

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA**

Gabriela Müller

**ENGENHARIA GENÔMICA DE LINHAGEM INDUSTRIAL DE
SACCHAROMYCES CEREVISIAE VISANDO MELHORAR A
FERMENTAÇÃO DE SACAROSE PARA A PRODUÇÃO DE
ÁLCOOL COMBUSTÍVEL NO BRASIL**

Florianópolis

2013

Gabriela Müller

**ENGENHARIA GENÔMICA DE LINHAGEM INDUSTRIAL DE
SACCHAROMYCES CEREVISIAE VISANDO MELHORAR A
FERMENTAÇÃO DE SACAROSE PARA A PRODUÇÃO DE
ÁLCOOL COMBUSTÍVEL NO BRASIL**

Tese submetida ao Programa de Pós
Graduação em Bioquímica para a
obtenção do Grau de Doutora em
Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Boris U. Stambuk

Florianópolis

2013

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Müller, Gabriela
Engenharia genômica de linhagem industrial de
Saccharomyces cerevisiae visando melhorar a fermentação de
sacarose para produção de álcool combustível no Brasil /
Gabriela Müller ; orientador, Boris Ugarte Stambuk -
Florianópolis, SC, 2013.
123 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-
Graduação em Bioquímica.

Inclui referências

1. Bioquímica. 2. fermentação sacarose. 3. engenharia
genômica. 4. leveduras. 5. álcool combustível. I. Stambuk,
Boris Ugarte . II. Universidade Federal de Santa Catarina.
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. III. Título.

**“Engenharia genômica de linhagem industrial de
Saccharomyces cerevisiae visando melhorar a fermentação de
sacarose para a produção de álcool combustível no Brasil”
por**

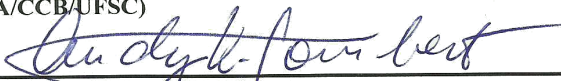
GABRIELA MÜLLER

Tese julgada e aprovada em sua forma final
pelos membros titulares da Banca
Examinadora (Port. 14/PPGBQA/2013) do
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica
- UFSC, composta pelos Professores
Doutores:

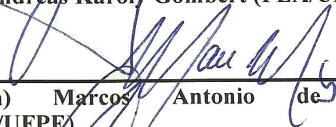
Banca Examinadora:



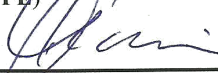
**Prof(a) Dr(a) Boris Juan Carlos Ugarte Stambuk
(BQA/CCB/UFSC)**



Prof(a) Dr(a) Andreas Karoly Gombert (FEA/UNICAMP)



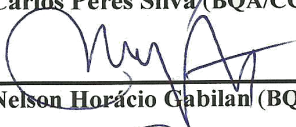
**Prof(a) Dr(a) Marcos Antonio de Morais Júnior
(Genética/CCB/UFPE)**



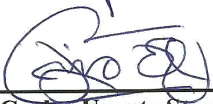
Prof(a) Dr(a) Angélica Francesca Maris (BEG/CCB/UFSC)



Prof(a) Dr(a) Carlos Peres Silva (BQA/CCB/UFSC)



Prof(a) Dr(a) Nelson Horácio Cabilan (BQA/CCB/UFSC)



**Prof. Dr. Boris Juan Carlos Ugarte Stambuk
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica**

Florianópolis, 23 de abril de 2013

Dedico esta Tese de Doutorado às pessoas mais importantes na minha vida, minha família, pois sem vocês nada disso teria sido possível! Hélio, Neusa e Marina obrigada por tudo hoje e sempre. Com amor!

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais Hélio e Neusa Müller, pela confiança e dedicação. Obrigada por tudo!

Agradeço a minha irmã Marina Müller, por sempre estar disposta a me escutar por horas no telefone e ter sempre uma palavra de incentivo. Você é um grande exemplo de superação e conquistas.

Agradeço ao meu orientador, Prof. Boris Stambuk, pela oportunidade de realizar este trabalho sob sua orientação. Obrigada pela amizade construída nestes 4 anos, pelos ensinamentos e por acreditar em mim.

Agradeço, em especial, ao colega Victor Ribeiro de Goddoy, companheiro de experimentos e experiências. Obrigada por estar presente nestes quase quatro anos, sempre alerta. Incontáveis finais de semanas e noites passadas no laboratório. Certamente sem a sua ajuda, as coisas teriam sido mais difíceis. Obrigada!

As amigas queridas Débora, Catarina, Adriane, Belisa, Alice, Mylena e Eduarda pela amizade plena e alegrias, além das geladas nos finais de expediente e praias nos finais de semana. Foi muito bom passar esses anos com vocês.

Agradeço aos colegas do Laboratório de Biologia Molecular e Biotecnologia de Leveduras (LBMBL) da UFSC pelo companheirismo e excelentes discussões a cerca dos nossos trabalhos.

As amigas Incomodativas, que sempre presentes nos invernos mais frios e nos calorosos verões. Não discutimos sobre ciência, mas certamente me ajudaram a me tornar uma pessoa melhor.

Agradeço à CAPES por me conceder a bolsa de estudo, ao CNPq, à FINEP, à JICA e à Usina Cerradinho - Açúcar, Etanol e Energia S/A pelo auxílio financeiro aos nossos projetos.

Se um dia tiver que escolher entre o mundo e o amor...lembre-se: Se escolher o mundo ficará sem o amor, mas se escolher o amor com ele você conquistará o mundo!

Albert Einstein

RESUMO

Leveduras *S. cerevisiae* tem sido amplamente utilizadas em diversos processos industriais como a produção de bebidas alcoólicas, etanol combustível e alimentos graças à sua capacidade de fermentar açúcares eficientemente, mesmo em condições industriais. No Brasil, o etanol combustível é produzido a partir da fermentação do caldo de cana-de-açúcar ou melão, contendo altas concentrações de sacarose. A principal via de utilização da sacarose pela levedura *S. cerevisiae* é através da hidrólise extracelular do açúcar, pela ação da enzima extracelular (codificada pelos genes *SUC*), gerando monômeros de glicose mais frutose no meio de fermentação. Entretanto, a hidrólise extracelular do dissacarídeo apresenta algumas desvantagens, pois contribui para incrementar o estresse osmótico das células, além de que os monossacarídeos liberados no meio podem servir de fonte de carbono para microrganismos contaminantes do processo fermentativo. Já foi descrito uma via alternativa de utilização da sacarose por *S. cerevisiae*, que consiste no transporte ativo deste dissacarídeo pelo simporte com prótons H^+ mediado pelo transportador *AGT1*, e posterior hidrólise intracelular pela ação de hidrolases como a invertase intracelular ou α -glicosidases. Esta via de utilização de sacarose é uma alternativa interessante, pois as células fermentariam a sacarose com maior eficiência para compensar o gasto energético do transporte do açúcar, gerando mais etanol. No presente trabalho, a levedura industrial diplóide CAT-1, isolada de dornas de fermentação, foi modificada genomicamente de forma a utilizar a sacarose somente por meio do transporte ativo e hidrólise intracelular. Para tal fim, foram construídas leveduras que expressassem constitutivamente a forma intracelular da invertase (*P_{ADH1}::iSUC2*) sem expressar a invertase extracelular (por exemplo através da deleção da segunda cópia do gene, *suc2Δ*), além da sobre-expressão do gene *AGT1*, característica indispensável para o funcionamento da via proposta. Com estas modificações inseridas nas leveduras industriais GMY08 e GMY15 foram obtidos incrementos na produção de etanol de aproximadamente 13%, redução de 50% na formação de glicerol, além de não haver o acúmulo de glicose e frutose no meio de fermentação. Para a aplicação direta das leveduras modificadas na indústria, foi necessário remover os marcadores heterólogos, submetendo as leveduras a diversos eventos de transformação e remoção de plasmídeos, que culminaram numa diminuição de 30% na atividade invertase intracelular. Por outro lado, a seleção de clones em meio rico contendo sacarose e antimicina A, fez com que a atividade de transporte de sacarose aumentasse 4 vezes em relação às linhagens parentais. Estas linhagens geneticamente modificadas sem marcadores (GMYwo) apresentaram um fenótipo de utilização lenta da sacarose, porém com um maior rendimento na conversão de substrato a etanol em relação a linhagem parental CAT-1. Também não foi observada secreção de glicerol, nem a presença de glicose e frutose extracelular. Estas leveduras geneticamente modificadas sem a presença de genes marcadores heterólogos poderão ser utilizadas para testes com mostos e condições industriais, como sistemas fermentativos de batelada alimentada com reciclo de células, contribuindo para aumentar a eficiência deste setor industrial.

Palavras-chave: *S. cerevisiae*, leveduras industriais, sacarose, engenharia genômica, *SUC2*, *AGT1*.

ABSTRACT

Saccharomyces cerevisiae yeasts have been largely employed in various industrial processes such as production of alcoholic beverages or fuel ethanol due to their ability to ferment sugars efficiently, even under industrial conditions. In Brazil, fuel ethanol is produced from the fermentation of sugarcane juice or molasses, containing high concentrations of sucrose. The main pathway of sucrose utilization by *S. cerevisiae* yeasts is through extracellular hydrolysis of the sugar, by the action of the extracellular enzyme invertase (encoded by *SUC* genes), generating monomers of glucose plus fructose in the fermentation medium. However, the extracellular hydrolysis of the disaccharide is undesirable, since it contributes to increase the osmotic stress of cells, and the monosaccharides released into the medium can serve as carbon source for contaminant microorganisms of the fermentation process. An alternative pathway for sucrose utilization by *S. cerevisiae* has been described, involving the active transport of the disaccharide by H⁺ symport mediated by the *AGT1* transporter, and subsequent intracellular hydrolysis by the action of hydrolases such as the intracellular invertase or α -glucosidase. This pathway of sucrose utilization is an interesting alternative, since the cells will ferment sucrose more efficiently to compensate the energy costs of transporting the sugar, producing more ethanol. In this study, the diploid industrial yeast CAT-1, isolated from fermentation vats, was genomically modified in order to utilize sucrose only by active transport and intracellular hydrolysis. To this end, yeasts were constructed that constitutively express the intracellular form of invertase (*P_{ADH1}::iSUC2*) without expressing the extracellular invertase (by deleting, for instance, the second copy of the gene, *suc2Δ*), besides over-expressing the *AGT1* gene, an indispensable characteristic for the function of the proposed pathway. With these modifications inserted into the industrial yeasts GMY08 and GMY15 approximately 13% higher ethanol production levels were obtained, 50% reduction in the production of glycerol, besides no accumulation of glucose and fructose in the fermentation medium. For the direct application of the modified yeasts in industry, it was necessary to remove the heterologous markers by submitting the yeasts to several transformation events and removal of plasmids, which resulted in a 30% decrease in the intracellular invertase activity. Moreover, selection of clones in rich medium containing sucrose and antimycin A, allowed a four-fold increase in the sucrose transport activity compared to the parental strains. These genetically modified strains without markers (GMYwo) showed a slow sucrose utilization phenotype, although with higher substrate to ethanol conversion yields when compared to the parental strain CAT-1. It was also observed no secretion of glycerol, nor the presence of extracellular glucose and fructose. These genetically modified yeasts without the presence of heterologous gene markers can be readily used for testing musts and industrial conditions, such as fed-batch fermentation systems with cell recycle, contributing to increase the efficiency of this industrial sector.

Keywords: *S. cerevisiae*, industrial yeast, sucrose, genomic engineering, *SUC2*, *AGT1*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Estrutura tridimensional da enzima invertase de <i>S. cerevisiae</i> (SAINZ-POLO et al., 2013). Fonte: <i>Protein Data Base</i>	26
Figura 2	Consumo de açúcares por <i>S. cerevisiae</i> (DÁRIO, 2011).	30
Figura 3	Processo de produção de etanol utilizado no Brasil (AMORIM et al., 2011).	33
Figura 4	Fluxograma das estratégias de modificações genômicas e linhagens de leveduras geradas neste trabalho.	44
Figura 5	Estratégia de recombinação homóloga para substituição do gene <i>TRP1</i> pelo gene <i>KanMX</i>	52
Figura 6	Estratégia para sobre-expressão da invertase intracelular na linhagem industrial CAT-1.	53
Figura 7	Estratégia de deleção do gene <i>SUC2</i>	54
Figura 8	Estratégia de sobre-expressão do gene <i>AGT1</i> no locus <i>AGT1</i>	55
Figura 9	Estratégia de sobre-expressão do gene <i>AGT1</i> em múltiplas cópias.	55
Figura 10	Estratégia de substituição do gene <i>SUC2</i> pelo módulo de sobre-expressão do gene <i>AGT1</i> no cromossomo IX da levedura industrial CAT-1.	56
Figura 11	Verificação em gel de agarose da integração do módulo de sobre-expressão do gene <i>iSUC2</i>	67
Figura 12	Verificação em gel de agarose da integração do promotor <i>GPD</i> no locus <i>AGT1</i>	68
Figura 13	Crescimento em glicose (20 g L ⁻¹) e parâmetros fisiológicos das linhagens modificadas (GMY).	74
Figura 14	Crescimento em sacarose (20 g L ⁻¹) e parâmetros fisiológicos das linhagens modificadas (GMY).	76
Figura 15	Fermentação em batelada simples contendo 200 g L ⁻¹ de sacarose e 10 g L ⁻¹ de células.	80
Figura 16	Parâmetros cinéticos das linhagens modificadas obtidos durante a fermentação contendo 200 g L ⁻¹ de sacarose.	82
Figura 17	Verificação em gel de agarose a remoção do gene <i>KanMX</i> do genoma das leveduras industriais.	85
Figura 18	Crescimento em glicose (20 g L ⁻¹) e parâmetros fisiológicos das linhagens modificadas sem os marcadores (GMYwo).	88

Figura 19 Crescimento em sacarose (20 g L ⁻¹) e parâmetros fisiológicos das linhagens modificadas sem os marcadores (GMYwo).	90
Figura 20 Fermentação em batelada simples contendo 200 g L ⁻¹ de sacarose e 10 g L ⁻¹ de células modificadas sem os marcadores - GMYwo.	92
Figura 21 Parâmetros cinéticos das linhagens industriais modificadas sem marcadores - GMYwo - obtidos durante a fermentação em batelada simples contendo 200 g L ⁻¹ de sacarose.	94
Figura 22 Expressão relativa dos genes <i>iSUC2</i> e <i>AGTI</i> durante a fermentação de 200 g L ⁻¹ de sacarose.	96
Figura 23 Representação esquemática do novo modelo de utilização de sacarose por leveduras industriais de <i>S. cerevisiae</i> modificadas.	99
Figura 24 Confirmação da substituição do gene <i>TRP1</i> pelo gene <i>KanMX</i>	117
Figura 25 Verificação em gel de agarose a integração do Módulo 4.	118
Figura 26 Verificação em gel de agarose da deleção da segunda cópia do gene <i>SUC2</i>	119
Figura 27 Verificação em gel de agarose a substituição do gene <i>SUC2</i> pelo módulo de sobre-expressão do gene <i>AGTI</i>	120
Figura 28 Verificação em gel de agarose a remoção do gene <i>Ble^r</i> das linhagens industriais.	121

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Linhagens de <i>S. cerevisiae</i> utilizadas neste trabalho.....	46
Tabela 2	Plasmídeos utilizados neste trabalho	48
Tabela 3	Iniciadores utilizados neste trabalho	49
Tabela 4	Dosagem da atividade invertase total e periplasmática, e transporte de pNP α G pela permease <i>AGT1</i> , em linhagens industriais de <i>S. cerevisiae</i> modificadas crescidas em sacarose.....	71
Tabela 5	Determinação da atividade da enzima α -glicosidase (maltase) em leveduras industriais crescidas em diferentes açúcares e frente a diferentes substratos em pH 7,0.....	72
Tabela 6	Dosagem da atividade invertase total e periplasmática, e transporte de pNP α G pela permease <i>AGT1</i> nas linhagens industriais modificadas (GMY e GMYwo) crescidas em sacarose.....	86

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<i>HXT</i>	<i>Hexose Transporter</i>	21
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase	22
EUA	Estados Unidos da América	24
EIA	<i>United States Energy Information Administration</i>	24
<i>SUC</i>	<i>SUCrose fermentation</i>	25
<i>MAL</i>	<i>MALtose fermentation</i>	25
pb	Pares de bases	27
kDa	Kilo Daltons	27
<i>AGTI</i>	<i>Alpha Glucoside Transporter</i>	29
pNF α G	<i>p</i> -Nitrofenil- α -D-Glicopiranosídeo	29
<i>GPD</i>	<i>Glycerol-3-Phosphate Dehydrogenase</i>	34
NADH	Nicotinamida Adenina Dinucleótido Hidreto	34
Mb	Mega bases	37
<i>RTM1</i>	<i>Resistance to Toxic Molasses</i>	37
ATP	Trifosfato de Adenosina	38
<i>PMA1</i>	<i>Plasma Membrane ATPase</i>	38
<i>LTR</i>	<i>Long Terminal Repeats</i>	54
<i>GMY</i>	<i>Genetic Modified Yeast</i>	66
<i>GMYwo</i>	<i>Genetic Modified Yeast without markers</i>	83
<i>AMPc</i>	Monofosfato cíclico de adenosina	87

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	23
2.1 ETANOL COMBUSTÍVEL	23
2.2 UTILIZAÇÃO DE SACAROSE POR <i>S. CEREVISIAE</i>	25
2.3 PROCESSO DE PRODUÇÃO DE ETANOL COMBUSTÍVEL NO BRASIL	31
2.4 LEVEDURAS INDUSTRIAIS <i>S. CEREVISIAE</i> UTILIZADAS NA PRODUÇÃO DE ETANOL COMBUSTÍVEL	35
3 OBJETIVOS	41
3.1 OBJETIVO GERAL	41
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	41
4 MATERIAIS E MÉTODOS	43
4.1 MEIOS DE CULTIVO	43
4.2 LINHAGENS, PLASMÍDEOS E INICIADORES	43
4.3 MODIFICAÇÕES GENÔMICAS	51
4.3.1 Construção do módulo <i>iSUC2</i> contendo o gene marcador <i>KanMX</i> em linhagens de laboratório	51
4.3.2 Redirecionamento da expressão do gene <i>SUC2</i> na linhagem industrial CAT-1	51
4.3.3 Modificações genéticas na expressão do gene <i>AGTI</i> na linhagem industrial CAT-1	53
4.3.4 Reações de PCR	56
4.3.5 Eletroforese em gel de agarose	57
4.4 ENSAIOS DE CULTIVOS CELULARES	57
4.4.1 Pré-cultivos	57
4.4.2 Suspensão celular	58
4.4.3 Crescimento celular em frasco agitado	58
4.4.4 Fermentação em batelada simples em frascos agitados	59
4.4.5 Crescimento em microescala	59
4.4.6 Retirada dos marcadores <i>KanMX</i> e <i>Ble^r</i>	59
4.5 DETERMINAÇÕES BIOQUÍMICAS	60
4.6 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE INVERTASE	60
4.6.1 Atividade da invertase extracelular	60
4.6.2 Atividade da invertase total	61
4.7 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE TRANSPORTE DE PNF α G	61

4.8 DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETRO FISIOLÓGICOS DAS LEVEDURAS	62
4.9 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DURANTE FERMENTAÇÕES POR PCR EM TEMPO REAL	63
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	65
5.1 MODIFICAÇÕES GENÔMICAS EM LEVEDURA INDUSTRIAL DIPLOIDE DE <i>S. CEREVISIAE</i>	65
5.1.1 Construção do módulo <i>iSUC2</i> contendo o gene marcador <i>KanMX</i>	65
5.1.2 Sobre-expressão do gene <i>iSUC2</i> na linhagem industrial CAT-1	66
5.1.3 Sobre-expressão do gene <i>AGTI</i>	67
5.1.4 Deleção da segunda cópia do gene <i>SUC2</i> em linhagens industriais <i>iSUC2</i>	69
5.2 ATIVIDADE INVERTASE E TRANSPORTE ATIVO DE SACAROSE NAS LINHAGENS MODIFICADAS	69
5.3 CARACTERIZAÇÃO DO CRESCIMENTO CELULAR DAS LINHAGENS MODIFICADAS	73
5.4 CARACTERIZAÇÃO DAS LINHAGENS MODIFICADAS QUANTO AO PERFIL FERMENTATIVO EM ALTAS CONCENTRAÇÕES DE SACAROSE	78
5.5 CARACTERIZAÇÃO DAS LINHAGENS INDUSTRIAS MODIFICADAS SEM OS MARCADORES <i>KANMX</i> E <i>BLE^R</i> ...	83
6 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	101
Referências Bibliográficas	105
APÊNDICE A - Confirmação em gel de agarose das transformações genômicas	117

1 INTRODUÇÃO

A história da planta cana de açúcar e da produção do açúcar se confundem com a colonização do Brasil. Existem relatos da produção de açúcar que datam de 1532, época em que os portugueses trouxeram as primeiras mudas dessa planta para o Brasil. O Brasil, que sempre se destacou como produtor de açúcar, também inovou na produção e utilização de álcool combustível na sua frota automobilística. No anos 70, o mundo foi surpreendido com uma crise oriunda da falta de petróleo negociável, o que motivou o governo brasileiro a desenvolver uma forma alternativa de combustível. Esse advento é consequência da implantação de um programa que está completando quase 40 anos, o Proálcool (Programa Nacional do Alcool). Nasceu então o etanol combustível, obtido a partir da fermentação do caldo da cana de açúcar, melaço ou uma mistura de ambos (ANDRIETTA et al., 2007; BASSO et al., 2008; WHEALS et al., 1999).

Leveduras, principalmente do gênero *Saccharomyces*, têm sido amplamente utilizadas desde os primórdios da humanidade em diversos processos biotecnológicos para produção de bebidas alcoólicas, produtos de panificação e etanol combustível, entre outros. Sua utilização se deve à capacidade que estas leveduras apresentam de se adaptar e dominar o ambiente devido à habilidade de fermentar os açúcares presentes no meio, produzindo etanol, mesmo na presença de oxigênio. Além disso, suportam baixos níveis de pH, altas concentrações de etanol e também o estresse osmótico decorrente das altas concentrações de açúcares. *Saccharomyces cerevisiae* é considerada o agente predominante nas fermentações, mas outras espécies do complexo *Saccharomyces sensu stricto*, como *S. bayanus* e *S. paradoxus*, têm sido isoladas a partir de processos industriais. Esta levedura é utilizada em grande escala para produção industrial de etanol a partir de vários produtos agrícolas ricos em açúcares, sendo que grande parte desta produção utiliza meios contendo altas concentrações de sacarose, como é o caso de caldo de cana e melaço (WHEALS et al., 1999; ZANIN et al., 2000).

