eletroforese em gel de agarose	75
Tabela 6 - Reagentes utilizados para a transformação das leveduras	78
Tabela 7 - Sequência de nucleotídeos dos iniciadores utilizados para verificar a inserção do módulo para modificação genética no correto local no genoma da levedura engenhada ..	80
Tabela 8 - Combinação de iniciadores utilizados para verificar a inserção do módulo para modificação genética, no correto local no genoma da levedura, e fragmentos de DNA esperados, após eletroforese em gel de agarose, conforme proposta de modificação	80
Tabela 9 - Vetores utilizados para inserção de genes nas leveduras analisadas, após transformação com plasmídeos episomais	81
Tabela 10 - Concentrações máximas de glicose, de frutose e de glicerol encontrados nos cultivos das linhagens cultivadas em frascos agitados contendo 20 g.L ⁻¹ de sacarose	106
Tabela 11 - Parâmetros fisiológicos das linhagens CEN.PK113-7D e IMK-316 cultivadas em sistema contínuo	112
Tabela 12 - Parâmetros fisiológicos das linhagens CEN.PK113-5D e BSY21-34B cultivadas em sistema contínuo	114
Tabela 13 - Parâmetros fisiológicos das linhagens analisadas, obtidos após fermentação em frascos agitados contendo meio rico (YP) e concentração superior a 200 g.L ⁻¹ de sacarose	125
Tabela 14 - Parâmetros fisiológicos das linhagens <i>suc2Δ</i> , obtidos após fermentação em frascos agitados contendo meio rico (YP) e concentração de 100 g.L ⁻¹ de sacarose	126

Tabela 15 - Parâmetros fisiológicos das linhagens CEN.PK113-5D, MGD-02 e BSY21-34B, transformadas com plasmídeos, crescidas em frascos agitados contendo meio rico (YP) e 2% de glicose 130

Tabela 16 - Parâmetros fisiológicos das linhagens CEN.PK113-5D, MGD-02 e BSY21-34B, transformadas com plasmídeos, crescidas em frascos agitados contendo meio rico (YP) e 2% de sacarose 132

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	20
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	22
2.1 Histórico do etanol combustível	22
2.2 Utilização de açúcares por <i>S. cerevisiae</i>	25
2.3 Processo brasileiro de produção do etanol combustível	33
3 OBJETIVOS	39
4 MATERIAIS E MÉTODOS	40
4.1 Linhagens analisadas	40
4.2 Meio de cultura e reagentes	42
4.3 Preservação das linhagens	43
4.4 Análises em quimiostato	45
4.4.1 Meio de cultura	45
4.4.2 Cultivos contínuos	46
4.4.3 Análise de gases	48
4.4.4 Quantificação de biomassa celular	48
4.4.5 Quantificação de açúcares e metabólitos	49
4.4.6 Determinação dos parâmetros fisiológicos	50
4.5 Multiplicação de células para uso experimental	50
4.5.1 Pré-cultivo	50
4.5.2 Preparo de suspensão celular	50
4.6 Cultivo em micro-escala	51
4.7 Análise de crescimento em frasco agitado	51
4.8 Análise de fermentação em frasco agitado	52
4.9 Processamento de amostras	52
4.10 Quantificação de biomassa celular, açúcares e metabólitos	53
4.10.1 Quantificação de biomassa celular	53
4.10.2 Quantificação de glicose	54
4.10.3 Quantificação de sacarose	55
4.10.4 Quantificação de frutose	56
4.10.5 Quantificação de etanol	58

4.10.6 Quantificação de glicerol	59
4.11 Determinação da atividade de transporte	60
4.11.1 Transporte de <i>p</i> -nitrofenil- α -D-glucopiranosídeo	60
4.11.2 Transporte de [U- ¹⁴ C]-sacarose	61
4.11.3 Co-transporte de açúcar/H ⁺	63
4.12 Determinações enzimáticas	65
4.12.1 Determinação de atividade da invertase	65
<u>4.12.1.1 Invertase extracelular</u>	<u>65</u>
<u>4.12.1.2 Invertase total</u>	<u>66</u>
4.12.2 Determinação de atividade da maltase	68
4.13 Determinação dos parâmetros fisiológicos	70
4.14 Técnicas de manipulação de ácidos nucleicos	72
4.14.1 Engenharia genômica em <i>S. cerevisiae</i>	72
4.14.2 Construção dos módulos para modificação genética	73
<u>4.14.2.1 Extração e purificação de plasmídeos em bactérias (Miniprep)</u>	<u>75</u>
<u>4.14.2.2 Eletroforese em gel de agarose</u>	<u>77</u>
4.14.3 Transformação das linhagens de <i>S. cerevisiae</i>	77
4.14.4 Confirmação da inserção das modificações no genoma das linhagens	77
<u>4.14.4.1 Extração de DNA genômico de <i>S. cerevisiae</i></u>	<u>80</u>
4.14.5 Transformação de genes em <i>S. cerevisiae</i>	81
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	82
5.1 Obtenção de Linhagens de <i>S. cerevisiae</i> engenhas por engenharia genômica	82
5.1.1 Obtenção de linhagem engenhada no gene SUC2	83
5.1.2 Obtenção de linhagem engenhada no gene AGT1	85
5.2 Caracterização das linhagens de <i>S. cerevisiae</i> através de crescimento em frasco agitado	86
5.3 Caracterização das linhagens de <i>S. cerevisiae</i> através de cultivos contínuos	110
5.4 Caracterização das linhagens de <i>S. cerevisiae</i> através de fermentação em frasco agitado	120
5.5 Análise da via de sinalização de AMPc no metabolismo da sacarose	127
6 CONCLUSÕES	135
REFERÊNCIAS	138

1 INTRODUÇÃO

O Brasil possui destaque mundial na produção e no consumo em larga escala de etanol combustível. A indústria sucroalcooleira no país tem investido em tecnologia desde o fim dos incentivos fiscais do Programa Nacional do Álcool (Pró-Álcool), ocorrido na primeira metade da década de 90, almejando melhorar o processo de obtenção do etanol. O aperfeiçoamento constante ao longo dos anos trouxe maior eficiência ao processo e tornou o etanol brasileiro comercialmente atrativo ao consumidor nacional e competitivo no mercado internacional (ANDRIETTA et al., 2007; GOLDEMBERG, 2007; 2008; WHEALS et al., 1999; ZANIN et al., 2000).

Há crescente preocupação mundial com o possível esgotamento das reservas petrolíferas, fato que comprometeria o desenvolvimento das nações. Além disso, a implementação de políticas para proteção ambiental impulsionou a utilização mundial do etanol combustível na matriz energética de vários países nos últimos anos, em alternativa aos derivados de petróleo. Tais políticas incentivam a produção, o plantio de produtos agrícolas destinados à produção e o consumo desse combustível renovável (FARRELL et al., 2006; GOLDEMBERG, 2007). Dessa forma, a busca por fontes alternativas de energia torna-se crescente a cada ano, para que seja assegurado às nações manterem o desenvolvimento concomitante a redução das agressões ao meio ambiente.

O processo brasileiro pode utilizar caldo de cana-de-açúcar, melaço ou mistura de ambos como fonte para obtenção do etanol combustível. A sacarose é encontrada em abundância nesses substratos, e consequentemente é o principal açúcar a ser fermentado pelos micro-organismos utilizados no processo fermentativo industrial, sendo a espécie *Saccharomyces cerevisiae* normalmente utilizada no processo de fermentação (ANDRIETTA et al., 2007; WHEALS et al., 1999; ZANIN et al., 2000). Há estudos que investem na seleção e no melhoramento genético de *Saccharum officinarum* (cana-de-açúcar) para incrementar o teor de sacarose no caldo de cana, sendo essa uma estratégia interessante para o beneficiamento de açúcar (SCHÄFER; ROHWER; BOTHA, 2004; WACLAWOVSKY et al., 2010). Porém, para a obtenção do etanol combustível, o passo limitante do processo de fermentação é a resposta fisiológica da levedura *S. cerevisiae* em relação à concentração de açúcar disponível no meio. O setor industrial de produção do etanol combustível realiza há décadas a seleção das melhores linhagens a serem utilizadas no processo fermentativo

(ANDRIETTA et al., 2007; BASSO et al., 2008). Entretanto, o surgimento de técnicas avançadas para manipulação genética tornou possível realizar, nos últimos anos, estudos de modulação do metabolismo microbiano para incrementar a produtividade de processos industriais, aliando os resultados da pesquisa em laboratório com a realidade da indústria. Dessa forma, os estudos de caracterização metabólica dos micro-organismos utilizados na produção de etanol combustível são apontados como de grande importância biotecnológica, econômica e ambiental (IZIQUÉ, 2008; KELLYS; BIRREN; LANDER, 2004; LANDRY et al., 2006; QUEROL et al., 2003).

É de suma importância focar o aumento da produtividade de etanol, ou em outras palavras, produzir mais etanol sem ampliar a área de plantio de cana-de-açúcar, pois embora o Brasil possua um vasto território que permite expansão da fronteira agrícola, há críticas de organismos internacionais ao incentivo à produção do etanol combustível, inferindo que a expansão do setor poderia promover degradação ambiental e redução na produção de alimentos. Dessa forma, no presente trabalho é apresentado um estudo visando incrementar a produtividade do processo brasileiro de produção de etanol combustível, modificando a forma de utilização da sacarose pelas leveduras *S. cerevisiae*.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Histórico do etanol combustível

A possibilidade de utilizar etanol como combustível automotivo é conhecida desde o desenvolvimento dos primeiros veículos. Porém, a descoberta de reservas de petróleo e a expansão do comércio petrolífero tornaram inviável a utilização do etanol como matriz energética, devida a disponibilidade de derivados de petróleo com baixos preços (KOVARIK, 1998; MUSSATTO et al., 2010).

A produção de etanol para utilização automobilística em larga escala no Brasil teve seu início na década de 70 com a criação do Pró-Álcool. O programa foi criado, pelo governo brasileiro, para incentivar a produção de uma matriz energética alternativa aos derivados de petróleo e reduzir a dependência do combustível fóssil, para combater a instabilidade econômica envolvendo o comércio petrolífero, gerada por sucessivas altas no preço do barril de petróleo. O início do programa tinha como objetivo reduzir a importação de petróleo, pela mistura do etanol anidro na proporção de 20 a 25% como aditivo à gasolina. Posteriormente, o programa evoluiu e caracterizou-se pela concessão de subsídios: às montadoras para produção de veículos movidos totalmente a etanol hidratado, aos compradores desse tipo de veículos e aos produtores de etanol. A frota nacional de veículos movida a etanol aumentou de forma significativa com os subsídios, e juntamente com o aumento do consumo de gasolina, a produção do etanol combustível se tornou insuficiente para suprir o consumo do mercado brasileiro. Crises de abastecimento no comércio de combustíveis geraram desconfiança dos consumidores sobre a viabilidade do Pró-álcool, que foi praticamente extinto no período que compreendeu o fim da década de 80 e início da década de 90 (AMORIM et al., 2011; BERTELLI, 2005; GOLDEMBERG, 2008; ROSILLO-CALLE; CORTEZ, 1998; SANTOS, 1993).

O Pró-álcool novamente ganhou importância a partir de 1994, quando, especialistas da área energética apontaram o programa como pertencente a um plano estratégico que poderia contribuir para o crescimento econômico nacional. Nesse contexto enquadram-se: a implantação de um novo plano econômico (Plano Real), a preocupação crescente sobre a extinção das reservas de petróleo em um futuro próximo, e a preocupação crescente sobre as alterações climáticas. Na ocasião, o etanol combustível foi apontado como a fonte

alternativa de energia que poderia contribuir ao desenvolvimento econômico brasileiro, além de ser renovável e menos agressor ao meio ambiente. Leis de proteção ambiental foram decretadas para reduzir as emissões de monóxido de carbono, e previam o retorno dos subsídios para incentivar a utilização do etanol hidratado - utilizado como combustível automotivo - e do etanol anidro - utilizado como aditivo misturado à gasolina na proporção de 20 a 25% (AMORIM et al., 2011; FARRELL et al., 2006; GOLDEMBERG, 2007; HILL et al., 2006; ROSILLO-CALLE; CORTEZ, 1998).

Desde a criação do Pró-Álcool até os dias atuais, o setor sucroalcooleiro realiza a produção do etanol combustível em paralelo com o beneficiamento do açúcar refinado. Quando o açúcar apresentava preço atrativo no mercado internacional, o setor sucroalcooleiro reduzia a produção de etanol em detrimento ao beneficiamento do açúcar para exportação, e essa relação era invertida quando o preço do açúcar era reduzido no mercado internacional, prática que perdura até os dias atuais. Essa constante volatilidade do setor produtivo e a falta de uma política governamental regulatória trouxeram problemas ao mercado e tornaram a utilização do etanol hidratado pouco atraente para o consumidor, refletindo diretamente no número de veículos movidos a etanol licenciados entre os anos de 1995 e 2003, que atualmente encontra-se praticamente extinta. Por outro lado, a utilização de etanol anidro tornou-se crescente, devido o incremento de veículos movidos à gasolina em circulação, conforme pode ser visualizado na Figura 1 (AMORIM et al., 2011; MUSSATTO et al., 2010; WHEALS et al., 1999; ZANIN et al., 2000).

A tecnologia dos motores *flex*, introduzida em 2003, trouxe aos consumidores, uma alternativa para enfrentar a volatilidade do mercado de etanol combustível, e deu o poder de realizarem a regulação do mercado de combustíveis. Esses aspectos fizeram com que a tecnologia caísse no gosto popular, refletindo diretamente no comércio de veículos. O número de veículos em circulação que apresentam essa tecnologia cresceu constantemente até os dias atuais (Figura 1), fazendo com que o consumo de etanol combustível aumentasse, a ponto do volume de etanol consumido (hidratado e anidro) ultrapassar o volume de gasolina, no ano de 2010 (AMORIM et al, 2011; MUSSATTO et al., 2010).

Vários países produzem etanol combustível, porém o Brasil e os EUA são responsáveis por mais da metade da atual produção mundial. Os Estados Unidos são considerados atualmente o maior produtor mundial de etanol combustível, devido a inúmeros incentivos governamentais disponibilizados ao desenvolvimento do setor. O Brasil já foi considerado o

maior produtor de etanol combustível, e atualmente se destaca no consumo em larga escala e na exportação desse combustível (MARRIS, 2006; SÁNCHEZ; CARDONA, 2008; WHEALS et al., 1999; ZANIN et al., 2000).

Figura 1 - Número absoluto de automóveis licenciados no Brasil, segundo tipo de combustível, durante os anos de 1975 a 2010.

NOTA: Extraído de dados publicados pela Associação Nacional dos Fabricantes de Veículos Automotores (ANFAVEA, 2011).

FONTE: Dário (2012).

Por incentivar à utilização desse combustível em escala mundial, o Estado brasileiro recebeu duras críticas internacionais oriundas dos mais variados setores. O Brasil foi o maior responsabilizado pela crise global vivida em torno dos alimentos e acusado de degradar a floresta Amazônica para expandir a produção de cana-de-açúcar, com o argumento que o uso de terras férteis para o cultivo de substratos destinados à fabricação de biocombustíveis reduzia a área de plantio dos alimentos, contribuindo assim para o aumento dos preços dos mantimentos. O governo brasileiro rebateu as críticas argumentando que não houve redução da área de cultivo de alimentos, e que a região Amazônica não apresenta condições favoráveis para o cultivo da cana-de-açúcar. Outro forte argumento apresentado foi que a cana-de-açúcar não é fonte de alimento, ao contrário do milho que utilizados na

alimentação humana e animal (AMORIM et al., 2011; GREENPEACE, 2007; MORAES, 2011; MUSSATTO et al., 2010; ROBBINS, 2011).

Outros países também iniciaram a implementação de programas voltados à utilização de etanol como matriz energética, devido ao aumento da preocupação em reduzir os efeitos climáticos causados pela emissão de gases poluentes. Por outro lado, com o avanço tecnológico e o investimento em pesquisa, a técnica brasileira de produção do etanol se tornou mais eficiente e apresenta menor custo de produção, quando comparada às utilizadas por outros países, dando por consequência, maior competitividade do etanol brasileiro no mercado internacional (AMORIM et al., 2011; ANDRIETTA et al., 2007; BRANCO, 2009; MARRIS, 2006; MUSSATTO et al., 2010; ROBBINS, 2011; ZANIN et al., 2000). Dessa forma, vários países, que não dominam a técnica de produção de etanol em larga escala, veem realizando acordos comerciais e tecnológicos com o Brasil, para a compra de etanol e de tecnologia de produção (ORELLANA; NETO, 2006; WYMAN, 1999).

2.2 Utilização de açúcares por *S. cerevisiae*

A Figura 2 apresenta esquematicamente as principais vias de metabolização de alguns carboidratos por *S. cerevisiae*, assim como alguns genes e proteínas envolvidos, que apresentam relação com o metabolismo de sacarose.

Conforme descrito por Lagunas (1993), o passo inicial do processo de fermentação em *S. cerevisiae* é o transporte dos açúcares, do ambiente extracelular para o interior das células. Os monossacarídeos glicose e frutose são captados através de um sistema de difusão facilitada, que utiliza os transportadores de hexose codificados pelos genes *HXT* (Figura 2). Esse sistema de transporte é formado por uma família composta de aproximadamente 20 genes (*HXT1* a *HXT17*, *GAL2*, *SNF3* e *RGT2*), que se diferem pela função, pela regulação e pela afinidade a diferentes monossacarídeos. Em *S. cerevisiae* são descritos dois sistemas de transporte para monossacarídeos, um constitutivo de alta afinidade (K_m 1 a 2 mM) e outro de baixa afinidade (K_m 15 a 20 mM) que sofre regulação pela glicose (OZCAN; JONHSTON, 1999).

Figura 2 - Representação das vias de captação e dos genes envolvidos na utilização de açúcares por *S. cerevisiae*.

FONTE: Dário (2012).

As principais permeases, responsáveis pelo transporte de hexoses (glicose, frutose e manose), são codificados pelos genes *HXT1* a *HXT7*. Os transportadores codificados a partir desses genes apresentam menor afinidade pela frutose e pela manose, motivo pelo qual a glicose é captada mais rapidamente pelas células. O gene *GAL2* codifica para um transportador de galactose e de glicose, que é induzido apenas pela galactose. Acredita-se que os demais genes dessa família (*HXT8* a *HXT17*, *SNF3* e *RGT2*) são responsáveis por codificar proteínas transportadoras envolvidas na captação de açúcares em condições específicas, ou também que codificam para receptores da concentração de carboidratos presentes no meio extracelular, que participam da regulação e da expressão dos genes *HXT* (BOLES; HOLLEMBERG, 1997; DIDERICH et al., 1999; KRUCKEBERG et al., 1999; OZCAN; JONHSTON, 1999).

Além do sistema de transporte de monossacarídeos por difusão facilitada, há um sistema de transporte de dissacarídeos e de trissacarídeos realizado de forma ativa através do co-transporte dos açúcares juntamente com íons H^+ , com estequiometria de um próton para uma molécula de açúcar. Para ocorrer o transporte ativo dos açúcares é necessário um potencial eletroquímico trans-membrana, gerado pelo gradiente de pH entre o ambiente extracelular (pH próximo de 5,0) e intracelular (pH próximo de 7,0). A homeostase do pH intracelular é mantida por proteínas H^+ -ATPase trans-membrana, que funcionam como bombas, lançando os íons H^+ localizados no citoplasma para o ambiente extracelular. O processo de lançamento do próton ocorre com gasto energético, pela quebra da molécula de Adenosina Trifosfato (ATP) em Adenosina Difosfato (ADP) e Fosfato inorgânico (P_i), com estequiometria de uma molécula de ATP por próton bombeado (STAMBUK, 2000; WEUSTHUIS et al., 1993). Os genes *PMA1* e *PMA2* codificam a H^+ -ATPase e sofrem regulação na expressão conforme a condição fisiológica que as células se encontram, como no caso de alteração na concentração intracelular de prótons (SCHLESSER et al., 1988; SERRANO; KIELLAND-BRANDT; FINK, 1986).

A sacarose é um dissacarídeo não redutor formado por moléculas de glicose e de frutose unidas através de ligação osídica, envolvendo ambos os carbonos anoméricos, com conformação $Gli \alpha1-\beta2 Fru$. A característica dessa ligação confere a esse carboidrato, a possibilidade de sofrer a ação de dois tipos de hidrolases: por α -D-glicosidases, que são capazes de reconhecer a ligação " $Gli \alpha1$ ", e por β -D-frutosidases, que são capazes de reconhecer a ligação " $\beta2 Fru$ ". Dessa forma, na levedura *S. cerevisiae* são conhecidas duas

vias de utilização para esse açúcar, demonstrando haver inter-relação do metabolismo da sacarose com de outros carboidratos: a sacarose pode ser hidrolisada no ambiente extracelular - em glicose e frutose - por ação da invertase extracelular, e os monossacarídeos produzidos pela hidrólise da sacarose são captados por transportadores *HXT*; e também, conforme ilustra a Figura 2, a sacarose pode ser captada diretamente para o interior das células através do co-transporte com prótons H^+ , com alta afinidade pelo transportador codificado pelo gene *AGT1* e com baixa afinidade pelos transportadores *MALT*, e posteriormente hidrolisada pela maltase (α -D-glicosidase) ou pela invertase (β -D-frutosidase) intracelulares (BADOTTI; BATISTA; STAMBUK, 2006; BADOTTI et al., 2008; BARFORD; PHILLIPS; ORLOWSKI, 1992; BATISTA; MILETTI; STAMBUK, 2004; MWESIGYE; BARFORD, 1996; ORLOWSKI; BARFORD, 1991).

Conforme ilustração da Figura 2, as células de *S. cerevisiae* apresentam dois tipos de invertase (E.C. 3.2.1.2.6): uma forma extracelular (periplasmática) e outra intracelular, traduzidas a partir dos genes da família *SUC* (Figura 2-B). O gene *SUC2*, presente em todas as leveduras do gênero *Saccharomyces*, está localizado na região subtelomérica do cromossomo IX. Algumas linhagens podem apresentar outros genes *SUC*, localizados nos telômeros de diferentes cromossomos: *SUC1* no cromossomo VII, *SUC3* no cromossomo II, *SUC4* no cromossomo XIII, *SUC5* no cromossomo IV, *SUC7* no cromossomo VIII, *SUC8* cromossomo X, *SUC9* no cromossomo XIV e *SUC10* no cromossomo XVI ou XIII (GROSSMANN; ZIMMERMANN, 1979; HOHMANN; ZIMMERMANN, 1986; KORSHUNOVA; NAUMOVA; NAUMOV, 2005; NAUMOV et al., 1996; NAUMOV; NAUMOVA, 2010a,b). A análise de leveduras, isoladas em diferentes ambientes industriais, revelou que *S. cerevisiae* apresenta alta atividade invertase e também vários *loci SUC* no genoma, quando expostas a meios de cultura onde a sacarose é o principal açúcar a ser fermentado (como caldo-de-cana ou melaço). Isso inclui leveduras de panificação e as utilizadas na produção de bebidas destiladas. Por outro lado, as linhagens utilizadas na produção de vinho geralmente não apresentam amplificação do gene *SUC*, pois a glicose e frutose são os principais açúcares a serem fermentados na produção dessa bebida alcoólica (BENITEZ; MARTINEZ; CODON, 1996; BENITEZ; CODON, 1995; BIDENNE et al., 1992; CODON; BENITEZ; KORHOLA, 1997, 1998; DENAYROLLES et al., 1997; NADAL et al., 1999; NESS; AIGLE, 1995).

Sabe-se da existência de dois tipos distintos de RNAs mensageiros, transcritos a partir dos genes *SUC* (CARLSON; BOTSTEIN, 1982): um RNA mensageiro maior, com

aproximadamente 1.900 nucleotídeos, contendo uma sequência de nucleotídeos que codifica a um peptídeo sinal (20 aminoácidos), responsável por direcionar a secreção da proteína para o espaço periplasmático; e um transcrito menor, com aproximadamente 1.800 nucleotídeos, não contendo a sequência sinalizadora e que permite a síntese da enzima intracelular. Ambas enzimas possuem o mesmo pH ótimo (pH 4,6 a 5,0), a mesma temperatura ótima de atividade (35 a 50 °C) e a mesma afinidade ($K_m \approx 25 \text{ mM}$) pela sacarose (ANDJELKOVIC; PICURIC; VUJCIC, 2010; GASCÓN; NEUMANN; LAMPEN, 1968). Ambas proteínas possuem 532 aminoácidos, mas massas moleculares diferentes: próximo de 135.000 Daltons para a forma intracelular e valores superiores a 270.000 Daltons para a invertase extracelular, que pode chegar a complexos com massa superior a 800.000 Daltons, conforme ilustra a Figura 3.

Figura 3 - Representação da estrutura dos genes *SUC* de *S. cerevisiae*.

NOTA: A região promotora do gene possui local para ativação da transcrição dos genes *SUC* (UAS – *Upstream Activating Sequence*) e sítios de ligação de proteínas reguladoras (CRE, SUCA e SUCB), incluindo o TATA-box. Os códons que permitem o início da transcrição de cada RNA mensageiro estão representados em verde, e a sequência de resíduos de aminoácidos, correspondente ao peptídeo sinal, encontra-se sublinhada. As formas intra e extracelular da invertase são sintetizadas a partir do mesmo gene *SUC*.

FONTE: Modificado de Dário (2007).

A diferença na massa molecular, entre as diferentes formas de invertase, se deve pela existência de glicosilações na forma extracelular, adicionadas durante o processo celular de

síntese e secreção da proteína. Essa modificação não interfere na atividade de hidrólise da enzima, mas confere proteção contra a ação de proteases e contribui para a formação de complexos protéicos na forma de tetrâmeros, hexâmeros e até mesmo octâmeros da forma extracelular, garantindo a retenção dessa enzima no espaço periplasmático das células (ALVARADO et al., 1990; ARRUDA; VITOLO, 1999; REDDY et al., 1988). A expressão da invertase intracelular é realizada de forma constitutiva e praticamente não sofre repressão pela fonte de carbono disponível no meio. Por outro lado, a expressão da forma extracelular sofre repressão por alta concentração de sacarose, glicose, frutose, manose e xilose, enquanto que baixa concentração de glicose induz a expressão do gene *SUC* (DYNESEN et al., 1998; ECHEGARAY et al., 2000; HAQ; SHAFIQ; ALI, 2003; HERWING et al., 2001; OZCAN et al., 1997; REDDY et al., 1988). Algumas proteínas que participam na repressão da transcrição de vários genes foram identificadas como atuantes na regulação dos genes *SUC* (p. ex.: Mig1p, Rgt1p, Sfl1p, Sko1p e outras). Porém, não se tem conhecimento qual proteína, ou conjunto de proteínas, realiza o papel de ativador da transcrição (BELINCHÓN; GANCEDO, 2007; BU; SCHIMIDT, 1998), o que dificulta as tentativas de alterar a expressão dessa enzima nas leveduras *S. cerevisiae*.

A maltose e a maltotriose são um dissacarídeo e trissacarídeo, respectivamente, formados por moléculas de glicose unidas através de ligações osídica α 1-4. Esses açúcares são captados, para o interior da célula, através do co-transporte com prótons H^+ e hidrolisados pela maltase (Figura 2), ocorrendo liberação de moléculas de glicose que serão metabolizadas na via glicolítica (ZASTROW et al., 2001). Para que *S. cerevisiae* apresente a capacidade de fermentar esses açúcares é necessária à presença dos genes *MAL* no genoma das leveduras. Esses genes podem ser encontrados em cinco diferentes *loci*, localizados em regiões teloméricas de cromossomos distintos: *MAL1* no cromossomo VII, *MAL2* no cromossomo III, *MAL3* no cromossomo II, *MAL4* no cromossomo XI e *MAL6* no cromossomo VIII. Em cada um desses *loci* são encontrados três diferentes genes que codificam proteínas com funções diferentes: o gene *MALT* ou *MALx1* (x representa o *locus*) codifica ao transportador de maltose, o gene *MALS* ou *MALx2* codifica a maltase e o gene *MALR* ou *MALx3* codifica a proteína reguladora. A proteína reguladora induz a expressão dos outros dois genes na presença do ativador, ligando-se na região *UAS_{MAL}* (*Upstream Activating Sequence*) localizada entre os genes *MALT* e *MALR*, conforme ilustra a Figura 4-A (HORÁK, 1997; NEEDLEMAN, 1991; NOVAK; ZECHNER-KRPAN; MARIÉ, 2004). Quando alguns desses

loci não possuem o gene regulador *MALR* (*MALx3*), recebem a denominação *malg* para indicar que são parcialmente funcionais (NAUMOV; NAUMOVA; MICHELS, 1994). Ao analisarem alelos naturais do transportador de maltose, presentes no *locus mal1g*, Han et al. (1995) caracterizaram um gene responsável por codificar a um transportador capaz de realizar o transporte ativo de uma série de α -glicosídeos, que posteriormente passou a ser chamado *AGT1* (α -glucoside transporter). Esse gene aparentemente é regulado pelos mesmos mecanismos de regulação gênica dos genes *MAL*, pois possui uma sequência *UAS_{MAL}* na sua região promotora, conforme ilustra a Figura 4-B (STAMBUK et al., 1999; STAMBUK; BATISTA; DE ARAUJO, 2000). Em *S. cerevisiae*, a transcrição da proteína reguladora Malx3p é realizada ao ser ativada pela maltose. Essa proteína liga-se ao DNA na região *UAS_{MAL}* e induz a transcrição das proteínas transportadoras Malx1p e das α -glicosidases Malx2p (LEVINE; TANOUYE; MICHELS, 1992; SIRENKO; NI; NEEDLEMAN, 1995). Por outro lado, a presença de glicose causa repressão da expressão desses genes, de duas formas: inibe a ativação da proteína reguladora Malx3p, pela maltose; e ativa o repressor Mig1p, que impede a transcrição ao ligar-se na região promotora dos três genes *MAL* (HU et al., 2000; WANG; NEEDLEMAN, 1996).

Conforme descrito por Stambuk, Batista e De Araújo (2000) e Stambuk e De Araújo (2001), a permease Agt1p realiza o transporte da sacarose ($K_m \approx 8$ mM) e da trealose ($K_m \approx 7$ mM) com alta afinidade; e da maltose ($K_m \approx 18$ mM), da maltotriose ($K_m \approx 18$ mM) e do α -metil-glicosídeo ($K_m \approx 34$ mM) com baixa afinidade. Por outro lado, os transportadores Malx1p possuem alta afinidade pela maltose ($K_m \approx 5$ mM) e baixa afinidade pela sacarose ($K_m \approx 120$ mM) e pela trealose ($K_m \approx 90$ mM).

A maltase ou α -glucosidase (E.C. 3.2.1.20) é uma enzima citoplasmática - com pH ótimo próximo a 6,8 - capaz de hidrolisar a ligação osídica do resíduo de glicose em conformação " α ", encontrada em oligossacarídeos como na maltose, maltotriose e sacarose, e em substratos sintéticos como o *p*-nitrofenil- α -D-glucopiranosídeo (*p*NP α G) (TABATA et al., 1984; ZASTROW et al., 2000, 2001).

A transcrição gênica e a tradução protéica em *S. cerevisiae* podem sofrer regulação através de mecanismos de sinalização celular, com base nas mudanças ocorridas no ambiente extracelular. Há proteínas receptoras, na membrana plasmática das células, que sinalizam a disponibilidade de nutrientes no meio extracelular e deflagram uma cascata

Figura 4 - Representação da estrutura e do controle da expressão dos *loci* MAL.

NOTA: (A) Representação de um *locus* MAL funcional, apresentando telômero à direita e centrômero à esquerda. As setas maiores (coloridas) indicam a posição de cada gene MAL dentro do *locus* e sentido a qual são transcritos. As linhas pontilhadas indicam as proteínas traduzidas a partir de cada gene; as linhas contínuas com setas, indução; e as linhas contínuas com pontas rombas, repressão. (B) Representação do *locus* *mal1g*.

FONTE: Alves Jr. (2010).

intracelular de sinalização. A interação direta dos carboidratos, com as proteínas receptoras, causa mudança na conformação da estrutura dos receptores de membrana. Essa mudança na conformação, da proteína receptora de membrana, promove a ativação de uma outra proteína intracelular, ou de mais proteínas, que participam da indução ou da repressão da expressão de genes (FORSBERG; LJUNGDAHL, 2001; GANCEDO, 2008; THEVELEIN; VOORDECKERS, 2009). Assim, a captação e a metabolização de diferentes fontes de carbono, a progressão do ciclo celular, e o formato das células, podem ser modificados conforme a disponibilidade de nutrientes no meio onde as células de *S. cerevisiae* se encontram.

Trabalhos relatam que os receptores Snf3p e Rgt2p apresentam, respectivamente, alta e baixa afinidade para glicose e participam do processo de regulação da expressão dos genes *HXT*. A alteração da estrutura da proteína receptora promove a ativação de várias proteínas intracelulares, que interagem entre si para formarem complexos protéicos de ligação ao DNA, induzindo ou reprimindo a expressão dos genes *HXT* (FORSBERG; LJUNGDAHL, 2001; OZCAN; JONHSTON, 1999; ROLLAND; WINDERICKX; THEVELEIN, 2002; SANTANGELO, 2006).

Há também outra via de sinalização iniciada pelo receptor Gpr1p (*G-protein coupled receptor*). Lemaire et al. (2004) demonstraram que a proteína Gpr1p apresenta baixa afinidade para glicose ($K_m \approx 20$ mM) e alta afinidade para sacarose ($K_m \approx 0,5$ mM). De fato, Van de Velde e Thevelein (2008) demonstraram que a sacarose apresenta maior afinidade pelo receptor Gpr1p, e ainda consideram esse carboidrato o melhor ativador da via de sinalização iniciada pela proteína Gpr1p. Na sinalização iniciada através desse receptor, o carboidrato interage com a proteína de membrana e causa alteração na estrutura da proteína Gpr1p, que se encontra acoplada a proteína G Gpa2p. O complexo protéico Gpr1p-Gpa2p ativado interage com a enzima adenilato ciclase, codificada pelo gene *CYR1*, responsável pela formação de AMP cíclico (AMPc). O aumento da concentração intracelular de AMPc causa ativação da proteína quinase A (PKA), responsável pela fosforilação de proteínas intracelulares que participam na ativação e na repressão da transcrição gênica (FORSBERG; LJUNGDAHL, 2001; GANCEDO, 2008; SANTANGELO, 2006; THEVELEIN; WINDE, 1999; THEVELEIN; VOORDECKERS, 2009). Estudos apontam a participação da via de sinalização iniciada pela proteína Gpr1p em vários processos celulares importantes, como a ativação da glicólise, da floculação e crescimento filamentosos, entre outros (THEVELEIN; WINDE, 1999; LORENZ et al. 2000; VERSTREPEN et al., 2004).

2.3 Processo brasileiro de produção do etanol combustível

O Brasil e os EUA são responsáveis por mais da metade da produção mundial de etanol combustível, utilizando técnicas diferentes. O processo norte americano de produção do etanol combustível utiliza milho, cujos grãos são triturados e misturados com α -amilases sob alta temperatura, para formar o mosto utilizado no processo fermentativo. Nesse processo, a hidrólise do amido contido nos grãos de milho é realizada antes de iniciar o processo de fermentação, liberando açúcares fermentáveis às células de levedura (p. ex: maltose, maltotriose e glicose). Quando comparado ao processo brasileiro, o processo norte americano apresenta um maior tempo de fermentação, além de não empregar reciclo das células de levedura, fatos que proporcionam baixo rendimento à técnica utilizada nos EUA. Devido aos procedimentos usados, consequentemente, o etanol norte americano apresenta maior custo de produção e menor competitividade frente ao etanol brasileiro (AMORIM et al., 2011; MUSSATTO et al., 2010; SCHUBERT, 2006; WHEALS et al., 1999).

No Brasil, o setor sucroalcooleiro realiza a produção do etanol em paralelo com o beneficiamento do açúcar refinado, a partir do processamento de cana-de-açúcar. Após a colheita, a planta é moída para a extração do caldo rico em açúcar, que é composto por 78 a 86% de água, 10 a 20% de sacarose, 0,1 a 2,0% de açúcares redutores, 0,3 a 0,5% de cinzas e 0,5 a 1,0% de compostos nitrogenados (LIMA; BASSO; AMORIM, 2001). O caldo extraído é processado para a obtenção do açúcar refinado ou também utilizado diretamente no processo de produção do etanol combustível. O melaço, subproduto do beneficiamento do açúcar, apresenta grande concentração de açúcar, e também é aproveitado para obtenção de etanol. Com isso, o mosto utilizado na obtenção do etanol brasileiro é composto de caldo de cana-de-açúcar, de melaço ou de mistura de ambos (caldo de cana-de-açúcar e melaço), e contém aproximadamente 180 g.L^{-1} de açúcares totais (AMORIM et al., 2011; WHEALS et al., 1999; ZANIN et al., 2000).

Após a formação do mosto, o processo fermentativo é realizado, na grande maioria dos casos, através de sistemas de fermentação em batelada alimentada. A fermentação é realizada com elevada concentração de células de levedura (8 a 15% v/v), fato que proporciona ciclos fermentativos de 6 a 10 horas. Após esse período de tempo, o mosto fermentado é separado das células e segue para a destilação, enquanto que as células são tratadas com ácido para eliminar os micro-organismos que contaminam a fermentação (AMORIM et al., 2011; WHEALS et al., 1999). A obtenção do mosto e a condução do processo fermentativo (condições não estéreis) favorecem a proliferação de micro-organismos contaminantes, incluindo linhagens selvagens de *S. cerevisiae*, leveduras não-*Saccharomyces* e bactérias. É relatado na literatura que contaminações por micro-organismos não desejados no processo provocam perdas significativas na produtividade (BASÍLIO et al., 2008; LIBERAL et al., 2005, 2007; SCHELL et al., 2007). Um novo ciclo fermentativo é realizado com a colocação de um volume de mosto não fermentado na dorna de fermentação, contendo as células de levedura que foram tratadas anteriormente. Esse procedimento é repetido várias vezes, enquanto durar o período de safra da cana-de-açúcar, que apresenta durabilidade de 200 a 230 dias (AMORIM et al., 2011; ANDRIETTA et al., 2007; WHEALS et al., 1999; ZANIN et al., 2000).

O principal micro-organismo utilizado na produção de etanol, pelas usinas brasileiras, é a levedura *S. cerevisiae*. Alguns trabalhos demonstram a existência de linhagens, dessa espécie de levedura, capazes de dominar o processo de fermentação ao longo dos vários

ciclos fermentativos, realizados durante a safra. As linhagens, também conhecidas como “industriais”, foram isoladas e selecionadas ao longo dos anos de existência do processo de obtenção de etanol, e atualmente são utilizadas por várias usinas brasileiras desde o início da safra de produção do etanol. Essas linhagens industriais apresentam como características, a manutenção da viabilidade e da vitalidade ao longo dos ciclos. As leveduras industriais proporcionam alta produtividade ao processo, pois são capazes de produzir alta concentração de etanol em um curto espaço de tempo, por estarem adaptadas às condições extremas que são encontradas no ambiente industrial, como por exemplo: alto teor alcoólico, variações extremas de pH e temperatura, e competição com micro-organismos que contaminam o processo (AMORIM et al., 2004, 2011; ANDRIETTA et al., 2007; BASSO et al., 2008; WHEALS et al., 1999).

As condições extremas exercem pressão seletiva sobre os micro-organismos presentes no processo industrial, pois forçam a adaptação e a evolução das diferentes linhagens presentes na dorna de fermentação. De fato, Stambuk et al. (2009) demonstraram haver amplificação de genes envolvidos na síntese de vitaminas B1 (tiamina) e B6 (piridoxina) nas principais linhagens utilizadas na produção industrial de etanol no Brasil, suprimindo uma deficiência nutricional que o mosto de fermentação não disponibiliza às leveduras. As leveduras isoladas do processo fermentativo são geralmente diplóides ou até poliplóides, característica apontada como responsável por tornar esses micro-organismos mais resistentes às condições extremas e menos susceptíveis a mutação, ao contrário das linhagens de laboratório, que são haplóides (AA et al., 2006; ARGUESO et al., 2009; BASSO et al., 2008; FEREA et al., 1999; IHMELS et al., 2005; LANDRY et al., 2006; QUEROL et al., 2003).

