SÉRGIO LUIZ ALVES JÚNIOR

**Genômica do metabolismo de maltotriose em
Saccharomyces cerevisiae:
o papel determinante do gene *AGT1***

SÉRGIO LUIZ ALVES JÚNIOR

**Genômica do metabolismo de maltotriose
em *Saccharomyces cerevisiae*:
o papel determinante do gene *AGT1***

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

São Paulo
2010

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Sérgio Luiz Alves Júnior.

Título da Tese: Genômica do metabolismo de maltotriose em
Saccharomyces cerevisiae: o papel determinante do gene
AGT1.

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:

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

© reprodução total

Alves Júnior, Sérgio Luiz.

Genômica do metabolismo de maltotriose em *Saccharomyces cerevisiae*: o papel determinante do gene *AGT1* / Sérgio Luiz Alves Júnior. -- São Paulo, 2010.

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: Microbiologia aplicada.

Versão do título para o inglês: Genomics of maltotriose metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*: the determinant role of *AGT1* gene.

Descritores: 1. *Saccharomyces cerevisiae* 2. *AGT1* 3. Expressão 4. Maltotriose 5. Transporte 6. Fermentação I. Stambuk, Boris Juan Carlos Ugarte II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia III. Título.

ICB/SBIB015/2010

SÉRGIO LUIZ ALVES JÚNIOR

**Genômica do metabolismo de maltotriose
em *Saccharomyces cerevisiae*:
o papel determinante do gene *AGT1***

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

São Paulo
2010

A meus pais e minha esposa.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Prof. Dr. Boris U. Stambuk pela seriedade, pela atenção, pela orientação, pela substancial contribuição à minha formação e pela sua amizade. Tenho certeza que, por seguir seus passos, serei um de seus colegas de profissão.

À Profa. Dra. Ana Clara Guerrini Schenberg, à Profa. Dra. Elisabete José Vicente e ao Prof. Dr. Pedro Soares de Araújo por me terem concedido acesso irrestrito aos seus laboratórios, pela atenção que sempre me prestaram e pelas discussões construtivas. Agradeço também à Profa. Ana Clara e ao Prof. Pedro por, antecipadamente, terem aceitado o convite para compor a banca examinadora deste doutoramento.

Aos demais membros da banca examinadora por aceitarem o convite.

Ao Prof. Dr. Johan M. Thevelein por me dar a oportunidade de trabalhar em seu laboratório durante seis meses, proporcionando-me significativo crescimento profissional.

Ao Prof. Dr. Luiz Claudio Miletto pela atenção, pela amizade e pela construção de três linhagens para este trabalho.

Ao Prof. Dr. Hernán F. Terenzi (UFSC) por permitir a utilização de alguns de seus equipamentos.

Ao Prof. Dr. Robert Ivan Schumacher (IQ-USP) pela atenção e pela colaboração nos ensaios de citometria de fluxo.

Aos colegas de laboratório, estejam eles no ICB-USP, no IQ-USP, no LMCB-KUL ou no CCB-UFSC, pela amizade e pelas contribuições diretas e indiretas a este trabalho.

À Eliane, à Fábria e ao Marcos, funcionários da secretaria do Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia, pela seriedade e pela atenção.

Aos meus avós, às minhas tias Luciane e Isolete, à minha bisavó e aos meus irmãos pelo apoio incondicional e pelo carinho.

Aos meus pais por tudo. Sem eles... nada disto.

À minha esposa pelo amor, pelo carinho, pela amizade, pelo companheirismo, pelo apoio e, principalmente, pela paciência.

Ao CNPq e à FAPESP pelo apoio financeiro.

À CAPES pela bolsa de doutorado.

“No campo da observação, o acaso favorece apenas as mentes mais preparadas.”

Louis Pasteur

RESUMO

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

Processos biotecnológicos importantes dependem da eficiente fermentação de hidrolisados de amido, ricos em maltose e maltotriose, pela levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Entretanto, algumas linhagens apresentam dificuldade para consumir a maltotriose, o que diminui a eficiência fermentativa nesses processos. Embora se acredite que o transporte desse açúcar através da membrana plasmática seja o passo limitante para sua fermentação, existem conflitos na literatura em relação às permeases capazes de transportar a maltotriose. No intuito de melhorar a compreensão do metabolismo desse açúcar em *S. cerevisiae*, correlacionamos o fenótipo de várias cepas em maltotriose com seus respectivos genótipos. Para isso, identificamos os genes de transportadores de α -glicosídeos presentes nas linhagens analisadas e avaliamos o crescimento celular, a produção de etanol e as atividades de transporte por cada cepa. Para confirmar se tais genes eram, de fato, expressos, analisamos a expressão dos mesmos em diferentes condições de cultivo. Após verificarmos que a presença de um regulador constitutivo aumenta a expressão do gene *AGT1* e incrementa a fermentação de maltose e maltotriose, deletamos esse gene do genoma de três linhagens de laboratório para avaliar a contribuição da permease Agt1p para a utilização de maltotriose. Embora as linhagens selvagens tenham consumido e fermentado rapidamente esse açúcar, as *agt1 Δ* foram incapazes de transportar a maltotriose e de utilizá-la durante 3-4 dias de incubação. Contudo, após um período de incubação maior (8 dias), apenas uma das linhagens *agt1 Δ* continuou incapaz de crescer em maltotriose, enquanto as outras apresentaram crescimento tardio, após ~100 h de fase *lag*, porém sem produção de etanol. Essa mesma fase *lag* extensa foi também observada em cepas industriais incapazes de expressar o *AGT1*. Além disso, através de QRT-PCR vimos que os transportadores *MPH2-MPH3* não estão relacionados a esse fenótipo. Ao buscarmos o que poderia promover esse novo fenótipo, análises de microarray indicaram expressão aumentada de α -glicosídeses e transportadores de hexose durante esse crescimento tardio. Após inocularmos uma linhagem *hxt*-null *agt1 Δ* em maltotriose, detectamos glicose no meio de cultura durante o seu crescimento tardio, indicando que cepas que não contam com o Agt1p na membrana só conseguem crescer tardiamente em maltotriose em virtude da hidrólise extracelular desse açúcar. Por fim, nós demonstramos ainda que a α -glicosidase codificada pela ORF YJL216C é responsável por essa hidrólise extracelular da maltotriose, uma vez que a sua deleção tornou as células incapazes de crescer em maltotriose mesmo durante longos períodos de incubação. Assim, nossos resultados indicam que o Agt1p é o único transportador de maltotriose em *S. cerevisiae* e que o mesmo é necessário para promover eficiente fermentação desse açúcar. Pudemos também concluir que, em sua ausência, as células podem crescer em maltotriose somente se forem capazes de hidrolisá-la extracelularmente. Neste trabalho, discutimos também o poder de indução dos genes *MAL* pela maltose e pela maltotriose. Analisados em conjunto, nossos resultados sugerem que, embora não haja um indutor mais forte dentre esses açúcares, a atividade de transporte é maior em células crescidas em maltotriose.

Palavras-chave: *Saccharomyces cerevisiae*. *AGT1*. Expressão. Maltotriose. Transporte. Fermentação.

ABSTRACT

ALVES, S. L. Jr. **Genomics of maltotriose metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*: the determinant role of *AGT1* gene.** 133 p. PhD thesis (Biotechnology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

Important biotechnological processes depends on the efficient fermentation of starch hydrolysates rich in maltose and maltotriose by *Saccharomyces cerevisiae*. However, some strains have difficulty to consume maltotriose, which decreases their fermentation efficiency. Although it is believed that maltotriose transport across the plasma membrane is the rate-limiting step for its fermentation, there have been conflicting reports whether all the known α -glucoside transporters in *S. cerevisiae* allow efficient maltotriose utilization by yeast cells. In order to contribute for a better understanding of maltotriose metabolism in *S. cerevisiae*, we correlated the phenotype of several strains on maltotriose with their respective genotype. For such correlation, we identified which α -glucoside transporter genes were present in the strains analyzed and we determined the kinetics of cell growth and ethanol production by each strain on maltotriose, as well as their transport activities. To be sure that those genes were, indeed, expressed, we also evaluated their expression under different growth conditions. After verifying that a constitutive *MAL* regulator increases the expression of *AGT1* gene and improves maltose and maltotriose fermentation, we decided to delete this gene from three laboratorial strains to evaluate the contribution of the Agt1p permease for maltotriose utilization. In spite that the wild-type cells rapidly consumed and efficiently fermented this sugar, the *agt1* Δ strains were unable to transport maltotriose and to utilize this sugar during 3-4 days of incubation. However, after a longer period of incubation (8 days), just one of the *agt1* Δ strains was still unable to grow on maltotriose, while the other two strains presented delayed growth, after an ~100 h *lag* phase, but did not ferment this sugar. The same long *lag* phase on maltotriose was also seen in industrial strains which were unable to express their *AGT1* gene. Furthermore, QRT-PCR assays demonstrated that *MPH2-MPH3* transporters are not related to this phenotype. Seeking for what could promote this novel phenotype, microarray analysis indicated upregulation of α -glucosidases and hexose transporters during this delayed growth on maltotriose. After inoculation of an *hxt*-null *agt1* Δ strain on maltotriose, we detected glucose on the medium during cellular growth, indicating that strains which do not have Agt1p in their plasma membrane are able to grow after a long *lag* phase on maltotriose only because of extracellular maltotriose hydrolysis. Finally, we also show that the α -glucosidase codified by YJL216C is responsible for this delayed extracellular hydrolysis of maltotriose, since after its deletion cells became unable to grow on maltotriose at all. Thus, our results indicate that Agt1p is the only effective maltotriose transporter in *S. cerevisiae* and that it is required to promote an efficient fermentation of this sugar by yeast cells. We can also conclude that in its absence cells can only grow on maltotriose if they are capable to hydrolyze this sugar outside the cells. In the present work, we also discussed which one, maltose or maltotriose, is the best inducer of *MAL* genes. Taking together, our results suggest that, although there is no best inducer, α -glucoside transport activity is higher in maltotriose grown cells.

Keywords: *Saccharomyces cerevisiae*. *AGT1*. Expression. Maltotriose. Transport. Fermentation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1	Utilização de maltose e maltotriose por <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	21
Figura 1.2	Representação esquemática da organização e do controle da expressão dos genes <i>MAL</i>	23
Figura 1.3	Repressão e inativação catabólica em <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	25
Figura 3.1	Deleção do gene <i>AGT1</i>	38
Figura 3.2	Fusão de <i>GFP</i> à extremidade C-terminal do <i>AGT1</i>	40
Figura 4.1	Crescimento celular em micro-escala da cepa 340-2B transformada com o plasmídeo pJW4 ou pJW5	49
Figura 4.2	Confirmação da deleção do gene <i>AGT1</i> na cepa 340-2B	50
Figura 4.3	Utilização de açúcares em meio sintético pela cepa LCM002 transformada com o plasmídeo pJW5	50
Figura 4.4	Utilização de maltose e maltotriose pela cepa 340-2B transformada com o plasmídeo pJW4 ou pJW5 em meio rico	53
Figura 4.5	Utilização de maltose e maltotriose pela cepa 340-2B transformada com o plasmídeo pJW4 ou pJW5 em meio sintético	54
Figura 4.6	Atividade da permease Agt1p na cepa 340-2B transformada com o plasmídeo pJW4 ou pJW5	55
Figura 4.7	Atividade de hidrólise de <i>pNPαG</i> na cepa 340-2B transformada com o plasmídeo pJW4 ou pJW5	55
Figura 4.8	Atividade de hidrólise de maltose e maltotriose na cepa 340-2B transformada com o plasmídeo pJW4 ou pJW5	56
Figura 4.9	Cinética do transporte ativo de maltose e maltotriose pela cepa 340-2B transformada com o plasmídeo pJW5	57
Figura 4.10	Verificação da presença do gene <i>AGT1</i> e dos genes <i>MALx1</i> nas cepas analisadas	58
Figura 4.11	Utilização de maltose e maltotriose pelas cepas CEN.PK2-1C e LCM003 em meio rico	60
Figura 4.12	Utilização de maltose e maltotriose pelas cepas 1403-7A, LCM001, MC966A e BSY09 em meio rico	61
Figura 4.13	Cinética do transporte ativo de maltose e maltotriose pelas cepas CEN.PK2-1C e LCM003	62
Figura 4.14	Cinética do transporte ativo de maltose e maltotriose pelas cepas 1403-7A e LCM001	62
Figura 4.15	Utilização de maltose e maltotriose pela cepa BSY09 transformada com o plasmídeo pJW5 ou pGRSd-AGT1 em meio sintético	65

Figura 4.16	Utilização de maltotriose em meio rico pela cepa BSY09 transformada com o plasmídeo pJW5 ou pGRSd-AGT1	66
Figura 4.17	Fermentação em batelada de 50 g/L de extrato de malte pela cepa BSY021-34B transformada com diferentes plasmídeos	68
Figura 4.18	Confirmação da fusão <i>AGT1-GFP</i> na cepa 340-2B	69
Figura 4.19	Expressão da permease Agt1p em meios contendo maltose ou maltotriose como fontes de carbono	71
Figura 4.20	Expressão relativa dos genes <i>AGT1</i> e <i>MALx1</i> nas cepas 1403-7A e LCM001	72
Figura 4.21	Expressão relativa dos genes <i>AGT1</i> e <i>MALx1</i> nas cepas CEN.PK2-1C e LCM003	73
Figura 4.22	Expressão relativa dos genes <i>AGT1</i> e <i>MALx1</i> nas cepas MC966A e BSY09 ..	73
Figura 4.23	Crescimento celular em micro-escala de diferentes cepas industriais em maltose e em maltotriose	76
Figura 4.24	Verificação da presença do gene <i>AGT1</i> e dos genes <i>MALx1</i> nas cepas analisadas	76
Figura 4.25	Perfis de crescimento celular e produção de etanol das cepas CAT-1, PE-2 e VR-1 em maltotriose	78
Figura 4.26	Alinhamento de doze diferentes seqüências da permease Agt1p	78
Figura 4.27	Resumo dos resultados de PCR obtidos durante a avaliação do promotor do gene <i>AGT1</i> das cepas CAT-1 e PE-2	82
Figura 4.28	Expressão relativa dos genes <i>AGT1</i> e <i>MALx1</i> nas cepas CAT-1 e PE-2	83
Figura 4.29	Alinhamento de regiões promotoras do gene <i>AGT1</i>	84
Figura 4.30	Confirmação da distinta região promotora do gene <i>AGT1</i> nas cepas CAT-1 e PE-2	86
Figura 4.31	Crescimento celular em micro-escala das cepas CAT-1 e PE-2 transformadas com o plasmídeo pSA3.14-KanMX	86
Figura 4.32	Utilização de maltose e maltotriose pela cepa LCM001 em meio rico	89
Figura 4.33	Utilização de maltose e maltotriose pela cepa BSY09 em meio rico	90
Figura 4.34	Utilização de maltose e maltotriose pela cepa BSY09 transformada com o plasmídeo pJW5 ou pGRSd-AGT1 em meio rico contendo Antimicina A	91
Figura 4.35	Atividade mitocondrial das cepas MC966A e BSY09	92
Figura 4.36	Expressão relativa dos genes <i>MPHx</i> em diferentes cepas	94
Figura 4.37	Crescimento celular em micro-escala das cepas KY73 e BSY08	97
Figura 4.38	Perfil de aparecimento de glicose durante o crescimento celular da cepa BSY08 em maltotriose	98
Figura 4.39	Confirmação da deleção da ORF YJL216C na cepa BSY09	100

Figura 4.40	Crescimento celular em micro-escala das cepas isogênicas MC966A, BSY09 e SAY09-05	101
Figura 5.1	Filograma de transportadores de α -glicosídeos em fungos	114
Figura 5.2	Representação esquemática do locus <i>mal1g</i> da linhagem RM11-1A	115

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1	Cepas de leveduras utilizadas	34
Tabela 3.2	Primers utilizados	35
Tabela 3.3	Plasmídeos utilizados	37
Tabela 4.1	Atividade de transporte de α -glicosídeos das cepas CEN.PK2-1C e LCM003 crescidas em meio rico contendo 2% de maltose ou maltotriose como fontes de carbono	63

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 Cenário global do mercado de pães e cervejas	14
1.2 Utilização de maltose e maltotriose por <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	18
2 OBJETIVOS	31
2.1 Objetivo geral	31
2.2 Objetivos específicos	31
3 MATERIAL E MÉTODOS	32
3.1 Meios de cultura e condições de crescimento	32
3.2 Cepas, plasmídeos e primers utilizados	33
3.3 Deleção dos genes <i>AGT1</i> e <i>YJL216C</i>	37
3.4 Fusão da proteína verde fluorescente à extremidade C-terminal da permease Agt1p	39
3.5 Verificação da presença dos genes <i>MALx1</i> e do gene <i>AGT1</i> no genoma das cepas	41
3.6 Determinação de glicose, maltose, maltotriose e etanol	42
3.7 Determinação das atividades de transporte ativo e hidrólise de α -glicosídeos	43
3.8 Citometria de Fluxo	44
3.9 Análise de expressão gênica através de RT-PCR quantitativo em tempo real (QRT-PCR)	45
3.10 Seqüenciamento dos diferentes alelos do gene <i>AGT1</i>	46
3.11 Avaliação da região promotora do <i>AGT1</i> e verificação da presença dos genes <i>STAx</i>	47
3.12 Análise de expressão gênica em larga escala	47
4 RESULTADOS	48
4.1 Reguladores <i>MAL</i> e a capacidade fermentativa das células	48
4.2 A presença da permease Agt1p é necessária para a fermentação da maltotriose	57
4.3 Análise da expressão dos genes <i>AGT1</i> e <i>MALx1</i>	68
4.4 Utilização de maltotriose por cepas industriais	74
4.5 Avaliação de um novo fenótipo encontrado para utilização de maltotriose	87
5 DISCUSSÃO	102
6 CONCLUSÕES	118
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	120
APÊNDICE	133

1 INTRODUÇÃO

Há milênios, os seres humanos desenvolvem processos biotecnológicos nos quais leveduras são utilizadas. Na panificação e na produção de cervejas, por exemplo, empregam-se leveduras do complexo *Saccharomyces sensu stricto*, sendo predominante a espécie *Saccharomyces cerevisiae* (QUEROL e BOND, 2009). Esses processos biotecnológicos, que se mostraram bastante importantes para o desenvolvimento da nossa civilização, dependem da eficiente fermentação dos principais produtos da hidrólise do amido: glicose, maltose e maltotriose (VITTI, 2001; WILLAERT, 2001). Por esse motivo, estudos que contemplem o metabolismo desses açúcares em *S. cerevisiae* são de extrema importância para o crescimento dos setores industriais em questão.

1.1 Cenário global do mercado de pães e cervejas

Há pelo menos 10 mil anos, o homem iniciava o processo de cozimento de uma mistura de farinha de trigo e água, que resultava em uma massa achatada, dura por fora e macia por dentro. Nessa época a receita do pão ainda não continha fermento (VITTI, 2001). A descoberta da adição de um líquido fermentado para tornar a massa do pão leve e macia é atribuída aos egípcios. O Egito antigo foi o berço do pão moderno. Ao escavarem ruínas egípcias, arqueólogos encontraram câmaras de cozimento e pedras primitivas usadas para moer grãos (SAMUEL, 1996).

Os gregos foram os responsáveis pela introdução do pão na Europa e os romanos, por sua vez, aprenderam com eles a arte de fazer pão. Durante os séculos do império de Roma, as padarias públicas tornaram-se cada vez mais comuns. Já na Idade Moderna, graças ao aperfeiçoamento dos métodos de fabricação, o pão ganhou o mundo. Em meados do século XVIII, com o início da revolução industrial, as panificadoras começaram a aderir ao processo de mecanização e a diversificar o produto (VITTI, 2001). Em 1859, Louis Pasteur, o pai da microbiologia moderna, descobriu como o fermento funcionava. Ele verificou que o fermento, ao se alimentar da farinha de trigo, produzia gás carbônico, expandindo a massa e fazendo o pão crescer.

Atualmente, o crescimento deste setor tem sido bastante sensível na América Latina. Embora os países europeus – com destaque para Itália, Bélgica, França e Grécia – apresentem, em média, o maior número de padarias por habitantes, dados recentes da empresa ACNielsen¹ (líder global em pesquisa, informações e análise de mercado) apontam maior crescimento de vendas desse produto nos países da América Latina. No Brasil, quando comparados os anos de 2007 e 2008, esse crescimento foi de 11,04%, o que é considerado bastante satisfatório, tendo em vista que o crescimento das vendas nas grandes redes de supermercado, segundo a avaliação do mesmo período², nem mesmo atingiu a margem de 9%.

Nosso país conta, hoje, com mais de 63 mil empresas de panificação, responsáveis pela geração de 700 mil empregos diretos e mais de 1,5 milhão indiretos. A participação desse setor na indústria de alimentos é de 36,2% e o seu faturamento, em 2008, foi de R\$ 43,98 bilhões². No entanto, apesar do forte crescimento desse setor nos últimos anos e da sua relevância para a economia nacional, o consumo médio de pães no Brasil (29 kg/habitante/ano) ainda representa metade da porção recomendada pela OMS (Organização Mundial da Saúde) e pela FAO (Food Agricultural Organization). Segundo o SINDIPAN (Sindicato da Indústria de Panificação e Confeitaria de São Paulo), além do baixo poder aquisitivo da população, fatores como hábitos culturais e qualidade do produto estão diretamente ligados ao baixo consumo desse alimento. Isso é refletido pelas grandes diferenças sócio-culturais entre as regiões em nosso país. Enquanto na região Nordeste o consumo é, em média, de 10 kg/habitante/ano, nas regiões Sul e Sudeste – composta pelos estados que mais investem nesse setor – a média é de 40-45 kg/habitante/ano³. Desse modo, cabe salientar que os dados que compõem o panorama da indústria de pães em nosso país justificam o investimento nesse setor, bem como em pesquisas que contribuam para a sua melhoria e para o aprimoramento do processo produtivo.

Como comentado no início deste trabalho, a fabricação de cervejas é também um excelente exemplo das inúmeras aplicações encontradas para as leveduras. A cerveja é uma bebida não-destilada obtida a partir da fermentação alcoólica de um mosto composto por

¹ Os Produtos Mais Quentes do Mundo – informações sobre o crescimento de categorias de alimentos e bebidas (2006) – disponível em: www.acnielsen.com.br.

² Dados do Programa de Apoio a Panificação (PROPAN) – disponível em: www.propan.com.br.

³ Dados do Sindicato da Indústria de Panificação e Confeitaria de São Paulo (SINDIPAN) – disponível em: www.sindipan.org.br.

cereais maltados, lúpulo e água potável. Indícios arqueológicos sugerem que a história da elaboração e do consumo da cerveja teve início há pelo menos 8.000 anos, na região da antiga Mesopotâmia. Também foram encontradas evidências da sua produção no Egito, onde arqueólogos encontraram hieróglifos que comprovam a existência de uma cervejaria rudimentar datada de 5400 anos a.C.. Os egípcios divulgaram a bebida entre os povos orientais e foram os responsáveis pelo seu ingresso na bacia do Mediterrâneo e, de lá, para a Europa e todo o mundo (SAMUEL, 1996). Já durante o período decorrido durante o Império Romano, os povos germânicos destacaram-se como grandes fabricantes de cerveja.

Na Idade Média, vários mosteiros fabricavam cerveja empregando diversas ervas para aromatizá-la, dentre elas o lúpulo. Logo após o fim da Era Medieval, mais precisamente em 1516, a lei da pureza (*Reinheitsgebot*) foi instituída pelo Duque Wilhelm IV da Baviera. Essa lei tinha por objetivo padronizar a elaboração da bebida, garantindo a fabricação de um produto de qualidade. Segundo ela, a bebida deveria ter como ingredientes apenas a água, o lúpulo e a cevada. Contudo, foi apenas a partir da segunda metade do século XIX, graças aos estudos de Louis Pasteur e Emil Christian Hansen, que a produção dessa bebida passou a ter maior controle de qualidade, propiciando o desenvolvimento das grandes indústrias cervejeiras. Enquanto Pasteur demonstrou a importância de um processo que passou, então, a ser conhecido como Pasteurização, o qual garantia uma conservação prolongada da cerveja, Hansen comprovou a eficácia da utilização de culturas puras de leveduras na sua fabricação.

Esses novos conceitos e tecnologias revolucionaram a qualidade e o caráter da cerveja. Em nosso século, a evolução do processo de elaboração dessa bebida continuou de forma acentuada com o aprimoramento de técnicas e equipamentos e a diversificação dos tipos de cerveja disponíveis no mercado. Além disso, os conhecimentos adquiridos com a bioquímica, microbiologia, engenharia de processo e, mais recentemente, com a biotecnologia permitiram a elaboração de um produto com mínimas variações, mantendo uma uniformidade produtiva elevada e menor custo de produção.

Atualmente, a cerveja se apresenta como produto de grande importância para a economia mundial. Uma avaliação de mercado realizada em mais de 40 países pela ACNielsen⁴ atribuiu, à cerveja, o maior crescimento absoluto em valor de vendas dentre as

⁴ Os Produtos Mais Quentes do Mundo – informações sobre o crescimento de categorias de alimentos e bebidas (2002; 2004; 2006) – disponível em: www.acnielsen.com.br.

categorias de alimentos e bebidas entre os anos 2001 e 2006. O grau de relevância do setor cervejeiro para a economia de vários países é também percebida em um estudo da consultora ERNST & YOUNG⁵. Os dados obtidos por essa empresa demonstram que, na comunidade européia, esse setor contribui substancialmente para a produtividade, empregabilidade e competitividade econômica do continente, tanto de forma direta como indireta. O impacto econômico direto constitui apenas uma pequena fração do impacto total que este mercado tem na economia. As cervejarias da Europa empregam 164 mil pessoas, sendo que 2,6 milhões de empregos podem ser atribuídos, indiretamente, ao setor em questão. Estima-se que, de todos os empregados dos 25 países pertencentes à comunidade européia, 1,2% trabalham direta ou indiretamente para o mercado de cervejas.

O mercado de cervejas contribui em 57,5 bilhões de euros para a economia européia e a venda desse produto gera, no setor turístico, um total de 1,9 milhões de empregos. Anualmente, os consumidores europeus gastam uma estimativa de 125 bilhões de euros em cerveja, sendo que 72% desse dinheiro é gasto em virtude do turismo. O impacto indireto do mercado de cervejas também é fortemente percebido na agricultura, uma vez que os 3,9 bilhões de euros que as indústrias cervejeiras empregam em produtos agrícolas geram 147 mil empregos neste setor⁵.

Anualmente, as cervejarias européias produzem em média 41,6 bilhões de litros de cerveja, dos quais 2,3 bilhões de litros são exportados para fora da Europa. Assim, os Governos nacionais recebem um total de 39 bilhões de euros em impostos pela produção e venda dessa bebida⁵.

Em relação ao Brasil, dados do SINDICERV (Sindicato Nacional da Indústria da Cerveja) referente ao ano de 2007 apontam que o nosso país está entre os quatro maiores fabricantes de cerveja do mundo, com um volume anual de cerca de 10,0 bilhões de litros. De acordo com o SINDICERV, essa atividade industrial, que emprega em nosso país mais de 150 mil pessoas entre postos diretos e indiretos, teve um faturamento bruto de R\$ 25,8 bilhões no ano de 2007. Nos últimos cinco anos, as indústrias cervejeiras no Brasil investiram mais de R\$ 3 bilhões, proporcionando ampliações e modernizações de fábricas já existentes e o início das operações de dez novas plantas industriais⁶.

⁵ The contribution made by beer to the European economy. Disponível em: www.brewersofeurope.org.

⁶ Dados do Sindicato Nacional da Indústria da Cerveja (SINDICERV) – disponível em: www.sindicerv.com.br.

Contudo, apesar de o Brasil ser o quarto maior produtor mundial de cerveja, o consumo per capita dessa bebida em nosso país (média de 47,6 litros por ano) ainda é significativamente inferior ao observado em países como República Tcheca (158,0 litros/ano), Alemanha (117,7 litros/ano), Reino Unido (101,5 litros/ano) e Austrália (92,0 litros/ano) – maiores consumidores mundiais de cerveja. Segundo o SINDICERV, isso se deve principalmente ao baixo poder aquisitivo de boa parte dos consumidores brasileiros e à alta incidência de impostos sobre a produção e comercialização da cerveja em nosso país. Assim, embora na saída da fábrica seu custo (em média de R\$ 0,60 por litro) seja um dos menores do mundo, a incidência de uma série de tributos até chegar ao consumidor final, encarece consideravelmente o preço final dessa bebida⁶.

No intuito de aumentar o consumo per capita de cerveja em nosso país, as indústrias cervejeiras têm adotado estratégias de mercado para reduzir o preço final do produto. Essa redução é obtida através de ganhos na negociação de um maior volume de matéria-prima, na redução de custos logísticos por volume negociado e, ainda, no aumento da produtividade em cada planta. Além disso, as empresas têm apostado também na segmentação do mercado, através da diversificação dos produtos, com o objetivo de satisfazer consumidores de todas as classes sociais (DA SILVA, 2003).

O cenário nacional da cerveja se apresenta, portanto, com potencial de produção e consumo ainda em expansão. Certamente, novos avanços e/ou melhorias na produção poderão contribuir para aumentar ainda mais o desempenho das empresas envolvidas. Esses avanços podem ser alcançados, sobretudo, através de uma melhor compreensão da fisiologia e do metabolismo da levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

1.2 Utilização de maltose e maltotriose por *Saccharomyces cerevisiae*

A indústria da panificação dispõe, atualmente, de duas categorias de pães: os que sofrem adição de sacarose à massa e os que são produzidos a partir de massas não açucaradas (HIGGINS et al., 2001; NAKAGAWA e OUCHI, 1994). Na primeira categoria são empregadas leveduras selecionadas pela capacidade de fermentar eficientemente a sacarose, já que esse açúcar pode compor até 30% do peso seco da massa (BELL et al., 2001; HIGGINS et al., 2001). A receita tradicional do pão, entretanto, se encaixa na segunda

categoria, onde são empregadas leveduras que, no processo fermentativo responsável pelo crescimento da massa, utilizam os principais carboidratos obtidos com a hidrólise do amido: glicose, maltose e maltotriose (HIGGINS et al., 1999a).

Durante o processo de moagem dos grãos de trigo para obtenção da farinha, são liberados o amido, presente no endosperma, e as enzimas α - e β -amilases, presentes no gérmen. Assim, a farinha obtida nesse processo é composta tanto pelo amido quanto pelas amilases presentes no grão de trigo (VITTI, 2001). Com o sovamento da massa, as α -amilases promovem uma hidrólise inicial do amido, produzindo oligossacarídeos contendo 5-10 resíduos de glicose (esses resíduos, em sua maioria, são unidos por ligações α 1-4, porém, em oligossacarídeos provenientes de quebras próximas às ramificações do amido, são também encontradas ligações α 1-6). Em seguida, esses oligossacarídeos sofrem a ação das β -amilases, que, a cada duas unidades de glicose, hidrolisam ligações glicosídicas do tipo α 1-4, liberando moléculas de maltose (com dois resíduos de glicose) e maltotriose (com três). Vale destacar que, em alguns casos, amilases fúngicas são adicionadas a massa para auxiliar o processo de hidrólise do amido (VITTOLO, 2001; VITTI, 2001).

O mesmo processo de hidrólise enzimática do amido também acontece em cervejaria. Nesse caso, porém, a hidrólise ocorre durante o processo de mosturação, quando malte, lúpulo e água são misturados para formar o mosto cervejeiro. Durante esse processo, as enzimas α - e β -amilases – que foram sintetizadas durante a maltagem dos grãos de cevada – agem sobre o amido do malte, liberando, no mosto, moléculas de glicose, maltose e maltotriose (VENTURINI-FILHO e CEREDA, 2001).

Para atingir alta eficiência nesses dois processos, é desejável, portanto, que as leveduras empregadas em ambos sejam aptas a fermentar eficientemente os principais produtos de hidrólise do amido, uma vez que a glicose, a maltose e a maltotriose compõem a quase totalidade dos açúcares presentes tanto em massas de pães quanto em mostos cervejeiros. Nesse último, por exemplo, os três carboidratos em questão respondem por 70-80% do total de açúcares, sendo o restante representado pela frutose (2-5%), pela sacarose (3-6%) e por açúcares não fermentáveis (20-30%). A maltose é o açúcar presente em maior quantidade (45-65% do total) no mosto cervejeiro. O segundo açúcar fermentável mais abundante é a maltotriose e o terceiro, a glicose. Ambos constituem, respectivamente,

15-20% e 10-15% do total de açúcares encontrados em diversos tipos de mosto cervejeiro (GIBSON et al., 2007; WILLAERT, 2001).

Dentre esses açúcares, o mais rapidamente utilizado pelas leveduras é a glicose. A captação da maltose e da maltotriose inicia, normalmente, apenas após metade da concentração inicial de glicose ter sido consumida. Além dessa captação tardia, o metabolismo de maltotriose em espécies do gênero *Saccharomyces* é ainda mais lento que o metabolismo de maltose. Essa dificuldade, apresentada pelas leveduras, de fermentar eficientemente a maltotriose tem sido bastante notável principalmente no setor cervejeiro, onde, muitas vezes, quantidades significativas desse açúcar deixam de ser fermentadas (MENESES e JIRANEK, 2002; STEWART et al., 1979; ZASTROW et al., 2000; ZHENG et al., 1994). A lenta utilização da maltotriose pelas leveduras gera perda econômica para esse setor industrial em virtude do baixo rendimento de etanol e da obtenção de uma cerveja com elevado conteúdo de açúcar fermentável e com sabor atípico. Desse modo, tendo em vista os percentuais significativos do total de açúcares que a maltose e a maltotriose representam, a velocidade de captação e metabolização de ambos α -glicosídeos durante a fermentação do mosto é um dos fatores determinantes de uma fermentação eficiente e de um produto final de qualidade (D'AMORE et al., 1989; ERNANDES et al., 1993).