Atualmente nas destilarias brasileiras, são utilizados meios de fermentação (caldo de cana e melaço) contendo entre 150 - 200 g L⁻¹ de açúcares totais (principalmente sacarose), através de sistemas de fermentação contínuos ou descontínuos (batelada alimentada ou batelada simples). Nos processos de fermentação em batelada simples o mosto é adicionado no início da fermentação e ao término é totalmente removido, enquanto que nos processos em batelada alimentada o mosto é adicionado mais lentamente, sendo que ao final do processo fermentativo é removido em parte e adicionado o mesmo volume de mosto novo.

O mecanismo tradicional de utilização da sacarose pela *S. cerevisiae* consiste na hidrólise extracelular deste açúcar nos seus monômeros (glicose mais frutose), catalizada pela enzima invertase, sendo os monossacarídeos liberados transportados para o interior da célula por transportadores de hexoses codificados pelos genes da família *HXT* e metabolizados durante a glicólise (BATISTA; MILETTI; STAMBUK, 2004; MWESIGYE; BARFORD, 1996). Entretanto um outro mecanismo de fermentação da sacarose foi proposto para linhagens de laboratório de *S. cerevisiae* (BASSO et al., 2011). Neste novo modelo, a sacarose é transportada para o interior da célula por um transportador de membrana com simporte de prótons e hidrolisada no citosol da célula (BADOTTI et al., 2008; STAMBUK; BATISTA; ARAUJO, 2000; STAMBUK; ARAUJO, 2001), porém este mecanismo só será eficiente na ausência da invertase extracelular. Já foi comprovado que este novo modelo de utilização da sacarose produz um maior rendimento na produção de etanol combustível ao final da fermentação (BASSO et al., 2011; WEUSTHUIS et al., 1993), além de prevenir os efeitos deletérios sofridos pelas células de leveduras quando expostas a altas concentrações de açúcares e etanol (ERASMUS; MERWE; VUUREN, 2000).

Com o desenvolvimento das tecnologias baseadas em DNA, é possível averiguar a constante mudança na população de leveduras nas dornas de fermentação. Utilizando a técnica de cariotipagem, os pesquisadores conseguiram isolar e acompanhar o processo de fermentação levando em conta as populações de leveduras (ANDRIETTA et al., 2007; BASSO et al., 2008). Técnicas modernas de biologia molecular permitiram o sequenciamento do genoma das principais leveduras utilizadas na produção de etanol combustível no Brasil (ARGUESO et al., 2009; BABRZADEH et al., 2012). A aplicação de conceitos da engenharia genômica e engenharia metabólica poderão contribuir de forma muito significativa no desenvolvimento de linhagens de leveduras capazes de modular seu metabolismo conforme o substrato a ser fermentado.

O objetivo deste trabalho é utilizar as técnicas baseadas em PCR e engenharia genômica, para modificar a expressão de genes alvos na levedura industrial CAT-1, alterando a topologia do consumo de sacarose nessa linhagem. Também será abordada técnicas de *self-clonig* e a retirada dos marcadores dominantes utilizados nas transformações de leveduras industriais. O resultado esperado é a obtenção de uma levedura com o seu genótipo estável, e que resulte em um maior rendimento da produção de etanol combustível a partir da fermentação de sacarose, sem a expansão da área cultivada com cana de açúcar ou adequação da estrutura física das destilarias.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 ETANOL COMBUSTÍVEL

A auto suficiência no requerimento de energia é uma determinante crítica para o sucesso e desenvolvimento de qualquer economia. A diminuição das fontes de petróleo, associado com instabilidade dos preços e o impacto negativo causado no meio ambiente com a utilização de combustíveis fósseis, renova a busca de fontes e estratégias alternativas para a produção de biocombustíveis.

O Brasil é o mais competitivo produtor de etanol combustível no mundo, com um mercado doméstico bem desenvolvido e cada vez mais estimulado pelas vendas crescentes de carros bi combustíveis. A produção de etanol combustível tem sido apoiada pelo desenvolvimento de novas variedades de cana, variáveis meteorológicas favoráveis, solos férteis e tecnologias agrícolas (LEITE et al., 2009). No entanto, até 1975, a produção de etanol combustível foi marginal, totalizando menos de 600 milhões de litros por ano. Dois anos após a crise mundial do petróleo de 1973, o governo Brasileiro lançou o programa "Proálcool", com o objectivo de reduzir os preços elevados dos combustíveis e da dependência da importação de petróleo (GOLDEMBERG, 2008; ZANIN et al., 2000). Em 1993, o governo aprovou uma lei em que deverá ser adicionado 20 - 25% de etanol combustível na gasolina comercializada no Brasil. Posteriormente, o programa evoluiu e caracterizou-se pela concessão de subsídios: às montadoras para produção de veículos movidos totalmente a etanol hidratado, aos compradores desse tipo de veículos e aos produtores de etanol. A frota nacional de veículos movida a etanol aumentou de forma significativa com os subsídios, e juntamente com o aumento do consumo de gasolina, a produção do etanol combustível se tornou insuficiente para suprir o consumo do mercado brasileiro. Crises de abastecimento no comércio de combustíveis geraram desconfiança dos consumidores sobre a viabilidade do Proálcool, que foi praticamente extinto no período que compreendeu o fim da década de 80 e início da década de 90 (AMORIM et al., 2011; GOLDEMBERG, 2008; SANTOS, 1993).

O etanol combustível é produzido a partir de matérias primas renováveis incluindo diversos produtos agrícolas que contenham açúcares, amido ou outras estruturas polissacarídicas, que podem ser fermentados a etanol e, posteriormente purificado por operações de destilação e absorção. As matérias-primas utilizadas na produção de álcool combustível podem ser classificadas em três tipos basicamente: 1) matérias primas contendo sacarose

(cana de açúcar, beterraba, sorgum); 2) materiais amiláceos (trigo, milho, mandioca); e biomassa lignocelulósica (madeira, bagaço de cana de açúcar).

O Brasil é um dos maiores produtores de etanol combustível do mundo, sendo sua produção derivada quase totalmente da cana de açúcar (*Saccharum officinarum*). A cana de açúcar contém 12-17% de açúcares totais, sendo 90% sacarose e 10% glicose ou frutose. Tanto o suco de cana como o melaço (gerado após a cristalização do açúcar) apresentam minerais e nutrientes orgânicos e podem ser diretamente fermentados a etanol pela levedura *S. cerevisiae* (LIMA; BASSO; AMORIM, 2001), dispensando pré-tratamentos para este processo. No Brasil, a cana de açúcar foi a cultura escolhida para a geração de etanol combustível, por ser uma monocultura bastante antiga no país, além de possuir no seu caldo altas concentrações de açúcares livres, característica ideal para processos de fermentação eficientes e econômicos. Foi introduzida no século XVI durante a época colonial e participou durante anos como base da economia Brasileira, principalmente pela extração do seu caldo para produção e exportação de açúcar. O álcool, que sempre fora considerado subproduto do açúcar, passou a desempenhar papel estratégico na economia brasileira e, diante do sucesso da iniciativa, deixou de ser encarado apenas como resposta a uma crise temporária, mas como solução permanente, enquanto especialistas, alertavam o mundo para o risco das reservas petrolíferas não serem infinitas.

Atualmente o Brasil é o segundo maior produtor de etanol combustível do mundo, ficando atrás somente do EUA (EIA, 2012). O cultivo de cana de açúcar no Brasil ocupa uma área de aproximadamente 9 milhões de hectares destinados para a produção de açúcar, cachaça, forragem e etanol, entre outros. Para a safra de 2012/13 estima-se uma produção de 27 bilhões de litros de etanol combustível e importação de cerca de 219 milhões de litros. O Brasil também irá exportar cerca de 2 bilhões de litros de etanol, sendo 70% das exportações para os EUA, seguido da Jamaica (6,63%) e Coréia do Su (5,11%).

Devido a estes fatores, nos próximos anos a demanda internacional por este produto sofrerá um forte incremento, trazendo inúmeras oportunidades para a indústria sucroalcooleira no Brasil. Para isso, será necessário um aumento na produção e, principalmente, na eficiência do processo, a fim de não elevar significativamente os preços, em especial, ao consumidor brasileiro.

2.2 UTILIZAÇÃO DE SACAROSE POR *S. CEREVISIAE*

A sacarose é a maior fonte natural de carbono para leveduras do gênero *Saccharomyces*. É um dissacarídeo não redutor formado por moléculas de glicose e de frutose unidas através de ligação osídica, envolvendo ambos os carbonos anoméricos, com conformação Gli α 1- β 2 Fru. É o açúcar mais utilizado industrialmente para a produção de etanol combustível, e a hidrólise deste dissacarídeo pode ser realizada por duas enzimas diferentes: a invertase (β -frutofuranosidase) que é capaz de reconhecer a ligação “ β 2 Fru” e a maltase (α -glicosidase) que é capaz de reconhecer a ligação “Gli α 1” (BADOTTI et al., 2008). Estas enzimas são codificadas pelos genes *SUC* e *MAL*, respectivamente.

A invertase (EC 3.2.1.26), também conhecida como β -frutosidase, β -frutofuranosidase ou sacarase, pertence à família 32 glicosil hidrolase (GH32) e possui dois domínios distintos. O domínio N-terminal (Glyco_hydro_32N) forma uma estrutura de hélice com cinco folhas beta (β hélice), onde encontram-se os sítios de ligação ao substrato. Já o domínio C-terminal (Glyco_hydro_32C) apresenta uma estrutura de sanduíche de folhas betas (β sanduíche), característico das enzimas pertencentes à família GH32 (HENRISSAT et al., 1995). Apesar da invertase de *S. cerevisiae* ter sido uma das primeiras enzimas estudadas na bioquímica, até o momento sua estrutura ainda não tinha sido resolvida. Sainz-Polo et al. (2013) publicaram recentemente a estrutura tridimensional da invertase da linhagem de *S. cerevisiae* S288C, onde é observada uma estrutura quaternária não usualmente encontrada em outras invertases. Os monômeros associam-se em dois tipos diferentes de dímeros que estão por sua vez unidas em um octâmero, melhor descrito como um tetrâmero de dímeros. A dimerização desempenha um papel determinante na especificidade do substrato, pois esta estrutura limita o acesso do dissacárido (sacarose) ou oligossacarídeos curtos de até quatro unidades ao sítio ativo da enzima. A análise comparativa de enzimas de GH32 mostra que a formação da invertase em octâmeros ocorre através de uma extensão das folhas β que parece única para esta enzima. A interação entre dímeros é determinado por uma sequência curta de aminoácidos no início do domínio β sanduíche. Também foram descritos 13 sítios previstos para adição de N-glicosilação na forma da enzima que é exportada para a espaço periplasmático. Na Figura 1 podemos observar a estrutura tridimensional da enzima invertase de *S. cerevisiae* S288c, e sua complexação em tetrâmeros.

A enzima invertase possui um papel importante no metabolismo de açúcares pelas leveduras. Esta cataliza a hidrólise do dissacarídeo sacarose (produzindo monômeros de glicose e frutose) e do trissacarídeo rafinose

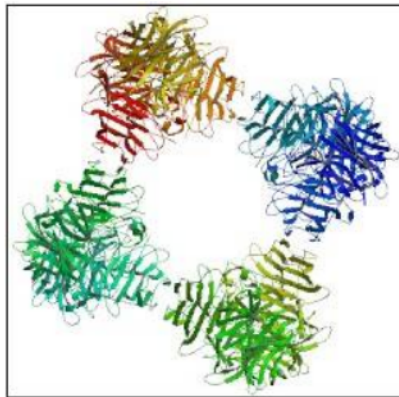


Figura 1 – Estrutura tridimensional da enzima invertase de *S. cerevisiae* (SAINZ-POLO et al., 2013). Fonte: *Protein Data Base*.

(produzindo frutose e melibiose) (GASCÓN; NEUMANN; LAMPEN, 1968; TAUSSIG; CARLSON, 1983). Embora as linhagens de leveduras possam conter qualquer número e combinação dos genes *SUC*, a análise de leveduras isoladas em diferentes ambientes industriais, revelou que *S. cerevisiae* apresenta alta atividade invertase e também vários loci *SUC* no genoma, quando isoladas de ambientes onde a sacarose é o principal açúcar a ser fermentado (como caldo de cana ou melaço). Isso inclui leveduras de panificação e as utilizadas na produção de bebidas destiladas. Por outro lado, é extremamente raro a detecção de linhagens utilizadas na produção de vinho com amplificação dos genes *SUC*, pois a glicose e frutose são os principais açúcares a serem fermentados na produção dessa bebida (BIDENNE et al., 1992; DENAYROLLES et al., 1997; NADAL et al., 1999).

Evidências na literatura sugerem um alto polimorfismo nos genes da família *SUC* em leveduras *S. cerevisiae*. O gene da β -frutosidade *SUC2*, é geralmente, o responsável pela síntese da invertase. Entretanto existem diversos outros genes *SUC* descritos na literatura. Todos os genes da família *SUC*, com exceção do *SUC2*, estão localizados em regiões teloméricas de diferentes cromossomos: *SUC1* está localizado no cromossomo VII, *SUC3* no cromossomo II, *SUC4* no cromossomo XIII, *SUC5* no cromossomo IV, *SUC7* no cromossomo VIII, *SUC8*, localizado no cromossoma X, *SUC9* no cromossoma XIV e *SUC10* no cromossoma XVI ou XIII (CARLSON; BOTSTEIN, 1983; CARLSON; CELENZA; ENG, 1985; NAUMOV; NAUMOVA, 2010a, 2010b). De acordo com Carlson e Botstein

(1983), Carlson, Celenza e Eng (1985), o polimorfismo nos genes *SUC* é resultado da recombinação de sequências teloméricas homólogas de vários cromossomos. Devido o gene *SUC2* estar localizado na parte terminal do cromossomo IX, porém não na região telomérica, assume-se este gene como ancestral da família de genes que codificam para a enzima invertase.

Durante a expressão do gene *SUC2* são codificadas duas formas da invertase, uma extracelular e outra intracelular. A invertase extracelular é um homodímero altamente glicosilado que é secretado para o espaço periplasmático da célula, onde ocorre a hidrólise extracelular da sacarose. A invertase intracelular também é um homodímero, entretanto não sofre glicosilação, pois permanece no citoplasma celular (GASCÓN; NEUMANN; LAMPEN, 1968; TRIMBLE; MALEY, 1977). A diferenciação das duas formas de invertase durante sua síntese ocorre devido à geração de dois tipos de mRNA, que diferem somente na sua região 5'. O transcrito maior, com aproximadamente 1900 pares de base (pb) codifica para a invertase extracelular e possui uma sequência sinal (20 aminoácidos) que direciona a proteína que está sendo sintetizada para o sistema de secretório. Esta sequência sinal não é encontrada no transcrito menor, de aproximadamente 1800 pb, que codifica então para a invertase intracelular (CARLSON; BOTSTEIN, 1982, 1983).

Durante a secreção da invertase periplasmática o peptídeo sinal é retirado por proteólise e a proteína madura é glicosilada. A forma glicosilada é mais estável em relação a forma não glicosilada (invertase intracelular), porém ambas as enzimas apresentam propriedades enzimáticas muito semelhantes, como o mesmo pH ótimo (pH 4,6 a 5,0), a mesma temperatura ótima de atividade (35 a 50 °C) e a mesma afinidade ($K_m \simeq 25$ mM) pela sacarose (ANDJELKOVIC; PICURIC; VUJCIC, 2010; GASCÓN; NEUMANN; LAMPEN, 1968). Ambas proteínas possuem 532 aminoácidos, mas massas moleculares diferentes: próximo de 135 kDa para a forma intracelular e valores superiores a 270 kDa para a invertase extracelular, que pode formar complexos com mais de 800 kDa. De acordo com Taussig e Carlson (1983), existem pelo menos 13 sítios de *N*-glicosilação na sequência de aminoácidos da invertase. A diferença na massa molecular, entre as diferentes formas desta enzima, se deve pela existência de glicosilações na forma extracelular, adicionadas durante o processo de síntese e secreção da proteína. Essa modificação não interfere na atividade de hidrólise da enzima, mas confere proteção contra a ação de proteases e contribui para a formação de complexos proteicos na forma de tetrâmeros, hexâmeros e até mesmo octâmeros da forma extracelular, garantindo a retenção dessa enzima no espaço periplasmático das células (ALVARADO et al., 1990; ARRUDA; VITOLO, 1999; REDDY et al., 1988).

A transcrição das duas formas da invertase é regulada independentemente. A expressão da forma intracelular da invertase ocorre em baixos níveis de forma constitutiva, não sendo reprimida por fontes de carbono disponíveis no meio (MWESIGYE; BARFORD, 1996; ÓZCAN et al., 1997). Já a expressão da forma periplasmática da enzima ocorre de forma induzida, sendo reprimida em altas concentrações de diversos açúcares como glicose, frutose, manose e xilose. Em condições de repressão induzida por açúcares, proteínas de regulação se ligam ao promotor do gene *SUC2* e assume uma conformação enovelada envolto por uma matriz uniforme de nucleossomos (BELINCHON; GANCEDO, 2007; BU; SCHMIDT, 1998). Por outro lado, baixa concentração de glicose induz a expressão do gene *SUC2*, bem como a presença de sacarose no meio de cultivo (CARLSON; BOTSTEIN, 1982; ECHEGARAY et al., 2000; ÓZCAN et al., 1997; REDDY et al., 1988).

O mecanismo tradicional de utilização da sacarose pela *S. cerevisiae* em ambientes industriais já é bastante conhecido (CARLSON, 1987). Consiste na hidrólise extracelular deste açúcar nos seus monômeros (glicose mais frutose), pela enzima invertase extracelular. Estes monômeros são então transportados para o interior da célula por transportadores de hexoses de difusão facilitada codificados pelos genes da família *HXT* e metabolizados durante a glicólise (BATISTA; MILETTI; STAMBUK, 2004; MWESIGYE; BARFORD, 1996). Até o momento já foram identificados mais de 20 genes que fazem parte da família dos genes *HXT* (WIECZORKE et al., 1999). A expressão dos genes *HXT* é dependente de fatores ambientais, como concentração da fonte de carbono no meio. Até o momento dois sistemas de captação de hexoses já foram descritos: um sistema de transportadores de alta afinidade e um sistema de transportadores de baixa afinidade (BISSON; FRAENKEL, 1983; REIFENBERGER; BOLES; CIRIACY, 1997). Os transportadores Hxt1p e Hxt3p são de baixa afinidade para o transporte de hexoses (km 50 - 100 mM), já o transportador Hxt4p possui afinidade moderadamente baixa e Hxt2p, Hxt6p e Hxt7p são descritos como transportadores de alta afinidade a hexose (km 1 - 4 mM). Ambos sistemas, de alta e baixa afinidade, possuem uma elevada afinidade por glicose em relação a frutose (REIFENBERGER; BOLES; CIRIACY, 1997).

Além da hidrólise extracelular, já foi demonstrado que a sacarose pode ser transportada para o interior da célula por um sistema de transporte com simporte de H^+ de baixa e um de alta afinidade, ambas permeases codificadas por genes pertencente à família dos genes *MAL* (BADOTTI et al., 2008; HAN et al., 1995; STAMBUK; BATISTA; ARAUJO, 2000). Este transporte funciona com a utilização de potenciais eletroquímicos juntamente com prótons, com uma estequiometria de 1 próton para cada molécula de

açúcar transportada (STAMBUK et al., 1996, 1999; WEUSTHUIS et al., 1993). O potencial eletroquímico transmembrana é gerado pelo gradiente de pH entre o ambiente extracelular (pH próximo de 5,0) e intracelular (pH próximo de 7,0). A homeostase do pH intracelular é mantida por proteínas H^+ -ATPase transmembrana, que funcionam como bombas, lançando os íons H^+ localizados no citoplasma para o ambiente extracelular.

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. Este transportador (TC # 2.A.1.1.11) possui alta afinidade para o transporte de trealose ($K_m \simeq 7$ mM) e sacarose ($K_m \simeq 8$ mM) e baixa afinidade para maltose ($K_m \simeq 18$ mM), da maltotriose ($K_m \simeq 18$ mM) e do α -metil-glicosídeo ($K_m \simeq 34$ mM) (STAMBUK; BATISTA; ARAUJO, 2000; STAMBUK; ARAUJO, 2001). Este gene aparentemente é regulado pelos mesmos mecanismos de regulação gênica dos genes *MAL*, pois possui uma sequência UAS_{MAL} na sua região promotora (STAMBUK et al., 1999; STAMBUK; BATISTA; ARAUJO, 2000). Os genes *MALxT* codificam para transportadores de alta afinidade (K_m 2 - 5 mM) para maltose, mas baixa afinidade (K_m 90 - 120 mM) para trealose e sacarose, não sendo aparentemente capazes de transportar maltotriose ou α -metilglicosídeo (ALVES et al., 2008; CHENG; MICHELS, 1991; DUVAL et al., 2010; HAN et al., 1995). Entretanto, este sistema de transporte de baixa afinidade não é eficiente em processos industriais, onde o transporte do açúcar é passo limitante da fermentação. Em leveduras industriais a expressão dos genes da família *MAL* ocorre de maneira induzível, sendo os genes expressos na presença de maltose e reprimidos na presença de outros açúcares como glicose, comumente encontrados em grandes quantidades em mosto de fermentação alcoólica nas destilarias brasileiras.

Após transportada para o interior da célula, a sacarose pode ser hidrolisada pela invertase intracelular ou a maltase (BADOTTI et al., 2008). A maltase ou α -glucosidase (E.C. 3.2.1.20) é uma enzima citoplasmática, com pH ótimo próximo a 6,8, capaz de hidrolisar a ligação osídica do resíduo de glicose em conformação " α ", encontrada em oligossacarídeos como na maltose, maltotriose e sacarose, e em substratos sintéticos como o *p*-nitrofenil- α -D-glicopiranosídeo (pNP α G) (ZASTROW et al., 2000, 2001). Dessa maneira, o transporte ativo de sacarose pode justificar a presença de uma forma intracelular da enzima invertase. Em todos os casos, o metabolismo de sacarose e maltose estão intimamente ligados, dividindo os mesmos sistemas de transportes de açúcares, enzimas hidrolíticas e cascatas

2.3 PROCESSO DE PRODUÇÃO DE ETANOL COMBUSTÍVEL NO BRASIL

A cana de açúcar, que pode gerar até 160 Kg de sacarose e possui um rendimento próximo a 80 litros de etanol, é até o presente momento, a única matéria prima utilizada em escala industrial para a produção de etanol combustível no Brasil (ANDRIETTA et al., 2007; STAMBUK et al., 2008). O maior custo da produção de etanol no Brasil está relacionado com o plantio e manejo da cana de açúcar nos campos. Nos EUA, maior produtor de etanol do mundo, o etanol é produzido a partir de milho, cujos grãos são triturados e misturados com α -amilases sob alta temperatura, para formar o mosto utilizado no processo fermentativo. Nesse processo, a hidrólise do amido contido nos grãos de milho é realizado antes de iniciar o processo de fermentação, liberando açúcares fermentáveis às células de levedura (p. Ex: maltose, maltotriose e glicose). Quando comparado ao processo brasileiro, o processo norte americano apresenta um maior tempo de fermentação, além de não empregar reciclo das células de leveduras, fatos que proporcionam baixo rendimento à técnica utilizada nos EUA. Devido aos procedimentos usados, consequentemente, o etanol norte americano apresenta maior custo de produção e menor competitividade frente ao etanol brasileiro (AMORIM et al., 2011; WHEALS et al., 1999).