O processo de fermentação realizado com esse somatório de fatores - elevada concentração de açúcares, elevada concentração de células, ciclo de células, utilização de leveduras selecionadas – permitem uma fermentação com uma eficiência de 92 a 93%, obtenção de até 87 g.L⁻¹ de etanol a cada ciclo e menor custo de produção ao processo brasileiro, em comparação os processos realizados em outros países (AMORIM et al., 2011; WHEALS et al., 1999). A fermentação eficiente da sacarose pelas leveduras industriais deve-se, em grande parte, à expressão da invertase periplasmática, conforme demonstrado por Dário (2007).

Entretanto, trabalhos demonstram haver uma correlação inversa entre os níveis dessa enzima e a performance fermentativa das células, correlação que aumenta em

ambientes contendo alta concentração de sacarose (ECHEGARAY et al., 2000; MYERS; LAWLOR; ATTFIELD, 1997; ODA; OUCHI, 1990; TAKESHIGE; OUCHI, 1995). Leveduras sem atividade invertase - não possuem genes *SUC* no genoma - podem ainda utilizar eficientemente a sacarose hidrolisada por leveduras que produzem atividade dessa enzima, especialmente em situações com alta densidade celular, ou seja, situação semelhante à encontrada na produção industrial de etanol combustível brasileiro. Trabalhos demonstram que mais de 90% dos monossacarídeos produzidos pela hidrólise extracelular da sacarose se difundem pelo meio de cultura, não sendo necessariamente metabolizados pelas células que realizaram a hidrólise da sacarose (GORE; YOUK; VAN OUDENAARDEN, 2009; GREIG; TRAVISANO, 2004; KOSCHWANEZ; FOSTER; MURRAY, 2011)

A hidrólise rápida de grande quantidade de sacarose no espaço periplasmático das células produz altas concentrações de glicose e frutose (KOSCHWANEZ; FOSTER; MURRAY, 2011), fato que causa alterações na expressão gênica e diversas adaptações metabólicas nas células, permitindo às células suportarem a alta pressão osmótica gerada pelos monossacarídeos (VERSTREPEN et al., 2004). A pressão osmótica pode resultar em perda no rendimento da fermentação, promovendo desvio do carbono a ser utilizado na produção de etanol para vias metabólicas responsáveis pela formação de compostos com função protetora e de reserva energética celular (p. ex.: trealose, glicerol e glicogênio), além da produção de ácidos como o ácido acético e succínico (ALCARDE; BASSO, 1997; ERASMUS; VAN DER MERWE; VAN VUUREN, 2003; MYERS; LAWLOR; ATTFIELD, 1997). Além disso, algumas linhagens de *S. cerevisiae* não captam frutose de forma eficiente, conforme descrito por Berthels et. al. (2004, 2008). A captação não eficiente desse monossacarídeo pelas células pode disponibilizar fonte de carbono aos micro-organismos contaminantes do processo. Esse fato pode permitir a proliferação das células que contaminam a fermentação, podendo diminuir a oferta de açúcar às leveduras industriais, e permitindo a formação de ácidos orgânicos oriundos do metabolismo bacteriano, que causa alteração metabólica nas células de levedura (DA SILVA FILHO et al., 2005a,b; GUERRA et al., 2001; LIBERAL et al., 2007; PATARO et al., 2000).

A tecnologia denominada “Very-High-Gravity Fermentation” (VHGF) é amplamente utilizada em processos fermentativos de cervejarias (KODAMA et al., 1994). Essa tecnologia não apresenta resultados satisfatórios na produção de etanol a partir da cana-de-açúcar, pois ocorre queda do rendimento fermentativo conforme a concentração de sacarose é

aumentada (JONES; THOMAS; INGLEDEW, 1994; TAKESHIGE; OUCHI, 1995). Em cervejaria, os açúcares presentes no mosto (maltose e maltotriose) são captados ativamente pelas células e hidrolisados no citoplasma, fato que permite um equilíbrio entre as concentrações dos açúcares no interior e no exterior da célula, impedindo alteração drástica na osmolaridade do meio (KODAMA et al., 1994, 1995; ZASTROW et al., 2001). Trabalhos demonstram que a sacarose é também metabolizada por transporte direto através da membrana, para o interior das células, e hidrólise pela invertase intracelular (BADOTTI et al., 2008; BARFORD; PHILLIPS; ORLOWSKI, 1992; DÁRIO, 2007; MWESIGYE; BARFORD, 1996). Por outro lado, a metabolização desse dissacarídeo ocorre principalmente por hidrólise extracelular, por ação da invertase extracelular (DÁRIO, 2007; JOHNSTON; CARLSON, 1992). Em trabalhos realizados com maltose, Weusthuis et al. (1993) demonstraram que células cultivadas em maltose apresentam gasto energético, devido ao transporte ativo do dissacarídeo, correspondente a 25% da energia gerada durante a fermentação, quando comparadas com células cultivadas em glicose. Ficou demonstrado nesse trabalho, que as células apresentam incremento no rendimento da produção de etanol e na velocidade de fermentação, para repor a energia perdida. O transporte de açúcares através da membrana é o passo limitante na fermentação (GOFFRINI; FERRERO; DONNINI, 2002; MALLUTA; DECKER; STAMBUK, 2000; ZASTROW et al., 2001), e linhagens com expressão incrementada do transportador de maltose, já foram patenteadas e se encontram em pleno uso pelas indústrias cervejeiras por fermentarem mais eficientemente esse açúcar (ALDHOUS, 1990; BUTLER, 1996; KODAMA et al., 1994).

Dessa forma, essa abordagem pode contribuir para o desenvolvimento de linhagens que tornariam o processo de produção do etanol combustível brasileiro mais produtivo. Conhecendo as formas de perda de rendimento no processo industrial e o mecanismo de metabolização da sacarose pelas leveduras, pretende-se desenvolver linhagens capazes de fermentar esse dissacarídeo de forma eficiente, pois possibilitaria:

- Flexibilizar a condução do processo industrial, permitindo aumentar a velocidade de alimentação das dornas de fermentação;
- Maior produção de etanol, por redução da pressão osmótica imposta às células de levedura, causado pelas altas concentrações de glicose e frutose, geradas após a hidrólise extracelular da sacarose;

- Maior produção de etanol, por redução na disponibilidade de glicose e frutose, geradas após a hidrólise extracelular da sacarose, para bactérias e leveduras contaminantes do processo industrial;
- Maior produção de etanol pelas leveduras sem atividade invertase, que em condições semelhante às encontradas na indústria (fermentação com alta densidade celular e alta concentração de sacarose) apresentam melhor performance fermentativa, quando comparadas com leveduras que apresentam atividade invertase;
- Maior produção de etanol pelas células de levedura, por redução na quantidade de açúcar desviado da produção de etanol e direcionado à produção de compostos de reserva energética e proteção celular, e;
- Maior produção de etanol, por aumento no fluxo glicolítico para compensar o gasto de energia proveniente do transporte ativo da sacarose, que pode ser incrementado por alteração da via metabólica do açúcar.

Tais aspectos podem trazer benefícios significativos a toda cadeia produtiva e consumidora de etanol combustível, pois pequenos aumentos no rendimento industrial podem significar incremento na lucratividade do setor sucroalcooleiro e redução de custo ao consumidor.

3 OBJETIVOS

O presente trabalho tem por objetivo analisar e caracterizar a fermentação da sacarose por linhagens de *S. cerevisiae* engenhas na via de utilização desse açúcar. Especificamente:

- ***Analisar as enzimas e os transportadores envolvidos na metabolização da sacarose:*** Avaliar a presença e a expressão de genes que codificam para os transportadores de sacarose (genes *AGT1* e *MALx1*), bem como de glicosidases responsáveis pela hidrólise do dissacarídeo, invertase intra- e extracelular (genes *SUC*) e maltase (genes *MALx2*).
- ***Engenhar geneticamente leveduras:*** Construir fragmentos de DNA integrativos para que, por recombinação homóloga, os genes alvos desse estudo (*AGT1* e *SUC*) sejam modificados e/ou removidos do genoma de leveduras de laboratório.
- ***Analisar o envolvimento de vias de sinalização na metabolização da sacarose:*** Avaliar a participação da cascata de sinalização controlada por Adenosina Monofostato cíclica (AMPc) na expressão dos genes alvos do estudo, assim como a sua importância na metabolização da sacarose.
- ***Analisar fisiologicamente as leveduras estudadas:*** Avaliar parâmetros fisiológicos como: a velocidade específica de crescimento (μ_x), a velocidade específica de consumo do substrato ($\mu_{Glucose}$ e $\mu_{Sacarose}$), a velocidade específica de formação de etanol (μ_{Etanol}), o tempo de geração celular (t_g), o fator de conversão de substrato a células ($Y_{X/S}$) e o fator de conversão de substrato a etanol ($Y_{Etanol/S}$).
- ***Analisar a capacidade das leveduras em fermentar a sacarose:*** Avaliar a performance fermentativa das diferentes linhagens em meio de cultura contendo sacarose e em condições semelhantes às encontradas na fermentação industrial.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Linhagens analisadas

Todas as linhagens de levedura utilizadas nesse trabalho são pertencentes à família de *S. cerevisiae* denominada “CEN.PK” e apresentam característica genética haplóide. O genótipo relevante das linhagens é apresentado na Tabela 1.

Tabela 1 - Linhagens de *S. cerevisiae* utilizadas no estudo.

Linhagem	Tipo de Levedura	Genótipo relevante
CEN.PK113-7D ^a	padrão prototrófica	MATa <i>mal13 AGT1 MAL12 MAL2-8^c SUC2</i>
CEN.PK113-5D ^a	padrão ura ⁻	MATa <i>mal13 AGT1 MAL12 MAL2-8^c ura3-52 SUC2</i>
CEN.PK2-1C ^a	padrão ura ⁻ his ⁻ leu ⁻ trp ⁻	MATa <i>mal13 AGT1 MAL12 MAL2-8^c SUC2 ura3-52 his3Δ1 leu2-3,112 trp1-289</i>
MTY-01 ^b	<i>agt1Δ</i> ura ⁻	Isogênica a CEN.PK113-5D, mas <i>agt1Δ::Kan^R</i>
LCM003 ^c	<i>agt1Δ</i> ura ⁻ his ⁻ leu ⁻ trp ⁻	Isogênica a CEN.PK2-1C, mas <i>agt1Δ::Kan^R</i>
IMK-316 ^{b,g}	<i>suc2Δ</i> prototrófica	Isogênica a CEN.PK113-7D, mas <i>suc2Δ::Kan^R</i>
MGD-02 ^b	<i>suc2Δ</i> ura ⁻	Isogênica a CEN.PK113-5D, mas <i>suc2Δ::Kan^R</i>
MGD-01 ^d	<i>suc2Δ</i> ura ⁻ his ⁻ leu ⁻ trp ⁻	Isogênica a CEN.PK2-1C, mas <i>suc2 Δ::Kan^R</i>
BSY21-34B ^e	<i>iSUC2</i> ura ⁻	MATa <i>mal13 AGT1 MAL12 MAL2-8^c TRP1-pADH1::iSUC2 ura3-52 trp1-289</i>
IMI-056 ^f	<i>iSUC2</i> prototrófica	Isogênica a BSY21-34B, mas <i>ura3-52::URA3</i>
IMI-007 ^f	<i>iSUC2</i> prototrófica evoluída	Evoluída a partir da linhagem IMI-056

NOTA: ^a Entian e Kötter (1998);

^b Dário (2012);

^c Alves Jr. (2010);

^d Dário (2007);

^e Stambuk et al. (2011);

^f Basso et al. (2011).

^g Linhagem cedida pelo Laboratório de Engenharia Bioquímica da Universidade de São Paulo – LEB/UFSC.

FONTE: Dário (2012).

As leveduras pertencentes à família “CEN.PK” foram escolhidas para o desenvolvimento deste trabalho, porque são sugeridas como referência para estudos fisiológicos de *S. cerevisiae* (VAN DIJKEN et al., 2000). Além disso, apresentam grande homologia genética em relação à linhagem S288C, que foi utilizada no projeto de sequenciamento do genoma de *S. cerevisiae* (DARAN-LAPUJADE et al., 2003).

As leveduras padrão deste trabalho, CEN.PK113-7D, CEN.PK113-5D e CEN.PK2-1C, foram obtidas a partir de uma levedura ancestral em comum e apresentam mutações em genes que participam de etapas das rotas de biossíntese de aminoácidos e de bases nitrogenadas (VAN DIJKEN et al., 2000). Dessa forma, as linhagens padrão possuem

diferentes requerimentos auxotróficos. A levedura CEN.PK113-7D não requer suplementação de nutrientes no meio de cultura, pois apresenta a capacidade de sintetizar todos os aminoácidos e bases nitrogenadas necessários para o seu metabolismo, e por esse motivo, essa levedura é chamada de prototrófica. A levedura CEN.PK113-5D apresenta o alelo *ura3-52* por mutação na região que codifica o gene funcional *URA3*¹, tornando essa levedura incapaz de sintetizar uracila. Portanto, o crescimento dessa levedura somente é obtido quando o requerimento nutricional (uracila) é adicionado ao meio de cultivo. A levedura CEN.PK2-1C apresenta os alelos *ura3-52*; *his3Δ1*; *leu2-3,112* e *trp1-289* por mutações nas regiões que codificam os genes funcionais *URA3*, *HIS3*², *LEU2*³ e *TRP1*⁴, respectivamente. Esse genótipo reflete a incapacidade dessa levedura sintetizar uracila, histidina, leucina e triptofano. Portanto, o crescimento dessa levedura somente é obtido quando os quatro requerimentos nutricionais (uracila, histidina, leucina e triptofano) são adicionados ao meio de cultivo.

A linhagem CEN.PK113-5D foi utilizada neste trabalho como levedura padrão para se obter leveduras engenhas nos genes *SUC2* e *AGT1*, através da técnica denominada “engenharia genômica”. Os fragmentos de DNA, que formam esses genes, foram modificados diretamente nos cromossomos da levedura padrão por recombinação homóloga, dando origem às linhagens MGD-02 (*suc2Δ*) e MTY-01 (*agt1Δ*), conforme apresentado a seguir no item 4.14.1. Da mesma forma como realizado neste trabalho, Dário (2007) e Alves Jr. (2010) utilizaram a levedura CEN.PK2-1C como linhagem padrão, para obter, respectivamente, as linhagens MGD-01 (*suc2Δ*) e LCM003 (*agt1Δ*). A linhagem IMK-316 apresenta característica *suc2Δ* como as leveduras MGD-01 e MGD-02, porém trata-se de uma linhagem totalmente prototrófica.

¹ O gene *URA3* codifica a enzima orotidina-5-fosfato descarboxilase. Essa enzima catalisa a descarboxilação de orotidina-5-fosfato (OMP) para formar uridina-5-fosfato (UMP), sexto passo da biossíntese de uracila.

² O gene *HIS3* codifica a enzima Imidazol glicerol-fosfato desidratase. Essa enzima catalisa a conversão do D-eritro-1-(imidazol-4-il)glicerol 3-fosfato para 3-(imidazol-4-il)-2-oxopropil-fosfato, sexto passo na biossíntese de histidina.

³ O gene *LEU2* codifica a enzima β -isopropilmalate desidrogenase. Essa enzima catalisa a conversão do β -isopropilmalato para α -cetoisocaproato, terceiro passo na biossíntese de leucina.

⁴ O gene *TRP1* codifica a enzima fosforibosil-antranilato. Essa enzima catalisa a conversão do N-(5'-fosforibosil)-antranilato para 1-(2-carboxifenilamino)-1-deoxiribulose 5-fosfato, terceiro passo da biossíntese de triptofano.

A linhagem BSY21-34B (*iSUC2*), engenhada por Stambuk et al. (2011), foi obtida após uma série de cruzamentos e retro-cruzamentos, entre linhagens disponíveis no LBMBL/UFSC. Essa levedura apresenta a inserção da região promotora do gene *ADH1*⁵ (P_{ADH1}), para controlar a expressão do gene *SUC2*. A substituição da região promotora do gene *SUC2* tem como objetivo impedir a síntese da forma periplasmática da enzima invertase e aumentar a expressão da forma intracelular dessa enzima. Isso é esperado, pois a inserção do P_{ADH1} impede que os RNA mensageiros transcritos a partir do gene *SUC2* contenham a sequência de bases nitrogenadas que codificam ao peptídeo sinal (maiores detalhes no item 2.2), além do fato do P_{ADH1} responder fortemente a presença de glicose, aumentando a expressão do gene o qual esse promotor controla (DEMARINI; CARLIN; LIVI, 2001).

A linhagem IMI-056 (*iSUC2* prototrófica), engenhada por Basso (2011), foi obtida após reconstituir a funcionalidade do gene *URA3* na levedura BSY21-34B, inserindo-se o gene *URA3* no local do alelo *ura3-52* por recombinação homóloga. Esse mesmo autor, submeteu a levedura IMI-056 a cultivo contínuo em condição de anaerobiose e sob limitação de sacarose por cerca de 90 gerações, obtendo a linhagem IMM-007 (*iSUC2* prototrófica evoluída). Ambas linhagens possuem genótipo *iSUC2*, do mesmo modo que à levedura BSY21-34B, e dessa forma, apresentam aumento na expressão da forma intracelular e incapacidade de sintetizar a forma periplasmática da enzima invertase.

4.2 Meio de cultura e reagentes

Todos os reagentes utilizados, no trabalho desenvolvido no LBMBL/UFSC, foram de grau analítico (Sigma, St. Louis, MO, USA). Os meios de cultura líquidos (SHERMAN, 2005), descritos na Tabela 2, foram utilizados para a realização do trabalho após esterilização por filtração, utilizando sistema para filtração contendo membranas de nitrocelulose com 0,22 µm de porosidade (Millipore, Billerica, MA, USA). Os sistemas para filtração, os frascos e demais materiais utilizados no cultivo das células foram previamente esterilizados em autoclave a 120 °C por 15 min. Quando requerido, os meios sólidos foram preparados por adição de 2% de ágar aos meios descritos na Tabela 2, e nesse caso, os meios foram

⁵ O gene *ADH1* codifica para a enzima álcool desidrogenase. Essa enzima catalisa a redução de acetaldeído para formar etanol, último passo da rota fermentativa da glicólise.

esterilizados em autoclave a 120 °C por 15 min. Para obtenção de meio sólido seletivo contendo antibiótico, após a esterilização, os frascos foram incubados em estufa a 60 °C por 30 min. Após, uma quantia de 100 µg.mL⁻¹ de Geneticina (G418) foi adicionada aos frascos sob condições assépticas.

Tabela 2 - Composição dos meios de cultura utilizados no estudo.

Meio	Componentes (para 100 mL de meio)
Rico Completo (YP)	- 1 g de Extrato de Leveduras; - 2 g de Peptona; - 2 g de Fonte de Carbono (glicose, maltose, maltotriose ou sacarose); - Ajustar com solução de HCl para pH 5 = ± 0,1; - Água destilada q.s.p ^a 100 mL.
Sintético (SC)	- 0,67 g de <i>Yeast Nitrogen Base</i> ; - 2 g de Fonte de Carbono (glicose, maltose, maltotriose ou sacarose); - Ajustar com solução de HCl para pH = 5 ± 0,1; - Água destilada q.s.p 100 mL.
Sintético Drop-out ^b (SC ^{-Drop-out})	- 0,67 g de <i>Yeast Nitrogen Base</i> sem aminoácidos; - 2 g de Fonte de Carbono (glicose, maltose, maltotriose ou sacarose); - 0,192 g Uracila Drop-out ^c ; - Ajustar com solução de HCl para pH = 5 ± 0,1; - Água destilada q.s.p 100 mL.

NOTA: ^a quantidade suficiente para;

^b Contém todos os aminoácidos e bases nitrogenadas necessárias ao crescimento das células, exceto o nutriente que a levedura analisada é incapazes de sintetizar, por exemplo, o meio SCD^{-URA} não apresenta uracila na sua composição;

^c A quantidade colocada nos meios é variável conforme o requerimento auxotrófico.

FONTE: Dário (2012).

4.3 Preservação das linhagens

Para a realização dos procedimentos experimentais no LBMBL/UFSC, as células de levedura foram mantidas a 4 °C em tubos de vidro fechados por tampas com rosca, contendo o meio sólido inclinado de interesse, ou seja, meio YP para as células que não portavam plasmídeo ou meio SC^{-Drop-out} para as células que portavam plasmídeo. As células eram repicadas a cada 2 meses para novos tubos contendo meio sólido inclinado, do mesmo tipo que foi utilizado anteriormente.

Para o estoque das linhagens no LBMBL/UFSC, as células foram armazenadas em criotubos, contendo meio suplementado com 20% de glicerol, a -80 °C por tempo indeterminado. Os estoques das linhagens foram obtidos da seguinte forma: uma quantidade de células da linhagem de interesse, suficiente para preencher uma alça

bacteriológica, foi transferida sob condições assépticas da superfície de placas de Petri para tubos de ensaio que continham 3 mL de meio líquido YP contendo 2% de glicose, e em seguida, os tubos foram incubados sob agitação orbital em uma incubadora a 160 rpm (New Brunswick, Innova 44, Edison, New Jersey, USA) a 28 °C por 24 horas. Após, um volume de 500 µL da cultura foi transferido para criotubos estéreis que continham 500 µL de solução de glicerol 40% (p/v), perfazendo uma concentração final de 20% de glicerol. Os criotubos foram resfriados de forma gradual até a temperatura de -80 °C, mantendo-se os criotubos por 6 horas a 4 °C, em seguida a -20 °C por 2 horas e finalmente acondicionados em ultrafreezer a -80 °C. O congelamento gradual permite que as células sejam capazes de sintetizar proteínas importantes para a manutenção da sua viabilidade em temperaturas baixas (ISAAC; JENNINGS, 1995).

Quando se tornou necessário recuperar as células, os criotubos foram retirados do ultrafreezer, e sob condições assépticas, uma alça bacteriológica foi friccionada na cultura congelada, contida no criotubo. Utilizando técnica de esgotamento, para se obter colônias isoladas, estrias foram realizadas com alça bacteriológica na superfície de uma placa de Petri preenchida com meio sólido YP contendo 2% de glicose, sendo em seguida, as placas incubadas em estufa bacteriológica a 28 °C por 3 a 5 dias. As colônias isoladas obtidas foram coletadas da superfície da placa com auxílio de alça bacteriológica e inoculadas em tubos, na superfície de meio sólido inclinado YP contendo 2% de glicose. Os tubos foram incubados em estufa bacteriológica a 28 °C por 3 a 5 dias, e em seguida armazenados a 4 °C para utilização posterior das linhagens.

Para a realização dos procedimentos experimentais no LEB/USP, as linhagens CEN.PK113-5D e BSY21-34B, descritas no item 4.1, foram armazenadas em criotubos por tempo indeterminado a -80 °C. Os estoques das linhagens foram obtidos sob condições assépticas semelhantes às descritas anteriormente, porém, com alterações na forma de cultivo das células, utilizando-se balões de Erlenmeyer com chicanas e incubação das culturas a 30 °C sob agitação orbital de 200 rpm (New Brunswick, C24, Edison, New Jersey, USA).

4.4 Análises em quimiostato

Essa etapa do trabalho foi realizada em parceria com o grupo de trabalho do Prof. Dr. Andreas Karoly Gombert, do LEB/USP. O Dr. Thiago Olitta Basso participou ativamente dessa etapa do trabalho, sendo algumas análises realizadas na íntegra por esse pesquisador.

4.4.1 Meio de cultura

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico (Sigma). O meio sintético definido, descrito por Verduyn et al. (1992), foi utilizado nessa etapa do trabalho e apresenta em sua composição, por litro: 5 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 3 g de KH_2PO_4 e 0,5 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, suplementado com micronutrientes, vitaminas e fonte de carbono. Os micro-nutrientes apresentam a seguinte composição por litro: 15,00 mg de EDTA, 4,50 mg de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,30 mg de $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,84 mg de $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0,30 mg de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 4,50 mg de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 3,00 mg de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,40 mg de $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1,00 mg de H_3BO_3 e 0,10 mg de KI. As vitaminas apresentam a seguinte composição por litro: 0,05 mg de biotina, 1,00 mg de pantotenato de cálcio, 1,00 mg de ácido nicotínico, 25,00 mg de inositol, 1,00 mg de tiamina-HCl, 1,00 mg de piridoxina-HCl e 0,20 mg de ácido *p*-aminobenzoico. O meio de cultura foi suplementado com uracila a uma concentração final de $80 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, pois as leveduras analisadas apresentam genótipo *ura⁻*, conforme descrição realizada no item 4.1. A fonte de carbono utilizada, por litro, foi 10 g de glicose ou de sacarose nos cultivos em condição de aerobiose, e 25 g de glicose ou de sacarose nos cultivos em condição de anaerobiose total. Além disso, o meio utilizado nos cultivos em anaerobiose foi suplementado com $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ de ergosterol $\geq 75\%$ e $420 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ de Tween 80. Volumes de antiespumante à base de silicone foram adicionados aos meios de cultivo, $50 \mu\text{L} \cdot \text{L}^{-1}$ nos cultivos em aerobiose e $150 \mu\text{L} \cdot \text{L}^{-1}$ nos cultivos em anaerobiose.

As soluções de elementos traço, de vitaminas, de uracila e de sacarose foram esterilizadas por filtração com membrana de $0,22 \mu\text{m}$ (Millipore). Os demais componentes foram esterilizados em autoclave a 120°C por 15 min, exceto a solução de glicose que foi esterilizada em autoclave a 110°C por 20 min. Depois de esterilizadas, todas as soluções foram misturadas sob condições assépticas.

4.4.2 Cultivos contínuos

As culturas armazenadas em criotubos, conforme descrito no item 4.3, foram transferidas para balões de Erlenmeyers, com chicanas, que continham 1/5 do seu volume preenchido, com meio de cultura sintético definido contendo glicose como fonte de carbono, preparado como descrito no item 4.4.1, para gerar o inóculo utilizado nos cultivos contínuos. As células foram cultivadas a 30 °C sob agitação orbital de 200 rpm (New Brunswick) durante a noite. No dia seguinte, a absorbância da cultura foi determinada em espectrofotômetro (Beckman, DU-530, Fullerton, California, USA) com comprimento de onda a 600 nm. Um volume da cultura foi inoculado em biorreatores de bancada (New Brunswick, BIOFLO III, Edison, New Jersey, USA), preenchidos com 1 L de meio sintético definido contendo a fonte de carbono de interesse, descrito no item 4.4.1, de forma que o cultivo iniciasse com absorbância de 0,1.

Após inoculação das células, um cultivo descontínuo foi realizado, até a fonte de carbono disponível no biorreator exaurir, fato que foi identificado através da queda no percentual de CO₂ presente no gás de saída do biorreator. Água a 2 °C foi circulada constantemente pelo condensador de saída de gases, a partir de um Banho Maria termostatzado, para minimizar a perda de etanol e outros metabólitos, através do gás que era constantemente enviado a um analisador de gases, descrito no item 4.4.3.

Após o término do cultivo descontínuo, bombas peristálticas de precisão foram acionadas, para realizar continuamente a adição de meio de cultura estéril ao biorreator e a retirada de meio de cultura fermentado do sistema, iniciando-se assim, o cultivo contínuo. A bomba utilizada na adição de meio de cultura foi calibrada, para obter-se a vazão específica de 0,10 h⁻¹, enquanto que a retirada de meio do biorreator foi realizada por uma bomba continuamente ligada e conectada a um dreno, instalado em altura adequada no biorreator, que permitia manter continuamente 1 L de volume de trabalho no biorreator.

O pH dos cultivos foi constantemente mantido em 5,00 por adição controlada de uma solução 2 M de KOH estéril, através de uma bomba peristáltica e pelo monitoramento realizado por um eletrodo de pH submerso na cultura. A concentração de oxigênio dissolvido na cultura foi constantemente monitorada, por um eletrodo de oxigênio dissolvido (Mettler-Toledo, Columbus, OH, USA) submerso na cultura. A introdução de gases estéreis no biorreator foi mantida constante em 0,7 L.min⁻¹, por um controlador de fluxo mássico

(Brooks, 5876, Hatfield, PA, USA) e utilizando filtros com 0,22 μm de porosidade (Millipore), instalados no sistema. Também foram mantidas constantes, a temperatura em 30 °C e a agitação em 700 rpm. Nos cultivos realizados em aerobiose, o sistema foi equipado com mangueiras de silicone e conectores de polipropileno, e alimentado com ar comprimido, sendo que a concentração de oxigênio dissolvido permaneceu acima de 60% da saturação por todo o experimento, garantindo condição de plena aerobiose. Por outro lado, nos cultivos realizados em anaerobiose, o sistema foi alimentado com gás nitrogênio com 99,95% de pureza, e foi equipado com mangueiras de Norprene (Cole-Parmer, Vernon Hills, Illinois, USA) e conectores de Kynar (Cole-Parmer), para evitar a entrada de oxigênio no sistema. O frasco de alimentação, que armazenava o meio de cultura a ser bombeado ao biorreator, foi posicionado sobre um agitador magnético, para manter a homogeneidade do meio de cultura enviado ao biorreator. Quando os cultivos eram realizados em anaerobiose, o frasco de alimentação foi protegido da luz com material opaco, para evitar degradação do ergosterol, e também foi alimentado com gás nitrogênio durante todo o experimento a uma vazão de 0,5 L.min⁻¹, garantindo condição de anaerobiose total ao sistema.

Após 05 (cinco) tempos de residência ⁶, a obtenção do estado estacionário foi verificada, pela análise da produção de CO₂, conforme descrito no item 4.4.3, e pela concentração de biomassa celular na cultura, determinado conforme descrito no item 4.4.4. O estado estacionário foi definido como: a situação do cultivo em que ao menos 05 (cinco) tempos de residência tivessem passado, depois da última mudança nas condições do cultivo, e que, a biomassa celular e a produção de CO₂ permanecessem constantes (com variação menor do que 2%), durante os dois últimos tempos de residência.

Após atingir o estado estacionário, volumes da cultura foram coletados do biorreator, para quantificação da concentração residual do substrato limitante no meio de cultura, conforme descrito no item 4.4.5.

Além disso, para a obtenção de suspensões celulares, volumes da cultura foram coletados do biorreator e transferidos para tubos tipo Falcon, sendo os tubos centrifugados por 3 min a 5.000 g, e em seguida, a parte líquida (sobrenadante) da cultura foi desprezada. Água MilliQ a 4 °C foi adicionada aos tubos para fazer uma suspensão celular, e os tubos

⁶ O Tempo de residência é o período de tempo necessário para que o volume de meio contido no biorreator seja renovado. Os experimentos realizados com taxa de alimentação 0,1 h⁻¹, corresponde que a cada 10 h ocorre 1 (um) tempo de residência, ou seja, a renovação total do meio de cultura contido no biorreator.

foram centrifugados por 3 min a 5.000 *g*, desprezando-se a parte líquida (sobrenadante) após o término do tempo (passo repetido 2 x). Um volume de água MilliQ a 4 °C foi adicionado aos tubos, para obter-se suspensão celular na concentração de 20 ou $30 \pm 1 \text{ g.L}^{-1}$, dependendo do procedimento experimental a ser realizado. A suspensão celular foi utilizada para estimar a atividade de transporte de sacarose, conforme descrito no item 4.11.2, e a atividade de hidrólise pela invertase, conforme descrito no item 4.12.1.

Lâminas para microscopia foram preparadas com amostras a fresco retiradas dos cultivos e utilizadas para inspecionar a pureza dos cultivos, averiguando à presença de bactérias, com aumento de 400 vezes, em microscópio óptico (Leica, DM LS, Wetzlar, Germany) acoplado a uma câmera (Leica, DFC300 – FX) e através de um programa para computador (Leica, Qwin).

4.4.3 Análise de gases

O gás de saída do biorreator, captado através do condensador, foi direcionado a um recipiente contendo sílica gel, para reter a unidade presente no gás, antes de ser enviado ao analisador de gases (New Brunswick). A fração molar de O₂ no gás de saída foi determinada por um detector paramagnético (Beckman, 755, Brea, CA, USA), enquanto que a fração molar de CO₂ foi determinada com um detector infravermelho (Fuji eletric, 3300, Burlington, NJ, USA).

4.4.4 Quantificação de biomassa celular

Um sistema para filtração, acoplado a uma bomba de vácuo, foi montado com membranas de nitrocelulose, com porosidade de 0,45 μm (Millipore), previamente secas e pesadas. Volumes da cultura foram coletados do biorreator e filtrados através do sistema. O volume de amostra filtrado foi alterado, conforme a concentração de células na cultura, para que se obtivesse valores entre 25 e 50 mg de células secas nas membranas (OLSSON; NIELSEN, 1997). As membranas, contendo as células, foram lavadas 02 (três) vezes com água MilliQ e secas em forno de micro-ondas, numa potência de 180W por 15 min. Após a secagem, as membranas foram colocadas em dessecador contendo sílica gel por 10 minutos, para estabilização da temperatura. Em seguida, a massa de células foi determinada em

balança analítica e a concentração (em g.L⁻¹) calculada de acordo com o volume filtrado, empregando a equação 1. As determinações foram realizadas em duplicata e os valores apresentaram variação inferior a 3%.

$$X_{(g/L)} = [(m_{ma} - m_m) / V] \cdot 1000 \quad (1)$$

onde: m_{ma} = Massa da membrana, em gramas, contendo o filtrado, após secagem;

m_m = Massa da membrana seca, em gramas;

V = Volume filtrado em mL;

4.4.5 Quantificação de açúcares e metabólitos

A coleta de amostra, para a quantificação da concentração residual de açúcares no meio de cultura, foi realizada seguindo técnica descrita por Mashego et al. (2003). Com esse método, a amostra pode atingir rapidamente a temperatura de 1 °C , evitando que a pequena quantidade de substrato existente na amostra seja consumida pelo micro-organismo. O volume coletado foi rapidamente transferido para seringas, que continham em seu interior esferas de aço inoxidável (62 g, 4 mm de diâmetro) resfriadas a -20 °C previamente, e imediatamente filtrado, através de filtros com porosidade 0,22 µm, para tubos Eppendorf, que foram armazenados a -20 °C.

Os açúcares (sacarose, glicose e frutose) foram quantificados através de cromatografia líquida de troca aniônica (Dionex, DX-300, Sunnyvale, CA, USA), utilizando coluna Carbpak PA-1, detector de amperometria de pulso e 100 mM de NaOH como fase móvel a um fluxo de 0,9 mL.min⁻¹. Essas análises foram realizadas no laboratório do Prof. Dr. Luiz Carlos Basso da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz da Universidade de São Paulo (ESALQ/USP).

Os metabólitos (etanol e glicerol) foram quantificados através de cromatografia líquida, utilizando coluna de exclusão iônica (Biorad, Aminex HPX-87H, Hercules, CA, USA) a 60 °C e 8 mM de H₂SO₄ como fase móvel, a um fluxo de 0,6 mL.min⁻¹. Os metabólitos foram detectados através de refratômetro diferencial (Waters, 2414, Milford, MA, USA).

4.4.6 Determinação dos parâmetros fisiológicos

Os parâmetros fisiológicos das linhagens foram calculados a partir da fase estacionária de crescimento, conforme descrito por Schmidell et al. (2001).

4.5 Multiplicação de células para uso experimental

4.5.1 Pré-cultivo

As células das linhagens, mantidas em meio sólido inclinado como descrito no item 4.3, foram coletadas com auxílio de alça bacteriológica por raspagem da superfície do meio, sob condições assépticas. Uma quantidade de células suficiente para preencher a alça foi transferida para tubos de ensaio que continham 3 mL do meio líquido de interesse, preparados conforme descrito no item 4.2. Em seguida, os tubos foram incubados por 48 h em temperatura ambiente e sob agitação de 40 rpm em uma incubadora giratória para tubos (DIST, 431, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil).

4.5.2 Preparo de suspensão celular

A suspensão celular utilizada nos procedimentos experimentais foi obtida da seguinte forma: um volume de pré-cultivo, obtido conforme descrito no item 4.5.1, foi transferido sob condições assépticas para balões de Erlenmeyer, sem chicanas, que continham 1/5 do seu volume preenchido com meio líquido de interesse, preparado conforme descrito no item 4.2. O volume transferido (500 a 2000 μL) foi variável e dependente da concentração de biomassa celular presente no pré-cultivo, de modo que a concentração de células no início dos cultivos fosse semelhante em todos os experimentos (a descrição do método de determinação da concentração de biomassa celular está descrito no item 4.10.1). Os frascos foram incubados sob agitação orbital de 160 rpm a 28 °C (New Brunswick), até que as linhagens atingissem o final da fase de crescimento exponencial, entre a faixa de 1 a 1,5 g.L^{-1} de concentração de biomassa celular. Após atingir a concentração celular desejada, a cultura foi transferida para tubos tipo Falcon e os tubos foram centrifugados por 3 min a 5.000 g , e em seguida, a parte líquida (sobrenadante) da cultura foi desprezada. Água destilada a 4 °C

foi adicionada aos tubos para fazer uma suspensão celular, e os tubos foram centrifugados por 3 min a 5.000 *g*, desprezando-se a parte líquida (sobrenadante), repetindo-se esse passo 2x (duas vezes). Um volume de água destilada a 4 °C foi adicionado aos tubos para obter-se suspensão celular na concentração de $20 \pm 1 \text{ g.L}^{-1}$ ou $30 \pm 1 \text{ g.L}^{-1}$, dependendo do procedimento experimental a ser realizado.

4.6 Cultivo em micro-escala

A capacidade de crescimento das leveduras, em diferentes meios de cultura e em diferentes fontes de carbono, foi avaliada através de crescimento em micro-escala, utilizando placas de fundo plano contendo 96 poços (placas para *Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay* (ELISA)). O crescimento foi avaliado pela determinação de absorbância dos poços das placas, conforme o seguinte protocolo: um volume de 100 µL de pré-cultivo, obtido conforme descrito no item 4.5.1, foi transferido sob condições assépticas para tubos Eppendorf, que continham 900 µL de água destilada, perfazendo uma diluição de 10x (dez vezes) da cultura de células. Um volume de 10 µL da suspensão celular 10x diluída foi transferido para poços da placa para ELISA, e em seguida, um volume de 90 µL do meio de interesse (meio de cultura 1,1x concentrado) foi adicionado aos poços, perfazendo uma diluição final de 100x (cem vezes) da cultura de células e que o meio de cultura contivesse 2% da fonte de carbono. A seguir, as placas foram seladas com plástico transparente (PCR sealing tape) e incubadas em um leitor para placas (Tecan, Infinit M200, Grödig, Salzburg, Áustria), com leituras de absorbância a 570 nm sendo realizadas a cada 15 min, na temperatura de $29 \pm 1 \text{ °C}$, até as que células atingissem a fase estacionária de crescimento.

4.7 Análise de crescimento em frasco agitado

Um volume do pré-cultivo, obtido conforme descrito no item 4.5.1, foi transferido sob condições assépticas para balões de Erlenmeyers, e as células foram cultivadas sob as mesmas condições apresentadas no item 4.5.2. Os frascos foram incubados sob agitação orbital de 160 rpm a 28 °C, e volumes de 800 µL da cultura contida nos frascos foram coletados para amostragem, em intervalos de tempo variável, que permitissem obter o

maior número possível de amostras durante a fase exponencial de crescimento das linhagens. As amostras coletadas foram tratadas conforme descrito no item 4.9.