A utilização de maltose e maltotriose pelas leveduras (vide Figura 1.1) envolve inicialmente seu transporte ativo para o interior da célula, através do simporte com H^+ (HAN et al., 1995; SERRANO, 1977; SMIT et al., 2007; STAMBUK et al., 1998; 1999; 2000). Já no citoplasma, esses dois α -glicosídeos serão hidrolisados por maltases (α -glicosidases), liberando as moléculas de glicose que serão metabolizadas até etanol pela glicólise (HORÁK, 1997; LAGUNAS, 1993; NEEDLEMAN, 1991; NOVAK et al., 2004). A metabolização da maltose tem sido extensivamente estudada, tanto do ponto de vista bioquímico quanto genético. Para que uma cepa de *S. cerevisiae* seja capaz de fermentar a maltose é necessária a presença de pelo menos um dos cinco loci *MAL* existentes nessa levedura. Todos os cinco loci *MAL* são subteloméricos e cada locus se encontra em um cromossomo diferente: o locus *MAL1* se localiza no cromossomo VII; o *MAL2*, no cromossomo III; o *MAL3*, no II; o *MAL4*, no XI; e, o *MAL6*, no VIII. Esses cinco loci *MAL* podem ser constituídos pelos três genes necessários à metabolização da maltose: o gene *MALx1* (onde *x* representa o locus), que codifica o transportador de maltose; o gene *MALx2*, que codifica a maltase; e o gene *MALx3*, que codifica uma proteína reguladora que induz a expressão dos genes *MAL* na presença de

maltose no meio. Uma cepa de *S. cerevisiae* necessita, para a utilização da maltose, de apenas um desses loci completos, ou seja, apenas um locus contendo ao menos uma cópia dos genes *MALx1*, *MALx2* e *MALx3* é suficiente para garantir uma fermentação eficiente da maltose (NEEDLEMAN, 1991; NOVAK et al., 2004). Além desses loci completamente funcionais (contendo os três diferentes genes citados acima), existem ainda pelo menos três tipos de loci *MAL* parcialmente funcionais (*malp*, *malg* e *mal^o*), sendo que todas as cepas incapazes de fermentar maltose geralmente apresentam algum desses loci. O locus *malp* contém apenas o gene regulador *MALx3*, o locus *malg* contém apenas os genes para o transportador de maltose e para a α -glicosidase (*MALx1* e *MALx2*, respectivamente) e o locus *mal^o* apenas o gene para a α -glicosidase (MICHELS et al., 1992; NAUMOV et al., 1994).

FIGURA 1.1: Utilização de maltose e maltotriose por *Saccharomyces cerevisiae*. As setas indicam o sentido do fluxo das moléculas de açúcar no metabolismo. Em *Saccharomyces cerevisiae*, a fermentação é realizada mesmo na presença de oxigênio (BARFORD e HALL, 1979; DE DEKEN, 1966; VAN DIJKEN e SCHEFFERS, 1986). Porém, se os açúcares forem captados em baixa velocidade, essas leveduras os metabolizam através da respiração celular (POSTMA et al., 1989).

Esse tipo de organização em cluster dos genes *MAL* (responsáveis pelo metabolismo de maltose), além de já ter sido caracterizado em espécies do gênero *Saccharomyces* (MICHELS e NEEDLEMAN, 1984; NEEDLEMAN e MICHELS, 1983), foi também observada em leveduras filogeneticamente distantes – como *Torulaspora delbrueckii*, *Hansenula polymorpha*, *Kluyveromyces lactis* e *Debaromyces hansenii* – e, inclusive, no fungo filamentoso *Aspergillus oryzae* (FABRE et al., 2005; HASEGAWA et al., 2010; VIIGAND e ALEMAE, 2007; VIIGAND et al., 2005). Em todos esses loci, a proteína reguladora, ao ser ativada pela maltose, é responsável pela indução da expressão tanto do gene que codifica o transportador desse açúcar quanto do gene que codifica a maltase (α -glicosidase). Em *Saccharomyces cerevisiae*, a proteína reguladora Malx3p, na presença de maltose (vide Figura 1.2-A), se liga ao DNA na região promotora entre os genes *MALx1* e *MALx2* (na chamada sequência UAS_{MAL}), induzindo a transcrição das proteínas transportadoras Malx1p e das α -glicosidases Malx2p (CHANG et al., 1988; GOLDENTHAL et al., 1987; LEVINE et al., 1992; SIRENKO et al., 1995). Vale ressaltar que essa ativação dos genes *MALx1* e *MALx2* pela proteína reguladora Malx3p acontece em trans e, portanto, a presença de qualquer alelo *MALx3* funcional é capaz de induzir a transcrição de transportadores de maltose e α -glicosidases em qualquer locus *MAL* (MICHELS e NEEDLEMAN, 1984; NEEDLEMAN e MICHELS, 1983; NEEDLEMAN et al., 1984).

Assim como a região UAS_{MAL} , a região promotora de cada alelo *MALx3* também possui uma sequência reconhecida pela proteína Malx3p. Essa sequência segue a estrutura CGGN₉CGC, onde N₉ representa uma região rica em AT. Desse modo, na presença de maltose, a proteína reguladora é capaz de elevar o seu próprio nível de expressão gênica ao se ligar a sequência em questão (GANCEDO, 1998; NEEDLEMAN, 1991; SIRENKO et al., 1995).

A presença de glicose, por outro lado, pode reprimir a expressão desses genes através de duas maneiras: (1) inibindo a ativação da proteína reguladora Malx3p pela maltose e (2) ativando o repressor Mig1p – que impede a transcrição dos três genes *MAL* ao se ligar à região promotora de cada um deles (HU et al., 1995, 2000; KIM e MICHELS, 1988; WANG e NEEDLEMAN, 1996). Vale ressaltar, portanto, que o repressor Mig1p reprime a expressão não só dos genes que codificam o transportador de maltose (*MALx1*) e a α -glicosidase (*MALx2*), mas também do gene (*MALx3*) que codifica a proteína reguladora (vide Figura 1.2-A). Esse processo, comandado pelo repressor Mig1p, é conhecido como repressão catabólica (SANTANGELO, 2006).

FIGURA 1.2: Representação esquemática da organização e do controle da expressão dos genes *MAL*. (A) Representação de um locus *MAL* completamente funcional. As setas maiores (coloridas) indicam a posição de cada gene *MAL* dentro do locus. As linhas pontilhadas indicam as proteínas codificadas por cada gene; as linhas contínuas com setas, indução; e as linhas contínuas com pontas rombas, repressão. (B) Representação do locus *mal1g*.

A ativação do repressor Mig1p pela glicose envolve uma cascata de sinalização celular (Figura 1.3) iniciada com o transporte de glicose através da membrana plasmática (mediado pelos transportadores Hxtp) e com a sua subsequente fosforilação no citoplasma pela hexoquinase PII (Hxk2p). É importante salientar que a Hxk2p é necessária tanto no início quanto no final dessa cascata de sinalização. No início da cascata (fase onde essa enzima ainda pode ser substituída pelas isoenzimas Hxk1p ou Glk1p, porém de maneira menos eficiente), a Hxk2p é responsável pela rápida fosforilação da glicose, o que é necessário para iniciar a sinalização celular (DE WINDE et al., 1996; GANCEDO, 1998; JIANG et al., 2000a; ROSE et al., 1991; SANTANGELO, 2006; SANZ et al., 1996). Já no fim, a Hxk2p é indispensável para que a ativação do repressor Mig1p seja garantida (AHUATZI et al., 2007; MORENO et al., 2005; SANZ et al., 1996).

Após o transporte e a fosforilação da glicose, o complexo proteína-fosfatase Reg1p-Glc7p é ativado (GANCEDO, 1998; JIANG et al., 2000a; SANTANGELO et al., 2006). Esse complexo, por sua vez, defosforila tanto a proteína-quinase Snf1p quanto o repressor Mig1p (vide Figura 1.3). Enquanto estiver fosforilada, a proteína-quinase Snf1p se mantém

ativa e fosforila o repressor Mig1p, inativando-o. Porém, graças à atividade fosfatase do complexo Reg1p-Glc7p, a proteína-quinase Snf1p é desativada e o repressor Mig1p, ativado (AHUATZI et al., 2007; DE VIT et al., 1997; GANCEDO, 1998; JIANG e CARLSON, 1996; LUDIN et al., 1998; MCCARTNEY e SCHMIDT, 2001; SANTANGELO, 2006; SCHULLER, 2003). Após a defosforilação do repressor Mig1p, a Hxk2p se associa ao mesmo e estabiliza a sua conformação ativa (AHUATZI et al., 2007; MORENO et al., 2005)

A depleção dos níveis intra e extracelulares de glicose, contudo, restabelece a condição não reprimida dos genes *MAL*. Em baixas concentrações de glicose, o complexo Reg1p-Glc7p perde a sua atividade e a proteína-quinase Snf1p é novamente fosforilada por uma das seguintes enzimas (Figura 1.3): Sak1p, Tos3p ou Elm1p (ELBING et al., 2006; KIM et al., 2005; MCCARTNEY e SCHMIDT, 2001; NATH et al., 2003; SUTHERLAND et al., 2003). Com isso, ela desativa o repressor Mig1p, que é exportado do núcleo para o citoplasma (DE VIT e JOHNSTON, 1999; DE VIT et al., 1997; SCHULLER, 2003), permitindo que os genes *MAL* recuperem seus níveis de expressão basal. Os transportadores de maltose, assim sintetizados, promovem então a entrada de maltose nas células, que ativa a proteína reguladora Malx3p, promovendo a indução gênica (CHARRON et al., 1986; HU et al., 2000; WANG e NEEDLEMAN, 1996; WANG e MICHELS, 2004; WANG et al., 2002).

A indução pela maltose e a repressão pela glicose não são, no entanto, os únicos processos de regulação que controlam a fermentação da maltose. Já foi caracterizada, por exemplo, a existência de alelos para alguns dos genes *MAL* que determinam a expressão independente da indução pela maltose – fenótipo esse encontrado nas chamadas cepas *MAL* constitutivas (*MAL*^C). Esses alelos são mutações dos loci *MAL*, principalmente nos genes que codificam a proteína reguladora (CHARRON e MICHELS, 1987; GIBSON et al., 1997; WANG e NEEDLEMAN, 1996). O mecanismo proposto para indução da expressão dos genes *MAL* sugere que a maltose, ao se ligar à proteína reguladora Malx3p, acarreta a mudança conformacional da mesma, tornando-a ativa. Com a sua ativação, a proteína reguladora, portanto, é capaz de se ligar a região UAS_{MAL}, promovendo a transcrição dos genes que codificam o transportador e a α -glicosidase. Já no caso dos alelos constitutivos dos genes *MALx3*, as mutações neles encontradas promovem, por si só, uma conformação distinta capaz de permitir a expressão das proteínas Malx1p e Malx2p independentemente da presença de maltose (GIBSON et al., 1997; WANG e NEEDLEMAN, 1996). Na natureza, essas mutações podem ocorrer de forma espontânea – como no caso das cepas com genótipo

MAL4, todas constitutivas por possuírem alterações no gene regulador (*MAL43^G*) – ou também podem ser obtidas por mutagênese em laboratório, o que já foi feito para praticamente todos os outros loci *MAL* (CHARRON e MICHELS, 1987; HIGGINS et al. 1999b; VANONI et al., 1989). Geralmente as cepas industriais são *MAL* constitutivas, sendo essa característica altamente desejável em cepas de panificação e cervejaria (HIGGINS et al., 1999a; KODAMA et al., 1995; MENESES e JIRANEK, 2002; ODA e OUCHI, 1990). Cepas *MAL* constitutivas podem ainda apresentar tanto sensibilidade como insensibilidade à repressão pela glicose (CHARRON e MICHELS, 1987; GIBSON et al., 1997; HIGGINS et al. 1999b).

FIGURA 1.3: Repressão e inativação catabólica em *Saccharomyces cerevisiae*. Na presença de glicose, a expressão dos genes *MAL* é reprimida (repressão catabólica) e as permeases Malx1p, inativadas (inativação catabólica) – vide texto. As setas vermelhas representam as ações que ocorrem na presença de glicose e as azuis representam as ações que ocorrem na ausência dessa hexose. As setas contínuas indicam direcionamento de moléculas ou ativação dos sinalizadores e as tracejadas, as movimentações dos sinalizadores entre o núcleo e o citoplasma. As linhas contínuas com pontas rombas indicam desativação das moléculas sinalizadoras.

O controle da expressão dos genes *MAL* também pode ser mediado pelo complexo COMPASS (*Complex Proteins Associate with Set1*). Esse complexo, formado por oito proteínas (Set1p, Swd1p, Swd2p, Swd3p, Bre2p, Sdc1p, Spp1p e Shg1p), promove o silenciamento de genes contidos em regiões teloméricas e subteloméricas através da trimetilação do resíduo Lys-4 da Histona H3 (KROGAN et al., 2002; MUELLER et al., 2006; RUSCHE et al., 2003). Segundo Houghton-Larsen e Brandt (2006), o COMPASS atua sobre os loci *MAL* nos estágios finais da fermentação de mostos cervejeiros, promovendo o silenciamento dos genes envolvidos na metabolização da maltose. Segundo esse mesmo trabalho, o silenciamento promovido pelo COMPASS é bastante significativo, principalmente, em mostos que fazem uso de adjuntos açucarados (conhecidos como *high-gravity* e/ou *very high-gravity worts*). Nesse caso, a quantidade de açúcar residual no final do processo fermentativo é ainda maior do que a encontrada em mostos não suplementados (CASEY et al., 1984; D'AMORE et al., 1989; HOUGHTON-LARSEN e BRANDT, 2006).

Em adição ao seu papel na regulação da transcrição dos genes *MAL*, a glicose exerce também um forte controle na fermentação de outras fontes de carbono ao promover a inativação dos seus respectivos sistemas de transporte. Essa inativação (denominada inativação catabólica) envolve a fosforilação e a ubiquitinação dos transportadores, que são a seguir endocitados e degradados no vacúolo (GADURA e MICHELS, 2006; GADURA et al., 2006; HATANAKA et al., 2009; JIANG et al., 2000a; 2000b; MEDINTZ et al., 1996; RIBALLO et al., 1995; STAMBUK, 2002). No caso dos transportadores Malx1p, a fosfatase Reg1p-Glc7p, na presença de glicose, ativa, inicialmente, as quinases Yck1p e Yck2p (vide Figura 1.3) que, por sua vez, fosforilam essas permeases, promovendo abrupta perda de suas atividades (GADURA et al., 2006; JIANG et al., 2000b). Depois de fosforiladas, essas permeases sofrem ubiquitinação antes de serem encaminhadas para degradação no vacúolo (MEDINTZ et al., 1998). Por fim, o sensor de altas concentrações de glicose Rgt2p (vide Figura 1.3) ativa a proteína Grr1p estimulando a proteólise vacuolar dos transportadores em questão (JIANG et al., 1997; MEDINTZ et al., 2000).

Na tentativa de elucidar os domínios presentes nas permeases Malx1p que estariam envolvidos no processo de inativação pela presença de glicose, Medintz et al. (2000) analisaram a influência dos domínios amino-terminal (N-terminal) e carboxi-terminal (C-terminal) do transportador Mal61p na inibição da atividade de transporte e na proteólise

vacuolar do mesmo. Apesar de as mutações na região C-terminal não terem bloqueado a inativação catabólica, foi verificado que os resíduos 49-78, localizados no domínio N-terminal, estão relacionados com a rápida perda da atividade de transporte bem como com a sua proteólise. Esses dados corroboram resultados publicados anteriormente, que demonstram existir uma sequência PEST entre os resíduos 48-79 na região amino-terminal dessa mesma permease (CHENG e MICHELS, 1989). Sequências PEST são regiões de um polipeptídeo ricas em Prolina (P), Glutamato (E), Serina (S) e Treonina (T). Essas regiões são conhecidas por serem amplamente fosforiladas e, portanto, por permitirem a ubiquitinação das proteínas e a sua subsequente degradação (RECHSTEINER e ROGERS, 1996).

Outro tipo de sequência envolvida no processo de inativação catabólica promovido pela glicose é o chamado motivo de dileucina (BONIFACINO e TRAUB, 2003). No domínio N-terminal do transportador Mal61p, além da sequência PEST, também foi observada a presença desse motivo (MEDINTZ et al., 2000). Gadura e Michels (2006) demonstraram que o motivo de dileucina encontrado nessa permease, apesar de não estar relacionado com a internalização do transportador, está diretamente ligado ao direcionamento da proteína, após ter sido internalizada, do endossomo tardio para a sua degradação no vacúolo.

Recentemente, Hatanaka et al. (2009), verificaram que a permease codificada pelo alelo *MAL21* possui maior resistência à inativação catabólica que os demais transportadores Malx1p caracterizados. Após observarem diferenças na sequência de aminoácidos desses transportadores, os autores demonstraram, através de mutagênese sítio-dirigida, que os resíduos Gly-46 e His-50, presentes apenas no transportador Mal21p, são os responsáveis pela sua menor suscetibilidade à ubiquitinação em comparação aos transportadores codificados pelos demais alelos *MALx1*.

Apesar de inúmeros trabalhos já terem detalhado os mecanismos moleculares envolvidos no metabolismo de maltose em *Saccharomyces cerevisiae*, poucos estudos objetivaram analisar, como enfoque principal, a fermentação de maltotriose por essa levedura e as permeases envolvidas no transporte desse açúcar através da membrana plasmática das células. Em 1960, no entanto, Harris e Thompson, através de testes utilizando parâmetros fisiológicos para avaliar a captação de maltose e maltotriose pelas células de leveduras, já indicavam a possibilidade de haver um transportador específico para a maltotriose. De fato, mais tarde ficou demonstrado que esse açúcar possui um sistema de transporte distinto do já caracterizado transporte de maltose mediado pelas permeases

Malx1p (RUSSEL e STEWART, 1979; STEWART et al., 1979), embora compartilhe, com a maltose, as mesmas α -glicosidases Malx2p (TABATA et al., 1984; ZASTROW et al. 2001) – vide Figura 1.1.

Ao analisarem alelos naturais dos transportadores de maltose codificados pelos genes *MALx1*, Han et al. (1995) caracterizaram um gene presente em um locus *MAL* parcialmente funcional (no caso, *mal1g*) que passou a ser chamado *AGT1*, o qual codifica uma permease responsável pelo transporte ativo (através de simporte com H^+) de uma série de α -glicosídeos, incluindo a maltose e a maltotriose (HAN et al., 1995; STAMBUK et al., 1998; 1999; 2000). De acordo com Stambuk et al. (2000) e Stambuk e de Araújo (2001), a permease codificada pelo gene *AGT1* é um transportador com alta afinidade ($K_m \sim 7$ mM) para sacarose e trealose, mas transporta maltose e maltotriose com baixa afinidade ($K_m \sim 20$ mM) quando comparada aos transportadores Malx1p, que possuem alta afinidade (K_m de 2-5 mM) pela maltose (BUSTURIA e LAGUNAS, 1985; CHENG e MICHELS, 1991; STAMBUK e DE ARAÚJO, 2001; STAMBUK et al., 2000; VAN DER REST et al., 1995; VAN LEEWEN et al., 1992; WEUSTHUIS et al., 1993). Embora seja um transportador com especificidade distinta quando comparado aos transportadores de maltose codificados pelos genes *MALx1* (específicos para maltose e turanose), a permease Agt1p é aparentemente regulada pelos mesmos mecanismos de regulação gênica dos demais genes *MAL*, uma vez que possui uma sequência UAS_{MAL} na sua região promotora (HAN et al., 1995) – vide Figura 1.2-B.

Há alguns anos, nosso grupo de pesquisa (ZASTROW et al., 2000) demonstrou que algumas cepas industriais são capazes de crescer utilizando maltotriose como fonte de carbono apesar de não fermentarem o açúcar. Em um estudo posterior (ZASTROW et al., 2001), o isolamento e a caracterização de cepas capazes de fermentar a maltotriose permitiram identificar o transporte desse açúcar através da membrana plasmática das células como sendo o passo limitante na sua fermentação. Esses resultados são condizentes com estudos prévios que demonstram que quando açúcares são captados com baixas velocidades pelas leveduras, o seu metabolismo é essencialmente respiratório (POSTMA et al., 1989). No caso da maltose, o influxo aumentado desse açúcar para o interior da célula, com o seu conseqüente acúmulo, atuaria como um sinal na indução dos genes *MAL* permitindo o crescimento fermentativo. De fato, foi verificado que tanto a atividade de transporte como os níveis de concentração intracelular da maltose estão correlacionados

aos níveis de indução da expressão dos genes *MAL*, ou seja, quanto maior a concentração externa de maltose, maior a atividade de transporte e de acúmulo desse açúcar intracelularmente, resultando em um elevado nível de indução gênica (WANG et al., 2002). Em relação à maltotriose, não está claro se é este o açúcar indutor, ou se é um produto do processo de hidrólise pela α -glicosidase (no caso, a maltose).

Condizente com a importância que o transporte de maltotriose tem em alguns segmentos industriais, constatou-se que praticamente todas as linhagens de cervejaria contêm o gene *AGT1* (JESPERSEN et al., 1999). Além disso, análises de transcriptoma de leveduras do tipo *ale* têm indicado altos níveis de expressão dessa permease durante a fermentação do mosto cervejeiro (JAMES et al., 2003; MENESES e JIRANEK, 2002; RAUTIO e LONDESBOROUGH, 2003; VIDGREN et al., 2005). A importância da permease Agt1p para a utilização de maltotriose também foi verificada em dois trabalhos recentes, publicados por Smit et al. (2007; 2008). No primeiro deles, os autores avaliaram diferentes alelos do gene *AGT1* e demonstraram que diferenças na sequência de aminoácidos estão diretamente correlacionadas a capacidades distintas de transporte de maltotriose e de crescimento nessa fonte de carbono (SMIT et al., 2007). No segundo, atribuiu-se a mutação de dois resíduos, I505T e T557S, a maior $V_{\max}$ observada dentre os alelos analisados e a maior eficiência de utilização do α -glicosídeo em questão (SMIT et al., 2008).

Dentro do complexo *Saccharomyces sensu stricto*, a permease Agt1p, entretanto, não pode ser considerada a única responsável pelo transporte de maltotriose através da membrana plasmática das células. Na espécie *Saccharomyces pastorianus* – um híbrido natural de *S. cerevisiae* e *S. bayanus* utilizado na produção de cervejas do tipo *lager* – foi caracterizada uma permease com maior afinidade por maltotriose ($K_m \sim 20$ mM) que por maltose ($K_m \sim 70$ mM) (SALEMA-OOM et al., 2005). Essa permease, codificada pelo gene denominado *MTT1*, é essencial para o transporte de maltotriose em cepas de *S. pastorianus*, uma vez que a expressão da permease Agt1p é praticamente nula nessas leveduras. Contrariamente ao observado em linhagens de cervejaria do tipo *ale* (as quais são representantes da espécie *Saccharomyces cerevisiae*), as cepas *lager* (pertencentes à espécie *S. pastorianus*) expressam mais fortemente os alelos *MALx1* em detrimento da expressão do *AGT1* (RAUTIO e LONDESBOROUGH, 2003; VIDGREN et al., 2005). A permease Mtt1p apresenta 91% de similaridade aos transportadores Malx1p e 62% de similaridade ao Agt1p (DIETVORST et al., 2005). Segundo Salema-Oom et al. (2005), a montante e a jusante do

gene *MTT1*, também são encontrados genes que codificam, respectivamente, uma α -glicosidase e uma proteína reguladora Malx3p.

A relevância do *AGT1* para a fermentação de maltotriose também já foi contestada até mesmo na espécie *S. cerevisiae*. Apesar de uma série de trabalhos existentes na literatura terem sugerido que as permeases Malx1p são incapazes de permitir a captação da maltotriose (CHANG et al., 1989; HAN et al., 1995; SALEMA-OOM et al., 2005; SMIT et al., 2007; STAMBUK e DE ARAÚJO, 2001; STEWART et al., 1979), Day et al. (2002b) demonstraram ser, esses transportadores, aptos a transportar a maltotriose com praticamente a mesma afinidade apresentada para a maltose. Em outro trabalho, Day et al. (2002a) apontam ainda que as permeases codificadas pelos genes *MPH2* e *MPH3* (homólogas aos transportadores Malx1p) são também capazes de transportar o α -glicosídeo em questão (Figura 1.1). Os trabalhos desses autores, no entanto, além de contraditórios em relação a outros estudos, não avaliam a capacidade fermentativa das leveduras, uma vez que a utilização da maltotriose pelas células é analisada apenas através dos crescimentos celulares e das atividades de transporte.

No intuito de promover uma melhor compreensão do metabolismo de maltotriose em *S. cerevisiae*, verificamos, em cepas industriais e de laboratório, a presença dos genes que codificam transportadores conhecidos de α -glicosídeo, identificamos os seus alelos através de localização cromossômica e avaliamos a expressão dos mesmos em diferentes condições de cultivo. A essas análises, somam-se as determinações dos perfis de crescimento celular e de transporte, consumo, hidrólise e fermentação de açúcares das cepas estudadas. Analisados em conjunto, os dados obtidos permitiram correlacionar os genótipos com os fenótipos observados e demonstrar a importância da expressão da permease codificada pelo gene *AGT1* para a eficiente utilização da maltotriose pelas células de *S. cerevisiae*. Tendo sido cumprido o nosso objetivo, o conhecimento gerado pode, portanto, contribuir com a otimização de processos fermentativos, principalmente em cervejarias.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Com este doutoramento, objetivamos melhorar a compreensão do metabolismo de maltotriose em *Saccharomyces cerevisiae* e, dessa forma, contribuir com a otimização de processos fermentativos que dependam da eficiente fermentação de hidrolisados de amido por essa levedura.

2.2 Objetivos específicos

Com o presente trabalho, visamos especificamente:

- verificar, em linhagens industriais e de laboratório, a presença de genes que codificam transportadores conhecidos de α -glicosídeo em *S. cerevisiae* e analisar, nessas linhagens, a expressão dos mesmos em diferentes condições de cultivo;
- avaliar a importância do gene *AGT1* para o transporte e para a utilização da maltotriose em *S. cerevisiae*;
- avaliar a contribuição da expressão constitutiva dos genes *MAL* e da sobre-expressão do gene *AGT1* para a fermentação de maltotriose nessa levedura;
- elucidar os mecanismos regulatórios envolvidos na expressão dos genes *MAL* diante da maltotriose;
- analisar fenotipicamente linhagens industriais e de laboratório e correlacionar seus fenótipos com a presença dos transportadores de α -glicosídeos em suas células;
- comparar o poder de indução dos genes *MAL* pela maltose e pela maltotriose;
- analisar o grau de sensibilidade de diferentes linhagens à repressão catabólica.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Meios de cultura e condições de crescimento

Para o cultivo de leveduras, foram utilizados dois tipos de meio: meios ricos (YP) contendo 10 g/L de extrato de levedura e 20 g/L de bacto-peptona (ambos da Sigma) e meios sintéticos contendo 6,7 g/L de base nitrogenada sem aminoácidos (Sigma) e 1,92 g/L de uma mistura de aminoácidos necessários ao crescimento das células, sem uracila (Ura drop-out supplement, Sigma). Quando necessário, foram adicionados aos meios 200 mg/L de Geneticina (para a composição de meios seletivos), 3 mg/L de Antimicina A (um inibidor da cadeia respiratória, utilizado para permitir apenas o crescimento fermentativo das células) e/ou 20 g/L de bacto-ágar (para a confecção dos meios sólidos). Todos os meios tiveram seu pH ajustado para 5,0 com ácido clorídrico.

A suplementação dos meios com fonte de carbono foi realizada pela adição de 20 g/L de glicose, maltose ou maltotriose (em meio rico e sintético), 20 g/L de glicerol (somente em meio rico) ou 50 g/L de extrato de malte (somente em meio sintético). Todos esses suplementos de fonte de carbono são provenientes da Sigma.

Para a verificação das curvas de crescimento celular, consumo de açúcares e produção de etanol, as células foram previamente crescidas (durante 48 h) em meios contendo 20 g/L de maltose e, em seguida, inoculadas em frascos Erlenmeyer contendo 1/5 do volume de meio líquido. Todas as culturas foram incubadas em um agitador a 28° C e 160 rpm. O crescimento celular foi analisado pela densidade óptica (DO_{570}), obtida pela retirada de amostras da cultura em tempos pré-determinados. Parte dessas amostras foram aliqüotadas em microtubos e, subseqüentemente, utilizadas para a determinação do consumo de açúcares e da produção de etanol (vide seção 3.6). A perda de volume do meio de cultura, em virtude da retirada das amostras, nunca ultrapassou 10% do volume inicial do cultivo.

Alternativamente, após o pré-cultivo de 48h em maltose, as células foram inoculadas em placas de 96 poços com 100 μ L de meio rico por poço e incubadas, em um Tecan GENios microplate reader, a 29° C e 161 rpm. No Tecan, a densidade óptica (DO_{570}) foi medida a cada 15 min. Nesse caso, as medidas de crescimento apresentadas correspondem à

subtração das absorbâncias obtidas no meio com fonte de carbono pelas absorbâncias obtidas no meio sem fonte de carbono.

Para o ensaio de fermentação em batelada, as leveduras foram, inicialmente, pré-cultivadas em meio sintético (contendo 2% de maltose) até o início de sua fase exponencial de crescimento ($DO_{570} \sim 3,5$). Em seguida, as células foram lavadas e ressuspensas em água a 4° C de modo a atingirem a concentração de 20 mg de células/mL. Para o início do ensaio, as suspensões celulares foram misturadas, na proporção 1:1 (vol/vol), a soluções 2x concentradas de meio sintético suplementado com 50 g/L de extrato de malte. Cada fermentação foi realizada durante 8 h, com retirada de amostras – utilizadas para determinação da concentração celular ($DO_{570} \times 0,27$) e da produção de etanol – em intervalos de 2 h. Também nesse caso, a perda de volume do meio de cultura, em virtude da retirada das amostras, não ultrapassou 10% do volume inicial do cultivo.

O cultivo de *Escherichia coli* foi realizado a 37° C em meio Luria-Bertani, pH 7,5. Quando necessário, 100 mg/L de ampicilina e/ou 20 g/L de bacto-água foram adicionados a esse meio (AUSUBEL et al., 1992).

3.2 Cepas, plasmídeos e primers utilizados

As cepas, os primers e os plasmídeos utilizados se encontram, respectivamente, nas tabelas 3.1, 3.2 e 3.3. Para a construção do plasmídeo pSA3.14, o gene *AGT1* foi amplificado, juntamente com o seu promotor e terminador naturais, a partir do DNA genômico da cepa CEN.PK21C com os primers AGT1-FD1c e AGT1-FD2 e clonado na sítio *Bam*HI do plasmídeo YCplac33 (GIETZ e SUGINO, 1988). O plasmídeo pSA3.14 foi então linearizado com as enzimas *Aat*II e *Nde*I e ligado ao módulo KanMX (amplificado a partir do plasmídeo pFA6a-KanMX com os primers KanMX-F e KanMX-R) dando origem ao plasmídeo pSA3.14-KanMX. As clonagens foram realizadas em *Escherichia coli* Top10 (invitrogen) de acordo com Ausubel et al. (1992). A transformação das leveduras foi realizada segundo Gietz e Woods (2002).

TABELA 3.1: Cepas de leveduras utilizadas.

Cepa	Genótipo ou descrição	Fonte ou Referência
<u>S. cerevisiae</u>		
340-2B	<i>MATα mal13 AGT1 MAL12 trp1-1 ura3-52 lys2</i>	CHARRON et al. (1986)
LCM002	isogênica à 340-2B, mas <i>agt1Δ::kan^r</i>	Este trabalho
340-GFP	isogênica à 340-2B, mas <i>AGT1-GFP</i>	Este trabalho
1403-7A	<i>MATα mal13 AGT1 MAL12 mal33 MAL31 MAL32 MAL4^c gal3 gal4 trp1 ura3 suc⁻</i>	MICHELS e NEEDLEMAN (1984)
LCM001	isogênica à 1403-7A, mas <i>agt1Δ::kan^r</i>	Este trabalho
CEN.PK2-1C	<i>MATα mal13 AGT1 MAL12 MAL2-8^c SUC2 ura3-52 his3Δ1 leu2-3,112 trp1-289</i>	ENTIAN e KOTTER (1998)
LCM003	isogênica à CEN.PK2-1C, mas <i>agt1Δ::kan^r</i>	Este trabalho
MC966A	<i>MATα mal13 AGT1 MAL12 MAL2 ura3-52 his3-11,15 leu2-3,112 GAL SUC2</i>	YE et al. (1999)
BSY09	isogênica à MC966A, mas <i>agt1Δ::kan^r</i>	BATISTA et al. (2004)
SAY09-05	Isogênica à BSY09, mas <i>YJL216C::CaURA3</i>	Este trabalho
KY73	Isogênica à MC966A, mas <i>hxt1Δ::HIS3::Δhxt4 hxt2Δ::HIS3 hxt3Δ::LEU2::Δhxt6 hxt5Δ::LEU2 hxt7Δ::HIS3 gal2Δ::DR</i>	YE et al. (1999)
BSY08	Isogênica à KY73, mas <i>agt1Δ::kan^r</i>	BATISTA et al. (2004)
BSY021-34B	<i>MATα mal13 AGT1 MAL12 MAL2 TRP1-pADH1::iSUC2 ura3-52 trp1-289</i>	LBMBL-UFSC ^a
S288C	<i>MATα mal13 AGT1 MAL12 mal33 MAL31 MAL32 mel gal2 SUC2</i>	MORTIMER e JOHNSTON (1986)
ISP15	<i>MATα STA2 his3 thr1 trp1 leu2 ura3</i>	GAGIANO et al. (1999)
B01	Levedura de cervejaria do tipo <i>ale</i> – AmBev, Brasil	ZASTROW et al. (2001)
G13; G14; G15	Leveduras de Panificação	M. Ettayebi ^b
CAT-1	Utilizada na produção de etanol combustível – Isolada na Usina VO Catanduva, São Paulo/SP, em 1998/1999	BASSO et al. (2008)
PE-2	Utilizada na produção de etanol combustível – Isolada na Usina da Pedra, São Paulo/SP, em 1993/1994	BASSO et al. (2008)
VR-1	Utilizada na produção de etanol combustível – Isolada na Usina Vale do Rosário, São Paulo/SP, em 1993/1994	BASSO et al. (2008)
<u>S. pastorianus</u>		
LBCC-L52	Levedura de cervejaria do tipo <i>lager</i> – Labatt, Canadá	BATISTOTE et al. (2006)
W-34/70	Levedura de cervejaria do tipo <i>lager</i> – Weihenstephan, Alemanha	NAKAO et al. (2009)

^a Laboratório de Biologia Molecular e Biotecnologia de Leveduras – Universidade Federal de Santa Catarina.^b Universidade Sidi Mohamed Bem Abdallah, Fez, Marrocos.

TABELA 3.2: Primers utilizados (continua).