Nos dias de hoje, a fermentação exclusivamente do caldo de cana não é uma prática tão frequente nas unidades industriais. Quando da implantação do Proálcool muitas unidades fermentavam apenas o caldo. Atualmente quase nenhuma dessas unidades fermenta exclusivamente o caldo de cana natural, essas denominadas destilarias autônomas, migraram para usinas produtoras de açúcar. Agora, o que elas fermentam não se restringe ao caldo da cana de açúcar, mas sim o que obtêm como subproduto da cristalização da sacarose do caldo, isto é o melaço. Trata-se do produto do refino do açúcar misturado com caldo da cana de açúcar, que além de conter em média 90% de Brix sendo 60% de açúcares redutores, possui outros elementos necessários para que a fermentação ocorra sem a adição de nutrientes. Vários são fatores que influenciam na composição do melaço ou mel final, destacando-se entre eles a natureza da matéria prima, a qualidade da cana processada, os métodos da fabricação do açúcar, o tempo de armazenamento e as regiões de plantio (ANDRIETTA et al., 2007; STAMBUK et al., 2008; ZANIN et al., 2000).

O Brasil possui cerca de 432 usinas e destilarias, e estima-se que estas moerão um total de 625 milhões de toneladas de cana de açúcar e produzirão cerca de 27 bilhões de litros de etanol combustível, bem como 37 milhões de toneladas de açúcar na safra 2012/13 (PORTO; NETO; SOUSA, 2012). O rendimento da produção de etanol a partir de sacarose no Brasil atinge os

92 - 93%, entretanto a levedura também produz glicerol, biomassa celular, succinato e malato durante a fermentação alcoólica, sendo uma parte da energia desviada para estes processos celulares (AMORIM et al., 2011).

O atual processo de fermentação da sacarose utilizado no Brasil foi desenvolvido por Firmino Boinot em destilarias Francesas da região de Melle, e sua tecnologia patenteada em 1937 (Figura 3) (AMORIM et al., 2011). O processo chamado *Melle-Boinot* é o típico processo para a produção de etanol por fermentação em batelada. Compreende a pesagem e limpeza da matéria-prima, seguida pela redução do pH do meio com H_2SO_4 e diluição dos açúcares do mosto para valores próximos a 180 g L^{-1} . Após a fermentação do mosto por leveduras *S. cerevisiae*, o vinho produzido é decantado, centrifugado e enviado para a destilação do etanol, enquanto que as leveduras são reutilizadas para atingir concentrações celulares elevadas nas dornas de fermentação. Em culturas de batelada alimentada geralmente a concentração de substrato durante a fermentação se mantém baixa, enquanto o etanol é acumulado no meio de cultura, além da possibilidade de atingir altos volumes de produtividade. O controle da vazão do meio de alimentação na dorna é uma vantagem em relação ao processo em batelada simples, pois os efeitos inibitórios causados pela alta concentração de substrato ou produto no meio de fermentação podem ser neutralizados. Foi observado que a adição de sacarose em concentrações decrescentes linear ou exponencial levam a um aumento na produtividade de etanol em 10-14% (ECHEGARAY et al., 2000).

Nas usinas brasileiras as fermentações são realizadas em tanques enormes que chegam a utilizar 3 milhões de litros de mosto por batelada com altas densidades celulares (10 - 15% p/v). Cerca de 85% destas destilarias utilizam o processo de batelada alimentada, e somente 15% fermentação contínua. As fermentações levam em média de 6 - 12 horas e ao final, a concentração de álcool pode atingir de 7 - 11% (v/v) e o açúcar residual abaixo de 0,1%. O meio fermentado é então centrifugado para a separação da levedura e o vinho é enviado às torres de destilação. As leveduras retiradas do fermentador sofrem um tratamento com ácido sulfúrico (pH 2,0 - 2,5) para retirar bactérias contaminantes e leveduras mortas. Após 2 - 3 horas, as leveduras retornam às dornas de fermentação e inicia-se um nova batelada (WHEALS et al., 1999). Células de leveduras são recicladas cerca de 400 a 600 vezes durante a safra da cana de açúcar, que na região Centro-Sul do Brasil ocorre de abril a novembro, enquanto que no Nordeste do Brasil vai de setembro a março. O processo de produção de etanol de cana de açúcar depende de vários fatores regionais como condições climáticas, variedades de cana de açúcar e a demanda de mercado (AMORIM et al., 2011).

Apesar do processo de produção de etanol a partir de cana de açúcar ser um dos mais bem estruturados e com menor custo de produção e maior

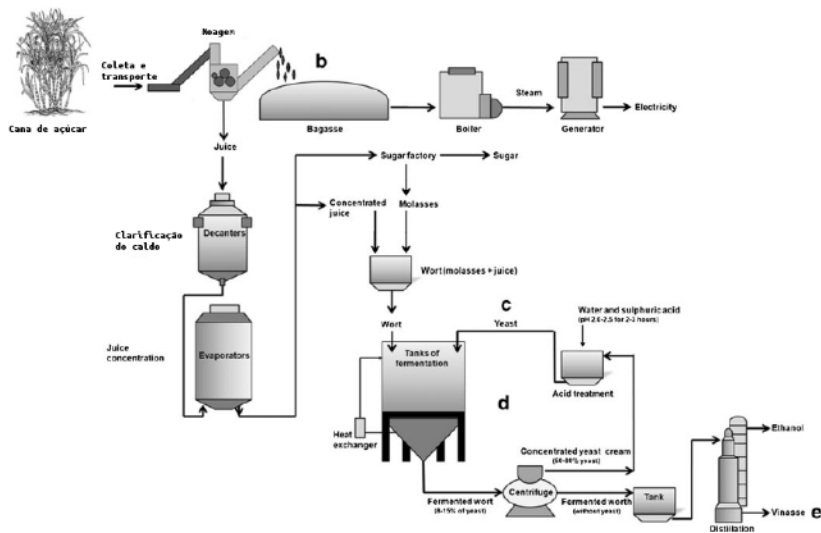


Figura 3 – Processo de produção de etanol utilizado no Brasil (AMORIM et al., 2011).

rendimento no mundo, este ainda apresenta alguns problemas. A atividade da invertase extracelular durante a utilização de sacarose pela *S. cerevisiae*, pode gerar rapidamente uma taxa muito elevada de glicose mais frutose, que ficam disponíveis no meio de fermentação. Devido à dificuldade de esterilização de grandes volumes de matéria-prima e sucessivos ciclos das leveduras durante toda a safra, as dornas de fermentação tornam-se susceptíveis à contaminação bacteriana e por leveduras selvagens (*Saccharomyces* e *non-Saccharomyces*) oriundas da própria cana-de-açúcar. Ambos contaminantes competem com as linhagens de leveduras inoculadas para a permanência no fermentador. Atualmente as destilarias utilizam antimicrobianos para conter a contaminação bacteriana, juntamente com a lavagem ácida e reciclo celular, porém a contaminação por leveduras selvagens é mais difícil de ser controlada (BASÍLIO et al., 2008), pois seu metabolismo é muito semelhante às leveduras industriais. As leveduras selvagens possuem características inapropriadas para o processo fermentativo como floculação celular, excessiva produção de espuma, baixo rendimento e fermentação incompleta dos açúcares (BASSO et al., 2008; FIGUEIRÊDO, 2012), entretanto, até o momento não existe nenhum produto ou procedimento que destrua somente as leveduras selvagens, sem afetar as leveduras *S. cerevisiae*

selecionadas.

O rápido aumento na concentração de glicose e frutose no meio após a hidrólise da sacarose pode levar as células de leveduras a um estresse osmótico. Quando submetidas a estas condições estressantes apresentam efeitos deletérios no seu metabolismo (TAKESHIGE; OUCHI, 1995) e severas adaptações metabólicas. *S. cerevisiae* consegue se adaptar ao aumento do estresse osmótico aumentando a produção de glicerol, principal soluto para contrabalançar a pressão osmótica. A síntese de glicerol é realizada pela enzima citosólica glicerol-3-fosfato desidrogenase, que é dependente de NADH. Duas isoformas desta enzima são codificadas pelos genes *GPD1* e *GPD2*, sendo o primeiro gene fortemente induzido em condições de estresse osmótico. Para que ocorra um aumento na produção de glicerol pela célula de levedura é necessário um aumento equimolar da formação de NADH, e este processo se dá com a diminuição da redução de acetaldeído a etanol e o aumento da oxidação do acetato (BLOMBERG; ADLER, 1989; ERASMUS; MERWE; VUUREN, 2000). Como consequência destas adaptações metabólicas ao estresse osmótico, menos etanol é produzido por cada unidade de açúcar metabolizado. De acordo com Brumm e Hebeda (1988) o glicerol formado por leveduras *S. cerevisiae* corresponde de 8 a 15 gramas por 100 gramas de etanol produzido.

A fermentação eficiente da sacarose pelas leveduras industriais deve-se, em grande parte, à expressão da invertase periplasmática (DÁRIO, 2007). Em ambientes contendo alta concentração de sacarose, trabalhos demonstram haver uma correlação inversa entre os níveis da invertase e a performance fermentativa das células (ECHEGARAY et al., 2000; TAKESHIGE; OUCHI, 1995). Leveduras sem atividade invertase - não possuem genes *SUC* no genoma - podem ainda utilizar eficientemente a sacarose hidrolisada por leveduras que produzem atividade dessa enzima, especialmente em situações com alta densidade celular, ou seja, situação semelhante à encontrada na produção industrial de etanol combustível brasileiro.

Apesar dos transportadores *HXT* de *S. cerevisiae* serem responsáveis pela captação de hexoses, os mesmos demonstram maior afinidade pela glicose em relação a frutose, sendo esta última vagarosamente utilizada e frequentemente sobrando no mosto de fermentação após o término do processo. Outro problema encontrado no processo de fermentação alcoólica é o aumento gradativo do produto final, etanol, no mosto de fermentação. Berthels et al. (2004) demonstraram que a utilização de frutose é amplamente inibida em altas concentrações de etanol durante a produção de vinho. Isto ocorre devido a difusão do etanol através da membrana plasmática causando danos às proteínas de membranas, proteínas e estruturas intracelulares. Além de modificar o equilíbrio entre as formas tautoméricas frutopiranosose para

frutofuranose, que não é transportada pelos transportadores Hxtp (FLOOD; JOHNS; WHITE, 1996).

Além dos problemas citados acima, a permease Agt1p pode sofrer inativação catabólica na presença de glicose, sendo retirado da membrana plasmática e endocitado em vacúolos (HOLLATZ; STAMBUK, 2001). Para minimizar e evitar os efeitos da inativação catabólica da permease Agt1p, foram identificados os resíduos de aminoácidos envolvidos no transporte do açúcar, translocação dos prótons H^+ , reconhecimento do substrato, na inativação catabólica e os sítios de fosforilação da proteína. Dessa maneira, mutações nesses resíduos específicos de aminoácidos podem conferir uma maior estabilidade ao transportador Agt1p e permanência na membrana plasmática por um tempo maior (TRICHEZ, 2007, 2012).

2.4 LEVEDURAS INDUSTRIAIS *S. CEREVISIAE* UTILIZADAS NA PRODUÇÃO DE ETANOL COMBUSTÍVEL

O principal microrganismo utilizado na produção de etanol combustível, pelas usinas brasileiras é a levedura *S. cerevisiae*. Tradicionalmente, as destilarias no Brasil iniciavam o processo fermentativo da sacarose com leveduras de panificação, devido aos seus baixos custos e disponibilidade em grandes quantidades. Após estudos dessas fermentações, foi observada a substituição completa da levedura de panificação inoculada, por linhagens de *S. cerevisiae* nativas (BASSO et al., 2008). Silva-Filho et al. (2005) constatou que, na maioria das destilarias, durante o processo fermentativo ocorria a sucessão de leveduras mais adaptadas para o processo industrial. Alguns trabalhos demonstram a existência de linhagens capazes de dominar o processo de fermentação ao longo dos vários ciclos fermentativos durante a safra resultando em fermentações eficientes e estáveis. As linhagens, também conhecidas como “industriais”, foram isoladas e selecionadas ao longo dos anos de existência do processo de obtenção de etanol, e atualmente são utilizadas por várias usinas brasileiras desde o início da safra de produção do etanol. Apresentam características essenciais para a sobrevivência em condições de estresse celular como: resistência aos reciclos celulares, altas temperaturas, alta concentração de etanol, estresse osmótico, variações de pH e competição com bactérias e leveduras selvagens, com muitos destes efeitos agindo sinergicamente (ANDRIETTA et al., 2007; AMORIM et al., 2011; BASSO et al., 2008; WHEALS et al., 1999).

O impacto positivo na seleção de linhagens de leveduras mais adaptadas é devido sua melhor performance fermentativa (alto rendimento a

etanol e redução na formação de glicerol), manutenção da viabilidade celular durante os ciclos, não floculação e não formação de espuma e a capacidade de sobreviver em ambientes industriais. Em 1990, foram selecionadas duas linhagens industriais de *S. cerevisiae* (CAT-1 e PE-2), que são utilizadas até hoje, em mais da metade das destilarias brasileiras para início do processo de fermentação. Essas linhagens foram isoladas de processos industriais de fermentações de batelada alimentada e contínua (BASSO et al., 2008).

A linhagem industrial CAT-1 foi isolada pela Fermentec Ltda em 1998/1999 na usina VO Catanduva localizada no estado de São Paulo. Atualmente esta linhagem está disponível comercialmente na empresa brasileira LNM Latino Americana Ltda. Esta linhagem foi estudada utilizando-se técnicas de cariotipagem, avaliada em condições de laboratório e reintroduzida durante anos nas destilarias para verificar sua predominância nas dornas de fermentação (ANDRIETTA et al., 2007; AMORIM et al., 2011; BASSO et al., 2008). Também foi testada sua capacidade fermentativa em outros processos industriais como para a produção de bebidas destiladas a partir de cereais, onde foi observado um melhor comportamento da linhagem CAT-1 em relação a linhagem comumente empregada nesse processo (NETO et al., 2009).

O grupo de pesquisa do Laboratório de Biologia Molecular e Biotecnologia de Leveduras da UFSC vem estudando o comportamento da linhagem industrial diploide CAT-1 em laboratório. Dário (2007), avaliou o perfil de crescimento e fermentativo desta linhagem frente a diferentes substratos, e demonstrou que a sacarose é rapidamente hidrolisada no exterior da células devido as altas taxa de expressão da invertase. Análises de *Southern Blot* mostraram que a linhagem CAT-1 só possui um loci do gene *SUC2* em seu genoma, localizado no cromossomo IX. Sabe-se que a deleção de uma única cópia deste gene não altera o padrão de hidrólise extracelular da sacarose (STAMBUK et al., 2009; DUVAL, 2010). O outro gene necessário para o transporte ativo da sacarose é o gene *AGT1*. Estudos do nosso grupo de pesquisa indicaram que, apesar do gene *AGT1* estar presente no cromossomo VII da levedura, este parece não ser funcional, pois a linhagem CAT-1 não consegue crescer em maltotriose como única fonte de carbono, fenótipo típico que requer a expressão do gene *AGT1* (ALVES et al., 2008; DUVAL et al., 2010). Entretanto, foi demonstrada a ausência da síntese de RNAm nesta linhagem, uma vez que a CAT-1 possui a ORF completa para o gene *AGT1*, porém uma sequência promotora diferenciada das linhagens de laboratório, mas semelhante as encontradas em outra linhagens industriais incapazes de fermentar a maltotriose (ALVES, 2010; BROWN; MURRAY; VERSTREPEN, 2010; VIDGREN et al., 2011).

Estudos utilizando microarray demonstraram a amplificação de genes

envolvidos na síntese de vitaminas B1 (tiamina) e B6 (piridoxina) nas principais linhagens utilizadas na produção industrial de etanol no Brasil, suprimindo uma deficiência nutricional que o mosto de fermentação não disponibiliza às leveduras. Recentemente, Babrzadeh et al. (2012) publicou o sequenciamento completo do genoma da linhagem diploide CAT-1, que busca identificar as variações no perfil genético que possam estar associadas a características industriais importantes. Análises do genoma revelaram que a linhagem CAT-1 é um diploide com alto grau de heterozigose e possui um genoma de 12 Mb. O aumento na ploidia em leveduras é uma característica apontada como responsável por tornar esses microrganismos mais resistentes às condições extremas e menos susceptíveis a mutação, ao contrário das linhagens de laboratório, que são haplóides (STAMBUK et al., 2009). Babrzadeh et al. (2012), ainda identificou uma série de genes com ampliações, que podem estar relacionados com o eficiente metabolismo de sacarose. O gene *AGT1* foi encontrado em uma única cópia apenas, e interessantemente, o gene *SUC2*, que codifica para invertase, e o gene *RTM1*, que implica em resistência das células ao melaço, não estavam amplificados no genoma da CAT-1. A presença disseminada dos genes *SUC* nas regiões teloméricas dos cromossomos indica que a síntese da invertase é uma característica comum tanto para leveduras de panificação como de produção de etanol, e mostra a adaptação destas linhagens aos meios ricos em sacarose. Também não foi observada amplificação do gene *SUC* no genoma da linhagem JAY291, que consiste em um esporo haplóide da linhagem PE-2 (ARGUESO et al., 2009).

A fermentação anaeróbica de sacarose pelo mecanismo de hidrólise extracelular (gerado glicose e frutose) rende 4 mol de ATP por molécula de açúcar. Quando a sacarose é internalizada pelo transporte ativo e metabolizada intracelularmente, o próton que é transportado junto com a sacarose (STAMBUK; BATISTA; ARAUJO, 2000) é retirado pela proteína de membrana ATPase (codificada pelo gene *PMAI*) para manter a força motriz através da membrana e prevenir a acidificação intracelular. Para cada H⁺ transportado para fora da célula pela ATPase é utilizado uma molécula de ATP (WEUSTHUIS et al., 1993), reduzindo assim o rendimento energético total da fermentação de sacarose em 25% (3 mol ATP por molécula de açúcar). Como consequência, as células que possuem transporte ativo e hidrólise intracelular do dissacarídeo, em quimiostatos com limitação de açúcar e em anerbiose, podem produzir 25% menos biomassa e 8% mais etanol, quando comparado com a fermentação em quimiostatos com limitação de glicose (WEUSTHUIS et al., 1993). As células apresentam incremento no rendimento da produção de etanol e na velocidade de fermentação, para repor a energia perdida, sendo o transporte de açúcares através da membrana o

passo limitante na fermentação (MALLUTA; DECKER; STAMBUK, 2000; ZASTROW et al., 2001).

Recentemente, o nosso grupo de pesquisa construiu uma linhagem de laboratório haplóide, geneticamente modificada pela inserção de um promotor forte (P_{ADH1}) substituindo os primeiros 60 nucleotídeos que codificam para a sequência sinal, responsável pelo direcionamento da invertase na célula, visando a utilização da sacarose somente pela via intracelular. Esta linhagem apresentou um aumento de 4% no rendimento de etanol durante a fermentação anaeróbica em quimiostatos com limitação de substrato (BASSO et al., 2011). Após 90 gerações nesse meio, as células apresentavam um aumento de 10 vezes na atividade de simporte de H^+ , resultando em um aumento em 11% no rendimento de etanol a partir de sacarose. Uma análise transcricional revelou aumento na expressão de genes relacionados com o metabolismo de maltose, incluindo o gene *AGT1*, que encontra-se amplificado nas leveduras evoluídas. Também já foram criadas linhagens de laboratório haplóides e diploides, que apresentam a sobre-expressão dos genes *SUC2* na sua forma intracelular e *AGT1*. Como resultado, foi observado a modificação no mecanismo de consumo da sacarose, e linhagens de laboratório com origens diferenciadas foram capazes de fermentar eficientemente altas concentrações de sacarose (DÁRIO, 2011; ESPÍRITO-SANTO, 2012). DÁRIO (2011) também relatou uma correlação positiva entre a capacidade fermentativa de sacarose por linhagens de laboratório prototróficas em relação às linhagens auxotróficas.

Na biotecnologia industrial existe um esforço contínuo para o aperfeiçoamento dos processos fermentativos focalizando tanto a seleção de microrganismos quanto o melhoramento das características próprias dos processos. Entretanto, na última década, a manipulação de genomas de microrganismos vem sendo amplamente empregada para a modificação de linhagens de leveduras. A engenharia genômica, definida como um aperfeiçoamento racional dos processos celulares pela introdução de modificações genéticas no organismo, apresenta-se como ferramenta fundamental para alcançar processos mais eficientes (BAILEY, 1991). A engenharia genômica de linhagens industriais ainda não é amplamente aplicada, porém em linhagens de laboratório de *S. cerevisiae* essa prática é rotineiramente utilizada.

As técnicas de recombinação homóloga podem ser utilizadas para a deleção de genes específicos, bem como a modulação da sua expressão colocando os genes sobre o controle de promotores fortes e constitutivos ou introduzindo uma mutação sítio dirigida na sequência do gene alvo (PETRACEK; LONGTINE, 2002). Para transformar o genoma da levedura industrial prototrófica CAT-1, foram utilizadas técnicas baseadas em PCR

para amplificação de módulos genéticos e eventos de recombinação homóloga para inserção dos módulos no genoma das leveduras. A recombinação homóloga é mais eficiente quando a região de homologia ao genoma possui cerca de 100 - 500 pb, chamada de *Long Flanking Homology* - *LFH*, apesar de que, sequências menores, de 30 a 40 pb de homologia *Short Flanking Homology* - *SFH*, também são capazes de se integrar de forma específica no genoma de leveduras, porém com eficiências menores. Para a seleção dos clones transformantes, foi necessária a utilização de marcadores de transformação dominantes, como a inserção do gene *KanMX* que confere resistência à geneticina, ou *Ble^r*, que confere resistência à bleomicina ou zeocina (GÜLDENER et al., 1996, 2002; PETRACEK; LONGTINE, 2002), uma vez que a linhagem CAT-1 não possui nenhum defeito no metabolismo de aminoácidos.