4.8 Análise de fermentação em frasco agitado

Entende-se por fermentação, no contexto deste trabalho, os ensaios realizados para avaliar o comportamento das leveduras, utilizando condições que permitissem simular, em laboratório, o processo de produção do etanol combustível brasileiro. Seguindo técnica descrita por Dário (2007), volumes iguais, de suspensão celular $20 \pm 1 \text{ g.L}^{-1}$ (obtida como descrito no item 4.5.2) e de meio YP 2x concentrado contendo 20 ou 40% de sacarose, foram misturados em balões de Erlenmeyers, no intuito de obter-se uma concentração final aproximada de 10 g.L^{-1} de células, 10 g.L^{-1} de extrato de leveduras, 20 g.L^{-1} de peptona e 100 ou 200 g.L^{-1} de sacarose. Os frascos foram incubados sob agitação orbital de 160 rpm a 28°C , e volumes de 800 μL , da cultura contida nos frascos, foram coletados para amostragem, em intervalos de tempo variável, que permitissem obter o perfil completo de metabolização da sacarose pelas linhagens analisadas. As amostras coletadas foram tratadas conforme descrito no item 4.9.

4.9 Processamento de amostras

Após cada tempo de coleta, um volume foi retirado, dos 800 μL coletados para amostragem, e utilizado para determinar a biomassa celular, conforme descrito no item 4.10.1. Em seguida, o volume restante das amostras foi centrifugado por 3 min a 5.000 g , e a parte líquida presente nos tubos (sobrenadante) foi coletada com auxílio de um pipetador. O volume obtido foi dividido em 2 (dois) tubos Eppendorf, (1) um destinado à quantificação de açúcares (sacarose, glicose e frutose), e outro (2) à quantificação de metabólitos (etanol e glicerol). Os tubos destinados à quantificação de açúcares foram incubados em Banho Maria a 100°C por 5 min, e em seguida, os tubos 1 e 2 foram armazenado em freezer -20°C , para posteriormente realizar a quantificação de açúcares e metabólitos, conforme descrito no item 4.10.

4.10 Quantificação de biomassa celular, açúcares e metabólitos

As quantificações foram realizadas através de métodos espectrofotométricos, utilizando espectrofotômetro (Beckman, DU-7, Fullerton, California, USA) e leitor de placas para ELISA (Tecan).

4.10.1 Quantificação de biomassa celular

A concentração de biomassa celular foi determinada por espectrofotometria em comprimento de onda a 570 nm empregando a equação 2.

$$C_{\text{Celular}} = \text{Abs}_{\text{Amostra}} \cdot D \cdot \text{FC} \quad (2)$$

onde: C_{Celular} = Concentração de biomassa celular na amostra em g.L^{-1} ;

$\text{Abs}_{\text{Amostra}}$ = Absorbância em 570 nm do tubo amostra;

D = Fator de diluição da amostra;

FC = Fator de conversão da absorbância, para massa seca em g.L^{-1} .

O Fator de conversão foi calculado pela razão entre a massa seca de células, determinada por análise gravimétrica, e a absorbância da cultura, determinada por espectrofotometria: um volume de pré-cultivo, obtido conforme descrito no item 4.5.1, foi transferido sob condições assépticas para balões de Erlenmeyers, e as células cultivadas sob as mesmas condições descritas no item 4.5.2, porém, por 12 horas e meio YP contendo 2% de glicose ou de sacarose. Após, as absorbâncias das culturas foram determinadas em espectrofotômetro (Beckman) em comprimento de onda a 570 nm, sendo aceitas leituras de absorbância entre 0,030 e 0,250. As amostras sofriam diluições conforme a necessidade, ajustando a leitura da amostra aos limites aceitos, para que não ocorressem distorções na determinação por ausência de linearidade entre a absorbância e a concentração celular. As amostras foram filtradas em membrana de nitrocelulose com 0,45 μm de porosidade (Millipore), previamente secas e pesadas. O volume de amostra filtrado foi alterado conforme a concentração de células na cultura, para se obter valores entre 25 e 50 mg de células secas nas membranas. As membranas contendo as células foram lavadas 02 (três)

vezes com água destilada e secas em forno de micro-ondas numa potência de 900W por 3 a 5 min, até as membranas atingirem peso constante. Após a secagem, as membranas foram colocadas em dessecador contendo sílica gel por 10 minutos para estabilizar a temperatura, e em seguida, a massa de células foi determinada em balança analítica e a concentração (em g.L^{-1}) calculada de acordo com o volume filtrado, empregando a equação 3.

$$X_{(g/L)} = [(m_{ma} - m_m) / V] \cdot 1000 \quad (3)$$

onde: m_{ma} = Massa, em gramas, da membrana contendo o filtrado após secagem;

m_m = Massa, em gramas, da membrana seca;

V = Volume filtrado em mL;

Os Fatores de Conversão, determinados empregando a equação 4, após cultivo das diferentes linhagens em diferentes fontes de carbono (glicose e sacarose), resultaram no valor médio de 0,27, que foi utilizado nos cálculos para a determinação da concentração celular.

$$FC = X_{(g/L)} / (Abs_{Amostra} \cdot D) \quad (4)$$

onde: FC = Fator de conversão da absorbância, para massa seca em g.L^{-1} ;

$X_{(g/L)}$ = Peso seco da massa de células em g.L^{-1} ;

$Abs_{Amostra}$ = Absorbância em 570 nm do tubo amostra;

D = Fator de diluição da amostra.

4.10.2 Quantificação de glicose

O princípio do método consiste na oxidação da glicose pela enzima glicose oxidase (GOD), produzindo ácido glicônico e peróxido de hidrogênio (reação 5). Em seguida, a enzima peroxidase (POD) catalisa a reação entre o peróxido de hidrogênio, a 4-aminoantipirina e o fenol, formando a quinonimina, que é um complexo químico de cor vermelha (reação 6). A intensidade de cor, medida em espectrofotômetro, é proporcional à concentração de glicose nas amostras.

A concentração de glicose foi determinada através de kit enzimático comercial, utilizado para diagnóstico *in vitro* de glicemia humana, seguindo as instruções do fabricante (BioTécnica, Varginha, Minas Gerais, Brasil): Em tubos Eppendorf, um volume de 10 µL de cada amostra, assim como de solução padrão de glicose 1 g.L⁻¹, foram incubados com 1 mL do reagente de cor (> 15000 U.L⁻¹ de glicose oxidase (GOD), > 1200 U.L⁻¹ de peroxidase (POD), 0,3 mM de 4-aminoantipirina, 10 mM de fenol e 182,42 mM de tampão fosfato pH = 7,0), por 10 min a 37 °C. Em seguida, a leitura de absorbância das amostras e do padrão de glicose foi realizada em espectrofotômetro (Beckman) com comprimento de onda a 505 nm. A concentração de glicose foi calculada através da proporção entre a absorbância apresentada pela amostra e a absorbância da solução padrão de glicose, através da equação 7.

$$C_{\text{Glicose}} = [(Abs_{\text{Amostra}} \cdot C_{\text{Padrão}}) / Abs_{\text{Padrão}}] \cdot D \quad (7)$$

onde: C_{Glicose} = Concentração de glicose na amostra em g.L⁻¹;

Abs_{Amostra} = Absorbância em 505 nm do tubo amostra;

$Abs_{\text{Padrão}}$ = Absorbância em 505 nm do tubo padrão de glicose;

$C_{\text{Padrão}}$ = Concentração de glicose no padrão (1 g.L⁻¹);

D = Fator de diluição da amostra.

4.10.3 Quantificação de sacarose

O princípio do método consiste em utilizar invertase comercial, para hidrolisar as moléculas de sacarose presentes nas amostras, produzindo glicose e frutose (reação 8). Em seguida, a glicose formada pode ser quantificada por método específico, conforme demonstrado no item 4.10.2. A intensidade de cor medida em espectrofotômetro é proporcional à concentração de glicose nas amostras, que por sua vez é proporcional à concentração de sacarose.

A concentração de sacarose foi determinada de forma indireta através de reação enzimática, utilizando protocolo adaptado de Holmes (1996): Em tubos Eppendorf, um volume de 20 µL de cada amostra foi incubado com 80 µL de solução 1 mg.mL⁻¹ de invertase em tampão CPB (0,05 M de ácido cítrico e 0,09 M de fosfato dibásico de sódio pH = 4,5), em Banho Maria a 37 °C por 30 minutos. Após, os tubos foram incubados em Banho Maria a 100 °C por 5 min e em seguida, esfriados em banho de gelo por 5 min. Em seguida, os tubos foram centrifugados por 3 min a 5.000 g e a parte líquida (sobrenadante) foi utilizada para quantificar a glicose formada, conforme protocolo descrito no item 4.10.2. A concentração de sacarose foi calculada através da concentração de glicose encontrada nas amostras, antes e depois da adição da solução de invertase, utilizando a equação 9.

$$C_{\text{Sacarose}} = \{ [((\text{Abs}_{\text{Amostra}} \cdot C_{\text{Padrão}}) / \text{Abs}_{\text{Padrão}}) \cdot 5 \cdot D] - C_{\text{Glicose}} \} \cdot 2 \quad (9)$$

onde: C_{Sacarose} = Concentração de sacarose na amostra em g.L⁻¹;

$\text{Abs}_{\text{Amostra}}$ = Absorbância em 505 nm do tubo amostra;

$\text{Abs}_{\text{Padrão}}$ = Absorbância em 505 nm do tubo padrão de glicose;

$C_{\text{Padrão}}$ = Concentração de glicose no padrão (1 g.L⁻¹);

5 = Fator de diluição da amostra após incubação com invertase (20 µL de amostra e 80 µL de solução de invertase);

D = Fator de diluição da amostra;

C_{Glicose} = Concentração de glicose em g.L⁻¹, determinada conforme item 4.10.2;

2 = Fator para conversão da concentração de glicose em sacarose.

4.10.4 Quantificação de frutose

O princípio do método consiste na reação de açúcares redutores – glicose e frutose – com o ácido dinitrosalicílico em meio alcalino para formar um complexo de cor púrpura-carmim (reação 10). A intensidade de cor formada é medida em espectrofotômetro, sendo

proporcional à concentração de açúcares redutores nas amostras. A concentração de frutose foi estimada pela diferença entre a concentração de glicose determinada previamente e a concentração total de açúcares redutores nas amostras.

A concentração de açúcares redutores foi determinada através de reação química, utilizando protocolo adaptado de Miller (1959): Em tubos Eppendorf, um volume de 50 μL de cada amostra e de calibradores (soluções padrão de glicose com 0,4 a 2 g.L^{-1}) foi incubado com 150 μL de reagente DNS (0,04 M de ácido 3,5-dinitrosalicílico, 0,5 M de NaOH, 0,7 M de tartarato de sódio e potássio e 0,02 M de fenol) em Banho Maria a 100 $^{\circ}\text{C}$ por 10 min, e em seguida, esfriados em banho de gelo por 5 min. Um volume de 800 μL de água destilada foi adicionado aos tubos e fez-se a determinação de absorbância das amostras e dos calibradores em espectrofotômetro (Beckman) com comprimento de onda a 540 nm. Curvas de calibração foram construídas, através de gráficos ($C_{\text{Cal.}}$) vs. ($\text{Abs}_{\text{Cal.}}$), ou seja, valores de concentração dos calibradores em g.L^{-1} ($C_{\text{Cal.}}$) em função da absorbância dos calibradores ($\text{Abs}_{\text{Cal.}}$), e utilizadas para a obtenção de regressões lineares. Os valores de absorbância das amostras foram empregados nas regressões lineares obtidas, permitindo calcular a concentração de açúcares redutores totais nas amostras. A concentração de frutose foi calculada pela diferença entre os valores de concentração de açúcares redutores, e os valores de concentração de glicose presentes nas amostras, utilizando a equação 11.

$$C_{\text{Frutose}} = [(b_1 \cdot \text{Abs}_{\text{Amostra}} + b_0) \cdot D] - C_{\text{Glicose}} \quad (11)$$

onde: C_{Frutose} = Concentração de frutose em g.L^{-1} ;

b_1 = Valor para o coeficiente angular, obtido a partir da regressão linear dos calibradores;

$\text{Abs}_{\text{Amostra}}$ = Absorbância em 540 nm do tubo amostra;

b_0 = Valor para o coeficiente linear, obtido a partir da regressão linear dos calibradores;

D = Fator de diluição da amostra;

C_{Glicose} = Concentração de glicose em g.L^{-1} , determinada conforme item 4.10.2;

4.10.5 Quantificação de etanol

O princípio do método consiste na oxidação do etanol pela enzima álcool oxidase (AOD) para formar acetaldeído e peróxido de hidrogênio (reação 12). O peróxido de hidrogênio formado reage com a 4-aminoantipirina e o fenol por ação da peroxidase (POD), formando um complexo químico de cor vermelha, quinonimina (reação 13). A intensidade de cor medida em espectrofotômetro é proporcional à concentração de etanol nas amostras.

A concentração de etanol foi determinada através de reação enzimática, utilizando protocolo descrito por Herberts (2006), que engloba adaptações realizadas nos protocolos descritos por Rodionov, Keppen e Sukhacheva (2002) e Salgado et al. (2000): Placas de fundo plano contendo 96 poços (placas para ELISA) foram mantidas sobre banho de gelo durante a transferência de volume das amostras à placa, para evitar a evaporação de etanol. Nos poços das placas, um volume de 10 µL de cada amostra e de calibradores (soluções padrão de etanol com 1 a 10 g.L⁻¹) foi incubado com 200 µL do reagente de cor (0,5 U.mL⁻¹ de álcool oxidase (AOD), 4 U.mL⁻¹ de peroxidase (POD), 14 mM de 4-aminoantipirina, 60 mM de fenol e 0,1 M de tampão fosfato pH = 7,5), por 1 hora a 37 °C. Em seguida, a leitura de absorbância das amostras e dos calibradores foi realizada em um leitor de placas para ELISA (Tecan) com comprimento de onda a 505 nm. Curvas de calibração foram construídas, através de gráficos (C_{Cal.}) vs. (Abs_{Cal.}), ou seja, valores de concentração dos calibradores em g.L⁻¹ (C_{Cal.}), em função da absorbância dos calibradores (Abs_{Cal.}), e utilizadas para a obtenção de regressões lineares. Os valores de absorbância das amostras foram empregados nas regressões lineares obtidas, permitindo calcular a concentração de etanol nas amostras, através da equação 14.

$$C_{\text{Etanol}} = (b_1 \cdot \text{Abs}_{\text{Amostra}} + b_0) \cdot D \quad (14)$$

onde: C_{Etanol} = Concentração de etanol em g.L⁻¹;

b₁ = Valor para o coeficiente angular, obtido a partir da regressão linear dos calibradores;

$Abs_{Amostra}$ = Absorbância em 505 nm do poço amostra;

b_0 = Valor para o coeficiente linear, obtido a partir da regressão linear dos calibradores;

D = Fator de diluição da amostra.

4.10.6 Quantificação de glicerol

O princípio do método consiste em formar glicerol-3-fosfato e adenosina difosfato (ADP), a partir de adenosina trifosfato (ATP) e do glicerol livre, pela ação da enzima glicerol quinase (reação 15). O glicerol-3-fosfato sofre ação da enzima glicerol-P-oxidase em presença de oxigênio, produzindo dihidroxiacetona-fosfato e peróxido de hidrogênio (reação 16). O peróxido de hidrogênio formado reage com a 4-aminoantipirina e o 4-clorofenol, por ação da Peroxidase (POD), formando um complexo químico de cor vermelha, quinonimina (reação 17). A intensidade de cor medida em espectrofotômetro é proporcional à concentração de glicerol nas amostras.

A concentração de glicerol foi determinada através de kit enzimático comercial, utilizado para diagnóstico *in vitro* de triglicérides humano, conforme adaptações às instruções do fabricante (BioTécnica): Em placas de fundo plano contendo 96 poços (placas para ELISA), um volume de 2 μL de cada amostra e de calibradores (soluções padrão de glicerol com 0,1 a 0,8 g.L^{-1}), foi incubado com 200 μL do reagente de cor ($> 1000 \text{ U.L}^{-1}$ de glicerolquinase, $> 1000 \text{ U.L}^{-1}$ de peroxidase, $> 2000 \text{ U.L}^{-1}$ de lipoproteína lípase, $> 5000 \text{ U.L}^{-1}$ de glicerol-3-fosfato oxidase, 2,7 mM de 4-clorofenol, 0,3 mM de 4-aminoantipirina, 2 mM de ATP e 50 mM de tampão pipes pH = 7,2), por 10 minutos a 37 °C. Em seguida, a leitura de absorbância das amostras e dos calibradores foi realizada em leitor de placas para ELISA (Tecan) com comprimento de onda a 505 nm. Curvas de calibração foram construídas através de gráficos ($C_{\text{Cal.}}$) vs. ($Abs_{\text{Cal.}}$), ou seja, valores de concentração dos calibradores em g.L^{-1} ($C_{\text{Cal.}}$), em função da absorbância dos calibradores ($Abs_{\text{Cal.}}$), e utilizadas para a obtenção

de regressões lineares. Os valores de absorbância das amostras foram empregados nas regressões lineares obtidas, permitindo calcular a concentração de glicerol nas amostras, através da equação 18.

$$C_{\text{Glicerol}} = (b_1 \cdot \text{Abs}_{\text{Amostra}} + b_0) \cdot D \quad (18)$$

onde: C_{Glicerol} = Concentração de glicerol em g.L^{-1} ;

b_1 = Valor para o coeficiente angular, obtido a partir da regressão linear dos calibradores;

$\text{Abs}_{\text{Amostra}}$ = Absorbância em 505 nm do poço amostra;

b_0 = Valor para o coeficiente linear, obtido a partir da regressão linear dos calibradores;

D = Fator de diluição da amostra.

4.11 Determinação da atividade de transporte

4.11.1 Transporte de *p*-nitrofenil- α -D-glucopiranosídeo

O princípio do método baseia-se na utilização do *p*-nitrofenil- α -D-glucopiranosídeo (*p*NP α G), substrato sintético estruturalmente análogo à maltose, para avaliar a capacidade das leveduras em transportar açúcares. Em *S. cerevisiae*, esse substrato é transportado com alta afinidade pelo transportador Agt1p, e a seguir é hidrolisado por α -glicosidases. A liberação do *p*-nitrofenol, composto químico de cor amarela, permite estimar a atividade de transporte, através da intensidade de cor medida em espectrofotômetro.

A atividade de transporte nas linhagens analisadas foi avaliada com células intactas, conforme descrito por Hollatz e Stambuk (2001): Suspensões celulares das linhagens foram preparadas em água destilada na concentração de $20 \pm 1 \text{ g.L}^{-1}$, conforme descrito no item 4.5.2. Volumes de 100 μL das suspensões celulares foram transferidos para cinco (05) tubos Eppendorf, no intuito de fazer células amostras em triplicata e células controles em duplicata. As células controle foram preparadas, incubando os tubos em Banho Maria a 100 °C por 10 min. Um volume de 100 μL de Reagente 1 (10 mM de *p*NP α G e 100 mM de tampão succinato-TRIS pH = 5,0) foi adicionado a cada tubo, e após homogeneização, os tubos foram

incubados em temperatura ambiente, por 5 min quando as células testadas continham o gene *AGT1* no seu genoma, ou por 10 min quando as células testadas não continham o gene. Um volume de 1 mL de Reagente 2 (2 M de bicarbonato de sódio) foi adicionado aos tubos, rapidamente após o término do tempo. Os tubos foram centrifugados por 3 min a 12.000 *g*, e em seguida, um volume de 800 µL da parte líquida (sobrenadante) foi coletado com auxílio de um pipetador, e a leitura de absorbância das amostras e dos controles foi realizada em espectrofotômetro (Beckman) com comprimento de onda a 400 nm. A atividade de transporte foi calculada em função da concentração de *p*-nitrofenol formado por minuto e por miligrama de células, através da equação 19.

$$V_{\text{Trans. } p\text{NF}\alpha\text{G}} = (\text{Abs}_{\text{Amostra}} - \text{Abs}_{\text{MControle}}) \cdot 1000 / (t \cdot X \cdot \Delta\epsilon) \quad (19)$$

onde: $V_{\text{Trans. } p\text{NF}\alpha\text{G}}$ = Atividade de transporte em nmoles . mg⁻¹ . min⁻¹;

$\text{Abs}_{\text{Amostra}}$ = Absorbância em 400 nm do tubo amostra;

$\text{Abs}_{\text{MControle}}$ = Absorbância média em 400 nm dos tubos controle;

t = Tempo em minutos;

X = Concentração de biomassa celular, em 100 µL nos tubos, em mg;

$\Delta\epsilon$ = Coeficiente de Absortividade Molar (14,8 mM⁻¹ . cm⁻¹, em pH > 9,0).

4.11.2 Transporte de [U-¹⁴C]-sacarose

O princípio do método baseia-se na utilização de carboidratos que possuem radioisótopo na formação do seu esqueleto carbônico (p. ex.: [U-¹⁴C]-sacarose). Após transporte dos açúcares, através da membrana para o interior das células, a intensidade de radioatividade contida nas amostras permite estimar a atividade de transporte das leveduras.

A atividade de transporte foi avaliada com células intactas e utilizando [U-¹⁴C]-sacarose (Amersham Biosciences, UK) como substrato, conforme protocolo adaptado de Stambuk et al. (1998): Suspensões celulares das linhagens foram preparadas em água destilada na concentração de 30 ± 1 g.L⁻¹, conforme descrito no item 4.5.2. Um volume de 36 µL das suspensões celulares foi transferido para três (03) tubos Eppendorf, no intuito de fazer células amostras em triplicata. Em seguida, um volume de 36 µL de Reagente 1 (100

mM de tampão succinato-TRIS pH = 5,0) foi adicionado a cada tubo, sendo após homogeneização, os tubos incubados em Banho Maria a 30 °C por 3 min. Um sistema para filtração, acoplado a uma bomba de vácuo, foi montado com membranas de nitrocelulose de 2,5 cm de diâmetro e com porosidade de 0,45 µm (Millipore). As membranas de nitrocelulose foram previamente incubadas, em temperatura ambiente, em uma solução de sacarose 30%, para reduzir a adsorção de açúcar radioativo nas membranas. Um volume de 18 µL de Reagente 2 (100 mM de [U-¹⁴C]-sacarose, 50mM de glicose e 50mM de frutose) foi adicionado a cada tubo, e após homogeneização, os tubos foram incubados em Banho Maria a 30 °C. A concentração utilizada de 100 mM de [U-¹⁴C]-sacarose era equivalente a, aproximadamente, 40.000 cpm.µL⁻¹ ou 0,0187 µCi.µL⁻¹. A utilização de glicose e frutose não radioativas, no preparo do Reagente 2, teve por intuito minimizar a provável captação de [U-¹⁴C]-glicose e [U-¹⁴C]-frutose pelas células, gerados pela hidrólise extracelular da [U-¹⁴C]-sacarose. Um volume de 25 µL foi coletado dos tubos, após 20, 60 e 100 segundos de incubação, e foi rapidamente filtrado através do sistema de filtração. Um volume de 5 mL de água destilada a 4 °C foi adicionado ao sistema de filtração, para lavar as células e as membranas de nitrocelulose, e em seguida, as membranas contendo as células foram cuidadosamente retiradas do sistema de filtração e transferidas para frascos de borosilicato contendo 10 mL de líquido de cintilação. Os frascos de borosilicato foram deixados em repouso de 10 horas, em local escuro a temperatura ambiente, e em seguida, a radioatividade contida nos frascos foi quantificada em um contador de radioatividade (Packard, C1600 TR, USA). Frascos de borosilicato contendo 10 mL de líquido de cintilação e 1 µL de [U-¹⁴C] sacarose foram também analisados. Curvas de calibração foram construídas, através de gráficos (Rad.CPM) vs. (t_s) , ou seja, (Rad.CPM) valores de radioatividade das amostras em cpm (contagens por minuto), em função do tempo em segundos (t_s), e utilizadas para a obtenção de regressões lineares. A atividade de transporte foi calculada em função da radioatividade contida nas amostras, por minuto e por miligrama de células, através da equação 20.

$$V_{\text{Trans. [14C]-sacarose}} = [(b_1 \cdot \text{Cpm}_{\text{Padrão}}) / X] \cdot 60 \quad 20$$

onde: $V_{\text{Trans. [14C]-sacarose}}$ = Atividade de transporte em nmoles . mg⁻¹ . min⁻¹;

b_1 = Valor para o coeficiente angular, obtido a partir da regressão linear das amostras coletadas;

$Cpm_{Padrão}$ = Valor de cpm contido em 1 μ L de $[U-^{14}C]$ sacarose;

60 = Conversão de tempo em segundos para minutos;

X = Concentração de biomassa celular, em 25 μ L de amostra, em mg.

4.11.3 Co-transporte de açúcar/ H^+

O princípio do método baseia-se em monitorar o pH de uma suspensão celular, durante a captação de açúcares, para avaliar a capacidade de transporte das leveduras. Em *S. cerevisiae*, os dissacarídeos e trissacarídeos são captados, para o interior das células, de forma ativa pelo co-transporte com H^+ . Após a adição de diferentes concentrações de carboidratos é possível registrar a alcalinização gerada em uma suspensão celular, devido o transporte das moléculas de açúcar para dentro das células, juntamente com o próton. A variação de pH é registrada com auxílio de um pHmetro de alta sensibilidade, e utilizada para estimar a atividade de transporte dos carboidratos.

A atividade de transporte, nas linhagens analisadas, foi avaliada através do monitoramento do pH de uma suspensão de células intactas, e utilizando como substratos a maltose, sacarose, maltotriose, trealose e α -metil-glicosídeo, conforme protocolo descrito por Stambuk (2000) e Stambuk e De Araújo (2001): Suspensões celulares das linhagens foram preparadas em água destilada na concentração de $30 \pm 1 \text{ g.L}^{-1}$, conforme descrito no item 4.5.2. Um sistema foi montado, para monitorar as alterações de pH provocadas pela adição de açúcares na suspensão celular. Para isso, um eletrodo de pH, acoplado a um pHmetro de alta sensibilidade (Radiometer, PHM84, Copenhagen, Denmark) e a um registrador gráfico (Radiometer, TT1 Servograph, Copenhagen, Denmark), foi posicionado dentro de um recipiente, que permitiu o controle de temperatura pela circulação de água a partir de um Banho Maria termostatizado a 30 °C. Um volume de 1.500 μ L das suspensões celulares, e o volume de água destilada necessário para perfazer a concentração final desejada de açúcar, apresentada na Tabela 3, foram incubados no recipiente termostatizado por 60 segundos e sob agitação constante, por auxílio de um agitador magnético. Em seguida, volumes de 20 μ L de 5 mM de ácido clorídrico (HCl) foram adicionados ao recipiente termostatizado a cada 15 segundos, e a variação de pH foi analisada através do registrador gráfico. A adição de HCl foi

realizada 3 a 5 vezes, conforme a necessidade, de modo que a suspensão celular alcançasse pH próximo a 5,00. Após, o volume de Solução de Carboidrato (1,50 M de Carboidrato pH $\approx$ 5,00) foi adicionado ao recipiente termostatizado, conforme a concentração final desejada de açúcar que foi definida previamente com auxílio na Tabela 3. A variação de pH da suspensão celular de cada experimento, exemplificado pela Figura 5, foi utilizada para o cálculo da atividade de transporte, expressa em função da concentração de açúcar transportado, por minuto e por miligrama de células, correlacionando a variação de pH causada à suspensão celular, por adição de concentrações conhecidas de H^+ e de açúcar, através da equação 21. Para o cálculo da atividade de transporte, a curva de pH obtida foi analisada a partir da inclinação nos primeiros 10 segundos.

Tabela 3 - Volume da solução 1,5 M de açúcar, e de água destilada, transferidos ao recipiente termostatizado para perfazer a concentração final desejada de açúcar, no ensaio de co-transporte açúcar/ H^+ .

C Açúcar Final (mM) ^a	1	5	10	20	50	75	100	150
água destilada (μL)	1438,0	1430,0	1420,0	1400,0	1340,0	1290,0	1240,0	1140,0
solução 1,5 M de açúcar (μL)	2,0	10,0	20,0	40,0	100,0	150,0	200,0	300,0

NOTA: ^a Concentração final aproximada.

FONTE: Dário (2012).

$$V_{\text{Carboidrato}/H^+} = (C_{\text{HCl}} \cdot h_{\text{pico açúcar}} \cdot \ell_{\text{tempo}} \cdot 60) / (\Delta p\text{H}_{\text{HCl Média}} \cdot t_s \cdot \ell_{\text{pico açúcar}} \cdot X) \quad (21)$$

onde: $V_{\text{Carboidrato}/H^+}$ = Atividade de transporte em nmoles . mg⁻¹ . min⁻¹;

C_{HCl} = Concentração de H^+ , em nmoles, no volume de HCl adicionado à suspensão celular;

$h_{\text{pico açúcar}}$ = Altura, em cm, do pico produzido pela adição de açúcar;

ℓ_{tempo} = Equivalência, em cm, do tempo em segundos;

60 = Conversão do tempo, de segundos para minutos;

$\Delta p\text{H}_{\text{HCl Média}}$ = Variação média de pH, em cm, produzida pela adição de HCl à suspensão celular;

t_s = Tempo em segundos, utilizado para a obtenção de valor de ℓ_{tempo} ;

$\ell_{\text{pico açúcar}}$ = Largura, em cm, do pico produzido pela adição de açúcar;

X = Concentração de biomassa celular, em mg, contida no volume de 1.500 μL.

Figura 5 - Gráfico representativo dos resultados obtidos pela técnica de registro de pH.

NOTA: A linha ondulada contínua (azul) representa o registro de pH obtido durante todo o experimento. As linhas pontilhadas representam as linhas base do registro de pH, utilizadas para os cálculos de variação do pH da suspensão celular. As setas A_{HCl} indicam a adição de HCl, enquanto que a seta $A_{a\acute{c}u\acute{c}ar}$ indica adição de açúcar à suspensão celular. O ΔpH_{HCl} representa a variação de pH causada na suspensão celular, após a adição da concentração conhecida de H^+ . Vide a legenda da equação 21 para o detalhamento dos demais símbolos apresentados na figura.

FONTE: Dário (2012).

4.12 Determinações enzimáticas

4.12.1 Determinação de atividade da invertase

O princípio do método baseia-se na capacidade da invertase em hidrolisar a sacarose. Em *S. cerevisiae*, sabe-se da existência de duas formas dessa enzima, uma extracelular (periplasmática) e outra intracelular (citoplasmática), que possuem pH ótimo $\approx 5,0$.

4.12.1.1 Invertase extracelular

A atividade de hidrólise da forma extracelular foi avaliada utilizando células intactas, previamente tratadas com fluoreto de sódio (inibidor da enolase, enzima da via glicolítica), e sacarose como substrato, e quantificando a glicose formada para o cálculo da atividade de hidrólise, conforme protocolo adaptado de Silveira, Carvajal e Bon (1996): Suspensões celulares das linhagens foram preparadas com água destilada na concentração $20 \pm 1 \text{ g.L}^{-1}$. Volumes de 100 μL das suspensões celulares foram transferidos para cinco (05) tubos Eppendorf, no intuito de fazer células amostras em triplicata e células controles em duplicata. As células controle foram preparadas incubando os tubos em Banho Maria a 100 °C por 10 min. Um volume de 100 μL de Reagente 1 (150 mM de fluoreto de sódio em tampão 150 mM succinato-TRIS pH = 5,0) foi adicionado a cada tubo, e após homogeneização, os tubos foram incubados em Banho Maria a 30 °C por 30 min. Em seguida, um volume de 100 μL de Reagente 2 (300 mM de sacarose) foi adicionado aos tubos, e em seguida, os tubos foram rapidamente incubados em Banho Maria a 30 °C por 5 min. Após o término do tempo, os tubos foram rapidamente incubados por 10 min a 100 °C, e em seguida, esfriados em banho de gelo por 5 min. Os tubos foram centrifugados por 3 min a 5.000 g e a parte líquida (sobrenadante) foi utilizada para quantificar a glicose formada, conforme protocolo descrito no item 4.10.2. A atividade de hidrólise foi calculada através da concentração de glicose formada, por minuto e por miligrama de células, através da equação 22. Os valores de atividade foram expressos, pela diferença entre o valor médio de atividade das amostras, analisadas em triplicata, e o valor médio de atividade das células controle, analisadas em duplicata.

$$V_{\text{Inv. Extra.}} = (\text{Abs}_{\text{Amostra}} \cdot 1665) / (\text{Abs}_{\text{Padrão}} \cdot X \cdot t) \quad (22)$$

onde: $V_{\text{Inv. Extra.}}$ = Atividade de hidrólise em $\text{nmoles} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$;

$\text{Abs}_{\text{Amostra}}$ = Absorbância em 505 nm do tubo amostra;

$\text{Abs}_{\text{Padrão}}$ = Absorbância em 505 nm do tubo padrão de glicose;

X = Concentração de biomassa celular, em mg, contida em 100 μL nos tubos;

t = Tempo, em minutos, de reação.

4.12.1.2 Invertase total

A atividade total de hidrólise da invertase nas linhagens, que compreende a atividade das formas intra e extracelular, foi avaliada utilizando células permeabilizadas, com tolueno, etanol e triton X-100, e sacarose como substrato. Foi quantificada a glicose formada, para o cálculo da atividade de hidrólise, conforme protocolo adaptado de Stambuk et al. (1999): Suspensões celulares das linhagens foram preparadas com água destilada na concentração de $20 \pm 1 \text{ g.L}^{-1}$. Um volume de 100 μL da suspensão celular foi transferido para um (01) tubo Eppendorf, centrifugado por 3 min a 5.000 g e a parte líquida desprezada. Um volume de 500 μL de Tampão A (tampão 50mM MOPS-NaOH pH = 6,8) foi adicionado ao tubo, e após homogeneização, o tubo foi centrifugado por 3 min a 5.000 g e a parte líquida desprezada. Volumes de 200 μL , de Tampão B (20% de glicerol, 1mM de EDTA, 1mM de DTT e tampão 50mM MOPS-NaOH pH = 6,8) e de 12 μL , de Tampão C (tolueno P.A., etanol P.A. e triton X-100 10% em água, na proporção 1:4:1 – v:v:v) foram adicionados ao tubo, e após homogeneização por 1 minuto em agitador tipo Vortex, o tubo foi centrifugado por 3 min a 5.000 g , e a parte líquida desprezada. Um volume de 1 mL de Tampão B foi adicionado ao tubo, e após homogeneização, o tubo foi centrifugado por 3 min a 5.000 g e a parte líquida desprezada (passo realizado 2x). Em seguida, um volume de 1 mL de Tampão A foi adicionado ao tubo, para formar uma suspensão de células permeabilizadas. Volumes de 50 μL , das suspensões de células permeabilizadas, foram transferidos para cinco (05) tubos Eppendorf, no intuito de fazer células amostras em triplicata e células controles em duplicata. As células permeabilizadas controle foram preparadas incubando os tubos em Banho Maria a 100 °C por 10 min. Um volume de 50 μL de Tampão Carboidrato (200mM de sacarose em tampão 300mM succinato-TRIS pH = 5,0) foi adicionado a cada tubo, e após homogeneização, os tubos foram incubados em Banho Maria a 30 °C por 5 min. Após o término do tempo, os tubos foram rapidamente incubados em Banho Maria a 100 °C por 10 min, e em seguida, esfriados em banho de gelo por 5 min. Os tubos foram centrifugados por 3 min a 5.000 g e a parte líquida (sobrenadante) foi utilizada para quantificar a glicose formada, conforme protocolo descrito no item 4.10.2. A atividade de hidrólise foi calculada em função da concentração de glicose formada, por minuto e por miligrama de células permeabilizadas, através da equação 23. Os valores de atividade foram expressos pela diferença entre o valor médio de atividade das amostras, analisadas em triplicata, e o valor médio de atividade das células controle, analisadas em duplicata.

$$V_{\text{Inv. Total}} = (\text{Abs}_{\text{Amostra}} \cdot 555) / (\text{Abs}_{\text{Padrão}} \cdot X \cdot t) \quad (23)$$

onde: $V_{\text{Inv. Total}}$ = Atividade de hidrólise em nmoles . mg^{-1} . min^{-1} ;

$\text{Abs}_{\text{Amostra}}$ = Absorbância em 505 nm do tubo amostra;

$\text{Abs}_{\text{Padrão}}$ = Absorbância em 505 nm do tubo padrão de glicose;

X = Concentração de biomassa celular, em mg, contida em 50 μL nos tubos;

t = Tempo, em minutos, de reação.

4.12.2 Determinação de atividade da maltase

O princípio do método baseia-se na capacidade da maltase em hidrolisar oligossacarídeos como maltose e sacarose (que são formados por glicose ligada em ligação α a outro monossacarídeo) ou substratos sintéticos como o *p*NP α G (que são formados por glicose ligada a um grupo fenólico, através de ligação osídica em conformação " α "). Em *S. cerevisiae*, a maltase é uma enzima intracelular (citoplasmática), que possui pH ótimo próximo de 6,8. Há relatos da existência de outros tipos α -glicosidase (TESTE; FRANÇOIS; PARROU, 2010), porém não se tem muito conhecimento sobre as características dos demais tipos dessa enzima.

A atividade de hidrólise da maltase foi avaliada utilizando-se células permeabilizadas com tolueno, etanol e triton X-100, e maltose, sacarose e *p*NP α G como substratos. Para calcular a atividade de hidrólise, foram quantificados a glicose formada, no caso de utilização de carboidratos, e o *p*-nitrofenol formado, no caso de utilização do substrato sintético, conforme protocolo adaptado de Stambuk et al. (1999): Suspensões celulares das linhagens foram preparadas com água na concentração de $20 \pm 1 \text{ g.L}^{-1}$. Um volume de 100 μL da suspensão celular foi transferido para um (01) tubo Eppendorf, centrifugado por 3 min a 5.000 *g* e a parte líquida desprezada. Um volume de 500 μL de Tampão A (tampão 100mM MOPS-NaOH pH = 6,8) foi adicionado ao tubo, e após homogeneização, o tubo foi centrifugado por 3 min a 5.000 *g* e a parte líquida desprezada. Volumes de 200 μL , de Tampão B (20% de glicerol, 1mM de EDTA, 1mM de DTT e tampão 100mM MOPS-NaOH pH = 6,8) e de 12 μL , de Tampão C (tolueno P.A., etanol P.A. e triton X-100 10% em água, na proporção 1:4:1 – v:v:v) foram adicionados ao tubo, e após homogeneização por 1 minuto em agitador tipo Vortex, o tubo foi centrifugado por 3 min a 5.000 *g*, e a parte líquida

desprezada. Um volume de 1 mL de Tampão B foi adicionado ao tubo, e após homogeneização, o tubo foi centrifugado por 3 min a 5.000 *g* e a parte líquida desprezada (passo realizado 2x). Em seguida, um volume de 1 mL de Tampão A foi adicionado ao tubo, para formar uma suspensão de células permeabilizadas. Volumes de 50 μ L, das suspensões de células permeabilizadas, foram transferidos para cinco (05) tubos Eppendorf, no intuito de fazer células amostras em triplicata e células controles em duplicata. As células permeabilizadas controle foram preparadas, incubando os tubos em Banho Maria a 100 °C por 10 min. Foi adicionado a cada tubo, um volume de 50 μ L de Tampão Carboidrato (200mM de maltose ou de sacarose em tampão 100mM MOPS-NaOH pH = 6,8), ou, um volume de 950 μ L de Tampão Sintético (2 mM de *p*NP α G e tampão 100mM MOPS-NaOH pH = 6,8). Nas análises com Tampão Carboidrato, os tubos foram incubados em Banho Maria a 30 °C por 5 min, enquanto que nas análises com Tampão Sintético, os tubos foram incubados em Banho Maria a 30 °C por 1 min. Após o término do tempo, os tubos foram rapidamente incubados em Banho Maria a 100 °C por 10 min, e em seguida, esfriados em banho de gelo por 5 min. Os tubos foram centrifugados por 3 min a 5.000 *g*, e nas análises com Tampão Carboidrato, a parte líquida (sobrenadante) foi utilizada para quantificar a glicose formada (conforme protocolo descrito no item 4.10.2), enquanto que nas análises com Tampão Sintético, um volume de 800 μ L da parte líquida foi coletada, com auxílio de um pipetador, e a leitura de absorbância, das amostras e dos controles, foi realizada em espectrofotômetro com comprimento de onda a 400 nm. Nas análises com Tampão Carboidrato, a atividade de hidrólise foi calculada em função da concentração de glicose formada, por minuto e por miligrama de células permeabilizadas (através da equação 24), enquanto que nas análises com Tampão Sintético, a atividade de transporte foi calculada em função da concentração de *p*-nitrofenol formado, por minuto e por miligrama de células permeabilizadas (através da equação 25). Os valores de atividade foram expressos pela diferença, entre o valor médio de atividade das amostras, analisadas em triplicata, e o valor médio de atividade das células controle, analisadas em duplicata.

$$V_{\text{Maltase Total Carboidrato}} = (\text{Abs}_{\text{Amostra}} \cdot 555) / (\text{Abs}_{\text{Padrão}} \cdot X \cdot t) \quad (24)$$

onde: $V_{\text{Maltase Total Carboidrato}}$ = Atividade de hidrólise em nmoles $\cdot$ mg⁻¹ $\cdot$ min⁻¹;

$\text{Abs}_{\text{Amostra}}$ = Absorbância em 505 nm do tubo amostra;

$Abs_{Padrão}$ = Absorbância em 505 nm do tubo padrão de glicose;

X = Concentração de biomassa celular, em mg, contida em 50 μ L nos tubos;

t = Tempo, em minutos, de reação.

$$V_{\text{Maltase Total pNF}\alpha\text{G}} = [(Abs_{\text{Amostra}} - Abs_{\text{Controle}}) \cdot 1000] / (t \cdot X \cdot \Delta\epsilon) \quad (25)$$

onde: $V_{\text{Maltase Total pNF}\alpha\text{G}}$ = Atividade de hidrólise em nmoles $\cdot$ mg⁻¹ $\cdot$ min⁻¹;

Abs_{Amostra} = Absorbância em 400 nm do tubo amostra;

Abs_{Controle} = Absorbância em 400 nm do tubo controle;

t = Tempo, em minutos, de reação;

X = Concentração de biomassa celular, em mg, contida em 100 μ L nos tubos;

$\Delta\epsilon$ = Coeficiente de Absortividade Molar (7,28 mM⁻¹ $\cdot$ cm⁻¹, em pH > 6,8).