Primer	Sequência (5' → 3')
AGT1- PFA6-F1 ^a	<u>TACATAGAAGAACATCAAACAACATAAAAAATAGTATAAT</u> CCAGCTGAAGCTTCGTACGC
AGT1-PFA6-R1 ^a	<u>TTCCTTATTTCTTCCAAAAAACAACCCCTTTTAC</u> GCATAGGCCACTAGTGGATC
V-AGT1-F	GAATTTTCGGGTTGGTG
AGT1-F	AGGAGCTCATGAAAAATATCATTTTATTGG
AGT1-R	TTGGATCCACATTTATCAGCTGC
V-Kan ^r -R	GGAATCGAATGCAACCGG
MALx1-F	CCATACTTGTTGTGAGTGG
MALx1-R	TCATTTGTTCAACAGATG
YJL216C-pFA6-F1 ^a	<u>TTTTTCATAAATGGGCCACGTATCCATGAGTATCATAAAGAA</u> CCAGCTGAAGCTTCGTACGC
YJL216C-pFA6-R1 ^a	<u>ATCTTTAACTCAGCTTCTGCGTTGATTCCGTCTCTAAATGAT</u> GCATAGGCCACTAGTGGATC
V-YJL216C-F	TGCTAGTTTCAAGGACTCCA
V-YJL216C-R	CGTTTAATGGCGGCATATGT
V-CaUR3-R	CGTTGTGCTACTGGTGAGGC
AGT1-pFA6-F2 ^a	<u>CAGTCCTCAAGCATAAAACAGCGAGAATTAAATGCAGCTGATAAATGT</u> CGGATCCCCGGGTAAATTAA
AGT1-R504A-F	AAGACTATAGTGCTGGCCGCGATTGCTACA
AGT1-SA1b	GTTGAGGAGAGTCATAAAACGG
AGT1-SA2b	CACCAACCCGAAAATTCTTC
AGT1-SA2c	GTAGAATCTATGGCTATGGGG
AGT1-SA2d	AGTTCCTTCCTCAATTCTTC
AGT1-SA3b	GAAGAATTGAGGAAGGAAC
AGT1-SA3c	CCCCATAGCCATAGATTCTAC
AGT1-SA4	TCACATTCTCGTTATCTTCGTC
AGT1-SA5	GAAGAATTTTCGGGTTGGTG
AGT1-SA6	GGGCAAACTTCCGAAGCATAAG
AGT1-SA7	CGGGGAGGGTTCTTACGAAA
AGT1-SA8	AGTAAACGCCTTGTCGGTGG
AGT1-SA9	GAGTGGTAAAGGCGCCGAGA
AGT1-SA10	TTCACTGAAGTTCTACCAG
AGT1-SA11	ATTCCATCAGCGGAGTTGAG

TABELA 3.2: Primers utilizados (conclusão).

AGT1-SA12	CTATAAGCTCTCACATTAATGC
AGT1-FD1c	NNNCCCGGGGATCCAAATCATGTTACCTACGTTAGG
AGT1-FD2	NNNGGATCCATATCCAGGCACAAGTACCAGGTGC
AGT1prom-F	AGTACGCATCAACGGAGTGT
AGT1prom-R	CTCTTATCATGGCGAAGTCA
KanMX-F	NNNNNGACGTCCGCGCCAGATCTGTTTAGCT
KanMX-R	NNNNNCATATGGTTTAAACTGGATGGCGGCG
STA-F	GGGATTCAAGGCATCATCACAA
STA-R	GTTGTGACAGTCTTTGGAGAGC
STA1-2-R	GGTGTTATGACAGAAGTC
STA3-R	GTGTTATGACCAGAAGTT
AGT1-1347F^b	TGGTGGAATGGGTTTTGGTT
AGT1-1397R^b	CCACCGGCACCATTACTAGC
MALx1-1352F^b	CTCATGGCGCTAAAATGGGT
MALx1-1403R^b	AAGAACGCGACAACCATTAGAAG
MPH2-1615F^b	ATCTGGGCTGTGGTTGACCTA
MPH2-1665R^b	TTCCACGAAAGTCTTCCGG

^a As seqüências sublinhadas são homólogas, respectivamente, às porções imediatamente a montante e a jusante do gene *AGT1* e à região correspondente a extremidade C-terminal da permease Agt1p. As seqüências em itálico são homólogas à série de plasmídeos pFA6a (PETRACEK e LONGTINE, 2002).

^b O número que faz parte do nome do primer indica o nucleotídeo onde se hibridiza a extremidade 5' do mesmo na ORF do gene correspondente.

TABELA 3.3: Plasmídeos utilizados.

Plasmídeo	Genótipo	Fonte ou referência
pJW4	pBluescript KS <i>ARSH4 CEN6 URA3 MAL63</i>	WANG e NEEDLEMAN (1996)
pJW5	pBluescript KS <i>ARSH4 CEN6 URA3 MAL63^C</i>	WANG e NEEDLEMAN (1996)
pFA6a-KanMX6	<i>Amp^r ori P_{TEF}-kan^r-T_{TEF}</i>	PETRACEK e LONGTINE (2002)
pFA6a-GFP(S65T)-KanMX6	<i>Amp^r ori GFP(S65T)-T_{ADH1}-P_{TEF}-kan^r-T_{TEF}</i>	PETRACEK e LONGTINE (2002)
pAG60	<i>Amp^r ori P_{TEF}-CaURA3-T_{TEF}</i>	PETRACEK e LONGTINE (2002)
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>CEN4 amp^r URA3 lacZ</i>	GIETZ e SUGINO (1988)
pSA3.14	<i>CEN4 amp^r URA3 lacZ AGT1</i>	Este trabalho
pSA3.14-KanMX	<i>CEN4 amp^r URA3 lacZ AGT1 P_{TEF}-kan^r-T_{TEF}</i>	Este trabalho

3.3 Deleção dos genes *AGT1* e *YJL216C*

O gene *AGT1* foi deletado do genoma das cepas 340-2B, 1403-7A e CEN.PK2-1C por recombinação homóloga e metodologias baseadas em PCR como descrito por Batista et al. (2004) e Petracek e Longtine (2002). Através de PCR, os primers AGT1-PFA6-F1 e AGT1-PFA6-R1 (Tabela 3.2) juntamente com o plasmídeo pFA6a-kanMX6 (Tabela 3.3) produziram um fragmento linear de DNA com ~1,6 kb portando em suas extremidades regiões homólogas à região a montante (correspondente aos nucleotídeos -40 a -1 a partir do códon de iniciação) e a jusante (correspondente aos 40 nucleotídeos após o códon de terminação) do gene *AGT1* e, entre essas extremidades, o gene *kan^r*, que confere resistência à Geneticina (vide Figura 3.1). Esse fragmento, quando inserido nas células de *S. cerevisiae*, tendeu a se integrar em seu genoma substituindo o gene de interesse pelo marcador específico em questão (*kan^r*). Para isolar os mutantes deletados, as cepas foram selecionadas em meios contendo Geneticina. Em seguida, as cepas parentais (não deletadas) e os transformantes obtidos foram analisados através de PCR com os primers V-AGT1-F, AGT1-R e V-kan^r-R (vide Tabela 3.2), que permitiram a amplificação de uma banda de ~900 pb apenas nas cepas contendo a deleção esperada e uma banda de ~1900 pb apenas nas cepas que ainda continham o *AGT1* (Figura 3.1).

FIGURA 3.1: Deleção do gene *AGT1*. Primers contendo regiões homólogas à região a montante (em marrom) e a jusante (em amarelo) do gene *AGT1* juntamente com o plasmídeo pFA6a-kanMX6 produziram um fragmento linear de DNA que, por recombinação homóloga, substituiu o gene *AGT1* pelo gene *kan^r*, que confere resistência a Geneticina. Depois da deleção, os primers V-AGT1-F, AGT1-R e V-kan^r-R foram utilizados para a verificação da presença ou não do *AGT1* nas células.

Para a deleção do gene YJL216C do genoma da cepa BSY09, foi empregada a mesma metodologia utilizada para a deleção do gene *AGT1* (BATISTA et al., 2004; PETRACEK e LONGTINE, 2002). Através de PCR, os primers YJL216C-PFA6-F1 e YJL216C-PFA6-R1 (Tabela 3.2) juntamente com o plasmídeo pAG60 (Tabela 3.3) produziram um fragmento linear de DNA com ~1,6 kb portando extremidades homólogas às regiões compreendidas entre os nucleotídeos 715 e 757 e entre os nucleotídeos 1401 e 1443 da ORF YJL216C. Entre essas extremidades, o fragmento em questão continha o gene *CaURA3*, que permite o crescimento celular em meios sem uracila. Quando inserido nas células de *S. cerevisiae*, esse fragmento tendeu a se integrar no genoma das mesmas, substituindo 643 pb do gene alvo pelo marcador específico em questão (*CaURA3*). Para isolar os mutantes deletados, as cepas foram selecionadas em meios sintéticos sem uracila (vide seção 3.1). Em seguida, a cepa parental (não deletada) e os transformantes foram analisados através de PCR com o par de

primers V-YJL216C-F e V-CaURA3-R (Tabela 3.2) que permitiram a amplificação de um fragmento de 1210 pb apenas nas cepas contendo a deleção esperada. Concomitantemente, as amostras de DNA genômico tanto da cepa parental quanto dos transformantes foram também analisadas com o par de primers V-YJL216C-F e V-YJL216C-R, permitindo a amplificação de um produto de 1188 pb a partir da ORF YJL216C.

3.4 Fusão da proteína verde fluorescente à extremidade C-terminal da permease Agt1p

Seguindo a mesma metodologia utilizada para a deleção dos genes *AGT1* e YJL216C, a proteína verde fluorescente (GFP) foi fusionada à porção C-terminal da permease Agt1p através da substituição do códon de terminação do *AGT1* pelo módulo GFP-kanMX produzido através de PCR como descrito por Petracek e Longtine (2002). Através de PCR, os primers AGT1-PFA6-F2 e AGT1-PFA6-R1 (Tabela 3.2) juntamente com o plasmídeo pFA6a-GFP(S65T)-kanMX6 (Tabela 3.3) produziram um fragmento linear de DNA com ~2,4 kb (módulo GFP-kanMX) portando em suas extremidades regiões homólogas à região compreendida entre os nucleotídeos 1801 e 1848 da ORF do *AGT1* (que corresponde à extremidade C-terminal da permease codificada) e aos 40 nucleotídeos imediatamente a jusante ao códon de terminação desse gene (vide Figura 3.2). Localizados entre essas extremidades, se encontram o gene *GFP* (que codifica a proteína verde fluorescente) e o gene *kan^r* (que confere resistência à Gentamicina). Para isolar os transformantes, as células foram selecionadas em meio contendo Gentamicina. Em seguida, a cepa parental (sem a fusão) e os transformantes foram analisados através de PCR com os primers AGT1-R504A-F e V-kan^r-R (Tabela 2.2) que permitiram a amplificação de um fragmento de ~2100 pb apenas nas cepas contendo a construção desejada. Concomitantemente, o DNA genômico dessas cepas foi também analisado com os primers AGT1-F e AGT1-R, servindo de controle positivo ao permitir a amplificação da ORF do *AGT1* tanto nas cepas parentais quanto nas mutantes (Figura 3.2).

FIGURA 3.2: Fusão de *GFP* à extremidade C-terminal do *AGT1*. (A) Primers contendo homologia à região C-terminal (em azul claro) e *downstream* (em amarelo) do gene *AGT1* juntamente com o plasmídeo pFA6a-GFP(S65T)-kanMX6 produziram, através de PCR, um fragmento linear de DNA que, por recombinação homóloga, substituiu o códon de terminação do *AGT1* pelo epítipo *GFP* (em verde) e pelo marcador *kan^r* (em laranja) no genoma das células. (B) Após a seleção dos transformantes, os primers AGT1-R504A-F e V-*kan^r*-R foram utilizados para a verificação da presença da fusão. Os primers AGT1-F e AGT1-R foram usados para amplificação da ORF do *AGT1*, como controle positivo.

3.5 Verificação da presença dos genes *MALx1* e do gene *AGT1* no genoma das cepas

Para a verificação da presença dos genes *MALx1* e do gene *AGT1* no genoma das cepas, os cromossomos das leveduras foram primeiramente separados através de Eletroforese de Campo Pulsado (PFGE). As amostras contendo os cromossomos de cada linhagem foram preparadas de acordo com protocolo descrito por Guerring et al. (1991). Após atingirem a fase estacionária de crescimento em meio YP contendo 2% de glicose, as células foram coletadas (1,0 mL), lavadas em Tris/EDTA (Tris-HCl 10,0 mM, pH 7,5, EDTA 50,0 mM) e ressuspensas em 150,0 μ L dessa mesma solução, porém contendo 130 μ g de Zymolyase 20T/mL. Subseqüentemente, essa suspensão foi incubada a 42° C por 30 segundos e misturada a 250,0 μ L de LMP agarose fundida (1% de LMP agarose em 0,125 M de EDTA, pH 7,5). Depois de homogeneizada, a mistura foi adicionada a moldes para a polimerização dos blocos que, então, continham os cromossomos de cada cepa. Após a polimerização, os blocos foram imersos em uma solução 10,0 mM de Tris-HCl, pH 7,5, contendo 0,5 M de EDTA, e incubados por 8 h a 37° C. Em seguida, os blocos foram transferidos para a solução NDS (Tris-HCl 10,0 mM, pH 9,5, EDTA 0,5 M, *N*-lauroilsarcosina 1%, Proteinase K 0,2%) e incubados durante a noite a 50° C. Por fim, os blocos foram lavados quatro vezes (1 h para cada lavagem) em Tris/EDTA (Tris-HCl 10,0 mM, pH 7,5, EDTA 50,0 mM) e armazenados a 4° C nessa mesma solução.

Após a imobilização dos cromossomos, os blocos de LMP agarose contendo os cromossomos foram depositados em um gel de agarose 1% em TBE 0,5X (Tris-HCl 50,0 mM, pH 8,3, ácido bórico 50,0 mM, EDTA 1,0 mM). A Eletroforese de Campo Pulsado (PFGE) foi realizada em um Gene Navigator (Pharmacia Biotec) durante 27 horas a 200V, em 2,5 L de TBE 0,5X a 10° C. Os tempos de pulsos foram de 70 segundos nas primeiras 15 horas e de 120 segundos nas últimas 12 horas. Após a corrida, o gel foi corado em TBE 0,5X contendo 0,5 μ g de Brometo de Etídeo/mL e posteriormente fotografado. Os cromossomos da cepa S288c (cujo genoma foi totalmente seqüenciado, www.yeastgenome.org) foram utilizados como marcador molecular.

Ao fim da PFGE, os cromossomos presentes no gel foram transferidos para uma membrana de Nylon (Biodyne A, Gibco BRL), conforme descrito por Ausubel et al. (1992). Em seguida, os cromossomos na membrana foram hibridados com sondas específicas através de *Southern blotting* com o kit AlkPhos (GE Healthcare) de acordo com instruções do fabricante.

As sondas foram produzidas por PCR utilizando o DNA genômico da cepa CEN.PK2-1C como DNA molde. Os primers AGT1-F e AGT1-R foram utilizados na produção da sonda para o gene *AGT1* e os primers MALx1-F e MALx1-R na produção da sonda para os genes *MALx1* (vide Tabela 3.2). Após a amplificação, os produtos de PCR foram denaturados e posteriormente marcados utilizando-se o mesmo kit AlkPhos.

3.6 Determinação de glicose, maltose, maltotriose e etanol

Ao longo dos crescimentos celulares, amostras foram retiradas para a determinação do consumo de açúcares e da produção de etanol.

A glicose foi determinada através de um kit enzimático comercial de acordo com as instruções do fabricante (BioDiagnostica-Laborclin). Para essa análise, 10,0 µL de cada amostra reagiram com 1,0 mL do reagente de cor desse kit (composto pelas enzimas glicose oxidase e peroxidase) sob incubação de 10 min a 37° C. Em seguida, a quinonimina (produto de cor avermelhada) produzida na reação foi estimada a 505 nm, permitindo a determinação da concentração de glicose em cada amostra através da correlação com a absorbância apresentada pela solução padrão (1,0 g/L).

As concentrações de maltose e maltotriose foram determinadas colorimetricamente através da reação com metilamina, em pH alcalino, segundo protocolo adaptado de Cáceres et al. (2000). Inicialmente, 600,0 µL de amostra diluída foram adicionados a 600,0 µL da solução reagente (NaOH 0,5 M, Metilamina 0,5%). Em seguida, essa mistura foi incubada por 5 min a 100° C. Por fim, o composto corado gerado pela reação foi estimado a 540 nm e as concentrações de maltose ou maltotriose foram determinadas correlacionando-se a absorbância de cada amostra com a equação de reta extraída de uma curva padrão construída a partir de uma solução 2% do açúcar correspondente (maltose ou maltotriose, conforme o caso).

O etanol produzido foi quantificado enzimaticamente através da reação com a álcool oxidase (AOD, de *Pichia pastoris*, Sigma) e com a peroxidase (POD, de raiz-forte, Toyobo) seguindo metodologias adaptadas dos protocolos descritos por Salgado et al. (2000) e Rodionov et al. (2002). Para essa determinação, 10,0 µL de amostra foram incubados em placas de 96 poços (de fundo plano) com 200,0 µL do reagente enzimático (0,5 U de

AOD/mL, 4,0 U/mL de POD, 14,0 mM de 4-aminoantipirina e 60,0 mM de Fenol em Tampão Forfato de Sódio 0,1 M, pH 7,5) por 1 h a 37° C. Após incubação, a absorbância foi medida a 415 nm em um leitor de placas (Tecan GENios microplate reader) e a concentração de etanol foi determinada pela correlação do valor de absorbância apresentada para cada amostra com a equação de reta extraída de uma curva padrão construída com soluções padrão de etanol (1,0-10,0 g/L).

3.7 Determinação das atividades de transporte ativo e hidrólise de α -glicosídeos

A atividade da permease Agt1p foi avaliada colorimetricamente em células cultivadas até o início da fase exponencial de crescimento ($DO_{570} \sim 3,5$) em meios rico ou sintético contendo maltose ou maltotriose como fonte de carbono. Para essa análise, foi utilizado o substrato sintético *p*-nitrofenil- α -D-glicopiranosídeo (*p*NP α G) conforme descrito por Hollatz e Stambuk (2001). As células crescidas em maltose ou maltotriose foram centrifugadas, lavadas duas vezes com água a 4° C e ressuspensas de modo a atingirem a concentração de 20 mg/mL. Em seguida, 100,0 μ L dessa suspensão foram adicionadas a 100,0 μ L de succinato-Tris 0,1 M, pH 5,0, contendo 10,0 mM de *p*NP α G. Após incubação por 5 min à temperatura ambiente, acrescentou-se 1,0 mL de Bicarbonato de Sódio 2 M (pH > 9,0) às amostras para interromper o ensaio e revelar o *p*-nitrofenol produzido, que foi, em seguida, estimado a 400 nm. As medidas foram realizadas em triplicata e células previamente fervidas foram utilizadas como controles.

O transporte ativo de maltose, maltotriose e trealose também foi analisado em células crescidas em meio rico contendo maltose ou maltotriose como fonte de carbono. Nesse caso, a atividade de transporte desses α -glicosídeos foi avaliada através do co-transporte de H^+ , medido pela variação de pH obtida em suspensão celular – conforme descrito por Stambuk e de Araújo (2001) e Stambuk et al. (1996; 1998; 1999, 2000). Ao atingirem o meio da fase exponencial de crescimento ($DO_{570} \sim 10,0$), as células foram centrifugadas e lavadas duas vezes com água a 4° C. Em seguida, essas células foram ressuspensas de modo a atingirem a concentração de 12-15 mg/mL e colocadas em um recipiente com temperatura controlada (28° C). O pH de cada suspensão celular foi ajustado para 5,0 e a reação foi iniciada pela adição de diferentes concentrações (0,1-100,0 mM) de

maltose, maltotriose ou trealose. Através de um pHmetro PHM84 acoplado a um registrador gráfico TT1 (Radiometer), as alterações de pH provocadas pela adição desses açúcares foram monitoradas e as atividades de transporte foram calculadas a partir da porção inicial (transcorridos 10 segundos) da curva obtida no registrador.

Para a determinação da atividade α -glicosidase, as células coletadas no início da fase exponencial de crescimento ($DO_{570} \sim 3,5$) foram inicialmente permeabilizadas, conforme descrito por Stambuk (1999). Para isso, aproximadamente 2 mg de células foram lavadas em 0,5 mL de tampão MOPS-NaOH 0,1 M, pH 6,8 (tampão A), e posteriormente ressuspensas em 200,0 μ L do mesmo tampão contendo 20% de glicerol, 1,0 mM de EDTA, e 1,0 mM DTT (tampão B). Em seguida, foram adicionados, a essa suspensão, 12,0 μ L de uma solução de tolueno/etanol/Triton X-100 10% (1:4:1; v/v) e as células foram vigorosamente agitadas durante 1 min. Após a permeabilização, as células foram lavadas duas vezes com tampão B e ressuspensas em 1,0 mL do tampão A. Dessa suspensão de células permeabilizadas, 50,0 μ L foram adicionados a 0,95 mL de uma solução 2,0 mM de *p*NP α G em tampão A ou, alternativamente, 40,0 μ L foram adicionados a 60,0 μ L de uma solução 0,2 M de maltose ou maltotriose em tampão A. Em seguida, cada uma dessas amostras foi incubada a 30° C durante 1 min (para as amostras com a solução de *p*NP α G) ou 5 min (para as amostras com as soluções de maltose ou maltotriose), fervidas a 100° C por 3 min e posteriormente centrifugadas. Logo após, os sobrenadantes foram utilizados para determinar colorimetricamente o *p*-nitrofenol, liberado com a quebra do *p*NP α G, e a glicose, liberada pela quebra da maltose ou da maltotriose. O *p*-nitrofenol foi estimado a 400 nM e a glicose foi determinada conforme descrito na seção 3.6. Todas as medidas foram realizadas em triplicata e foram utilizados controles com células previamente fervidas.

3.8 Citometria de Fluxo

Inicialmente, para análise da expressão da permease Agt1p, a cepa 340-GFP (Tabela 3.1) transformada com o plasmídeo pJW5 (Tabela 3.3) foi cultivada em meios rico e sintético contendo 2% de maltose ou maltotriose. No início da fase exponencial de crescimento ($OD_{570} \sim 3,5$), as células foram coletadas e fixadas em 1:10 (v/v) de *p*-formaldeído (Sigma).

Em seguida, essa suspensão celular (na concentração de 2×10^6 células/mL) foi injetada em um equipamento FACS (FACStar Plus) e a fluorescência verde emitida pelas células (FL1) foi quantificada. Os dados foram analisados e os gráficos foram plotados no software WinMDI. Para estimar a fluorescência emitida apenas pela permease Agt1p fusionada à GFP, células da cepa 340-2B crescidas em meio sintético com glicose foram utilizadas como branco.

Para análise da atividade mitocondrial, as cepas MC966A e BSY09 (Tabela 3.1) foram cultivadas em meio rico (YP) contendo 2% de maltotriose como fonte de carbono. Ao atingirem o meio da fase exponencial de crescimento ($DO_{570} \sim 10,0$), as células foram centrifugadas, lavadas e coletadas em 10,0 mL de meio fresco (YP + 2% de maltotriose) de modo a atingirem a concentração de 2×10^6 células/mL. Em seguida, foi adicionado 10,0 μ L de MitoTracker Red 100,0 mM (Invitrogen) a essa suspensão e as células foram coradas sob agitação (160 rpm) por 45 minutos a 28° C. Imediatamente após essa incubação, as células foram lavadas com PBS 1X e coletadas em 1:10 (v/v) de *p*-formaldeído (Sigma) de modo a manter a concentração celular em 2×10^6 células/mL. Por fim, essa suspensão celular foi injetada no FACS (FACStar Plus) e a fluorescência emitida pelas células (FL4) foi quantificada. Os dados assim obtidos foram também analisados no WinMDI, onde os gráficos foram plotados. Nesse ensaio, células não coradas com MitoTracker Red foram utilizadas como branco.

Em cada ensaio, a escolha das células para a confecção de histogramas levou em consideração os seus volumes, que não deveriam ser superiores aos da população utilizada como branco.

3.9 Análise de expressão gênica através de RT-PCR quantitativo em tempo real (QRT-PCR)

Para a análise da expressão dos genes *AGT1*, *MALx1* e *MPHx*, as células de *S. cerevisiae* foram inicialmente cultivadas em meios ricos contendo, alternadamente, como fonte de carbono, 2% de glicose, maltose ou maltotriose. Ao atingirem o meio da fase exponencial de crescimento ($DO_{570} \sim 10,0$), as células foram coletadas e rapidamente congeladas em nitrogênio líquido. Após esse rápido congelamento, as mesmas foram armazenadas a -80° C. O RNA total das células foi extraído pelo método de TRIzol (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante. Em seguida, 1,0 μ g do RNA extraído

foi tratado com DNase (Roche) e utilizado para síntese de cDNA com o kit Reverse Transcription System (Promega) de acordo com as instruções dos fabricantes.

Para a realização da PCR em tempo real foi utilizado o kit KAPA SYBR FAST qPCR (KAPABiosystems) também de acordo com as especificações do fabricante. Os pares de primers AGT1-1347F e -1397R; MALx1-1352F e -1403R; e, MPHx-1615F e -1665R (vide Tabela 3.2) foram utilizados para avaliar, respectivamente, a expressão dos genes *AGT1*, *MALx1* e *MPHx*. Uma curva padrão com cinco pontos (500,0 ng; 100,0 ng; 20,0 ng; 4,0 ng e 0,8 ng de cDNA) foi realizada para cada gene a ter sua expressão analisada. Para cada amostra, foram utilizados 20,0 ng de cDNA. Para a realização dessa reação e para a análise dos dados foi utilizado o equipamento StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems) com software próprio. Em cada ensaio foi gerada uma curva de dissociação para confirmar a amplificação de apenas um produto. Todas as amostras foram avaliadas em triplicata e os resultados apresentados são compostos da média e do desvio padrão obtidos de dois experimentos independentes. Os valores de expressão representam uma quantificação relativa obtida através do quociente da quantidade de mRNA transcrito a partir de cada gene analisado pela quantidade de mRNA transcrito a partir do gene *ACT1* em cada amostra.

3.10 Seqüenciamento dos diferentes alelos do gene *AGT1*

Para o seqüenciamento do gene *AGT1* presente nas cepas CAT-1, PE-2, CEN.PK2-1C e MC966A, foi necessário, primeiramente, extrair o DNA genômico das mesmas segundo protocolo padrão descrito na literatura (AUSUBEL et al., 1992). Em seguida, o alelo presente no genoma de cada linhagem foi amplificado por PCR com os primers AGT1-SA5 e AGT1-SA12. Esses produtos de PCR foram então purificados (kit Wizard – Promega) e encaminhados, juntamente com os primers AGT1-SA5, -SA6, -SA7, -SA8, -SA9, -SA10, -SA11 e -SA12 (vide Tabela 3.2), ao VIB Genetic Service Facility (Bélgica) para serem seqüenciados.

O seqüenciamento da região compreendida entre os nucleotídeos -279 e -1 do promotor do *AGT1* da linhagem CAT-1 exigiu, inicialmente, a sua amplificação por PCR com os primers AGT1-SA3c e AGT1-SA4 (vide Tabela 3.2). Subseqüentemente, esse produto de PCR foi também purificado (kit Wizard – Promega) e encaminhado, juntamente com o mesmo par de primers, ao VIB Genetic Service Facility (Bélgica) para ser seqüenciado.

3.11 Avaliação da região promotora do *AGT1* e verificação da presença dos genes *STAx*

Para a avaliação da região promotora do gene *AGT1*, o DNA genômico das cepas de laboratório e das linhagens CAT-1, PE-2 e W-34/70 foi inicialmente extraído segundo protocolo padrão descrito na literatura (AUSUBEL et al., 1992). Em seguida, essas amostras de DNA genômico foram utilizadas como DNA molde em reações em cadeia de polimerase com diferentes combinações dos primers AGT1-SA1b, -SA2b, -SA2c, SA2d, -SA3b, -SA3c, -SA4 e -SA5 e com o par de primers AGT1prom-F e AGT1prom-R (vide Tabela 3.2).

A verificação da presença ou ausência dos genes *STAx* no genoma das cepas LCM001 e BSY09, foi realizada através de PCR utilizando-se o DNA genômico dessas linhagens juntamente com os pares de primers: STA-F e STA-R; STA-F e STA1-2-R; e, STA-F e STA3-R (vide Tabela 3.2). Nessas reações, o DNA genômico da cepa ISP15 (Tabela 3.1), previamente caracterizada como *S. cerevisiae* var. *diastaticus* (GAGIANO et al., 1999; 2003), foi utilizado como controle positivo.

3.12 Análise de expressão gênica em larga escala

Inicialmente, as células da cepa LCM001 foram cultivadas em meio rico contendo 20 g/L de glicerol ou maltotriose até atingirem o meio da fase exponencial de crescimento ($DO_{570} \sim 10,0$). Ao atingirem esse ponto, as células foram coletadas e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido. O RNA total das células foi extraído pelo método de TRIzol (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante. Posteriormente, as amostras de RNA provenientes dos crescimentos em glicerol e em maltotriose foram enviadas ao VIB MicroArray Facility (Bélgica). Ambas as amostras foram hibridizadas simultaneamente com o biochip (Agilent Yeast 4x44K), sendo utilizada como controle a amostra correspondente ao crescimento em glicerol.

4 RESULTADOS

4.1 Reguladores *MAL* e a capacidade fermentativa das células

A expressão constitutiva dos genes *MAL* é bastante importante tanto para cepas de panificação como para cepas de cervejaria, uma vez que melhora a eficiência fermentativa desses processos. Foi demonstrado que essa característica tende a incrementar a fermentação de maltose pelas linhagens industriais (HIGGINS et al., 1999a; KODAMA et al., 1995; MENESES e JIRANEK, 2002; ODA e OUCHI, 1990). Tendo em vista os resultados desses autores, decidimos investigar a real contribuição dos reguladores *MAL* constitutivos para a fermentação de maltotriose em *S. cerevisiae*. Com esse intuito, decidimos transformar uma linhagem de *S. cerevisiae* sem regulador *MAL* funcional com plasmídeos contendo alternadamente o regulador induzível *MAL63* (pJW4) ou o regulador constitutivo *MAL63^c* (pJW5). Dessa forma, pudemos definir com exatidão a diferença entre a capacidade fermentativa de células portando reguladores *MAL* induzíveis ou *MAL* constitutivos.

A cepa utilizada para esse fim (340-2B – vide Tabela 3.1) não possui nenhum outro locus *MAL* além do *mal1g* e, portanto, o seu único transportador da família de genes *MAL* é a permease Agt1p. Por não possuir um regulador *MAL* funcional em seu genoma, essa linhagem é incapaz de expressar os genes *AGT1* e *MAL12* presentes no seu locus *mal1g* (CHARRON e MICHELS, 1988; CHARRON et al., 1986). Em virtude disso, e conforme esperado, a mesma não pôde utilizar a maltose e a maltotriose como fontes de carbono antes de ser transformada com o plasmídeo pJW4 ou com o plasmídeo pJW5 (Figura 4.1). Essa ausência de crescimento demonstra que para uma cepa de *S. cerevisiae* ser capaz de fermentar não só a maltose mas também a maltotriose é necessário, além de uma α -glicosidase (maltase) e de um transportador para esses açúcares, a presença de uma proteína reguladora codificada por um gene *MALx3*.

Para verificarmos se a permease Agt1p seria, de fato, o único transportador dessa linhagem capaz de transportar a maltose e a maltotriose, inicialmente deletamos o gene *AGT1* do seu genoma, dando origem à linhagem LCM002 (vide detalhes na seção 3.3). A confirmação dessa deleção pode ser observada no gel apresentado na Figura 4.2. Em seguida, transformamos a linhagem recém construída (LCM002) com o plasmídeo pJW5 (que contém o regulador constitutivo *MAL63^c*) e inoculamos as suas células em meio sintético

contendo 2% de glicose, maltose ou maltotriose como fonte de carbono. Conforme pode ser observado na Figura 4.3, mesmo diante do regulador *MAL63^C*, a linhagem LCM002 (340-2B *agt1Δ*) foi incapaz de metabolizar a maltose e a maltotriose. Desse modo, nossos resultados comprovam que o único transportador de maltose e maltotriose presente na cepa 340-2B é a permease codificada pelo gene *AGT1*.

FIGURA 4.1: Crescimento celular em micro-escala da cepa 340-2B transformada com o plasmídeo pJW4 ou pJW5. Após serem pré-crescidas em maltose, as células foram inoculadas em 100 μ L de meio rico contendo 2% de maltose (YPM) ou maltotriose (YPMt) como fonte de carbono.

FIGURA 4.2: Confirmação da deleção do gene *AGT1* na cepa 340-2B. Conforme descrito na seção 3.3, o DNA genômico da cepa LCM002 (Linha 1) e o da cepa 340-2B (linha 2) foram analisados, através de PCR, para a verificação da deleção em questão (M, 1 kb DNA ladder – Sigma; linha 1 confirmação da deleção; linha 2, verificação da presença do *AGT1*). Os produtos de PCR estão mostrados em gel de agarose 1%. Os números ao lado do gel indicam o tamanho dos produtos amplificados.

FIGURA 4.3: Utilização de açúcares em meio sintético pela cepa LCM002 transformada com o plasmídeo pJW5. Crescimento celular (A), consumo de açúcares (B – à esquerda) e produção de etanol (B – à direita) pela cepa LCM002 transformada com o plasmídeo pJW5 em meio sintético contendo 2% de glicose (■), maltose (●) ou maltotriose (▲) como fonte de carbono.

Como pode ser observado nas figuras 4.1, 4.4 e 4.5, a cepa transformada com os plasmídeos acima passou a crescer utilizando tanto a maltose quanto a maltotriose como fontes de carbono, indicando que a utilização da maltotriose é regulada pelos mesmos mecanismos regulatórios que controlam a utilização da maltose. A capacidade fermentativa dessas células, no entanto, foi diferente para cada plasmídeo, sendo a produção de etanol a partir desses açúcares sempre maior nas células que continham o plasmídeo pJW5. Tanto em meio rico (Figura 4.4) quanto em meio sintético (Figura 4.5) a presença do regulador *MAL63^C* constitutivo incrementou a capacidade fermentativa das células. Em meio sintético contendo maltotriose como fonte de carbono, a produção de etanol observada para a cepa 340-2B transformada com o plasmídeo contendo o regulador *MAL63^C* constitutivo foi duas vezes superior ao observado para essa mesma cepa transformada com o plasmídeo contendo o regulador *MAL63* induzível. Conforme esperado, a utilização de glicose não foi alterada por essas transformações (Figura 4.1).

Embora em meio rico (Figura 4.4) não tenha havido diferença de consumo de açúcares quando comparadas as células contendo o regulador induzível ou o constitutivo, vê-se claramente que, em meio sintético, a cepa 340-2B com pJW4 consumiu menos os α -glicosídeos maltose e maltotriose do que quando transformada com o plasmídeo pJW5 (Figura 4.5). Os gráficos da figura 4.4 mostram que em meio sintético as células passaram a consumir o etanol produzido mesmo sem consumir completamente o açúcar presente. No caso dos crescimentos em meios ricos, a quase completa utilização dos açúcares pelas células promoveu, assim, uma produção mais elevada de etanol quando comparada à fermentação realizada em meio sintético (vide figuras 4.4 e 4.5).