Considerando-se que uma porcentagem elevada dos custos de produção de etanol industrial são os custos de matéria-prima de açúcar, espera-se que qualquer aumento no rendimento de etanol a partir de sacarose terá um impacto significativo na produtividade deste setor industrial. O presente trabalho visa desenvolver linhagens de leveduras industriais que terão maiores rendimentos na fermentação de sacarose a etanol, após a modulação da expressão de genes alvos como o *SUC2* e *AGT1*.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste trabalho foi desenvolver estratégias de engenharia genômica para modificar o mecanismo da fermentação de sacarose em linhagens industriais diploides de *S. cerevisiae*, visando aumentar o rendimento da fermentação e sua aplicabilidade na indústria de álcool combustível.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- **Modificações genômicas em leveduras industriais:** desenvolver estratégias de modificações genômicas para que os genes alvos deste estudo (*SUC2* e *AGT1*), por recombinação homóloga, sejam modificados ou removidos do genoma da linhagem industrial diploide CAT-1;
- **Retirada dos marcadores de transformação:** construir plasmídeos que possibilitem a retirada dos marcadores dominantes de transformação pela recombinação homóloga de sequências *loxP*, para aplicabilidade imediata das leveduras modificadas nas usinas;
- **Analisar parâmetros cinéticos das leveduras modificadas:** avaliar parâmetros cinéticos das leveduras geneticamente modificadas e comparar com a linhagem parental. Utilizando curvas de crescimento contendo 20 g L⁻¹ de sacarose será calculado: velocidade específica de crescimento (μ_x), velocidade específica de consumo de substrato ($\mu_{sacarose}$, fator de conversão de substrato em biomassa ($Y_{x/s}$) e fator de conversão de substrato em produto (etanol) ($Y_{p/s}$);
- **Analisar o fenótipo das modificações genômicas:** dosar a atividade da invertase extracelular e intracelular frente ao substrato sacarose, bem como a atividade da permease *Agt1p* utilizando os substratos pNF α G e sacarose, após o eventos de recombinação homóloga. Avaliar se as inserções ocorreram nos sítios específicos do genoma das leveduras por PCR.
- **Avaliar fermentações utilizando sacarose:** analisar se as cepas modificadas são capazes de fermentar eficientemente altas

concentrações de sacarose (200 g L^{-1}) em bateladas simples.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MEIOS DE CULTIVO

Para o cultivo das linhagens de leveduras foi utilizado meio rico (YP) composto de 10 g L⁻¹ de extrato de levedura (Fluka), 20 g L⁻¹ de peptona bacteriológica (Fluka) e suplementado com diferentes fontes de carbono como glicose, sacarose, maltotriose, rafinose e galactose. Para a preparação de meio sólido foi adicionado 20 g L⁻¹ de Bacto-agar (Fluka) antes da esterilização do meio. O armazenamento das leveduras foi realizado em meio YP-agar com 20 g L⁻¹ de glicose (Vetec) em tubos inclinados e armazenados a 4°C por até quatro meses. Já para avaliação do crescimento celular e fermentação em batelada simples foram utilizadas concentrações de 20 g L⁻¹ e 200 g L⁻¹ de sacarose (Vetec), respectivamente. O pH do meio foi ajustado para 5,0 com a adição de ácido clorídrico.

Para a seleção das linhagens modificadas foram preparados meios ricos YP-agar suplementados com 200 mg L⁻¹ de geneticina (G418 - Sigma) ou 500 mg L⁻¹ de zeocina (Invitrogen). Quando utilizado zeocina, o pH do meio deve ser ajustado para 8,0. Para a seleção da transformação com o gene *AGTI*, foi utilizado meio YP-agar contendo 20 g L⁻¹ de maltotriose e 3 g L⁻¹ de Antimicina A (Invitrogen) (inibidor da cadeia respiratória), sendo o próprio gene *AGTI* o marcador de seleção.

4.2 LINHAGENS, PLASMÍDEOS E INICIADORES

As linhagens de laboratório BSY21-2B, BSY21-15B e BSY21-34B foram utilizadas para a construção do módulo de sobre-expressão do gene *iSUC2* com o gene marcador *KanMX*, amplificado do plasmídeo pUG6 (GÜLDENER et al., 1996). As modificações genômicas foram realizadas na linhagem industrial diploide CAT-1 (Isolada da Usina VO Catanduva/SP em 1998/1999) (BASSO et al., 2008). A figura 4 resume as estratégias genéticas utilizadas para a construção de uma cepa industrial capaz de fermentar a sacarose por hidrólise intracelular, bem como as linhagens geradas após cada evento de transformação e o seu genoma. As linhagens, os plasmídeos e os iniciadores utilizados neste trabalho, estão descritos nas tabelas 1, 2 e 3, respectivamente.

Para a construção do plasmídeo pSHKAN, foi amplificado o cassete de expressão (*P_{TEF}-KanMX-T_{TEF}*) do plasmídeo pUG6 utilizando os

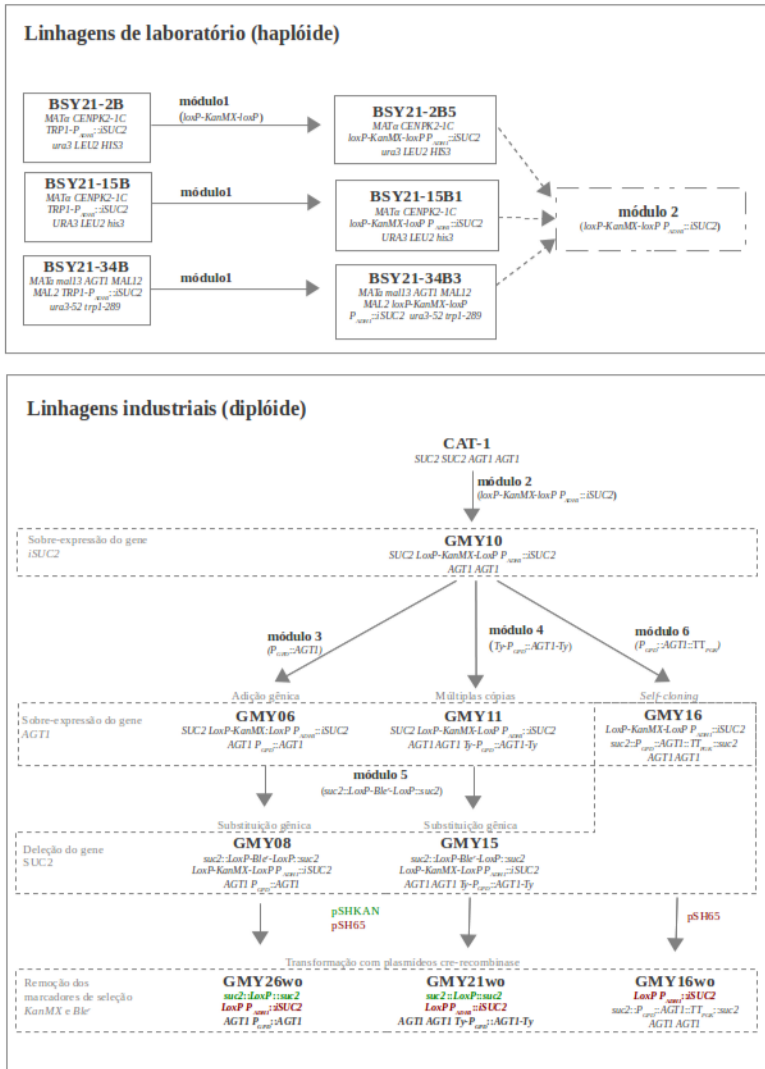


Figura 4 – Fluxograma das estratégias de modificações genômicas e linhagens de leveduras geradas neste trabalho. A) Linhagens de laboratório; B) Linhagens industriais geneticamente modificadas (GM Y) originadas a partir da linhagem industrial CAT-1.

iniciadores pSH-KANF e pSH-KANR. Ambos iniciadores contêm uma sequência flanqueadora de 40 pb para integração no plasmídeo pSH65 (GÜLDENER et al., 2002), que permite o reciclo dos marcadores de transformação, com o intuito de substituir o cassete de expressão do gene *Ble^r*, pelo descrito acima, preservando a atividade da cre-recombinase, característica principal desta classe de plasmídeos.

Tabela 1 – Linhagens de *S. cerevisiae* utilizadas neste trabalho.

Linhagens	Genoma	Referência
Linhagens de Laboratório		
BSY21-2B	<i>MATα CEN.PK2-1C TRP1-P_{ADH1}::iSUC2 ura3 LEU2 HIS3</i>	LBMBL-UFSC ^a
BSY21-15B	<i>CEN.PK2-1C TRP1-P_{ADH1}::iSUC2 URA3 LEU2 his3</i>	LBMBL-UFSC ^a
BSY21-34B	<i>MATα mal13 AGT1 MAL12 MAL2 TRP1-P_{ADH1}::iSUC2 ura3-52 trp1-289</i>	LBMBL-UFSC ^a
BSY21-2B5	<i>BSY21-2B loxP-KanMX-loxP P_{ADH1}::iSUC2 ura3 LEU2 HIS3</i>	Este trabalho
BSY21-15B1	<i>BSY21-15B loxP-KanMX-loxP P_{ADH1}::iSUC2 URA3 LEU2 his3</i>	Este trabalho
BSY21-34B3	<i>BSY21-34B loxP-KanMX-loxP P_{ADH1}::iSUC2 ura3-52 trp1-289</i>	Este trabalho
Linhagens Industriais		
CAT-1	<i>genoma diploide</i>	(BASSO et al., 2008)
GMY10	<i>CAT-1 loxP-KanMX-loxP P_{ADH1}::iSUC2 SUC2 AGT1 AGT1</i>	Este trabalho
GMY05	<i>CAT-1 SUC2 SUC2 P_{GPD}::AGT1 AGT1</i>	Este trabalho
GMY06	<i>GMY10 loxP-KanMX-loxP P_{ADH1}::iSUC2 SUC2 P_{GPD}::AGT1 AGT1</i>	Este trabalho
GMY11	<i>GMY10 loxP-KanMX-loxP P_{ADH1}::iSUC2 SUC2 AGT1 AGT1 Ty-P_{GPD}::AGT1::T_{PGK}-Ty</i>	Este trabalho
GMY08	<i>GMY06 loxP-KanMX-loxP P_{ADH1}::iSUC2 suc2::loxP-Ble^r-loxP::suc2 P_{GPD}::AGT1 AGT1</i>	Este trabalho
GMY15	<i>GMY11 loxP-KanMX-loxP P_{ADH1}::iSUC2 suc2::loxP-Ble^r-loxP::suc2 AGT1 AGT1 Ty-P_{GPD}::AGT1::T_{PGK}-Ty</i>	Este trabalho
GMY16	<i>GMY10 loxP-KanMX-loxP P_{ADH1}::iSUC2 Δsuc2::P_{GPD}::AGT1::T_{PGK} AGT1</i>	Este trabalho
GMY06wo	<i>GMY10 loxP P_{ADH1}::iSUC2 SUC2 P_{GPD}::AGT1 AGT1</i>	Este trabalho
GMY11wo	<i>GMY10 loxP P_{ADH1}::iSUC2 SUC2 AGT1 AGT1 Ty-P_{GPD}::AGT1::T_{PGK}-Ty</i>	Este trabalho

Continua na próxima página

Tabela 1 – Continuação

Linhagens	Genoma	Referência
GMY16wo	<i>GMY16 loxP P_{ADH1}::iSUC2 Δsuc2::P_{GPD}::AGT1::TPGK AGT1</i>	Este trabalho
GMY21	<i>GMY11wo loxP P_{ADH1}::iSUC2 suc2::loxP-Ble^r-loxP::suc2 AGT1 AGT1 Ty-P_{GPD}::AGT1::TPGK-Ty</i>	Este trabalho
GMY21wo	<i>GMY21 loxP P_{ADH1}::iSUC2 suc2::loxP::suc2 AGT1 AGT1 Ty-P_{GPD}::AGT1::TPGK-Ty</i>	Este trabalho
GMY26	<i>GMY06wo loxP P_{ADH1}::iSUC2 suc2::loxP-Ble^r-loxP::suc2 P_{GPD}::AGT1 AGT1</i>	Este trabalho
GMY26wo	<i>GMY26 loxP P_{ADH1}::iSUC2 suc2::loxP::suc2 P_{GPD}::AGT1 AGT1</i>	Este trabalho

^a Laboratório de Biologia Molecular e Biotecnologia de Leveduras-UFSC

Tabela 2 – Plasmídeos utilizados neste trabalho

Plasmídeos	Genoma	Referência
pGRSd-AGT1	<i>CEN6 amp^r URA3 P_{GPD}::AGT1::T_{PGK}</i>	(JULES et al., 2004)
pUG6	<i>amp^r ori loxP-P_{TEF}::KanMX::T_{TEF}-loxP</i>	(GÜLDENER et al., 1996)
pUG66	<i>amp^r ori loxP-P_{TEF}::Ble^r::T_{TEF}-loxP</i>	(GÜLDENER et al., 2002)
pSH65	<i>CEN/ARS amp^r ori P_{TEF}::Ble^r::T_{CYC1} P_{GAL}-CRE</i>	(GÜLDENER et al., 2002)
pSHKAN	<i>CEN/ARS amp^r ori P_{TEF}::KanMX::T_{TEF} P_{GAL}-CRE</i>	Este trabalho

Tabela 3 – Iniciadores utilizados neste trabalho

Iniciador	Sequência	Aplicação
pSH-KANF	CGACGGCCAGTGAATTCGAGCTCGGTACCCGGGGATCCCC <u>TAGGTC</u> TAGAGATCTGTTTAGC ^a	Construção do plasmídeo pSHKAN
pSH-KANR	AACGACGGCCAGTGAGCGCGCGTAATACGACTACTATAGGGCGAATT <u>GGATATAAGGGTTC</u> TCGAGAGCT ^a	Construção do plasmídeo pSHKAN
SUC2-F1	CAAGCAAAACAAAAAGCTTTTCTTTTCTACTAACGTATAT <u>GCCAGCTGAAGCTTCGTACGC</u> ^b	Substituição do <i>Sc TRP1</i> por <i>KanMX</i>
ADH1-R1	CGAAACAACAAAAAGATCTGTACAATCTTGATCCGGAGC <u>GCATAGGCCACTAGTGGATC</u> ^b	Substituição do <i>Sc TRP1</i> por <i>KanMX</i>
V2-SUC2F	GAGTTGTTGTCTAGCGTAG	Sobre-expressão do gene <i>iSUC2</i> e <i>Self-Cloning</i>
V2-SUC2R	TCCATTCCCTCCTACTTTC	Sobre-expressão do gene <i>iSUC2</i>
ssSUC2-F1	ATGCTTTTGCAAGCTTTCCTTTTCTTTTGGCTGGTTTTGCAGCCAAA ATATCTGCATCAGCCAGCTGAAGCTTCGTACGC ^b	Deleção do gene <i>SUC2</i>
551SUC2-R1	ATTCGTATTGGTAGCCTAAGAAACCTTCATTGGCAAATGCAGATTCTA GCTTCCAGGACTGCATAGGCCACTAGTGGATC ^b	Deleção do gene <i>SUC2</i>
Ty-pGRSd-F	CAAATGATGAGAAATAGTCACTAAATTAGTGGAAGCTGAAAC <u>TCGAGTTTATCATTATCAATAC</u> ^c	Sobre-expressão do gene <i>AGT1</i> nas regiões LTR dos Ty
Ty-pGRSd-R	TTATCATCATTTTATATGTTTATATTATTGATCCTATTACA <u>CGCAGAATTTTCGAGTTAT</u> ^c	Sobre-expressão do gene <i>AGT1</i> nas regiões LTR dos Ty
GPD-AGT1F	GCCATAGATTCTACTCGGTCTATCTATCATGTAACACTCCGTTGATGCG TACTAGAGAGTTTATCATTATCAATAC ^c	Sobre-expressão do gene <i>AGT1</i> no cromossomo VII
AGT1-389R	GAAAAACTGGCAGGGCATAC	Sobre-expressão do gene <i>AGT1</i> no cromossomo VII
ss-SUC2R	ATGCTTTTGCAAGCTTTCCT	Deleção do gene <i>SUC2</i> e sobre-expressão do gene <i>AGT1</i> - <i>Self-Cloning</i>

Continua na próxima página

Tabela 3 – Continuação

Iniciador	Sequência	Aplicação
V-SUC2F	GAAATTATCCGGGGGCGAAG	Verificação
V-TRP1-40F	GTCCATGGTGAAAGTTTGCG	Verificação
V-KAN _r -R	GGAATCGAATGCAACCGG	Verificação
V3-SUC2F	GCATCCACACGTACACAATCT	Verificação
SUC100-R	GTGGACCAAAGGTCTATCGC	Verificação
V-BLEF	CCTTCTATGAAAGGTTGGGC	Verificação
V-GPDF	CAACCATCAGTTCATAGGTC	Verificação
AGT1-1505TR	ACGGGCCAGCACTATAGTCTTAGTTCTC	Verificação
V-AGT1R	TTGGATCCACATTTATCAGCTGC	Verificação
V-AGT1F1	GAATTTTCGGGTTGGTG	Verificação
SUC2R	CTCCGACCCAGTTACCTG	Verificação
ACT1F	GCCTTGGACTIONCGAACAAGA	qPCR
ACT1R	TCCTTCGTGTTTTGGTTTTGG	qPCR
AGT1-1347F	TGGTGGAATGGGTTTTGGTT	qPCR
AGT1-1397R	CCACCGGCACCATTACTAGC	qPCR
qPCR-SUC2-F	TCCGTCTTTGCCGACTTATC	qPCR
qPCR-SUC2-R	ACCACGGTCCAAAAGAAGG	qPCR

^a Sequência de anelamento ao pUG6;

^b Sequência descrita por PETRACEK e LONGTINE (2002);

^c Sequência de anelamento ao pGRSd-AGT1;

4.3 MODIFICAÇÕES GENÔMICAS

Todas as modificações genômicas desenvolvidas na levedura industrial CAT-1, foram baseadas em técnicas de amplificação do DNA por PCR e integração no genoma por recombinação homóloga (DEMARINI; CARLIN; LIVI, 2001; PETRACEK; LONGTINE, 2002). As transformações realizadas nas leveduras estudadas foram conduzidas de acordo com os métodos descritos por Gietz e Woods (2002) e aplicadas técnicas de manipulação de DNA previamente descritas (AUSUBEL et al., 1992). Para a seleção dos transformantes, foram utilizados marcadores dominantes, ou seja, que conferem resistência a antimicrobianos ou substâncias normalmente tóxicas para as leveduras. Nas estratégias genômicas aplicadas neste trabalho, todos os marcadores dominantes estão flanqueados por regiões chamadas de *loxP*, que se recombinam e permitem a remoção destes marcadores por excisão do genoma na presença da enzima cre-recombinase (GÜLDENER et al., 1996, 2002).

4.3.1 Construção do módulo *iSUC2* contendo o gene marcador *KanMX* em linhagens de laboratório

A linhagem de laboratório BSY21-34B possui em seu genoma o gene *iSUC2* (invertase intracelular) controlado pelo promotor forte e constitutivo *ADH1* e uma marca de seleção auxotrófica *TRP1*. A substituição do gene *TRP1* pelo gene marcador *KanMX* foi realizada de acordo com a figura 5. O gene *KanMX* foi isolado do plasmídeo pUG6 por PCR utilizando os iniciadores SUC2-F1 e ADH1-R1 (Módulo 1) e inserido na linhagem BSY21-34B, gerando a linhagem BSY21-34B3. A verificação da correta substituição do gene foi realizada por PCR utilizando os iniciadores V-SUC2-F (rosa), V-TRP1-40F (violeta) e V-KANr-R (verde). Estas mesmas modificações foram realizadas nas linhagens BSY21-2B e BSY21-15B, que diferem entre si pelas marcas auxotróficas.

4.3.2 Redirecionamento da expressão do gene *SUC2* na linhagem industrial CAT-1

Duas estratégias foram utilizadas para modificar a expressão do gene *SUC2*. A primeira foi sobre-expressar a forma intracelular da invertase (*iSUC2*), e posteriormente deletar a outra cópia do gene *SUC2* do genoma da levedura CAT-1. O módulo genético para a sobre-expressão

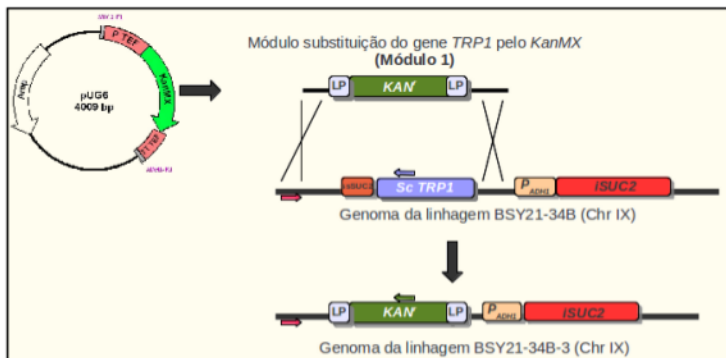


Figura 5 – Estratégia de recombinação homóloga para substituição do gene *TRP1* pelo gene *KanMX* na linhagem de laboratório BSY21-34B. As setas indicam os iniciadores utilizados para a verificação da correta integração do módulo 1 (V-SUC2-F - rosa; V-TRIP1-40F - violeta; V-KANr-R - verde).

da invertase intracelular foi amplificado por PCR a partir da linhagem BSY21-34B3 utilizando os iniciadores V2-SUC2F (vermelho claro) e V2-SUC2R (vermelho escuro), contendo sequências flanqueadoras longas com mais de 400 pb de homologia às regiões a montante e a jusante do gene *SUC2* no cromossomo IX (Módulo 2). Esta estratégia visa a substituição completa de uma cópia do gene *SUC2*, incluindo sua sequência sinal, pela sequência de DNA amplificada (Figura 6). A verificação da transformação foi realizada utilizando os iniciadores V3-SUC2F (magenta), V-KANr-R (verde) e SUC100-R (azul).