4.13 Determinação dos parâmetros fisiológicos

Os parâmetros fisiológicos das linhagens foram calculados na fase de crescimento exponencial, conforme descrito por Schmidell et al. (2001). Inicialmente, as fases de crescimento das linhagens foram identificadas a partir de gráficos ($\ln X$) vs. (t), ou seja, valores do logaritmo neperiano da concentração celular ($\ln X$) em função do tempo (t). Depois de determinar o período correspondente à fase exponencial, o melhor coeficiente de correlação foi obtido a partir de quatro (04) amostras coletadas durante a fase exponencial, e o módulo dos valores dos coeficientes angulares das regressões lineares de ($\ln X$) vs. (t) revelaram os valores de μ_x . Os valores foram expressos em h⁻¹.

O tempo de geração (t_g) das linhagens foi obtido pela razão entre o valor do logaritmo neperiano de 2 e o valor de μ_x apresentado pela respectiva linhagem, conforme equação 26. Os valores foram expressos em h.

$$t_g = \ln 2 / \mu_x \quad (26)$$

Para a obtenção do fator de conversão de substrato a células das linhagens ($Y_{x/s}$) foram traçados gráficos [X] vs. [Substrato], ou seja, valores da concentração de células em função da concentração de substrato, das amostras coletadas durante o período

correspondente à fase exponencial. Assim, o módulo dos coeficientes angulares das regressões lineares revelaram o $Y_{x/s}^{EXP}$. Os valores foram expressos em $gDW \cdot g_{substrato}^{-1}$.

Supondo que a velocidade específica de consumo de substrato (μ_s) é máxima e constante durante a fase exponencial de crescimento, o cálculo de μ_s^{Exp} foi realizado pela razão entre o valor de μ_x e o valor de $Y_{x/s}^{Exp}$, conforme equação 27. Os valores foram expressos em h^{-1} .

$$\mu_s^{Exp} = \mu_x / Y_{x/s}^{Exp} \quad (27)$$

Para a obtenção do fator de conversão de substrato a etanol exponencial das linhagens ($Y_{Eth/s}^{Exp}$) foram traçados gráficos [Etanol] vs. [Substrato], ou seja, valores da concentração de etanol em função da concentração de substrato, das amostras coletadas durante o período correspondente à fase exponencial. Assim, o módulo dos coeficientes angulares das regressões lineares revelaram o $Y_{Eth/s}^{Exp}$. Os valores foram expressos em $gEth \cdot g_{substrato}^{-1}$. Para a obtenção do fator de conversão de substrato a etanol global das linhagens ($Y_{Eth/s}^{Glo}$), foi calculada a razão entre os valores da concentração de etanol produzido e da concentração de substrato consumido, quando a concentração máxima de etanol foi alcançada, conforme equação 28.

$$Y_{Eth/s}^{Glo} = [Etanol] / [Substrato] \quad (28)$$

Supondo que a velocidade específica de produção de etanol (μ_{Eth}) é máxima e constante durante a fase exponencial de crescimento, o cálculo de μ_{Eth}^{Exp} foi realizado pela razão entre o valor de μ_x e o valor de $Y_{Eth/s}^{Exp}$, conforme equação 29. Os valores foram expressos em h^{-1} .

$$\mu_{Eth}^{Exp} = \mu_x / Y_{Eth/s}^{Exp} \quad (29)$$

A produtividade em etanol (P_{Eth}) foi calculada pela razão entre a concentração máxima e o tempo necessário para obter a concentração máxima de etanol, conforme equação 30. A produção máxima de etanol foi expressa em $g \cdot (L \cdot h)^{-1}$.

$$P_{Eth} = [Etanol] / t_h \quad (30)$$

4.14 Técnicas de manipulação de ácidos nucléicos

As manipulações e análises de DNA, incluindo purificação, Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e eletroforese, foram realizadas seguindo métodos padrão de biologia molecular descritos na literatura. Os genes de interesse, presentes no genoma das leveduras de laboratório, foram modificados através da técnica de engenharia genômica, descrita no item 4.14.1.

4.14.1 Engenharia genômica em *S. cerevisiae*

As regiões cromossômicas correspondentes aos genes *AGT1* e *SUC2*, presentes no genoma das linhagens de levedura analisadas, foram modificadas através de metodologias fundamentadas na Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e no processo de recombinação homóloga, com base nos procedimentos descritos por Batista, Miletti e Stambuk (2004) e Petracek e Longtine (2002). A técnica de engenharia genômica, apresentada esquematicamente na Figura 6, permite remover, a sequência de nucleotídeos que codificam ao gene de interesse, do genoma de leveduras, por substituição pela sequência de nucleotídeos que codificam a um gene marcador de interesse, ou ainda, modificar a expressão de um gene de interesse, inserindo uma sequência de nucleotídeos que codificam a uma região promotora. Essa técnica também preconiza utilização de sequências iniciadoras e PCR, para confirmar a inserção das modificações no local correto dentro do genoma das leveduras.

Nessa técnica, oligonucleotídeos iniciadores de transcrição são construídos de forma a conter regiões de homologia, a região alvo no DNA da levedura, e a um DNA molde (plasmídeo ou DNA genômico que contem genes utilizados como marcadores de seleção, por exemplo, um gene que confere resistência a um antibiótico (*Kan^r*) ou um gene que restaura um requerimento nutricional (*TRP1* e *URA3*)). Fragmentos lineares de DNA denominados “módulos para modificação genética” são produzidos por PCR, como descrito no item 4.14.2, e apresentam o gene marcador flanqueado por sequência de nucleotídeos homóloga a região alvo, presente no genoma da levedura. Quando as células são tratadas e recebem esses módulos, conforme descrito no item 4.14.3, há probabilidade de ocorrer recombinação por homologia, entre o módulo e o genoma da levedura. Essa recombinação

resulta em uma linhagem que expressa o marcador de seleção, no lugar do gene ou da região de interesse contida dentro do genoma da levedura. A seleção das células modificadas ocorre através de meio de cultivo preparado com a suplementação necessária (antibiótico ou requerimento nutricional). O DNA extraído das leveduras transformadas é utilizado para verificar por PCR, a inserção do módulo no local correto dentro do genoma da levedura, conforme descrito no item 4.14.4.

4.14.2 Construção dos módulos para modificação genética

O plasmídeo pFA6a-kanMX6⁷ foi utilizado como DNA molde, na produção dos módulos para modificação genética dos genes *AGT1* e *SUC2*. O plasmídeo foi multiplicado para os procedimentos experimentais, conforme descrito no item 4.14.2.1.

Os iniciadores, apresentados na Tabela 4, foram utilizados na obtenção dos módulos para modificação genética, e possuem 60 nucleotídeos de extensão, sendo uma sequência de 20 nucleotídeos homóloga ao plasmídeo pFA6a-kanMX6, obtida a partir de Petracek e Longtine (2002), e uma sequência de 40 nucleotídeos, homóloga às regiões alvo de interesse no genoma da levedura, obtida a partir do *Saccharomyces Genome Database* (SGD). Os módulos para modificação genética foram obtidos por PCR, sob as seguintes condições de reação: 10 µL de dNTP (10mM), 10 µL do plasmídeo pFA6a-kanMX6, 5 µL de iniciador F (20 pmol.µL⁻¹), 5 µL de iniciador R (20 pmol.µL⁻¹), 20 µL de MgSO₄ (50 mM), 50 µL de tampão 10x concentrado para DNA polimerase, 2 µL de DNA Polimerase (Invitrogen, Platinum[®] *Taq* DNA Polimerase *High Fidelity*, California, USA), e quantidade suficiente para 500 µL de água MilliQ.

O volume final da reação foi dividido em 05 (cinco) tubos para PCR, e esses foram incubados em termociclador (Eppendorf, Mastercycler Personal[®], Hamburg, Germany), programado da seguinte forma: passo 1 = 2 min a 94 °C, passo 2 = 20 s a 94 °C, passo 3 = 20 s a 55 °C, passo 4 = 2 min a 68 °C, passo 5 = repetidos 29 vezes os passos 2 a 4, passo 6 = 10 min a 68 °C e passo 7 = 4 °C por tempo indeterminado. Um volume da reação foi submetido à eletroforese em gel de agarose, conforme descrito no item 4.14.2.2, para verificar a

⁷ Plasmídeo descrito por Goldstein, Pan e Mcusker (1999) que apresenta o genótipo *Amp^r ori P_{TEF}-kan^r-T_{TEF}*. O gene *kan^r* de *Escherichia coli* foi modificado para conferir resistência à G418 (Geneticina) em leveduras, por inserção do promotor *TEF* de *A. gossypii* e do terminador *TEF* de *A. gossypii*;

obtenção do módulo para modificação genética esperado, conforme demonstra a Tabela 5. O conteúdo dos 05 (cinco) tubos foi transferido pra um único tubo, e esse foi incubado por 30 min em um concentrador a vácuo (Eppendorf, Vacufuge plus centrifugal vacuum concentrator, Hamburg, Germany). Após o término do tempo, um volume de 150 µL de água MilliQ foi adicionado ao tubo, para suspender o material contido no fundo do tubo.

Figura 6 - Representação esquemática da técnica de engenharia genômica em *S. cerevisiae*.

NOTA: As regiões identificadas em cor azul representam homologia à região a montante do gene alvo, e as regiões identificadas em cor vermelha representam homologia à região a jusante do gene alvo.

FONTE: Dário (2012).

Tabela 4 - Sequência de nucleotídeos dos iniciadores utilizados na construção dos módulos para modificação genética.

Iniciador ^a	Sequência 5' → 3' ^b	Proposta
AGT1 – F1	TACATAGAAGAACATCAAACA CTAAAAAATAGTATAATCCAGCTGAAGC TTCGTACGC (-40 a -1)	Modificar o gene <i>AGT1</i>
AGT1 – R1	TTCTTATTTCTTCCAAAAA AAAAAACAACCCTTTACGCATAGGCCACTA GTGGATC (1888 a 1848)	Modificar o gene <i>AGT1</i>
SUC2 – F1	CAAGCAAAACAAAAAGCTTTTCTTTT CACTAACGTATATGCCAGCTGAAGCT TCGTACGC (-40 a -1)	Modificar o gene <i>SUC2</i>
SUC2 – R1	CTTTTGAAAAAATAAAAA AGACAATAAGTTTATAACCTGCATAGGCCAC TAGTGGATC (1636 a 1597)	Modificar o gene <i>SUC2</i>

NOTA: ^a Os iniciadores F (*forward*) são complementares a fita 3'→ 5' e apresentam homologia à região a montante do gene, enquanto que, os iniciadores R (*reverse*) são complementares a fita 5'→ 3' e apresentam homologia à região a jusante do gene;

^b As sequências de nucleotídeos sublinhadas são homólogas ao plasmídeo utilizado no estudo e em negrito são homólogas ao genoma da levedura, obtidas a partir do SGD. Os valores entre parênteses correspondem à posição a qual a sequência de nucleotídeos dos iniciadores apresentam homologia ao genoma da levedura, a partir do códon de início da tradução do gene.

FONTE: Dário (2012).

Tabela 5 - Combinação de iniciadores utilizados na obtenção dos módulos para modificação genética, conforme proposta de modificação, e produtos de PCR esperados após eletroforese em gel de agarose.

Proposta	Iniciador F	Iniciador R	Fragmento esperado (pb)
Modificar o gene <i>AGT1</i>	AGT1 – F1	AGT1 – R1	1623
Modificar o gene <i>SUC2</i>	SUC2 – F1	SUC2 – R1	1623

FONTE: Dário (2012).

4.14.2.1 Extração e purificação de plasmídeos em bactérias (Miniprep)

A cepa DH5 α de *Escherichia coli* – genótipo: *F- recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17(vK-mk+) supE44 rel1 Δ (argF-lacZya) U169 (ϕ 80 lacZ Δ M15) γ^-* , foi utilizada como vetor, para a multiplicação dos plasmídeos utilizados nos procedimentos de modificação genética das células de levedura.

O meio líquido Luria-Bertani (LB líquido), utilizado para o cultivo de *E. coli* (AUSUBEL et al., 1992), foi preparado conforme instruções do fabricante (Sigma) e esterilizado em autoclave a 120 °C por 15 min. As bactérias foram inoculadas em balões de Erlenmeyers, que continham 1/5 do seu volume preenchidos com meio LB líquido, e cultivadas em incubadora de agitação orbital de 137 rpm a 37 °C (Nova Ética, 430, Vargem Grande Paulista, São Paulo, Brasil). Quando requerido, os meios sólidos foram preparados com adição de 2% de ágar ao meio LB líquido. Para obtenção de meio sólido seletivo contendo antibiótico, após a esterilização, os frascos foram incubados em estufa a 60 °C por 30 min. Após, uma quantia de 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de Ampicilina foi adicionada aos frascos sob condições assépticas.

A técnica de Miniprep foi realizada, conforme protocolo descrito por Maniatis, Fritsch e Sambrook (1982) e todos os reagentes utilizados foram de grau analítico (Sigma). A bactéria DH5 α contendo o plasmídeo de interesse, armazenada em criotubo contendo meio LB líquido suplementado com 20% de glicerol, foi inoculada na superfície de placas de Petri contendo meio LB sólido seletivo com Ampicilina, com auxílio de alça bacteriológica, através da técnica de esgotamento. As placas foram então incubadas em estufa bacteriológica a 37 °C até o dia seguinte. Uma única colônia foi coletada da superfície do meio LB sólido, com auxílio de alça bacteriológica e transferida para 5 mL de meio LB líquido seletivo. A cultura foi incubada sob agitação orbital de 137 rpm a 37 °C até o dia seguinte. Após, a cultura foi transferida para tubos Falcon e centrifugada por 3 min a 6.000 *g* e as células separadas do meio de cultura, desprezando-se a parte líquida. Um volume de 100 μ L de Tampão GTE (50mM de glicose, 10mM de EDTA e tampão 25mM Tris-HCl pH = 8,0) foi adicionado ao tubo Falcon contendo as células precipitadas, e as células foram suspensas com auxílio de agitador tipo Vortex. Os tubos Falcon foram incubados por 5 min em temperatura ambiente, e em seguida, um volume de 200 μ L de Solução NaOH/SDS (0,2 M de NaOH e 1% de SDS) foi adicionado ao tubo. Os tubos foram vigorosamente agitados, com auxílio de agitador tipo Vortex, por 1 min, e então, incubados em banho de gelo por 5 min. Em seguida, um volume de 150 μ L de uma solução 5 M de Acetato de Potássio foi adicionado ao tubo, e após agitação vigorosa de 1 min, com auxílio de agitador tipo Vortex, os tubos foram novamente incubados em banho de gelo por 5 min. Após, o tubo foi centrifugado por 5 min a 5.000 *g* e a parte líquida presente no tubo Falcon (sobrenadante) foi transferida para um tubo Eppendorf, desprezando-se os restos celulares presentes no fundo do tubo Falcon. Um volume de 800 μ L de etanol 95% foi adicionado ao tubo Eppendorf, e em seguida, o tubo foi incubado em temperatura ambiente por 2 min. O tubo foi centrifugado por 15 min a 12.000 *g*, e após, a parte líquida foi desprezada. Um volume de 1 mL de etanol 70% foi adicionado ao precipitado e os tubos foram novamente centrifugados por 15 min a 12.000 *g*. A parte líquida foi totalmente removida, e os tubos, contendo o DNA precipitado, foram deixados por 1 h em capela de fluxo laminar para secar, com a abertura do tubo voltada para baixo e sobre papel toalha absorvente. Em seguida, o precipitado foi suspenso em 30 μ L de Tampão TE (1 mM de EDTA e tampão 10 mM Tris-HCl pH = 8,0) estéril ou de água MilliQ estéril, e um volume de 1 μ L de RNase (1 mg.mL⁻¹ de RNase, 1mM de EDTA e tampão 10mM Tris-HCl pH =

8,0) foi adicionado aos tubos, que foram incubados em estufa a 37 °C por 1 h. Após, os tubos contendo os plasmídeos foram armazenados sob refrigeração a -20 °C, até a sua utilização.

4.14.2.2 Eletroforese em gel de agarose

Um volume de 12 µL, (10 µL da reação submetida a PCR, misturado com 2 µL de Tampão de Corrida 10 vezes concentrado (20% de Ficoll 400, 0,1 M de EDTA, 1,6% de SDS e 0,05% de Azul de Bromofenol)) foi aplicado em gel 1% de agarose, contendo 2,5 µg.mL⁻¹ de brometo de etídio em tampão TBE 0,5 vez (1 mM de EDTA pH = 8,0 e tampão 45 mM Tris-borato). Um volume de 5 µL, de marcador de peso molecular 1 kb ladder, foi também aplicado no gel de agarose. O gel foi submetido à eletroforese em Tampão TBE 0,5 vez, a 100 V por 40 a 60 min. Após o término do tempo, o gel foi analisado e fotografado sob luz ultravioleta (MANIATIS; FRITSCH; SAMBROOK, 1982).

*4.14.3 Transformação das linhagens de **S. cerevisiae***

As linhagens de levedura foram transformadas, sob condições assépticas, através do protocolo descrito por Agatep et al. (1998): As linhagens de interesse foram pré-cultivadas conforme descrito no item 4.5.1, porém, incubando-se os tubos a 28 °C sob agitação orbital de 160 rpm, durante a noite até o dia seguinte. No dia seguinte, um volume de 1,5 mL do pré-cultivo foi transferido para um balão de Erlenmeyer, com capacidade para 250 mL, preenchido com 50 mL de meio YP contendo 2% de glicose. O frasco foi incubado a 28 °C sob agitação orbital de 160 rpm, até atingir Abs₆₀₀ ≈ 1 (≈ 3 a 6 horas). Após atingir a concentração celular desejada, a cultura foi transferida para tubo Falcon e centrifugada por 5 min a 3000 g, e a parte líquida contida no tubo (sobrenadante) foi totalmente desprezada. As células foram gentilmente suspensas em 1 mL de uma solução 0,1 M de Acetato de Lítio estéril, com auxílio de um pipetador, e a suspensão celular obtida foi transferida a um tubo Eppendorf. Em seguida, o tubo foi centrifugado por 2 min a 3000 g, e após descartar o sobrenadante obtido, um volume de 300 a 500 µL de 0,1 M de Acetato de Lítio foi adicionado ao tubo, e em seguida, as células foram suspensas com auxílio de agitador do tipo Vortex (Obs.: O volume adicionado foi dependente da Abs₆₀₀ inicial da cultura, por ex.: Abs₆₀₀ ≈ 0,9 (300 µL)

e $Abs_{600} \approx 1,5$ (500 μL)). Após, em novos tubos foram colocados os reagentes listados na Tabela 6.

Tabela 6 - Reagentes utilizados para a transformação das leveduras.

Tubo	Controle Negativo	Controle Positivo	Transformação
Suspensão celular ^a	50 μL	50 μL	50 μL
Solução PLI ^b	300 μL	300 μL	300 μL
SS-DNA ^c	5 μL	5 μL	5 μL
Água Milli Q estéril	10 μL	-	-
Plasmídeo Controle ^d	-	10 μL	-
Inserto ^e	-	-	50 ou 10 μL

NOTA: ^a Suspensão celular, em solução 0,1 M de acetato de lítio, preparada no passo anterior;

^b Solução estéril composta de 0,1 M de acetato de Lítio e 40% de PEG 3350;

^c DNA simples fita extraído de esperma de Salmão, previamente incubado em Banho Maria a 100 °C por 5 min;

^d Plasmídeo pJW5 (genótipo: pBluescript KS *ARSH4 CEN6 URA3 MAL63^C*) (WANG; NEEDLEMAN, 1995);

^e Coloca-se 50 μL de produto de PCR concentrado quando se transforma as células com modulo para modificação genética, ou 10 μL de DNA plasmidial quando se transforma com plasmídeo.

FONTE: Dário (2012).

As suspensões celulares, obtidas no passo anterior, foram vigorosamente agitadas com auxílio de agitador tipo Vortex, e em seguida incubadas em Banho Maria a 42 °C por 30 min, agitando-se rapidamente os tubos a cada 5 min. Após, os tubos foram centrifugados por 2 min a 3.000 *g*, e o sobrenadante obtido foi removido, com auxílio de um pipetador. As células foram tratadas conforme descrito em (a) ou (b):

(a) Transformação com gene que supre requerimento nutricional: Um volume de 500 μL de água MilliQ estéril foi adicionado aos tubos, para suspender as células, e a suspensão celular foi inoculada na superfície de placas de Petri, contendo meio sólido seletivo requerido (Meio Sintético Drop-out), preparado conforme descrito no item 4.2. A suspensão celular foi transferida para o meio da placa de Petri, e a inoculação foi realizada por agitação orbital da placa, para distribuir a suspensão celular na superfície do meio sólido, sem o uso de alça de Drigalsky;

(b) Transformação com gene que confere resistência a antibiótico: Um volume de 1 mL de meio líquido YP contendo 2% de glicose foi adicionado ao tubo, para suspender as células, e os tubos foram incubados a 28 °C por 3 a 4 horas sob agitação orbital de 160 rpm. Após, os tubos foram centrifugados por 2 min a 3.000 *g* e o sobrenadante desprezado. Um volume de 500 μL de água MilliQ estéril foi adicionado para suspender as células, e a

suspensão celular obtida foi inoculada na superfície de placas de Petri, contendo meio sólido seletivo requerido (Meio YP contendo 2% de glicose, com $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de Geneticina). A suspensão celular foi transferida para o meio da placa de Petri, e a inoculação foi realizada por agitação orbital da placa, para distribuir a suspensão celular na superfície do meio sólido, sem o uso de alça de Drigalsky.

As placas foram deixadas, com a tampa aberta, dentro de capela de fluxo laminar, até secar a superfície do meio sólido (≈ 30 min), e em seguida, as placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 28°C por 3 a 5 dias, até surgirem colônias de células na superfície do meio. As colônias que cresceram foram repicadas, com auxílio de alça bacteriológica, para novas placas contendo o mesmo tipo de meio utilizado anteriormente, e em seguida, foram incubadas em estufa bacteriológica a 28°C por 3 a 5 dias, até o crescimento das células na superfície do meio. Após o crescimento, as células foram utilizadas para confirmação da inserção das modificações no genoma das linhagens, conforme descrito no 4.14.4.

4.14.4 Confirmação da inserção das modificações no genoma das linhagens

O DNA genômico das colônias de leveduras, que cresceram no meio seletivo após o processo de transformação, foi extraído conforme descrito no item 4.14.4.1, e utilizado para verificar por PCR, a inserção dos módulos nos locais corretos dentro do genoma das leveduras. Iniciadores, de ≈ 20 nucleotídeos de comprimento, foram utilizados para a verificação, e conforme demonstra a Tabela 7, a combinação de iniciadores utilizada foi variável, conforme a modificação realizada. A PCR para verificação foi realizada sob as seguintes condições: $1 \mu\text{L}$ de dNTP 10mM , $2 \mu\text{L}$ do DNA genômico, $1 \mu\text{L}$ de iniciador F $20 \text{ pmol.}\mu\text{L}^{-1}$, $1 \mu\text{L}$ de iniciador R $20 \text{ pmol.}\mu\text{L}^{-1}$, $0,75 \mu\text{L}$ de MgCl_2 50 mM , $2,5 \mu\text{L}$ de tampão $10\times$ concentrado para DNA polimerase, $0,5 \mu\text{L}$ de DNA Polimerase (Ludwig, *Taq* DNA Polimerase, Rio Grande do Sul, Brasil), e quantidade suficiente para $25 \mu\text{L}$ de água MilliQ.

Os tubos contendo as reações foram incubados em termociclador (Eppendorf, Mastercycler Personal[®], Hamburg, Germany) programado da seguinte forma: passo 1 = 2 min a 95°C , passo 2 = 20 s a 95°C , passo 3 = 20 s a 60°C , passo 4 = 1 min a 72°C , passo 5 = repetidos 29 vezes os passos 2 a 4, passo 6 = 5 min a 72°C e passo 7 = 4°C por tempo indeterminado. Um volume da reação foi submetido à eletroforese em gel de agarose,

conforme descrito no item 4.14.2.2, para verificar a obtenção dos fragmentos de DNA esperados, conforme demonstra a Tabela 8.

Tabela 7 - Sequência de nucleotídeos dos iniciadores utilizados para verificar a inserção do módulo para modificação genética no correto local no genoma da levedura engençada.

Iniciador	Sequência 5' → 3' ^a	Proposta
V-AGT1-F	GAATTTTCGGGTTGGTG (-71 a -54)	Verificar presença do gene <i>AGT1</i>
V-AGT1-R	ACATTATCAGCTGC (1845 a 1830)	Verificar presença do gene <i>AGT1</i>
V-Kan ^r -R	GGAATCGAATGCAACCGG (845 a 828)	Verificar presença do gene <i>Kan^r</i>
V-SUC2-F	GAAATTATCCGGGGGCGAAG (-447 a -428)	Verificar presença do gene <i>SUC2</i>
V-SUC950-R	GGCACTGTACTCCCAGTT (942 a 925)	Verificar presença do gene <i>SUC2</i>

NOTA: ¹ Os iniciadores F (*forward*) são complementares a fita 3' → 5', enquanto que os iniciadores R (*reverse*) são complementares a fita 5' → 3'. Os valores entre parênteses correspondem à posição a qual a sequência de nucleotídeos dos iniciadores apresentam homologia ao genoma da levedura, a partir do códon de início da tradução do gene.

FONTE: Dário (2012).

Tabela 8 - Combinação de iniciadores utilizados para verificar a inserção do módulo para modificação genética, no correto local no genoma da levedura, e fragmentos de DNA esperados, após eletroforese em gel de agarose, conforme proposta de modificação.

Genótipo	Iniciador F	Iniciador R	Fragmento esperado (pb)
Linhagem Padrão			
<i>AGT1</i>	V-AGT1-F	V-AGT1-R	1919
	V-AGT1-F	V-Kan ^r -R	Ausência
<i>SUC2</i>	V-SUC2-F	V-SUC950-R	1392
	V-SUC2-F	V-Kan ^r -R	Ausência
Linhagem Engenhada			
(G418+) = <i>agt1Δ::Kan^r</i>	V-AGT1-F	V-AGT1-R	Ausência
	V-AGT1-F	V-Kan ^r -R	916
(G418+) = <i>suc2Δ::Kan^r</i>	V-SUC2-F	V-SUC950-R	Ausência
	V-SUC2-F	V-Kan ^r -R	1292

FONTE: Dário (2012).

4.14.4.1 Extração de DNA genômico de *S. cerevisiae*

A extração de DNA genômico foi realizada através do seguinte protocolo, utilizando reagentes de grau analítico (Sigma): Os itens a seguir foram adicionados, na ordem apresentada, em tubos com tampa de rosca (*screw cap tube*): um volume de 200 µL de água MilliQ; uma quantidade de células da linhagem de interesse, suficiente para preencher uma alça bacteriológica; uma quantidade, de bolinhas de vidro lavadas com ácido, equivalente a um volume de 200 µL de água; e 200 µL da fase inferior da emulsão fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1 - v/v/v). Os tubos foram agitados bruscamente por 30 segundos, com

auxílio de agitador de tubos tipo Vortex, e em seguida, os tubos foram centrifugados por 10 min a 13.000 *g*. As partes líquidas, contidas nos tubos (sobrenadantes), foram coletadas com auxílio de pipetador e transferidas para tubos Eppendorf. Após, volumes de, 1 mL de etanol P.A, e 100 µL de 3M de Acetato de Sódio pH = 5,2 foram adicionados aos tubos. Os tubos foram agitados em vortex por 5 segundos e incubados por 1 a 2 horas em freezer a -20 °C. Após, os tubos foram centrifugados por 5 min a 13.000 *g*, e em seguida, as partes líquidas foram descartadas. Os precipitados obtidos foram lavados com 1 mL de Etanol 70%, e os tubos foram centrifugados por 5 min a 13.000 *g*. A parte líquida foi totalmente removida, e os tubos, contendo o DNA precipitado, foram deixados por 1 h em capela de fluxo laminar para secar, com a abertura do tubo voltada para baixo e sobre papel toalha absorvente. Em seguida, o precipitado, contido no fundo do tubo, foi suspenso em 35 µL de água MilliQ estéril, e um volume de 1 µL de RNase (1 mg.mL⁻¹ de RNase, 1mM de EDTA e tampão 10mM Tris-HCl pH = 8,0) foi adicionado aos tubos, que foram incubados em estufa a 37 °C por 1 h. Após, os tubos foram armazenados sob refrigeração a -20 °C, até o momento do uso.

4.14.5 Transformação de genes em *S. cerevisiae*

As linhagens de *S. cerevisiae* foram transformadas, através da técnica descrita no item 4.14.3, com os plasmídeos apresentados na Tabela 9. Todos os plasmídeos apresentam replicação autônoma e são episomais (permitem as células manter os plasmídeos durante o processo de divisão celular).

Tabela 9 - Vetores utilizados para inserção de genes nas leveduras analisadas, após transformação com plasmídeos episomais.

Plasmídeo	Genótipo	Referência
pGRSd	<i>CEN6 amp^r URA3 P_{GPD}-T_{PGK}</i>	Jules et al. (2004)
pGRSd-AGT1	<i>CEN6 amp^r URA3 P_{GPD}-AGT1-T_{PGK}</i>	Jules et al. (2004)
YCplac33	<i>ARS1 CEN4 amp^r URA3 lacZ</i>	Gietz e Sugino (1988)
YCpCYR1	<i>ARS1 CEN4 amp^r URA3 CYR1</i>	Vanhalewyn et al. (1999)

FONTE: Dário (2012).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Obtenção de Linhagens de *S. cerevisiae* engenhradas por engenharia genômica

Conforme apresentadas no item 2.2, existem duas diferentes vias de metabolização para a sacarose em *S. cerevisiae*: (1) hidrólise extracelular da sacarose, que é dependente da expressão dos genes *SUC*; e, (2) transporte ativo do açúcar através da membrana e hidrólise intracelular do dissacarídeo, sendo por esse motivo, dependente da expressão dos genes *AGT1* e *MAL* para ser funcional. A primeira via revela a interconexão da metabolização da sacarose e dos monossacarídeos glicose e frutose, enquanto que a segunda via revela a conexão direta entre a metabolização da sacarose e de α -glicosídeos, como por exemplo: da maltose e da maltotriose (BADOTTI et al., 2008; BATISTA; MILETTI; STAMBUK, 2004; KHAN; ZIMMERMANN; EATON, 1973; STAMBUK et al., 1999). O conhecimento da inter-relação das vias metabólicas é ferramenta de grande importância, pois permite elaborar estratégias que auxiliem na elucidação dos passos necessários a metabolização dos açúcares.

Sabe-se que para as células de levedura serem capazes de transportar a sacarose é necessário crescê-las previamente em maltose, para ocorrer indução da expressão dos genes *MAL*; ou então, a levedura deve apresentar genótipo *MAL* constitutivo (*MAL^c*) (BADOTTI; BATISTA; STAMBUK, 2006; BADOTTI et al., 2008; BATISTA; MILETTI; STAMBUK, 2004), que permitirá às células expressar os genes *MAL* independentemente da presença de indutor (maltose) no meio (NEEDLEMAN, 1991; NOVAK et al., 2004). As linhagens utilizadas como micro-organismo padrão nesse trabalho possuem os genes *SUC2* e *AGT1*, e também apresentam genes *MAL* constitutivo, pois possuem o alelo *MAL2-8^c* (comparar genótipo relevante apresentado na Tabela 1).

Os genes *SUC2* e *AGT1* foram removidos isoladamente do genoma da linhagem padrão CEN.PK113-5D, através da técnica de engenharia genômica descrita no item 4.14.1, com o intuito de analisar o metabolismo de sacarose em maiores detalhes e visando incrementar a utilização desse açúcar por *S. cerevisiae*. Os fragmentos de DNA que formam os genes supracitados foram modificados diretamente nos cromossomos da levedura padrão, dando origem às linhagens MGD-02 (*suc2Δ*), como descrito no item 5.1.1, e MTY-01 (*agt1Δ*), como descrito no item 5.1.2.

5.1.1 Obtenção de linhagem engenhada no gene *SUC2*

Fragmentos lineares de DNA, chamados “módulo para deleção”, foram confeccionados por PCR utilizando o plasmídeo pFA6a-kanMX6, como DNA molde, e os iniciadores SUC2-F1 e SUC2-R1, com o intuito de remover o gene *SUC2* do genoma da levedura padrão. Esses módulos apresentavam aproximadamente 1.623 pb de comprimento (Figura 7-A, Coluna 1) e possuíam o gene *kan^r* na porção central, e nas extremidades, sequências homólogas às regiões cromossômicas a montante (≈ 40 pb) e a jusante (≈ 40 pb) do gene *SUC2* (Figura 7-B).

As células da linhagem CEN.PK113-5D foram transformadas com esses módulos, e em seguida inoculadas na superfície de placas de Petri contendo meio de cultura suplementado com o antibiótico Geneticina. Por recombinação homóloga, houve a integração dos módulos para deleção no genoma de algumas células, permitindo o desenvolvimento de colônias resistentes ao antibiótico. Os DNAs genômicos, das colônias que se desenvolveram na superfície da placa de Petri, e da levedura padrão, foram extraídos e analisados por PCR, para avaliar a presença ou a ausência dos genes *SUC2* e *kan^r* nas linhagens.

O DNA genômico da linhagem padrão (CEN.PK113-5D) foi submetido a PCR com os iniciadores de verificação V-SUC2-F (que hibridiza numa região cromossômica a montante do módulo de modificação) e V-SUC950-R (que hibridiza dentro do gene *SUC2*), e observou-se amplificação de um fragmento com 1392 pb de comprimento (Figura 7-A, Coluna 2), indicando que, como esperado, essa linhagem apresenta o gene *SUC2* (Figura 7-B). Como controle, o DNA genômico dessa linhagem foi também submetido a PCR com os iniciadores de verificação V-SUC2-F e V-Kan^r-R, e como esperado, não foi observada amplificação de fragmento de DNA (Figura 7-A, Coluna 4).

Por outro lado, os DNAs genômicos das colônias que se desenvolveram no meio de cultura seletivo foram submetidos a PCR com os iniciadores de verificação V-SUC2-F e V-SUC950-R, e não se observou amplificação de fragmento de DNA, indicando que o gene *SUC2* não está presente no genoma das células resistentes ao antibiótico (Figura 7-A, Coluna 3). Para confirmar a modificação realizada, os DNAs genômicos dessas linhagens foram também submetidos a PCR juntamente com os iniciadores de verificação V-SUC2-F e V-Kan^r-R, e como esperado, houve amplificação de um fragmento de 1292 pb (Figura 7-A, Coluna 5), indicando que o gene *kan^r* está inserido no genoma da levedura engenhada (Figura 7-B).

Assim, a presença do gene *SUC2* na linhagem CEN.PK113-5D foi confirmada, e também a substituição desse gene, pelo gene *kan^r* (*suc2Δ::Kan^r*), no genoma das colônias que foram capazes de crescer no meio seletivo contendo antibiótico. As células engenhadas, contidas em uma dessas colônias, foram isoladas para análises posteriores, e passamos a denominá-las como linhagem MGD-02 (*suc2Δ*).

Figura 7 - Engenharia genômica realizada na levedura padrão para obter a linhagem engenhada *suc2Δ*.

NOTA: (A) Eletroforese em gel de agarose do marcador de peso molecular (coluna M) e dos produtos de PCR obtidos, conforme a combinação de iniciadores e de DNA genômico indicados na legenda, na produção do módulo para deleção (coluna 1) e na confirmação da modificação realizada no genoma da levedura padrão (colunas 2 a 5). (B) Esquema ilustrando, o módulo para deleção contendo as regiões de homologia ao genoma da levedura padrão, e os locais de homologia de cada iniciador de verificação ao DNA das linhagens analisadas, que permitiram demonstrar a substituição do gene *SUC2*, presente no DNA da levedura padrão, pelo gene *Kan^r*, presente no DNA da levedura engenhada. Os números entre parênteses correspondem ao número das colunas do gel apresentado em A. Os quadros branco e cinza presentes na representação do gene *kan^r* correspondem, respectivamente, ao promotor *TEF* e ao terminador *TEF*.

FONTE: Dário (2012).

Cabe salientar que a linhagem *iSUC2*, BSY21-34B (BASSO et al., 2011; STAMBUK et al., 2011), foi também obtida por engenharia genômica e apresenta expressão do gene *SUC2* sob o controle da região promotora do gene *ADH1* (*P_{ADH1}*). A fusão do *P_{ADH1}* ao segundo códon ATG, após a sequência que codifica ao peptídeo sinal, permite o aumento da expressão (sobre-expressão) da forma intracelular da enzima invertase e

concomitantemente, impede a síntese da forma periplasmática dessa enzima, conforme ilustra a Figura 8.

Figura 8 - Representação da estrutura do gene *SUC2* na levedura engenhada *iSUC2*.

NOTA: A região promotora nativa do gene *SUC2* – contendo as regiões UAS (*Upstream Activating Sequence*), os sítios de ligação de proteínas reguladoras (CRE, SUCA e SUCB) e o TATA-box – e a região que representa a sequência de resíduos de aminoácidos do peptídeo sinal (região amarela hachurada) não foram alteradas na construção da linhagem. A inserção do módulo de modificação genética – contendo o gene de seleção auxotrófica (*TRP1*) e a região promotora do gene *ADH1* (*P_{ADH1}*) – foi realizada no segundo códon, que permite o início da transcrição do RNA mensageiro, o qual dará origem a forma intracelular da invertase.

FONTE: Dário (2012).

5.1.2 Obtenção de linhagem engenhada no gene *AGT1*

No intuito de remover o gene *AGT1* do genoma da levedura CEN.PK113-5D foi realizada técnica semelhante à descrita no item anterior, porém com algumas alterações. Os módulos para deleção foram confeccionados por PCR utilizando o plasmídeo pFA6a-kanMX6, como DNA molde, e os iniciadores AGT1-F1 e AGT1-R1. Esses módulos apresentavam aproximadamente 1.623 pb de comprimento (Figura 9-A, Coluna 1) e possuíam o gene *kan^r* na porção central, e nas extremidades, sequências homólogas às regiões cromossômicas a montante (≈ 40 pb) e a jusante (≈ 40 pb) do gene *AGT1* (Figura 9-B).