Os dados apresentados nas figuras 4.4 e 4.5 demonstram também que a quantidade de etanol produzida por células metabolizando a maltotriose foi sempre superior a das células que metabolizavam a maltose. Essa diferença entre a fermentação das fontes de carbono foi ainda mais pronunciada com a transformação da cepa 340-2B com o plasmídeo pJW5 e em crescimentos realizados em meio sintético. De acordo com esses resultados estão os de atividade de transporte da permease Agt1p. Conforme pode ser observado na Figura 4.6, o ensaio de atividade de transporte da permease Agt1p – que utiliza um substrato sintético (*pNP α G*) específico para esse transportador (vide HOLLATZ e STAMBUK, 2001) – demonstra que, para a cepa 340-2B transformada com o pJW5, as células crescidas em meio sintético com maltotriose apresentam maior atividade da permease Agt1p que as

células crescidas nesse mesmo tipo de meio porém contendo maltose como fonte de carbono. Indiretamente, os dados obtidos com esse ensaio indicam que a expressão do transportador codificado pelo gene *AGT1* é superior em células cultivadas em maltotriose.

A importância da expressão constitutiva dos genes *MAL* também pôde ser verificada nos ensaios de atividade de transporte do Agt1p. Os resultados apresentados na Figura 4.6, apontam haver maior expressão dessa permease na presença do regulador *MAL63^C*, uma vez que as atividades de transporte foram superiores em células contendo o plasmídeo pJW5. As atividades de transporte também foram superiores em células crescidas em meio rico, estando, portanto, de acordo com os perfis de consumo de açúcar observados e com a capacidade fermentativa das células nos dois tipos de meio utilizados (vide figuras 4.4 e 4.5). Dessa forma, uma boa correlação ($r^2 = 0.90$) entre o nível de expressão desse transportador e a capacidade fermentativa das células foi encontrada.

Ao analisarmos as atividades de hidrólise de *pNPαG*, maltose e maltotriose, não verificamos, no entanto, diferença significativa entre células contendo o regulador *MAL63* ou o *MAL63^C*. Conforme pode ser observado nas figuras 4.7 e 4.8, houve pouca ou nenhuma diferença quando comparadas as atividades α -glicosidase apresentadas pela cepa 340-2B transformada com o plasmídeo pJW4 ou com o pJW5. Também não foi possível estabelecer uma correlação satisfatória entre os níveis de expressão das maltases e da capacidade fermentativa das células do mesmo modo como foi estabelecido para a expressão do gene *AGT1*. Ao compararmos meios ricos e sintéticos, é verificada inclusive uma correlação inversa entre atividade α -glicosidase e produção de etanol. Os resultados apresentados na Figura 4.8 revelam ainda que a atividade de hidrólise de maltotriose é aproximadamente metade da de maltose.

FIGURA 4.4: Utilização de maltose e maltotriose pela cepa 340-2B transformada com o plasmídeo pJW4 ou pJW5 em meio rico. Crescimento celular (A, B), consumo de açúcares (C, D) e produção de etanol (E, F) pela cepa 340-2B transformada com o plasmídeo pJW4, portador do gene regulador *MAL63* induzível (símbolos brancos), ou com o plasmídeo pJW5, portador do gene regulador *MAL63^c* constitutivo (símbolos pretos), em meio rico contendo 2% de maltose (A, C, E) ou maltotriose (B, D, F) como fontes de carbono.

FIGURA 4.5: Utilização de maltose e maltotriose pela cepa 340-2B transformada com o plasmídeo pJW4 ou pJW5 em meio sintético. Crescimento celular (A, B), consumo de açúcares (C, D) e produção de etanol (E, F) pela cepa 340-2B transformada com o plasmídeo pJW4, portador do gene regulador *MAL63* induzível (símbolos brancos), ou com o plasmídeo pJW5, portador do gene regulador *MAL63^c* constitutivo (símbolos pretos), em meio sintético sem uracila contendo 2% de maltose (A, C, E) ou maltotriose (B, D, F) como fontes de carbono.

FIGURA 4.6: Atividade da permease Agt1p na cepa 340-2B transformada com o plasmídeo pJW4 ou pJW5. A atividade da permease Agt1p foi determinada pelo transporte do substrato sintético $pNP\alpha G$ nas células da cepa 340-2B transformada com o plasmídeo pJW4 (*MAL63*) ou com o plasmídeo pJW5 (*MAL63^C*) crescidas em meio sintético (SC) ou em meio rico (YP) contendo maltose (barras brancas) ou maltotriose (barras cinzas) como fonte de carbono.

FIGURA 4.7: Atividade de hidrólise de $pNP\alpha G$ na cepa 340-2B transformada com o plasmídeo pJW4 ou pJW5. A atividade de hidrólise do substrato sintético $pNP\alpha G$ foi determinada nas células da cepa 340-2B transformada com o plasmídeo pJW4 (*MAL63*) ou com o plasmídeo pJW5 (*MAL63^C*) crescidas em meio sintético (SC) ou em meio rico (YP) contendo maltose (barras brancas) ou maltotriose (barras cinzas) como fonte de carbono.

FIGURA 4.8: Atividade de hidrólise de maltose e maltotriose na cepa 340-2B transformada com o plasmídeo pJW4 ou pJW5. A atividade de hidrólise da maltose e da maltotriose foi determinada nas células da cepa 340-2B transformada com o plasmídeo pJW4 (*MAL63*) ou com o plasmídeo pJW5 (*MAL63^C*) crescidas em meio sintético (SC) contendo maltose (barras brancas) ou maltotriose (barras cinzas) como fonte de carbono.

Em concordância com os perfis de produção de etanol e com os resultados de atividade de transporte da permease Agt1p, a cinética de transporte ativo de maltotriose também aponta que, em células da cepa 340-2B com pJW5 crescidas em meio sintético contendo maltose ou maltotriose, a maltotriose pode induzir mais fortemente a expressão desse transportador em comparação com a maltose. Esse fato pode ser visualizado na Figura 4.9, que mostra uma capacidade de transporte de maltotriose duas vezes superior em células crescidas nessa fonte de carbono (52,53 μmol de maltotriose transportada por grama de células por minuto) que em células crescidas em maltose (25,81 μmol de maltotriose transportada por g de células por min). As análises de cinética de transporte também confirmam a baixa afinidade ($K_m \sim 20 \text{ mM}$) dessa permease por ambos α -glicosídeos, fato que já havia sido observado por Stambuk e de Araújo (2001). Em contrapartida, apesar da mesma afinidade verificada para os dois açúcares, observa-se na Figura 4.9 maior V_{max} para o transporte de maltotriose por células crescidas em maltotriose que para o transporte de maltose por células crescidas em maltose (respectivamente, 52,53 e 38,43 μmol de açúcar transportado por g de células por min).

FIGURA 4.9: Cinética do transporte ativo de maltose e maltotriose pela cepa 340-2B transformada com o plasmídeo pJW5. O transporte ativo de maltose (●) e de maltotriose (▲, △) foi determinado com diferentes concentrações desses substratos. Esse ensaio foi realizado com células crescidas em meio sintético contendo 2% de maltose (símbolos pretos) ou maltotriose (símbolo branco) como fonte de carbono.

4.2 A presença da permease Agt1p é necessária para a fermentação da maltotriose

A publicação de trabalhos conflitantes em relação à capacidade dos transportadores de α -glicosídeos conhecidos transportarem maltotriose nos levou a analisar o grau de contribuição dessas permeases para a fermentação desse açúcar. Inicialmente, para esse propósito, utilizamos três linhagens de laboratório (vide Tabela 3.1): 1403-7A, CEN.PK2-1C e MC966A. No intuito de confirmarmos os genótipos parcialmente predefinidos dessas cepas (ENTIAN e KOTTER, 1998; HAN et al., 1995; YE et al., 1999), realizamos uma eletroforese de campo pulsado (PFGE) seguida de um *Southern Blotting* para detecção do gene *AGT1* e um *Southern Blotting* para identificação dos genes *MALx1* presentes em cada genoma (vide seção 3.5). Os resultados apresentados na Figura 4.10, além de confirmarem a presença do gene *AGT1* nas três linhagens, apontam também a presença dos genes *MAL21* e *MAL31* nos três genomas e do gene *MAL41* na cepa 1403-7A. Essa análise possibilitou, assim, a revisão do genoma das cepas analisadas, tendo em vista que até o presente não havia sido verificada a presença do gene *MAL21* na cepa 1403-7A, nem mesmo a presença do gene *MAL31* nas cepas CEN.PK2-1C e MC966A.

No intuito de verificarmos especificamente a importância da permease Agt1p para a fermentação de maltotriose em *S. cerevisiae*, deletamos, conforme descrito na seção 3.3, o gene *AGT1* do genoma das cepas 1403-7A, CEN.PK2-1C e MC966A, o que deu origem, respectivamente, às linhagens LCM001, LCM003 e BSY09. Além da confirmação da deleção desse gene através de PCR (assim como realizado para a cepa 340-2B, vide seção 4.1 – Figura 4.2), nossos resultados de PFGE e *Southern Blotting* (Figura 4.10) também apontam a sua ausência nas cepas criadas. Os dados apresentados na Figura 4.10 demonstram ainda, conforme esperado, que essas linhagens *agt1Δ* apresentam a mesma cariotipagem e os mesmos genes *MALx1* de suas cepas parentais 1403-7A, CEN.PK2-1C e MC966A.

FIGURA 4.10: Verificação da presença do gene *AGT1* e dos genes *MALx1* nas cepas analisadas. Os cromossomos das cepas S288C (1), 1403-7A (2), LCM001 (3), CEN.PK2-1C (4), LCM003 (5), MC966A (6) e BSY09 (7) foram separados através de PFGE (A) e posteriormente transferidos para uma membrana de Nylon (B) para serem hibridizados com sondas para o gene *AGT1* (painel superior da parte B) e para os genes *MALx1* (painel inferior da parte B). Os valores à esquerda do gel representam os tamanhos (em kilobases) de cromossomos selecionados da cepa S288C. Os números romanos no meio da figura indicam a localização dos cromossomos onde os genes verificados se localizam. As posições dos cromossomos contendo os genes *AGT1*, *MAL31*, *MAL41* e *MAL21* estão também indicadas à direita da parte B da figura.

Antes de terem suas curvas de crescimento analisadas, as seis linhagens acima (parentais e *agt1Δ*) foram pré-crescidas em meio rico contendo 2% de maltose, a fim de evitar qualquer efeito repressor que pudesse ser causado pela glicose. A Figura 4.11 apresenta as curvas de crescimento, de consumo de açúcares e de produção de etanol da cepa CEN.PK2-1C e de sua derivada *agt1Δ* (LCM003) em meio rico contendo 2% de maltose (YPM) ou maltotriose (YPMt) como fonte de carbono. Os dados apresentados demonstram que ambas as cepas (CEN.PK2-1C e LCM003) foram capazes de fermentar eficientemente a maltose, consumindo o açúcar em, no máximo, 30 h de incubação. A utilização de maltotriose, em contrapartida, foi diferente para essas duas cepas: enquanto a cepa parental (não deletada) fermentou a maltotriose tão eficientemente quanto a maltose, a linhagem *agt1Δ* foi incapaz de utilizar a maltotriose como fonte de carbono (Figura 4.11). Esses mesmos perfis de crescimento celular e de fermentação de açúcares foram também observados para as cepas 1403-7A, LCM001, MC966A e BSY09 (Figura 4.12). Embora as linhagens selvagens (1403-7A e MC966A) tenham fermentado eficientemente tanto a maltose quanto a maltotriose, a deleção do gene *AGT1* impossibilitou as células de utilizarem a maltotriose como fonte de carbono durante o tempo de incubação. Assim como verificado para a cepa LCM003, as cepas LCM001 e BSY09 (deletadas no *AGT1*) utilizaram a maltose tão eficientemente quanto as suas linhagens parentais (Figura 4.12).

Em concordância com o observado para a cepa 340-2B transformada com o plasmídeo pJW5 (vide seção 4.1), a capacidade de transporte de maltotriose das cepas CEN.PK2-1C e 1403-7A também foi maior em células crescidas nessa fonte de carbono que em células crescidas em maltose (vide figuras 4.13-B e 4.14-B). Nossas análises de cinética de transporte demonstram ainda, conforme publicado (RAUTIO e LONDESBOROUGH, 2003; STAMBUK e DE ARAÚJO, 2001; ZASTROW et al., 2001), existir dois tipos de sistema de transporte para a maltose: um de alta ($K_m \sim 5$ mM) e outro de baixa afinidade ($K_m \sim 30$ mM). Vale ressaltar que, com a deleção do gene *AGT1* dessas linhagens, o transporte de maltose de alta afinidade não foi alterado, porém o sistema de baixa afinidade foi praticamente extinto (vide figuras 4.13-A e 4.14-A). Para a maltotriose, em contrapartida, não foi verificado transporte de alta afinidade e o componente de baixa afinidade observado foi completamente perdido com a deleção do gene *AGT1* (figuras 4.13-B e 4.14-B).

FIGURA 4.11: Utilização de maltose e maltotriose pelas cepas CEN.PK2-1C e LCM003 em meio rico. Crescimento celular (A, B), consumo de açúcares (C, D) e produção de etanol (E, F) pelas cepas CEN.PK2-1C (A, C, E) e LCM003 (B, D, F) em meio rico contendo 2% de maltose (símbolos brancos) ou maltotriose (símbolos pretos) como fonte de carbono.

FIGURA 4.12: Utilização de maltose e maltotriose pelas cepas 1403-7A, LCM001, MC966A e BSY09 em meio rico. Crescimento celular (gráficos à esquerda) e produção de etanol (gráficos à direita) pelas linhagens parentais (símbolos brancos) e suas derivadas *agt1Δ* (símbolos pretos) em meio rico contendo 2% de maltose (○, ●) ou maltotriose (△, ▲) como fonte de carbono. (A) 1403-7A e LCM001. (B) MC966A e BSY09.

FIGURA 4.13: Cinética do transporte ativo de maltose e maltotriose pelas cepas CEN.PK2-1C e LCM003. O transporte ativo de maltose (A) e de maltotriose (B) foi determinado com diferentes concentrações desses substratos em células da cepa parental CEN.PK2-1C (●, ■) e de sua derivada *agt1Δ* (○, □) crescidas em meio rico contendo 2% de maltose. A cinética de transporte ativo de maltotriose pela cepa CEN.PK2-1C também foi determinada em células crescidas em meio rico contendo 2% de maltotriose (◆).

FIGURA 4.14: Cinética do transporte ativo de maltose e maltotriose pelas cepas 1403-7A e LCM001. O transporte ativo de maltose (A) e de maltotriose (B) foi determinado com diferentes concentrações desses substratos em células da cepa parental 1403-7A (●, ■) e de sua derivada *agt1Δ* (○, □) crescidas em meio rico contendo 2% de maltose. A cinética de transporte ativo de maltotriose pela cepa 1403-7A também foi determinada em células crescidas em meio rico contendo 2% de maltotriose (◆).

Corroborando os dados das Figuras 4.13 e 4.14, bem como os resultados apresentados na seção 4.1, a análise das atividades de transporte de α -glicosídeos das cepas CEN.PK2-1C e LCM003 também demonstrou, de forma indireta, que a expressão dos transportadores de α -glicosídeos é maior em células crescidas em meio contendo maltotriose como fonte de carbono. Conforme pode ser observado na Tabela 4.1, as atividades de transporte das células da cepa CEN.PK2-1C crescidas em maltotriose foram sempre superiores às das células crescidas em maltose. Utilizando-se o substrato sintético *pNP α G* (que avalia apenas a atividade da permease *Agt1p*), vê-se, por exemplo, que a capacidade de transporte das células crescidas em maltotriose foi o dobro da observada para o crescimento em maltose (Tabela 4.1). Assim, esses resultados, indiretamente, sugerem a maltotriose como indutor mais forte da expressão dos genes *MALx1* e *AGT1* em *S. cerevisiae*.

TABELA 4.1: Atividade de transporte de α -glicosídeos das cepas CEN.PK2-1C e LCM003 crescidas em meio rico contendo 2% de maltose ou maltotriose como fontes de carbono.

Cepa e Fonte de carbono	Transporte ^a (nmol [mg céls.] ⁻¹ min. ⁻¹) de:			
	<i>pNPαG</i>	Maltose	Maltotriose	Trealose
CEN.PK2-1C				
Maltose	5	62	7	21
Maltotriose	10	104	10	39
LCM003				
Maltose	0	74	<1	<1
Maltotriose^b	0	11	<1	<1

^a Estimada pelos níveis de *p*-nitrofenol produzido (*pNP α G*) ou de co-transporte de H⁺ (maltose, maltotriose e trealose) nas células das leveduras, utilizando 5 mM de concentração final de açúcar. Os ensaios foram realizados em triplicata com desvios padrões inferiores a 15%.

^b Células foram coletadas após 75 h de crescimento, quando atingiram uma DO₅₇₀ de ~3,5 (aproximadamente 1 mg céls./ml).

As atividades de transporte da cepa LCM003 (CEN.PK2-1C *agt1Δ*), por sua vez, se apresentaram como nova confirmação da deleção do gene *AGT1*, uma vez que os transportes de trealose e *pNPαG*, açúcares sabidamente transportados apenas pelo Agt1p (HOLLATZ e STAMBUK, 2001; STAMBUK e DE ARAÚJO, 2001), foram abolidos nessa cepa (Tabela 4.1). Cabe então ressaltar que os resultados apresentados nas Figuras 4.13-B e 4.14-B e na Tabela 4.1 demonstram ausência também de atividade de transporte de maltotriose após a deleção do gene *AGT1*. Portanto, nossos dados claramente indicam que a presença da permease Agt1p é essencial para o transporte de maltotriose pelas células de *S. cerevisiae*.

Por fim, quando avaliamos a atividade de transporte das células da cepa LCM003 (CEN.PK2-1C *agt1Δ*) inoculadas em maltotriose, verificou-se forte decréscimo inclusive na atividade de transporte de maltose, indicando que a falta de capacidade de transportar maltotriose dessa cepa promove uma forte diminuição da indução dos seus genes *MAL* (Tabela 4.1).

A reintrodução do gene *AGT1* em cepas *agt1Δ* conferiu às células novamente a capacidade de utilizar a maltotriose como fonte de carbono (vide figuras 4.15 e 4.16). Ao serem transformadas com o plasmídeo pGRSd-AGT1 (que possui o gene *AGT1* sob o controle do promotor *GPD* – vide Tabela 3.3 e JULES et al., 2004), as células da cepa BSY09 consumiram toda a maltotriose presente no meio em que foram inoculadas e produziram quantidades de etanol semelhantes às obtidas a partir da maltose (figuras 4.15 e 4.16). Contraditoriamente, Day et al. (2002b) transformaram uma cepa *mal⁻* – que continha, porém, o regulador *MAL63* – com um plasmídeo contendo o gene *MAL31* e verificaram que a mesma se tornou capaz de crescer em maltotriose. Por outro lado, a transformação da cepa BSY09 (que contém, além do gene *MAL21*, o *MAL31*) com o plasmídeo pJW4 (que possui o regulador *MAL63* – vide Tabela 3.3 e seção 4.1) não facilitou o consumo dessa fonte de carbono (dados não mostrados). Em virtude de os nossos resultados com a cepa 340-2B (seção 4.1) terem apontado que o regulador constitutivo *MAL63^c* tende a incrementar a fermentação de maltotriose, transformamos também a cepa BSY09 com o plasmídeo pJW5, porém, nem mesmo o regulador constitutivo presente nesse plasmídeo permitiu a utilização de maltotriose (figuras 4.15 e 4.16).

FIGURA 4.15: Utilização de maltose e maltotriose pela cepa BSY09 transformada com o plasmídeo pJW5 ou pGRSd-AGT1 em meio sintético. Crescimento celular (A, B), consumo de açúcares (C, D) e produção de etanol (E, F) pela cepa BSY09 transformada com o plasmídeo pJW5 (A, C, E) ou com o plasmídeo pGRSd-AGT1 (B, D, F) em meio sintético sem uracila contendo 2% de maltose (símbolos brancos) ou maltotriose (símbolos pretos) como fontes de carbono.

FIGURA 4.16: Utilização de maltotriose em meio rico pela cepa BSY09 transformada com o plasmídeo pJW5 ou pGRSd-AGT1. Crescimento celular (A), consumo de açúcares (B – à esquerda) e produção de etanol (B – à direita) pela cepa BSY09 transformada com o plasmídeo pJW5 (▲) ou com o plasmídeo pGRSd-AGT1 (△) em meio rico contendo 2% de maltotriose como fonte de carbono.

Interessantemente, verificou-se que a cepa BSY09 transformada com o plasmídeo pGRSd-AGT1 (que, em virtude de um promotor forte diante do *AGT1*, garante a sobre-expressão do mesmo) fermentou mais eficientemente a maltotriose que a sua cepa parental MC966A. Conforme pode ser observado nas figuras 4.12-B e 4.16, a cepa MC966A gerou mais biomassa e menos etanol a partir dessa fonte de carbono que a BSY09 após a transformação. Vale lembrar que a cepa MC966A possui um regulador induzível (*MAL23*) e, portanto, esses resultados, assim como os apresentados na seção 4.1, indicam que a expressão constitutiva ou a sobre-expressão da permease Agt1p tende a incrementar a fermentação de maltotriose. A mesma otimização, entretanto, não foi verificada quando a cepa LCM001 (que possui o regulador constitutivo *MAL43^Δ*) foi transformada com o plasmídeo pGRSd-AGT1 (que, conforme mencionado acima, possui um promotor forte regulando a expressão do *AGT1*), tendo em vista que tanto a eficiência de fermentação de

maltotriose da cepa parental (1403-7A) quanto a da LCM001 após a transformação foram similares, com rendimento ($Y_{e/s}$) em torno de 0,3 (dados não mostrados).

Em virtude dessa diferença de incremento no rendimento de etanol – entre as cepas BSY09 (*MAL* induzível) e LCM001 (*MAL* constitutiva) – e de os resultados apresentados na seção 4.1 terem demonstrado que a presença de um regulador *MAL* constitutivo aumenta a expressão da permease Agt1p, decidimos verificar se a adição de uma cópia extra do gene *AGT1* (tanto sob controle de um promotor forte quanto do seu promotor natural) seria capaz de aumentar a produção de etanol mesmo em células que já apresentem expressão constitutiva dos genes *MAL*. Para essa análise, escolhemos a cepa BSY021-34B, que contém o regulador constitutivo *MAL23-8^c* e que já possui, em seu genoma, uma cópia do gene *AGT1* (vide Tabela 3.1). Com isso, transformamos essa linhagem alternadamente com os plasmídeos pGRSd, pGRSd-*AGT1*, YCplac33 e pSA3.14 e, após as transformações, realizamos ensaios de fermentação em batelada em meio contendo extrato de malte (o qual apresenta em sua composição glicose, maltose e maltotriose em proporções similares ao mosto cervejeiro), conforme detalhado na seção 3.1. Os resultados assim obtidos (vide Figura 4.17) demonstram que a presença de uma nova cópia do *AGT1* nessa linhagem não proporcionou maior rendimento de etanol nem mesmo quando esse gene foi colocado diante de um promotor forte, o que garantiria a sua sobre-expressão. Conforme pode ser verificado na Figura 4.17, não houve diferença significativa na capacidade fermentativa das células transformadas tanto com os plasmídeos controle (pGRSd ou YCplac33, vide Tabela 3.1) quanto com os plasmídeos contendo o *AGT1* ora sob o controle de um promotor forte (pGRSd-*AGT1*) ora sob o controle do seu promotor natural (pSA3.14). Assim, nossos resultados sugerem que, em cepas *MAL* constitutivas, o aumento do número de cópias do gene *AGT1* ou a presença do mesmo diante de um promotor forte (como, nesse caso, o promotor *GPD*) não é capaz de aumentar a produção de etanol a partir da maltotriose.

FIGURA 4.17: Fermentação em batelada de 50 g/L de extrato de malte pela cepa BSY021-34B transformada com diferentes plasmídeos. Nos tempos indicados, amostras foram retiradas dos meios para a determinação da produção de etanol (azul-escuro) e da concentração celular (amarelo-escuro) durante a fermentação de 50 g/L de extrato de malte pela cepa BSY021-34B transformada, alternadamente, com os plasmídeos pGRSd (○), pGRSd-AGT1 (●), YCplac33 (△) e pSA3.14 (▲).

4.3 Análise da expressão dos genes *AGT1* e *MALx1*

Os resultados apresentados nas duas seções anteriores (seções 4.1 e 4.2) sugerem, através das análises de atividade e cinética de transporte, que a expressão do transportador Agt1p é maior em células metabolizando a maltotriose que em células metabolizando a maltose. Esses ensaios, no entanto, promovem apenas uma estimativa, de forma indireta, da expressão desses transportadores em células crescidas em meios contendo maltose ou maltotriose como fonte de carbono. Assim, no intuito de obtermos uma constatação direta dos níveis de expressão dessa permease diante dos α -glicosídeos em questão, quantificamos a expressão da proteína através de citometria de fluxo e a expressão relativa dos transcritos de mRNA do gene *AGT1* através de RT-PCR quantitativo em tempo real (QRT-PCR).

A avaliação através de citometria de fluxo exigiu, inicialmente, que fusionássemos a proteína verde fluorescente (GFP) à extremidade C-terminal da permease Agt1p, conforme detalhado na seção 3.4. Ao realizarmos essa fusão na cepa 340-2B, demos origem à linhagem 340-GFP (vide Figura 4.18), a qual foi posteriormente transformada com o plasmídeo pJW5 (que contém o regulador *MAL63⁶*) no intuito de permitir a expressão do gene *AGT1*. Com isso, nos ensaios de citometria de fluxo (vide Figura 4.19), conseguimos avaliar o grau de contribuição da maltose e da maltotriose para a indução da permease Agt1p, uma vez que a quantidade de fluorescência verde emitida pelas células é diretamente proporcional ao nível de expressão desse transportador.

FIGURA 4.18: Confirmação da fusão *AGT1-GFP* na cepa 340-2B. Conforme descrito na seção 3.4, o DNA genômico da cepa 340-2B (linhas 1 e 4) e o da sua isogênica 340-GFP (linhas 2 e 3) foram analisados, através de PCR, para a verificação da presença da fusão em questão (M, λ /HindIII+EcoRI; linhas 1 e 2, resultado da reação realizada com os primers AGT1-F e AGT1-R; linhas 3 e 4, resultado da reação realizada com os primers AGT1-R504A-F e V-kan^r-R, que confirmou a fusão *AGT1-GFP*). Os produtos de PCR estão mostrados em gel de agarose 1%. Os números ao lado do gel indicam o tamanho dos produtos amplificados.

Após a fusão, a cepa criada foi crescida até o início da sua fase exponencial de crescimento em meios sintético e rico contendo 2% de maltose ou maltotriose como fonte de carbono. Em seguida, as suas células foram coletadas e injetadas no FACS no intuito de quantificar a expressão do transportador Agt1p. Em meio sintético, embora tenha sido observada uma expressão levemente superior da permease Agt1p em células crescidas em maltotriose, percebemos um maior número de células com grau intermediário de fluorescência verde durante a metabolização da maltose. Vale ressaltar que essa fluorescência intermediária observada é também correspondente à expressão do transportador em questão, pois o valor obtido para a mesma (quantificada pelo FACS) é superior à da amostra utilizada como branco. Em meio rico, contudo, verificou-se uma vantagem muito sutil da expressão desse transportador em células crescidas em maltose (vide Figura 4.19). Esses resultados, portanto, sugerem não haver diferença no grau de indução do gene *AGT1* pela maltose ou pela maltotriose.

A expressão do gene *AGT1* também foi avaliada através de QRT-PCR pela quantificação relativa de seus transcritos de mRNA (vide detalhes na seção 3.9). Com essa análise, também tínhamos o intuito de avaliar o grau de contribuição da maltose e da maltotriose para a expressão desse gene. Assim, as cepas CEN.PK2-1C, 1403-7A e MC966A foram crescidas em meios ricos contendo glicose, maltose ou maltotriose como fontes de carbono e as suas células foram coletadas no meio da fase exponencial de crescimento para subsequente extração de RNA. Ao avaliarmos as cepas *MAL* constitutivas (CEN.PK2-1C e 1403-7A), verificamos que as células crescidas em maltotriose apresentaram níveis de expressão do *AGT1* similares aos das células crescidas em maltose (vide figuras 4.20 e 4.21). Essa similaridade, no entanto, não foi observada com a cepa *MAL* induzível MC966A. Para essa linhagem, a expressão do gene *AGT1* em células que metabolizavam a maltose foi quatro vezes superior a das células que metabolizavam a maltotriose (Figura 4.22). Esses dados ainda demonstram que a cepa 1403-7A apresenta o maior nível de expressão desse gene e que a cepa MC966A apresenta o menor entre as três cepas analisadas.

FIGURA 4.19: Expressão da permease Agt1p em meios contendo maltose ou maltotriose como fontes de carbono. (A-F) *Dotplots* do volume das células em função da fluorescência emitida. (G,H) Histogramas do número de eventos em função da fluorescência emitida. (A,B) Branco. Após atingirem a fase exponencial de crescimento, as células da cepa 340-GFP, crescidas em meio sintético (C,E,G) e em meio rico (D,F,H) contendo maltotriose (C,D) ou maltose (E,F) como fontes de carbono, foram analisadas em FACS. Nos *Dotplots*, as células selecionadas na região 1, para análise em histogramas, estão representadas em vermelho (vide seção 3.8). Nos histogramas (G,H), o Branco está representado em preto e as células crescidas em meios contendo maltotriose ou maltose como fontes de carbono estão representadas, respectivamente, em vermelho e verde.

No intuito de avaliar a contribuição desses açúcares para a expressão dos transportadores codificados pelos genes *MALx1*, analisamos também os níveis dos transcritos de mRNA desses genes em cada cepa. Assim como observado para a expressão do gene *AGT1*, as cepas *MAL* constitutivas CEN.PK2-1C e 1403-7A apresentaram níveis semelhantes de expressão dos genes *MALx1* ao serem comparadas células crescidas em maltose e maltotriose (figuras 4.20 e 4.21). Do mesmo modo, essa semelhança não foi observada com a cepa *MAL* induzível MC966A, que apresentou expressão dos genes *MALx1* três vezes superior em células que metabolizavam a maltose (Figura 4.22).

Apesar de ter sido verificado na linhagem *MAL* induzível MC966A que a maltose induz mais fortemente a expressão dos genes *AGT1* e *MALx1* que a maltotriose, os resultados que obtivemos com as cepas *MAL* constitutivas estão em concordância com os dados obtidos com a citometria de fluxo, uma vez que demonstram não haver diferença no grau de indução desses genes durante o metabolismo da maltose e da maltotriose.

FIGURA 4.20: Expressão relativa dos genes *AGT1* e *MALx1* nas cepas CEN.PK2-1C e LCM003. Ao atingirem o meio de sua fase exponencial de crescimento em meio rico contendo diferentes fontes de carbono (vide quadro superior à direita da figura), as células foram coletadas para extração de RNA. Os valores apresentados no eixo Y representam uma quantificação relativa da expressão dos genes *AGT1* e *MALx1*. Esses valores foram obtidos com o quociente da quantidade de mRNA transcrito a partir desses genes pela quantidade de mRNA transcrito a partir do gene *ACT1* em cada amostra.

FIGURA 4.21: Expressão relativa dos genes *AGT1* e *MALx1* nas cepas 1403-7A e LCM001. Ao atingirem o meio de sua fase exponencial de crescimento em meio rico contendo diferentes fontes de carbono (vide quadro superior à direita da figura), as células foram coletadas para extração de RNA. Os valores apresentados no eixo Y representam uma quantificação relativa da expressão dos genes *AGT1* e *MALx1*. Esses valores foram obtidos com o quociente da quantidade de mRNA transcrito a partir desses genes pela quantidade de mRNA transcrito a partir do gene *ACT1* em cada amostra.

FIGURA 4.22: Expressão relativa dos genes *AGT1* e *MALx1* nas cepas MC966A e BSY09. Ao atingirem o meio de sua fase exponencial de crescimento em meio rico contendo diferentes fontes de carbono (vide quadro superior à direita da figura), as células foram coletadas para extração de RNA. Os valores apresentados no eixo Y representam uma quantificação relativa da expressão dos genes *AGT1* e *MALx1*. Esses valores foram obtidos com o quociente da quantidade de mRNA transcrito a partir desses genes pela quantidade de mRNA transcrito a partir do gene *ACT1* em cada amostra.

A análise da expressão desses genes em células crescidas em glicose revelou dados interessantes, uma vez que demonstram, claramente, existir diferenças no grau de susceptibilidade de cada cepa à repressão provocada pela glicose. As figuras 4.20, 4.21 e 4.22 demonstram que enquanto as cepas CEN.PK2-1C e MC966A têm a expressão dos seus genes *AGT1* e *MALx1* reprimida, total ou parcialmente, pela presença da glicose, a cepa 1403-7A não apresenta problemas para expressar os genes em questão diante dessa hexose.

As linhagens *agt1Δ* derivadas das cepas CEN.PK2-1C, 1403-7A e MC966A também tiveram seu RNA extraído a partir de células crescidas em maltose. Conforme pode ser verificado nas figuras 4.20, 4.21 e 4.22, essas linhagens apresentaram os mesmos níveis de expressão dos genes *MALx1* que suas cepas parentais crescidas na mesma fonte de carbono (maltose). Também, conforme esperado, não foi verificada expressão do gene *AGT1* nas linhagens *agt1Δ*.

4.4 Utilização de maltotriose por cepas industriais

No intuito de avaliarmos de maneira global a capacidade de utilização da maltotriose em cepas industriais, realizamos cultivo em micro-escala (vide seções 3.1, 3.2 e Tabela 3.1) de 9 linhagens diferentes, divididas em 3 grupos de acordo com a aplicação industrial das mesmas: grupo 1, composto por três cepas de cervejaria (sendo uma do tipo *ale*, portanto exemplar da espécie *S. cerevisiae*, e duas do tipo *lager*, portanto membros da espécie *S. pastorianus*); grupo 2, composto por três cepas de panificação; e, grupo 3, composto por três linhagens utilizadas na produção de etanol combustível. Com essa avaliação inicial de crescimento celular, conseguimos observar fenótipos distintos de utilização de maltotriose entre as cepas analisadas (vide Figura 4.23).