Para a deleção da segunda cópia do gene *SUC2*, foi amplificado por PCR, a partir do plasmídeo pUG66 com os iniciadores ssSUC2-F1 e 551SUC2-R1, o gene marcador de transformação *Ble^r* flanqueado por sequência *loxP*. De acordo com a figura 7, este módulo de deleção possui 60 pb de homologia à sequência sinal deste gene (deletada na outra cópia), que permite uma integração sítio-específica na cópia não modificada, e 60 pb de homologia à região 551 nucleotídeos do gene *SUC2*. Com esta estratégia não deletamos a sequência toda do gene *SUC2*, mas truncamos este gene de forma que o mesmo não apresente mais atividade codificante. Para a verificação da transformação, o DNA das linhagens foi amplificado por PCR utilizando os iniciadores V-SUC2F (rosa) e SUC100-R (azul) para confirmar a remoção de cerca de 550 pb do gene *SUC2*. Os produtos de amplificação foram visualizados em gel de agarose 1%.

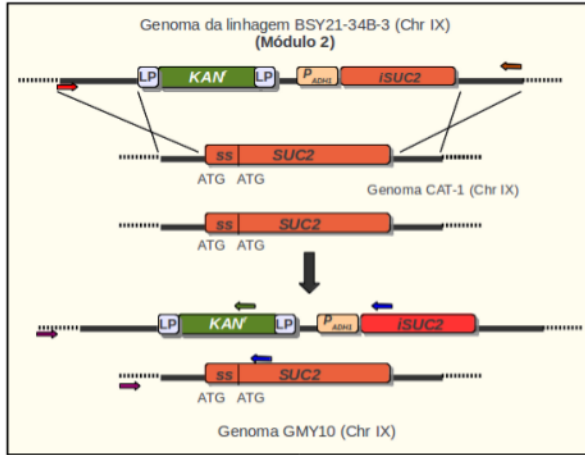


Figura 6 – Estratégia para sobre-expressão da invertase intracelular na linhagem industrial CAT-1. As setas indicam os iniciadores utilizados para a verificação da correta integração do módulo genômico, sendo possível amplificar o gene marcador *KanMX* (magenta e verde) e as cópias normal e modificada (*iSUC2*) do gene *SUC2* (magenta e azul) no cromossoma IX da levedura.

4.3.3 Modificações genéticas na expressão do gene *AGT1* na linhagem industrial CAT-1

Para a sobre-expressão do gene *AGT1* nas linhagens CAT-1 modificadas geneticamente, foram utilizadas três estratégias diferentes. A primeira estratégia utilizada para a sobre-expressão do gene *AGT1* na linhagem industrial foi inserir o promotor constitutivo *GPD* a montante do gene *AGT1* no cromossomo VII da levedura. O módulo genético foi construído por amplificação por PCR a partir do pGRSd-*AGT1* utilizando os iniciadores *GPD-AGT1F* e *AGT1-389R* (Módulo 3). Nesta estratégia, foi gerado um módulo genético que contém uma sequência flanqueadora de 55 pb (em azul) de homologia à região a montante do gene *AGT1*, e 409 pb que correspondem ao próprio gene *AGT1*, utilizado como região longa de homologia (Figura 8). Os clones transformantes foram verificados por amplificação do DNA total utilizando os iniciadores V-GPDF (salmão), V-*AGT1F1* (marrom) e *AGT1-I505TR* (laranja), e o resultado das amplificações foi visualizado em gel de agarose 1%.

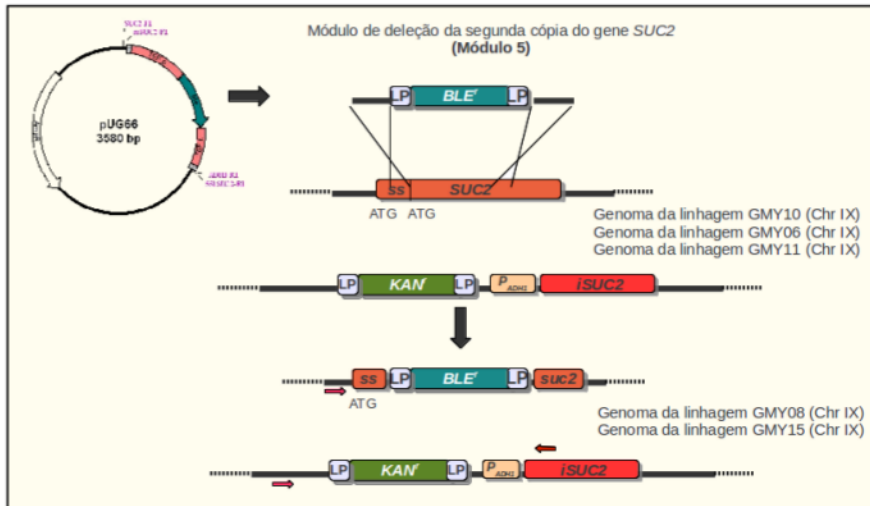


Figura 7 – Estratégia de deleção do gene *SUC2* pela substituição de 551 nucleotídeos da sua sequência codificante pelo marcador *Ble'*. A verificação da correta integração do Módulo 5 foi realizada por PCR utilizando iniciadores que anelam no cromossomo IX (V-SUC2F - rosa), a montante do gene *SUC2*, e na posição de 100 pb no gene *SUC2* (SUC100R - azul).

Outra estratégia foi amplificar o módulo de sobre-expressão do gene *AGT1* a partir do plasmídeo pGRSd-*AGT1* utilizando os iniciadores Ty-pGRSd-F e Ty-pGRSd-R (Tabela 3). Com esta estratégia pretendeu-se a integração deste módulo em múltiplas cópias nas regiões LTR dos elementos transposons Ty1 de leveduras *Saccharomyces* (figura 9) (GUERRA et al., 2006). Para a verificação dos transformantes por amplificação do DNA, foram utilizados os iniciadores V-GPDF (salmão) e *AGT1*-I505T-R (laranja) e os resultados foram visualizados em gel de agarose.

A terceira estratégia utilizada é denominada de *Self-Cloning*, pois não é utilizado nenhum gene *non-Saccharomyces* para a transformação das leveduras. Aqui, utilizamos um único evento de recombinação homóloga para deletar uma cópia do gene *SUC2* com módulo de sobre-expressão do gene *AGT1*. Neste caso, o próprio gene *AGT1* é utilizado com marcador de seleção, pois somente células que possuem expressão deste gene serão capazes de crescer em meio contendo maltotriose e antimicina A (ALVES et al., 2008). O módulo de deleção/sobre-expressão foi amplificado por PCR a partir da linhagem EGY01 (DUVAL et al., 2010) utilizando os iniciadores ss-

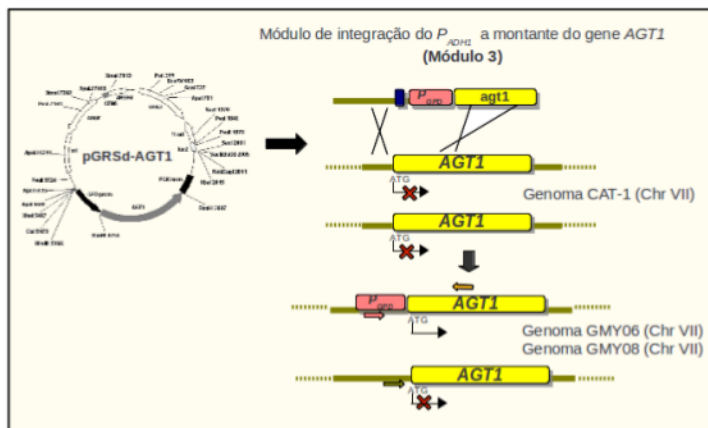


Figura 8 – Estratégia de sobre-expressão do gene *AGT1* no *locus AGT1*, pela adição de um promotor forte e constitutivo (*GPD*) a montante do gene *AGT1*. A verificação foi realizada utilizando os iniciadores V-GPDF (salmão), V-AGT1F1 (marrom) e AGT1-I505RT (laranja).

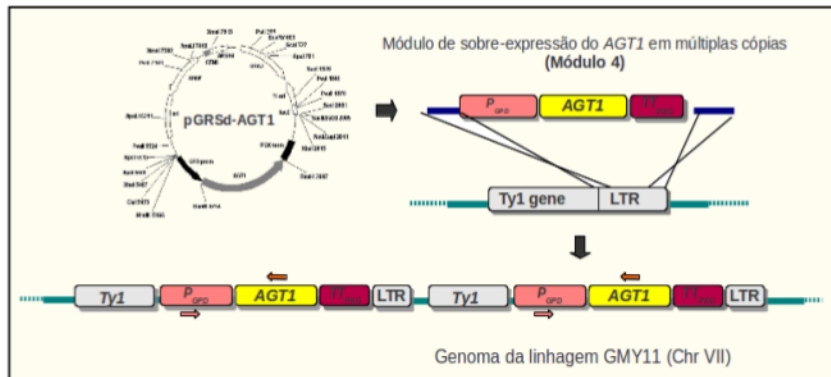


Figura 9 – Estratégia de sobre-expressão do gene *AGT1* em múltiplas cópias. A verificação da construção foi realizada por PCR utilizando os iniciadores que anelam na sequência do promotor *GPD* (V-GPDF - salmão) e no gene *AGT1* (AGT1-I505RT - laranja).

SUC2F e V2-SUC2R. Este módulo possui uma região de homologia de 342 pb a montante do gene *SUC2*, incluindo a sequência sinal, que permite uma

integração específica, uma vez que esta sequência já foi deletada na outra cópia do gene *SUC2*, e 578 pb a jusante do gene *SUC2*. A verificação da transformação foi realizada utilizando os iniciadores V3-SUC2F (magenta) e AGT1-R (verde claro) (figura 10).

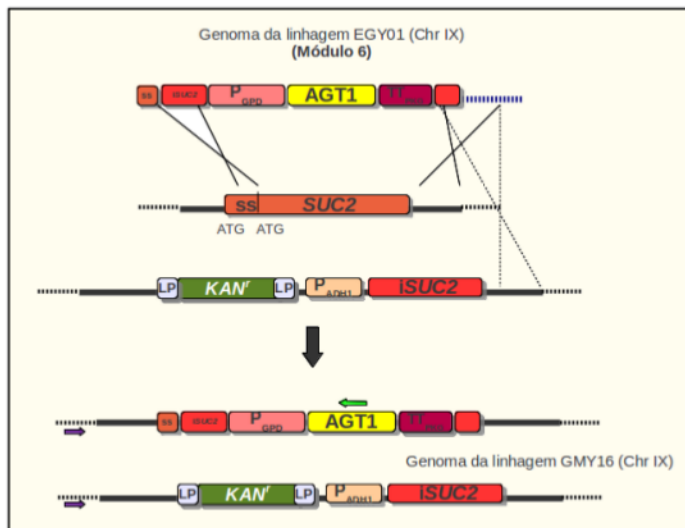


Figura 10 – Estratégia de substituição do gene *SUC2* pelo módulo de sobre-expressão do gene *AGT1* no cromossomo IX da levedura industrial CAT-1, utilizando um único evento de recombinação homóloga e sem a utilização de genes marcadores *non-Saccharomyces*. A correta substituição foi verificada por PCR utilizando um iniciador que anela na região a montante do gene *SUC2* (V3-SUC2F - magenta) e outro que anela no final do gene *AGT1* (V-AGT1R - verde claro).

4.3.4 Reações de PCR

Todas as metodologias de modificações genômicas em leveduras utilizadas neste trabalho foram baseadas em PCR. Para a construção dos módulos genômicos a reação foi realizada com uma enzima de alta fidelidade durante polimerização das fitas de DNA (Phusion High Fidelity DNA Polymerase, Finnzymes) seguindo as seguintes condições: 50 ng DNA, tampão 1X, 200 μ M de dNTPs, 5 μ M de cada iniciador, 1 U da enzima

Phusion e água ultrapura para completar um volume de 50 μL . O programa de PCR utilizado em termociclador Mastercycler Gradient (Eppendorf) era composto pelos seguintes passos: desnaturação inicial de 98°C por 30 segundos; seguida de ciclo de 29 vezes com um passo de desnaturação de 98°C por 5- 10 segundos, anelamento dos iniciadores com temperatura de 69°C por 30 seg e um passo de extensão das fitas de 72°C por 15 - 30 seg/Kb, além de um passo de extensão final de 72°C por 5 minutos.

Já, as reações de PCR para verificação dos transformantes, foram conduzidas com a enzima PAQ500 (Stratagena) de acordo com as especificações: 50 ng de DNA, tampão 1X, 200 μM de dNTPs, 2,0 mM de MgCl_2 , 5 μM de cada iniciador, 2,5 U de PAQ500 DNA polimerase e água ultrapura esterilizada em quantidade suficiente para um volume total de 25 μL . O programa do termociclador continha os seguintes passos: desnaturação inicial de 95°C por 5 min; seguida de ciclo de 29 vezes com um passo de desnaturação de 95°C por 1 min, anelamento dos iniciadores com temperatura de 69°C por 45 seg e um passo de extensão das fitas de 72°C por 60 seg/Kb e extensão final de final de 72°C por 5 min.

4.3.5 Eletroforese em gel de agarose

Todos os módulos amplificados por PCR e as verificações das transformações foram visualizadas em eletroforese em gel de agarose. Um volume de 22 μL , (20 μL da reação submetida a PCR, misturado com 2 μL de tampão de corrida 10 vezes concentrado (20% de ficoll 400, 0,1 M de EDTA, 1,6% de SDS e 0,05% de azul de bromofenol)) foi aplicado em gel 1% de agarose, contendo 0,5 $\mu\text{g.mL}$ de brometo de etídio em tampão TBE 0,5X (1 mM de EDTA pH = 8,0 e tampão 45 mM Tris-borato). Um volume de 5 μL , de marcador de peso molecular 1 kb ladder (Fermentas), foi também aplicado no gel de agarose. O gel foi submetido à eletroforese em tampão TBE 0,5X, a 100V por 40 a 60 min. Após o término do tempo, o gel foi analisado e fotografado sob luz ultravioleta (MANIATIS; FRITSCH; SAMBROOK, 1982).

4.4 ENSAIOS DE CULTIVOS CELULARES

4.4.1 Pré-cultivos

Os pré-cultivos das leveduras foram realizados em 4 mL de meio rico YP acrescidos 20 g L^{-1} de glicose e incubados a 28 °C, por 48 horas a 160

rpm. Nos ensaios em que as células foram crescidas em frascos Erlenmeyers, contendo em 1/5 de seu volume meio rico YP, a agitação foi constante e igual a 160 rpm, a 28 °C.

Para determinação da massa seca de leveduras, foi utilizada a equação 4.1. Primeiramente foi medida a densidade óptica da amostra em comprimento de onda de 570 nm, devendo a leitura da absorbância ficar entre 0,030 a 0,300 OD. Ao valor da absorbância mensurada, multiplicou-se o Fator de Conversão 0,27 para a determinação da concentração celular. Este valor foi obtido pela razão entre a massa seca de células e a absorbância da cultura.

$$X_{biomassa} = ABS_{amostra} \cdot D \cdot FC \quad (4.1)$$

$X_{biomassa}$ = Concentração da biomassa celular na amostra expressa em $g L^{-1}$;

$ABS_{amostra}$ = Absorbância da amostra em 570 nm;

D = Fator de diluição da amostra;

FC = Fator de conversão da absorbância para massa seca de leveduras.

4.4.2 Suspensão celular

Para os ensaios de atividade enzimática, transporte de substratos e fermentação em batelada simples com frascos agitados foi necessário concentrar as células até $20 g L^{-1}$. Para isso, as células foram coletadas no início da fase exponencial, com uma concentração de $1 - 1,5 g L^{-1}$, centrifugadas (6000 rpm, 5 minutos) para a retirada do meio de cultura e lavadas com água destilada gelada. O processo de lavagem foi repetido três vezes. Levando em consideração a concentração celular na hora da coleta das células e o volume de cultivo, pode-se calcular a quantidade de água necessária para que a suspensão celular fique numa concentração de $20 g L^{-1}$.

4.4.3 Crescimento celular em frasco agitado

A partir da pré-cultura descrita na seção 4.4.1, foi adicionado 1/100 do volume de células em relação ao volume de meio rico YP contendo $20 g L^{-1}$ de glicose ou sacarose. As células foram crescidas por 24 horas, sob agitação constante de 160 rpm, a 28°C. As amostras foram retiradas em intervalos de tempo no intuito de coletar o maior número de pontos dentro da fase exponencial de crescimento celular. A partir destas amostras, foi realizada a leitura da absorbância em 570 nm e alíquotas de 500 μL foram centrifugadas (5.000 g, 4 min), o sobrenadante coletado e estocado a -20°C (freezer) para posterior análise de açúcares (sacarose, glicose e frutose) e de

metabólitos (etanol e glicerol).

4.4.4 Fermentação em batelada simples em frascos agitados

Este ensaio teve como finalidade avaliar o comportamento das linhagens parentais e modificadas em uma situação similar ao processo de produção de etanol no Brasil. Para a realização deste ensaio, as linhagens foram pré-crescidas como descrito na seção 4.4.1 e após realizada a propagação celular, onde foi inoculado um volume de célula 1000X (mil vezes) menor em relação ao volume de meio rico YP contendo 20 g L^{-1} de sacarose. As células foram crescidas até atingir uma concentração celular de aproximadamente $1 - 1,5 \text{ g L}^{-1}$ e realizada a suspensão celular (4.4.2). A esta suspensão, foi adicionado, nas mesmas proporções, meio YP duas vezes concentrado acrescido de 400 g L^{-1} sacarose, de forma que a concentração final atingisse 10 g L^{-1} de células e 200 g L^{-1} de sacarose. As amostras foram retiradas em intervalos de tempo pré- determinados. A partir destas amostras, foi realizada a leitura da absorbância em 570 nm e alíquotas de $500 \mu\text{L}$ foram centrifugadas (5.000 g , 4 min) e o sobrenadante coletado e estocado a -20°C (freezer) para posterior análise de açúcares (sacarose, glicose e frutose) e metabólitos (etanol e glicerol).

4.4.5 Crescimento em microescala

Após o pré-cultivo (seção 4.4.1), as células foram diluídas 10X (dez vezes) em água destilada e um volume de $10 \mu\text{L}$ dessa diluição foi transferido para cada poço da placa de ELISA. Em seguida, $90 \mu\text{L}$ de meio rico (1,1x concentrado) foi adicionado a cada um dos 96 poços e a placa foi incubadas à 28°C e 161 rpm em um leitor para placas (Tecan, Infinit ProM200, Grödig, Salzburg, Áustria). Os meios utilizados ficaram com a concentração final de sacarose ajusta para 20 g L^{-1} e 200 g L^{-1} . A variação da densidade óptica (570 nm) foi medida a cada quinze minutos e para calcular o valor final do crescimento celular, foi subtraída a absorbância do meio com fonte de carbono do sem a fonte de carbono.

4.4.6 Retirada dos marcadores *KanMX* e *Ble^r*

Primeiramente, as células de leveduras que continham os genes marcadores de seleção *KanMX* e *Ble^r* flanqueados por sequências *loxP*, foram transformadas com os plasmídeos pSH65 e pSHKAN, que contém a enzima cre-recombinase sob o controle do promotor *GAL*. Após a transformação e seleção dos clones, as cepas foram pré-crescidas (4.4.1) em meio rico YP suplementado com 20 g L^{-1} de rafinose e incubadas a 28°C até o início da fase exponencial de crescimento. Em seguida as células pré-crescidas em rafinose, foram inoculadas com uma OD de 0,4 em meio rico YP contendo 20 g L^{-1} de galactose e incubadas a 28°C com agitação por quatro horas. Após foram realizadas diluições seriadas e as células plaqueadas em meio

YPD-agar, de forma que cada placa apresentou, em média, 100 a 150 colônias. As placas foram colocadas em estufa a 28°C por 48 horas. Após realizou-se um *replica-plate* (LEDERBERG; LEDERBERG, 1952) em meio rico YPD-agar acrescido de geneticina (G418) ou zeocina e as placas foram novamente incubadas em estufa a 28°C por 48 horas. Para avaliação dos resultados, foi observada a ausência no crescimento de colônias nas placas com o meio seletivo em relação às placas com meio rico, indicando que, provavelmente nestas células o marcador dominante foi removido. A excisão do gene *KanMX* foi confirmada por PCR utilizando os iniciadores V3-SUC2F, V-KAN^rR e SUC100-R, enquanto que a excisão do gene *Ble^r* foi confirmada utilizando os iniciadores V-SUC2F e SUC100-R.

Para a retirada dos plasmídeos pSH65 ou pSHKAN, as células foram inoculadas em 3 mL de meio rico YPS, incubadas a 28°C com agitação por 12 horas. Passadas as 12 horas de crescimento, as células foram novamente inoculadas em 3 mL de meio rico YPS, em repiques sucessivos por 5 dias. Após esse período as células foram plaqueadas no meio YPS-agar contendo antimicina A e posteriormente realizado um *replica-plate* em meio seletivo YPS-agar contendo geneticina ou zeocina. As células que não cresceram em meio seletivo e cresceram nas placas com meio rico perderam o plasmídeo.

4.5 DETERMINAÇÕES BIOQUÍMICAS

As determinações de sacarose, glicose, frutose, glicerol e etanol foram realizadas por cromatografia líquida de alta pressão (HPLC, Jasco X-LC), com detector de refração index (RI 2031 plus, Jasco) e coluna para ácidos orgânicos (HyperREZ XP Organic Acid Column, Thermo Scientific). A fase móvel utilizada foi 5 mM de ácido sulfúrico, a 20 °C, com taxa de fluxo de 0,3 mL/min.

4.6 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE INVERTASE

Este método baseia-se na quantificação da glicose liberada após a hidrólise da invertase sobre o substrato sacarose. Todos os ensaios enzimáticos foram determinados em triplicata e os controles negativos (usando células fervidas a 100°C durante 5 min) em duplicata. Geralmente os resultados obtidos diferiram em menos de 10%.

4.6.1 Atividade da invertase extracelular

A atividade da invertase extracelular foi determinada utilizando-se células íntegras conforme descrito por Silveira, Carvajal e Bon (1996). Para isso, 100 µL de solução tampão 150 mM Tris-succinato pH 5,0, contendo 150 mM NaF (fluoreto de sódio), foi misturado com 100 µL de células e incubado em banho-maria a 30°C por 30 min. Posteriormente, foi adicionado 100 µL de 300 mM sacarose e incubado nas

mesmas condições por mais 5 min. A seguir, as amostras foram fervidas a 100°C, por 5 min e a glicose formada foi determinada no sobrenadante através de kits enzimáticos comerciais utilizados conforme descrição dos fabricantes. A atividade da invertase extracelular foi expressa em nmoles de glicose produzida por mg^{-1} de células (peso seco) por min^{-1} .