As células da linhagem CEN.PK113-5D foram transformadas com esses módulos, e em seguida inoculadas na superfície de placas de Petri contendo meio de cultura suplementado com o antibiótico Geneticina. Por recombinação homóloga, houve a integração dos módulos para deleção no genoma de algumas células, permitindo o desenvolvimento de colônias resistentes ao antibiótico. Os DNAs genômicos, das colônias que se desenvolveram na

superfície da placa de Petri, e da levedura padrão, foram extraídos e analisados por PCR para avaliar a presença ou a ausência dos genes *AGT1* e *kan^r* nas linhagens.

O DNA genômico da linhagem padrão (CEN.PK113-5D) foi submetido a PCR com os iniciadores de verificação V-AGT1-F (que hibridiza numa região cromossômica a montante do módulo de modificação) e V-AGT1-R (que hibridiza dentro do gene *AGT1*), e observou-se amplificação de um fragmento com 1919 pb de comprimento (Figura 9-A, Coluna 2), indicando que, como esperado, essa linhagem apresenta o gene *AGT1* (Figura 9-B). Como controle, o DNA genômico dessa linhagem foi também submetido a PCR com os iniciadores de verificação V-AGT1-F e V-Kan^r-R, e como esperado, não foi observada amplificação de fragmento de DNA (Figura 9-A, Coluna 4).

Por outro lado, os DNAs genômicos das colônias que se desenvolveram no meio de cultura seletivo foram submetidos a PCR com os iniciadores de verificação V-AGT1-F e V-AGT1-R, e não se observou amplificação de fragmento de DNA, indicando que o gene *AGT1* não está presente no genoma das leveduras resistentes ao antibiótico (Figura 9-A, Coluna 3). Para confirmar a modificação realizada, os DNAs genômicos dessas linhagens foram também submetidos a PCR juntamente com os iniciadores de verificação V-AGT1-F e V-Kan^r-R, e como esperado, houve amplificação de um fragmento de 916 pb (Figura 9-A, Coluna 5), indicando que o gene *kan^r* está inserido no genoma da levedura engenhada (Figura 9-B).

Assim, a presença do gene *AGT1* na linhagem CEN.PK113-5D foi confirmada, e também a substituição desse gene, pelo gene *kan^r* (*agt1Δ::Kan^r*), no genoma das colônias que foram capazes de crescer no meio seletivo contendo antibiótico. As células engenhadas contidas em uma dessas colônias foram isoladas para análises posteriores, e passamos a denominá-las como linhagem MTY-01 (*agt1Δ*).

5.2 Caracterização das linhagens de *S. cerevisiae* através de crescimento em frasco agitado

Os fenótipos apresentados pelas linhagens engenhadas foram avaliados após realização das modificações genéticas descritas no item 5.1. Foram avaliadas, inicialmente, as leveduras CEN.PK113-5D (*Std*), MGD-02 (*suc2Δ*), MTY-01 (*agt1Δ*) e BSY21-34B (*iSUC2*).

As determinações de atividade da invertase confirmaram os fenótipos esperados para as modificações genéticas introduzidas no genoma da levedura padrão, isto é, presença de atividade da invertase extracelular nas linhagens que não foram modificadas no gene *SUC2*

(CEN.PK113-5D e MTY-01), ausência de atividade da invertase na linhagem *suc2Δ* e aumento de atividade da invertase intracelular na linhagem *iSUC2*, conforme demonstra a Figura 10-A. Nas leveduras CEN.PK113-5D e MTY-01, verificou-se que aproximadamente 90% da atividade de invertase corresponde à forma extracelular e apenas 10% à forma intracelular da invertase (percentual que se refere à diferença entre os níveis de atividade da invertase total e extracelular). Esse resultado da distribuição da atividade invertase nas células é semelhante ao observado por Dário (2007) após análise, nas mesmas condições experimentais empregadas neste trabalho, de linhagens industriais utilizadas na produção industrial de etanol combustível.

Figura 9 - Engenharia genômica realizada na levedura padrão para obter a linhagem engenhada *agt1Δ*.

NOTA: (A) Eletroforese em gel de agarose do marcador de peso molecular (coluna M) e dos produtos de PCR obtidos, conforme a combinação de iniciadores e de DNA genômico indicados na legenda, na produção do módulo para deleção (coluna 1) e na confirmação da modificação realizada no genoma da levedura padrão (colunas 2 a 5). (B) Esquema ilustrando, o módulo para deleção contendo as regiões de homologia ao genoma da levedura padrão, e os locais de homologia de cada iniciador de verificação ao DNA das linhagens analisadas, que permitiram demonstrar a substituição do gene *AGT1*, presente no DNA da levedura padrão, pelo gene *Kan^r*, presente no DNA da levedura engenhada. Os números entre parênteses correspondem ao número das colunas do gel apresentado em A. Os quadros branco e cinza presentes na representação do gene *kan^r* correspondem, respectivamente, ao promotor *TEF* e ao terminador *TEF*.

FONTE: Dário (2012).

Em outra constatação sobre os resultados de atividade da invertase, observa-se que a levedura *agt1Δ* apresentou atividade 20% menor que a levedura *Std*, tanto nos níveis de

atividade total quanto nos níveis de atividade da forma extracelular dessa enzima. Resultado semelhante a esse foi também obtido por Dário (2007) ao analisar, nas mesmas condições experimentais empregadas nesse trabalho, a levedura padrão CEN.PK2-1C e a sua isogênica engenhada no gene *AGT1* (LCM003 - *agt1Δ*). Cabe salientar que a expressão da invertase intracelular é realizada de forma constitutiva e praticamente não sofre repressão pela fonte de carbono disponível no meio, enquanto que por outro lado, a expressão da forma extracelular é regulada conforme a concentração de açúcar disponível no ambiente extracelular, destacando-se a repressão causada por alta concentração de sacarose, glicose e frutose (BELINCHÓN; GANCEDO, 2007; ECHEGARAY et al., 2000; HAQ; SHAFIQ; ALI, 2003; HERWING et al., 2001; OZCAN et al., 1997). Sabe-se também que em *S. cerevisiae*, o receptor de membrana Gpr1p apresenta alta afinidade para a sacarose (LEMAIRE et al., 2004; VAN DE VELDE; THEVELEIN, 2008) e desencadeia a ativação de uma via de sinalização responsável pela formação de AMPc, o qual participa da regulação de vários processos celulares importantes (THEVELEIN; VOORDECKERS, 2009; VERSTREPEN et al., 2004). Com base nesses aspectos, acredita-se que a diferença nos níveis de atividade invertase entre as linhagens não engenhas no gene *SUC2* (CEN.PK113-5D e MTY-01), possa ser explicada por um possível decréscimo na captação da sacarose pela levedura *agt1Δ*, que é incapaz de realizar o transporte desse dissacarídeo com alta afinidade, devida a ausência da permease Agt1p. A maior concentração de sacarose no ambiente extracelular durante o cultivo dessa levedura, em comparação à levedura *Std*, pode ter desencadeado, de forma mais efetiva, a via de sinalização iniciada pela proteína Gpr1p, e conseqüentemente, causado diminuição na expressão da forma extracelular da enzima invertase.

Observa-se através da Figura 10-A que as linhagens modificadas no gene *SUC2* (MGD-02 e BSY21-34B) aparentemente apresentaram atividade invertase extracelular. Entretanto, cabe salientar que a técnica utilizada para estimar a atividade dessa hidrolase apresenta limitações como qualquer outro procedimento experimental. Em uma das etapas do ensaio de determinação de atividade da invertase extracelular foi utilizado um inibidor da Enolase, o Fluoreto de Sódio (NaF), para evitar que a glicose formada a partir da hidrólise da sacarose fosse metabolizada através da glicólise. A Enolase é uma das enzimas atuantes na via glicolítica e tem a função de desidratar o 2-Fosfoglicerato, para formar Fosfoenolpiruvato. A Enolase depende de Magnésio (Mg^{2+}) para apresentar atividade, pois esse íon atua como co-fator da enzima. Assim, quando as células foram tratadas com Fluoreto de Sódio, ocorreu

interação do íon Magnésio com o íon Flúor (F⁻), resultando na inibição da atividade da enzima por falta de co-fator. Através de regulação via retro-alimentação (*feedback*) pode ter ocorrido paralisação das enzimas da via glicolítica que atuam em etapas anteriores a Enolase, principalmente da Hexoquinase. A enzima Hexoquinase atua no primeiro passo da glicólise, fosforilando a glicose e a frutose, permitindo que esses açúcares sejam metabolizados através da via glicolítica e impedindo que se difundam para fora da célula (BARNETT, 2003). Assim, acredita-se que a glicose formada a partir da sacarose, por ação das hidrolases existentes nas células, não pôde ser metabolizada pelas leveduras e acabou sendo detectada na parte líquida (sobrenadante) do tubo de análise, sobrenadante que foi utilizado para calcular a atividade de hidrólise da enzima, pela formação de glicose (SILVEIRA; CARVAJAL; BON, 1996). Assim, acredita-se que nas linhagens *suc2Δ* e *iSUC2* - incapazes de hidrolizar a sacarose no ambiente extracelular - a glicose e a frutose, liberadas após a hidrólise intracelular do dissacarídeo, podem ter extravasado do interior da célula para o ambiente extracelular através dos transportadores de hexoses Hxtp, que realizam o transporte de açúcares por difusão e permitem o fluxo em dois sentidos, de fora pra dentro e de dentro para fora das células (BOLES; HOLLEMBERG, 1997). Através de experimentos realizados utilizando maltose como fonte de carbono, Jansen et al. (2002) demonstraram fenômeno semelhante, e sugerem que a detecção de glicose, durante os cultivos realizados, foi oriunda da hidrólise intracelular da maltose. Com isso, acredita-se que o extravasamento dos monossacarídeos pode ter levado à detecção de glicose no sobrenadante, resultando na falsa atividade da invertase extracelular. Esse fato foi mais evidente para a linhagem *iSUC2*, pois a troca da região promotora do gene *SUC2* proporcionou um incremento superior a 10 vezes na atividade da forma intracelular da invertase, quando comparada com a levedura padrão (CEN.PK113-5D), conforme demonstra a Figura 10-A. Somando-se a isso, resultados do grupo, obtidos através de eletroforese de proteína em gel de poliacrilamida, demonstram que a linhagem contendo o gene *iSUC2* expressa apenas a forma intracelular da enzima (≈135 kDa), enquanto que na linhagem *Std* foi encontrada também a forma extracelular (superior a 270 kDa) (dados não publicados). Com base nesses aspectos, acredita-se que a linhagem *iSUC2* é, de fato, incapaz de sintetizar a forma extracelular da enzima invertase. Ainda nesse contexto, na linhagem sem invertase (*suc2Δ*), a sacarose, para ser metabolizada, deve ser transportada através da membrana e hidrolisada no citoplasma das células pela maltase, conforme demonstram as Figuras 10-B e 11. Acredita-se que nos experimentos com

a linhagem *suc2Δ* também houve detecção de falsa atividade da invertase extracelular e total, pois essa linhagem apresentou baixa atividade de hidrólise, quando compara-se o resultado obtido para essa levedura com o resultado da levedura *iSUC2* (Figura 10-A). Além disso, a atividade residual de invertase apresentada pela linhagem *suc2Δ* parece ser compatível com a atividade de maltase dessa linhagem (Figura 10-B).

Figura 10 - Atividade de hidrólise das enzimas invertase (β -frutosidase) e maltase (α -glicosidase), das linhagens CEN.PK113-5D, MTY-01, MGD-02 e BSY21-34B.

NOTA: (A) A atividade invertase foi determinada com células intactas (invertase extracelular - barras hachuradas) e com células permeabilizadas (invertase total - barras sem preenchimento), em tampão succinato-Tris pH = 5,0. (B) A atividade maltase foi determinada com células permeabilizadas em tampão MOPS-NaOH pH = 6,8, utilizando como substrato o *p*NP α G (barras hachuradas em amarelo), a maltose (barras com estrias verticais em preto) e a sacarose (barras com estrias inclinadas em preto). Todos os testes foram realizados após crescimento das linhagens em meio YP contendo 2 % de sacarose.

FONTE: Dário (2012).

A maltase é uma enzima capaz de hidrolisar a ligação osídica do resíduo de glicose em conformação “ α ”, presente em carboidratos como a maltose (Gli α 1- α 4 Gli) e a sacarose (Gli α 1- β 2 Fru), e em substratos sintéticos como o *p*-nitrofenil- α -D-glucopiranosídeo (*p*NP α G). Por ser uma hidrolase citoplasmática, apresenta pH ótimo próximo de 6,8 (TABATA et al., 1984; ZASTROW et al., 2001). Por outro lado, a invertase apresenta pH ótimo próximo de 5,0 para as suas duas formas (extra e intracelular) e é capaz de hidrolisar a ligação osídica do resíduo de frutose em conformação “ β ”, presente em carboidratos como a sacarose (ARRUDA; VITOLO, 1999; REDDY et al., 1988). Dessa forma, as células das linhagens analisadas foram cultivadas em sacarose para avaliar a atividade maltase e, posteriormente, tratadas em tampão MOPS-NaOH pH = 6,8, sendo utilizados 3 (três) diferentes substratos para estimar a atividade dessa enzima: sacarose (sofre hidrólise pela maltase e pela invertase), maltose e *p*NP α G (que sofrem hidrólise apenas pela maltase).

Os resultados de hidrólise da sacarose pela maltase, apresentados na Figura 10-B, indicam que embora a atividade da enzima invertase seja ótima em pH 5, essa hidrolase também apresenta atividade enzimática em pH 6,8 (pH próximo ao encontrado no citoplasma das células (pH $\approx$ 7)). Esse fato fica evidente quando se compara a atividade de hidrólise da sacarose pela maltase, com a atividade de hidrólise desse mesmo açúcar pela invertase, observando-se perfil semelhante entre as determinações realizadas, exceto para a levedura MGD-02 que não é capaz de sintetizar invertase (comparar Figuras 10-A e 10-B). Ao encontro desse resultado, as atividades com maltose e *p*NP α G demonstram que as leveduras engenhas no gene *SUC2* (*suc2 Δ* e *iSUC2*) apresentaram atividade maltase superior que as linhagens não modificadas nesse gene (*Std* e *agt1 Δ*). Esse resultado indica que durante o crescimento em sacarose, as leveduras *suc2 Δ* e *iSUC2* apresentaram expressão dos genes *MAL*, os quais são constitutivos nas linhagens da família de leveduras CEN.PK (HORÁK, 1997; NEEDLEMAN, 1991; NOVAK; ZECHNER-KRPAN; MARIÉ, 2004), permitindo a essas linhagens, realizarem o transporte do açúcar através da membrana por expressão dos genes *AGT1* e *MALx1*, e à levedura *suc2 Δ* , hidrolisar o carboidrato intracelularmente por expressão dos genes *MALx2*. Embora a levedura *iSUC2* tenha apresentado atividade de hidrólise pela maltase, essa linhagem não depende da expressão dessa enzima para realizar a hidrólise da sacarose, pois suas células apresentam aumento de expressão da forma intracelular da invertase (Figura 10). Assim, acredita-se que a linhagem MGD-02 metaboliza a sacarose devido ao transporte ativo do açúcar e posterior hidrólise

pela maltase, enquanto que, a linhagem BSY21-34B metaboliza a sacarose através da captação do açúcar por transporte ativo e posterior hidrólise intracelular, em grande parte devido à presença da forma intracelular da invertase, mas também com participação da maltase.

Para as leveduras *Std* e *agt1Δ*, que realizam hidrólise da sacarose no ambiente extracelular, foi observada baixa atividade maltase. Nesse caso, acredita-se que embora os genes *MAL* sejam constitutivos na família de leveduras CEN.PK, a glicose formada no espaço periplasmático pela hidrólise extracelular da sacarose, provavelmente, promove efeito repressor pós-transcricional sobre os genes *MAL*, das leveduras CEN.PK113-5D e MTY-01. Trabalhos demonstram evidências da ocorrência de regulação pós-transcricional induzida pela glicose, que envolve a inativação catabólica por ubiquitinação e degradação vacuolar sobre proteínas de regulação (KIM et al., 2006; WEIß; HUPPERT; KOLLING, 2008) e também sobre transportadores de membrana (MEDINTZ et al., 1996, 2000; RIBALLO et al., 1995; STAMBUK, 2002).

Stambuk, Batista e De Araujo (2000) demonstraram que o transporte da sacarose, através da membrana das células, é realizado por dois sistemas que envolvem o co-transporte com prótons H^+ , um de alta afinidade realizado pelo transportador Agt1p ($K_m \approx 8$ mM) e outro de baixa afinidade realizado pelas permeases Malx1p ($K_m \approx 120$ mM). Para avaliar a funcionalidade, nas linhagens analisadas, da permease responsável pelo transporte de alta afinidade, as células foram crescidas em sacarose, e posteriormente, foi realizada uma técnica que utiliza o substrato sintético *p*-nitrofenil- α -D-glicosídeo (*p*NP α G). Segundo descrito por Hollatz e Stambuk (2001), esse composto somente é transportado pelas células que apresentam expressão da permease Agt1p. O *p*NP α G é transportado através da membrana celular de *S. cerevisiae* com alta afinidade pela permease Agt1p ($K_m \approx 3$ mM), e após sofrer hidrólise pela maltase - que apresenta K_m de $\approx 0,1$ a $0,2$ mM por esse composto (NEEDLEMAN et al., 1978; YOSHIKAWA et al., 1994) - o grupamento químico *p*-nitrofenol é formado, o qual é quantificado para estimar a atividade de transporte.

Conforme demonstra a Figura 11, as linhagens engenhas no gene *SUC2* (*suc2Δ* e *iSUC2*) apresentaram atividade de transporte do substrato sintético *p*NP α G. Esse resultado era esperado, pois para poder metabolizar a sacarose, as células dessas linhagens necessitam expressar os genes envolvidos no transporte e na hidrólise do açúcar no ambiente intracelular. A linhagem *iSUC2* apresentou atividade de transporte

aproximadamente 9 vezes inferior [$\approx 1,2 \text{ nmol. (mg DW.min)}^{-1}$] quando comparada à linhagem *suc2Δ* [$\approx 10,5 \text{ nmol. (mg DW.min)}^{-1}$]. Esperava-se que a linhagem BSY21-34B apresentaria atividade de transporte superior à da linhagem MGD-02, devida a alta atividade de invertase intracelular da linhagem *iSUC2* e pela metabolização da sacarose ficar condicionada a atividade da maltase na levedura *suc2Δ*, que é inferior a atividade da invertase na levedura *iSUC2* (Figura 10).

Como esperado, a levedura MTY-01 - que não possui no seu genoma o gene que codifica ao transportador de alta afinidade da sacarose - não apresentou atividade de transporte do substrato sintético (Figura 11). De modo semelhante, a linhagem padrão (*Std*) também não apresentou atividade de transporte, contudo, cabe salientar nesse caso, que a técnica experimental empregada apresenta como limitação depender da expressão da maltase, que hidrolisa o *pNPαG* para formar *p*-nitrofenol. De fato, analisando os resultados apresentados na Figura 10-B, observa-se que a levedura CEN.PK113-5D apresenta baixa atividade de hidrólise pela maltase, fato que pode interferir na avaliação dos resultados de transporte de *pNPαG*. De qualquer forma, sabe-se que linhagens de *S. cerevisiae* incapazes de expressar a permease Agt1p continuam transportando o dissacarídeo pelos transportadores de maltose Malx1p, mas que possuem baixa afinidade pela sacarose (BADOTTI et al., 2008; STAMBUK; BATISTA; DE ARAÚJO, 2000). Esses resultados indicam que, nas condições analisadas, a hidrólise extracelular é a principal via de fermentação da sacarose nas leveduras (*Std* e *agt1Δ*), ou seja, hidrólise extracelular da sacarose por ação da invertase periplasmática e posterior transporte dos monossacarídeos (glicose e frutose) pelos transportadores Hxtp.

Para aprofundar a avaliação da capacidade das células em transportar a sacarose, outras diferentes técnicas foram empregadas. Os testes foram realizados com três linhagens, que possuem formas diferentes de metabolizar esse açúcar: (1) linhagem não modificada (CEN.PK2-1C - *Std*), que metaboliza a sacarose, principalmente, por hidrólise extracelular e captação dos monossacarídeos formados; (2) linhagem sem invertase (MGD-01 - *suc2Δ*), que necessita transportar e realizar a hidrólise do açúcar no ambiente intracelular, por ação da maltase; e (3) linhagem com invertase intracelular sobre-expressa (BSY21-34B - *iSUC2*), que necessita transportar e hidrolisar o açúcar no ambiente intracelular, por ação da invertase intracelular, mas também com participação da maltase.

Figura 11 - Atividade de transporte da permease Agt1p pelas linhagens CEN.PK113-5D, MTY-01, MGD-02 e BSY21-34B.

NOTA: A atividade foi determinada com células intactas, em tampão succinato-Tris pH = 5,0 utilizando o substrato sintético pNPαG. Todos os testes foram realizados após crescimento das linhagens em meio YP contendo 2 % de sacarose.

FONTE: Dário (2012).

Utilizando a concentração final de 5 mM de substrato sintético pNPαG como substrato (Figura 12-A), a linhagem *suc2Δ* apresentou atividade de transporte aproximadamente 8 vezes superior [$\approx 12,5 \text{ nmol. (mg DW. min)}^{-1}$] que as linhagens *Std* e *iSUC2* [$\approx 1,5 \text{ nmol. (mg DW. min)}^{-1}$]. Entretanto, a alteração na expressão da maltase pode ser um fator limitante, pois a técnica depende da expressão dessa enzima para realizar a hidrólise do pNPαG e obter o *p*-nitrofenol, o qual é posteriormente quantificado para estimar a atividade de transporte. Nesse contexto, as leveduras *suc2Δ*, que dependem exclusivamente da maltase para realizar a metabolização da sacarose, podem apresentar maior atividade de transporte devida a maior atividade da maltase que essas leveduras apresentam, em comparação as que possuem invertase (Figura 10-B). Em virtude disso, uma concentração final de 20 mM de açúcar radioativo ([U-¹⁴C]-sacarose) foi utilizada para avaliar a atividade de transporte das leveduras. Resultados semelhantes ao verificado com a técnica anterior foram obtidos, porém observou-se que a levedura *iSUC2* apresentou atividade aproximadamente 2 vezes maior [$\approx 5,0 \text{ nmol. (mg DW. min)}^{-1}$] que a levedura padrão [$\approx 2,5 \text{ nmol. (mg DW. min)}^{-1}$] (Figura 12-B). Sabe-se que essa técnica apresenta limitações que podem interferir na interpretação dos resultados, como por exemplo: (1) o uso de alta

concentração de substrato radioativo pode provocar ligação do substrato à superfície das células ou nos filtros de nitrocelulose utilizados no procedimento; (2) o gás carbônico radioativo ($^{14}\text{CO}_2$) formado a partir do açúcar pode gerar um valor de atividade subestimado, dependendo a velocidade do metabolismo celular (fluxo glicolítico) da linhagem analisada (STAMBUK; DE ARAÚJO, 2001); e (3) a sacarose radioativa pode ser hidrolisada extracelularmente pelas células, durante a incubação dos tubos de teste, e os monossacarídeos radioativos formados ($[\text{U-}^{14}\text{C}]$ -glicose e $[\text{U-}^{14}\text{C}]$ -frutose) podem ser captados, contribuindo para uma falsa medida de atividade de transporte ativo da sacarose. Cabe ressaltar que esse último inconveniente foi minimizado nos testes realizados, com a adição de 50 mM de glicose e 50 mM de frutose não radioativas, ao reagente que continha a sacarose marcada com radioisótopo, no intuito de minimizar a captação das hexoses radioativas formadas pela hidrólise extracelular.

Devida a estequiometria 1:1 no simporte açúcar/ H^+ , a técnica de registro de pH foi realizada para avaliar com maior precisão a atividade de transporte das células, utilizando uma concentração final de 20 mM de diferentes tipos de açúcares, os quais apresentam diferentes afinidades aos sistemas de transporte (STAMBUK et al., 1999; STAMBUK; BATISTA; DE ARAÚJO, 2000), conforme apresentado no item 2.2. Analisando a Figura 12-C, observa-se que a linhagem padrão (*Std*) não apresentou atividade de transporte para nenhum dos açúcares analisados, indicando que as células não expressavam transportadores de α -glucosídeos, principalmente a permease Agt1p. A concentração de açúcar utilizada no ensaio (20 mM) permite analisar apenas o funcionamento do sistema de transporte de alta afinidade pela sacarose, que apresenta *K_m* aproximado de 8 mM, uma vez que o transporte do dissacarídeo é realizado pelos transportadores Malx1p com baixa afinidade (*K_m* $\approx$ 120 mM), conforme descrito por Stambuk, Batista e De Araújo (2000). As leveduras engenhas apresentaram atividade de transporte de α -glucosídeos, como esperado, pois as células dependem totalmente do transportador Agt1p para realizar a metabolização da sacarose. Entretanto, a linhagem *iSUC2* apresentou atividade de transporte inferior ao observado à linhagem *suc2Δ*.

Linhagens de levedura chamadas “auxotróficas”, apresentam mutações em genes atuantes nas etapas de biossíntese de aminoácidos e de bases nitrogenadas, e por isso são incapazes de sintetizar todos os aminoácidos e bases nitrogenadas necessários ao seu metabolismo. As leveduras auxotróficas são importantes no âmbito da pesquisa, pois

Figura 12 - Atividades de transporte das linhagens padrão, *suc2Δ* e *iSUC2*, avaliada por diferentes técnicas experimentais.

NOTA: Após crescimento em meio YP contendo 2 % de sacarose, a atividade de transporte foi determinada em células intactas, utilizando o substrato sintético pNPαG (A), [U-¹⁴C] sacarose (B) e o co-transporte açúcar/H⁺ (C). * Não detectado.

FONTE: Dário (2012).

permitem detectar e selecionar micro-organismos modificados por engenharia genômica. Além disso, permitem avaliar a fisiologia de *S. cerevisiae* por inserção, nas células, de plasmídeos que portam genes de interesse concomitante a genes (por ex.: *URA3*, *TRP1* e outros) que reconstituem a capacidade das células de se desenvolverem em meio de cultura seletivo (PRONK, 2002; VAN DIJKEN et al., 2000). Entretanto, Pronk (2002) salienta que alterações metabólicas, regulatórias e morfológicas causadas pela limitação de nutrientes podem interferir na interpretação dos resultados experimentais. É amplamente aceito que meios de cultura obtidos a partir de extrato de leveduras e de peptona (meio YP) são ricos e complexos, não apresentando limitação de nutrientes. Da Cruz, Cilli e Ernandes (2002) demonstraram que meios suplementados com peptona, comparados aos meios suplementados com aminoácidos livres ou amônia, proporcionam crescimento mais rápido das leveduras, consumo mais acelerado dos açúcares e fermentação mais eficiente.

Entretanto, Corbacho et al. (2011) demonstraram que esse tipo de meio de cultura pode apresentar limitação de nutrientes, como por exemplo de uracila.

Com base nisso, linhagens provenientes da família de leveduras CEN.PK, que contem diferentes marcas auxotróficas, foram incluídas nos testes, com o intuito de avaliar a influência do requerimento auxotrófico na capacidade das células em metabolizar a fonte de carbono. Do mesmo modo que foi apresentado no item 5.1, a levedura CEN.PK2-1C foi utilizada como linhagem padrão por Dário (2007) e ALVES Jr. (2010) para obter-se respectivamente, as linhagens MGD-01 (*suc2Δ*) e LCM003 (*agt1Δ*). As leveduras padrão, CEN.PK2-1C e CEN.PK113-5D, requerem diferente suplementação de nutrientes no meio de cultura, bem como as suas isogênicas engenhradas nos genes *SUC2* e *AGT1*. Assim, as leveduras utilizadas nessa etapa do trabalho podem ser classificadas em dois grupos: (1) leveduras que necessitam Leucina, Histidina, Triptofano e Uracila, por apresentarem genótipo *leu⁻*, *his⁻*, *trp⁻* e *ura⁻* (linhagens CEN.PK2-1C, LCM003 e MGD-01) e (2) leveduras que necessitam apenas Uracila, por apresentar genótipo *ura⁻* (linhagens CEN.PK113-5D, MTY-01, MGD-02 e BSY21-34B) (comparar genótipo relevante apresentado na Tabela 1).

Após a caracterização fisiológica das modificações genéticas realizadas na levedura padrão CEN.PK113-5D, foi avaliada a capacidade de utilização de diferentes açúcares pelas leveduras pertencentes aos dois grupos determinados anteriormente, inicialmente, através de cultivos em micro-escala. Além da glicose e sacarose - substratos normalmente encontrados no processo fermentativo brasileiro para produção de etanol combustível - foi verificada a utilização de maltose e maltotriose, no intuito de analisar a funcionalidade dos genes *MAL* e *AGT1* nas leveduras, uma vez que há interconexão entre as vias de metabolização dos açúcares mencionados.

Na Figura 13, observa-se que houve um perfil de crescimento indistinto das linhagens analisadas em glicose e maltose. Esse resultado já era previsto, pois o gene *SUC2* não é envolvido na metabolização desses dois açúcares, bem como o gene *AGT1*, que embora realize o transporte de maltose, o faz com baixa afinidade. O crescimento das linhagens em maltose indica que nessas leveduras ao menos um *locus MAL* é funcional, e portanto contêm os 3 genes necessários para metabolizar esse açúcar (*MALx1*, *MALx2*, *MALx3*). De fato, o crescimento em maltose era esperado, pois essas leveduras apresentam genótipo *MAL* constitutivo. As linhagens *agt1Δ* (LCM003 e MTY-01) não apresentaram crescimento em maltotriose, pois a presença da permease Agt1p é considerada essencial para que *S.*

cerevisiae seja capaz de metabolizar esse trissacarídeo, conforme descrito por Alves Jr. et al. (2008) e Alves Jr. (2010). Por outro lado, as linhagens *agt1Δ* continuaram crescendo normalmente em sacarose. Já as linhagens engenhradas no gene *SUC2*, *suc2Δ* (MGD-01 e MGD-02) e *iSUC2* (BSY21-34B), apresentam crescimento distinto em sacarose (aparentemente mais lento) quando comparadas às demais leveduras, destacando-se a linhagem BSY21-34B, que apresentou tempo de crescimento superior a 25 horas nesse experimento, enquanto que as demais linhagens já haviam alcançado a fase estacionária de crescimento.

Figura 13 - Cultivo das linhagens analisadas em placas para ELISA contendo meio rico (YP) e diferentes fontes de carbono.

FONTE: Dário (2012).

A seguir, as leveduras foram cultivadas em frascos Erlenmeyer contendo meio YP e 2% de fonte de carbono (glicose ou sacarose). Alíquotas foram retiradas das culturas ao longo do tempo de cultivo, para possibilitar a determinação do perfil de metabolização dos açúcares e estimar os parâmetros fisiológicos das linhagens analisadas.

Nos crescimentos em frascos agitados contendo 20 g.L⁻¹ de glicose, o consumo do açúcar presente no meio de cultura e a concomitante produção de etanol foram observados durante a fase exponencial de crescimento. Houve cessão do crescimento celular após o

término da glicose (Figura 14), quando ocorreu o fenômeno conhecido por “parada diáuxica”, o qual as células, por não estarem mais reprimidas pela presença do açúcar no meio, passam a modular o seu metabolismo para utilizar o etanol produzido durante a primeira fase de crescimento exponencial (LEWIS et al., 1993; YOUNG et al, 2003). O etanol produzido e acumulado no meio de cultura foi utilizado como fonte de carbono por todas as linhagens, estendendo os cultivos até entre 40 e 50 horas (dados não mostrados).

As leveduras pertencentes ao mesmo grupo de auxotrofia não apresentaram diferença entre si nos parâmetros fisiológicos quando cultivadas na presença de glicose, conforme apresenta a Figura 14-B. Os resultados sugerem que as alterações genéticas não alteraram a fisiologia das leveduras durante o crescimento em glicose, conforme o esperado, pois o alvo da engenharia genética era modificar o metabolismo de sacarose. Entretanto, quando comparamos os (02) dois grupos de leveduras auxotróficas, observa-se que as linhagens requerentes apenas de uracila apresentaram maior rendimento na produção de etanol ($Y_{Eth/S}^{Exp} \approx 0,25 \text{ gEth.gGlu}^{-1}$) e menor rendimento na produção de biomassa ($Y_{X/S}^{Exp} \approx 0,12 \text{ gDW.gGlu}^{-1}$), quando comparadas com as leveduras do outro grupo, com maior número de auxotrofias ($Y_{ETH/S}^{Exp} \approx 0,20 \text{ gEth.gGlu}^{-1}$ e $Y_{X/S}^{Exp} \approx 0,14 \text{ gDW.gGlu}^{-1}$). Somando-se a isso, os resultados sugerem que as leveduras auxotróficas apenas para uracila, quando comparadas com as linhagens pertencentes ao grupo originado a partir da levedura CEN.PK2-1C, apresentaram maiores velocidades de consumo de glicose (μ_{gli}^{Exp}) e de produção de etanol (μ_{Eth}^{Exp}), parâmetros que refletiram diretamente na maior velocidade de crescimento (μ_x) e no menor tempo de geração (tg) dessas células.

Sabe-se que a uracila, por exemplo, é captada pelas células por um sistema de co-transporte com próton H^+ (PANTAZOPOULOU; DIALLINAS, 2007) e que para a manutenção da homeostase do pH intracelular, há proteínas H^+ -ATPase na membrana celular das leveduras que funcionam como bombas, lançando os íons H^+ presente no citoplasma das células ao ambiente extracelular com gasto de energia (ATP). Dessa forma, acredita-se que a discrepância, observada nos parâmetros fisiológicos dos dois grupos de leveduras, foram reflexo da interferência fisiológica sofrida pelas células por necessitarem adquirir do meio de cultura os nutrientes necessários para suprir a sua carência nutricional. De fato, Basso et al. (2010) realizaram cultivos contínuos com meio de cultura suplementado com quantidade limitante de uracila, e observaram drástica alteração na fisiologia da levedura *S. cerevisiae*, por desvio da fonte de carbono à formação de etanol e acetato, mesmo em condições que

normalmente levariam as células a gerar energia através do metabolismo respiratório (condição de aerobiose). Em outro exemplo de alterações importantes à fisiologia de *S. cerevisiae*, geradas por limitação de requerimento nutricional, Çakar, Sauer e Bailey (1999) compararam linhagens auxotróficas para leucina com leveduras prototróficas, e obtiveram diferente concentração celular, na fase estacionária de cultivos descontínuos suplementados com diferentes concentrações do requerimento nutricional, até mesmo nos casos em que a restauração da auxotrofia nas células foi realizada por inserção de plasmídeos contendo o gene *LEU2*.

Do mesmo modo que foi observado nos crescimentos em glicose, nos experimentos em frascos agitados contendo 20 g.L⁻¹ de sacarose houve concomitante consumo do açúcar presente no meio de cultura e produção de etanol durante a fase exponencial de crescimento, e após a parada diáuxica, o crescimento celular estendeu até entre 40 e 50 horas de cultivo, por utilização, como fonte de carbono, do etanol produzido a partir da metabolização da sacarose (dados não mostrados).

Analisando separadamente as linhagens não modificadas no gene *SUC2* (*Std* e *agt1Δ*), observa-se através da Figura 15 que a metabolização da sacarose é realizada, principalmente, por ação da invertase periplasmática, pois houve aparecimento de glicose e frutose no meio de cultura, sendo esses monossacarídeos transportados posteriormente ao interior das células. Dessa forma, a hidrólise extracelular constitui a principal via de metabolização desse açúcar, nas linhagens que contêm o gene *SUC* não modificado. Foi demonstrado anteriormente nas análises fenotípicas das alterações genéticas realizadas no genoma da levedura padrão, que a linhagem *agt1Δ* (MTY-01) apresentou atividade de invertase menor que a levedura *Std* (CEN.PK113-5D), tanto nos níveis de atividade total quanto nos níveis de atividade da forma extracelular dessa enzima (Figura 10-A). Esse resultado teve reflexo nos cultivos em frasco agitado (Figura 15), pois foi observado acúmulo de concentrações menores de glicose e frutose no meio de cultura das linhagens *agt1Δ* (MTY-01 e LCM003) quando comparadas às suas leveduras isogênicas padrão (CEN.PK113-5D e CEN.PK2-1C). Com a menor atividade de hidrólise e a incapacidade das leveduras *agt1Δ* em realizar o transporte do dissacarídeo, esperava-se que a velocidade de consumo da sacarose seria menor nas leveduras engenhada. Entretanto, a diferença no perfil de metabolização da sacarose não refletiu em diferenças significativas nos parâmetros fisiológicos das leveduras

Figura 14 - Metabolização da glicose e parâmetros fisiológicos das linhagens analisadas, cultivadas em frascos agitados contendo meio rico (YP) e 2% da fonte de carbono.

Auxotrofia	Linhagens <i>Std</i>	Linhagens <i>agt1Δ</i>	Linhagens <i>suc2Δ</i>	Linhagem <i>isUC2</i>
Leu ⁻ , His ⁻ , Trp ⁻ e Ura ⁻	—■— CEN.PK2-1C	—●— LCM003	—▲— MGD-01	
Ura ⁻	—■— CEN.PK113-5D	—●— MTY-01	—▲— MGD-02	—◆— BSY 21-34B

NOTA: (A) Perfil de metabolização da glicose ao longo do tempo de cultivo. Os experimentos foram realizados em duplicata, porém o perfil apresentado reflete os dados de apenas um experimento. (B) Parâmetros fisiológicos obtidos durante a fase exponencial de crescimento das leveduras. São apresentados os valores médios e os desvios da média de dois experimentos independentes.

FONTE: Dário (2012).

sem a permease Agt1p, em comparação com as leveduras padrão. Apenas os resultados de rendimento da produção de células ($Y_{X/S}^{Exp}$) indicaram que aparentemente houve maior rendimento na formação de células pelas linhagens *agt1Δ*. Com isso, futuramente seria interessante realizar testes mais controlados para melhor avaliar os resultados obtidos, investigando possíveis vias de sinalização atuantes nesse caso, bem como a alteração na expressão dos genes que codificam a permeases de membrana responsáveis pelo transporte de hexoses.

Analisando os resultados obtidos com as leveduras engenhas no gene *SUC2* (Figura 16), observa-se que a linhagem BSY21-34B se destacou por apresentar lento perfil de crescimento, quando comparadas às demais leveduras, uma vez que sua cultura em frascos agitados contendo sacarose como fonte de carbono apresentou tempo superior a 20 horas para realizar a parada diáuxica (Figura 16-A). As linhagens *suc2Δ* apresentaram menor velocidade de crescimento (μ_x) e maior tempo de geração (tg) ($\mu_x \approx 0,29 \text{ h}^{-1}$ e $tg \approx 2,30 \text{ h}$) quando comparadas as respectivas linhagens isogênicas padrão, CEN.PK2-1C e CEN.PK113-5D ($\mu_x \approx 0,32 \text{ h}^{-1}$ e $tg \approx 2,00 \text{ h}$). Porém, os mesmos parâmetros obtidos para a levedura *iSUC2* ($\mu_x \approx 0,15 \text{ h}$ e $tg \approx 4,30 \text{ h}$) apresentaram valores indicativos de um crescimento ainda mais lento. Além dos parâmetros fisiológicos de crescimento, em comparação com as leveduras *Std*, as leveduras engenhas (*suc2Δ* e *iSUC2*) apresentaram consumo da sacarose (μ_{Sac}^{Exp}) e de produção de etanol (μ_{Eth}^{Exp}) mais lentos, enquanto que por outro lado, apresentaram maior rendimento na produção de etanol ($Y_{Eth/S}^{Exp}$), destacando-se a levedura BSY21-34B (Figura 16-B). Sobre esses resultados, cabe também salientar que as linhagens engenhas apresentaram menor produção de glicerol (Tabela 10) e menor concentração de açúcar residual durante os seus cultivos (Figura 16-A, gráfico de concentração de frutose), quando comparadas com as linhagens padrão.