Conforme pode ser observado na Figura 4.23, as cepas dos grupos 1 (B01, LBCC-L52 e W-34/70) e 2 (G13, G14 e G15) – que são empregadas em setores industriais onde a maltose e a maltotriose são os principais substratos a serem fermentados (GIBSON et al., 2007; PONTE e REED, 1982 *apud* HIGGINS et al. 1999a; WILLAERT, 2001) – apresentaram crescimento celular igualmente rápido em meios contendo alternadamente essas fontes de carbono e atingiram a fase estacionária em, no máximo, 17 h após o inóculo. Isso indica que essas seis linhagens utilizam ambos os açúcares com eficiência semelhante. As cepas que

compõem o grupo 3 (CAT-1, PE-2 e VR-1), por sua vez, também cresceram rapidamente em maltose, no entanto, ao avaliarmos o crescimento das mesmas em maltotriose, verificamos um fenótipo distinto do observado nas cepas que compõem os outros dois grupos. As linhagens CAT-1, PE-2 e VR-1 (utilizadas na produção de etanol combustível) apresentaram, em comparação com os seus crescimentos em maltose, um atraso de, pelo menos, 20 h para o início da sua fase exponencial de crescimento em maltotriose. Esse fato aponta certa dificuldade para essas cepas utilizarem especificamente a maltotriose como fonte de carbono, haja vista que a utilização de maltose por essas cepas foi tão eficiente quanto a das outras seis linhagens industriais testadas (Figura 4.23).

Na tentativa de elucidarmos o que gera esse fenótipo distinto das cepas CAT-1, PE-2 e VR-1, investigamos a presença dos genes que codificam os transportadores Agt1p e Malx1p no genoma das mesmas. Para isso, separamos os cromossomos dessas linhagens através de PFGE e os transferimos para uma membrana de Nylon de modo a realizarmos um *Southern Blotting* com sonda para o gene *AGT1* e um *Southern Blotting* com sonda para os genes *MALx1*. Com isso, pudemos verificar que a cepa PE-2 possui os alelos *MAL11*, *MAL31* e *MAL41* em seu genoma, enquanto as cepas CAT-1 e VR-1 possuem apenas os alelos *MAL11* e *MAL31*. Com relação à presença do *AGT1*, verificamos que, dentre essas três linhagens, apenas a cepa VR-1 não possui esse gene (Figura 4.24). Esse resultado se mostrou bastante intrigante, uma vez que os dados apresentados na seção 4.2 demonstram que cepas capazes de crescer rapidamente em maltotriose perdem essa capacidade ao terem o gene *AGT1* deletado. É importante ressaltar que um possível problema na hidrólise de maltotriose pelas α -glicosidases das cepas CAT-1, PE-2 e VR-1 deve ser descartado em virtude de já ter sido demonstrado que a maltose e a maltotriose compartilham as mesmas isoformas dessas enzimas (TABATA et al., 1984; ZASTROW et al., 2001) e de o crescimento celular dessas cepas em maltose ter sido tão rápido quanto o das cepas dos grupos 1 e 2. Portanto, as α -glicosidases presentes nessas linhagens, além de serem expressas, se mostram funcionais.

Os resultados apresentados na Figura 4.24 ainda sugerem que as cepas CAT-1 e PE-2 possuem apenas uma cópia do gene *AGT1*, tendo em vista que as mesmas possuem também uma cópia do alelo *MALx1* (ambos localizados no cromossomo VII – locus *MAL1* – vide HAN et al., 1995). Assim, um dos cromossomos VII dessas linhagens possui o gene *AGT1* e o outro o gene *MALx1*.

FIGURA 4.23: Crescimento celular em micro-escala de diferentes cepas industriais em maltose e em maltotriose. Após serem pré-crescidas em maltose, as células das cepas industriais acima foram inoculadas em 100 μ L de meio rico contendo 2% de maltose ou maltotriose como fonte de carbono.

FIGURA 4.24: Verificação da presença do gene *AGT1* e dos genes *MALx1* nas cepas analisadas. Os cromossomos das cepas CAT-1, PE-2 e VR-1 foram inicialmente separados através de PFGE e posteriormente transferidos para uma membrana de Nylon para serem hibridizados com sondas para o gene *AGT1* (A) e para os genes *MALx1* (B). Os cromossomos contendo os genes *AGT1*, *MAL11*, *MAL31* e *MAL41* estão indicados à esquerda da parte A e à direita da parte B.

Uma nova confirmação do crescimento tardio das cepas CAT-1, PE-2 e VR-1 foi obtida ao analisarmos o crescimento das mesmas em frascos Erlenmeyer durante 200 h de incubação. Esse ensaio (assim como os que geraram alguns dos resultados apresentados nas seções 4.1 e 4.2) permitiu a retirada de amostras nos tempos estabelecidos para a dosagem da produção de etanol durante o crescimento das células. Desse modo, verificamos que, mesmo após iniciarem o crescimento exponencial (que ocorreu após 100-120 h de incubação), não houve produção de etanol pelas células das cepas PE-2 e VR-1, demonstrando que o açúcar utilizado foi completamente oxidado pela respiração celular. A cepa CAT-1, de maneira um pouco diferente, fermentou parte do açúcar presente no meio, porém, em virtude da pequena quantidade de etanol produzida diante de 20 g/L de maltotriose, percebe-se que parte do açúcar também foi metabolizado através da respiração celular (Figura 4.25).

A presença do gene *AGT1* nas linhagens CAT-1 e PE-2 e o fenótipo de crescimento tardio de ambas com pouca ou nenhuma produção de etanol pelas células se mostrou, inicialmente, incompatível com os resultados apresentados nas seções 4.1 e 4.2. Assim, decidimos seqüenciar o *AGT1* das cepas CAT-1 e PE-2 no intuito de investigar se haveria alguma mutação no alelo presente nessas linhagens que pudesse provocar a perda de funcionalidade da permease codificada. Além disso, como comparação, seqüenciamos também o alelo presente nas cepas de laboratório CEN.PK2-1C e MC966A (vistas como boas fermentadoras de maltotriose). Esses quatro seqüenciamentos realizados nos permitiram verificar que o alelo presente na cepa CAT-1 é idêntico ao da PE-2, assim como o alelo das cepas de laboratório são idênticos entre si e idênticos ao da cepa S288C, a qual já foi inteiramente seqüenciada (vide www.yeastgenome.org). Curiosamente, ao alinharmos essas quatro seqüências com seqüências de alelos do gene *AGT1* previamente publicadas por Smit et al. (2007) e Vidgren et al. (2005), verificamos ainda que todas as mutações observadas na permease Agt1p presente nas cepas CAT-1 e PE-2 já foram encontradas, alternadamente, nas permeases Agt1p funcionais seqüenciadas por esses autores, o que sugere, em princípio, que o *AGT1* da CAT-1 e da PE-2 pode codificar uma proteína capaz de transportar a maltotriose (Figura 4.26). Por outro lado, vale ressaltar que, apesar de as mutações já terem sido encontradas em alelos que codificam permeases funcionais, o seqüenciamento por si só não permite descartar a hipótese de perda de funcionalidade desse transportador em virtude da combinação das mutações presentes.

FIGURA 4.25: Perfis de crescimento celular e produção de etanol das cepas CAT-1, PE-2 e VR-1 em maltotriose. Após serem pré-crescidas em maltose, as células das cepas CAT-1, PE-2 e VR-1 foram inoculadas em meio rico contendo 2% de maltotriose como fonte de carbono. Nos tempos indicados, amostras foram retiradas para determinação do crescimento celular (painel esquerdo) e da produção de etanol (painel direito).

Ao mesmo tempo em que investigávamos a possibilidade de essas linhagens conterem alelos do *AGT1* que codificassem permeases funcionais, observamos que a região correspondente à sequência UAS_{MAL} do locus *mal1g* descrito (HAN et al., 1995) não está presente no locus *mal1g* dessas cepas. Essa observação se deu ao tentarmos amplificar a região promotora desse gene para um subsequente seqüenciamento. A Figura 4.27 apresenta um esquema de uma série de testes realizados através de PCR com diferentes combinações de pares de primers que nos permitiu verificar a ausência da sequência UAS_{MAL} conhecida (HAN et al., 1995) e da região a montante a essa sequência no locus *mal1g* das linhagens CAT-1 e PE-2. Em contrapartida, vale ressaltar que esses mesmos testes permitiram confirmar a presença da região promotora, previamente conhecida, em todas as cepas de laboratório analisadas neste trabalho, tendo em vista a obtenção de produtos com tamanho esperado utilizando-se todas as combinações de pares de primers apresentadas (Figura 4.27).


```

AGT1_IFO2043      MKNIISLVSKKKAASKNEDKNISESSRDIVNQVEVFNTENFEEGKKDSAFELDHLEFTTN 60
AGT1_IFO2252      MKNIISLVSKKKAASKNEDKNISESSRDIVNQVEVFNTENFEEGKKDSAFELDHLEFTTN 60
AGT1_A60          MKNIISLVSKKKAASKNEDKNISESSRDIVNQVEVFNTENFEEGRKDSAFELDHLEFTTN 60
AGT1_A179        MKNIISLVSKKKAASKNEDKNISESSRDIVNQVEVFNTENFEEGRKDSAFELDHLEFTTN 60
AGT1_WH310       MKNIISLVSKKKAASKNEDKNISESSRDIVNQVEVFNTENFEEGKKDSAFELDHLEFTTN 60
AGT1_CAT1        MKNIISLVSKKKAASKNEDKNISESSRDIVNQVEVFNTENFEEGKKDSAFELDHLEFTTN 60
AGT1_PE2         MKNIISLVSKKKAASKNEDKNISESSRDIVNQVEVFNTENFEEGKKDSAFELDHLEFTTN 60
AGT1_S288C       MKNIISLVSKKKAASKNEDKNISESSRDIVNQVEVFNTEDFEEGKKDSAFELDHLEFTTN 60
AGT1_CEN.PK2-1C  MKNIISLVSKKKAASKNEDKNISESSRDIVNQVEVFNTEDFEEGKKDSAFELDHLEFTTN 60
AGT1_MC966A      MKNIISLVSKKKAASKNEDKNISESSRDIVNQVEVFNTEDFEEGKKDSAFELDHLEFTTN 60
AGT1             MKNIISLVSKKKAASKNEDKNISESSRDIVNQVEVFNTEDFEEGKKDSAFELDHLEFTTN 60
AGT1_IFO0304     MKNIISLVSKKKAASKNEDKNISESSRDIVNQVEVFNTEDFEEGKKDSAFELDHLEFTTN 60
*****:*****

AGT1_IFO2043      SAQLGDSDEDNENVINETNTTDDANEANSEKSMTLKQALLIYPKAALWSILVSTTLVME 120
AGT1_IFO2252      SAQLGDSDEDNENVINEMNATDDANEANSEKSMTLKQALLKYPKAALWSILVSTTLVME 120
AGT1_A60          SAQLGDSDEDNENVINETNTTDDANEANSEKSMTLKQALLIYPKAALWSILVSTTLVME 120
AGT1_A179        SAQLGDSDEDNENVINETNTTDDANEANSEKSMTLKQALLIYPKAALWSILVSTTLVME 120
AGT1_WH310       SAQLGDSDEDNENVINETNTTDDANEANSEKSMTLKQALLIYPKAALWSILVSTTLVME 120
AGT1_CAT1        SAQLGDSDEDNENVINETNATDDANEANSEKSMTLKQALLIYPKAALWSILVSTTLVME 120
AGT1_PE2         SAQLGDSDEDNENVINETNATDDANEANSEKSMTLKQALLIYPKAALWSILVSTTLVME 120
AGT1_S288C       SAQLGDSDEDNENVINEMNATDDANEANSEKSMTLKQALLKYPKAALWSILVSTTLVME 120
AGT1_CEN.PK2-1C  SAQLGDSDEDNENVINEMNATDDANEANSEKSMTLKQALLKYPKAALWSILVSTTLVME 120
AGT1_MC966A      SAQLGDSDEDNENVINEMNATDDANEANSEKSMTLKQALLKYPKAALWSILVSTTLVME 120
AGT1             SAQLGDSDEDNENVINEMNATDDANEANSEKSMTLKQALLKYPKAALWSILVSTTLVME 120
AGT1_IFO0304     SAQLGDSDEDNENVINEMNATDDANEANSEKSMTLKQALLKYPKAALWSILVSTTLVME 120
*****:*****

AGT1_IFO2043      GYDTALLNLYALPVFQRKFGTLNGEYSYEITSQWQIGLNMVCVQCCEMIGLQITPYMVEF 180
AGT1_IFO2252      GYDTALLNLYALPVFQRKFGTLNGEYSYEITSQWQIGLNMVCVQCCEMIGLQITPYMVEF 180
AGT1_A60          GYDTALLNLYALPVFQRKFGTLNGEYSYEITSQWQIGLNMVCVQCCEIIGLQITPYMVEF 180
AGT1_A179        GYDTALLNLYALPVFQRKFGTLNGEYSYEITSQWQIGLNMVCVQCCEIIGLQITPYMVEF 180
AGT1_WH310       GYDTALLNLYALPVFQRKFGTLNGEYSYEITSQWQIGLNMVCVQCCEMIGLQITPYMVEF 180
AGT1_CAT1        GYDTALLNLYALPVFQRKFGTLNGEYSYEITSQWQIGLNMVCVQCCEMIGLQITPYMVEF 180
AGT1_PE2         GYDTALLNLYALPVFQRKFGTLNGEYSYEITSQWQIGLNMVCVQCCEMIGLQITPYMVEF 180
AGT1_S288C       GYDTALLSALYALPVFQRKFGTLNGEYSYEITSQWQIGLNMVCVLCCEMIGLQITTYMVEF 180
AGT1_CEN.PK2-1C  GYDTALLSALYALPVFQRKFGTLNGEYSYEITSQWQIGLNMVCVLCCEMIGLQITTYMVEF 180
AGT1_MC966A      GYDTALLSALYALPVFQRKFGTLNGEYSYEITSQWQIGLNMVCVLCCEMIGLQITTYMVEF 180
AGT1             GYDTALLSALYALPVFQRKFGTLNGEYSYEITSQWQIGLNMVCVLCCEMIGLQITTYMVEF 180
AGT1_IFO0304     GYDTALLSALYALPVFQRKFGTLNGEYSYEITSQWQIGLNMVCVLCCEMIGLQITTYMVEF 180
*****:*****

```

FIGURA 4.26: Alinhamento de doze diferentes seqüências da permease Agt1p (continua). A procedência de cada seqüência analisada encontra-se à esquerda da figura. A procedência assinalada em azul corresponde à seqüência presente na base de dados “*Saccharomyces* Genome Database” (disponível em www.yeastgenome.org) e a assinalada em verde corresponde à primeira seqüência publicada da permease Agt1p (HAN et al., 1995). Em preto, estão as obtidas através da ferramenta NCBI-BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast) e as publicadas por Smit et al. (2008) e Vidgren et al. (2005). As procedências assinaladas em vermelho correspondem às seqüências que obtivemos. Para realizar o alinhamento, foi utilizado o programa de computador ClustalW (disponível em www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html).


```

AGT1_IFO2043      MGNRYTMITALGLLTAYIFILYYCKSLAMIAVGQVLSAMPWGCFOGLTVTYASEVCPLAL 240
AGT1_IFO2252      MGNRYTMITALGLLTAYIFILYYCKSLAMIAVGQVLSAMPWGCFOGLTVTYASEVCPLAL 240
AGT1_A60          MGNRYTMITALGLLTAYVFILYYCKSLAMIAVGQVLSAMPWGCFOGLTVTYASEVCPLAL 240
AGT1_A179         MGNRYTMITALGLLTAYVFILYYCKSLAMIAVGQVLSAMPWGCFOGLTVTYASEVCPLAL 240
AGT1_WH310        MGNRYTMITALGLLTAYVFILYYCKSLAMIAVGQVLSAMPWGCFOGLTVTYASEVCPLAL 240
AGT1_CAT1         MGNRYTMITALGLLTAYIFILYYCKSLAMIAVGQVLSAMPWGCFOGLTVTYASEVCPLAL 240
AGT1_PE2          MGNRYTMITALGLLTAYIFILYYCKSLAMIAVGQVLSAMPWGCFOGLTVTYASEVCPLAL 240
AGT1_S288C        MGNRYTMITALGLLTAYIFILYYCKSLAMIAVGQILSAIPWGCFOGLTAVTYASEVCPLAL 240
AGT1_CEN.PK2-1C   MGNRYTMITALGLLTAYIFILYYCKSLAMIAVGQILSAIPWGCFOGLTAVTYASEVCPLAL 240
AGT1_MC966A       MGNRYTMITALGLLTAYIFILYYCKSLAMIAVGQILSAIPWGCFOGLTAVTYASEVCPLAL 240
AGT1              MGNRYTMITALGLLTAYIFILYYCKSLAMIAVGQILSAIPWGCFOGLTAVTYASEVCPLAL 240
AGT1_IFO0304      MGNRYTMITALGLLTAYIFILYYCKSLAMIAMGQVLSAMPWGCFOGLTAVTYASEVCPLAL 240
*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****

AGT1_IFO2043      RYYMTSYSNICWLFQGFASGIMKNSQENLGNSDLGYKLPPFALQWIWPAPLMIGIFFAPE 300
AGT1_IFO2252      RYYMTSYSNICWLFQGFASGIMKNSQENLGNSDLGYKLPPFALQWIWPAPLMIGIFFAPE 300
AGT1_A60          RYYMTSYSNICWLFQGFASGIMKNSQENLGNSDLGYKLPPFALQWIWPAPLMIGIFFAPE 300
AGT1_A179         RYYMTSYSNICWLFQGFASGIMKNSQENLGNSDLGYKLPPFALQWIWPAPLMIGIFFAPE 300
AGT1_WH310        RYYMTSYSNICWLFQGFASGIMKNSQENLGNSDLGYKLPPFALQWIWPAPLMIGIFFAPE 300
AGT1_CAT1         RYYMTSYSNICWLFQGFASGIMKNSQENLGNSDLGYKLPPFALQWIWPAPLMIGIFFAPE 300
AGT1_PE2          RYYMTSYSNICWLFQGFASGIMKNSQENLGNSDLGYKLPPFALQWIWPAPLMIGIFFAPE 300
AGT1_S288C        RYYMTSYSNICWLFQGFASGIMKNSQENLGNSDLGYKLPPFALQWIWPAPLMIGIFFAPE 300
AGT1_CEN.PK2-1C   RYYMTSYSNICWLFQGFASGIMKNSQENLGNSDLGYKLPPFALQWIWPAPLMIGIFFAPE 300
AGT1_MC966A       RYYMTSYSNICWLFQGFASGIMKNSQENLGNSDLGYKLPPFALQWIWPAPLMIGIFFAPE 300
AGT1              RYYMTSYSNICWLFQGFASGIMKNSQENLGNSDLGYKLPPFALQWIWPAPLMIGIFFAPE 300
AGT1_IFO0304      RYYMTSYSNICWLFQGFASGIMKNSQENLGNSDLGYKLPPFALQWIWPAPLMIGIFFAPE 300
*****:*****:*****:*****:*****:*****

AGT1_IFO2043      SPWWLVRKDRVAEARKSLSRILSGKGAEKDIQVDLTCLKIELTIEKERLLASKSGSFFDC 360
AGT1_IFO2252      SPWWLVRKDRVAEARKSLSRILSGKGAEKDIQIDVTLKIELTIEKERLLASKSGSFFDC 360
AGT1_A60          SPWWLVRKDRVAEARKSLSRILSGKGAEKDIQIDLTCLKIELTIEKERLLASKSGSFFDC 360
AGT1_A179         SPWWLVRKDRVAEARKSLSRILSGKGAEKDIQIDLTCLKIELTIEKERLLASKSGSFFDC 360
AGT1_WH310        SPWWLVRKDRVAEARKSLSRILSGKGAEKDIQIDLTCLKIELTIEKERLLASKSGSFFDC 360
AGT1_CAT1         SPWWLVRKDRVAEARKSLSRILSGKGAEKDIQIDLTCLKIELTIEKERLLASKSGSFFDC 360
AGT1_PE2          SPWWLVRKDRVAEARKSLSRILSGKGAEKDIQIDLTCLKIELTIEKERLLASKSGSFFDC 360
AGT1_S288C        SPWWLVRKDRVAEARKSLSRILSGKGAEKDIQVDLTCLKIELTIEKERLLASKSGSFFNC 360
AGT1_CEN.PK2-1C   SPWWLVRKDRVAEARKSLSRILSGKGAEKDIQVDLTCLKIELTIEKERLLASKSGSFFNC 360
AGT1_MC966A       SPWWLVRKDRVAEARKSLSRILSGKGAEKDIQVDLTCLKIELTIEKERLLASKSGSFFNC 360
AGT1              SPWWLVRKDRVAEARKSLSRILSGKGAEKDIQVDLTCLKIELTIEKERLLASKSGSFFNC 360
AGT1_IFO0304      WPWWLVRKDRVAEARKSLSRILSGKGAEKDIQVDLTCLKIELTIEKERLLASKSGSFFNC 360
*****:*****:*****:*****:*****:*****

AGT1_IFO2043      FKGVNRRRLACLWVAQNTSGACLLGYSTYFFER-AGMATDKAFTFSVIQYCLGLAGT 419
AGT1_IFO2252      FKGVNRRRLACLWVAQNTSGACLLGYSTYFFER-AGMATDKAFTFSVIQYCLGLAGT 419
AGT1_A60          FKGVNRRRLACLWVAQNTSGACLLGYSTYFFER-AGMATDKAFTFSVIQYCLGLAGT 419
AGT1_A179         FKGVNRRRLACLWVAQNTSGACLLGYSTYFFER-AGMATDKAFTFSVIQYCLGLAGT 419
AGT1_WH310        FKGVNRRRLACLWVAQNTSGACLLGYSTYFFER-AGMATDKAFTFSVIQYCLGLAGT 419
AGT1_CAT1         FKGVNRRRLACLWVAQNTSGACLLGYSTYFFER-AGMATDKAFTFSVIQYCLGLAGT 419
AGT1_PE2          FKGVNRRRLACLWVAQNTSGACLLGYSTYFFER-AGMATDKAFTFSVIQYCLGLAGT 419
AGT1_S288C        FKGVNRRRLACLWVAQNTSGACLLGYSTYFFER-AGMATDKAFTFSVIQYCLGLAGT 419
AGT1_CEN.PK2-1C   FKGVNRRRLACLWVAQNTSGACLLGYSTYFFER-AGMATDKAFTFSVIQYCLGLAGT 419
AGT1_MC966A       FKGVNRRRLACLWVAQNTSGACLLGYSTYFFER-AGMATDKAFTFSVIQYCLGLAGT 419
AGT1              FKGVNRRRLACLWVAQNTSGACLLGYSTYFFER-AGMATDKAFTFSVIQYCLGLAGT 419
AGT1_IFO0304      FKGVNRRRLACLWVAQNTSGACLLGYSTYFFER-AGMATDKAFTFSVIQYCLGLAGT 419
*****:*****:*****:*****:*****:*****

```

FIGURA 4.26: Continuação.


```

AGT1_IFO2043      LCSWVISGRVGRWTILTYGLAFQMVCLFIIIGMGFGSGSGASNGAGGLLLLALSFFYNAGI 479
AGT1_IFO2252      LCSWVISGRVGRWTILTYGLAFQMVCLFVIIGMGFGSGSGASNGAGGLLLLALSFFYNAGI 479
AGT1_A60          LCSWVISGRVGRWTILTYGLAFQMVCLFVIIGMGFGSGSGASNGAGGLLLLALSFFYNAGI 479
AGT1_A179        LCSWVISGRVGRWTILTYGLAFQMVCLFIIIGMGFGSGSGASNGAGGLLLLALSFFYNAGI 479
AGT1_WH310       LCSWVISGRVGRWTILTYGLAFQMVCLFIIIGMGFGSGSGASNGAGGLLLLALSFFYNAGI 479
AGT1_CAT1        LCSWVISGRVGRWTILTYGLAFQMVCLFVIIGMGFGSGSGASNGAGGLLLLALSFFYNAGI 479
AGT1_PE2         LCSWVISGRVGRWTILTYGLAFQMVCLFVIIGMGFGSGSGASNGAGGLLLLALSFFYNAGI 479
AGT1_S288C       LCSWVISGRVGRWTILTYGLAFQMVCLFIIIGMGFGSGSSASNGAGGLLLLALSFFYNAGI 479
AGT1_CEN.PK2-1C  LCSWVISGRVGRWTILTYGLAFQMVCLFIIIGMGFGSGSSASNGAGGLLLLALSFFYNAGI 479
AGT1_MC966A      LCSWVISGRVGRWTILTYGLAFQMVCLFIIIGMGFGSGSSASNGAGGLLLLALSFFYNAGI 479
AGT1             LCSWVISGRVGRWTILTYGLAFQMVCLFIIIGMGFGSGSSASNGAGGLLLLALSFFYNAGI 480
AGT1_IFO0304     LCSWVISGRVGRWTILTYGLAFQMVCLFIIIGMGFGSGSSASNGAGGLLLLALSFFYNAGI 479
*****:*****

AGT1_IFO2043      GAVVYICIVTEIPSAELRTKTIVLARICYNIMAVINAILTPYMLNVSDWNWGAKTGLYWGG 539
AGT1_IFO2252      GAVVYICIVTEIPSAELRTKTIVLARICYNIMAVINAILTPYMLNVSDWNWGAKTGLYWGG 539
AGT1_A60          GAVVYICIVTEIPSAELRTKTIVLARICYNLMAVINAILTPYMLNVSDWNWGAKTGLYWGG 539
AGT1_A179        GAVVYICIVTEIPSAELRTKTIVLARICYNIMAVINAILTPYMLNVSDWNWGAKTGLYWGG 539
AGT1_WH310       GAVVYICIVTEIPSAELRTKTIVLARTCYNIMAVINAILTPYMLNVSDWNWGAKTGLYWGG 539
AGT1_CAT1        GAVVYICIVTEIPSAELRTKTIVLARICYNIMAVINAILTPYMLNVSDWNWGAKTGLYWGG 539
AGT1_PE2         GAVVYICIVTEIPSAELRTKTIVLARICYNIMAVINAILTPYMLNVSDWNWGAKTGLYWGG 539
AGT1_S288C       GAVVYICIVAEIPSAELRTKTIVLARICYNLMAVINAILTPYMLNVSDWNWGAKTGLYWGG 539
AGT1_CEN.PK2-1C  GAVVYICIVAEIPSAELRTKTIVLARICYNLMAVINAILTPYMLNVSDWNWGAKTGLYWGG 539
AGT1_MC966A      GAVVYICIVAEIPSAELRTKTIVLARICYNLMAVINAILTPYMLNVSDWNWGAKTGLYWGG 539
AGT1             GAVVYICIVAEIPSAELRTKTIVLARICYNLMAVINAILTPYMLNVSDWNWGAKTGLYWGG 540
AGT1_IFO0304     GAVVYICIVAEIPSAELRTKTIVLARICYNLMAVINAILTPYMLNVSDWNWGAKTGLYWGG 539
*****:*****

AGT1_IFO2043      FTAVTLAWVIIDLPETTGRITFSEINELFNQGVPAKFASTVVDPPFGKGKTQHDSLDAESI 599
AGT1_IFO2252      FTAVTLAWVIIDLPETSGRTFSEINELFNQGVPAKFASTVVDPPFGKGKTQHDSLDAESI 599
AGT1_A60          FTAVTLAWAIIDLPETTGRITFSEINELFNQGVPAKFASTVVDPPFGKGKTQHDSLDAESI 599
AGT1_A179        FTAVTLAWVIIDLPETSGRTFSEINELFNQGVPAKFASTVVDPPFGKGKTQHDSLDAESI 599
AGT1_WH310       FTAVTLAWVIIDLPETSGRTFSEINELFNQGVPAKFASTVVDPPFGKGKTQHDSLDAESI 599
AGT1_CAT1        FTAVTLAWVIIDLPETSGRTFSEINELFNQGVPAKFASTVVDPPFGKGKTQHDSLDAESI 599
AGT1_PE2         FTAVTLAWVIIDLPETSGRTFSEINELFNQGVPAKFASTVVDPPFGKGKTQHDSLDAESI 599
AGT1_S288C       FTAVTLAWVIIDLPETTGRITFSEINELFNQGVPAKFASTVVDPPFGKGKTQHDSLDAESI 599
AGT1_CEN.PK2-1C  FTAVTLAWVIIDLPETTGRITFSEINELFNQGVPAKFASTVVDPPFGKGKTQHDSLDAESI 599
AGT1_MC966A      FTAVTLAWVIIDLPETTGRITFSEINELFNQGVPAKFASTVVDPPFGKGKTQHDSLDAESI 599
AGT1             FTAVTLAWVIIDLPETTGRITFSEINELFNQGVPAKFASTVVDPPFGKGKTQHDSLDAESI 600
AGT1_IFO0304     FTAVTLAWVIIDLPETTGRITFSEINELFNQGVPAKFASTVVDPPFGKGKTQHDSLDAESI 599
*****:*****

AGT1_IFO2043      SQFSSIKQRELNAADKC 616
AGT1_IFO2252      SQFSSIKQRELNAADKC 616
AGT1_A60          SQSSSIKQRELNAADKC 616
AGT1_A179        SQSSSIKQRELNAADKC 616
AGT1_WH310       SQSSSIKQRELNAADKC 616
AGT1_CAT1        SQSSSIKQRELNAADKC 616
AGT1_PE2         SQSSSIKQRELNAADKC 616
AGT1_S288C       SQSSSIKQRELNAADKC 616
AGT1_CEN.PK2-1C  SQSSSIKQRELNAADKC 616
AGT1_MC966A      SQSSSIKQRELNAADKC 616
AGT1             SQSSSIKQRELNAADKC 617
AGT1_IFO0304     SQSSSIKQRELNAADKC 616
** *****

```

FIGURA 4.26: Conclusão.

FIGURA 4.27: Resumo dos resultados de PCR obtidos durante a avaliação do promotor do gene *AGT1* das cepas CAT-1 e PE-2. A parte superior da figura representa a posição de hibridização dos diferentes primers utilizados. A posição do gene *AGT1*, da sequência *UAS_{MAL}* e do gene *MAL12* está esquematizada segundo Han *et al.* (1995). A parte inferior da figura apresenta a legenda de cores dos primers e o resumo dos resultados.

Em virtude da distinta região promotora encontrada nas cepas CAT-1 e PE-2, decidimos avaliar a expressão do gene *AGT1* durante o crescimento das mesmas em meio rico contendo maltose como fonte de carbono. Interessantemente, os resultados que obtivemos com essa avaliação demonstram que a expressão desse gene é praticamente nula nas células das cepas CAT-1 e PE-2, enquanto que a expressão dos genes *MALx1*, analisada como controle, foi ainda superior a encontrada nas linhagens de laboratório avaliadas previamente (vide Figura 4.28 e seção 4.3). Esses resultados, portanto, sugerem que o fenótipo apresentado pelas cepas CAT-1 e PE-2 em maltotriose (crescimento tardio com pouca ou nenhuma produção de etanol) é provavelmente causado pela falta de expressão do gene *AGT1* presente no genoma das mesmas e não pelas mutações encontradas em sua sequência.

FIGURA 4.28: Expressão relativa dos genes *AGT1* e *MALx1* nas cepas CAT-1 e PE-2. Ao atingirem o meio de sua fase exponencial de crescimento em meio rico contendo 2% de maltose como fonte de carbono, as células foram coletadas para extração de RNA. Os valores apresentados no eixo Y representam uma quantificação relativa da expressão dos genes *AGT1* e *MALx1*. Esses valores foram obtidos com o quociente da quantidade de mRNA transcrito a partir desses genes pela quantidade de mRNA transcrito a partir do gene *ACT1* em cada amostra.

Há alguns anos, foi demonstrado que as permeases Agt1p e Malx1p são diferentemente expressas em cepas de cervejaria do tipo *ale* e do tipo *lager* (RAUTIO e LONDESBOROUGH, 2003; VIDGREN et al., 2005). Os resultados apresentados por esses autores demonstram que enquanto cepas do tipo *ale* apresentam alta expressão do gene *AGT1* e baixa dos genes *MALx1*, cepas do tipo *lager* expressam fortemente os genes *MALx1* e praticamente não expressam o gene *AGT1*. Recentemente, Vidgren et al. (2009) apresentaram a sequência da região promotora do gene *AGT1* de uma cepa *lager* e demonstraram ser, essa sequência, bastante distinta da publicada por Han et al. (1995), a qual é idêntica à presente na cepa inteiramente seqüenciada S288C (vide www.yeastgenome.org). Interessantemente, ao analisarmos a sequência publicada da região promotora do gene *AGT1* dessa cepa *lager* (VIDGREN et al., 2009), verificamos que entre os nucleotídeos -1 e -314 (contado a partir do códon de iniciação do gene *AGT1*) há 99% de homologia com a sequência previamente conhecida da região promotora desse gene (HAN et al., 1995; www.yeastgenome.org). Por outro lado, a montante do nucleotídeo -314,

ambas as seqüências se tornam bastante diferentes e a homologia cai para menos de 10%. Vale ressaltar que, segundo Han et al. (1995), a seqüência UAS_{MAL} se localiza entre os nucleotídeos -413 e -494 da região promotora do *AGT1*. É importante também destacar que, nas cepas CAT-1 e PE-2, verificamos que a presença de uma seqüência distinta da presente na S288C inicia justamente a montante do nucleotídeo -279 (onde se hibridiza a extremidade 5' do primer AGT1-SA3c – vide Figura 4.27 e Tabela 3.2). De maneira interessante, na cepa CAT-1, ao obtermos a seqüência do promotor do *AGT1* – entre os nucleotídeos -1 e -279 – vimos que a mesma compartilha 100% de homologia com a seqüência correspondente da cepa lager A15, publicada por Vidgren et al. (2009), e apresenta apenas dois nucleotídeos de diferença em relação à mesma seqüência na linhagem S288C (vide Figura 4.29).

```

AGT1_CAT1      ATTATAATATTTTTTTAGTTGTTTGATGTTCTTCTATGTAGCATCAGAAAGAAACACCAA 60
AGT1_A15      ATTATAATATTTTTTTAGTTGTTTGATGTTCTTCTATGTAGCATCAGAAAGAAACACCAA 60
AGT1          ATTATACTATTTTTTTAGTTGTTTGATGTTCTTCTATGTAGCATCAGAAAGAAACACCAA 60
AGT1_S288C    ATTATACTATTTTTTTAGTTGTTTGATGTTCTTCTATGTAGCATCAGAAAGAAACACCAA 60
*****

AGT1_CAT1      CCGGAAAATTCTTCAAACAATCAATACCAAAACCGCTTTATATAAAAAATTAAAGATGTCGA 120
AGT1_A15      CCGGAAAATTCTTCAAACAATCAATACCAAAACCGCTTTATATAAAAAATTAAAGATGTCGA 120
AGT1          CCGGAAAATTCTTCAAACAATCAATACCAAAACCGCTTTATATAAAAAATTAAAGATGTCGA 120
AGT1_S288C    CCGGAAAATTCTTCAAACAATCAATACCAAAACCGCTTTATATAAAAAATTAAAGATGTCGA 120
*****

AGT1_CAT1      CATTCCTTATTTTTTTACTGAGTTTCGTTAAAAATTGGGTACACTCTTGATTACTGTAAATTGT 180
AGT1_A15      CATTCCTTATTTTTTTACTGAGTTTCGTTAAAAATTGGGTACACTCTTGATTACTGTAAATTGT 180
AGT1          CATTCCTTATTTTTTTACTGAGTTTCGTTAAAAATTGGGTACACTCTTGATTACTGTAAATTGT 180
AGT1_S288C    CATTCCTTATTTTTTTACTGAGTTTCGTTAAAAATTGGGTACACTCTTGATTACTGTAAATTGT 180
*****

AGT1_CAT1      CTCGTATGTCCCTCAAGCCCGGTACGTTGTCAATTTCTAGTACGCATCAACGGAGTGT 240
AGT1_A15      CTCGTATGTCCCTCAAGCCCGGTACGTTGTCAATTTCTAGTACGCATCAACGGAGTGT 240
AGT1          CTCGTATGTCCCTCAAGCCCGGTACGTTGTCAATTTCTAGTACGCATCAACGGAGTGT 240
AGT1_S288C    CTCGTATGTCCCTCAAGCCCGGTACGTTGTCAATTTCTAGTACGCATCAACGGAGTGT 240
*****

AGT1_CAT1      ACATGATAGATAGACCGAGTAGAATCTATGGCTATGGGG 279
AGT1_A15      ACATGATAGATAGACCGAGTAGAATCTATGGCTATGGGG 279
AGT1          ACATGATAGATAGACCGAGTAGAATCTATGGCTATGGGG 279
AGT1_S288C    ACATGATAGATAGACCGAGTAGAATCTATGGCTATGGGG 279
*****

```

FIGURA 4.29: Alinhamento de regiões promotoras do gene *AGT1*. As seqüências correspondem aos nucleotídeos -1 a -279 do promotor do *AGT1*. A procedência de cada seqüência analisada encontra-se à esquerda da figura. Para realizar o alinhamento, foi utilizado o programa de computador ClustalW (www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html).