4.6.2 Atividade da invertase total

A atividade de invertase total foi determinada utilizando-se células permeabilizada (STAMBUK et al., 1999). Para isso, 100 μL de células foram centrifugadas (3.000 g, 1 min) e posteriormente misturadas com 200 μL de tampão 50 mM Mops-NaOH (ácido 3-(N-morfolino) propanosulfônico), pH 6,8 (tampão A), contendo 20% glicerol, 0,5 mM EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) e 0,5 mM DTT (Dithiothreitol). A seguir foram adicionados 12 μL de uma mistura contendo tolueno, etanol e 10% Triton X-100 em água, na proporção 1:4:1 (v/v/v). As amostras foram homogeneizadas durante 1 min, centrifugadas (3.000 g, 1 min) e o sobrenadante desprezado. Posteriormente, as células foram lavadas com 1,5 mL do tampão A e ressuspensas em 1 mL do mesmo tampão. Aliquotas de 50 μL dessa suspensão foram misturadas com 50 μL de 200 mM sacarose, incubadas durante 5 min a 30°C e fervidas a 100°C durante 5 min. Após centrifugação (3.000 g, 1 min), a atividade da invertase total (produção de glicose) foi determinada como descrito acima e expressa em nmoles de glicose produzida por mg^{-1} de células (peso seco) por min^{-1} .

4.7 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE TRANSPORTE DE PNF α G

O princípio do método baseia-se na utilização do *p-nitrofenil- α -D-glucopiranosídeo*, substrato sintético estruturalmente análogo à maltose, para avaliar a capacidade das leveduras em transportar açúcares. Em *S. cerevisiae*, esse substrato é transportado com alta afinidade pelo transportador Agt1p, e a seguir é hidrolisado por α -glicosidases. A liberação do *p*-nitrofenol, composto químico de cor amarela, permite estimar a atividade de transporte, através da intensidade de cor medida em espectrofotômetro. A atividade de transporte nas linhagens analisadas foi realizado utilizando células intactas conforme o método colorimétrico proposto por Hollatz e Stambuk (2001). Partindo de suspensões celulares (seção 4.4.2), 100 μL foram transferidos para 02 tubos e fervidos a 100°C, a fim de preparar os controles negativos. Outros 100 μL foram adicionados juntamente com 100 μL de pNF α G durante 5 ou 10 min a temperatura ambiente, dependendo se a linhagem possui ou não, respectivamente, a permease Agt1p no genoma. As reações foram interrompidas através da adição de 1 mL de 2 M de bicarbonato de sódio. As amostras foram centrifugadas a 12.000 rpm por 3 min e o *p*-nitrofenol liberado foi medido por absorvância a 400 nm ($\Delta \epsilon = 14,8 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, no pH $\geq 9,0$) utilizando 800 μL do sobrenadante. Todas as análises foram feitas em triplicatas e os controles negativos com células fervidas, em duplicata. As atividades de transporte foram expressas em

nmoles de *p*-nitrofenol liberado por mg^{-1} de células (massa seca) por min^{-1} .

4.8 DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETRO FISIOLÓGICOS DAS LEVEDURAS

Os parâmetros cinéticos das linhagens foram calculados durante a fase de crescimento exponencial, conforme descrito por (SCHMIDELL et al., 2001). Primeiramente, a fase exponencial de crescimento das linhagens foi identificada através segmento linear obtido pelo gráfico logaritmo natural da biomassa ($\ln X$) em função do tempo (h). Após a definição do segmento linear correspondente à fase exponencial, determinou-se o valor da velocidade máxima de crescimento na fase exponencial (μ_x) através do coeficiente angular da equação da reta deste segmento, utilizando quatro (04) amostras coletadas durante a fase exponencial. Os valores de μ_x foram expressos em h^{-1} .

Os fatores de conversão de substrato à biomassa correspondente à fase exponencial de crescimento ($Y_{X/S}^{Exp}$) foram determinados plotando-se um gráfico da concentração de biomassa ($[X]$) em função da concentração de substrato consumido ($[Substrato]$), ou seja, ($[X]$ vs. $[Substrato]$), das amostras coletadas durante o período da fase exponencial. Assim, o módulo dos coeficientes angulares das regressões lineares revelaram o $Y_{X/S}^{Exp}$, que foi expresso em g biomassa.g substrato $^{-1}$. Considerando que a velocidade específica de consumo de substrato (μ_S) é máxima e constante durante a fase exponencial de crescimento, a determinação do valor de μ_S^{Exp} foi realizada a partir da equação 4.2, sendo os valores expressos em h^{-1} .

$$\mu_S^{Exp} = \frac{\mu_x}{Y_{X/S}^{Exp}} \quad (4.2)$$

De uma forma semelhante, para a obtenção do fator de conversão de substrato à produto (etanol) ($Y_{P/S}^{Exp}$) durante a fase exponencial de crescimento, foram traçados gráficos da concentração de produto (etanol) ($[produto]$) em função da concentração de substrato utilizado pela célula ($[Substrato]$), ou seja, ($[P]$ vs. $[Substrato]$). Assim, o módulo dos coeficientes angulares das regressões lineares revelaram o $Y_{P/S}^{Exp}$, que foi expresso em g etanol.g substrato $^{-1}$. Assumindo que a velocidade específica de produção de etanol (μ_P) é máxima e constante durante a fase exponencial de crescimento, a determinação do valor de μ_P^{Exp} foi realizada a partir da equação 4.3, sendo os valores expressos em h^{-1} .

$$\mu_P^{Exp} = \frac{\mu_x}{Y_{P/S}^{Exp}} \quad (4.3)$$

No caso dos ensaios de fermentação, foram calculados os fatores de conversão substrato a biomassa global ($Y_{X/S}^{Global}$), sendo X correspondente à concentração final de biomassa e S à concentração final de substrato. O fator de conversão de substrato a produto global ($Y_{P/S}^{Global}$) também foi calculado, resultado da razão entre os valores de concentração máxima de etanol produzido e de substrato consumido,

quando a concentração máxima de etanol foi atingida (equação 4.4). A produtividade em produto (PP) e em biomassa (PX) também foram calculados para os ensaios fermentativos. Estes parâmetros foram calculados pelas equações 4.5 e 4.6, ou seja, razão entre os valores da concentração máxima de etanol ou biomassa produzidos pelo tempo necessário a obtenção desta concentração. Os valores foram expressos em g. (L.h⁻¹).

$$Y_{P/S}^{Global} = \frac{[Etanol]}{[Substrato]} \quad (4.4)$$

$$PP = \frac{P_{final} - P_{inicial}}{Tempo_{Total}} \quad (4.5)$$

$$PX = \frac{X_{final} - X_{inicial}}{Tempo_{Total}} \quad (4.6)$$

4.9 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DURANTE FERMENTAÇÕES POR PCR EM TEMPO REAL

A análise da expressão dos genes *AGT1* e *SUC2*, durante fermentação em batelada contendo altas concentrações de sacarose, foi realizado coletando-se amostras de células nos tempos zero, cinco e dez horas após o início da fermentação. As células coletadas foram separadas por centrifugação (7.000 g, 4 min) e em seguida, realizada a extração do RNA total utilizando o RNeasy Mini Kit (Qiagen), de acordo com as instruções do fabricante. Em seguida, 0,5 µg de RNA total foram utilizados para a síntese de cDNA com o QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen), conforme descrito pelo fabricante. Para realização da PCR em tempo real, foi utilizado o QuantiFast Sybr Green PCR Kit (Qiagen). As reações de 20 µL continham 10 µL de SYBR Green qPCR Mix 1x e o volume restante foi dividido entre o volume de cDNA para cada amostra e iniciadores. Os oligonucleotídeos específicos para cada gene utilizados nessas reações estão descritos na Tabela 2.

Para a reação de amplificação, a concentração de oligonucleotídeo utilizada foi 0,3 µM. Também foram calculadas as eficiências de amplificação dos pares de oligonucleotídeos através da amplificação de uma curva padrão de cDNA com cinco pontos (400 ng; 200 ng; 100 ng; 50 ng e 25 ng) para cada par de oligonucleotídeo. Após, a concentração de cDNA estipulada para as reações foi de 100 ng.

As reações de PCR em tempo real foram realizadas no equipamento Rotor-Gene Q (Qiagen), e a ciclagem ocorreu em duas etapas: 40 ciclos de 5 segundos de desnaturação à 95°C e 10 segundos de anelamento dos iniciadores e extensão. Ao final da última etapa de cada ciclo ocorreu a aquisição de fluorescência. Os dados gerados a partir destas reações foram analisados a partir do software próprio do equipamento. Em cada ensaio, foi gerada uma curva de dissociação (ou curva de melting) para confirmar a amplificação de apenas um produto.

Para análise da expressão relativa, foram subtraídos dos valores de Cts (Tempo Ciclagem) do gene de interesse dos valores de Cts do gene constitutivo de cada

amostra. Desse valor gerado, foi subtraído o valor médio do controle para cada amostra, incluindo o próprio controle. Finalmente, cada valor gerado serviu como um expoente negativo de base 2. A fórmula do método comparativo $\Delta\Delta CT$, $2^{-\Delta\Delta CT}$, foi proposta por SCHMITTGEN e LIVAK (2008), e foi utilizada para realizar os cálculos da expressão relativa neste trabalho (Equação 4.7).

$$\Delta\Delta CT = (C_{t_{alvo}} - C_{t_{constitutivo}})^{teste} - (C_{t_{alvo}} - C_{t_{constitutivo}})^{controle} \quad (4.7)$$

O gene normalizador utilizado em nossas reações foi o *ACT1*, responsável pela síntese de β -actina e expresso constitutivamente em leveduras *S. cerevisiae*. Já a expressão dos genes *SUC2* e *AGT1* na linhagem industrial CAT-1 foram utilizados como calibrador para o cálculo da expressão relativa.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 MODIFICAÇÕES GENÔMICAS EM LEVEDURA INDUSTRIAL DIPLOIDE DE *S. CEREVISIAE*

A levedura industrial CAT-1 utilizada neste trabalho foi isolada de dornas de fermentação de álcool combustível em 1998/1999, e apresenta uma notável capacidade de produzir etanol a partir de cana-de-açúcar. Além de dominar o processo industrial com boa viabilidade e competir com linhagens selvagens, é uma das cepas de leveduras mais utilizadas para começar as fermentações nas usinas de álcool combustível no Brasil (BASSO et al., 2008).

Como já discutido anteriormente, existem duas vias de metabolização da sacarose em *S. cerevisiae*: (1) hidrólise extracelular da sacarose, que é dependente da expressão dos genes *SUC*; e, (2) transporte ativo do açúcar através da membrana e hidrólise intracelular do dissacarídeo (pela invertase intracelular ou maltase), sendo por esse motivo, dependente também da expressão dos genes *AGT1* e *MAL* para ser funcional. Sabe-se que para as células de levedura serem capazes de transportar a sacarose é necessário crescê-las previamente em maltose, para ocorrer indução da expressão dos genes *MAL*; ou então, a levedura deve apresentar genótipo *MAL* constitutivo (*MALc*) (BADOTTI; BATISTA; STAMBUK, 2005; BADOTTI et al., 2008; BATISTA; MILETTI; STAMBUK, 2004), que permitirá às células expressar os genes *MAL* independentemente da presença de indutor (maltose) no meio (NEEDLEMAN, 1991; NOVAK; ZECHNER-KRPAN; MARIE, 2004). No caso de linhagens industriais, selecionadas em ambientes com uma pressão seletiva elevada, como dornas de fermentação alcoólica, as leveduras possuem um metabolismo induzível de acordo com o meio onde estão crescendo (DÁRIO, 2007). Naturalmente estas leveduras foram selecionadas por se desenvolverem com alta viabilidade em ambientes ricos em sacarose, glicose e frutose, condição em que ocorre repressão dos genes responsáveis pelo transporte ativo da sacarose, *AGT1* e *MALT*.

Com o objetivo de modificar a via de metabolização da sacarose pela linhagem industrial diploide CAT-1, foi necessário, além de redirecionar a localização da invertase nas células (sobre-expressão da isoforma intracelular desta enzima e deleção da outra cópia do gene *SUC2*), realizar a sobre-expressão do gene *AGT1*. Uma vez que leveduras industriais não apresentam marcas auxotróficas em seu genoma, foi necessário a utilização de marcadores dominantes codificados pelos genes *KanMX* (resistência a G418) e *Ble^r* (resistência a zeocina) para a seleção dos clones com as modificações genéticas.

5.1.1 Construção do módulo *iSUC2* contendo o gene marcador *KanMX*

Primeiramente substituiu-se o gene marcador *TRP1* pelo gene *KanMX* na linhagem de laboratório BSY21-34B, que possui o locus *SUC2* previamente

modificado com a inserção do gene *TRP1* e do promotor forte *P_{ADH1}* entre a sequência sinal (os primeiros 60 nucleotídeos) do gene *SUC2*, e a sequência que codifica a invertase intracelular, gerando linhagens de laboratório *iSUC2* (BASSO et al., 2011; ESPÍRITO-SANTO, 2012; DÁRIO, 2011). O módulo de substituição do *TRP1* pelo *KanMX* (Módulo 1 - Figura 5) foi amplificado a partir do plasmídeo pUG6, e continha além do gene *KanMX* flanqueado por regiões *loxP*, sequências nas suas extremidades com 40 pb que apresentavam homologia à região -40 a +1 do gene *SUC2* e homologia ao início da sequência de nucleotídeos do promotor *ADH1*. Os transformantes foram selecionados em placas de Petri contendo meio YPD suplementado com geneticina, e seu DNA foi amplificado para verificação da correta integração do Módulo 1. Utilizando os iniciadores V-SUC2F e V-TRP1-40F foi possível amplificar uma banda de ~1229 pb, referente à presença do gene marcador *TRP1* no cromossomo IX da linhagens de laboratório (BSY21-2B; BSY21-15B e BSY21-34B), enquanto que nas linhagens transformantes essa banda não foi visualizada (Figura A-24). Já com o outro par de iniciadores utilizados (V-SUC2F e V-KANrR), foi visualizada amplificação de uma banda de ~1298 pb, referente à presença do gene *KanMX* no cromossomo IX das linhagens modificadas, enquanto que nas parentais não foi visualizada amplificação (Figura A-24). Os géis de confirmação das transformações, estão disponíveis para conferência no Apêndice deste trabalho.

5.1.2 Sobre-expressão do gene *iSUC2* na linhagem industrial CAT-1

Após as verificações, a linhagem modificada escolhida para dar sequência aos experimentos foi a BSY21-34B-3 e seu DNA foi utilizado para amplificar o módulo de sobre-expressão do gene *iSUC2* (Módulo 2 - Figura 6) utilizado na transformação de linhagens industriais. Este, era composto pelas sequências *loxP-KanMX-loxP P_{ADH1}::iSUC2*, e nas suas extremidades continha regiões longas de homologia com 635 pb e 459 pb, a montante e a jusante do gene *SUC2*, respectivamente. Utilizando esta estratégia, foi possível remover a sequência de 60 pb correspondente à sequência sinal da invertase, forçando a mesma a permanecer o citosol da célula e sob o controle de um promotor forte e constitutivo (*P_{ADH1}*). Utilizando os iniciadores V3-SUC2F e SUC100R, foi possível amplificar uma combinação de bandas visualizadas em gel de agarose, que permitiu a confirmação da integração do Módulo 2 no cromossomo IX da linhagem industrial CAT-1. Como controle positivo da reação de PCR, foi utilizado o DNA da linhagem BSY21-15B1 (igual ao BSY21-34B3), e foi obtida amplificação de uma banda de ~3274 pb, referente ao marcador *KanMX* e *P_{ADH1}::iSUC2*, mesma banda visualizada para o clone transformante que foi denominado de GYM10 (*Genetic Modified Yeast*). Esse resultado confirma a integração do Módulo 2 no locus proposto. Entretanto, para a linhagem GMY10 ainda foi observado, em gel de agarose, uma banda de ~774 pb correspondente a cópia do gene *SUC2* não modificada, mesmo tamanho de banda observado quando utilizado o DNA da linhagem parental CAT-1, que não possui modificações genômicas (Figura 11). A partir deste resultado, percebeu-se a necessidade de posterior deleção da outra cópia do gene *SUC2*.

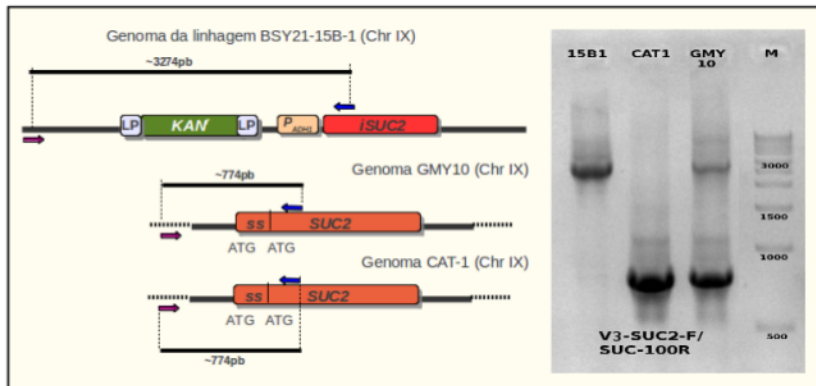


Figura 11 – Verificação em gel de agarose da integração do módulo de sobre-expressão do gene *iSUC2*. Linha 1 - BSY21-15B1; Linha 2 - CAT-1; Linha 3 - GMY10 (linha 3) e Linha 4 - marcador de peso molecular (M). Foram utilizados os iniciadores V3-SUC2F (magenta) e SUC100R (azul). No lado esquerdo da figura pode ser visualizada a nova configuração dos *loci SUC2* na linhagem industrial modificada GMY10.

5.1.3 Sobre-expressão do gene *AGT1*

As linhagens que apresentam a sobre-expressão do gene *AGT1*, foram modificadas por estratégias diferentes. O plasmídeo pGRSd-*AGT1* foi utilizado como DNA molde para amplificação do Módulo 3 ($P_{GPD}::AGT1$) e do Módulo 4 ($P_{GPD}::AGT1::TPGK$). Na primeira estratégia, foi realizada a inserção do promotor *GPD* logo a montante do gene *AGT1* presente no cromossomo VII da levedura, de modo que a expressão deste gene fique sobre o controle do promotor forte e constitutivo (P_{GPD}) (Módulo 3 - Figura 9). O Módulo 3 continha o promotor *GPD* flanqueado por uma sequência de homologia de 55 pb à região promotora (-279 pb do início do gene) e uma região de correspondente aos 409 nucleotídeos iniciais do próprio gene *AGT1*. Nesta estratégia não foi utilizado gene marcador de seleção, pois o próprio gene *AGT1* atua como marcador da transformação. Os clones foram selecionados em placas de Petri contendo meio rico YP suplementado com maltotriose e antimicina A, e o DNA dos transformantes foi amplificado por PCR utilizando os iniciadores V-GPDF (salmão), V-AGT1F1 (marrom) e AGT1-1505TR (laranja). Após a corrida em gel de agarose, foi possível confirmar a integração do Módulo 3 pela amplificação de uma banda de ~1944 pb, utilizando os iniciadores V-GPDF e AGT1-1505TR, referente à presença do promotor *GPD* frente ao gene *AGT1*, na linhagem modificada denominada de GMY06, e como esperado, na linhagem parental CAT-1 (que não possui modificações genômicas) esta banda não foi visualizada. Para

confirmar se o módulo se integrou em uma ou duas cópias do gene *AGT1*, uma outra reação de PCR foi realizada com os iniciadores V-AGT1F1 e AGT1-I505TR. A sequência de anelamento do iniciador V-AGT1F1 foi removida durante a inserção do promotor *GPD* no locus *AGT1*, entretanto quando utilizado este iniciador, é observada a amplificação de uma banda na linhagem modificada GMY06, de mesmo tamanho (~1583 pb) ao visualizada na linhagem parental CAT-1, referente ao locus *AGT1* normal sem modificações. Este resultado indica que a integração do Módulo 3 ocorreu em uma única cópia do gene *AGT1* na linhagem modificada GMY06 (Figura 12).

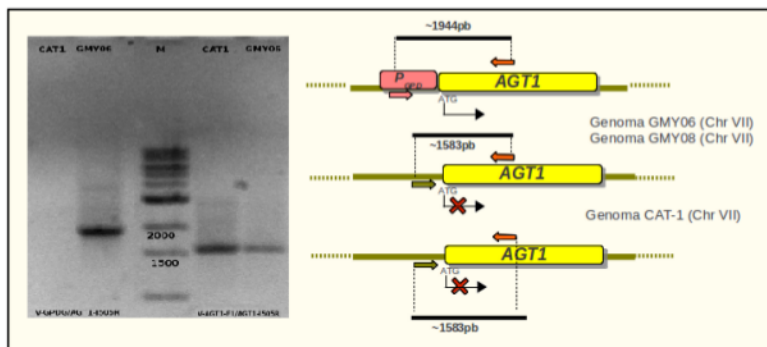


Figura 12 – Verificação em gel de agarose da integração do promotor *GPD* no locus *AGT1*. No lado esquerdo do gel está demonstrada a reação de PCR utilizando os iniciadores V-GPDF (salmão)/AGT1-I505TR (laranja) e os DNAs da linhagem CAT-1 (linha 1) e GMY06 (linha 2). No centro é observado o marcador de peso molecular (M). No lado direito do marcador de peso molecular o resultado das amplificações utilizando os iniciadores V-AGT1F (marrom)/AGT1-I505TR (laranja) e os DNAs da linhagem CAT-1 (linha 4) e GMY06 (linha 5).

Numa segunda estratégia utilizada para a sobre-expressão do gene *AGT1*, o Módulo 4 foi integrado nas regiões *LTR* dos elementos *Ty1* na levedura *S. cerevisiae*, levando à integração em provavelmente múltiplas cópias (Figura 9). O Módulo 4 era composto por sequências flanqueadoras de 42 pb de homologia às regiões *LTR* dos genes *Ty1*. Embora não saibamos quantos genes *Ty1* existem no genoma da linhagem industrial CAT-1, na linhagem de referência S288C, este gene aparece cerca de 32 vezes no seu genoma (GOFFEAU et al., 1996). A seleção dos clones transformantes foi realizada em placas de Petri contendo maltotriose mais antimicina A, e o DNA das linhagens transformantes foi amplificado com os iniciadores V-GPDF (salmão) e AGT1-I505TR (laranja). Como resultado, foi visualizada em gel de agarose, a amplificação de uma banda de ~1583 pb correspondente à amplificação da sequência *P_{GPD}::AGT1*, não encontrada no genoma da linhagem parental CAT-1 (Figura A-25).