O glicerol é normalmente produzido durante a fermentação por *S. cerevisiae*, a partir da dihidroxiacetona fosfato. A via de síntese desse composto é apontada como auxiliar a via de produção de etanol, na realização do balanço redox de co-fatores das células cultivadas em condições anaeróbicas, por conversão do NADH em NAD^+ , e consequentemente permitindo o crescimento celular (BARNETT, 2003; CORDIER et al., 2007; VAN DIJKEN; SCHEFFERS, 1986). Durante os cultivos em sacarose, não foi detectada a produção de glicerol pelas linhagens engenhas no gene *SUC2* (Tabela 10), fato que pode estar relacionado ao menor rendimento na produção de células ($Y_{X/S}^{Exp}$) por essas linhagens, quando comparadas

Figura 15 - Metabolização da sacarose e parâmetros fisiológicos das linhagens não modificadas no gene *SUC2*, cultivadas em frascos agitados contendo meio rico (YP) e 2% da fonte de carbono.

NOTA: (A) Perfil de metabolização da sacarose ao longo do tempo de cultivo. Os experimentos foram realizados em duplicata, porém o perfil apresentado reflete os dados de apenas um experimento. (B) Parâmetros fisiológicos obtidos durante a fase exponencial de crescimento das leveduras. São apresentados os valores médios e os desvios da média de dois experimentos independentes.

FONTE: Dário (2012).

as suas linhagens isogênicas padrão (Figura 16-B). Por outro lado, trabalhos apontam que o glicerol é produzido e acumulado pelas leveduras em resposta à alta osmolaridade do meio de cultura, devido à presença de alta concentração de açúcar (ANDO et al., 2006; CORDIER et al., 2007; CRONWRIGHT et al., 2002). A alteração na osmolaridade do ambiente extracelular induz a saída de água do interior da célula, podendo causar a morte celular (FOLCH-MALLOL; GARAY-ARROYO; LLEDIAS, 2004). Nesse caso, as leveduras direcionam o seu metabolismo à produção e retenção do glicerol, permitindo às células manter o equilíbrio osmótico intracelular e evitar a perda de água (HERSEN et al., 2008).

Neste trabalho, foi observado que durante a fase exponencial de crescimento das leveduras não engenhadas no gene *SUC2* (*Std* e *agt1Δ*) houve acúmulo de glicose e frutose no meio de cultura, devida à hidrólise extracelular da sacarose. Nos crescimentos das linhagens engenhadas no gene *SUC2* (*suc2Δ* e *iSUC2*) foram encontradas baixas concentrações desses monossacarídeos (Figura 16-A e Tabela 10). Nessa segunda situação, provavelmente não houve alteração na condição de osmolaridade do meio de cultura, e consequentemente, acredita-se que não houve indução na produção e na retenção do glicerol pelas leveduras engenhadas (Tabela 10).

Através da Figura 16-A e da Tabela 10, é possível observar que a concentração de frutose no meio de cultura foi maior que a concentração de glicose, ao longo do tempo de cultivo das linhagens que realizam a hidrólise extracelular da sacarose. Somando-se a isso, uma concentração residual de aproximadamente $0,5 \text{ g.L}^{-1}$ ($\approx 2,5 \text{ mM}$) de frutose - quantidade de açúcar que não foi totalmente consumido pelas células - foi encontrada no meio de cultura dessas linhagens, após a cultura atingir a fase estacionária de crescimento. Todavia, nos cultivos das linhagens engenhadas no gene *SUC2* (*suc2Δ* e *iSUC2*), foram encontradas baixas concentrações desses monossacarídeos ao longo do tempo de cultivo e não foi encontrada concentração residual de açúcar, após a cultura atingir a fase estacionária. Isso indica melhor aproveitamento da fonte de carbono pelas células engenhadas, fato que pode ter contribuído para que essas linhagens apresentassem maior produção de etanol ($Y_{Eth/S}^{Exp}$), que as leveduras padrão.

A diferença observada durante os experimentos, entre a cinética de metabolização da glicose e da frutose, foi avaliada em trabalhos anteriores, que apontam como causa para esse fato, diferenças de afinidade desses açúcares pelas permeases e pelas hexoquinases. As hexoquinases (Hxk1p e Hxk2p), enzimas atuantes na etapa inicial da via glicolítica e que tem

Figura 16 - Metabolização da sacarose e parâmetros fisiológicos das linhagens modificadas no gene *SUC2*, cultivadas em frascos agitados contendo meio rico (YP) e 2% da fonte de carbono.

NOTA: (A) Perfil de metabolização da sacarose ao longo do tempo de cultivo. Os experimentos foram realizados em duplicata, porém o perfil apresentado reflete os dados de apenas um experimento. (B) Parâmetros fisiológicos obtidos durante a fase exponencial de crescimento das leveduras. São apresentados os valores médios e os desvios da média de dois experimentos independentes.

FONTE: Dário (2012).

Tabela 10 - Concentrações máximas de glicose, de frutose e de glicerol encontrados nos cultivos das linhagens cultivadas em frascos agitados contendo 20 g.L⁻¹ de sacarose.

Analito*	Linhagem analisada						
	CEN.PK2-1C	LCM003	MGD-01	CEN.PK113-5D	MTY-01	MGD-02	BSY 21-34B
Glicose	0,61 ± 0,14	0,50 ± 0,08	0,05 ± 0,01	0,52 ± 0,05	0,50 ± 0,04	0,01 ± 0,01	0,02 ± 0,01
Frutose	1,65 ± 0,62	1,16 ± 0,27	0,20 ± 0,05	1,63 ± 0,33	1,52 ± 0,23	0,09 ± 0,01	0,12 ± 0,01
Glicerol	0,13 ± 0,02	0,13 ± 0,01	nd**	0,12 ± 0,01	0,13 ± 0,02	nd	nd

NOTA: * Valores máximos encontrados nos cultivos, expressos em g.L⁻¹. Os dados estão apresentados como média e o desvio padrão de dois experimentos independentes.

** Não detectado.

FONTE: Dário (2012).

o papel de fosforilar as hexoses, apresentam diferentes afinidades por esses açúcares, além de serem expressas em diferentes momentos durante um cultivo. Embora exista discrepância na cinética de fosforilação desses açúcares, o transporte através da membrana plasmática das células é apontado como o passo limitante no processo de fermentação dessas hexoses (BERTHELS et al., 2004, 2008). Sabe-se que os genes *HXT1* a *HXT7* codificam para as principais permeases responsáveis pelo transporte de monossacarídeos (glicose e frutose), mas com afinidade menor pela frutose, motivo pelo qual a glicose é captada mais rapidamente. Em *S. cerevisiae* são descritos dois sistemas de transporte: um de baixa afinidade (K_m 15 a 20 mM) que é expresso de forma constitutiva, e outro de alta afinidade (K_m 1 a 2 mM) que é regulado pela glicose (OZCAN; JONHSTON, 1999). Brejning, Jespersen e Arneborg (2003) e Perez et al. (2005) analisaram a expressão dos transportares de hexoses em leveduras utilizadas na produção de vinhos, e verificaram que, o gene *HXT1* é expresso no início da fermentação e não apresenta função na fase estacionária, o gene *HXT2* é expresso somente durante a fase *lag* de crescimento das células, o gene *HXT3* é expresso ao longo do cultivo e a sua expressão diminui a partir da fase estacionária, e os genes *HXT6* e *HXT7* são expressos a partir da fase estacionária. Assim, a metabolização dos monossacarídeos (glicose e frutose) apresenta diferente regulação e afinidade aos diferentes tipos de transportadores, pois são captados por tipos específicos de transportadores, expressos conforme a disponibilidade de açúcares no ambiente extracelular das células (BERTHELS et al., 2004, 2008; BISSON; FRAENKEL, 1983; OZCAN; JONHSTON, 1999). A concentração residual de frutose ($\approx 2,5$ mM), encontrada nas culturas das leveduras que realizam a hidrólise extracelular da sacarose, foi próxima ao K_m do sistema de transporte de alta afinidade para a frutose (K_m 4 a 8 mM), conforme descrito por Bisson e Fraenkel (1983).

Os resultados indicaram (Figuras 10 e 11), que as linhagens *suc2Δ* metabolizam a sacarose por transportar ativamente o açúcar, através da membrana celular, e por realizar a hidrólise do açúcar no ambiente intracelular pela ação da maltase. Já a linhagem *iSUC2*, metaboliza a sacarose também por transportar ativamente o açúcar, e por realizar a hidrólise do açúcar no ambiente intracelular, em grande parte por ação da forma intracelular da invertase, mas também com participação da maltase. Acredita-se que a maior produção de etanol alcançada pela linhagem *iSUC2* foi devido a sua maior capacidade de hidrolisar o açúcar (alta atividade da invertase intracelular e atividade maltase), que não estaria limitando a entrada de açúcar na via glicolítica, em comparação a linhagem *suc2Δ*, que por outro lado, a metabolização do açúcar fica condicionada a menor capacidade dessa células em hidrolisar a sacarose (apenas atividade maltase). Por outro lado, os resultados de transporte revelaram que a linhagem *iSUC2* apresenta menor capacidade de captação do açúcar que a levedura *suc2Δ*, explicando o crescimento mais lento dessa linhagem (Figura 11).

O resultado de crescimento lento apresentado pela linhagem *iSUC2* foi inesperado, pois devido à alta atividade de invertase intracelular, esperava-se que essa levedura seria capaz de incrementar a capacidade de transporte, e consequentemente apresentaria maior velocidade de crescimento, em comparação a levedura *suc2Δ*. Com isso, suspeitou-se que a modificação realizada na linhagem *iSUC2* poderia ter promovido uma alteração inesperada no metabolismo dessa levedura.

Sabe-se que ocorrem alterações no metabolismo de *S. cerevisiae* quando as células são cultivadas em diferentes condições experimentais, como no caso de crescimento oxidativo, crescimento respiro-fermentativo e crescimento fermentativo (FRICK; WITTMANN, 2005; VAN DEN BRINK et al., 2008a). Frick e Wittmann (2005) demonstraram que o fluxo metabólico pode ser desviado da via das pentoses fosfato para glicólise, durante crescimento oxidativo, e o oposto ocorre em crescimento fermentativo, além de outras alterações que ocorrem conforme a condição de crescimento, alterando a biossíntese do aminoácido alanina, o ciclo dos ácidos tricarboxílicos e a formação NADPH. Análises de transcriptoma e de proteômica realizadas por Zuzuarregui et al. (2006) em linhagens utilizadas na produção de vinhos, indicaram que há diferenças nos perfis de RNAm e de proteínas, que conferem diferente perfil de fermentação às leveduras. Trabalhos apontam que devido à limitação de oxigênio molecular (O_2), há alteração na composição protéica da

parede celular, e consequentemente resulta em alterações na morfologia das células (ABRAMOVA et al., 2001; KLIS; BOORSMA; DE GROOT, 2006), pois o O_2 é necessário em várias vias biossintéticas, tais como: síntese do heme, de esteróis, de ácidos graxos insaturados, de pirimidinas e de desoxirribonucleótidos (LAI et al., 2006; SNOEK; STEENSMA, 2007). Van den Brink et al. (2008b) demonstraram que os metabólitos intracelulares influenciam fortemente na regulação do fluxo glicolítico, realizando o controle da expressão de uma série de genes, dentre eles o gene *ADH1*. Além disso, Koschwanez, Foster e Murray (2011) demonstraram que a síntese de invertase representa um custo de 0,35% na manutenção do metabolismo de células que são forçadas a expressar essa enzima (que apresentam gene *SUC* não modificado), em comparação com células *suc2Δ*.

Com base nesses aspectos, a alta atividade da invertase intracelular da levedura *iSUC2*, talvez possa ter promovido desvio do fluxo de carbono, que seria utilizado na obtenção de energia (ATP) e de precursores necessários à síntese dos transportadores e enzimas necessárias a metabolização da fonte de carbono, para a biossíntese da enzima invertase, prejudicando sensivelmente outras vias metabólicas nas células engenhas *iSUC2*. Além disso, acredita-se que o controle metabólico pode ter sido prejudicado, pois na condição fisiológica a qual a expressão do gene *SUC2* deveria ser reprimida, ocorreria o aumento da expressão. Cabe salientar que a modificação genética realizada, para obter a linhagem *iSUC2*, envolveu a inserção de uma versão truncada da região promotora do gene *ADH1* (P_{ADH1} - que controla a expressão da enzima Álcool Desidrogenase de *S. cerevisiae*), para controlar a expressão do gene *SUC2*. Sabe-se que o P_{ADH1} responde fortemente a presença de glicose, aumentando a expressão do gene a qual esse promotor controla (DEMARINI; CARLIN; LIVI, 2001).

Para uma avaliação preliminar desse fato, as linhagens padrão (CEN.PK113-5D) e BSY21-34B foram cultivadas, em balão de Erlenmeyer contendo meio rico (YP) e 2% de glicose ou de maltose como fonte de carbono, e utilizadas para avaliar a atividade de transporte e da invertase total. A Figura 17-A demonstra que, conforme o esperado, não houve atividade de transporte do substrato sintético *pNPαG* nas leveduras cultivadas em glicose, pois esse monossacarídeo atua como repressor da expressão dos genes *MAL*, embora esses genes sejam constitutivos na família de leveduras CEN.PK. Como esperado, as células crescidas em maltose apresentaram atividade de transporte, pois esse dissacarídeo atua como indutor da expressão dos genes *MAL*. Entretanto, as células cultivadas em

maltose não apresentaram diferença significativa na atividade de transporte do substrato *pNPαG*.

Na análise de atividade da invertase total, esperava-se maior atividade para as células da levedura engenhada *iSUC2*, em comparação à levedura padrão, devido à presença do promotor forte controlando a expressão do gene *SUC2*. Entretanto, não foi observado aumento significativo na atividade da invertase total nas células da linhagem *iSUC2* cultivadas em maltose, em comparação as células cultivadas em glicose (Figura 17-B). Com esses resultados, acredita-se que, aparentemente, o crescimento mais lento da levedura engenhada *iSUC2* se deve por repressão na expressão e inativação catabólica dos transportadores, e não apresenta relação com a sobre-expressão do gene *SUC2*. De encontro a essa hipótese estão os resultados do crescimento em glicose, apresentados anteriormente (Figura 14), que mostraram metabolização da glicose pela levedura engenhada semelhante à linhagem padrão, mesmo sobre-expresando a invertase intracelular nestas condições (Figura 17). Porém, ressalta-se que estudos mais aprofundados, que permitam avaliar essas diferenças de forma quantitativa, são necessários para analisar o crescimento lento em sacarose, apresentado pela levedura *iSUC2*.

Figura 17 - Atividades de transporte e da enzima invertase (β -frutosidase) nas linhagens CEN.PK113-5D e BSY21-34B, cultivadas em glicose e maltose.

NOTA: Após cultivo em meio YP contendo 2 % de glicose ou maltose como fonte de carbono, células intactas foram utilizadas para determinar a atividade de transporte do substrato sintético *pNPαG* (A), e células permeabilizadas foram utilizadas para determinar a atividade da invertase total (B).

FONTE: Dário (2012).

5.3 Caracterização das linhagens de *S. cerevisiae* através de cultivos contínuos

Em *S. cerevisiae*, o transporte ativo, de dissacarídeos e de trissacarídeos, é realizado através do co-transporte com íons H^+ , enquanto que o transporte de monossacarídeos é realizado por difusão a favor do gradiente de concentração, conforme descrito no item 2.2. Uma análise comparativa entre esses sistemas de transporte permite avaliar que a metabolização de uma mesma concentração molar de diferentes açúcares (por exemplo, maltose e glicose), proporciona menor rendimento energético (saldo de ATP) às células que transportam ativamente a maltose, pois a manutenção da homeostase do pH intracelular envolve gasto de ATP (WEUSTHUIS et al., 1993). Essa avaliação foi realizada por Weusthuis et al. (1993), que descreveu ganho às células, de 3 moles de ATP por mol de maltose consumido, e de 4 moles de ATP para 2 moles de glicose consumida (quantidade que equivalente a um mol de maltose). O transporte ativo da maltose é realizado com estequiometria 1:1, ou seja, uma molécula de açúcar juntamente com uma de próton. Na manutenção do pH citoplasmático ocorre o gasto de 01 (uma) molécula de ATP para cada próton lançado pelas H^+ -ATPases, obtendo-se assim no saldo final do balanço energético, 3 moles de ATP por mol de maltose consumido pelas células. Na situação de anaerobiose, as células cultivadas em maltose apresentam aumento no fluxo glicolítico para repor a energia perdida no lançamento do próton, e para formar a mesma quantidade de biomassa que as células cultivadas em glicose, apresentam maior produção de etanol.

Aplicando esses conceitos no contexto deste trabalho, em uma análise comparativa entre as leveduras analisadas - que apresentam formas diferentes de metabolizar sacarose - acreditar-se-ia na obtenção de resultados semelhantes aos descritos por Weusthuis et al. (1993). As leveduras não modificadas, que metabolizam a sacarose por hidrólise extracelular e transporte das hexoses (glicose e a frutose) por difusão, obteriam ganho energético de 4 moles de ATP por mol de sacarose consumido, quando cultivadas em condições de anaerobiose. Por outro lado, nas mesmas condições, as linhagens engenhradas no gene *SUC2* (*suc2Δ* e *iSUC2*), que necessitam transportar a sacarose na forma de dissacarídeo e realizar a hidrólise do açúcar no ambiente intracelular, obteriam ganho energético de 3 moles de ATP. Da mesma forma, esperar-se-ia que as leveduras engenhradas no gene *SUC2* apresentariam aumento no fluxo glicolítico para repor a energia perdida na manutenção do pH

citoplasmático, e para formar a mesma quantidade de biomassa que as células não modificadas, apresentariam maior produção de etanol.

Experimentos bem controlados são necessários para comprovar o exposto acima, e verificar os efeitos causados às células que apresentam alteração na captação da sacarose. Assim, em colaboração com o grupo de pesquisa do prof. Dr. Andreas Karoly Gombert, as leveduras *SUC2*, *suc2Δ* e *iSUC2* foram cultivadas em sistema contínuo (quimiostato), estratégia experimental que auxilia na investigação da energética envolvida no transporte de açúcares (WEUSTHUIS et al., 1994). O uso de linhagens auxotróficas é importante nas áreas da biologia molecular e da engenharia metabólica, porém, sua utilização deve ser cautelosa, principalmente em estudos quantitativos, como é o caso das análises realizadas através dos cultivos em quimiostato. De fato, Basso et al. (2010) realizaram cultivos contínuos utilizando meio de cultura suplementado com quantidade limitante de uracila, e observaram alteração na fisiologia da levedura *S. cerevisiae*, devido ao desvio da fonte de carbono à formação de etanol e acetato, mesmo em condições que normalmente as células apresentariam metabolismo totalmente respiratório (células cultivadas sob condição de aerobiose plena e sob limitação de glicose). Para evitar problemas experimentais e a interpretação equivocada de resultados, como as enfrentadas por esses autores, preconiza-se a utilização de linhagens totalmente prototróficas em estudos quantitativos e que apresentem as modificações genéticas integradas ao genoma da levedura (PRONK, 2002).

As células das leveduras padrão (CEN.PK113-7D - *Std*) e *suc2Δ* (IMK-316), ambas prototróficas, foram analisadas após cultivo contínuo operado a uma vazão específica (D) de $0,10 \text{ h}^{-1}$, em condição de anaerobiose total e sob limitação de sacarose como única fonte de carbono, e empregando meio sintético totalmente definido. Conforme apresenta a Tabela 11, os resultados obtidos, a partir de amostras coletadas durante o estado estacionário, revelaram que a linhagem *suc2Δ* apresentou rendimento na conversão de sacarose a células 23 % menor que a linhagem *Std* (CEN.PK113-7D), ($Y_{X/S} = 0,072 \text{ gDW} \cdot \text{gGLU eq}^{-1}$ e $0,094 \text{ gDW} \cdot \text{gGLU eq}^{-1}$, respectivamente). Além disso, comparando os rendimentos na conversão de sacarose a etanol ($Y_{Eth/S}$), foi observado um rendimento 6% maior para a levedura engenhada, em relação à linhagem padrão *SUC2* ($Y_{Eth/S} = 0,401 \text{ gETH} \cdot \text{gGLU eq}^{-1}$ e $0,378 \text{ gETH} \cdot \text{gGLU eq}^{-1}$, respectivamente). Cabe salientar que os valores teóricos de mudança no $Y_{X/S}$ e $Y_{Eth/S}$ são, respectivamente, 25% e 8% (WEUSTHUIS et al., 1993). Os valores obtidos para velocidade de consumo da sacarose (q_{sac}) e para formação de etanol (q_{Eth}) indicam

maior atividade do fluxo glicolítico na linhagem engenhada, representando respectivamente, maior captação da sacarose e maior formação de etanol. Os resultados obtidos para q_{Eth} foram corroborados pelos dados de velocidade de formação de CO_2 (q_{CO_2}), uma vez que em condição de anaerobiose total, há liberação concomitante de um (01) mol de CO_2 para cada mol de etanol produzido. Observa-se que a levedura sem invertase apresentou menor velocidade de formação de glicerol (q_{Gly}), indicativo que essa levedura produz, de fato, menos glicerol que a levedura padrão, corroborando os resultados apresentados no item 5.2.

Tabela 11 - Parâmetros fisiológicos das linhagens CEN.PK113-7D e IMK-316 cultivadas em sistema contínuo.

Linhagem	Parâmetro Fisiológico ^(a)					
	$Y_{x/s}$	$Y_{Eth/s}$	q_{Eth}	q_{CO_2}	$q_{Sac}^{(b)}$	q_{Gly}
Std (CEN.PK113-7D)	0,094	0,378	9,34	10,35	2,94	0,77
suc2Δ (IMK-316)	0,072	0,401	11,64	13,30	3,52	0,68

NOTA: Após cultivo contínuo das células em meio sintético definido, sob limitação de sacarose e em condição de anaerobiose total, as amostras coletadas durante o estado estacionário da cultura foram utilizadas para determinar os parâmetros informados na tabela.

^(a) $Y_{x/s}$ = Rendimento na conversão de substrato a células, expresso em grama de biomassa seca formada, por grama de sacarose em equivalente de glicose consumida (gDW . gGLU eq⁻¹); $Y_{Eth/s}$ = Rendimento na conversão de substrato a etanol, expresso em grama de etanol formado, por grama de sacarose em equivalente de glicose consumida (gETH . gGLU eq⁻¹); q = velocidade específica de consumo de sacarose, ou de formação de produto (Etanol, Glicerol e CO_2), expressos em mmol formado/consumido por grama de biomassa seca por hora.

^(b) expresso em mmol GLU eq = mmol de sacarose em número equivalente de glicose.

FONTE: Dário (2012).

As células das leveduras *Std* (CEN.PK113-5D) e *iSUC2* (BSY21-34B), ambas auxotróficas para uracila, foram analisadas após cultivo contínuo operado a uma vazão específica (D) de $0,10\ h^{-1}$, em aerobiose plena ou anaerobiose total e sob limitação de sacarose ou de glicose como única fonte de carbono, e empregando meio sintético totalmente definido. Os resultados obtidos, a partir de amostras coletadas durante o estado estacionário, são apresentados na Tabela 12. Os resultados obtidos após os cultivos realizados com glicose como substrato limitante, tanto em aerobiose plena como em anaerobiose total, demonstraram que aparentemente não houve diferença entre as leveduras analisadas, indicando que a modificação genética realizada na levedura *iSUC2* não alterou sua fisiologia.

Nos cultivos da levedura *iSUC2*, realizados em anaerobiose e sob limitação de sacarose, observou-se que essa linhagem apresentou, em relação à levedura padrão, rendimento na conversão de sacarose a células 13% menor ($Y_{x/s} = 0,095 \pm 0,003\ gDW.gGLU\ eq^{-1}$ e $0,109 \pm 0,001\ gDW.gGLU\ eq$, respectivamente), rendimento da conversão de sacarose

a etanol 5% maior ($Y_{Eth/S} = 0,382 \pm 0,004$ gETH.gGLU eq⁻¹ e $0,363 \pm 0,005$ gETH.gGLU eq⁻¹, respectivamente) e velocidade de formação de etanol 22% maior ($q_{Eth} = 8,97 \pm 0,27$ mmol.gDW⁻¹.h⁻¹ e $7,34 \pm 0,19$ mmol.gDW⁻¹.h⁻¹, respectivamente). Além disso, os valores de velocidade específica de formação de CO₂ (q_{CO_2}) e consumo de O₂ (q_{O_2}) foram maiores para a levedura engenhada, indicado que a atividade do metabolismo celular dessa linhagem é maior que da levedura padrão. Esses resultados indicam que a alteração genética resultou em incremento na produção de etanol, para compensar o déficit energético apresentado pelas células engenhadas *iSUC2*. Ao contrário do que era esperado, pois contradiz os resultados apresentados no item 5.2, foi observada maior velocidade de formação de glicerol (q_{Gly}) pela levedura engenhada.

Avaliando os resultados apresentados na Tabela 12, observa-se que a levedura engenhada apresentou consumo incompleto da fonte de carbono, como pode ser observado nas concentrações de açúcares residuais. A presença de sacarose no meio de cultura, como açúcar residual (Tabela 12), causou surpresa, pois indica à possível limitação no transporte do açúcar pela levedura *iSUC2*.

Nos cultivos realizados em aerobiose e sob limitação de sacarose, foi observado que ambas as linhagens, apresentaram metabolismo totalmente respiratório como esperado, pois não foi observada produção de etanol. Os valores de velocidade específica de formação de CO₂ (q_{CO_2}) e consumo de O₂ (q_{O_2}) foram maiores para a levedura engenhada, indicado que a atividade do metabolismo celular dessa linhagem é maior que da levedura padrão, do mesmo modo que foi observado para as células cultivadas em anaerobiose. Analisando o rendimento na conversão de sacarose a células, dos cultivos em aerobiose, foi observado que a levedura *iSUC2* apresentou valor 13% menor que a levedura padrão ($Y_{X/S} = 0,539 \pm 0,003$ gDW.g GLUeq⁻¹ e $0,470 \pm 0,007$ gDW.g GLUeq⁻¹, respectivamente), resultado semelhante ao observado para as células cultivadas em anaerobiose. Uma vez que as leveduras engenhadas gastariam apenas 1 mol de ATP para o lançamento do próton captado durante o co-transporte da sacarose, esperava-se que as células cultivadas em aerobiose apresentariam menor diferença percentual no parâmetro $Y_{X/S}$ ($\approx 1,3\%$), pois a respiração de 1 mol desse dissacarídeo fornece às células maior quantidade de moles de ATP (76 ATPs), quando comparada a fermentação de 1 mol desse açúcar (4 ATPs).

Tabela 12 - Parâmetros fisiológicos das linhagens CEN.PK113-5D e BSY21-34B cultivadas em sistema contínuo.

Parâmetro Fisiológico ^(a)	Aerobiose		Anaerobiose	
	<i>Std</i>	<i>iSUC2</i>	<i>Std</i>	<i>iSUC2</i>
Glicose				
$Y_{x/s}$ (gDW . gGLU eq ⁻¹)	0,504	0,494	0,103	0,104
$Y_{Eth/s}$ (gETH . gGLU eq ⁻¹)	0	0	0,379	0,389
q_s (mmol GLUeq . gDW ⁻¹ . h ⁻¹) ^(b)	1,103	1,092	5,708	5,742
q_{CO_2} (mmol . gDW ⁻¹ . h ⁻¹)	2,65	2,59	8,93	8,88
q_{O_2} (mmol . gDW ⁻¹ . h ⁻¹)	2,25	2,22	0,00	0,00
q_{Eth} (mmol . gDW ⁻¹ . h ⁻¹)	0	0	8,45	8,72
q_{Gly} (mmol . gDW ⁻¹ . h ⁻¹)	0	0	0,810	0,786
$S_{Residual - Glu}$ (g.L ⁻¹)	0,100	0,097	0,106	0,107
Sacarose				
$Y_{x/s}$ (gDW . gGLU eq ⁻¹) ^(b)	0,539 ± 0,003	0,470 ± 0,007	0,109 ± 0,001	0,095 ± 0,003
$Y_{Eth/s}$ (gETH . gGLU eq ⁻¹)	0	0	0,363 ± 0,005	0,382 ± 0,004
q_s (mmol GLUeq . gDW ⁻¹ . h ⁻¹) ^(c)	1,06 ± 0,055	1,103 ± 0,013	5,178 ± 0,199	6,003 ± 0,121
q_{CO_2} (mmol . gDW ⁻¹ . h ⁻¹)	2,47 ± 0,47	3,38 ± 0,04	8,67 ± 0,13	10,7 ± 0,0
q_{O_2} (mmol . gDW ⁻¹ . h ⁻¹)	2,22 ± 0,21	3,11 ± 0,04	0	0
q_{Eth} (mmol . gDW ⁻¹ . h ⁻¹)	0	0	7,34 ± 0,19	8,97 ± 0,27
q_{Gly} (mmol . gDW ⁻¹ . h ⁻¹)	0	0	0,607 ± 0,067	0,709 ± 0,062
$S_{Residual - Glu}$ (g.L ⁻¹)	0,036 ± 0,005	0,010 ± 0,002	0,047 ± 0,006	0,090 ± 0,028
$S_{Residual - Fru}$ (g.L ⁻¹)	0,062 ± 0,014	0,017 ± 0,003	0,103 ± 0,016	0,053 ± 0,033
$S_{Residual - Suc}$ (g GLU eq . L ⁻¹)	0	0,031 ± 0,001	0	2,81 ± 0,07

NOTA: Após cultivo contínuo das células (CEN.PK113-5D (*Std*) e BSY21-34B (*iSUC2*)) em meio sintético definido, em condição de aerobiose plena ou de anaerobiose total e sob limitação de glicose ou de sacarose, as amostras coletadas durante o estado estacionário da cultura foram utilizadas para determinar os parâmetros informados na tabela.

^(a) $S_{Residual}$ = Substrato residual, expresso em gramas por litro; $Y_{x/s}$ = Rendimento na conversão de substrato a células, expresso em g de biomassa seca formada por g de açúcar consumido; $Y_{Eth/s}$ = Rendimento na conversão de substrato a etanol, expresso em g de etanol formado por g de açúcar consumido; q = velocidade específica de consumo: de O₂ ou de substrato (glicose ou sacarose), ou de formação de produto (Etanol, Glicerol e CO₂), expressos em mmol formado/consumido por g de biomassa seca por hora.

^(b) g GLU eq . L = gramas de sacarose em número equivalente de glicose por litro.

^(c) mmol GLU eq = mmol de sacarose em número equivalente de glicose.

FONTE: Dário (2012).

No intuito de melhor entender as alterações no metabolismo das leveduras, cultivadas em condição de quimiostato, foram realizadas determinações de atividade da invertase (total e extracelular). A análise da Figura 18 revela que as células da linhagem *iSUC2*, cultivadas sob todas as condições estudadas (limitadas por glicose ou sacarose, sob condição de aerobiose ou anaerobiose) aparentemente apresentaram atividade de invertase extracelular. Entretanto, acredita-se que esse resultado foi obtido por uma limitação na técnica empregada, que proporcionou a detecção de uma falsa atividade, conforme discussão realizada no item 5.2. Por outro lado, como era de se esperar, as células da linhagem CEN.PK113-5D apresentaram atividade de hidrólise extracelular, que praticamente não apresentou alteração, entre as células cultivadas em limitação de glicose ou de sacarose

e sob condição de aerobiose (Figura 18-A), e também entre as células cultivadas em limitação de glicose ou de sacarose e sob condição de anaerobiose (Figura 18-B).

Os resultados de atividade total da invertase, na linhagem *iSUC2* cultivada sob condição de anaerobiose (Figura 18-B), tanto às células limitadas por glicose como por sacarose, não apresentaram alteração significativa nos valores de atividade de hidrólise. Por outro lado, quando essa linhagem foi cultivada sob condição de aerobiose (Figura 18-A), as células em limitação pela glicose apresentaram maior atividade de hidrólise que as células cultivadas em sacarose. Realizando a mesma análise comparativa com os resultados de atividade total da invertase para a linhagem CEN.PK113-5D, as células em limitação pela glicose apresentaram maior atividade de hidrólise que as células cultivadas em sacarose, tanto às cultivadas sob condição de aerobiose (Figura 18-A), quanto às células cultivada sob condição de anaerobiose (Figura 18-B). Esperava-se que as atividades totais também fossem apresentar valores próximos entre si, do mesmo modo que foi observado para a atividade da forma extracelular. Sabe-se que a expressão da forma periplasmática da invertase é regulada conforme a concentração de açúcar disponível no ambiente extracelular, destacando-se a repressão causada por alta concentração de glicose e de sacarose, e que a expressão da invertase intracelular é realizada de forma constitutiva, e praticamente não sofre repressão pela fonte de carbono disponível no meio (BELINCHÓN; GANCEDO, 2007; ECHEGARAY et al., 2000; HAQ; SHAFIQ; ALI, 2003; HERWING et al., 2001; OZCAN et al., 1997). Com base nisso, acredita-se que o resultado apresentado na Figura 18, apresenta sobreposição de atividades das enzimas invertase e maltase (enzima citoplasmática codificada pelos genes *MALx2*), do mesmo modo que foi discutido no item 5.2, pois as leveduras analisadas apresentam genótipo *MAL^C* (constitutivo) e provavelmente suas células expressavam os genes *MAL* durante o estado estacionário do cultivo contínuo.

Cabe salientar que as células obtidas durante o estado estacionário dos cultivos contínuos em glicose não apresentavam repressão na expressão do gene *SUC2*, pela concentração de glicose no meio de cultura ser baixa, conforme demonstra os valores de S_{residual} na Tabela 12, a ponto de não causar repressão na expressão do gene *SUC2*, ou até mesmo induzir a sua transcrição. De fato, células obtidas durante a fase exponencial de crescimento de cultivos realizados em glicose revelaram que a presença de glicose no meio de cultura ($\approx 15 \text{ g.L}^{-1}$) foi capaz de causar a repressão na expressão da invertase total (item 5.2, Figura 17).

Figura 18 - Atividade de hidrólise da enzima invertase (β -frutosidase), das linhagens CEN.PK113-5D e BSY21-34B cultivadas em sistema contínuo.

NOTA: Após cultivo contínuo das células em meio sintético definido, sob limitação de glicose ou de sacarose e em condição de aerobiose plena (A) ou de anaerobiose total (B), as células em estado estacionário foram utilizadas para determinar a atividade da invertase, com células intactas (invertase extracelular - barras hachuradas) e com células permeabilizadas (invertase total - barras sem preenchimento), em tampão succinato-Tris pH = 5,0.

FONTE: Dário (2012).

Além das análises de atividade da invertase, avaliou-se a atividade de transporte das células, utilizando [U-¹⁴C]-sacarose. Os resultados demonstraram que as células cultivadas sob limitação de glicose apresentaram menor capacidade de transporte do açúcar radioativo, quando comparados aos resultados obtidos para as células cultivadas sob limitação de sacarose (Figura 19). A permease Agt1p realiza o transporte da sacarose com alta afinidade ($K_m \approx 8$ mM), enquanto que os transportadores Malx1p realizam o transporte do dissacarídeo com baixa afinidade ($K_m \approx 120$ mM), conforme descrito por Stambuk,

Batista e De Araújo (2000). Esse resultado possivelmente foi obtido, devido ao efeito repressor que a glicose promove na expressão do gene *AGT1*, já que a concentração de substrato radioativo utilizado no ensaio (20 mM), permite analisar apenas o funcionamento do sistema de transporte de alta afinidade pela sacarose.

A hidrólise não é considerada a etapa limitante para a levedura *iSUC2* metabolizar a sacarose, devida a alta atividade da invertase (Figura 18). Além disso, esperava-se que o incremento na expressão da forma intracelular da invertase, permitiria à linhagem *iSUC2* incrementar a atividade de transporte e captar o açúcar de forma mais eficiente que a levedura padrão, semelhante ao observado na Figura 12. De fato, comparando os resultados obtidos para ambas as linhagens, esse resultado foi apresentado pelas células cultivadas em aerobiose e sob limitação de sacarose. Entretanto, os resultados em anaerobiose apresentaram uma relação inversa, ou seja, menor atividade de transporte para a linhagem engenhada. Esse resultado, que revelou menor transporte do açúcar radioativo pela levedura BSY21-34B, explica o valor de sacarose residual ($2,81 \pm 0,07 \text{ g GLUeq.L}^{-1}$) encontrado durante os cultivos dessa levedura em anaerobiose e sob limitação de sacarose (Tabela 12).

Conforme foi comentado anteriormente, a utilização de açúcar radioativo como substrato apresenta algumas limitações a essa técnica de determinação da atividade de transporte, dentre elas destaca-se a possibilidade de liberação de quantidades significativas de gás carbônico radioativo ($^{14}\text{CO}_2$). Os valores de velocidade específica de formação de gás carbônico (q_{CO_2}), apresentados na Tabela 12, revelaram maior valor de q_{CO_2} para a levedura *iSUC2* que à levedura padrão [$10,7 \pm 0,0 \text{ mmol} \cdot (\text{gDW} \cdot \text{h})^{-1}$ e $8,67 \pm 0,13 \text{ mmol} \cdot (\text{gDW} \cdot \text{h})^{-1}$ respectivamente], cultivadas em anaerobiose sob limitação de sacarose. Esse resultado, juntamente com os maiores valores de q_s , q_{Eth} e q_{Gly} , indicam maior velocidade no fluxo glicolítico da levedura engenhada em relação à levedura padrão. Com isso, o resultado de menor atividade de transporte da linhagem *iSUC2*, cultivada em anaerobiose sob limitação de sacarose, pode ser resultado de erro experimental ocasionado pela maior formação de $^{14}\text{CO}_2$. Entretanto, analisando os valores obtidos de q_{CO_2} das linhagens cultivadas em aerobiose foi observada relação inversa, ou seja, a levedura *iSUC2* também apresentou maior valor de q_{CO_2} em relação à levedura padrão (Tabela 12), porém maior atividade de transporte de $[\text{U-}^{14}\text{C}]$ sacarose (Figura 19).

Figura 19 - Atividade de transporte das linhagens CEN.PK113-5D e BSY21-34B, cultivadas em sistema contínuo.

NOTA: Após cultivo contínuo das células em meio sintético definido, em condição de aerobiose plena ou de anaerobiose total e sob limitação de glicose ou de sacarose, as células intactas, coletadas durante o estado estacionário do cultivo, foram utilizadas para determinar a atividade de transporte, utilizando sacarose radioativa.

FONTE: Dário (2012).

Observações realizadas com auxílio de microscópio óptico, de amostras retiradas das culturas em estado estacionário, revelaram que as células das linhagens padrão e *iSUC2*, cultivadas sob regime de aerobiose e limitadas tanto por glicose como por sacarose, apresentaram formatos normais, ou seja, células ovóides com presença de gêmulas (dados não mostrados). As células de ambas linhagens cultivadas em anaerobiose e sob limitação de glicose também não apresentaram alterações morfológicas (Figura 20-A). Por outro lado, as células cultivadas em anaerobiose e sob limitação de sacarose apresentaram formato alongado, semelhante à forma de pseudo-hifas, sendo que as células da levedura *iSUC2* apresentaram maior alongação que as células da levedura padrão, conforme mostram as Figuras 20-B e Figuras 20-C. Alteração semelhante na morfologia das células foi observada por Weusthuis et al. (2003), durante o cultivo de *S. cerevisiae* utilizando meio de cultura contendo mistura de maltose e glicose como substrato limitante.