Embora não tenhamos seqüenciado a região promotora do gene *AGT1* das cepas CAT-1 e PE-2 a montante do nucleotídeo -279, verificamos, através de PCR, que a distinta região promotora recentemente descrita (VIDGREN et al., 2009) está também presente nessas duas linhagens industriais. Conforme descrito na seção 3.11, utilizando os primers AGT1prom-F e AGT1prom-R (desenhados a partir da seqüência do promotor do *AGT1* da cepa A15), obtivemos amplificações de produtos de tamanho bastante próximos ao esperado tanto na cepa lager W-34/70, a qual teve seu genoma inteiramente seqüenciado recentemente (NAKAO et al., 2009), quanto nas cepas CAT-1 e PE-2 (Figura 4.30). É importante ressaltar que nenhuma amplificação foi verificada ao utilizarmos esse par de primers juntamente com o DNA genômico proveniente da cepa S288C, empregada como controle negativo nessa reação. Por outro lado, ao utilizarmos os primers AGT1-F e AGT1-R, que permitem a amplificação do gene *AGT1* em todas as cepas analisadas, verificamos a amplificação esperada a partir das quatro amostras utilizadas (Figura 4.30).

Para confirmar a hipótese de que uma deficiência no transporte de maltotriose nas cepas CAT-1 e PE-2 seria o motivo do crescimento tardio observado, transformamos essas linhagens com o plasmídeo pSA3.14-KanMX (o qual possui o gene *AGT1* – vide seção 3.2) e avaliamos os perfis de crescimento das mesmas em meio rico contendo maltose ou maltotriose como fontes de carbono. Como pode ser observado na Figura 4.31, após a transformação com esse plasmídeo, as células iniciaram a sua fase exponencial de crescimento simultaneamente em maltotriose e em maltose, atingindo a fase estacionária em menos de 15 h após o inóculo. Dessa forma, esses resultados se mostram de acordo com os dados apresentados nas seções anteriores, uma vez que demonstram que a expressão de um alelo do gene *AGT1* (nesse caso, proveniente da cepa CEN.PK2-1C) que codifique uma permease funcional permite a eficiente utilização da maltotriose em células que contenham pelo menos um regulador *MAL* e uma isoforma de α -glicosidase. Em virtude de já termos verificado que ambas as cepas eram capazes de utilizar eficientemente a maltose, nossos resultados, portanto, já apontavam a presença dessas duas últimas enzimas nas células da CAT-1 e da PE-2. Assim, apenas a transformação com um plasmídeo contendo o gene *AGT1* sob controle do seu promotor natural foi capaz de permitir às células uma utilização eficiente também da maltotriose.

FIGURA 4.30: Confirmação da distinta região promotora do gene *AGT1* nas cepas CAT-1 e PE-2. Através de PCR, as cepas CAT-1 (linhas 1 e 5), PE-2 (linhas 2 e 6), S288C (linhas 3 e 7) e W-34/70 (linhas 4 e 8) foram analisadas quanto a presença da distinta região promotora do *AGT1* no genoma (M, 1 kb DNA ladder – Sigma; linhas 1-4, amplificação do promotor em questão; linhas 5-8, amplificação do *AGT1*). Os produtos de PCR estão mostrados em gel de agarose 1%. Os números ao lado do gel indicam o tamanho desses produtos.

FIGURA 4.31: Crescimento celular em micro-escala das cepas CAT-1 e PE-2 transformadas com o plasmídeo pSA3.14-KanMX. Após serem pré-crescidas em maltose, as células foram inoculadas em 100 μ L de meio rico contendo 2% de maltose (YPM) ou maltotriose (YPMt) como fonte de carbono.

4.5 Avaliação de um novo fenótipo encontrado para utilização de maltotriose

Na seção anterior, demonstramos que, quando cultivadas em meio rico contendo maltotriose como fonte de carbono, as células da cepa VR-1, que não possui em seu genoma o gene *AGT1*, e das cepas CAT-1 e PE-2, que praticamente não expressam esse gene, apresentam uma extensa fase *lag* antes de iniciarem o seu crescimento exponencial. Além disso, vimos também que, durante esse crescimento tardio, as células não fermentam o açúcar ou, se fermentam, produzem quantidades ínfimas de etanol. Tendo em vista esse distinto fenótipo apresentado pelas cepas CAT-1, PE-2 e VR-1 durante o cultivo de suas células em maltotriose, decidimos cultivar as linhagens de laboratório *agt1Δ* que construímos (vide seção 4.2 e Tabela 3.1) por um período prolongado (200 h) em meio contendo esse açúcar. Com isso, tínhamos o intuito de verificar se as linhagens LCM003, LCM001 e BSY09 apresentariam esse mesmo fenótipo em virtude da ausência do gene *AGT1*, ou se esse fenótipo seria uma característica exclusiva das linhagens industriais.

Ao cultivarmos a cepa LCM003 (CEN.PK2-1C *agt1Δ*) por 200 h em meio rico contendo 2% de maltotriose (YPMt) verificamos que suas células, ainda assim, se mostraram incapazes de crescer utilizando essa fonte de carbono. No final das 200 h a biomassa produzida foi de apenas 1,89 g de células por litro. Essa biomassa, entretanto, não foi gerada pelo consumo de maltotriose (que permaneceu em 20 g/L até o fim do cultivo), mas sim graças ao consumo dos componentes do extrato de levedura e peptona utilizados (dados não mostrados).

As linhagens LCM001 (1403-7A *agt1Δ*) e BSY09 (MC966A *agt1Δ*), todavia, ao serem cultivadas em YPMt durante 200 h, interessantemente apresentaram o mesmo fenótipo observado nas cepas CAT-1, PE-2 e VR-1: crescimento tardio e ausência de produção de etanol. Conforme pode ser observado nas Figuras 4.32 e 4.33, as cepas LCM001 e BSY09 iniciaram o seu crescimento exponencial em maltotriose em 72-80 h após o inóculo. Assim como as cepas PE-2 e VR-1, essas linhagens de laboratório também não fermentaram o açúcar. Uma vez que a fonte de carbono consumida foi inteiramente metabolizada através da respiração celular, a LCM001 conseguiu atingir altos valores de densidade óptica (Figura 4.32). A BSY09, por outro lado, apesar de não ter fermentado a maltotriose, produziu pouca biomassa (Figura 4.33). Vale ressaltar que essa extensa fase *lag* observada foi sempre

reprodutível nas cepas que a apresentaram, havendo apenas certa variação no tempo de início da fase exponencial de crescimento.

O crescimento respiratório dessas células foi também confirmado ao inocularmos a cepa BSY09 em YPMt com 3 mg/L de Antimicina A. A presença desse inibidor da cadeia respiratória impediu que essa linhagem crescesse em maltotriose mesmo durante 200 h de incubação e mesmo diante de um regulador constitutivo. Contudo, ao receberem novamente uma cópia do gene *AGT1*, as células da cepa BSY09 voltaram a consumir a maltotriose, metabolizando-a através da fermentação (Figura 4.34).

Uma nova confirmação desse crescimento respiratório foi obtida ao avaliarmos a atividade mitocondrial dessa linhagem durante o seu crescimento tardio em meio contendo a fonte de carbono em questão. Essa atividade foi medida em FACS através do grau de fluorescência vermelha emitida pelas células coletadas em fase exponencial de crescimento e subseqüentemente coradas com MitoTracker Red (vide seção 3.8), que indica atividade mitocondrial (CHU et al., 2007). Desse modo, a fluorescência emitida pelas células é diretamente proporcional à atividade de suas mitocôndrias, o que reflete, portanto, se estão respirando ou fermentando a fonte de carbono presente no meio de cultura. Corroborando os resultados obtidos com as determinações de etanol, os dados de citometria de fluxo apontam que a cepa BSY09 apresentou metabolismo essencialmente respiratório durante o seu crescimento tardio em maltotriose, tendo em vista que a atividade mitocondrial (estimada pela intensidade da fluorescência emitida) apresentada pelas suas células foi bastante superior a obtida pela sua linhagem parental MC966A, que sabidamente fermenta esse açúcar. Esta última, por sua vez, apresentou, para aproximadamente 90% das células de sua população, o mesmo nível de fluorescência verificado para a população utilizada como branco (Figura 4.35).

Assim, nossos resultados evidenciam que, diante da falta de uma permease *Agt1p* na membrana das células de *S. cerevisiae*, as leveduras podem apresentar a total falta de capacidade de crescimento em maltotriose ou apresentar um crescimento tardio, após uma extensa fase *lag*, com pouca ou nenhuma produção de etanol. Esse fato, no entanto, não explica como as leveduras conseguem passar a consumir tardiamente a maltotriose. Com intuito de elucidar o que promove esse fenótipo distinto, decidimos realizar ensaios que permitissem testar as hipóteses levantadas, conforme descrito a seguir.

FIGURA 4.32: Utilização de maltose e maltotriose pela cepa LCM001 em meio rico. Crescimento celular (A), consumo de açúcares (B) e produção de etanol (C) pela cepa LCM001 em meio rico contendo 2% de maltose (○) ou maltotriose (●) como fonte de carbono.

FIGURA 4.33: Utilização de maltose e maltotriose pela cepa BSY09 em meio rico. Crescimento celular (A), consumo de açúcares (B) e produção de etanol (C) pela cepa BSY09 em meio rico contendo 2% de maltose (○) ou maltotriose (●) como fonte de carbono.

FIGURA 4.34: Utilização de maltose e maltotriose pela cepa BSY09 transformada com o plasmídeo pJW5 ou pGRSd-AGT1 em meio rico contendo Antimicina A. Crescimento celular (A, B), consumo de açúcares (C, D) e produção de etanol (E, F) pela cepa BSY09 transformada com o plasmídeo pJW5 (A, C, E) ou com o plasmídeo pGRSd-AGT1 (B, D, F) em meio rico contendo 2% de maltose (símbolos brancos) ou maltotriose (símbolos pretos) e 3 mg/L de Antimicina A.

FIGURA 4.35: Atividade mitocondrial das cepas MC966A e BSY09. (A-D) *Dotplots* do volume das células em função da fluorescência emitida. (E) Histograma do número de eventos em função da fluorescência emitida. (A,B) Branco. Após atingirem a fase exponencial de crescimento, as células das cepas MC966A (C) e BSY09 (D), crescidas em meio rico contendo maltotriose como fonte de carbono, foram coradas com MitoTracker Red e posteriormente analisadas em FACS. Nos *Dotplots*, as células selecionadas na região 1, para análise em histogramas, estão representadas em verde (vide seção 3.8). No histograma, o branco está representado em preto e as células das cepas MC966A e BSY09 estão representadas, respectivamente, em vermelho e verde.

Para verificarmos se tal fenótipo não seria apenas um artefato causado por uma possível seleção de mutantes ocorrida durante esse longo período de incubação, coletamos uma alíquota de células da linhagem LCM001, após o início do seu crescimento exponencial, e as inoculamos em um novo meio rico contendo a mesma concentração inicial de maltotriose (2%). Após o re-inóculo, as células voltaram a apresentar a mesma extensa fase *lag*, descartando a hipótese de uma seleção de mutantes aptos a utilizarem maltotriose (dados não mostrados).

Vivier et al. (1999) demonstraram que a presença do gene *STA2* – o qual, assim como os genes *STA1* e *STA3*, codifica uma glucoamilase em *S. cerevisiae* var. *diastaticus* – permitiu o crescimento de células utilizando amido como fonte de carbono após uma extensa fase *lag* de aproximadamente 100 h. É sabido também que as glucoamilases codificadas pelos genes *STAx* são capazes de hidrolisar a maltotriose (PRETORIUS et al., 1986) e que as mesmas já foram encontradas em algumas leveduras de laboratório (GAGIANO et al., 1999, 2003; PRETORIUS et al., 1986; VIVIER et al., 1999). Tendo isso em vista, decidimos verificar se um desses três genes *STAx* mencionados estaria presente no genoma das cepas LCM001 e BSY09. A verificação realizada por PCR (vide seção 3.11), entretanto, demonstrou que essas linhagens não possuem tais genes (dados não mostrados), o que indica que as glucoamilases Sta1p, Sta2p e Sta3p não podem ser responsabilizadas pelo fenótipo encontrado nas cepas LCM001 e BSY09 quando cultivadas em maltotriose.

Embora nossos resultados tenham demonstrado ausência de transporte de maltotriose em cepas *agt1Δ* (vide seção 4.2), foi demonstrado por Day et al. (2002a) que as permeases Mph2p e Mph3p (as quais possuem 97% de homologia entre si) são capazes de transportar a maltotriose com alta afinidade, possibilitando a utilização desse açúcar pelas células de *S. cerevisiae*. Em virtude dos resultados apresentados por esses autores, decidimos avaliar a expressão dos genes *MPHx* nas cepas estudadas para verificar se haveria uma possível relação entre esses genes e o distinto fenótipo observado em maltotriose. Os resultados mostrados na Figura 4.36 demonstram haver elevada expressão dos genes *MPHx* nas cepas LCM001 e BSY09, que apresentam crescimento tardio em maltotriose. Por outro lado, níveis elevados de expressão desses genes também foram verificados na cepa LCM003, que não apresenta esse fenótipo. Além disso, as cepas CAT-1 e PE-2, que, assim como a LCM001 e a BSY09, são capazes de crescer tardiamente em maltotriose, não apresentaram (PE-2), ou apresentaram ínfima (CAT-1), expressão dos genes *MPHx* (Figura 4.36). Esses

resultados, portanto, sugerem que as permeases codificadas pelos genes *MPHx* não têm relação com o fenótipo em questão.

Os dados da Figura 4.36 demonstram ainda que a glicose não tem influência sobre a expressão dos genes *MPHx*, já que mesmo nas cepas CEN.PK2-1C e MC966A – as quais tiveram a expressão dos seus genes *MALx1* e *AGT1* reprimidos pela glicose – a expressão dos genes *MPHx* se mostrou igualmente elevada em glicose e em maltose. Desse modo, nossos resultados indicam que os mecanismos envolvidos na regulação da expressão dos genes *MPH2* e *MPH3* diferem dos envolvidos na regulação dos genes *MALx1* e *AGT1* (vide seção 4.3).

FIGURA 4.36: Expressão relativa dos genes *MPHx* em diferentes cepas. Ao atingirem o meio de sua fase exponencial de crescimento em meio rico contendo diferentes fontes de carbono (vide quadro à direita da figura), as células foram coletadas para extração de RNA. Os valores apresentados no eixo Y representam uma quantificação relativa da expressão dos genes *MPHx*. Esses valores foram obtidos com o quociente da quantidade de mRNA transcrito a partir desses genes pela quantidade de mRNA transcrito a partir do gene *ACT1* em cada amostra.

No intuito de buscarmos genes que pudessem estar relacionados ao fenótipo de crescimento tardio dessas linhagens, decidimos realizar uma análise de expressão gênica em larga escala através de microarray. Para isso, foram hibridizadas simultaneamente com o biochip amostras de cDNA provenientes dos crescimentos da cepa LCM001 em glicerol (controle) e em maltotriose. A realização desse ensaio, todavia, por si só não permitiu esclarecer o fenótipo em questão. Apesar disso, os dados gerados interessantemente apontaram, nas células crescidas em maltotriose, expressão aumentada de regiões codificantes (ORF's) não caracterizadas que, possivelmente, codificam glucanases e α -glicosidases. É importante ainda salientar que, de maneira intrigante, observou-se nessas células expressão incrementada também de genes que codificam transportadores de hexoses, porém não de genes que codificam transportadores de α -glicosídeos (dados não mostrados).

Apesar de termos verificado que as cepas estudadas não possuem os genes *STAx*, os quais poderiam promover a hidrólise extracelular da maltotriose, nossos resultados sugerem que a utilização tardia de maltotriose dificilmente aconteça através do transporte desse açúcar pela membrana plasmática das células. Isso se sustenta em virtude de termos demonstrado altos níveis de expressão dos genes *MPHx* em células incapazes de crescer em maltotriose mesmo durante 200 h de incubação e ausência de expressão dos mesmos em células que passam a utilizar a maltotriose a partir de 120 h após o inóculo. Além disso, nossos dados iniciais (vide seção 4.2) já indicavam que o transporte de maltotriose é praticamente nulo em células *agt1Δ*. Os dados de microarray, embora não sejam por si só conclusivos, também ajudam a corroborar esses nossos resultados, pois apontam, em células crescidas em maltotriose, expressão aumentada de genes que codificam transportadores de hexoses e possíveis hidrolases, mas não de transportadores de α -glicosídeos. Sendo assim, decidimos testar, de maneira diferente, a hipótese de a maltotriose ser hidrolisada extracelularmente em células sem expressão da permesse *Agt1p*. Isso exigiu que verificássemos, após o início da fase exponencial de crescimento das cepas analisadas, se havia ou não glicose no meio de cultura à medida que as células se multiplicavam utilizando a maltotriose. Desse modo, se detectássemos glicose, teríamos o indicativo de que a maltotriose é hidrolisada extracelularmente em células de *S. cerevisiae* que não contam com o transportador *Agt1p*. Essa detecção, porém, não se mostrou possível. Em virtude de a glicose ser um açúcar rapidamente transportado e consumido pelas

leveduras, acreditamos que, nesses casos, a glicose que fosse gerada pela possível hidrólise extracelular da maltotriose seria imediatamente absorvida e, portanto, impossível de ser detectada.

Tendo em vista o acima exposto, optamos por cultivar em maltotriose uma linhagem *agt1Δ* que não possuísse transportadores de hexose. A escolha da mesma se deu no intuito de permitir que a glicose que fosse gerada pela hidrólise em questão pudesse ser detectada no meio de cultura. A cepa escolhida para isso (BSY08 – vide Tabela 3.1) é isogênica a BSY09, exceto pela ausência dos genes *HXT1-HXT7*, os quais codificam transportadores de hexose (ÖZCAN e JOHNSTON, 1999). Como controle, avaliamos também o crescimento celular da cepa KY73, a qual deu origem a BSY08 após ter o gene *AGT1* deletado (BATISTA et al., 2004). Como pode ser observado na Figura 4.37, as cepas KY73 e BSY08, conforme esperado, foram incapazes de crescer em meio rico contendo glicose como fonte de carbono. Em maltose, todavia, ambas as cepas cresceram igualmente rápido e atingiram a fase estacionária de crescimento em 18 h (quando cultivadas em micro-escala) e em 42 h (quando cultivadas em frascos Erlenmeyer) de incubação (vide Figuras 4.37 e 4.38). Os fenótipos esperados para cada cepa também se confirmaram em maltotriose: a linhagem KY73 cresceu nessa fonte de carbono tão rapidamente quanto em maltose e a BSY08 apresentou crescimento tardio com fase *lag* de aproximadamente 130 h (Figuras 4.37 e 4.38).

O crescimento das cepas KY73 e BSY08 em frascos Erlenmeyer contendo meio rico com maltose ou maltotriose permitiu a retirada de alíquotas nos tempos estabelecidos para determinar a concentração de glicose em cada cultivo. Vale lembrar que ambas as cepas são *hxt*-null e, portanto, toda a glicose gerada extracelularmente pelas suas células pode ser detectada no meio. Com isso, conseguimos verificar a presença de glicose após o início da fase exponencial de crescimento da cepa BSY08 em meio rico com 2% de maltotriose. Conforme apresentado na Figura 4.38, o início do aparecimento de glicose no meio coincide com o início da fase exponencial de crescimento das células. É importante destacar que a concentração de glicose nesse meio cresceu à medida que as células se multiplicavam e, ainda, que as inclinações das curvas de crescimento celular e de aparecimento de glicose são muito semelhantes. Como esperávamos, o crescimento da cepa KY73 tanto em maltose como em maltotriose se deu graças ao transporte desses açúcares através da membrana plasmática das células. O mesmo aconteceu com a BSY08 em maltose (Figura 4.38). Portanto, esses resultados finalmente confirmam a hipótese levantada de hidrólise

extracelular da maltotriose durante o crescimento de células que não contam com a permease Agt1p em sua membrana plasmática. Esses resultados também demonstram que essa hidrólise da maltotriose foi parcial, gerando para cada mol de maltotriose, um mol de glicose e um de maltose. A maltose gerada foi a fonte de carbono responsável pelo crescimento celular da linhagem BSY08.

Ao constatarmos que a hidrólise extracelular da maltotriose é responsável pelo crescimento tardio observado nessa fonte de carbono, decidimos investigar qual seria a enzima responsável por essa hidrólise. Com esse intuito, realizamos inicialmente uma varredura por genes candidatos com base nos dados obtidos através do ensaio de microarray. Essa varredura levou em consideração a expressão aumentada de genes ou regiões codificantes (ORF's) em células crescidas em maltotriose e a função descrita ou predita para cada gene ou ORF. Após essa análise inicial, decidimos deletar um dos candidatos para verificar se o mesmo teria alguma relação com o distinto fenótipo observado.

FIGURA 4.37: Crescimento celular em micro-escala das cepas KY73 e BSY08. Após serem pré-crescidas em maltose, as células foram inoculadas em 100 μ L de meio rico contendo 2% de glicose (YPD), maltose (YPM) ou maltotriose (YPMt) como fonte de carbono.

FIGURA 4.38: Perfil de aparecimento de glicose durante o crescimento celular da cepa BSY08 em maltotriose. Após serem pré-crescidas em maltose, as células das cepas KY73 e BSY08 foram inoculadas em meio rico contendo 2% de maltose (YPM) ou maltotriose (YPMt) como fonte de carbono. Nos tempos indicados, amostras foram retiradas para determinação do aparecimento de glicose (painel inferior) durante o crescimento celular (painel superior).

O candidato em questão é a região codificante YJL216C. Em virtude de ainda não ter sido caracterizada, foi apenas predito (com base na sequência de aminoácidos) que a proteína por ela codificada é uma α -glicosidase (VANDENBOL et al., 1994). Na cepa S288C – primeira linhagem a ser inteiramente seqüenciada (vide www.yeastgenome.org) – essa ORF está localizada no cromossomo X, entre duas regiões codificantes que codificam potenciais transportadores de hexose (*HXT8* e *HXT9*). Em virtude dessa localização e do fato de já terem sido observadas maltases extracelulares em outras espécies de leveduras (JANSEN et al., 2006; MARIN et al., 2006; REISER e GASPERIK, 1995), fomos levados a acreditar que a potencial α -glicosidase codificada pela ORF YJL216C poderia também ser extracelular, apesar de as α -glicosidases até então reconhecidas por hidrolisar a maltose e a maltotriose em *S. cerevisiae* serem citoplasmáticas (DELOM et al., 2006).

A Figura 4.39 apresenta a confirmação da deleção da ORF YJL216C do genoma da cepa BSY09 (para detalhes da deleção, vide seção 3.3), o que deu origem a linhagem SAY09-05. Conforme pode ser observado no gel, a partir do genoma da nova linhagem (SAY09-05) foi obtido produto de PCR tanto na reação que objetivava confirmar a deleção da ORF YJL216C quanto na reação que permitia a amplificação da mesma. A partir do genoma da cepa BSY09, porém, foi obtido, conforme esperado, apenas o produto da reação que se propunha a amplificar a ORF em questão (Figura 4.39). Esses resultados, portanto, além de confirmarem a deleção da região codificante YJL216C, sugerem também que a cepa BSY09 possua dois alelos da mesma. De fato, através da ferramenta NCBI-BLAST (disponível em www.ncbi.nlm.nih.gov/blast) pudemos observar que um alelo dessa ORF pode também ser encontrado no cromossomo VI de *S. cerevisiae*. Esse alelo foi observado na cepa JAY291, uma linhagem haplóide recentemente seqüenciada, que é derivada da cepa industrial PE-2 (ARGUESO et al., 2009). O alelo do cromossomo VI, entretanto, não é capaz de codificar uma proteína funcional em virtude de uma alteração na fase de leitura da ORF, promovida por uma adição de base na altura do seu nucleotídeo 750. Vale ainda salientar que a banda correspondente a amplificação da ORF YJL216C, obtida a partir do genoma da cepa SAY09-05, é significativamente menos intensa do que a obtida a partir do genoma da linhagem parental BSY09 (vide Figura 4.39). Isso, portanto, se apresenta em concordância com a suposição da presença de dois alelos da ORF YJL216C no genoma da cepa BSY09.

FIGURA 4.39: Confirmação da deleção da ORF YJL216C na cepa BSY09. Conforme descrito na seção 3.3, o DNA genômico da cepa BSY09 (linhas 1 e 4) e o da sua isogênica SAY09-05 (linhas 2 e 3) foram analisados, através de PCR, para a verificação da deleção em questão (M, 1 kb DNA ladder – Sigma; linhas 1 e 2, resultado da reação realizada com os primers YJL216C-PFA6-F1 e YJL216C-PFA6-R1, que confirmou a deleção; linhas 3 e 4, resultado da reação realizada com os primers V-YJL216C-F e V-CaURA3-R). Os produtos de PCR estão mostrados em gel de agarose 1%. Os números ao lado do gel indicam o tamanho dos produtos amplificados.

Embora não tenha sido possível determinar, através de PCR, o alelo deletado (se o do cromossomo X ou do VI), decidimos avaliar o crescimento celular do mutante obtido (SAY09-05) em meio rico contendo maltotriose (YPMt). Com isso, tínhamos o intuito de verificar se a deleção realizada ocasionaria perda da capacidade de hidrólise extracelular da maltotriose e, conseqüentemente, ausência do crescimento tardio observado nessa fonte de carbono. De fato, conforme apresentado na Figura 4.40, através da análise do crescimento celular, pudemos confirmar a função predita à sequência protéica codificada pela ORF YJL216C e demonstrar que a mesma – agora, comprovadamente uma α -glicosidase – está localizada extracelularmente, proporcionando a hidrólise extracelular da maltotriose. Essa avaliação fenotípica apontou clara diferença entre a capacidade de crescimento da cepa parental BSY09 e da sua derivada (após deleção da ORF YJL216C) SAY09-05. Na figura 4.40, verifica-se que, após essa deleção, as células deixam de apresentar o crescimento tardio observado em linhagens incapazes de expressar a permease Agt1p. Vale ressaltar que a

linhagem SAY09-05 foi incapaz de crescer em maltotriose mesmo durante 400 h de incubação (dados não mostrados). Esses dados também sugerem que o alelo deletado seja o alelo localizado no cromossomo X, tendo em vista que o presente no cromossomo VI é incapaz de codificar uma proteína funcional.

FIGURA 4.40: Crescimento celular em micro-escala das cepas isogênicas MC966A, BSY09 e SAY09-05. Após serem pré-crescidas em maltose, as células foram inoculadas em 100 μ L de meio rico contendo 2% de maltose (YPM) ou maltotriose (YPMt) como fonte de carbono.

5 DISCUSSÃO

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é empregada em uma série de processos biotecnológicos principalmente em virtude da sua capacidade de fermentar açúcares mesmo na presença de oxigênio (BARFORD e HALL, 1979; DE DEKEN, 1966; VAN DIJKEN e SCHEFFERS, 1986). Em alguns setores industriais, essa levedura é responsável pela fermentação dos produtos de hidrólise do amido. Dentre esses produtos, a maltose e a maltotriose se apresentam como açúcares majoritários (GIBSON et al., 2007; PONTE e REED, 1982 *apud* HIGGINS et al. 1999; WILLAERT, 2001). Embora os aspectos moleculares do metabolismo de maltose em *Saccharomyces cerevisiae* já tenham sido extensivamente estudados, poucos trabalhos, até o presente, apresentaram como foco principal a utilização de maltotriose por essa levedura. Além disso, na literatura, ainda constam trabalhos conflitantes em relação aos transportadores envolvidos no transporte da maltotriose através da membrana plasmática das células. Em virtude dessa carência de informação, decidimos verificar a presença de transportadores de α -glicosídeos em cepas industriais e de laboratório, para correlacioná-los à capacidade fermentativa das diferentes linhagens analisadas em maltotriose. Além dessa correlação, este trabalho também buscou a elucidação dos mecanismos regulatórios responsáveis pela expressão dos genes envolvidos no metabolismo do açúcar em questão.

Sabidamente, as proteínas reguladoras codificadas pelos genes *MALx3*, na presença de maltose, se ligam a sequência *UAS_{MAL}* (presente nos loci *MAL*), permitindo a expressão do transportador de maltose e da α -glicosidase (CHANG et al., 1988; GOLDENTHAL et al., 1987; LEVINE et al., 1992; SIRENKO et al., 1995). Dessa forma, Han et al. (1995), ao observarem a existência dessa sequência no locus *mal1g*, entre os genes *AGT1* e *MAL12*, sugeriram que a expressão da permease Agt1p poderia ser regulada pelos mesmos mecanismos de regulação gênica dos transportadores Malx1p. De fato, os resultados que obtivemos corroboraram esse indicativo, uma vez que demonstram que células contendo apenas o locus *mal1g* (dentre todos os loci *MAL*) tornaram-se capazes de consumir a maltose e a maltotriose somente após a sua transformação com um plasmídeo contendo um gene que codifica um regulador *MAL* funcional (Figuras 4.1, 4.4 e 4.5). Tendo em vista também que essas células foram crescidas em meios que continham alternadamente maltose ou maltotriose (e nunca os dois açúcares ao mesmo tempo), nossos dados indicam ainda que a utilização de ambos

α -glicosídeos é controlada pelos mesmos mecanismos regulatórios e que, assim como já evidenciado para a maltose (CHARRON e MICHELS, 1987; CHARRON et al., 1986; NEEDLEMAN et al., 1984; RAN et al., 2008), a utilização da maltotriose também exige, além de um transportador e de uma α -glicosidase, a presença de uma proteína reguladora Malx3p.

Foi demonstrado que a expressão constitutiva dos genes *MAL* em *S. cerevisiae* tende a incrementar a fermentação de maltose pelas células dessa levedura (HIGGINS et al., 1999; KODAMA et al., 1995; MENESES e JIRANEK, 2002; ODA e OUCHI, 1990). Corroborando os dados presentes na literatura, nossos resultados demonstram que, em maltose, as células da cepa 340-2B (seção 4.1), quando portavam o regulador constitutivo, produziram até 30% mais etanol do que quando continham o regulador induzível. Além disso, interessante, a transformação das células com o plasmídeo pJW5 (*MAL63^C*) também proporcionou incremento na produção de etanol a partir da maltotriose. Em meio sintético contendo essa fonte de carbono, por exemplo, esse incremento chegou a quase 100%. Essa otimização alcançada ocorreu em virtude da maior eficiência de consumo dos açúcares quando as células continham o regulador *MAL63^C* constitutivo. Desse modo, percebe-se a importância do emprego de uma linhagem *MAL* constitutiva em setores industriais que dependam da fermentação dos produtos de hidrólise do amido.

Os resultados obtidos com a cepa 340-2B também apontam significativa disparidade entre o consumo de maltose e maltotriose em meio rico e sintético. Essa disparidade se deve à diferença existente entre a composição de ambos os meios: a fonte de nitrogênio do meio sintético é amônia (5 g/L) e uma pequena quantidade (1,92 g/L) de uma mistura de aminoácidos, enquanto que a fonte de nitrogênio do meio rico é proveniente de peptídeos, presentes nos 20 g/L de peptona que compõem esse meio. Foi demonstrado por da Cruz et al. (2002) que meios suplementados com peptona proporcionam crescimento mais rápido das leveduras, consumo mais acelerado dos açúcares e fermentação mais eficiente que os meios suplementados com aminoácidos livres ou amônia. Esses mesmos autores apontam ainda que a utilização de maltose ocorre de maneira incompleta quando as células de *S. cerevisiae* são crescidas em meios contendo altas concentrações (15%) desse açúcar e aminoácidos livres ou amônia como fonte de nitrogênio (DA CRUZ et al., 2002).

Analisados em conjunto, nossos dados de *Southern Blotting*, análises de expressão gênica e avaliações fenotípicas permitem afirmar que a permease codificada pelo gene *AGT1*

é indispensável para o transporte de maltotriose através da membrana plasmática das células de *S. cerevisiae*. Os resultados obtidos demonstram que, na ausência desse transportador, as células são incapazes de consumir a maltotriose com rapidez e, conseqüentemente, de promover uma fermentação eficiente desse açúcar.