5.1.4 Deleção da segunda cópia do gene *SUC2* em linhagens industriais *iSUC2*

O Módulo 5 (Figura 7), utilizado para deletar a segunda cópia do gene *SUC2*, foi amplificado a partir do plasmídeo pUG66, e continha o gene marcador *Ble^r*, flanqueado por sequências *loxP* e regiões de homologia com 60 pb correspondentes à sequência sinal e à posição 551 nucleotídeos do gene *SUC2*, respectivamente. Apesar do gene *SUC2* não ter sido completamente removido do genoma das leveduras, restando cerca de 1040 pb não modificados, esta estratégia impediu a síntese da invertase periplasmática nas linhagens modificadas (vide Tabela 4 abaixo). A seleção dos clones transformantes foi realizada meio rico YP contendo glicose (pH 9,0), suplementado com zeocina. O DNA total dos clones transformantes foi utilizado em reações de PCR para confirmação da correta integração do Módulo 5, utilizando os iniciadores V-SUC2F (rosa) e SUC100R (azul claro), e as bandas amplificadas foram visualizadas em gel de agarose (Figura A-26). As linhagens obtidas, GMY08 (derivada da GMY06) e GMY15 (originada a partir da GMY11), apresentaram ausência de amplificação referente à cópia não modificada do gene *SUC2* e apresentaram uma amplificação de ~2700 pb, referente à cópia *iSUC2*.

A última estratégia utilizada para sobre-expressar o gene *AGT1* e deletar a cópia normal do gene *SUC2* (em linhagens *iSUC2*), não necessita a utilização de marcadores dominantes *non-Saccharomyces* para a seleção dos transformantes, e ocorre em um único evento de recombinação homóloga. O Módulo 6 (Figura 10), amplificado do genoma da linhagem de laboratório EGY01 (DUVAL, 2010), estava flanqueado por duas regiões longas de homologia ao locus *SUC2*, no cromossomo IX. Na posição 5' o módulo era composto por uma sequência de 342 nucleotídeos correspondentes ao início do gene *SUC2*, incluindo a sua sequência sinal, enquanto que na região 3' do módulo a sequência de homologia possuía 578 pb, sendo 124 nucleotídeos do final do gene *SUC2* e os demais homólogos à região a jusante deste gene. Os clones foram selecionados em placas de Petri, contendo meio rico YP suplementado com maltotriose e antimicina A. A verificação da correta integração do Módulo 6, deletando o gene *SUC2*, e gerando a linhagem GMY16, é visualizada na Figura A-27. Para tal, foram utilizados os iniciadores V3-SUC2 (magenta) e V-AGT1R (verde claro), gerando uma amplificação de ~3753 pb correspondente a presença do gene *AGT1* no cromossomo IX da linhagem modificada, banda essa, não visualizada em gel de agarose para a linhagem parental GMY10, confirmando assim, a integração do módulo de sobre-expressão do gene *AGT1* no locus *SUC2* (*suc2::AGT1*) do cromossomo IX.

5.2 ATIVIDADE INVERTASE E TRANSPORTE ATIVO DE SACAROSE NAS LINHAGENS MODIFICADAS

Afim de verificar se as modificações genômicas realizadas no cromossomo IX no locus *SUC2*, e no cromossomo VII no locus *AGT1*, apresentaram os efeitos

fenotípicos esperados, foi realizada a dosagem da atividade da enzima invertase frente ao substrato sacarose, e a atividade de transporte da permease Agt1p nas linhagens modificadas (Tabela 4).

As determinações de atividade invertase confirmaram os fenótipos esperados para as modificações genéticas introduzidas no *locus SUC2*, após crescimento das linhagens em sacarose. Na linhagem industrial CAT-1, observou-se que, praticamente 80% da atividade invertase corresponde a forma extracelular e apenas 20% à forma intracelular da enzima (Tabela 4). Esse resultado da distribuição da atividade invertase nas células é semelhante ao observado por Dário (2007), DÁRIO (2011) após análise de linhagens industriais utilizadas na produção industrial de etanol combustível, cultivadas em sacarose. Com a sobre-expressão do gene *iSUC2* na linhagem GMY10, podemos observar um realocamento da atividade invertase nas células de leveduras, onde agora, 93% da atividade dosada corresponde a forma intracelular da enzima, enquanto que, somente 7% da atividade invertase é periplasmática. Apesar do aumento da atividade da isoforma intracelular da invertase na linhagem GMY10, esta apresenta ainda quantidades significativas de atividade periplasmática da enzima, codificada pela cópia normal do gene *SUC2* encontrado em um dos cromossomos IX presentes no genoma diploide das leveduras, característica observada também nas linhagens modificadas GMY06 e GMY11 (Tabela 4).

Podemos observar uma aparente atividade invertase periplasmática apresentada pelas linhagens *iSUC2/suc2* GMY08, GMY15 e GMY16 (Tabela 4). Entretanto, cabe salientar que a técnica utilizada para estimar a atividade dessa hidrolase apresenta limitações como qualquer outro procedimento experimental. Em uma das etapas do ensaio de determinação de atividade invertase extracelular foi utilizado um inibidor da enolase, o fluoreto de sódio (NaF), para evitar que a glicose (e frutose) formada a partir da hidrólise da sacarose fosse metabolizada através da glicólise. A enolase é uma das enzimas da via glicolítica e tem a função de desidratar o 2-fosfoglicerato, para formar fosfoenolpiruvato. A enolase depende de magnésio (Mg^{2+}) para sua atividade, pois esse íon atua como co-fator da enzima. Assim, quando as células foram tratadas com fluoreto de sódio, ocorreu a interação do íon magnésio com o íon flúor (F^{-}), resultando na inibição da atividade da enzima por falta de co-fator. Com a via glicolítica parada, mas com a atividade de transporte ativo da sacarose funcionando, acredita-se que a sacarose é rapidamente transportada e hidrolisada pela invertase no citosol da célula. Os monômeros formados, que não podem ser metabolizados pela via glicolítica, extravasam da célula pelo transporte de difusão facilitada mediado pelos transportadores Hxtp, que permitem o fluxo dos açúcares nos dois sentidos (BOLES; HOLLENBERG, 1997; JANSEN; WINDE; PRONK, 2002). Em eletroforese com gel de poliacrilamida não desnaturante, que permite a diferenciação entre a forma periplasmática (270 kDa) e a forma intracelular da invertase (~135 kDa) foi possível confirmar que a forma periplasmática da enzima não é mais expressa nas linhagens GMY08 e GMY15, aparecendo no gel somente a forma não-glicosilada de baixo peso molecular da invertase intracelular (dados não mostrados).

Para avaliar a funcionalidade, nas linhagens analisadas, da permease responsável pelo transporte ativo de alta afinidade de sacarose (Agt1p), as células

Tabela 4 – Dosagem da atividade invertase total e periplasmática, e transporte de pNP α G pela permease *AGT1*, em linhagens industriais de *S. cerevisiae* modificadas crescidas em sacarose.

Linhagens	Atividade Invertase (nmoles mg ⁻¹ min ⁻¹)		Transporte de pNP α G (nmoles mg ⁻¹ min ⁻¹)
	Total	Periplasmática	
CAT-1	330 ± 6	260 ± 8	0,0
GMY10	1941 ± 40	142 ± 7	0,0
GMY06	ND ^a	ND ^a	2,3 ± 0,1
GMY11	3147 ± 62	253 ± 1	3,0 ± 0,2
GMY08	2223 ± 45	56 ± 2	4,5 ± 0,3
GMY15	4300 ± 50	80 ± 3	3,1 ± 0,1
GMY16	1687 ± 32	76 ± 3	3,0 ± 0,1

^a Não determinada.

foram crescidas em sacarose, e posteriormente, foi utilizado o substrato sintético p-nitrofenil- α -D-glicosídeo (pNP α G). Segundo descrito por Hollatz e Stambuk (2001), esse composto somente é transportado pelas células que apresentam expressão da permease *Agt1p*. O pNP α G é transportado através da membrana celular de *S. cerevisiae* com alta afinidade pela permease *Agt1p* ($K_m \simeq 3$ mM), e após sofrer hidrólise pela maltase o grupamento químico p-nitrofenol é formado, o qual é quantificado para estimar a atividade de transporte. Os dados da Tabela 4, indicam que as linhagens CAT-1 e GMY10 não possuem atividade de transporte de pNP α G. Este resultado já era esperado, pois já foi descrito que a linhagem industrial CAT-1 aparentemente não possui o gene *AGT1* funcional no seu genoma (DUVAL et al., 2010), enquanto que a linhagem GMY10 (derivada da CAT-1) só foi modificada no locus *SUC2*. Já nas linhagens modificadas para a sobre-expressão do gene *AGT1* (GMY06, GMY11, GMY08, GMY15 e GMY16) podemos notar uma significativa atividade de transporte do substrato sintético pNP α G, além de um incremento na atividade invertase intracelular, provavelmente por uma maior disponibilidade de glicose intracelular, uma vez que o gene *iSUC2* está sob o controle de um promotor induzível por glicose (*P_{ADH1}*). As diferentes estratégias de modificações genômicas empregadas para sobre-expressão do gene *AGT1* resultaram em atividades de transporte de pNP α G diferenciadas, sendo a maior atividade medida para a linhagem GMY08 (Tabela 4). As reais implicações dessa diferença observada na atividade da permease *Agt1p* só poderão ser realmente mensuradas em ensaios de crescimento celular e fermentações. Resultados semelhantes foram obtidos em nosso grupo de pesquisa, aplicando técnicas de modificações genômicas semelhantes, porém utilizando leveduras de laboratório haploides e diploides (DÁRIO, 2011; ESPÍRITO-SANTO, 2012). A magnitude da diferença observada nos resultados de transporte de pNP α G observados nos trabalhos citados acima, está relacionada com a capacidade da levedura em expressar os genes *MAL* (constitutivamente ou

Tabela 5 – Determinação da atividade da enzima α -glicosidase (maltase) em leveduras industriais crescidas em diferentes açúcares e frente a diferentes substratos em pH 7,0.

Atividade α -glicosidase (nmoles $\text{mg}^{-1} \text{min}^{-1}$)									
Meios	YPS			YPM			YPD		
Substrato	Sacarose	Maltose	pNP α G	Sacarose	Maltose	pNP α G	Sacarose	Maltose	pNP α G
Linhagens									
CAT-1	444 \pm 20	5 \pm 2	13 \pm 2	620 \pm 22	717 \pm 33	1003 \pm 17	115 \pm 5	1 \pm 0	0,0
GMV10	4355 \pm 22	5 \pm 2	23 \pm 3	2799 \pm 30	634 \pm 78	928 \pm 19	4610 \pm 41	13 \pm 1	19 \pm 4
GMV06	ND ^a	ND ^a	27 \pm 0	ND ^a	ND ^a	1243 \pm 25	ND ^a	ND ^a	29 \pm 1
GMV11	4213 \pm 12	5 \pm 2	3 \pm 1	4101 \pm 77	487 \pm 32	693 \pm 20	3011 \pm 50	0,0	31 \pm 1
GMV08	3917 \pm 33	36 \pm 9	33 \pm 6	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a
GMV15	4905 \pm 21	29 \pm 4	22 \pm 2	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a

^a Não determinada.

de forma induzível) durante a fase exponencial de crescimento. A coloração obtida durante o ensaio de atividade da permease Agt1p é definida a partir do produto (p-nitrofenol) liberado após a hidrólise do pNP α G pela enzima α -glicosidase no citosol da célula, posterior ao transporte do mesmo pelo transportador Agt1p. Sendo assim, este experimento depende diretamente da atividade enzimática das α -glicosidasas nas células de leveduras, uma vez que, a ausência desta atividade de hidrólise pode subestimar ou mesmo impedir a determinação do transporte de pNP α G, lembrando que nos ensaios de transporte de pNP α G as células de leveduras são crescidas em sacarose. Observando os resultados apresentados na Tabela 5, podemos observar que nas linhagens industriais crescidas em sacarose, a atividade de hidrólise do pNP α G é muito baixa, com uma atividade máxima de 33 nmoles $\text{mg}^{-1} \text{min}^{-1}$, quando comparadas com as atividades de no mínimo 100 nmoles $\text{mg}^{-1} \text{min}^{-1}$ mensuradas por DÁRIO (2011), ESPÍRITO-SANTO (2012) nas leveduras de laboratório (MAL^c constitutivas).

Já é conhecido que existe uma interconexão entre os metabolismos de diferentes açúcares em *S. cerevisiae*, apresentando diferenças específicas para cada tipo de açúcar, mas também uma série de reações e enzimas comuns. Um exemplo é a conexão direta entre a metabolização da sacarose e de α -glicosídeos, como por exemplo a maltose e maltotriose (BADOTTI et al., 2008; BATISTA; MILETTI; STAMBUK, 2004; STAMBUK et al., 1999). Crescendo as leveduras industriais (parental e modificadas) em meio rico contendo maltose (YPM), podemos observar a indução dos genes *MAL*, nesse caso especificamente o gene *MALx2* (maltase), pela atividade de hidrólise frente aos três substratos utilizados: sacarose, maltose e pNP α G (Tabela 5). Por outro lado, é possível observar a repressão dos genes *MAL*, pela ausência ou baixa atividade de hidrólise frente aos substratos maltose

e pNP α G (hidrolisados por α -glicosidades) quando as células foram crescidas em meios contendo sacarose ou glicose (Tabela ??). No caso da linhagem parental CAT-1 crescida em YPM, a hidrólise da sacarose deve estar sendo realizada por um somatório da atividade da enzima invertase e maltase, uma vez que, já se sabe que a maltase é capaz de hidrolisar a sacarose em cepas *suc2* Δ e que o crescimento em maltase desreprime as células, permitindo a expressão da enzima invertase (BADOTTI; BATISTA; STAMBUK, 2005; BATISTA; MILETTI; STAMBUK, 2004; STAMBUK et al., 1999). Também é possível observar a influência da sobre-expressão do gene *iSUC2* na elevada atividade de hidrólise do substrato sacarose, inclusive após crescimento das leveduras em meios de cultivo com reconhecida capacidade de repressão gênica, como meio contendo glicose (YPD).

5.3 CARACTERIZAÇÃO DO CRESCIMENTO CELULAR DAS LINHAGENS MODIFICADAS

Após a confirmação dos fenótipos de hidrólise e transporte de açúcares nas leveduras modificadas, foi realizada a caracterização metabólica destas linhagens. Inicialmente, as linhagens foram testadas quanto ao seu perfil de crescimento celular quando cultivadas em meio rico YP acrescido de 20 g L⁻¹ de glicose ou sacarose. As linhagens foram cultivadas de acordo com o item 4.4.1. Também foram extraídos alguns parâmetros cinéticos baseados no crescimento celular.

Nos crescimentos em frascos agitados contendo 20 g L⁻¹ de glicose, o consumo do açúcar presente no meio de cultura e a concomitante produção de etanol foram observados durante a fase exponencial de crescimento. Houve cessão do crescimento celular após o término da glicose (Figura 13), quando ocorreu o fenômeno conhecido por “parada diáuxica“, no qual as células, por não estarem mais reprimidas pela presença do açúcar no meio, passam a modular o seu metabolismo para utilizar o etanol produzido durante a primeira fase de crescimento exponencial (LEWIS et al., 1993; YOUNG et al., 2003). O pico máximo de produção de etanol aconteceu ao mesmo tempo em que a glicose foi completamente depletada do meio de cultivo, após 10 horas de crescimento.

Como esperado, todas as linhagens analisadas neste experimento, mostraram um perfil semelhante de consumo do açúcar e produção de etanol. O crescimento em glicose é importante para nos certificarmos que as modificações genômicas inseridas nas leveduras industriais GMY não causaram efeitos negativos no crescimento e fermentação das células modificadas em relação a parental CAT-1, uma vez que o alvo da engenharia genética era modificar o metabolismo de sacarose. Em relação aos parâmetros cinéticos obtidos, podemos observar que a linhagem modificada GMY15 foi a que apresentou o menor rendimento na produção de biomassa ($Y_{X/S}^{Exp}$ 0,11 \pm 0,02), menor velocidade de consumo de substrato (μ_S^{Exp}) e menor velocidade de formação de produto (μ_P^{Exp}) em relação as demais. Apesar da linhagem GMY08 ($Y_{X/S}^{Exp}$ 0,16 \pm 0,01) possuir um rendimento na formação de biomassa semelhante à linhagem parental CAT-1 ($Y_{X/S}^{Exp}$ 0,15 \pm 0,02), esta apresentou o maior rendimento

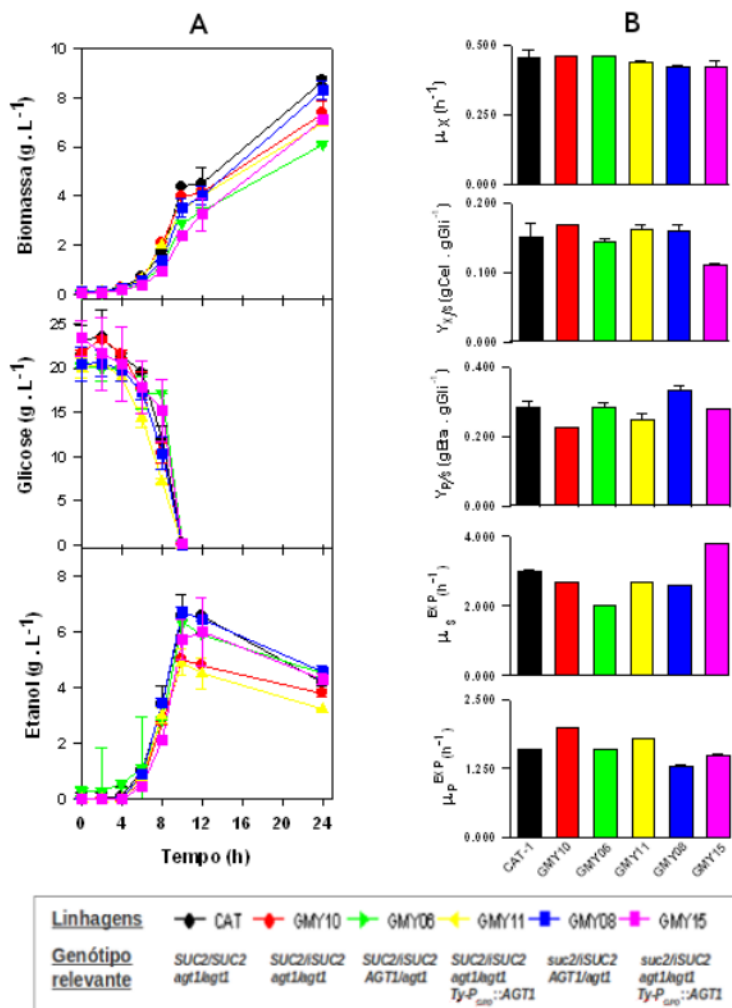


Figura 13 – Crescimento em glicose (20 g L⁻¹) e parâmetros fisiológicos das linhagens modificadas (GMY). A) Crescimento em frascos agitados demonstrando a formação de biomassa, o consumo de glicose e produção de etanol. B) Parâmetros cinéticos extraídos do crescimento em meio rico (YP) com glicose.

na formação de etanol ($Y_{P/S}^{Exp} 0,34 \pm 0,01$). Na Figura 13 também podemos perceber que as linhagens modificadas em apenas um dos genes alvo (*SUC2* ou *AGT1*) possuem os parâmetros cinéticos de crescimento em meio rico contendo glicose muito semelhantes entre si e a linhagem parental CAT-1.

Para estender os conhecimentos em relação à assimilação de sacarose (20 g L^{-1}) pelas linhagens geneticamente modificadas, as mesmas foram submetidas ao crescimento em frascos agitados (4.4.1) e as amostras foram retiradas até 12 horas de crescimento. Do mesmo modo que foi observado nos crescimentos em glicose houve concomitante consumo do açúcar presente no meio de cultura e produção de etanol durante a fase exponencial de crescimento. Após as modificações genômicas nos genes alvo (*SUC2* e *AGT1*), e redirecionamento da via metabólica de utilização da sacarose, foram observadas diferenças principalmente na formação de glicose e frutose no meio extracelular, na velocidade de consumo da sacarose e na velocidade das linhagens modificadas GMY08 e GMY15 em produzir etanol (Figura 14). Na linhagem parental CAT-1, que não possui transportadores de sacarose, a metabolização deste açúcar é realizada, principalmente por ação da invertase periplasmática, pois houve aparecimento de glicose e frutose no meio de cultura, sendo esses monossacarídeos transportados posteriormente ao interior das células. Nas linhagens modificadas no gene *AGT1*, mas que ainda apresentam uma cópia do gene *SUC2* normal (GMY06 e GMY11), também foi observado um acúmulo de glicose e frutose no meio, indicando que o transporte ativo da sacarose é mais lento que a sua hidrólise extracelular pela invertase periplasmática. Dessa forma, a hidrólise extracelular constitui a principal via de metabolização desse açúcar, nas linhagens que contêm o gene *SUC2* não modificado, e que, enquanto as células apresentarem atividade desta enzima o modelo proposto de transporte e hidrólise intracelular da sacarose fica comprometido.

Podemos notar que somente as linhagens modificadas GMY08 e GMY15 não produziram glicose no meio extracelular. Quanto à frutose podemos visualizar uma flutuação na sua concentração ao longo do crescimento. A linhagem parental CAT-1 foi a linhagem que mais produziu e acumulou frutose no meio extracelular, enquanto que nas linhagens modificadas GMY08 e GMY15 não foi visualizado acúmulo deste monossacarídeo. A presença de glicose e frutose no tempo zero do crescimento, pode ser decorrente da hidrólise da sacarose durante a esterilização dos meios em autoclave. O interessante é perceber que a concentração destes açúcares, nas linhagens referidas acima, vai decrescendo ao longo do tempo e acabaram por ser consumidos entre 6 e 8 horas de crescimento.