Em estudos realizados com *Kluyveromyces marxianus*, Groeneveld et al. (2008) apontaram que a alteração do formato celular, de ovóide (ou esferóide) para alongado (ou cilíndrico), causa aumento na velocidade de crescimento das células, e os autores discutem que essa mudança morfológica (que aumenta a relação superfície/volume celular) é uma estratégia adotada pelas células para permitir a inserção de transportadores adicionais na membrana celular, aumentando dessa forma a capacidade de captação de nutrientes. Cabe salientar que a disponibilidade de oxigênio molecular (O_2) no meio de cultura também afeta fortemente a composição protéica da parede celular, e a sua limitação é apontada como

responsável por causar alterações drásticas na morfologia das células (ABRAMOVA et al., 2001; KLIS; BOORSMA; DE GROOT, 2006). Sabe-se que o O₂ é necessário em várias vias biossintéticas, tais como: do heme, de esteróis, de ácidos graxos insaturados, de pirimidinas e de desoxirribonucleótidos (LAI et al., 2006; SNOEK; STEENSMA, 2007). Entretanto, como as células de ambas as linhagens, cultivadas em anaerobiose e sob limitação de glicose, apresentaram morfologia não alterada, as observações realizadas neste trabalho e as realizadas por Weusthuis et al. (1993) sugerem que a necessidade de dispor de transportadores na membrana das células, para captar os dissacarídeos disponíveis no meio de cultura, juntamente com a condição de restrição de oxigênio, podem ter resultado na alteração morfológica das células.

Por outro lado, sabe-se que em *S. cerevisiae* o receptor de membrana Gpr1p apresenta alta afinidade ($K_m \approx 0,5 \text{ mM}$) para a sacarose e baixa afinidade ($K_m \approx 20 \text{ mM}$) para glicose (LEMAIRE et al., 2004). O dissacarídeo é considerado o melhor ativador de uma via de sinalização intracelular responsável pela formação de AMPc, o qual participa da regulação de vários processos celulares importantes, dentre eles a indução do crescimento filamentososo (THEVELEIN; VOORDECKERS, 2009; VAN DE VELDE; THEVELEIN, 2008; VERSTREPEN et al., 2004). Assim acredita-se que a alteração morfológica foi desencadeada pela sacarose disponível no meio de cultura, por ativação de via de sinalização iniciada pela proteína Gpr1p, pois somente as células cultivadas em anaerobiose e sob limitação dessa fonte de carbono apresentaram alteração no formato celular (Figura 20). Nesse contexto, o maior grau de alongação apresentado pela levedura *iSUC2* pode ter relação com a concentração de sacarose residual ($2,81 \pm 0,07 \text{ g GLU eq.L}^{-1}$) encontrada durante os cultivos da levedura engenhada, em anaerobiose e sob limitação de sacarose (Tabela 12), que podem causar maior indução da via de sinalização iniciada pelo receptor Gpr1p.

Conforme foi discutido anteriormente, preconiza-se a utilização de linhagens prototróficas em estudos fisiológicos quantitativos, como é o caso das análises de parâmetros fisiológicos em leveduras cultivadas sob condição de quimiostato, para se evitar problemas experimentais e a interpretação equivocada de resultados. Dessa forma, Basso et al. (2011) analisaram leveduras prototróficas, cultivadas em condição de anaerobiose e sob limitação de sacarose, e obtiveram resultados semelhantes aos apresentados neste trabalho, ou seja, maior produção de etanol ($\approx 4\%$) e menor de biomassa ($\approx 6\%$), para a levedura *iSUC2*, em comparação a levedura padrão. Ainda nesse trabalho, os autores observaram a

presença de uma concentração de $\approx 1,8 \text{ g.L}^{-1}$ de sacarose residual, e adotaram a estratégia de engenharia evolutiva almejando minimizar a concentração de açúcar residual. Para isso, a levedura *iSUC2* prototrófica (IMI-056) foi submetida a cultivo contínuo em condição de anaerobiose total e sob limitação de sacarose por cerca de 90 gerações. Nesse ponto do experimento de evolução, observou-se que a concentração de sacarose residual era muito baixa, e dessa forma, isolaram uma linhagem, denominada IMM-007 (*iSUC2* prototrófica evoluída), para investigar a alteração ocorrida no genoma dessa levedura. Análises de transcriptoma revelaram que a linhagem IMM-007 apresentou incremento na expressão de uma série de genes, principalmente os envolvidos diretamente no metabolismo da sacarose, como os genes *MAL* e *AGT1*, justificando porque essa levedura apresentou captação mais eficiente da fonte de carbono, durante o estado estacionário dos cultivos realizados.

Figura 20 - Imagens obtidas após observação em microscópio óptico, das células coletadas durante o estado estacionário dos cultivos contínuos realizados em anaerobiose.

NOTA: (A) Formato apresentado pelas células das linhagens padrão (CEN.PK113-5D) e *iSUC2* (BSY21-34B) nos cultivos realizados com limitação de glicose, (B) células da linhagem padrão nos cultivos realizados com limitação de sacarose, e (C) células da linhagem *iSUC2* nos cultivos realizados com limitação de sacarose.

FONTE: Dário (2012).

5.4 Caracterização das linhagens de *S. cerevisiae* através de fermentação em frasco agitado

A produção brasileira de etanol combustível ocorre, principalmente, através de processos de batelada alimentada, utilizando mosto que contem aproximadamente 180 g.L^{-1} de açúcares totais e elevada concentração de células de levedura (8 a 17% v/v), obtendo-se com isso ciclos de fermentação com duração de 6 a 10 horas (AMORIM et al., 2011, WHEALS et al., 1999). No intuito de avaliar o comportamento de leveduras, utilizando condições que permitisse simular em laboratório o processo de produção do etanol combustível brasileiro,

foram realizadas fermentações em frascos agitados contendo concentração extrema de sacarose (superior a 200 g.L^{-1}) e aproximadamente 10 g.L^{-1} de células de levedura. Conforme discutido no item 5.2 deste trabalho, o requerimento auxotrófico exerce influência na capacidade das células em metabolizar a fonte de carbono disponível no meio de cultura. Dessa forma, linhagens prototróficas foram analisadas, no intuito de avaliar a capacidade dessas linhagens em metabolizar a sacarose.

Ao analisar o desempenho das linhagens, através de fermentações em frascos agitados contendo concentração superior a 200 g.L^{-1} de sacarose (Figura 21), observa-se que a linhagem padrão (CEN.PK113-7D) consumiu todos os açúcares disponíveis no meio de cultura em um período aproximado de 9 horas, gerando concentração acima de 100 g.L^{-1} de glicose e frutose no meio de cultura. Atribui-se que o aparecimento dessa concentração de monossacarídeos no meio de cultura foi devido à ação da invertase periplasmática, uma vez que a linhagem padrão apresenta o gene *SUC2* em seu genoma. O período de tempo de 9 horas, que a levedura CEN.PK113-7D necessitou para consumir todo o açúcar disponível no meio de cultura, foi semelhante ao observado por Dário (2007) em experimentos realizados com a linhagem industrial CAT-1, amplamente utilizada na produção de etanol combustível no Brasil (BASSO et al., 2008), que também não apresenta requerimento auxotrófico, conforme por ser observado analisando o trabalho de Stambuk et al. (2009), uma vez que essa linhagem foi capaz de crescer em meio sintético definido (meio descrito por Verduyn et al. (1992)) sem a adição de qualquer suprimento de auxotrofia. No trabalho realizado por Dário (2007), a levedura padrão CEN.PK2-1C (isogênica à levedura CEN.PK113-7D, porém auxotrófica (comparar genótipo relevante das linhagens na Tabela 1)) foi também capaz de metabolizar totalmente o açúcar disponível, sob as mesmas condições experimentais, porém em um período de 18 horas. Acredita-se que a discrepância no tempo de consumo dos açúcares entre essas linhagens padrão tem relação com a influência do requerimento nutricional na fisiologia das leveduras, principalmente da linhagem CEN.PK2-1C que requer maior suplementação.

Os resultados da linhagem IMI-056 (*iSUC2* prototrófica) revelaram consumo completo dos açúcares presentes no meio de cultura em aproximadamente 18 horas, porém a concentração de monossacarídeos encontrada durante o cultivo dessa linhagem foi inferior que a concentração encontrada nos cultivos da levedura padrão (Figura 21), semelhante ao observado nos experimentos comparativos entre a levedura padrão

CEN.PK115-5D e a levedura isogênica *iSUC2* ura^- , BSY21-34B (dados não mostrados). Já a levedura IMM-007 (*iSUC2* evoluída) consumiu totalmente os açúcares disponíveis no meio de cultura em aproximadamente 12 horas e apresentando baixa concentração de monossacarídeos no meio de cultura, quando esses resultados são comparados aos obtidos para as linhagens CEN.PK113-7D e IMI-056 (Figura 21). Acredita-se que a detecção de glicose e frutose no meio de cultura das linhagens *iSUC2* foi resultado da rápida hidrólise intracelular da sacarose, por ação da alta atividade invertase dessas leveduras. Nesse caso, a sacarose pode ter sido rapidamente captada e hidrolisada pelas células, promovendo o acúmulo de alta concentração de glicose e frutose no citoplasma das leveduras. Esse acúmulo intracelular dos monossacarídeos pode ter promovido saturação do sítio catalítico da enzima hexoquinase, que reduziria a cinética de fosforilação das hexoses, e assim, permitiria a saída dos monossacarídeos ao ambiente extracelular via os transportadores de hexose, codificados pelos genes *HXT*.

A análise de metabolização da sacarose pela linhagem IMK-316 (*suc2Δ*) revela que o açúcar não foi totalmente consumido pelas células, restando aproximadamente 40 g.L⁻¹ da fonte de carbono (Figura 21), mesmo após 48 horas de incubação das células (dado não mostrado). Cabe salientar que a sacarose é metabolizada por essa linhagem, da mesma forma que pela linhagem MGD-02, analisada no item 5.2, ou seja, por transporte ativo do açúcar para o interior da célula e hidrólise intracelular exercida pela maltase. Por esse motivo, acredita-se que a pequena concentração de glicose e de frutose encontrada no meio de cultura dessa levedura não foi gerada por hidrólise extracelular do dissacarídeo, mas sim pela saída desses monossacarídeos das células, através dos transportadores Hxtp, após hidrólise intracelular pela maltase. A fermentação incompleta da sacarose foi semelhante a observada por Dário (2007), para a levedura auxotrófica MGD-01 (*suc2Δ*), que apresentou aproximadamente 70 g.L⁻¹ de sacarose residual. A discrepância, entre as leveduras *suc2Δ* prototrófica (IMK-316) e *suc2Δ* auxotrófica (MGD-01), na concentração de açúcar residual encontrada após o término do cultivo (40 g.L⁻¹ e 70 g.L⁻¹, respectivamente), é outro indício da influência exercida pelo requerimento nutricional sobre a fisiologia das leveduras, pois a concentração de sacarose residual foi menor no cultivo da levedura prototrófica.

Analisando os parâmetros fisiológicos das linhagens, obtidos após as fermentações em frascos agitados, observa-se que a levedura IMK-316 apresentou menor produtividade em etanol ($P_{Eth} \approx 3,23 \text{ gEth. (L.h)}^{-1}$) e menor rendimento global na conversão de substrato a

etanol ($Y_{Eth/S}^{GLO} \approx 0,29 \text{ gEth.gSac}^{-1}$) que as demais linhagens, pois a levedura *suc2Δ* apresentou consumo incompleto da sacarose disponível. Corroborando os resultados apresentados no item 5.2, que indicavam maior rendimento na produção de etanol pelas linhagens engenhradas no gene *SUC2*, a levedura IMI-056 apresentou maior P_{Eth} e $Y_{Eth/S}^{GLO}$ em comparação a levedura padrão, sendo esses parâmetros ainda mais expressivos para a linhagem IMM-007, que sofreu processo de evolução em sacarose (Tabela 13).

Embora os genes *MAL* sejam constitutivos na família de leveduras CEN.PK, acredita-se que a glicose formada no espaço periplasmático das células promova repressão pós-transcricional sobre os genes *MAL*, semelhante à inativação catabólica de transportadores de membrana (ubiquitinação e degradação vacuolar) já estudada em leveduras (MEDINTZ et al., 1996, 2000; RIBALLO et al., 1995; STAMBUK, 2002). Nesse contexto, a levedura MGD-02 foi transformada com plasmídeos para sobre-expressar o gene *AGT1* (plasmídeo pGRSd-AGT1), e foi observado que o açúcar disponível no meio de cultura não foi totalmente metabolizado pelas leveduras, restando aproximadamente 20 g.L^{-1} (dados não mostrados), ou seja, perfil semelhante ao obtido para a levedura IMK-316 (Figura 21). Dessa forma, acredita-se que a metabolização incompleta da sacarose tem relação, possivelmente, com uma menor capacidade de hidrólise que as leveduras *suc2Δ* apresentam, pois a levedura *iSUC2* (metaboliza a sacarose principalmente por hidrólise intracelular e não depende da maltase) apresentou metabolização completa da sacarose. Assim, novos experimentos seriam necessários para caracterizar a fermentação incompleta de altas concentrações de sacarose pelas linhagens sem atividade invertase.

O mosto utilizado na obtenção do etanol brasileiro é obtido a partir de caldo de cana-de-açúcar, de melaço (subproduto do beneficiamento do açúcar) ou de mistura de ambos em diferentes proporções, que é variável em cada usina produtora de etanol. Devido a essa variabilidade na formação do mosto, a concentração encontrada de cada um dos três açúcares é alterada conforme o regime de trabalho das usinas (AMORIM et al., 2011; WHEALS et al., 1999; ZANIN et al., 2000). Sabe-se que o mosto é preparado para conter, inicialmente, $\approx 180 \text{ g.L}^{-1}$ de açúcares totais (somatório das concentrações da sacarose, glicose e frutose). Entretanto, como o processo de fermentação é realizado em batelada alimentada pela indústria, sabe-se que dificilmente as células de levedura são expostas a uma concentração de sacarose tão elevada, como a utilizada neste trabalho ($> 200 \text{ g.L}^{-1}$).

Figura 21 - Metabolização da sacarose pelas linhagens CEN.PK113-7D, IMK-316, IMI-056 e IMM-007, durante fermentação em frascos agitados contendo meio rico (YP) e concentração superior a 200 g.L^{-1} da fonte de carbono.

NOTA: Os experimentos foram realizados em duplicata, porém o perfil apresentado reflete os dados de apenas um experimento.

FONTE: Dário (2012).

Tabela 13 - Parâmetros fisiológicos das linhagens analisadas, obtidos após fermentação em frascos agitados contendo meio rico (YP) e concentração superior a 200 g.L⁻¹ de sacarose.

Parâmetros Fisiológicos *	Linhagem analisada			
	CEN.PK113-7D	IMK-316	IMI-056	IMM-007
P_{Eth} [gEth. (L.h) ⁻¹]	4,77 ± 0,11	3,23 ± 0,06	4,99 ± 0,08	5,21 ± 0,12
$Y_{Eth/S}^{Glo}$ (gEth.gSac ⁻¹)	0,34 ± 0,01	0,29 ± 0,01	0,36 ± 0,01	0,38 ± 0,01

NOTA: * Os valores de produtividade de etanol (P_{Eth}) são expressos em gramas, por litro, por hora [gEth. (L.h)⁻¹], e os valores de rendimento na conversão de substrato a células global ($Y_{Eth/S}^{Glo}$) são expressos em gramas de etanol produzido por grama de sacarose consumida (gEth.gSac⁻¹). Para os calculos de rendimento assumiu-se que a concentração teórica inicial era de 250 g.L⁻¹. Os dados estão apresentados como média e o desvio padrão de dois experimentos independentes.

FONTE: Dário (2012).

Por esse motivo, optou-se por avaliar a capacidade de leveduras *suc2Δ* em metabolizar 100 g.L⁻¹ de sacarose, concentração mais próxima a qual realmente é encontrada na indústria. Devido ao fato das linhagens padrão e *iSUC2* metabolizarem totalmente concentração superior a 200 g.L⁻¹ de sacarose, optou-se em realizar as análises com 100 g.L⁻¹ desse açúcar somente com as leveduras sem invertase, que obtiveram resultado insatisfatório na condição anterior (> 200 g.L⁻¹ de sacarose). Os resultados demonstraram que as linhagens MGD-01 e IMK-316 foram capazes de metabolizar totalmente a fonte de carbono disponível e sem realizar hidrólise extracelular (Figura 22). Semelhante ao observado para as linhagens *suc2Δ* nos crescimentos em frascos agitados contendo sacarose (item 5.2, Figura 16), houve acúmulo de baixas concentrações de glicose e frutose no meio de cultura, monossacarídeos que acreditamos serem oriundos da hidrólise intracelular do dissacarídeo e transporte através da membrana, para fora das células, pelos transportadores Hxtp. A levedura MGD-01 consumiu totalmente a sacarose disponível no meio em um período de ≈8 horas, tempo em que a produção máxima de etanol foi alcançada, enquanto que a levedura IMK-316 alcançou a produção máxima de etanol e o consumo total do açúcar em ≈ 6 horas.

Avaliando os parâmetros fisiológicos das células submetidas a fermentação em frascos agitados contendo 100 g.L⁻¹ de sacarose, observa-se através da Tabela 14 que a levedura prototrófica (IMK-316) apresentou maior produtividade ($P_{Eth} \approx 7,14$ gEth.(L.h)⁻¹) e maior fator de conversão de substrato a etanol global ($Y_{Eth/S}^{Glo} \approx 0,42$ gEth.gSac⁻¹) que a levedura auxotrófica (MGD-01), $P_{Eth} \approx 4,83$ gEth.(L.h)⁻¹ e $Y_{Eth/S}^{Glo} \approx 0,38$ gEth.gSac⁻¹. Esses resultados indicam que o requerimento nutricional exerceu influência sobre a fisiologia das leveduras. Além disso, a levedura auxotrófica apresentou maior concentração de glicerol no meio de cultura (≈ 2,80 g.L⁻¹) que a levedura prototrófica (≈ 1,98 g.L⁻¹).

Figura 22 - Metabolização da sacarose pelas linhagens *suc2Δ*, durante fermentação em frascos agitados contendo meio rico (YP) e concentração de 100 g.L⁻¹ da fonte de carbono.

NOTA: O perfil apresentado reflete os dados de apenas um experimento.

FONTE: Dário (2012).

Tabela 14 - Parâmetros fisiológicos das linhagens *suc2Δ*, obtidos após fermentação em frascos agitados contendo meio rico (YP) e concentração de 100 g.L⁻¹ de sacarose.

Parâmetros Fisiológicos *	Linhagem analisada	
	MGD-01	IMK-316
P_{Eth} [gEth.(L.h) ⁻¹]	4,83	7,14
$Y_{Eth/S}^{Glo}$ (gEth.gSac ⁻¹)	0,38	0,42

NOTA: * Os valores de produtividade de etanol (P_{Eth}) são expressos em gEth.(L.h)⁻¹, e os valores de rendimento na conversão de substrato a células global ($Y_{Eth/S}^{Glo}$) são expressos em gEth.gSac⁻¹. Para os cálculos de rendimento assumiu-se que a concentração teórica inicial era de 100 g.L⁻¹. Os dados apresentados são referentes aos dados de apenas um experimento.

FONTE: Dário (2012).

Assim, ressalta-se que estudos mais profundos são necessários para analisar a metabolização incompleta de concentrações superiores a 200 g.L⁻¹, apresentada pelas leveduras *suc2Δ*.

5.5 Análise da via de sinalização de AMPc no metabolismo da sacarose

A proteína adenilato ciclase, codificada pelo gene *CYR1*, é responsável pela formação de AMPc em *S. cerevisiae*. O AMPc atua nas células, como segundo mensageiro, na ativação da proteína quinase A (PKA), a qual é responsável pela fosforilação de proteínas intracelulares, que participam na regulação da transcrição e da expressão gênica (FORSBERG; LJUNGDAHL, 2001; GANCEDO, 2008; SANTANGELO, 2006; THEVELEIN; WINDE, 1999; THEVELEIN; VOORDECKERS, 2009). Sabe-se, que a adição de glicose às células, em fase estacionária de crescimento ou crescendo em fontes de carbono não fermentáveis, e a acidificação intracelular são condições que causam ativação da via PKA, por desencadear o aumento na concentração intracelular de AMPc. Várias proteínas intracelulares participam da regulação da via de sinalização desse segundo mensageiro, como: Ras1p e Ras2p que estimulam a adenilato ciclase, mas que são inibidas pelas proteínas Ira1p e Ira2p, as quais são inibidas pela acidificação intracelular (SANTANGELO, 2006; THEVELEIN; VOORDECKERS, 2009).

Vanhalewyn et al. (1999) demonstraram que as leveduras da família CEN.PK apresentam mutação no gene (*CYR1*) que codifica enzima adenilato ciclase (substituição da adenina na posição 5627 da ORF, por uma timina, resultando em substituição da lisina na posição 1876 da proteína, por uma metionina). Essa mutação impede às células, dessa família de leveduras, aumentarem a produção de AMPc em resposta à acidificação e ao aumento da concentração de glicose extracelular. Porém, as células apresentam capacidade de produzir esse composto a nível basal, que não sofre alteração na concentração intracelular, ao longo das fases de crescimento.

O AMPc é atuante na via de sinalização iniciada pela proteína Gpr1p, o qual participa do controle de vários processos celulares importantes, como: na glicólise, na floculação, no crescimento filamentosos e outros (THEVELEIN; WINDE, 1999; LORENZ et al., 2000; VERSTREPEN et al., 2004). Considerado que a sacarose é o melhor ativador da via de sinalização iniciada pela proteína Gpr1p (VAN DE VELDE; THEVELEIN, 2008), analisamos a

capacidade das leveduras modificadas no gene *SUC* em metabolizar a sacarose, mas apresentando produção normal de AMPc.

Para isso, o plasmídeo controle YCplac33 e o plasmídeo YCpCYR1 (contem o gene *CYR1* sem mutações) foram inseridos nas leveduras utilizadas neste trabalho, e que apresentam formas diferentes de metabolizar a sacarose. Entretanto, apenas os resultados obtidos com as linhagens CEN.PK113-5D, MGD-02 e BSY21-34B são apresentados, e representam os resultados obtidos para as demais leveduras isogênicas. Assim, as leveduras foram pré-crescidas em meio mínimo sem uracila e cultivadas em balões de Erlenmeyer contendo meio YP e 2% de fonte de carbono (glicose ou sacarose). Alíquotas foram retiradas das culturas ao longo do tempo de cultivo, para possibilitar a determinação do perfil de metabolização dos açúcares e estimar os parâmetros fisiológicos das linhagens analisadas.

Nos crescimentos em frascos agitados contendo 20 g.L⁻¹ de glicose, as leveduras que portavam o plasmídeo YCpCYR1 não apresentaram diferença no perfil de metabolização dessa fonte de carbono, em relação às leveduras com o plasmídeo controle YCplac33 (Figura 23). De fato, os parâmetros fisiológicos obtidos, a partir da fase exponencial de crescimento dessas linhagens, não demonstraram existir grande diferença entre as leveduras, conforme apresenta a Tabela 15. Esse resultado era até esperado, pois a proteína Gpr1p apresenta baixa afinidade para glicose, $K_m \approx 20$ mM (LEMAIRE et al., 2004). Entretanto, sabe-se que alterações intracelulares (p. ex.: acidificação intracelular e alteração na relação AMP/ATP) podem desencadear formação de AMPc (SANTANGELO, 2006). Dessa forma, talvez as alterações metabólicas geradas às células foram pequenas, para serem detectadas nos cultivos em frascos agitados, contendo glicose como fonte de carbono.

Nos cultivos que continham 20 g.L⁻¹ de sacarose, a análise do perfil de metabolização da fonte de carbono (Figura 24) revelou 02 (dois) fatos que merecem destaque: (1) nos cultivos da levedura padrão, foi observado acúmulo de menor concentração de glicose e de frutose, nas células que portavam o plasmídeo YCpCYR1; e (2) nos cultivos da levedura *suc2Δ*, as células que continham o gene *CYR1* sem mutação, apresentaram maior tempo para iniciar o consumo da fonte de carbono (maior fase lag). Os parâmetros fisiológicos (Tabela 16) corroboram que as linhagens portando o plasmídeo YCpCYR1, apresentaram velocidade específica de crescimento (μ_x) mais lenta, e conseqüentemente maior tempo de geração celular (*tg*), que às leveduras isogênicas portando o plasmídeo controle. Por outro lado, a presença do plasmídeo YCpCYR1 conferiu às células, menor rendimento na conversão

de substrato a células ($Y_{X/S}^{Exp}$), e consequentemente maior rendimento na conversão de substrato a etanol ($Y_{Eth/S}^{Exp}$). Os resultados de velocidade específica de produção de etanol (μ_{Eth}^{Exp}) e de velocidade específica de consumo da sacarose (μ_{sac}^{Exp}), indicam a um metabolismo mais lento das leveduras portando o gene *CYR1* sem mutação.

Os resultados de atividade da invertase (Figura 25-B), nas células que possuem o gene *SUC2* no seu genoma, demonstraram que a atividade de forma extracelular da invertase correspondeu a aproximadamente 94% da atividade da invertase total (percentual que se refere à diferença entre os níveis de atividade da invertase total e extracelular), tanto nas células que portavam o plasmídeo YCplac33 como o plasmídeo YCpCYR1, resultado semelhante ao discutido no item 5.2.

Por outro lado, em outra análise sobre os resultados de atividade da invertase extracelular e total, observa-se que as células contendo o YCpCYR1 apresentaram atividade aproximadamente 31% inferior que as células portando o plasmídeo controle (Figura 25-B). Esse resultado vai ao encontro do observado no perfil de metabolização da sacarose pela levedura padrão (Figura 24), onde houve acúmulo de menor concentração de glicose e de frutose, no meio de cultura das células que portavam o plasmídeo YCpCYR1. O receptor Gpr1 apresenta alta afinidade pela sacarose ($K_m \approx 0,5$ mM) (LEMAIRE et al., 2004), e por esse açúcar ser considerado o melhor ativador da via de sinalização iniciada por esse receptor (VAN DE VELDE; THEVELEIN, 2008), acredita-se que a presença do dissacarídeo no meio cultura desencadeou de forma mais efetiva, a via de sinalização nas células que portavam o gene *CYR1* sem mutação. Consequentemente, acredita-se que a ativação da via interferiu na expressão da enzima invertase. Resultado semelhante, de decréscimo na atividade da invertase, foi discutido no item 5.2, para as leveduras sem o transportador de alta afinidade para a sacarose (linhagem *agt1Δ*).

Os resultados de hidrólise da sacarose pela maltase, apresentados na Figura 25-B, indicam que, de fato, a enzima invertase apresenta atividade enzimática em pH 6,8, conforme discussão realizada no item 5.2. Além disso, observa-se que a presença do gene *CYR1* sem mutação, nas leveduras, não alterou essa condição. Um exemplo desse fato, são os resultados de atividade, nas análises que utilizaram a sacarose como fonte de carbono, realizadas com a linhagem MGD-02, transformada com os plasmídeos controle e YCpCYR1, que não apresentaram diferença entre si. Analisando os resultados de atividade, utilizando a maltose como substrato (Figura 25-B), observa-se que a presença do gene *CYR1* sem

Figura 23 - Metabolização da glicose pelas linhagens CEN.PK113-5D, MGD-02 e BSY21-34B, transformadas com plasmídeos, crescidas em frascos agitados contendo meio rico (YP) e 2% da fonte de carbono.

NOTA: Perfil de metabolização da glicose ao longo do tempo de cultivo, das leveduras transformadas com o plasmídeo YCplac33 (símbolos abertos) e YpPCYR1 (símbolos fechados).

FONTE: Dário (2012).

Tabela 15 - Parâmetros fisiológicos das linhagens CEN.PK113-5D, MGD-02 e BSY21-34B, transformadas com plasmídeos, crescidas em frascos agitados contendo meio rico (YP) e 2% de glicose.

Linhagem	CEN.PK113-5D		MGD-02		BSY21-34B	
	YCplac33	YCpCYR1	YCplac33	YCpCYR1	YCplac33	YCpCYR1
$Y_{X/S}^{Exp}$	0,11	0,11	0,13	0,13	0,12	0,12
$Y_{Eth/S}^{Exp}$	0,24	0,25	0,25	0,25	0,26	0,24
μ_x	0,32	0,32	0,33	0,32	0,32	0,32
μ_{Glc}^{Exp}	2,91	2,91	2,54	2,46	2,66	2,67
μ_{Eth}^{Exp}	1,33	1,28	1,32	1,28	1,23	1,19
tg	2,17	2,17	2,10	2,17	2,17	2,17

NOTA: ^(a) $Y_{X/S}$ = Rendimento na conversão de substrato a células, expresso em g de biomassa seca formada por g de glicose consumida ($g_{DW}.g_{Glu}^{-1}$); $Y_{Eth/S}$ = Rendimento na conversão de substrato a etanol, expresso em g de etanol formado por g de glicose consumida ($g_{Eth}.g_{Glu}^{-1}$); μ_x = velocidade específica de crescimento, expresso em h^{-1} ; μ_{Glc} = velocidade específica de consumo de glicose, expresso em h^{-1} ; μ_{Eth} = velocidade específica de formação de etanol, expresso em h^{-1} ; tg = tempo de geração celular, expresso em h.

FONTE: Dário (2012).

Figura 24 - Metabolização da sacarose pelas linhagens CEN.PK113-5D, MGD-02 e BSY21-34B, transformadas com plasmídeos, crescidas em frascos agitados contendo meio rico (YP) e 2% da fonte de carbono.

NOTA: Perfil de metabolização da glicose ao longo do tempo de cultivo, das leveduras transformadas com o plasmídeo YCplac33 (símbolos abertos) e YPpCYR1 (símbolos fechados).

FONTE: Dário (2012).

Tabela 16 - Parâmetros fisiológicos das linhagens CEN.PK113-5D, MGD-02 e BSY21-34B, transformadas com plasmídeos, crescidas em frascos agitados contendo meio rico (YP) e 2% de sacarose.

Linhagem Parâmetro	CEN.PK113-5D		MGD-02		BSY21-34B	
	YCplac33	YCpCYR1	YCplac33	YCpCYR1	YCplac33	YCpCYR1
$Y_{X/S}^{Exp}$	0,17 ± 0,01	0,14 ± 0,00	0,17 ± 0,01	0,15 ± 0,00	0,15 ± 0,00	0,14 ± 0,01
$Y_{Eth/S}^{Exp}$	0,23 ± 0,01	0,25 ± 0,00	0,25 ± 0,01	0,27 ± 0,00	0,25 ± 0,00	0,27 ± 0,00
μ_X	0,34 ± 0,01	0,31 ± 0,00	0,31 ± 0,01	0,26 ± 0,01	0,17 ± 0,01	0,14 ± 0,01
μ_{Sac}^{Exp}	2,13 ± 0,04	2,09 ± 0,00	1,85 ± 0,04	1,70 ± 0,05	1,10 ± 0,05	1,00 ± 0,00
μ_{Eth}^{Exp}	1,49 ± 0,02	1,24 ± 0,00	1,25 ± 0,01	0,93 ± 0,03	0,66 ± 0,03	0,50 ± 0,03
Tg	2,07 ± 0,04	2,24 ± 0,00	2,27 ± 0,05	2,72 ± 0,08	4,20 ± 0,18	5,14 ± 0,27

NOTA: ^(a) $Y_{X/S}$ = Rendimento na conversão de substrato a células, expresso em g de biomassa seca formada por g de glicose consumida (gDW.gGlu⁻¹); $Y_{Eth/S}$ = Rendimento na conversão de substrato a etanol, expresso em g de etanol formado por g de glicose consumida (gEth.gGlu⁻¹); μ_X = velocidade específica de crescimento, expresso em h⁻¹; μ_{Glc} = velocidade específica de consumo de glicose, expresso em h⁻¹; μ_{Eth} = velocidade específica de formação de etanol, expresso em h⁻¹; tg = tempo de geração celular, expresso em h.

FONTE: Dário (2012).

mutação, aparentemente, não influenciou a expressão da maltase, como pode ser observado nos resultados obtidos com a linhagem MGD-02, transformada com os plasmídeos YCplac33 e YCpCYR1.

Conforme demonstra a Figura 26, a linhagem CEN.PK113-5D não apresentou atividade de transporte. Para as células da linhagem BSY21-34B, transformadas com o plasmídeo controle e com o plasmídeo YCpCYR1, foi observada atividade de transporte, porém sem diferença significativa [$\approx 1,4$ nmol.(mg DW.min)⁻¹]. Entretanto, as células da linhagem *suc2Δ*, transformadas com o plasmídeo YCpCYR1, apresentaram redução de aproximadamente 25% na atividade de transporte do substrato sintético pNPαG [≈ 8 nmol.(mg DW.min)⁻¹], em relação as células transformadas com plasmídeo controle [≈ 11 nmol.(mg DW.min)⁻¹]. Esse resultado, talvez explique o perfil de metabolização da sacarose dessa levedura (Figura 24), onde as células da levedura *suc2Δ* portando o plasmídeo YCpCYR1 apresentaram um tempo maior para iniciar o consumo da fonte de carbono (maior fase lag).

Os resultados indicaram que o restabelecimento do correto funcionamento das vias de sinalização, as quais o AMPc atua, foi importante para a incrementar a fermentação da sacarose. Observou-se que a formação desse segundo mensageiro incrementou a formação de etanol, além de atuar sobre a expressão dos genes *SUC*. Além disso, foi observada uma correlação inversa entre a atividade invertase extracelular e a capacidade das células da linhagem padrão, em fermentar a fonte de carbono. De fato, essa correlação já foi verificada

por outros trabalhos (ECHEGARAY et al., 2000; MYERS; LAWLOR; ATTFIELD, 1997; TAKESHIGE; OUCHI, 1995).

Figura 25 - Atividade de hidrólise das enzimas invertase (β -frutosidase) e maltase (α -glicosidase), das linhagens CEN.PK113-5D, MGD-02 e BSY21-34B, transformadas com os plasmídeos YCplac33 e YCpCYR1.

NOTA: (A) A atividade invertase foi determinada com células intactas (invertase extracelular - barras hachuradas) e com células permeabilizadas (invertase total - barras sem preenchimento), em tampão succinato-Tris pH = 5,0. (B) A atividade maltase foi determinada com células permeabilizadas em tampão MOPS-NaOH pH = 6,8, utilizando como substrato, a maltose (barras com estrias verticais) e a sacarose (barras com estrias inclinadas). Todos os testes foram realizados após crescimento das linhagens em meio YP contendo 2 % de sacarose.

FONTE: Dário (2012)

Figura 26 - Atividade de transporte das linhagens CEN.PK113-5D, MGD-02 e BSY21-34B, transformadas com os plasmídeos YCplac33 e YCpCYR1.

NOTA: A atividade foi determinada com células intactas, em tampão succinato-Tris pH = 5,0 utilizando o substrato sintético pNPαG. Todos os testes foram realizados após crescimento das linhagens em meio YP contendo 2 % de sacarose.

FONTE: Dário (2012).

6 CONCLUSÕES

Almejando melhorar o processo de fermentação realizado pela levedura *S. cerevisiae*, para obter total fermentação dos açúcares disponíveis no meio de cultura em um espaço curto de tempo, esse trabalho analisou o efeito causado a esse micro-organismo, devido a alteração na forma das células captarem a sacarose. Além disso, foi iniciada uma investigação sobre os aspectos moleculares das vias de sinalização envolvidas na fermentação da sacarose. Assim, após a avaliação do comportamento das leveduras de laboratório, modificadas por engenharia genômica na forma de metabolizar a sacarose, é possível realizar as seguintes ponderações:

- Os resultados dos experimentos realizados, em frascos agitados (crescimento e fermentação) e em sistema contínuo, revelaram que as leveduras engenhas no gene *SUC2* (*suc2Δ* e *iSUC2*), incapazes que hidrolisar a sacarose no ambiente extracelular, apresentam maior rendimento na produção de etanol, em comparação à linhagem padrão, que hidrolizam a sacarose no ambiente extracelular;

- As leveduras engenhas no gene *SUC2* (*suc2Δ* e *iSUC2*) apresentam menor velocidade específica de crescimento em sacarose, em comparação a linhagem padrão, sendo que o resultado foi mais expressivo à levedura com a invertase intracelular sobre-expressa (*iSUC2*). Talvez esse resultado esteja relacionado ao transporte de sacarose ser limitante nas leveduras *iSUC2*, ou a hidrólise, nas leveduras *suc2Δ*. De qualquer modo, são necessários mais estudos para melhor elucidar essa característica;

- As leveduras prototróficas apresentam maior eficiência na metabolização da fonte de carbono disponível no meio de cultura, em comparação as leveduras auxotrófica, conforme demonstraram os resultados dos cultivos em frascos agitados contendo glicose e sacarose, e de cultivo descontínuo em frascos agitados, que continham concentração de sacarose de aproximadamente 100 g.L⁻¹ ou superior de 200 g.L⁻¹;

- Embora as leveduras *suc2Δ* não possuam atividade invertase, a sacarose é metabolizada por ação da maltase (α -glicosidase). Essas leveduras não foram capazes de metabolizar totalmente a fonte de carbono, nas fermentações que continham concentração superior a 200 g.L⁻¹ de sacarose. Talvez a capacidade de hidrólise dessa levedura seja limitada por depender da maltase, pois a levedura *iSUC2*, que apresenta invertase

intracelular sobre-expressa, apresentou fermentação completa dos açúcares, nas mesmas condições experimentais que a levedura sem invertase foi submetida.

- A investigação quantitativa (cultivos contínuos realizados em condição de anaerobiose e sob limitação de sacarose como substrato limitante) da tese relacionada a maior produção de etanol, pelas células que necessitam realizar o transporte ativo do açúcar através da membrana, em comparação com as células que captam o açúcar por difusão, revelou que, de fato, as leveduras *suc2Δ* e *iSUC2* apresentaram incremento de 6% e 5%, respectivamente, no rendimento da conversão de substrato a etanol ($Y_{Ethl/S}$), em comparação a levedura padrão;

- Embora a linhagem *suc2Δ* não tenha capacidade de metabolizar totalmente a fonte de carbono, durante os cultivos descontínuos em frascos agitados contendo concentração superior a 200 g.L^{-1} de sacarose, no cultivo contínuo em anaerobiose e sob limitação desse açúcar, essa levedura apresentou formação de etanol próxima ao estabelecido teoricamente (8%). Talvez essa levedura apresente limitação em metabolizar alta concentração de sacarose, por limitação na hidrólise do açúcar, que nessa levedura é realizada pela maltase;

- Embora a estratégia de sobre-expressão do gene *SUC2* tenha resultado em incremento na produção de etanol, foi observado maior concentração de açúcares residuais, nos cultivos contínuos realizados com a levedura *iSUC2*, em comparação à levedura padrão, resultado que está relacionado à limitação do transporte da sacarose nessa linhagem;

- Os resultados inesperados de limitação no transporte da sacarose e também de alteração morfológica apresentada pelas células, cultivadas em anaerobiose e sob limitação da sacarose, necessitam de estudos mais aprofundados para a elucidação. Entretanto, acredita-se que esses resultados estejam relacionados com a limitação de oxigênio e por atuação da via de sinalização intracelular, desencadeada por ativação do receptor Gpr1p pela sacarose.

- O restabelecimento do correto funcionamento das vias de sinalização, as quais o AMPc atua, foi importante para a incrementar a fermentação da sacarose. As linhagens que portavam o gene *CYR1* sem mutação apresentaram incremento na formação de etanol e redução na atividade invertase, indicando que o AMPc atua sobre a expressão dos genes *SUC*.

Em suma, este trabalho demonstrou que foi possível incrementar a produção de etanol pelas leveduras, alterando a forma como a sacarose é captada. Entretanto, alguns

resultados obtidos continuam sem explicação, e necessitam de uma investigação mais profunda, como: (1) a metabolização eficiente da sacarose pela levedura *iSUC2* em condição de alta concentração desse açúcar, porém lento crescimento nessa fonte de carbono, e (2) a metabolização ineficiente do dissacarídeo pela levedura *suc2Δ* em condição de alta concentração desse açúcar, porém crescimento eficiente nessa fonte de carbono e apresentando parâmetros fisiológicos melhores que os da levedura não modificada.

Acredita-se que os resultados inesperados estejam relacionados com limitações no transporte ou na hidrólise do açúcar, que não puderam ser totalmente desvendados neste trabalho. Talvez engenhar uma levedura que apresente genótipo *iSUC2*, que realize a síntese da invertase intracelular sob controle do promotor nativo desse gene, seria importante para ajudar na elucidação do mecanismo de metabolização da sacarose. Essa nova linhagem ajudaria na investigação da capacidade de transporte e de hidrólise da sacarose. De qualquer forma, estudos mais aprofundados são necessários para melhorar a fermentação da sacarose pelas células, principalmente em meio de cultura contendo altas concentrações de sacarose.