Vimos também que células *agt1Δ* cultivadas em maltotriose apresentam apenas 14% da atividade de transporte de maltose encontrada em células *agt1Δ* cultivadas em maltose (Tabela 4.1), o que indica que, para induzir a expressão dos genes *MAL*, a maltotriose necessita ser internalizada pelas células, da mesma forma como já foi demonstrado para a maltose (WANG et al., 2002). De fato, esses resultados estão de acordo com dados recentemente publicados por Van de Velde e Thevelein (2008), os quais demonstram que a maltotriose – apontada por esses autores como um potente indutor da formação de pseudo-hifas em *S. cerevisiae* – foi incapaz de induzir filamentação em mutantes *agt1Δ/agt1Δ*.

Cabe ressaltar que, através de uma PFGE seguida de *Southern Blotting*, pudemos observar a presença de dois a três alelos dos genes *MALx1* nas linhagens de laboratório CEN.PK2-1C, 1403-7A e MC966A, das quais deletamos o gene *AGT1*. Verificamos ainda, através de QRT-PCR, que essas cepas são capazes de expressar não apenas os genes *MALx1* mas também os genes *MPHx*. Dessa forma, os resultados obtidos, além de demonstrarem a importância da permease Agt1p para o transporte e a utilização de maltotriose por *S. cerevisiae*, permitiram também avaliar indiretamente o grau de contribuição dos outros transportadores de α -glicosídeos já descritos. Uma vez que as cepas deletadas no gene *AGT1* tornaram-se incapazes de transportar a maltotriose e de fermentar essa fonte de carbono, nossos dados indicam que as permeases codificadas pelos genes *MALx1* e *MPHx* são incapazes de promover a utilização de maltotriose pelas células de *S. cerevisiae*, diferentemente do que foi observado por Day et al. (2002a; 2002b), que afirmaram que os transportadores codificados tanto pelos genes *MALx1* quanto pelos *MPHx* transportam maltotriose com alta afinidade (K_m 5-7 mM). Day et al. (2002b), inclusive, apontam em seu trabalho que o alelo *MAL31* codifica uma permease com capacidade de transporte de maltotriose ainda superior a encontrada para a permease codificada pelo alelo *MAL61*. Entretanto, é importante lembrar que: (1) essas linhagens de laboratório possuem o gene *MAL31* em seu genoma; (2) a expressão dos genes *MALx1* e *MPHx* foi confirmada nas mesmas; e (3) estudos prévios (MICHELS e NEEDLEMAN, 1984; HAN et al., 1995) já demonstraram que, na cepa 1403-7A, não apenas os genes *AGT1* e *MAL41* mas também o

gene *MAL31* codificam transportadores funcionais. Além disso, o fato de as cepas que analisamos continuarem aptas a fermentar eficientemente a maltose mesmo após a deleção do gene *AGT1* é um indício de que ao menos um dos alelos dos genes *MALx1* encontrados codificam transportadores funcionais.

Vale ainda salientar que Day et al. (2002a; 2002b), em seus ensaios de transporte, utilizaram açúcares marcados radiotivamente, os quais podem se ligar inespecificamente à parede ou à membrana celular das leveduras, gerando a falsa impressão de transporte após a visualização de tais células. Durante os ensaios de transporte, esses pesquisadores também fizeram uso de um tempo demasiadamente elevado (150 segundos) de incubação das células com os açúcares, possibilitando a geração de erros na estimativa dos açúcares dentro das células. Além disso, foi demonstrado recentemente que a ^{14}C -maltotriose comercial utilizada por Day e colaboradores (American Radiolabeled Chemicals Inc.) é fortemente contaminada (até 16% da sua radioatividade) com ^{14}C -maltose e ^{14}C -glicose, provocando uma superestimativa do transporte de maltotriose nas células (DIETVORST et al., 2005). Em nosso trabalho, entretanto, esses artefatos estão descartados, uma vez que a atividade de transporte de maltotriose foi determinada pelo influxo de prótons (co-transporte açúcar- H^+) transcorridos apenas 10 segundos após a adição do açúcar (vide seção 3.7).

Nossos resultados também demonstram que a capacidade de transporte de células crescidas em maltotriose foi sempre superior a de células crescidas em maltose. Em relação à atividade de transporte da permease Agt1p, especificamente, essa superioridade foi de até 100% em alguns casos. Assim, poderíamos sugerir, indiretamente, que a expressão dos genes *MAL* é maior em células crescidas em maltotriose que em células crescidas em maltose. Da mesma forma, outros autores (DIETVORST et al., 2005; SALEMA-OOM et al., 2005) também sugeriram que a maltotriose seria um melhor indutor das permeases responsáveis pelo transporte de α -glicosídeos ao verificarem, em células cultivadas em maltotriose, atividades de transporte até três vezes superiores a de células crescidas em maltose. Por outro lado, ao avaliarmos diretamente a expressão da permease Agt1p através de citometria de fluxo e ao quantificarmos os transcritos de mRNA tanto do gene *AGT1* quanto dos genes *MALx1*, observamos que a maltotriose não é capaz de induzir mais fortemente a expressão desses genes que a maltose. Em uma das cepas analisadas, inclusive, essa expressão foi, ainda, de três a quatro vezes menor em células que

metabolizavam a maltotriose. É importante, porém, ressaltar que as atividades de transporte, diferentemente dos ensaios de citometria de fluxo e QRT-PCR, não permitem avaliar, diretamente, o grau de contribuição de cada açúcar para a indução dos genes *MAL*.

Essa aparente contradição, contudo, é passível de elucidação. Deve-se considerar que a quantificação dos transcritos de mRNA dos genes *AGT1* e *MALx1* não representam apenas os transportadores que estejam funcionais na membrana. Do mesmo modo, a fluorescência verde emitida pelas células – quantificada pelo ensaio de citometria de fluxo – também não representa, necessariamente, somente as permeases ativas. Já foi demonstrado que os transportadores Malx1p, por exemplo, sofrem inativação catabólica na presença de glicose e que isso envolve a fosforilação e a ubiquitinação dos mesmos antes de serem endocitados e degradados no vacúolo (GADURA e MICHELS, 2006; GADURA et al., 2006; HATANAKA et al., 2009; JIANG et al., 2000a, 2000b; MEDINTZ et al., 1996). Na presença de glicose, esses transportadores são rapidamente fosforilados e, com isso, permanecem desativados na membrana temporariamente, antes de serem endocitados (GADURA et al., 2006; JIANG et al., 2000b). Além disso, Stambuk (2002) demonstrou que, em células contendo a GFP fusionada a permeases Malx1p, a fluorescência verde pode ainda ser percebida mesmo após esses transportadores estarem no vacúolo. Dessa forma, acredita-se que, em nossos ensaios, parte da fluorescência emitida pelas células (e detectada pelo FACS) seja proveniente de transportadores que já tenham sido fosforilados, ubiquitinados e até mesmo endocitados. Conforme demonstrado por Zastrow et al. (2000; 2001) e evidenciado pelos nossos ensaios de atividade α -glicosidase (vide seção 4.1), é importante também lembrar que a velocidade de hidrólise da maltose é pelo menos duas vezes superior a da maltotriose. Isso pode, portanto, explicar porque as atividades de transporte foram superiores em células crescidas em maltotriose apesar de os ensaios de citometria de fluxo e QRT-PCR não terem apontado maior expressão do *AGT1* durante a metabolização desse açúcar. Acredita-se que em virtude de a maltose ser hidrolisada mais rapidamente que a maltotriose, o que gera mais moléculas de glicose dentro das células por intervalo de tempo, a inativação catabólica dos transportadores seja mais forte durante o crescimento em maltose. Portanto, analisados em conjunto, nossos resultados indicam que, apesar de a capacidade de transporte das células que metabolizam a maltotriose ser sempre superior a das células crescidas em maltose, a maltotriose não pode ser considerada um indutor mais forte dos genes *MAL* quando comparada a maltose.

De fato, em concordância com nossos dados, já foi demonstrado que altas taxas de hidrólise de maltose são responsáveis pela inativação dos transportadores Malx1p em virtude da quantidade de moléculas de glicose geradas rapidamente no interior das células (GIBSON et al., 1997; HU et al., 1995; JIANG et al., 2000a; PENALVER et al., 1998). Essas moléculas de glicose presentes no citoplasma são rapidamente fosforiladas, promovendo a ativação do complexo Reg1p-Glc7p (GANCEDO et al., 1998; JIANG et al., 2000b; SANTANGELO et al., 2006). Este último, por sua vez, ativa as quinases Yck1p e Yck2p que, assim, fosforilam as permeases Malx1p promovendo abrupta perda de suas atividades (GADURA et al., 2006; JIANG et al., 2000b). Embora os mecanismos envolvidos na inativação das permeases Malx1p já estejam bem caracterizados (GADURA e MICHELS, 2006; GADURA et al., 2006; HATANAKA et al., 2009; JIANG et al., 2000a, 2000b; MEDINTZ et al., 1996, 1998; RIBALLO et al., 1995; STAMBUK, 2002), até o presente não foi comprovado que o transportador Agt1p seja inativado através dos mesmos mecanismos. Contudo, nossos resultados sugerem que, assim como os Malx1p, o transportador Agt1p também sofre inativação diante da presença de glicose. Seria, portanto, interessante investigar, em trabalhos futuros, os seus possíveis resíduos de aminoácidos envolvidos nessa inativação. Apesar de, ao realizarmos uma análise segundo o programa de computador desenvolvido por Rechsteiner e Rogers (1996), não termos encontrado uma sequência PEST na sequência de aminoácidos da permease Agt1p, já foi demonstrado que os transportadores Mtt1p, por exemplo, ao terem parte de sua extremidade C-terminal modificada, promoveram aumento da capacidade de transporte de maltotriose em células de *S. pastorianus* no final do processo fermentativo, sugerindo que essa modificação tenha proporcionado maior estabilidade dos transportadores na membrana (DIETVORST et al., 2005). Desse modo, apesar da aparente carência de uma sequência PEST, outros resíduos podem estar envolvidos com a perda da atividade da permease Agt1p diante da glicose gerada intracelularmente.

Embora a ativação do complexo Reg1p-Glc7p através da glicose gerada no citoplasma também possa reprimir a expressão dos genes *MAL*, nossos resultados sugerem que isso ocorra mais lentamente que a inativação dos transportadores, uma vez que, quando comparado ao crescimento em maltotriose, as células em maltose apresentaram menor atividade de transporte porém os mesmos (ou, no caso da cepa MC966A, maiores) níveis de expressão tanto dos genes *MALx1* como do gene *AGT1*. Vale lembrar que o processo de

inativação envolve, primeiramente, a fosforilação dos transportadores e que isso promove, rapidamente, a perda de suas atividades (GADURA et al., 2006; JIANG et al., 2000b). De acordo com os nossos resultados, os dados de Kodama et al. (1995) também demonstram que, diante da glicose, a fermentação da maltose é primariamente afetada pela inativação dos seus transportadores e não pela diminuição da expressão dos genes *MAL*.

Através da quantificação relativa dos transcritos de mRNA dos genes *MALx1* e *AGT1*, também foi possível avaliar a susceptibilidade das diferentes linhagens à repressão catabólica. Verificamos que, enquanto a expressão dos genes *MAL* é reprimida pela glicose nas cepas CEN.PK2-1C e MC966A, a cepa 1403-7A se mostrou insensível a essa repressão. De fato, já foi demonstrado que algumas linhagens podem expressar seus genes *MAL* mesmo na presença de glicose e que essa capacidade está vinculada ao regulador *MAL* que possuem (CHARRON e MICHELS, 1987; GIBSON et al., 1997; HIGGINS et al., 1999b; WANG e NEEDLEMAN, 1996). Nossos resultados, entretanto, vão além, demonstrando graus diferentes de sensibilidade à repressão promovida por essa hexose: o regulador *MAL23-8^c* (presente na cepa CEN.PK2-1C) apresentou sensibilidade total à repressão catabólica; o *MAL23* (MC966A), sensibilidade parcial; e o *MAL43^c* (1403-7A), completa insensibilidade à repressão pela glicose (Figuras 4.20, 4.21 e 4.22). Isso demonstra, conforme publicado (CHARRON e MICHELS, 1987; WANG e NEEDLEMAN, 1996), que a glicose não impede que o regulador codificado pelo gene *MAL43^c*, presente na cepa 1403-7A, se ligue à região *UAS_{MAL}* permitindo a expressão dos demais genes *MAL*. Essa insensibilidade apresentada pela cepa 1403-7A é promovida por uma mutação no sítio de ligação do repressor Mig1p da região promotora do regulador *MAL43^c* (WANG e NEEDLEMAN, 1996).

Foi sugerido por Day et al. (2002a) que a expressão dos genes *MPHx* é regulada do mesmo modo que a dos genes *MALx1* e que, portanto, os genes *MPHx* também são reprimidos diante da presença de glicose. Porém, nossos resultados demonstram que essa hexose não influencia a expressão desses genes, já que mesmo nas cepas CEN.PK2-1C e MC966A – as quais tiveram a expressão dos seus genes *MALx1* e *AGT1* reprimidos pela glicose – a expressão dos genes *MPHx* se mostrou igualmente elevada em glicose e em maltose. Assim, vemos que os mecanismos envolvidos na regulação da expressão dos genes *MPHx* não são exatamente os mesmos dos genes *MALx1* e *AGT1*.

Levando-se em consideração que para cada molécula de maltose ou maltotriose transportada, respectivamente, duas ou três moléculas de glicose entram na célula, nossos

ensaios de cinética de transporte – realizados com a linhagem 340-2B diante de um regulador constitutivo – indicam que o fluxo de moléculas de glicose que entram na via glicolítica durante a metabolização da maltotriose (157,59 μmol de glicose por grama de células por minuto) é o dobro da quantidade que entra durante a metabolização da maltose (76,86 μmol de glicose por g por min). Isso, portanto, explica a maior quantidade de etanol produzida por células da cepa 340-2B crescidas em maltotriose (Figuras 4.4 e 4.5).

Ainda com base nos resultados de cinética de transporte obtidos com a cepa 340-2B diante do regulador *MAL63^C*, pudemos também verificar que, embora a capacidade de transporte de maltose por células crescidas em maltose tenha sido bastante inferior à capacidade de hidrólise desse α -glicosídeo pelas mesmas células crescidas nas mesmas condições (311,85 μmol de glicose liberada por grama de células por minuto), no caso de células crescidas em maltotriose, a capacidade de transporte de maltotriose é praticamente a mesma que a de hidrólise desse açúcar (160,7 μmol de glicose liberada por g por min) – vide figuras 4.8 e 4.9. Assim, embora Zastrow et al. (2001) tenham considerado o transporte de maltotriose através da membrana plasmática como o passo limitante na sua fermentação, nossos resultados sugerem que, em células contendo um regulador *MAL* que garanta a expressão constitutiva do *AGT1*, o transporte desse açúcar deixa de ser limitante.

Os resultados que obtivemos após a transformação de cepas *MAL* constitutivas com um plasmídeo contendo o gene *AGT1* sob o controle de um promotor forte também se mostram em concordância com o discutido no parágrafo acima. Ao sobre-expressarmos o gene *AGT1* em uma cepa *MAL* induzível, verificamos incremento da fermentação de maltotriose pelas suas células. A mesma melhora, porém, não foi observada ao sobre-expressarmos esse gene em cepas *MAL* constitutivas (vide seção 4.2). Essa diferença de incremento da fermentação de maltotriose, contudo, pode ser explicada pelos nossos dados de QRT-PCR, os quais demonstram ser baixa a expressão do gene *AGT1* na linhagem *MAL* induzível (vide seção 4.3). Nesse caso, é esperado, portanto, que a sobre-expressão do *AGT1* promova, conforme observado, melhora mais significativa na cepa com menor expressão desse gene. Vale também ressaltar que a mesma relação observada para a cepa 340-2B com o plasmídeo pJW5 (que contém o regulador constitutivo) pôde também ser observada para uma das linhagens *MAL* constitutivas transformada com o plasmídeo contendo o *AGT1* sob o controle de um promotor forte. Para esta última linhagem, a $V_{\text{máx}}$ obtida com a cinética da atividade de transporte foi de 58,31 μmol de maltotriose transportada por grama de células

por minuto (Figura 4.14), o que equivale dizer um fluxo de 174,93 μmol de glicose por g por min. Assim, também para essa linhagem (1403-7A), a capacidade de transporte de maltotriose praticamente se iguala a de hidrólise desse α -glicosídeo nessa cepa (150,70 μmol de glicose liberada por grama de células por minuto – dados não mostrados). Portanto, esses resultados indicam que o aumento da expressão da permease Agt1p é incapaz de incrementar a fermentação da maltotriose em células que possuam um regulador *MAL* constitutivo. Em virtude de a expressão do transportador Agt1p ser naturalmente mais elevada nas linhagens *MAL* constitutivas, o transporte de maltotriose através da membrana plasmática dessas células deixa de ser limitante para a sua fermentação. É interessante ainda salientar que esses resultados corroboram os dados de um de nossos trabalhos recentes (STAMBUK et al., 2006), que demonstram que a transformação de uma cepa que utiliza a maltotriose apenas através da respiração celular (ou seja, sem produzir etanol) com um plasmídeo contendo o gene *AGT1* sob o controle de um promotor forte tornou-a capaz de fermentar esse açúcar. Contudo, a eficiência fermentativa dessa linhagem (estimada pelo rendimento de etanol, $Y_{e/s} \sim 0,39$) não foi superior a da cepa B01 (considerada uma boa fermentadora de maltotriose), mesmo esta última não contendo o plasmídeo que garante a sobre-expressão do *AGT1* ($Y_{e/s} \sim 0,41$).

Nos últimos anos, alguns estudos apresentaram estratégias para a otimização da fermentação de maltose e maltotriose por leveduras cervejeiras sem que isso envolvesse a sobre-expressão de seus transportadores. Houghton-Larsen e Brandt (2006), por exemplo, demonstraram que a deleção de alguns componentes do complexo COMPASS diminuiu o silenciamento dos genes *MAL* que ocorre no final do processo fermentativo e, conseqüentemente, promoveu um acréscimo de até 29% na produção final de etanol em mostos contendo altas concentrações de maltose. A presença de uma enzima capaz de hidrolisar extracelularmente esses dois α -glicosídeos de maneira eficiente também melhorou o rendimento de etanol ao proporcionar a diminuição da concentração de açúcar residual ao final da fermentação (DIETVORST et al., 2007; LIU et al., 2009). Enquanto Dietvorst et al. (2007) alcançaram esse maior rendimento através da fusão da maltase Mal32p com seqüências N- e C-terminal que garantiram sua secreção e seu ancoramento na parede celular, Liu et al. (2009) o obtiveram ao substituir o gene *PEP4*, que codifica uma protease vacuolar de *S. cerevisiae*, pelo gene *GAI* de *Saccharomycopsis fibuligera*, que codifica uma glucoamilase. Tendo isso em vista, pode-se afirmar que, ao serem combinadas,

estratégias como essas podem contribuir significativamente com a otimização da fermentação da maltotriose em setores industriais que dependam da eficiente utilização desse açúcar pelas células de *S. cerevisiae*.

Ao analisarmos a utilização de maltotriose por cepas industriais, curiosamente, observamos um fenótipo distinto do que, até o presente, se havia observado em células cultivadas nessa fonte de carbono: crescimento tardio (após extensa fase lag) e metabolização da maltotriose completamente (ou majoritariamente) através da respiração celular. Apesar de já se ter relatado que algumas leveduras consomem a maltotriose porém não a fermentam (ZASTROW et al., 2000; LONDESBOROUGH, 2001), tamanha fase lag nunca havia sido observada em células não reprimidas pela glicose (como, em nosso caso, em células pré-crescidas em maltose – conforme descrito em “Material e Métodos”).

Quando decidimos investigar o motivo do fenótipo peculiar mencionado acima, optamos por, inicialmente, seqüenciar o gene *AGT1* das linhagens que o exibiram, uma vez que sabíamos, através de nossos resultados, que a presença de uma permease Agt1p funcional promove rápido crescimento celular em maltotriose. Além disso, outros autores já haviam demonstrado que enquanto determinadas mutações podem contribuir com um aumento da capacidade de transporte de maltotriose, outras podem gerar proteínas truncadas (SMIT et al., 2007, 2008; VIDGREN et al., 2005). Com base nesse tema, é interessante, aqui, observarmos alguns pontos relacionados à diversidade alélica dos genes *MALx1* e *AGT1*, bem como à origem dos mesmos.

Trabalhos recentes – que apresentaram o seqüenciamento de novas espécies e linhagens de leveduras ou que objetivaram investigar a utilização de maltotriose em *S. cerevisiae* e *S. pastorianus* – proporcionaram o conhecimento de significativa variabilidade alélica do gene *AGT1* (CLIFTEN et al., 2003; KELLIS et al., 2003; NAKAO et al., 2009; SMIT et al., 2008; VIDGREN et al., 2005). Contribuíram também com esse conhecimento, pesquisadores que se propuseram a seqüenciar alelos do gene *AGT1* (de linhagens empregadas em diferentes setores industriais) e depositar as seqüências obtidas em bancos de dados (disponível em www.ncbi.nlm.nih.gov). De posse dessas seqüências publicadas, e das que obtivemos a partir do genoma das linhagens CAT-1, PE-2, CEN.PK2-1C e MC966A (vide seção 3.10 e Figura 4.26), construímos uma árvore filogenética utilizando, subsequente, os programas de computador ClustalW (disponível em www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html) e Dendroscope 2.3 (HUSON et al., 2007). Para

compor esse filograma, utilizamos também seqüências conhecidas (obtidas através da ferramenta NCBI-BLAST; disponível em www.ncbi.nlm.nih.gov/blast) de transportadores de α -glicosídeos de outras espécies de leveduras e até mesmo do fungo filamentoso *Aspergillus fumigatus*. Dessa forma, apesar de obtermos apenas uma vaga elucidação da história evolutiva do gene *AGT1*, conseguimos uma satisfatória representação da sua variabilidade alélica (Figura 5.1).

É reconhecido que o locus *MAL1*, que está localizado no cromossomo VII, é considerado o progenitor a partir do qual os demais loci *MAL* foram derivados. Por serem genes subteloméricos, acredita-se que a evolução dos genes *MAL* tenha acontecido através de vários eventos de translocação (CHARRON e MICHELS, 1988; CHARRON et al., 1989; HAN et al., 1995; NAUMOV et al., 1994). Ao avaliarem as regiões a montante e a jusante do gene *AGT1*, Han et al. (1995) sugeriram que dois eventos de recombinação foram responsáveis pela formação do locus *mal1g* que caracterizaram (onde o gene *AGT1* está localizado). O primeiro desses eventos foi a translocação da seqüência correspondente ao *AGT1* para a região subtelomérica do cromossomo VII (onde esse gene é encontrado naturalmente). O segundo, por sua vez, colocou, a montante do *AGT1*, o gene que codifica a maltase (nesse caso, o *MAL12*). O fato principal que impulsionou esses autores a chegarem a tal conclusão foi a avaliação da seqüência de nucleotídeos da região compreendida entre os genes *AGT1* e *MAL12*. Eles verificaram que, a montante do nucleotídeo -314 do promotor do *AGT1*, a seqüência é praticamente idêntica à região correspondente dos demais loci *MAL*. Porém, entre os nucleotídeos -1 e -314 (tanto do promotor do *AGT1* quanto dos genes *MALx1*), o grau de homologia é desprezível.

Em seu trabalho, contudo, Han et al. (1995) não conseguiram esclarecer a origem genômica do *AGT1*. Apesar disso, diante da região intergênica *AGT1-MAL12*, eles afirmaram que eventos de mutagênese ao acaso não podem ter originado o gene *AGT1* a partir do *MAL11*. De fato, com base no filograma da Figura 5.1, pode-se verificar que o evento que deu origem ao clado do gene *AGT1* – o qual está presente no locus *mal1g* (HAN et al. 1995) – foi contemporâneo ao que originou o clado dos genes *MALx1*. Assim, podemos inferir também que os genes *MALx1* e *AGT1* têm uma origem comum, mas não que o gene *AGT1* tenha sido originado a partir do *MAL11*, por exemplo, ou o contrário. Além disso, a divergência entre ambos os clados aconteceu muito antes da diversificação alélica dos mesmos. É importante salientar que os dados publicados por Jespersen et al. (1999) ajudam

a suportar essa especulação. Esses autores, ao localizarem transportadores de α -glicosídeos no genoma de diversas linhagens de cervejaria, observaram seqüências altamente homólogas ao *AGT1* nos cromossomos II e XI (alternadamente) de duas linhagens do tipo lager. Além disso, dentre as 30 linhagens analisadas por esses autores, 29 continham o gene *AGT1* no seu respectivo cromossomos VII. Desse modo, Jespersen et al. (1999) sugeriram que eventos semelhantes possam estar envolvidos na dispersão dos genes *MALx1* e *AGT1* do cromossomo VII para os demais cromossomos.

Retomando o foco em nos nossos resultados, vale lembrar que todas as mutações que encontramos no gene *AGT1* das linhagens CAT-1 e PE-2 (utilizadas na produção de etanol combustível – vide Tabela 3.1) já foram observadas, alternadamente, em permeases Agt1p funcionais encontradas em outras linhagens (Figura 4.26) e que, além disso, nossos resultados demonstraram que o crescimento tardio das mesmas em maltotriose está vinculado à falta de expressão da permease Agt1p e não às mutações em questão. Ao investigarmos essa falta de expressão, verificamos que essas linhagens não possuem a seqüência *UAS_{MAL}* na região promotora do *AGT1*. Pelo contrário, a região promotora do *AGT1* dessas cepas é, aparentemente, muito semelhante à encontrada em linhagens que pouco expressam esse gene (VIDGREN et al., 2009). Desse modo, percebe-se que a falta de expressão do *AGT1* nas cepas CAT-1 e PE-2 está vinculada à ausência da seqüência *UAS_{MAL}* no promotor desse gene, o que permitiria a ligação do regulador *MAL* e, conseqüentemente, a sua expressão. Vale recordar também que essa distinta região promotora, publicada por Vidgren et al. (2009), compartilha, entre os nucleotídeos -1 e -314, 99% de homologia com a seqüência previamente conhecida (HAN et al., 1995; www.yeastgenome.org). Porém, a montante do nucleotídeo -314, a homologia cai para menos de 10%.

É importante salientar que, através da ferramenta NCBI-BLAST (disponível em www.ncbi.nlm.nih.gov/blast), pudemos também verificar essa distinta região promotora (comentada no parágrafo acima) na cepa lager (*S. pastorianus*) W-34/70 e em outras duas linhagens de *S. cerevisiae* inteiramente seqüenciadas: M22 e RM11-1A (DONIGER et al., 2008; NAKAO et al., 2009; TÖRÖK et al., 1996; WEI et al., 2007). Contudo, diferentemente do que observamos nas linhagens CAT-1 e PE-2, as cepas W-34/70, M22 e RM11-1A apresentam permeases Agt1p truncadas (e, possivelmente, não funcionais) assim como a cepa lager A15, a partir da qual primeiramente se identificou a distinta região promotora em questão (VIDGREN et al., 2009).

FIGURA 5.1: Filograma de transportadores de α -glicosídeos em fungos. Para a construção do filograma, as seqüências de aminoácidos das permeases escolhidas foram inicialmente alinhadas através do software ClustalW (www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html). Em seguida, o arquivo com o alinhamento foi exportado para o software Dendroscope 2.3 (HUSON et al., 2007), onde as seqüências foram organizadas em filograma. O filograma é composto apenas por seqüências de transportadores funcionais. A seta preta aponta a raiz da árvore; a azul, a origem dos clados AGT1 e MALx1. As permeases não acompanhadas do nome da espécie representam *S. cerevisiae*. As permeases não acompanhadas nem mesmo do nome da cepa representam os primeiros ou os únicos alelos seqüenciados de cada gene. As permeases que seqüenciamos estão em negrito. Os ramos em azul representam os alelos de AGT1 de *S. cerevisiae*; em vermelho, de outras espécies. O AGT1 de *S. pastorianus* (um híbrido natural de *S. cerevisiae* e *S. bayanus*) presente no filograma é proveniente do genoma de *S. bayanus* que compõe esse híbrido natural. Os ramos ampliados (quadro em cinza-claro) estão marcados na árvore por um quadrado tracejado.

Comparando as seqüências de nucleotídeos das regiões promotoras do gene *AGT1* das linhagens M22, RM11-1A, W-34/70 e A15, observa-se, apesar da homologia acima de 90%, pequena diferença de tamanho entre elas. Isso pode, portanto, explicar a sutil diferença no tamanho dos produtos de PCR que obtivemos ao amplificarmos o promotor do *AGT1* das cepas CAT-1, PE-2 e W-34/70 utilizando primers desenhados com base na distinta região promotora recentemente identificada (vide Tabela 3.2 e seções 3.11 e 4.4). De maneira interessante, no mesmo contig onde encontramos essa região promotora na linhagem RM11-1A, pudemos também observar outros genes *MAL* dispostos diferentemente dos padrões já encontrados. Nesse contig pode-se observar ainda, além do gene *AGT1*, uma cópia de um gene *MALx1* capaz de codificar um transportador de maltose funcional e, inclusive, uma cópia extra de um gene *MALx3* que codifica um proteína truncada (Figura 5.2). Embora já tenham sido observadas cópias extras de genes *MAL* que codificam reguladores e/ou transportadores nos loci *MAL3* e *MAL6* (GIBSON et al., 1997; LEVINE et al., 1992; MICHELS et al., 1992), o arranjo encontrado no distinto locus *mal1g* da linhagem RM11-1A, até o presente, não havia sido descrito. A Figura 5.2 apresenta um esquema da disposição dos genes *MAL* no locus *mal1g* em questão.

FIGURA 5.2: Representação esquemática do locus *mal1g* da linhagem RM11-1A. As setas coloridas indicam a posição de cada gene *MAL* dentro do locus. Os genes em letras minúsculas codificam proteínas truncadas. O traço vermelho, a montante do *agt1*, indica os 1426 pb da distinta região promotora, recentemente identificada por Vidgren et al. (2009). O quadrado verde representa a seqüência *UAS_{MAL}*. Os números representam as distâncias entre os genes em kilobases.

Infelizmente, os contigs onde encontramos a nova região promotora do *AGT1* nas demais linhagens seqüenciadas (além da RM11-1A), por não terem o tamanho suficiente, não permitiram identificar os genes que estariam 2-3 kb a montante do *AGT1*. No entanto, com base nas informações do parágrafo acima, pode-se inferir que esse mesmo distinto locus *mal1g* possa estar também presente nas cepas CAT-1 e PE-2. Se for esse o caso, as hibridizações que observamos (através de *Southern Blotting*) para os genes *MALx1* e *AGT1* nos dois cromossomos VII dessas linhagens podem não indicar que ambos os cromossomos homólogos contenham, alternadamente, o gene *AGT1* e o *MAL11*, mas sim que cada um deles porte esses dois genes.

Ao prolongarmos o tempo de cultivo das linhagens de laboratório *agt1Δ*, verificamos também, em duas delas, o fenótipo de crescimento tardio em maltotriose sem produção de etanol. Esses resultados evidenciaram que, diante da falta da permease Agt1p na membrana plasmática das células de *S. cerevisiae*, as leveduras perdem a capacidade de fermentar a maltotriose ou até mesmo de consumi-la. Ao investigarmos esse crescimento tardio, verificamos que a hidrólise extracelular da maltotriose é responsável por ele.

Nossos dados de microarray deram indícios dessa hidrólise no exterior da célula ao apontarem, em células crescidas em maltotriose, expressão aumentada de hidrolases e de transportadores de hexose, porém não de transportadores de α -glicosídeos. É interessante ressaltar que os transportadores de hexose com expressão aumentada – Hxt4p, Hxt6p e Hxt7p – sabidamente possuem alta afinidade pela glicose e são expressos preferencialmente em baixas concentrações desse açúcar ou em sua ausência (ÖZCAN e JOHNSTON, 1999). Neste ponto, vale lembrar que, para os ensaios de microarray, foram hibridizadas simultaneamente com o biochip amostras de cDNA provenientes dos crescimentos da cepa LCM001 tanto em maltotriose quanto em glicerol, e que, essa última fonte de carbono, utilizada como controle, também caracteriza uma condição de ausência de glicose. Portanto, isso levava a crer que a hidrólise extracelular da maltotriose liberava, aos poucos, moléculas de glicose que, em baixas concentrações, induzia a expressão dos transportadores Hxtp acima (ÖZCAN e JOHNSTON, 1999).

Dentre as possíveis hidrolases apontadas pelo microarray, encontramos uma potencial α -glicosidase cuja ORF está situada entre duas potenciais regiões codificantes de transportadores de hexose: *HXT8* e *HXT9*. Essa ORF, YJL216C, está localizada ~800 pb a montante do *HXT8* e ~3 kb a jusante do *HXT9*. Condizente com a localização da mesma, os

mecanismos regulatórios envolvidos em sua expressão gênica são, aparentemente, os mesmos envolvidos na expressão do gene *HXT9*. No entanto, as condições em que esses genes são reconhecidamente expressos não se assemelham às que submetemos nossas células (HIKKEL et al., 2003; LUCAU-DANILA et al., 2003; NOURANI et al., 1997). De fato, em condições semelhantes às quais cultivamos as leveduras, já foi verificado que esses genes são expressos em níveis pouco significativos (ÖZCAN e JOHNSTON, 1999). Isso se suporta pelos nossos dados de microarray, os quais não apontaram, nas células cultivadas em maltotriose, expressão aumentada nem diminuída – em relação ao controle em glicerol – desses dois possíveis transportadores de glicose (dados não mostrados).

Embora com base no que se conheça a respeito da regulação gênica da ORF YJL216C não seja possível explicar a sua expressão aumentada em células crescidas em maltotriose, após a deletarmos do genoma da linhagem BSY09, entretanto, verificamos que a mesma é responsável pela hidrólise extracelular desse açúcar e, conseqüentemente, pelo crescimento tardio observado em células *agt1Δ* (ou que não contam com a expressão do *AGT1*) cultivadas nessa fonte de carbono. Desse modo, serão necessários outros trabalhos para elucidar os mecanismos envolvidos na regulação da expressão dessa ORF durante o crescimento tardio em maltotriose, bem como para melhor caracterizar a enzima por ela codificada. Apesar de maltases extracelulares já terem sido caracterizadas em espécies de leveduras como *Schizosaccharomyces pombe* (JANSEN et al., 2006), *Xanthophyllomyces dendrorhous* (MARIN et al., 2006) e *Saccharomycopsis fibuligera* (REISER e GASPERIK, 1995), até o presente, na espécie *S. cerevisiae*, somente as glucoamilases Staxp, presentes na variedade com atividade diastática (*S. cerevisiae* var. *diastaticus*), eram reconhecidamente capazes de hidrolisar a maltotriose (PRETORIUS et al., 1986). Com relação à enzima codificada pela ORF YJL216C, a qual foi apenas predita como α -glicosidase (VANDENBOL et al., 1994), resta conhecer seus substratos, além da maltotriose apontada neste trabalho, e quantificar a sua atividade α -glicosidase.

6 CONCLUSÕES

Os resultados apresentados neste trabalho permitem concluir que:

1. Em *Saccharomyces cerevisiae*, a presença da permease Agt1p na membrana plasmática das células é indispensável para a rápida utilização da maltotriose e para a conseqüente fermentação desse açúcar. Diante da ausência do gene *AGT1* ou da falta de expressão do mesmo, as células são incapazes de transportar esse açúcar através da membrana plasmática.
2. Diante da falta da permease Agt1p na membrana plasmática das células, dois fenótipos podem ser encontrados em maltotriose: ausência total de crescimento (mesmo após longos períodos de incubação) ou crescimento tardio sem produção de etanol. Em células que apresentam crescimento tardio, o consumo da maltotriose acontece através da sua hidrólise extracelular. Essa hidrólise é promovida pela α -glicosidase codificada pela ORF YJL216C.
3. A falta de expressão do *AGT1* em algumas linhagens está vinculada à ausência da sequência UAS_{MAL} no promotor desse gene. As cepas que carecem dessa sequência no promotor do *AGT1* possuem uma distinta região promotora em comum.
4. A presença de um regulador constitutivo tende a incrementar a atividade de transporte de maltotriose pelas células de *S. cerevisiae* e, conseqüentemente, o consumo e a fermentação desse α -glicosídeo. Esse incremento da atividade de transporte diante da presença de um regulador constitutivo faz com que o transporte da maltotriose através da membrana plasmática das células deixe de ser o fator limitante para a sua fermentação.
5. A maltotriose, assim como a maltose, precisa ser internalizada para induzir a expressão dos genes *MAL*.
6. Apesar de a maltotriose não poder ser considerada um indutor mais forte dos genes *AGT1* e *MALx1* que a maltose, a capacidade de transporte das células que metabolizam a maltotriose é sempre superior a das células crescidas em maltose.
7. Os diferentes alelos de reguladores *MAL* podem apresentar diferentes graus de sensibilidade à repressão pela glicose. Esse fato é de particular importância para a escolha de uma linhagem a ser empregada em um setor industrial onde hidrolisados de amido são utilizados.

Embora tenhamos identificado a α -glicosidase responsável pela hidrólise extracelular da maltotriose, novos trabalhos serão necessários para caracterizá-la. Essa caracterização poderá contribuir significativamente para a compreensão de formas alternativas de utilização de α -glicosídeos em *S. cerevisiae*.

Uma vez que nossos resultados demonstram que a capacidade de transporte e hidrólise de maltotriose é bastante inferior a observada para a maltose, seria também interessante encontrar alternativas para otimizar, ao mesmo tempo, esses dois primeiros passos do metabolismo de maltotriose nessas leveduras. Através de mutagênese sítio-dirigida, por exemplo, a afinidade tanto das maltases como dos transportadores Agt1p pela maltotriose poderia ser aumentada no intuito de obter maior fluxo de moléculas de glicose pela via glicolítica durante o metabolismo da maltotriose. Neste trabalho, foram também discutidas algumas estratégias, presentes na literatura, que poderiam contribuir com a otimização da fermentação de maltotriose em *S. cerevisiae*. Certamente, a linhagem construída com a combinação de duas ou mais dessas estratégias apresentaria maior eficiência fermentativa diante dos produtos de hidrólise do amido e, conseqüentemente, aumentaria a rentabilidade dos setores industriais que se dispusessem a utilizá-la.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHUATZI, D.; RIERA, A.; PELÁEZ, R.; HERRERO, P.; MORENO, F. Hxk2 regulates the phosphorylation state of Mig1 and therefore its nucleocytoplasmic distribution. **J. Biol. Chem.**, v. 282, p. 4485-4493, 2007.
- 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.
- 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.
- BARFORD, J. P.; HALL, R. J. An examination of the crabtree effect in *Saccharomyces cerevisiae*: the role of respiratory adaptation. **J. Gen. Microbiol.**, v. 114, p. 267-275, 1979.
- BASSO, L. C.; 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.
- 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.
- BATISTOTE, M.; DA CRUZ, S. H.; ERNANDES, J. R. Altered patterns of maltose and glucose fermentation by brewing and wine yeasts influenced by the complexity of nitrogen source. **J. Inst. Brew.**, v. 112, p. 84–91, 2006.
- BELL, P. J. L.; HIGGINS, V. J.; ATTFIELD, P. V. Comparison of fermentative capacities of industrial baking and wild-type yeasts of the species *Saccharomyces cerevisiae* in different sugar media. **Lett. Appl. Microbiol.**, v. 32, p. 224-229, 2001.
- BONIFACINO, J. S.; TRAUB, L. M. Signals for sorting of transmembrane proteins to endosomes and lysosomes. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 72, p. 395-447, 2003.
- BUSTURIA, A.; LAGUNAS, R. Identification of two forms of the maltose transport system in *Saccharomyces cerevisiae* and their regulation by catabolite inactivation. **Biochem. Biophys. Acta**, v. 820, p. 324-326, 1985.
- CÁCERES, A.; CÁRDENAS, A.; GALLEGO, M.; VALCÁRVEL, M. A continuous espectrophotometric system for the discrimination/determination of monosaccharides and oligoccharides in foods. **Anal. Chim. Acta**, v. 404, p. 121-129, 2000.

CASEY, G. P.; MAGNUS, C. A.; INGLEDEW, W. M. High-gravity brewing: effects of nutrition on yeast composition, fermentative ability and alcohol production. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 48, p. 639-646, 1984.

CHANG, Y. S.; DUBIN, R. A.; PERKINS, E.; FORREST, D.; MICHELS, C. A.; NEEDLEMAN, R. B. *MAL63* codes for a positive activator of maltose fermentation in *Saccharomyces cerevisiae*. **Curr. Genet.**, v. 14, p. 201-209, 1988.

CHANG, Y. S.; DUBIN, R. A.; PERKINS, E.; MICHELS, C. A.; NEEDLEMAN, R. B. Identification and characterization of the maltose permease in genetically defined *Saccharomyces* strain. **J. Bacteriol.**, v. 171, p. 6148-6154, 1989.

CHARRON, M. J.; DUBIN, R. A.; MICHELS, C. A. The constitutive glucose-repression-insensitive mutation of the yeast *MAL4* locus is an alteration of the *MAL3* gene. **Mol. Cell. Biol.**, v. 6, p. 3891-3899, 1986.

CHARRON, M. J.; MICHELS, C. A. The constitutive glucose-repression-insensitive mutation of the yeast *MAL4* locus is an alteration of the *MAL3* gene. **Genetics**, v. 116, p. 23-31, 1987.

CHARRON, M. J.; MICHELS, C. A. The naturally occurring alleles of *MAL1* in *Saccharomyces* species evolved by various mutagenic processes including chromosomal rearrangement. **Genetics**, v. 120, p. 83-93, 1988.

CHARRON, M. J.; READ, E.; HAUT, S. R.; MICHELS, C. A. Molecular evolution of the telomere associated *MAL* loci of *Saccharomyces*. **Genetics**, v. 122, p. 307-316, 1989.

CHENG, Q.; MICHELS, C. A. The maltose permease encoded by the *MAL61* gene of *Saccharomyces cerevisiae* exhibits both sequence and structural homology to other sugar transporters. **Genetics**, v. 123, p. 477-484, 1989.

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

CHU, Z.; LI, J.; ESHAGHI, M.; KARATURI, R. K.; LIN, K.; LIU, J. Adaptive expression responses in the Pol- γ null strain of *S. pombe* depleted of mitochondrial genome. **BMC Genomics**, v. 8, p. 323, 2007.

CLIFTEN, P.; SUDARSANAM, P.; DESIKAN, A.; FULTON, L.; FULTON, B.; MAJORS, J.; WATERSTON, R.; COHEN, B. A.; JOHNSTON, M. Finding functional features in *Saccharomyces* genomes by phylogenetic footprinting. **Science**, v. 301, p. 71-76, 2003.

D'AMORE, T.; RUSSELL, I.; STEWART, G. G. The effect of carbohydrate adjuncts on brewer's wort fermentation by *Saccharomyces uvarum* (*carlsbergensis*). **J. Inst. Brew.**, v. 95, p. 333-336, 1989.

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, C. L. Indústria cervejeira: um mercado em constante transformação. **Revista FAE Business**, v. 6, p. 50-53, 2003.

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

DAY, R. E.; ROGERS, P. J.; DAWES, I. W.; HIGGINS, V. J. Molecular analysis of maltotriose transport and utilization by *Saccharomyces cerevisiae*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 68, p. 5326-5335, 2002b.

DE DEKEN, R. H. The crabtree effect: a regulatory system in yeast. **J. Gen. Microbiol.**, v. 44, p. 149-156, 1966.

DELOM, F.; SZPONARSKI, W.; SOMMERER, N.; BOYER, J. C.; BRUNEAU, J. M.; ROSSIGNOL, M.; GIBRAT, R. The plasma membrane proteome of *Saccharomyces cerevisiae* and its response to the antifungal calcofluor. **Proteomics**, v. 6, p. 3029-3039, 2006.

DE VIT, M. J.; JOHNSTON, M. The nuclear exportin Msn5 is required for nuclear export of the Mig1 glucose repressor of *Saccharomyces cerevisiae*. **Curr. Biol.**, v. 9, p. 1231-41, 1999.

DE VIT, M. J.; WADDLE, J. A.; JOHNSTON, M. Regulated nuclear translocation of the Mig1 glucose repressor. **Mol. Biol. Cell.**, v. 8, p. 1603-18, 1997.

DE WINDE, J. H.; CRAUWELS, M.; HOHMANN, S.; THEVELEIN, J. M.; WINDERICKX, J. Differential requirements of the yeast sugar kinases for sugar sensing in establishing the catabolite-repressed state. **Eur. J. Biochem.**, v. 241, p. 633-643, 1996.

DIETVORST, J.; BLIECK, L.; BRANDT, R.; VAN DIJCK, P.; STEENSMA, H. Y. Attachment of MAL32-encoded maltase on the outside of yeast cells improves maltotriose utilization. **Yeast**, v. 24, p. 27-38, 2007.

DIETVORST, J.; LONDESBOROUGH, J.; STEENSMA, H. Y. Maltotriose utilization in lager yeast strains: *MTT1* encodes a maltotriose transporter. **Yeast**, v. 22, p. 775-788, 2005.

DONIGER, S. W.; KIM, H. S.; SWAIN, D.; CORCUERA, D.; WILLIAMS, M.; YANG, S. P.; FAY, J. C. A catalog of neutral and deleterious polymorphism in yeast. **PLoS Genet.**, v. 4, p. e1000183, 2008.

ELBING, K.; MCCARTNEY, R. R.; SCHMIDT, M. C. Purification and characterization of the three Snf1-activating kinases of *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochem. J.**, v. 393, p. 797-805, 2006.

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

ERNANDES, J. R.; WILLIAMS, J. W.; RUSSELL, I.; STEWART, G. G. Effect of yeast adaptation to maltose utilisation on sugar uptake during the fermentation of brewer's wort. **J. Inst. Brew.**, v. 99, p. 67-71, 1993.

FABRE, E.; MULLER, H.; THERIZOLS, P.; LAFONTAINE, I.; DUJON, B.; FAIRHEAD, C. Comparative genomics in hemiascomycetes yeast: evolution of sex, silencing and subtelomeres. **Mol. Biol. Evol.**, v. 22, p. 856-873, 2005.

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

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

GAGIANO, M.; BESTER, M.; VAN DIK, D.; FRANKEN, J.; BAUER, F. F.; PRETORIUS, I. S. Mss11p is a transcription factor regulating pseudohyphal differentiation, invasive growth and starch metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* in response to nutrient availability. **Mol. Microbiol.**, v. 47, p. 119-134, 2003.

GAGIANO, M.; VAN DIK, D.; BAUER, F. F.; LAMBRECHTS, M. G.; PRETORIUS, I. S. Msn1p/Mss10p, Mss11p and Muc1p/Flo11p are part of a signal transduction pathway downstream of Mep2p regulating invasive growth and pseudohyphal differentiation in *Saccharomyces cerevisiae*. **Mol. Microbiol.**, v. 31, p. 103-116, 1999.

GANCEDO, J. M. Yeast carbon catabolite repression. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 62, p. 334-361, 1998.

GIBSON, B. R.; LAWRENCE, S. J.; LESCLAIRE, J. P.; POWDEL, C. D.; SMART, K. A. Yeast responses to stresses associated with industrial brewery handling. **FEMS Microbiol. Rev.**, v. 31, p. 535-569, 2007.

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

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.

GIETZ, R. D.; WOODS, R. A. Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method. **Methods Enzymol.**, v. 350, p. 87-96, 2002.

GOLDENTHAL, M. J.; VANONI, M.; BUCHFERER, B.; MARMUR, J. Regulation of *MAL* gene expression in yeast: gene dosage effects. **Mol. Gen. Genet.**, v. 209, p. 508-517, 1987.

GUERRING, S. L.; CONNELLY, C.; HIETER, P. Positional mapping of genes by chromosome blotting and chromosome fragmentation. **Methods Enzymol.**, v. 194, p. 57-77, 1991.

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.

HARRIS, G.; THOMPSON, C. C. Uptake of nutrients by yeast. II. Maltotriose permease and the utilization of maltotriose by yeasts. **J. Inst. Brew.**, v. 66, p. 293-297, 1960.

HASEGAWA, S.; TAKIZAWA, M.; SUYAMA, H.; SHINTANI, T.; GOMI, K. Characterization and expression analysis of a maltose-utilizing (*MAL*) cluster in *Aspergillus oryzae*. **Fungal Genet. Biol.**, v. 47, p. 1-9, 2010.

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

HIGGINS, V. J.; BELL, P. J.; DAWES, I. W.; ATTFIELD, P. V. Generation of a novel *Saccharomyces cerevisiae* strain that exhibits strong maltose utilization and hyperosmotic resistance using nonrecombinant techniques. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 67, p. 4346-4348, 2001.

HIGGINS, V. J.; BRAIDWOOD, M.; BELL, P. J.; BISSINGER, P.; DAWES, I. W.; ATTFIELD, P. V. Genetic evidence that noninduced maltase and maltose permease activities, governed by *MALx3*-encoded transcriptional regulators, determine efficiency of gas production by baker's yeast in unsugared dough. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 65, p. 680-685, 1999a.

HIGGINS, V. J.; BRAIDWOOD, M.; BISSINGER, P.; DAWES, I. W.; ATTFIELD, P. V. Leu343Phe substitution in the Malx3 protein of *Saccharomyces cerevisiae* increases the constitutivity and glucose insensitivity of *MAL* gene expression. **Curr. Genet.**, v. 35, p. 491-498, 1999b.

HIKKEL, I.; LUCAU-DANILA, A.; DELAVEAU, T.; MARC, P.; DEVAUX, F.; JACO, C. A general strategy to uncover transcription factor properties identifies a new regulator of drug resistance in yeast. **J. Biol. Chem.**, v. 278, p. 11427-32, 2003.

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

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

HOUGHTON-LARSEN, J.; BRANDT, A. Fermentation of high concentrations of maltose by *Saccharomyces cerevisiae* is limited by the COMPASS methylation complex. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 72, p. 7176-7182, 2006.

HU, Z.; NEHLIN, J. O.; RONNE, H.; MICHELS, C. A. *MIG1*-dependent and *MIG1*-independent glucose regulation of *MAL* gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. **Curr. Genet.**, v. 28, p. 258-266, 1995.

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.

HUSON, D. H.; RICHTER, D. C.; RAUSCH, C.; DEZULIAN, T.; FRANZ, M.; RUPP, R. Dendroscope - An interactive viewer for large phylogenetic trees. **BMC Bioinformatics**, v. 8, p. 460, 2007.

JAMES, T. C.; CAMPBELL, S.; DONNELLY, D.; BOND, U. Transcriptional profile of brewery yeast under fermentation conditions. **J. Appl. Microbiol.**, v. 94, p. 432-448, 2003.

JANSEN, M. L.; KROOK, D. J.; DE GRAAF, K.; VAN DIJKEN, J. P.; PRONK, J. T.; DE WINDE, J. H. Physiological characterization and fed-batch production of an extracellular maltase of *Schizosaccharomyces pombe* CBS 356. **FEMS Yeast Res.**, v. 6, p. 888-901, 2006.

JESPERSEN, L.; CESAR, L. B.; MEADEN, P. G.; JAKOBSEN, M. Multiple α -glucoside transporter genes in brewer's yeast. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 65, p. 450-456, 1999.

JIANG, R.; CARLSON, M. Glucose regulates protein interactions within the yeast SNF1 protein kinase complex. **Genes Dev.**, v. 10, p. 3105-3115, 1996.

JIANG, H.; MEDINTZ, I.; MICHELS, C. A. Two glucose sensing/signaling pathways stimulate glucose-induced inactivation of maltose permease in *Saccharomyces*. **Mol. Biol.**, v. 8, p. 1293-1304, 1997.

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

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

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.

KELLIS, M.; PATTERSON, N.; ENDRIZZI, M.; BIRREN, B.; LANDER, E. S. Sequencing and comparison of yeast species to identify genes and regulatory elements. **Nature**, v. 423, p. 241-254, 2003.

KIM, M. D.; HONG, S. P.; CARLSON, M. Role of Tos3, a Snf1 protein kinase kinase, during growth of *Saccharomyces cerevisiae* on nonfermentable carbon sources. **Eukaryot Cell**, v. 4, p. 861-866, 2005.

KIM, J.; MICHELS, C. A. The MAL63 gene of *Saccharomyces* encodes a cysteine-zinc finger protein. **Curr. Genet.**, v. 14, p. 319-323, 1988.

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.

KROGAN, N. J.; DOVER, J.; KHORRAMI, S.; GREENBLATT, J. F.; SCHNEIDER, J.; JOHNSTON, M.; SHILATIFARD, A. COMPASS, a histone H3 (lysine 4) methyltransferase required for telomeric silencing of gene expression. **J. Biol. Chem.**, v. 277, p. 10753–10755, 2002.

LAGUNAS, R. Sugar transport in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiol. Ver.**, v. 104, p. 229-242, 1993.

LEVINE, J.; TANOUYE, L.; MICHELS, C. A. The UAS_{MAL} 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.

LIU, X. F.; WANG, Z. Y.; WANG, J. J.; LU, Y.; HE, X. P.; ZHANG, B. R. Expression of *GAI* gene and disruption of *PEP4* gene in an industrial brewer's yeast strain. **Lett. Appl. Microbiol.**, v. 49, p. 117-123, 2009.

LONDESBOROUGH, J. Fermentation of maltotriose by brewer's and baker's yeast. **Biotechnol Lett.**, v. 23, p. 1995–2000, 2001.

LUCAU-DANILA, A.; DELAVEAU, T.; LELANDAIS, G.; DEVAUX, F.; JACQ, C. Competitive promoter occupancy by two yeast paralogous transcription factors controlling the multidrug resistance phenomenon. **J. Biol. Chem.**, v. 278, p. 52641-50, 2003.

LUDIN, K.; JIANG, R.; CARLSON, M. Glucose-regulated interaction of a regulatory subunit of protein phosphatase 1 with the Snf1 protein kinase in *Saccharomyces cerevisiae*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 95, p. 6245-50, 1998.

MARÍN, D.; LINDE, D.; FERNÁNDEZ LOBATO, M. Purification and biochemical characterization of an α -glucosidase from *Xanthophyllomyces dendrorhous*. **Yeast**, v. 23, p. 117-125, 2006.

MCCARTNEY, R. R.; SCHMIDT, M. C. Regulation of Snf1 kinase. Activation requires phosphorylation of threonine 210 by an upstream kinase as well as a distinct step mediated by the Snf4 subunit. **J. Biol. Chem.**, v. 276, p. 36460-36466, 2001.

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.; JIANG, H.; MICHELS, C. A. The role of ubiquitin conjugation in glucose-induced proteolysis of *Saccharomyces* maltose permease. **J. Biol. Chem.**, v. 273, p. 34454-34462, 1998.

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.

MENESES, F. J.; JIRANEK, V. Expression patterns of genes and enzymes involved in sugar catabolism in industrial *Saccharomyces cerevisiae* strains displaying novel fermentation characteristics. **J. Inst. Brew.**, v. 108, p. 322-335, 2002.

MICHELS, C. A.; NEEDLEMAN, R. B. The dispersed, repeated family of *MAL* loci in *Saccharomyces* spp. **J. Bacteriol.**, v. 157, p. 949-952, 1984.

MICHELS, C. A.; READ, E.; NAT, K.; CHARRON, M. J. The telomere-associated *MAL3* locus of *Saccharomyces* is a tandem array of repeated genes. **Yeast**, v. 8, p. 655-665, 1992.

MORENO, F.; AHUATZI, D.; RIERA, A.; PALOMINO, C. A.; HERRERO, P. Glucose sensing through the Hxk2-dependent signalling pathway. **Biochem. Soc. Trans.**, v. 33, p. 265-268, 2005.

MORTIMER, R. K.; JOHNSTON, J. R. Genealogy of principal strains of the yeast genetic stock center. **Genetics**, v. 113, p. 35-43, 1986.

MUELLER, J. E.; CANZE, M.; BRYK, M. The requirement for COMPASS and Paf1 in transcriptional silencing and methylation of histone H3 in *Saccharomyces cerevisiae*. **Genetics**, v. 173, p. 557-567, 2006.

NAKAGAWA, S.; OUCHI, K. Construction from a single parent of baker's yeast strains with high freeze tolerance and fermentative activity in both lean and sweet doughs. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 60, p. 3499-502, 1994.

NAKAO, Y.; KANAMORI, T.; ITOH, T.; KODAMA, Y.; RAINIERI, S.; NAKAMURA, N.; SHIMONAGA, T.; HATTORI, M.; ASHIKARI, T. Genome sequence of the lager brewing yeast, an interspecies hybrid. **DNA Res.**, v. 16, p. 115-129, 2009.

NATH, N.; MCCARTNEY, R. R.; SCHMIDT, M. C. Yeast Pak1 kinase associates with and activates Snf1. **Mol. Cell. Biol.**, v. 23, p. 3909-39017, 2003.

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.

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

NEEDLEMAN, R. B.; MICHELS, C. A. Repeated family of genes controlling maltose fermentation in *Saccharomyces carlsbergensis*. **Mol. Cell. Biol.**, v. 3, p. 796-802, 1983.

NEEDLEMAN, R. B.; KABACK, D. B.; DUBIN, R. A.; PERKINS, E. L.; ROSENBERG, N. G.; SUTHERLAND, K. A.; FORREST, D. B.; MICHELS, C. A. *MAL6* of *Saccharomyces*: a complex

genetic locus containing three genes required for maltose fermentation. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 81, p. 2811-2815, 1984.

NOURANI, A.; WESOŁOWSKI-LOUVEL, M.; DELAVEAU, T.; JACO, C.; DELAHODDE, A. Multiple-drug-resistance phenomenon in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: involvement of two hexose transporters. **Mol. Cell. Biol.**, v. 17, p. 5453-60, 1997.

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. Role of the yeast maltose fermentation genes in CO₂ production rate from sponge dough. **Food Microbiol.**, v. 7, p. 43-47, 1990.

ÖZCAN, S.; JOHNSTON, M. Function and regulation of yeast hexose transporters. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 63, p. 554-569, 1999.

PEÑALVER, E.; LUCERO, P.; MORENO, E.; LAGUNAS, R. Catabolite inactivation of the maltose transporter in nitrogen-starved yeast could be due to the stimulation of general protein turnover. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 166, p. 317-324, 1998.

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

POSTMA, E.; VERDUYN, C.; SCHEFFERS, W. A.; VAN DIJKEN, J. P. Enzymic analysis of the Crabtree effect in glucose-limited cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 55, p. 468-477, 1989.

PRETORIUS, I. S.; MODENA, D.; VANONI, M.; ENGLARD, S.; MARMUR, J. Transcriptional control of glucoamylase synthesis in vegetatively growing and sporulating *Saccharomyces* species. **Mol. Cel. Biol.**, v. 6, p. 3034-3041, 1986.

QUEROL, A.; BOND, U. The complex and dynamic genomes of industrial yeasts. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 293, p. 1-10, 2009.

RAN, F.; BALI, M.; MICHELS, C. A. Hsp90/Hsp70 chaperone machine regulation of the *Saccharomyces* MAL-activator as determined *in vivo* using noninducible and constitutive mutant alleles. **Genetics**, v. 179, p. 331-343, 2008.

RAUTIO, J.; LONDESBOROUGH, J. Maltose transport by brewer's yeasts in brewer's wort. **J. Inst. Brew.**, v. 109, p. 251-261, 2003.

RECHSTEINER, M.; ROGERS, S. W. PEST sequences and regulation by proteolysis. **Trends Biochem. Sci.**, v. 21, p. 267-271, 1996.

REISER, V.; GASPERÍK, J. Purification and characterization of the cell-wall-associated and extracellular α -glucosidases from *Saccharomycopsis fibuligera*. **Biochem. J.**, v. 308, p. 753-760, 1995.

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.

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

ROSE, M.; ALBIG, W.; ENTIAN, K. D. Glucose repression in *Saccharomyces cerevisiae* is directly associated with hexose phosphorylation by hexokinases PI and PII. **Eur. J. Biochem.**, v. 199, p. 511-518, 1991.

RUSCHE, L. N.; KIRCHMAIER, A. L.; RINE, J. The establishment, inheritance, and function of silenced chromatin in *Saccharomyces cerevisiae*. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 72, p. 481-516, 2003.

RUSSEL, I.; STEWART, G. G. Transformation of maltotriose uptake ability into a haploid strain of *Saccharomyces* spp. **J. Inst. Brew.**, v. 86, p. 55-59, 1979.

SALEMA-OOM, M.; PINTO, V. V.; GONÇALVES, P.; SPENCER-MARTINS, I. Maltotriose utilization by industrial *Saccharomyces* strains: characterization of a new member of the α -glucoside transporter family. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 71, p. 5044-5049, 2005.

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

SAMUEL, D. Investigation of ancient Egyptian baking and brewing methods by correlative microscopy. **Science**, v. 273, p. 488-490, 1996.

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

SANZ, P.; NIETO, A.; PRIETO, J. A. Glucose repression may involve processes with different sugar kinase requirements. **J. Bacteriol.**, v. 178, p. 4721-4723, 1996.

SERRANO, R. Energy requirements for maltose transport in yeast. **Eur. J. Biochem.**, v. 80, p. 97-102, 1977.

SCHULLER, H. J. Transcriptional control of nonfermentative metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Curr. Genet.**, v. 43, p. 139-60, 2003.

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

SMIT, A.; CORDERO-OTERO, R. R.; PRETORIUS, I. S. Differences among AGT1-encoded α -glucoside transporters and their ability to transport maltotriose in *Saccharomyces* yeasts. **Ann. Microbiol.**, v. 57, p. 77-84, 2007.

SMIT, A.; MOSES, S. G.; PRETORIUS, I. S.; CORDERO OTERO, R. R. The Thr505 and Ser557 residues of the AGT1-encoded α -glucoside transporter are critical for maltotriose transport in *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Appl. Microbiol.**, v. 104, p. 1103-1111, 2008.

STAMBUK, B. U. A simple experiment illustrating metabolic regulation: induction versus repression of yeast α -glucosidase. **Biochem. Educ.**, v. 27, p. 177-180, 1999.

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.; ALVES, S. L. JR.; HOLLATZ, C.; ZASTROW, C. R. Improvement of maltotriose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. **Lett. Appl. Microbiol.**, v. 43, p. 370-376, 2006.

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

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

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

STAMBUK, B. U.; DE ARAÚJO, P. S.; PANEK, A. D.; SERRANO, R. Kinetics and energetics of trehalose transport in *Saccharomyces cerevisiae*. **Eur. J. Biochem.**, v. 237, p. 876-881, 1996.

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

STEWART, G. G.; ERRATT, J.; GARRISON, I.; GORING, T.; HANCOCK, I. Studies on the utilization of wort carbohydrates by brewer's yeast strains. **Tech. Q. Master Brew. Assoc. Am.**, v. 16, p. 1-7, 1979.

SUTHERLAND, C. M.; HAWLEY, S. A.; MCCARTNEY, R. R.; LEECH, A.; STARK, M. J.; SCHMIDT, M. C.; HARDIE, D. G. Elm1p is one of three upstream kinases for the *Saccharomyces cerevisiae* SNF1 complex. **Curr. Biol.**, v. 13, p. 1299-305, 2003.

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

TÖRÖK, T.; MORTIMER, R. K.; ROMANO, P.; SUZZI, G.; POLSINELLI, M. Quest for wine yeasts - An old story revisited. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.**, v. 17, p. 303-313, 1996.

VANDENBOL, M.; DURAND, P.; BOLLE, P. A.; DION, C.; PORTETELLE, D.; HILGER, F. Sequence analysis of a 40.2 kb DNA fragment located near the left telomere of yeast chromosome X. **Yeast**, v. 10, p. 1657-1662, 1994.

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

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

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.

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

VANONI, M.; SPLITTI, P.; GOLDENTHAL, M.; MARMUR, J. Structure and regulation of the multigene family controlling maltose fermentation in budding yeast. **Progr. Nucl. Acid Res. Mol. Biol.**, v. 37, p. 281-322, 1989.

VENTURINI FILHO, W. G.; CEREDA, M. P. Cerveja. In: AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A. (Eds.). **Biotecnologia industrial: biotecnologia na produção de alimentos**. São Paulo: Edgard Blücher, 2001. v. 4. Cap. 4, p. 91-144.

VIDGREN, V.; HUUSKONEN, A.; VIRTANEN, H.; RUOHONEN, L.; LONDESBOROUGH, J. Improved fermentation performance of a lager yeast after its *AGT1* maltose and maltotriose transporter genes. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 75, p. 2333-2345, 2009.

VIDGREN, V.; RUOHONEN, L.; LONDESBOROUGH, J. Characterization and functional analysis of the *MAL* and *MPH* loci for maltose utilization in some ale and lager yeast strains. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 71, p. 7846-7857, 2005.

VIIGAND, K.; ALAMÄE, T. Further study of the *Hansenula polymorpha* MAL locus: characterization of the alpha-glucoside permease encoded by the HpMAL2 gene. **FEMS Yeast Res.**, v. 7, p. 1134-1144, 2007.

VIIGAND, K.; TAMMUS, K.; ALAMÄE, T. Clustering of MAL genes in *Hansenula polymorpha*: cloning of the maltose permease gene and expression from the divergent intergenic region between the maltose permease and maltase genes. **FEMS Yeast Res.**, v. 5, p. 1019-1028, 2005.

VITOLO, M. Aplicações de enzimas na tecnologia de alimentos. In: AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A. (Eds.). **Biotecnologia industrial: biotecnologia na produção de alimentos**. São Paulo: Edgard Blücher, 2001. v. 4. Cap. 14, p. 387-420.

VITTI, P. Pão. In: AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A. (Eds.). **Biotecnologia industrial: biotecnologia na produção de alimentos**. São Paulo: Edgard Blücher, 2001. v. 4. Cap. 13, p. 365-386.

VIVIER, M. A.; SOLLITTI, P.; PRETORIUS, I. S. Functional analysis of multiple AUG codons in the transcripts of the *STA2* glucoamylase gene from *Saccharomyces cerevisiae*. **Mol. Gen. Genet.**, v. 261, p.11-20, 1999.

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.

WANG, X.; BALI, M.; MEDINTZ, I.; MICHELS, C. A. Intracellular maltose is sufficient to induce *MAL* gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. **Eukariot. Cell**, v. 1, p. 696-703, 2002.

WANG, X.; MICHELS, C. A. Mutations in *SIN4* and *RGR1* cause constitutive expression of *MAL* structural genes in *Saccharomyces*. **Genetics**, v. 168, p. 747-757, 2004.

WEI, W.; MCCUSKER, J. H.; HYMAN, R. W.; JONES, T.; NING, Y.; CAO, Z.; GU, Z.; BRUNO, D.; MIRANDA, M.; NGUYEN, M.; WILHELMY, J.; KOMP, C.; TAMSE, R.; WANG, X.; JIA, P.; LUEDI, P.; OEFNER, P. J.; DAVID, L.; DIETRICH, F. S.; LI, Y.; DAVIS, R. W.; STEINMETZ, L. M. Genome sequencing and comparative analysis of *Saccharomyces cerevisiae* strain YJM789. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 104, p. 12825-12830, 2007.

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.

WILLAERT, R. Sugar consumption kinetics by brewer's yeast during the primary beer fermentation. **Cerevisia.**, v. 26, p. 43-49, 2001.

YE, L.; KRUCKEBERG, A. L.; BERDEN, J. A.; VAN DAM, K. Growth and glucose repression are controlled by glucose transport in *Saccharomyces cerevisiae* cells containing only one glucose transporter. **J. Bacteriol.**, v. 181, p. 4673-4675, 1999.

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

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

ZHENG, X.; D'AMORE, T.; RUSSELL, I.; STEWART, G. G. Factors influencing maltotriose utilization during brewery wort fermentations. **J. Am. Soc. Brew. Chem.**, v. 52, p. 41-47, 1994.

APÊNDICE

Publicações vinculadas a este doutoramento:

ALVES, S.L. JR.; HERBERTS, R.A.; HOLLATZ, C.; MILETTI, L.C.; STAMBUK, B.U. Maltose and maltotriose active transport and fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Am. Soc. Brew. Chem.**, v. 65, p. 99-104, 2007.

ALVES, S.L. JR.; HERBERTS, R.A.; HOLLATZ, C.; TRICHEZ, D.; MILETTI, L.C.; DE ARAÚJO, P.S.; STAMBUK, B.U. Molecular analysis of maltotriose active transport and fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*: a determinant role for the *AGT1* permease. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 74, p. 1494-1501, 2008.

DUVAL, E.H.; **ALVES, S.L. JR.**; DUNN, B.; SHERLOCK, G.; STAMBUK, B.U. Microarray karyotyping of maltose-fermenting *Saccharomyces* yeasts with differing maltotriose utilization profiles reveals copy number variation in genes involved in maltose and maltotriose utilization. **J. Appl. Microbiol.** no prelo. 2009.

STAMBUK, B.U.; **ALVES, S.L. JR.**; HOLLATZ, C.; ZASTROW, C.R. Improvement of maltotriose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. **Lett. Appl. Microbiol.**, v. 43, p. 370-376, 2006.

Publicações não vinculadas a este doutoramento:

BADOTTI, F.; DÁRIO, M.G.; **ALVES, S.L. JR.**; CORDIOLI, M.L.; MILETTI, L.C.; DE ARAÚJO, P.S.; STAMBUK, B.U. Switching the mode of sucrose utilization by *Saccharomyces cerevisiae*. **Microb. Cell. Fact.**, v. 7, p. 4., 2008.

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