Embora as linhagens engenhas, que foram desenvolvidas e analisadas neste trabalho, possuam limitações do ponto de vista industrial, são de suma importância para a análise molecular das vias de utilização de sacarose por *S. cerevisiae*. Isso leva à possibilidade de melhorar a performance fermentativa das leveduras industriais, por permitir identificar genes alvo para melhoramento via engenharia genômica. Os resultados desse trabalho podem contribuir com cadeia produtora de etanol combustível, pois demonstrou que é possível evitar a pressão osmótica que as células são expostas no processo industrial, e reduzir a proliferação de microorganismos contaminantes do processo fermentativo. Assim, acredita-se que associar, a boa adaptação que as linhagens industriais possuem frente ao processo industrial, com as características metabólicas estudadas neste trabalho e que são desejadas para nas leveduras industriais, pode permitir o aumento na ordem de milhões de litros de etanol em escala industrial, a partir da mesma quantidade de matéria-prima. Em outras palavras, produzir mais etanol sem a necessidade de ampliar a fronteira agrícola para a produção de cana de açúcar.

REFERÊNCIAS⁸

- AA, E.; TOWNSEND, J. P.; ADAMS, R. I.; NIELSEN, K. M.; TAYLOR, J. W. Population structure and gene evolution in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Yeast Res.**, v.6, p.706-715, 2006.
- ABRAMOVA, N.; SERTIL, O.; MEHTA, S.; LOWRY, C. V. Reciprocal Regulation of Anaerobic and Aerobic Cell Wall Mannoprotein Gene Expression in *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Bacteriol.**, v.183, p.2881-2887, 2001.
- AGATEP, R.; KIRKPATRICK, R. D.; PARCHALIUK, D. L.; WOODS, R. A.; GIETZ, R. D. Transformation of *Saccharomyces cerevisiae* by the lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol protocol. **Tech. Tips Online**, v.3, n.1, p.133-137, 1998.
- ALCARDE, A. R.; BASSO, L. C. Efeito da trealose na manutenção da viabilidade de células de leveduras desidratadas por liofilização. **Sci. Agric.**, v.54, n.3, p. 189-194, 1997.
- ALDHOUS, P. Genetic engineering: modified yeast fine for food. **Nature**, v.344, p.186, 1990.
- 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. **Biochem.**, v.29, p.2471-2482, 1990.
- ALVES JR., 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 *Saccharomyces cerevisiae* Reveals a Determinant Role for the AGT1 Permease. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.74, p.1494-1501, 2008.
- ALVES JR., S. L. **Genômica do metabolismo de maltotriose em *Saccharomyces cerevisiae*: o papel determinante do gene AGT1**. 2010. 135 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.
- AMORIM, H. V.; BASSO, L. C.; OLIVEIRA, A. J.; GODOY, A.; CHERUBIN, R.; LOPES, M. L. Identification and selection of yeast strains from alcoholic fermentations in Brazil by electrophoretic karyotyping. In: ELEVENTH INTERNATIONAL CONGRESS ON YEAST, 2004, Rio de Janeiro, **Book of Abstracts**, 2004. p. 51.
- AMORIM, H.; LOPES, M. R.; DE CASTRO OLIVEIRA, J.; BUCKERIDGE, M.; GOLDMAN, G. Scientific challenges of bioethanol production in Brazil. **Appl. Microbiol. Biotech.**, v.91, n.5, p.1267-1275, 2011.
- ANDJELKOVIC, U.; PICURIC, S.; VUJCIC, Z. Purification and characterization of *Saccharomyces cerevisiae* external invertase isoforms. **Food Chem.**, v.120, p.799-804, 2010.

⁸ De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

ANDO, A.; TANAKA, F.; MURATA, Y.; TAKAGI, H.; SHIMA, J. Identification and classification of genes required for tolerance to high-sucrose stress revealed by genome-wide screening of *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Yeast Res.**, v.6, n.2, p.249-267, 2006.

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

ANFAVEA - Associação Nacional dos Fabricantes de Veículos Automotores. **Anuário da Indústria Automobilística Brasileira**. São Paulo: ANFAVEA, 2011. 52-126 p.

ARGUESO, J. L.; CARAZZOLLE, M. F.; MIECZKOWSKI, P. A.; DUARTE, F. M.; NETTO, O. V.; MISSAWA, S. K.; GALZERANI, F.; COSTA, G. G.; VIDAL, R. O.; NORONHA, M. F.; DOMINSKA, M.; ANDRIETTA, M. G.; ANDRIETTA, S. R.; CUNHA, A. F.; GOMES, L. H.; TAVARES, F. C.; ALCARDE, A. R.; DIETRICH, F. S.; MCCUSKER, J. H.; PETES, T. D.; PEREIRA, G. A. Genome structure of a *Saccharomyces cerevisiae* strain widely used in bioethanol production. **Genome Res.**, v.19, p. 2258-2270, 2009.

ARRUDA, L.; VITOLO, M. Characterization of invertase entrapped into calcium alginate beads. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, 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, John Wiley & Sons, 1992. 1512p.

BADOTTI, F.; BATISTA, A. S.; STAMBUK, B. U. Sucrose active transport and fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. **Braz. Arch. Biol. Technol.**, v.49, p.s115-s123, 2006.

BADOTTI, F.; DÁRIO, M. G.; ALVES, S.; CORDIOLI, M.; MILETTI, L.; DE ARAUJO, P.; STAMBUK, B. Switching the mode of sucrose utilization by *Saccharomyces cerevisiae*. **Microb. Cell Fact.**, v.7, p.2-11. 2008.

BARFORD, J. P.; PHILLIPS, P. J.; ORLOWSKI, J. H. A new model of uptake of multiple sugars by *S. cerevisiae*. **Bioproc. Eng.**, v.7, p.303-307, 1992.

BARNETT, J. A. A history of research on yeasts 5: the fermentation pathway. **Yeast**, v.20, n.6, p.509-543. 2003.

BASÍLIO, A. C.; ARAÚJO, P. R. L.; MORAIS, J. O. F.; FILHO, E. A. S.; MORAIS JR., M. A. SIMOES, D. A. Detection and identification of wild yeast contaminants of the industrial fuel ethanol fermentation process. **Curr. Microbiol.**, v.56, p.322-326, 2008.

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

BASSO, T. O.; DÁRIO, M. G.; TONSO, A.; STAMBUK, B. U.; GOMBERT, A. K. Insufficient uracil supply in fully aerobic chemostat cultures of *Saccharomyces cerevisiae* leads to respiro-fermentative metabolism and double nutrient-limitation. **Biotechnol. Lett.**, v.32, p.973-7, 2010.

BASSO, T. O. **Melhoramento da fermentação alcoólica em *Saccharomyces cerevisiae* por engenharia evolutiva**. 2011. 137 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

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. **Metab. Eng.**, v.13, n.6, p.694-703, 2011.

BATISTA, A. S.; MILETTI, L. C.; STAMBUK, B. U. Sucrose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* lacking hexose transport. **J. Mol. Microbiol. Biotechnol.**, v.8, p.26-33, 2004.

BELINCHÓN, M. M.; GANCEDO, J. M. Different signalling pathways mediate glucose induction of *SUC2*, *HXT1* and pyruvate decarboxylase in yeast. **FEMS Yeast Res.**, v.7, p.40-47 2007.

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

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

BERTELLI, L. G. A verdadeira história do Proálcool. **O Estado de São Paulo**, Economia & Negócios B2 p. , 16 nov. 2005. Disponível em: <<http://www2.senado.gov.br/bdsf/item/id/60823>>. Acesso em: 26 Set. 2010.

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 Res.**, v.4, p.683-689, 2004.

BERTHELS, N.; CORDERO OTERO, R.; BAUER, F.; PRETORIUS, I.; THEVELEIN, J. Correlation between glucose/fructose discrepancy and hexokinase kinetic properties in different *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast strains. **Appl. Microbiol. Biotech.**, v.77, p.1083-1091, 2008.

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

BISSON, L. F.; FRAENKEL, D. G. Involvement of kinases in glucose and fructose uptake by *Saccharomyces cerevisiae*. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA.**, v.80, p.1730-1734, 1983.

BOLES, E.; HOLLEMBERG, C. The molecular genetics of hexoses transport in yeast. **FEMS Microbiol. Rev.**, v. 21, p. 111, 1997.

BRANCO, L. G. B. Biocombustíveis Brasileiros e o Mercado Internacional: desafios e oportunidades. **Rev. CEJ**, n. 46, p. 39-48, 2009.

BREJNING, J.; JESPERSEN, L.; ARNEBORG, N. Genome-wide transcriptional changes during the lag phase of *Saccharomyces cerevisiae*. **Arch. Microbiol.**, v. 179, p. 278-294, 2003.

BU, Y. SCHMIDT, M. C. Identification of *cis*-acting elements in the *SUC2* promoter of *Saccharomyces cerevisiae* required for activation of transcription. **Nucleic. Acids Res.**, v.26, n.4. p. 1002-1009, 1998.

BUTLER, D. Interest ferments in yeast genome sequence. **Nature**, v. 380, p. 660-661, 1996.

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.

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

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

CORBACHO, I; TEIXIDO, F.; VELAZQUEZ, R.; HERNANDEZ, L. M.; OLIVERO, I. Standard YPD, even supplemented with extra nutrients, does not always compensate growth defects of *Saccharomyces cerevisiae* auxotrophic strains. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v.99, p.591-600, 2011.

CORDIER, H.; MENDES, F.; VASCONCELOS, I.; FRANÇOIS, J. M. A metabolic and genomic study of engineered *Saccharomyces cerevisiae* strains for high glycerol production. **Metabolic Eng.**, v.9, n.4, p.364-378. 2007.

CRONWRIGHT, G. R.; ROHWER, J. M.; PRIOR, B. A. Metabolic Control Analysis of Glycerol Synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 68, n. 9, p. 4448-4456, 2002.

ÇAKAR, Z. P.; SAUER, U.; BAILEY, J. E. Metabolic engineering of yeast: the perils of auxotrophic hosts. **Biotech. Lett.**, v.21, n.7, p.611-616. 1999.

DA CRUZ, S. H.; CILLI, E. M.; ERNANDES, J. R. Structural complexity of the nitrogen source and influence on yeast growth and fermentation. **J. Inst. Brew.**, v. 108, p. 54-61, 2002.

DA SILVA FILHO, E. A.; DOS SANTOS, S. K. B.; RESENDE, A. DO M.; DE MORAIS, J. O. F.; DE MORAIS JR, M. A.; SIMÕES, D. A. Yeast population dynamics of industrial fuel-ethanol fermentation process assessed by PCR-fingerprinting. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.88, p.13-23, 2005a.

DA SILVA FILHO, E. A.; DE MELO, H. F.; ANTUNES, D. F.; DOS SANTOS, S. K. B.; RESENDE, A. DO M.; SIMÕES, D. A.; DE MORAIS JR, M. A. Isolation by genetic physiological characteristics of a fuel-ethanol fermentative *Saccharomyces cerevisiae* strain with potential for genetic manipulation. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.**, v.32, p.481-486, 2005b.

DARAN-LAPUJADE, P.; DARAN, J. M.; KOTTER, P.; PETIT, T.; PIPER, M. D.; PRONK, J. T. Comparative genotyping of the *Saccharomyces cerevisiae* laboratory strains S288C and CEN.PK113-7D using oligonucleotide microarrays. **FEMS Yeast Res.**, v. 4, p.259-269, 2003.

DÁRIO, M.G. **Análise molecular do metabolismo de sacarose por linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* utilizadas na produção industrial de álcool combustível.** 2007. 95f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2007.

DÁRIO, M. G. **Efeito da alteração na captação de sacarose ao metabolismo de *Saccharomyces cerevisiae*.** 2012. 153 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

DEMARINI, D. J.; CARLIN, E. M.; LIVI, G. P. Constitutive promoter modules for PCR-based gene modification in *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, v.18, p.723-728, 2001.

DENAYROLLES, M.; DE VILLECHENON, E.P.; LONVAUD-FUNEL, A.; AIGLE, M. Incidence of SUC-RTM telomeric repeated genes in brewing and wild wine strains of *Saccharomyces*. **Curr. Genet.**, v.31, p.457-461, 1997.

DIDERICH, J.A.; SCHEPPER, M.; VAN HOEK, P.; LUTTIK, M.A.H.; VAN DIJKEN, J.P.; PRONK, J.T.; KLAASSEN, P.; BOELEN, 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*. **J. Biol. Chem.**, v.274, n.22, p.15350-15359, 1999.

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. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, 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 Bioenergy**, v.19, p.39-50, 2000.

ENTIAN, K. D.; KÖTTER, P. Yeast mutant and plasmid collections. **Meth. Microbiol.**, v.26, p.431-449, 1998.

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 Res.**, 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.

FEREA, T. L.; BOTSTEIN, D.; BROWN, P. O.; ROSENZWEIG, F. Systematic changes in gene expression patterns following adaptive evolution in yeast. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v.96, p.9721-9726, 1999.

FOLCH-MALLOL, J. L.; GARAY-ARROYO, A.; LLEDIAS, F. La respuesta a estrés en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. **Rev. Lat. Amer. Microbiol.**, v. 46, p. 24-46, 2004.

FORSBERG, H.; LJUNGDAHL, P. Sensors of extracellular nutrients in *Saccharomyces cerevisiae*. **Current Gen.**, v.40, n.2, p.91-109. 2001.

FRICK, O.; WITTMANN, C. Characterization of the metabolic shift between oxidative and fermentative growth in *Saccharomyces cerevisiae* by comparative ¹³C flux analysis. **Microb. Cell Fact.**, v.4, p.1-16, 2005.

GANCEDO, J. M. The early steps of glucose signalling in yeast. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v.32, n.4, p.673-704. 2008.

GASCÓN, S.; NEUMANN, N. P.; LAMPEN, J. O. Comparative study of the properties of the purified internal and external invertases from yeast. **J. Biol. Chem.**, v. 243, v. 7, p. 1573-1577, 1968.

GIETZ, R. D.; SUGINO, A. New yeast-*Escherichia coli* shuttle vectors constructed with in vitro mutagenized yeast genes lacking six-base pair restriction sites. **Gene**, v. 74, p. 527-534, 1988.

GOLDEMBERG, J. Ethanol for a sustainable energy future. **Science**, v. 315, p.808-810, 2007.

GOLDEMBERG, J. The Brazilian biofuels industry. **Biotech. Biofuels**, v.1, p.6, 2008.

GOLDSTEIN, A. L.; PAN, X.; MCUSKER, H. Heterologous URA3MX cassettes for gene replacement in *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, v.15, p.507-511, 1999.

GOFFRINI, P.; FERRERO, I.; DONNINI, C. Respiration-dependent utilization of sugars in yeasts: a determinant role for sugar transporters. **J. Bacteriol.**, v. 184, p. 427-432, 2002.

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

GREENPEACE. **Biocombustíveis:** parte da solução e do problema. Disponível em: <http://www.greenpeace.org/brasil/documentos/energia/greenpeacebr_070208_energia_biocombustivel_problema_e_solucao_port_v1>. Acesso em: 25 Dez. 2010.

GREIG, D.; TRAVISANO, M. The Prisoner's Dilemma and polymorphism in yeast *SUC* genes. **Proc Biol Sci.**, v. 271, p. s25-s26, 2004.

GROENEVELD, P.; STOUTHAMER, A. H.; WESTERHOFF, H. V. Super life how and why cell selection leads to the fastest-growing eukaryote. **FEBS Journal**, v.276, p.254-270. 2009.

GROSSMANN, M. K.; ZIMMERMANN, F. K. The structural genes of internal invertases on *Saccharomyces cerevisiae*. **Mol. Gen. Genet.**, v.175, p.223-229, 1979.

GUERRA, J. B.; ARAUJO, R. A.; PATARO, C.; FRANCO, G. R.; MOREIRA, E. S.; MENDONÇA-HAGLER, L. C.; ROSA, C. A. Genetic diversity of *Saccharomyces cerevisiae* strains during the 24 h fermentative cycles for the production of the artisanal Brazilian cachaça. **Letters Appl. Microbiol.**, v.33, p.106-111, 2001.

HAN, E. K.; COTTY, F.; SOTTAS, C. JIANG, H. MICHELS, C. A. Characterization of *AGT1* encoding a general α -glucoside transporter from *Saccharomyces*. **Mol. Microbiol.**, 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. **Pak. J. Botany.**, v.35, p.527-531, 2003.

HERBERTS, R. A. **Transporte ativo de α -glicosídeos**: Uma metodologia para avaliar a vitalidade de leveduras cervejeiras. 2006. 62f. 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. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, 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*. **Biotechnol. Bioeng.**, v.76, p.247-258, 2001.

HILL, J.; NELSON, E.; TILMAN, D.; POLASKY, S.; TIFFANY, D. Environmental, economic, and energetic costs and benefits of biodiesel and ethanol biofuels. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v.103, p.11206-11210, 2006.

HOHMANN, S.; ZIMMERMANN, F. K. Cloning and expression on a multicopy vector of five invertase genes of *Saccharomyces cerevisiae*. **Curr. Genet.**, v.11, p.217-225, 1986.

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

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

HORÁK, J. Yeast nutrient transporters. **Biochem. Biophys. Acta.**, v.331, p.41-79, 1997.

HU, Z.; YUE, Y.; JIANG, H.; ZHANG, B.; SHERWOOD, P. W.; MICHELS, C. A. Analysis of the mechanism by which glucose inhibits maltose induction of MAL gene expression in *Saccharomyces*. **Genetics**, v. 154, p. 121-132, 2000.

IHMELS, J.; BERGMANN, S.; GERAMI-NEJAD, M.; YANAI, I.; MCCLELLAN, M.; BERMAN, J.; BARKAI, N. Transcriptional network through the evolution of motif usage. **Science**, v. 309, p.938-940, 2005.

ISAAC, S.; JENNINGS, D. **Microbial culture**. Oxfordshire: BIOS Scientific Publishers, 1995. 133p.

IZIQUE, C. Ampliação da produção de etanol no país dependerá de investimentos em ciência básica e aplicada. **Rev. FAPESP**, v. 146, Abril 2008.

JANSEN, M. L.; DE WINDE, J. H.; PRONK, J. T. Hxt-Carrier-Mediated Glucose Efflux upon Exposure of *Saccharomyces cerevisiae* to Excess Maltose. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.68, n.9, p.4259-4265, 2002.

JOHNSTON, M.; CARLSON, M. Regulation of carbon and phosphate utilization. In: JONES, E. W.; PRINGLE, J.R.; BROACH J.R. **The molecular and cellular biology of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: gene expression**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1992. p. 193-281. v. 2.

JONES, A. M.; THOMAS, K. C.; INGLEDEW, W. M. Ethanolic fermentation of blackstrap molasses and sugarcane juice using very high gravity technology. **J. Agric. Food Chem.**, v. 42, p. 1242-1246, 1994.

JULES, M.; GUILLOU, V.; FRANÇOIS, J.; PARROU, J. L. Two distinct pathways for trehalose assimilation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 70, p. 2771-2778, 2004.

KHAN, N. A.; ZIMMERMANN, F. K.; EATON, N. R. Genetic and biochemical evidence of sucrose fermentation by maltase in yeast. **J. Mol. Gen. Genet.**, v. 123, p. 43-50, 1973.

KELLYS, M.; BIRREN, B. W.; LANDER, E. S. Proof and evolutionary analysis of ancient genome duplication in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Nature**, v. 428, p. 617-624, 2004.

KIM, J. H.; BRACHET, V. R.; MORIYA, H.; JOHNSTON, M. Integration of Transcriptional and Posttranslational Regulation in a Glucose Signal Transduction Pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. **Eukar. Cell**, v.5, n.1, p.167-173, 2006.

KLIS, F. M.; BOORSMA, A.; DE GROOT, P. W. J. Cell wall construction in *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, v.23, p.185-202. 2006.

KODAMA, Y.; FUKUI, N.; SHIBANO, J.; ASHIKARI, T. **Yeast transformant for manufacturing beers by highgravity brewing**. JP nº 06,245,750. 26 feb. 1993; 06 set. 1994, Jpn. **Kokai Tokyo Koho**, v. 121, p. 299331, 06 set. 1994.

KODAMA, Y.; FUKUI, N.; ASHIKARI, T.; SHIBANO, Y.; MORIOKA-FUJIMOTO, K.; HIRAKI, Y.; NAKATANI, K. Improvement of maltose fermentation efficiency: constitutive expression of *MAL* genes in brewing yeasts. **J. Am. Soc. Brew. Chem.**, v. 53, p. 24-29, 1995.

KORSHUNOVA, I. V.; NAUMOVA, E. S.; NAUMOV, G. I. Comparative molecular-genetic analysis of the beta-fructosidases in yeast *Saccharomyces*. **Mol. Biol. (Mosk)**, 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 Biol.**, v. 9, n. 8, p.e1001122. 2011.

KOVARIK, B. Henry Ford, Charles F. Kettering and the Fuel of the Future. **Autom. Hist. Rev.**, v.32, p.7-27, 1998.

KRUCKEBERG, A. L.; YE, L.; BERDEN, J. A.; DAM, K. V. Functional expression, quantification and cellular localization of the Hxt2 hexose transporter of *Saccharomyces cerevisiae* tagged with the green fluorescent protein. **Biochem. J.**, v.339, p.299-307, 1999.

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

LAI, L. C.; KOSORUKOFF, A. L.; BURKE, P. V.; KWAIST, K. E. Metabolic-State-Dependent Remodeling of the Transcriptome in Response to Anoxia and Subsequent Reoxygenation in *Saccharomyces cerevisiae*. **Eukary. Cell**, v.5, p.1468-1489, 2006.

LANDRY, C. R.; TOWNSEND, J. P.; HARTL, D. L.; CAVALIERI, D. Ecological and evolutionary genomics of *Saccharomyces cerevisiae*. **Mol. Ecol.**, 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*. **Mol. Cell**, v.16, p.293–299, 2004.

LEVINE, J.; TANOUYE, L.; MICHELS, C. A. The UASMAL is bidirectional promoter element required for the expression of both the *MAL61* and *MAL62* genes of the *Saccharomyces cerevisiae*. **Curr. Genet.**, v. 22, p. 181-189, 1992.

LEWIS, J. G.; NORTHCOTT, C. J.; LEARMONTH, R. P.; ATTFIELD, P. V.; WATSON, K. The need for consistent nomenclature and assessment of growth phases in diauxic cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Gen. Microbiol.**, v.139, p.835-839, 1993.

LIBERAL, A. T. S.; DA SILVA-FILHO, E. A.; DE MORAIS, J. O. F.; SIMÕES, D. A.; DE MORAIS JR, M. A. Contaminant yeast detection in industrial ethanol fermentation must by rDNA-PCR. **Letters. Appl. Microbiol.**, v.40, p.19-23, 2005.

LIBERAL, A.T. S.; BASILIO, A. C.; RESENDE, A. M.; BRASILEIRO, B. T.; DA SILVA-FILHO, E. A.; DE MORAIS, J. O. F.; SIMÕES, D. A.; DE MORAIS JR, M. A. Identification of *Dekkera bruxellensis* as a major contaminant yeast in continuous fuel ethanol fermentation. **J. Appl Microbiol.**, v.102, p.538-547, 2007.

LIMA, U. A.; BASSO, L. C.; AMORIM, H. V. Produção de etanol. In: LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. **Biotecnologia Industrial**. São Paulo: Editora Blucher, 2001. p. 1-43. v. 3 : Processos fermentativos e enzimáticos.

LORENZ, M. C.; PAN, X.; HARASHIMA, T.; CARDENAS, M. E.; XUE, Y.; HIRSCH, J. P.; HEITMAN, J. The G Protein-Coupled Receptor Gpr1 Is a Nutrient Sensor That Regulates Pseudohyphal Differentiation in *Saccharomyces cerevisiae*. **Genetics**, v.154, n.2, p.609-622, 2000.

MALLUTA, E. F.; DECKER, P.; STAMBUK, B. U. The Kluyver effect for trehalose in *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Basic Microbiol.**, v. 40, p. 199-205, 2000.

MANIATIS, T.; FRITSCH, E. F.; SAMBROOK, J. **Molecular cloning**: a laboratory manual. New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1982. 545p.

MARRIS, E. Drink the best and drive the rest. **Nature**, v.444, p.670-672, 2006.

MASHEGO, M. R.; VAN GULIK, W. M.; VINKE, J. L.; HEIJNEN, J. J. Critical evaluation of sampling techniques for residual glucose determination in carbon-limited chemostat culture of *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotech. Bioeng.**, v.83, p.395-399, 2003.

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

MEDINTZ, I.; WANG, X.; HRADEK, T.; MICHELS, C. A. A PEST-like Sequence in the N-Terminal Cytoplasmic Domain of *Saccharomyces* Maltose Permease Is Required for Glucose-Induced Proteolysis and Rapid Inactivation of Transport Activity. **Biochemistry**, v.39, p.4518-4526, 2000.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Anal. Chem.**, v.31, p.426-429, 1959.

MORAES, M. Perspective: lessons from Brazil. **Nature**, v.474, n.7352, p.S25-S25, 2011.

MUSSATTO, S. I.; DRAGONE, G.; GUIMARÃES, P. M. R.; SILVA, J. O. P. A.; CARNEIRO, L. V. M.; ROBERTO, I. S. C.; VICENTE, A. N.; DOMINGUES, L. L.; TEIXEIRA, J. A. Technological trends, global market, and challenges of bio-ethanol production. **Biotech. Adv.**, v.28, n.6, p.817-830, 2010.

MWESIGYE, P. K.; BARFORD, J. P. Mechanism of sucrose utilization by *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Gen. Appl. Microbiol.**, v.42, p. 209-306, 1996.

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*. **Appl. Environ. Microbiol.**, 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. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.65, p.1688-1695, 1999.

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 Microbiol. Lett.**, v.135, p.31-35, 1996.

NAUMOV, G. I.; NAUMOVA, E. S. Comparative genetics of yeast: a novel beta-fructosidase gene *SUC8* in *Saccharomyces cerevisiae*. **Genetika**, v. 46, n. 3, p. 364-372, 2010a.

NAUMOV, G. I.; NAUMOVA, E. S. Polygenic control for fermentation of β -fructosides in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: New genes *SUC9* and *SUC10*. **Microbiol.**, v. 79, n. 2, p. 160-166, 2010b.

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

NEEDLEMAN, R. B.; FEDEROFF, H. J.; ECCLESHALL, T. R.; BUCHFERER, B.; MARMUR, J. Purification and characterization of an alpha-glucosidase from *Saccharomyces carlsbergensis*. **Biochemistry**, v. 17, n. 22, p.4657-4661, 1978.

NESS, F.; AIGLE, M. RTM1: a member of a new family of telomeric repeated genes in yeast. **Genetics**, v.140, p.945-956, 1995.

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

ODA, Y.; OUCHI, K. Effect of invertase activity on the leavening ability of yeast in sweet dough. **Food Microbiol.**, v.7, p.241-248, 1990.

OLSSON, L.; NIELSEN, J. On-line and *in situ* monitoring of biomass in submerged cultivations. **Trends in Biotech.**, v. 15, p. 517-522, 1997.

ORELLANA, C.; NETO, R. B. Brasil and Japan give fuel to ethanol market. **Nature Biotechnol.**, v.24, n.3. p.232, 2006.

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

OZCAN, S.; JOHNSTON, M. Function and regulation of yeast hexose transporters. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 63, p. 554-559, 1999.

OZCAN, 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.

PANTAZOPOULOU, A.; DIALLINAS, G. Fungal nucleobase transporters. **FEMS Microbiol. Rev.**, v.31, n.6, p.657-675, 2007.

PATARO, C.; GUERRA, J. B.; PETRILLO-PEIXOTO, M. L.; MENDONÇA-HAGLER, L. C.; LINARDI, V. R.; ROSA, C. A. Yeast communities and genetic polymorphism of *Saccharomyces cerevisiae* strains associated with artisanal fermentation in Brazil. **J. Appl. Microbiol.**, v.89, p.24-31, 2000.

PEREZ, M.; LUYTEN, K.; MICHEL, R.; RIOU, C.; BLONDIN, B. Analysis of *Saccharomyces cerevisiae* hexose carrier expression during wine fermentation: both low- and high-affinity HXT transporters are expressed. **FEMS Yeast Res.**, v. 5, p. 351-361, 2005.

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

PRONK, J. T. Auxotrophic yeast strains in fundamental and applied research. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.68, p.2095-100, 2002.

QUEROL, A.; FERNÁNDEZ-ESPINAR, M.T.; DEL OLMO, M.; BARRIO, E. Adaptive evolution of wine yeast. **Inter. J. Food Microbiol.**, v.86, p.3-10, 2003.

REDDY, A.; JOHNSON, R. S.; BIEMANN, K.; WILLIAMS, R. S.; ZIEGLER, F. D.; TRIMBLE, R. B.; MALEY, F. Characterization of the glycosylation sites in yeast external invertase. **J. Biol. Chem.**, v.263, n.15, p.6978-6985, 1988.

RIBALLO, E.; HERWIJER, M.; WOLF, D. H.; LAGUNAS, R. Catabolite inactivation of the yeast maltose transporter occurs in the vacuole after internalization by endocytosis. **J. Bacteriol.**, v.177, p.5622-5627, 1995.

ROBBINS, M. Policy: Fuelling politics. **Nature**, v.474, n.7352, p.S22-S24, 2011.

RODIONOV, Y. V.; KEPPE, O. I.; SUKHACHEVA, M. V. A photometric assay for ethanol. **Appl. Biochem. Microbiol.**, v. 38, p. 395-396, 2002.

ROLLAND, F.; WINDERICKX, J.; THEVELEIN, J. M. Glucose-sensing and -signaling mechanisms in yeasts. **FEMS Yeasts Res.**, v.2, p.183-201, 2002.

ROSILLO-CALLE, F.; CORTEZ, L. A. B. Towards proalcool II – A review of the brazilian bioethanol programme. **Biomass Bioenergy**, v.14, n.2, p. 115-124, 1998.

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

SÁNCHEZ, Ó. J.; CARDONA, C. A. Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. **Biores. Tech.**, v.99, p.5270-5295, 2008.

SANTANGELO, G. M. Glucose signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 70, p. 253-282, 2006.

SANTOS, M. H. C. **Política e Políticas de uma energia alternativa**: o caso do Proálcool. Rio de Janeiro: Notrya, 1993. 352p.

SCHÄFER, W. E.; ROHWER, J. M.; BOTHA, F. C. A kinetic study of sugarcane sucrose synthase. **Eur. J. Biochem.**, v.271, p.3971-3977, 2004.

SHELL, D. J.; DOWE, N.; IBSEN, K. N.; RILEY, C. J.; RUTH, M. F.; LUMPKIN, R. E. Contaminant occurrence, identification and control in a pilot-scale corn fiber to ethanol conversion process. **Biores. Technol.**, v.98, p.2942-2948, 2007.

SCHLESSER, A.; ULASZEWSKI, S.; GHISLAIN, M.; GOFFEAU, A. A second transport ATPase gene in *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Biol Chem.**, v. 263, p. 19480-19487, 1988.

SERRANO, R.; KIELLAND-BRANDT, M. G.; FINK, G. R. Yeast plasma membrane ATPase is essential for growth and has homology with (Na⁺ + K⁺), K⁺- and Ca²⁺-ATPases. **Nature**, v. 319, p. 689-693, 1986.

SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. In: LIMA, U. DE A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. **Biotecnologia Industrial**. São Paulo: Editora Blucher, 2001. v. 2 : Engenharia Bioquímica.

SCHUBERT, C. Can biofuels finally take center stage? **Nature Biotech.**, v. 24, p.777-784, 2006.

SHERMAN, F. **Getting started with yeast**. Disponível em: <<http://www.urmc.rochester.edu/labs/Sherman-Lab/publications/books.cfm>>. Acesso em: 13 Fev. 2009.

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

SIRENKO, O. I.; NI, B.; NEEDLEMAN, R. B. Purification properties of Mal63p activator of *Saccharomyces cerevisiae*. **Curr. Genet.**, v. 27, p. 509-516, 1995.

SNOEK, I. S. I.; STEENSMA, H. Y. Factors involved in anaerobic growth of *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, v.24, p.1-10. 2007.

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*. **Bioch. Bioph. Acta**, v.1379, n.1, p.118-128. 1998.

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

STAMBUK, B. U. A simple laboratory exercise illustrating active transport in yeast cells. **Biochem. Mol. Biol. Edu.**, v. 28, p. 313-317, 2000.

STAMBUK, B. U.; BATISTA, A. S.; DE ARAUJO, P. S. Kinetics of active sucrose transport in *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Biosci. Bioeng.**, v. 89, p. 212-214, 2000.

STAMBUK, B. U.; DE ARAUJO, P. S. Kinetics of active α -glucoside transport in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Yeast Res.**, v.1, p. 73-78, 2001.

STAMBUK, B. U. Transcriptional and posttranslational regulation of a membrane nutrient transporter. **Biochem. Mol. Biol. Educ.**, v.30, p.388-393, 2002.

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

STAMBUK, B. U.; DE ARAUJO, P. S.; BASSO, L. C.; AMORIM, H. V.; TRICHEZ, D.; ALVES JR, S. L.; KLINKOWSTROM, A. M.; MILETTI, L. C.; MACHADO, L. O.; BADOTTI, F.; ESPIRITO-SANTO, J. C. A.; SCHLÖGL, P.; DÁRIO, M. G. **Processo para modificar geneticamente leveduras *Saccharomyces*, e seu uso em processos fermentativos de produção de metabólitos.** BR nº PI 0901254-0 A2. 14 abr. 2009; 04 jan 2011. Revista da Propriedade Industrial, Rio de Janeiro, n. 2087, p. 47, 4 jan 2011.

TABATA, S.; IDE, T.; UMEMURA, Y.; TORII, K. Purification and characterization of α -glucosidases produced by *Saccharomyces* in response to three distinct maltose genes. **Biochim. Biophys. Acta**, v.797, p.231-238, 1984.

TAKESHIGE, K.; OUCHI, K. Effects of yeast invertase on ethanol production in molasses. **J. Ferment. Bioeng.**, v.79, p.513-515, 1995.

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. **J. Biolog. Chem.**, v.285, n.35, p.26815-26824, 2010.

THEVELEIN, J. M.; DE WINDE, J. H. Novel sensing mechanisms and targets for the cAMP-protein kinase A pathway in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Mol. Microb.**, v.33, p.904-918, 1999.

THEVELEIN, J. M.; VOORDECKERS, K. Functioning and Evolutionary Significance of Nutrient Transceptors. **Mol. Biol. Evol.**, v.26, n.11, p.2407-2414, 2009.

VAN DE VELDE, S.; THEVELEIN, J. M. cAMP-PKA and Snf1 signaling mechanisms underlie the superior potency of sucrose for induction of filamentation in yeast. **Eukar. Cell**, v.7, p.286-293, 2008.

VAN DEN BRINK, J.; CANELAS, A. B.; VAN GULIK, W. M.; PRONK, J. T.; HEIJNEN, J. J.; DE WINDE, J. H.; DARAN-LAPUJADE, P. Dynamics of glycolytic regulation during adaptation of *Saccharomyces cerevisiae* to fermentative metabolism. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.74, n.18, p.5710-5723, 2008a.

VAN DEN BRINK, J.; DARAN-LAPUJADE, P.; PRONK, J.; DE WINDE, J. New insights into the *Saccharomyces cerevisiae* fermentation switch: dynamic transcriptional response to anaerobicity and glucose-excess. **BMC Genomics**, v.9, n.1, p.100. 2008b.

VAN DIJKEN, J. P.; BAUER, J.; BRAMBILLA, L.; DUBOC, P.; FRANÇOIS, J. M.; GANCEDO, C.; GIUSEPPIN, M. L.; HEIJNEN, J. J.; HOARE, M.; LANGE, H. C.; MADDEN, E. A.; NIEDERBERGER, P.; NILSEN, 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 comparison of physiological and genetic properties of four *Saccharomyces cerevisiae* strains. **Enz. Microb. Tech.**, v.26, p.706-714, 2000.

VAN DIJKEN, J. P.; SCHEFFERS, W. A. Redox balances in the metabolism of sugars by yeasts. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 43, p. 275-278, 1986.

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. **Mol. Microb.**, v.33, n.2, p.363-376. 1999.

VERDUYN, C.; POSTMA, E.; SCHEFFERS, W. A.; VAN DIJKEN, J. P. Energetics of *Saccharomyces cerevisiae* in anaerobic glucose-limited chemostat cultures. **J. Gen. Microbiol.**, v. 136, p. 405-412, 1990.

VERDUYN, C.; POSTMA, E.; SCHEFFERS, W. A.; VAN DIJKEN, J. P. Effect of benzoic acid on metabolic fluxes in yeasts: a continuous-culture study on the regulation of respiration and alcoholic fermentation. **Yeast**, v.8, p.501-517, 1992.

VERSTREPEN, K. J.; ISERENTANT, D.; MALCORPS, P.; DERDELINCKX, G.; VAN DIJCK, P.; WINDERICKX, J.; PRETORIOUS, I. S.; THEVELEIN, J. M.; DELVAUX, F. R. Glucose and sucrose: hazardous fast-food for industrial yeast? **Trends Biotech.**, v.22, p.531-537, 2004.

WACLAWOVSKY, A. J.; SATO, P. M.; LEMBKE, C. G.; MOORE, P. H.; SOUZA, G. M. Sugarcane for bioenergy production: an assessment of yield and regulation of sucrose content. **Plant Biotech. J.**, v.8, n.3, p.263-276, 2010.

WANG, J.; NEEDLEMAN, R. B. Removal of a Mig1p binding site converts a *MAL63* constitutive mutant derived by interchromosomal gene conversion to glucose insensitivity. **Genetics**, v.142, p. 51-63, 1996.

WEIß, P.; HUPPERT, S.; KOLLING, R. ESCRT-III Protein Snf7 Mediates High-Level Expression of the *SUC2* Gene via the Rim101 Pathway. **Eukar. Cell**, v.7, n.11, p.1888-1894, 2008.

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. **Appl Environ Microbiol.**, v.59, p.3102-3109, 1993.

WEUSTHUIS, R. A.; PRONK, J. T.; VAN DEN BROEK, P. J.; VAN DIJKEN, J. P. Chemostat cultivation as a tool for studies on sugar transport in yeasts. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v.58, p.616-630, 1994.

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

WYMAN, C. E. Biomass Ethanol: Technical progress, opportunities, and Commercial challenges. **Ann. Rev. Energy Environ.**, v.24, p.189-226, 1999.

YOUNG, E. T.; DOMBEK, K. M.; TACHIBANA, C.; IDEKER, T. Multiple Pathways Are Co-regulated by the Protein Kinase Snf1 and the Transcription Factors Adr1 and Cat8. **J. Biol. Chem.**, v.278, n.28, p.26146-26158, 2003.

YOSHIKAWA, K.; YAMAMOTO, K.; OKADA, S. Specificity of yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) in removing carbohydrates by fermentation. **Biotechnol. Biochem.**, v. 58, p. 1392-1398, 1994.

ZANIN, G. M.; SANTANA, C. C.; BON, E. P.; GIORDANO, R. C.; DE MORAES, F. F.; ANDRIETTA, S. R.; DE CARVALHO NETO, C. C.; MACEDO, I. C.; FO, D. L.; RAMOS, L. P.; FONTANA, J. D. Brazilian bioethanol program. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, v.84-86, p.1147-1161, 2000.

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

ZASTROW, C. R.; HOLLATZ, C.; DE ARAUJO, P. S.; STAMBUK, B. U. Maltotriose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.**, 27: 34-38, 2001.

ZUZUARREGUI, A.; MONTEOLIVA, L.; GIL, C.; DEL OLMO, M. Transcriptomic and Proteomic Approach for Understanding the Molecular Basis of Adaptation of *Saccharomyces cerevisiae* to Wine Fermentation. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.72, n.1, p.836-847, 2006.