Na Figura 14, ainda é possível observar que a concentração de frutose no meio de cultura foi maior que a concentração de glicose, ao longo do tempo de cultivo das linhagens que realizam a hidrólise extracelular da sacarose. Somando-se a isso, uma concentração residual de aproximadamente $0,5 \text{ g L}^{-1}$ de frutose - quantidade de açúcar que não foi totalmente consumido pelas células - foi encontrada no meio de cultura dessas linhagens, após a cultura atingir a fase estacionária de crescimento. Todavia, nos cultivos das linhagens modificadas no gene *SUC2* (*iSUC2/suc2*), foram encontradas baixas concentrações desses monossacarídeos ao longo do tempo de cultivo e não foi encontrada concentração residual de açúcar, após a cultura atingir

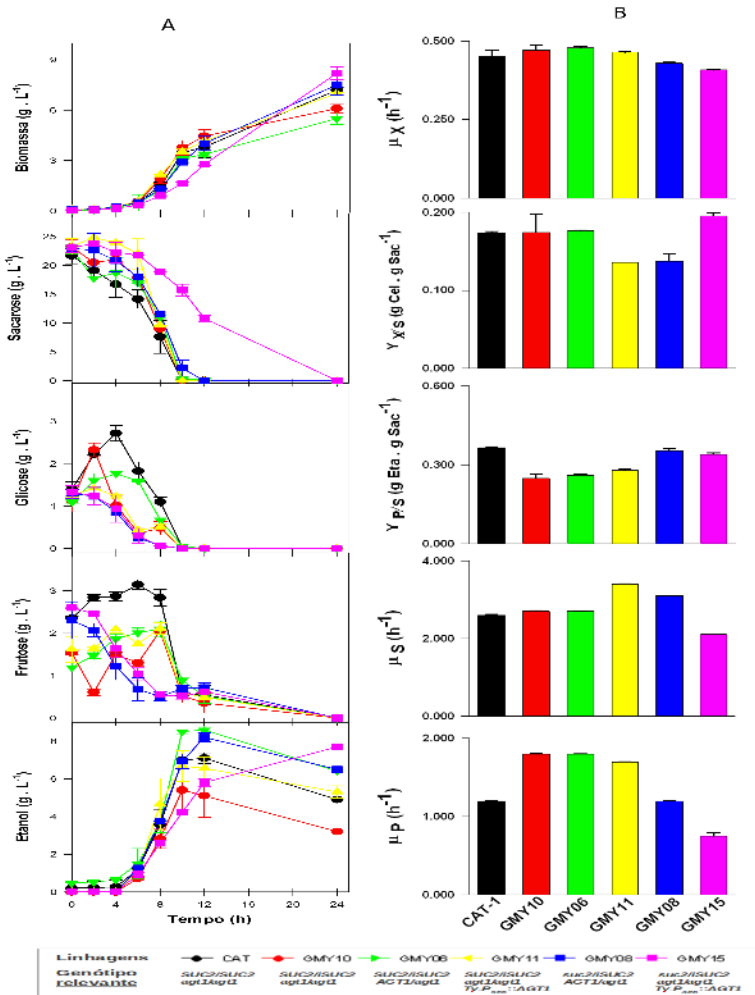


Figura 14 – Crescimento em sacarose (20 g L⁻¹) e parâmetros fisiológicos das linhagens modificadas (GMY). A) Crescimento em frascos agitados demonstrando a formação de biomassa, o consumo de sacarose, formação e consumo de glicose e frutose e produção de etanol. B) Parâmetros cinéticos extraídos do crescimento em meio rico (YP) com sacarose.

a fase estacionária. A diferença observada durante os experimentos, entre a cinética de metabolização da glicose e da frutose, foi avaliada em trabalhos anteriores, que apontam como causa para esse fato, diferenças de afinidade desses açúcares pelas permeases e pelas hexoquinases. As hexoquinases (Hxk1p e Hxk2p), enzimas atuantes na etapa inicial da via glicolítica e que tem o papel de fosforilar as hexoses, apresentam diferentes afinidades por esses açúcares, além de serem expressas em diferentes momentos durante um cultivo. Embora exista discrepância na cinética de fosforilação desses açúcares, o transporte através da membrana plasmática das células é apontado como o passo limitante no processo de fermentação dessas hexoses (BERTHELIS et al., 2004, 2008). Sabe-se que os genes *HXT1* a *HXT7* codificam para as principais permeases responsáveis pelo transporte de monossacarídeos (glicose e frutose), mas com afinidade menor pela frutose, motivo pelo qual a glicose é captada mais rapidamente.

Curiosamente, a linhagem GMY15 não consumiu toda a sacarose em 12 horas de crescimento, restando 11 g L^{-1} de sacarose no meio neste período. Após 24 horas de crescimento a sacarose já tinha sido completamente consumida, e interessantemente não foi observada a parada diáxica para esta linhagem, sendo o pico de produção de etanol após 24 horas de crescimento. De acordo com a Tabela 1, a atividade de transporte ativo da sacarose pela permease *Agt1p* é menor para a linhagem GMY15 em relação à GMY08, podendo o transporte mais lento da sacarose, ser um dos motivos, do aumento do tempo de permanência deste açúcar no meio de cultivo. A atividade de transporte de *pNP α G* é muito semelhante entre a linhagem GMY15 e as linhagens GMY06 e GMY11, porém não é possível observar a influência de um transporte de sacarose mais lento nas linhagens que apresentam a invertase extracelular. De acordo com os parâmetros cinéticos obtidos para a linhagem GMY15, a mesma apresenta a menor velocidade de consumo de substrato (μ_S^{Exp} $2,1 \pm 0,0$) e a menor velocidade de produção de etanol (μ_P^{Exp} $0,75 \pm 0,04$) em relação as demais linhagens. Após 24 horas de crescimento e o consumo total da sacarose, a linhagem GMY15 apresentou a maior concentração de biomassa (Figura 14A), e rendimento de produção de etanol ($Y_{P/S}^{Exp}$ $0,34 \pm 0,03$), semelhante ao apresentado pela linhagem GMY08 ($Y_{P/S}^{Exp}$ $0,35 \pm 0,06$). A linhagem parental CAT-1, linhagem esta que possui seu metabolismo adaptado para a utilização de sacarose, foi quem apresentou o melhor rendimento em etanol ($Y_{P/S}^{Exp}$ $0,36 \pm 0,04$), apesar do resultado estar muito próximo aos obtidos com linhagens modificadas GMY08 e GMY15. O direcionamento da célula para utilização da sacarose pelo transporte ativo e posterior hidrólise intracelular, se mostra funcional nas leveduras modificadas, pela diminuição do acúmulo de monossacarídeos no meio extracelular em relação às cepas *iSUC2/SUC2*, mas parece não estar adaptado para produzir etanol em crescimentos com baixa concentração celular inicial.

Já foi demonstrado que em células que apresentam o transporte ativo de sacarose existe uma correlação positiva entre velocidades no consumo de substrato e velocidades de produção de etanol mais lentas e o aumento no rendimento da produção de etanol. As linhagens modificadas em um único gene alvo (GMY10, GMY06 e GMY11) não apresentaram nenhuma característica favorável em relação à linhagem parental CAT-1, quanto o aumento na eficiência da síntese de etanol a

partir de sacarose. Brink et al. (2008) demonstraram que os metabólitos intracelulares influenciam fortemente na regulação do fluxo glicolítico, realizando o controle da expressão de uma série de genes, dentre eles o gene *ADHI*. Além disso, Koschwanez, Foster e Murray (2011) demonstraram que a síntese de invertase representa um custo de 0,35% na manutenção do metabolismo de células que são forçadas a expressar essa enzima (que apresentam gene *SUC* não modificado), em comparação com células *suc2Δ*. Entretanto, o gasto energético para a síntese de invertase é muito baixo para justificar uma influência negativa no metabolismo celular da linhagem GMY15, uma vez que em crescimentos contendo glicose, onde a enzima invertase continua sendo constitutivamente expressa ($P_{ADHI}::iSUC2$), não é observado qualquer modificação no perfil de crescimento das linhagens modificadas GMY08 e GMY15 (Figura 13). É importante lembrar que a modificação genética realizada, para obter a linhagem *iSUC2*, envolveu a inserção de uma versão truncada da região promotora do gene *ADHI* para controlar a expressão do gene *SUC2*. Sabe-se que o P_{ADHI} responde fortemente a presença de glicose, aumentando a expressão do gene a qual esse promotor controla (DEMARINI; CARLIN; LIVI, 2001).

5.4 CARACTERIZAÇÃO DAS LINHAGENS MODIFICADAS QUANTO AO PERFIL FERMENTATIVO EM ALTAS CONCENTRAÇÕES DE SACAROSE

Após as caracterizações das leveduras em baixa concentração de sacarose (20 g L^{-1}), fez-se necessário avaliar o comportamento das linhagens industriais modificadas utilizando condições que permitisse simular em laboratório o processo de produção do etanol combustível brasileiro. De acordo com Amorim et al. (2011), Wheals et al. (1999) a produção brasileira de etanol é realizada, principalmente, em bateladas alimentadas com mosto contendo aproximadamente 180 g L^{-1} de açúcares totais, elevada concentração celular (8 a 17% v/v) e ciclos de fermentação que levam de 6 a 10 horas. Conforme descrito no item 4.4.4, as fermentações foram conduzidas com elevada concentração de sacarose (acima de 200 g L^{-1}) e 10 g L^{-1} de células de levedura.

Ao analisar o desempenho das linhagens, através de fermentações em frascos agitados contendo concentração superior a 200 g L^{-1} de sacarose (Figura 15), observa-se que, da mesma forma que no crescimento em frascos agitados, as linhagens que possuem uma cópia do gene *SUC2* expresso no seu genoma, geram grandes quantidades de glicose e frutose no meio extracelular. Para a linhagem parental CAT-1 e as modificadas GMY05, GMY10 e GMY11, a sacarose foi completamente depletada do meio após 4 horas do início da fermentação, mas os açúcares totais gerados só foram consumidos após 7 horas. Quando comparada a linhagem GMY05, que possui o *locus SUC2* no cromossomo XI sem alteração e contém o gene *AGT1* sob o controle do promotor forte *GPD*, quanto a formação de glicose e frutose, observamos que a mesma produz e acumula cerca de 20% a menos monossacarídeos que a parental CAT-1. Este decréscimo deve estar associado à presença da permease *Agt1p* na membrana da celular, que irá realizar o transporte ativo da sacarose presente no meio. Entretanto

a hidrólise extracelular da sacarose ainda é a principal via de metabolização deste açúcar na presença da invertase periplasmática. Quando observamos as linhagens sem a atividade da invertase extracelular (GMY08 e GMY15), podemos perceber que a concentração de sacarose atinge o zero após 7 horas do início da fermentação e que praticamente não há formação de glicose e frutose no meio extracelular. Para ambas linhagens a concentração máxima de glicose dosada foi de $1,4 \text{ g L}^{-1}$ e frutose foi de $2,7 \text{ g L}^{-1}$. Acredita-se que a detecção desta quantidade de monossacarídeos no meio de fermentação foi resultado da rápida hidrólise intracelular da sacarose, por ação da alta atividade invertase dessas leveduras. Nesse caso, a sacarose pode ter sido rapidamente captada e hidrolisada pelas células, promovendo o acúmulo de alta concentração de glicose e frutose no citoplasma das leveduras. Esse acúmulo intracelular dos monossacarídeos pode ter promovido saturação do sítio catalítico da enzima hexoquinase, que reduziria a cinética de fosforilação das hexoses, e assim, permitiria a saída dos monossacarídeos ao ambiente extracelular via os transportadores de hexose, codificados pelos genes *HXT*. De qualquer forma, a assimilação da sacarose ocorre de forma mais lenta nas linhagens *iSUC2/suc2*, e esta permanece no meio de cultivo mais tempo por não haver enzimas hidrolíticas para a sacarose. O fato de não existir grandes concentrações de açúcares (glicose e frutose) livres na dorna, impede a contaminação de bactérias e leveduras selvagens dependentes de glicose, oriundas com a cana-de-açúcar, que geralmente não são capazes de fermentar a sacarose.

O glicerol é um composto osmoprotetor, que é sintetizado quando a célula de levedura é submetida a um estresse osmótico muito grande, e é utilizado para evitar a saída de água e manter o equilíbrio osmótico dentro da célula (HERSEN et al., 2008; FOLCH-MALLOL; GARAY-ARROYO; LLEDIAS, 2004). Por outro lado, trabalhos apontam que o glicerol é produzido e acumulado pelas leveduras em resposta à alta osmolaridade do meio de cultura, devido à presença de alta concentração de açúcares (ANDO et al., 2006; CORDIER et al., 2007; CRONWRIGHT; ROHWER; PRIOR, 2002). Além disso, a via de síntese desse composto é apontada como auxiliar na realização do balanço redox de co-fatores das células, após reações metabólicas de biossíntese de aminoácidos, por exemplo, por conversão do NADH em NAD^+ , e consequentemente permitindo o crescimento celular (BARNETT, 2003; CORDIER et al., 2007; DIJKEN; SCHEFFERS, 1986). Quando a sacarose é hidrolisada no meio extracelular, ocorre uma alteração osmótica muito brusca devida às altas concentrações de glicose e frutose liberadas no meio e as células de leveduras quando submetidas a um estresse osmótico desse tipo, apresentam efeitos deletérios no seu metabolismo (TAKESHIGE; OUCHI, 1995) e severas adaptações metabólicas como desvio dos açúcares para a produção de glicerol e formação de glicogênio, além de apresentarem uma produção elevada de ácido acético e succínico (ERASMUS; MERWE; VUUREN, 2000). Situações de estresse celular, como as descritas acima, são capazes de induzir a expressão da enzima glicerol-3-fosfato desidrogenase, que cataliza a redução de diidroxiacetona a glicerol fosfato, fato observado nas linhagens que possuem hidrólise extracelular da sacarose. Por outro lado, modificações no transporte de açúcares e do fluxo de prótons na célula são apontadas como as principais causas na repressão da síntese dessas enzimas (BISSON et al., 1993).

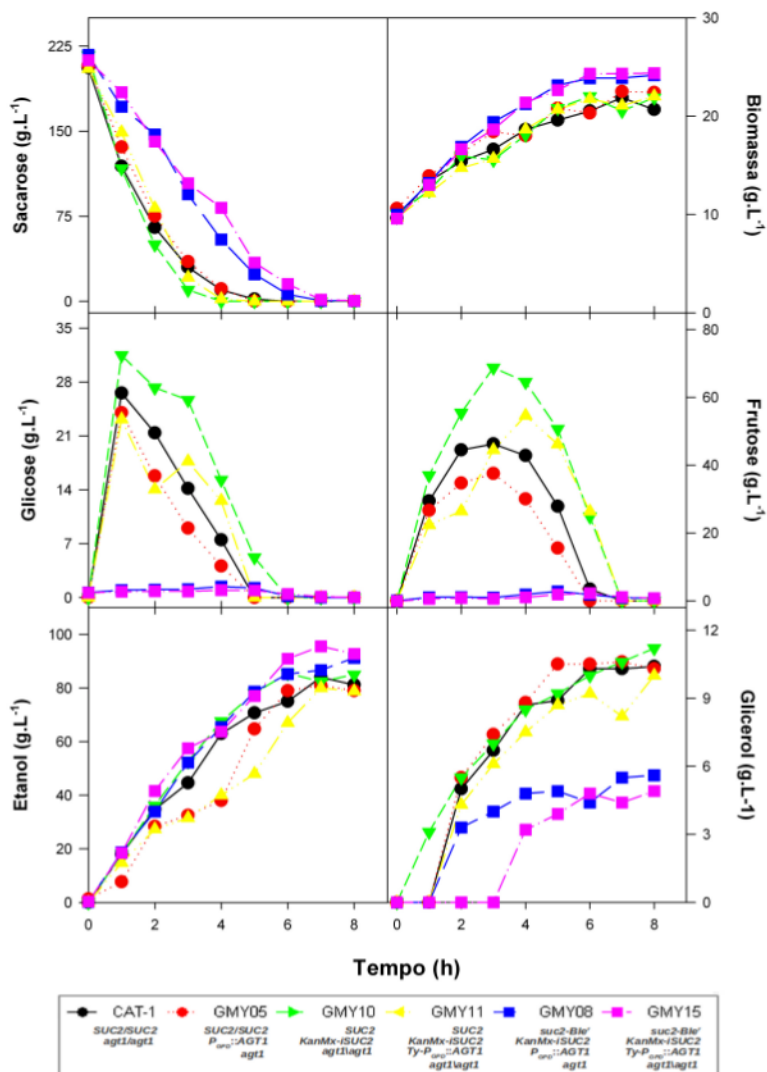


Figura 15 – Fermentação em batelada simples contendo 200 g L⁻¹ de sacarose e 10 g L⁻¹ de células iniciais, utilizando a linhagem parental CAT-1 e as linhagens com as modificações genômicas indicadas.

Além disto, algumas linhagens de *Saccharomyces* não conseguem captar eficientemente a frutose do meio, o que muitas vezes leva à fermentação incompleta deste açúcar e perdas na produção de etanol (BERTHELIS et al., 2004). Por outro lado, bactérias e leveduras contaminantes (*não-Saccharomyces*) que não possuem atividade de invertase (KALITERNA et al., 1995) se beneficiam utilizando preferencialmente o excesso de glicose e frutose acumulado no meio de fermentação, além de haver a necessidade de lavagem das células de leveduras com ácido sulfúrico para minimizar a contaminação (BASSO et al., 2008). Exatamente este comportamento foi observado durante a fermentação de alta concentração de açúcar, pelas linhagens que possuem a hidrólise extracelular da sacarose (parental e as modificadas) (Figura 15). Após a segunda hora de fermentação, nas linhagens *SUC2/iSUC2*, a produção de glicerol já chegava a aproximadamente 6 g L^{-1} , e ao término da fermentação atingiu uma concentração aproximada de 11 g L^{-1} . Já as linhagens que não ficaram expostas a elevadas concentrações de glicose e frutose (GMY08 e GMY15), pela ausência de atividade invertase extracelular, produziram uma concentração de glicerol 50% menor em relação às demais linhagens. Outro dado interessante é o momento (tempo) do início da produção e acúmulo do glicerol, como pode ser observado para a linhagem GMY10, que apresentou uma rápida hidrólise da sacarose e elevada concentração dos monossacarídeos no meio, e logo na primeira hora já havia começado a secretar o glicerol. A linhagem GMY15, por exemplo, além de produzirem menos glicerol, o mesmo só foi detectado no meio de extracelular na quarta hora após o início da fermentação. Apesar da produção de glicerol ser intrínseca ao metabolismo das leveduras *S. cerevisiae*, neste experimento podemos confirmar a forte relação que existe entre a formação de glicerol e a osmolaridade no meio de cultivo.

Analisando os parâmetros fisiológicos das linhagens, obtidos após as fermentações em frascos agitados, observa-se que a linhagem GMY08 (*iSUC2/suc2*) apresentou a maior produtividade em etanol (PP $13,9 \text{ [g Eta (L h)}^{-1}\text{]}$), menor rendimento global na conversão de substrato a biomassa ($Y_{X/S}^{Global}$ $0,09 \text{ g Cel. g Sac}^{-1}$) e curiosamente apresentou um rendimento global na conversão de substrato a produto ($Y_{P/S}^{Global}$) semelhante ao da linhagem parental CAT-1, que é uma levedura robusta, adaptadas às condições industriais (Figura 16). O maior rendimento na conversão de substrato a produto foi observado para a linhagem GMY15 ($Y_{P/S}^{Global}$ $0,44 \text{ g Eta g Sac}^{-1}$) e uma produtividade em etanol (PP) praticamente idêntica a linhagem GMY08. O objetivo mais importante deste ensaio foi demonstrar que a via de assimilação intracelular da sacarose está funcionando nas leveduras genomicamente modificadas, pela ausência na formação de monômeros de glicose e frutose no meio extracelular e o aumento na produtividade em relação à cepa parental CAT-1. É necessário lembrar que para a produção de etanol no Brasil, utilizam-se sistemas de fermentação em batelada alimentada com mostos contendo $\sim 200 \text{ g L}^{-1}$ de açúcares totais, onde as células de leveduras ficam expostas menos tempo à elevadas concentrações de açúcares e possuem um perfil fermentativo robusto, além de realizarem diversos ciclos celulares. O ciclo é importante para adaptar o metabolismo celular das leveduras às condições de (açúcares, temperatura, pH) de trabalho. Empregando o ciclo celular, em batelada alimentada, foi possível observar que no segundo ciclo as linhagens GMY08 e GMY15 consumiam a

sacarose mais rapidamente, sem gerar glicose e frutose, além de apresentarem elevada produtividade em etanol quando comparadas com o primeiro ciclo das células (dados não mostrados).

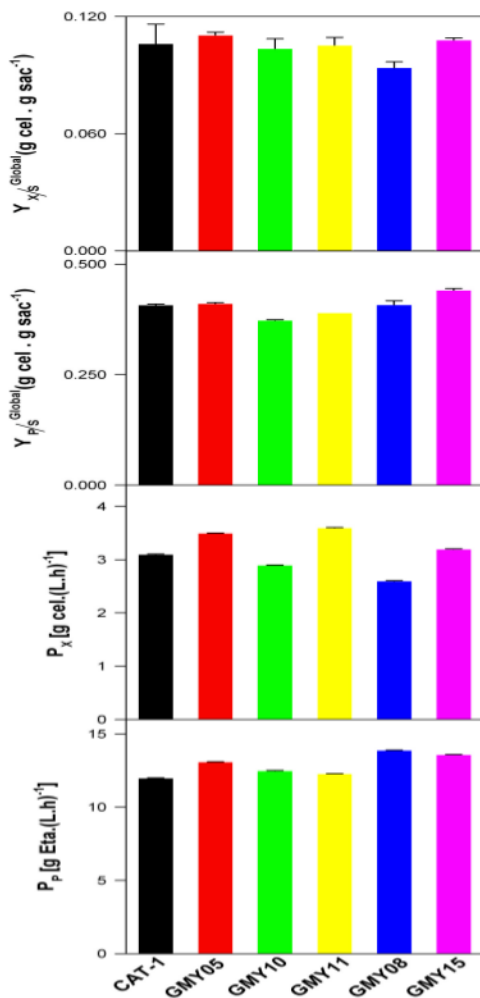


Figura 16 – Parâmetros cinéticos obtidos durante a fermentação contendo 200 g L⁻¹ de sacarose utilizando as linhagens industriais CAT-1 e GMY05 (*SUC2/SUC2*), GMY10 e GMY11 (*iSUC2/SUC2*) e GMY08 e GMY15 (*iSUC2/suc2*).

5.5 CARACTERIZAÇÃO DAS LINHAGENS INDUSTRIAS MODIFICADAS SEM OS MARCADORES *KANMX* E *BLE^R*

Após a publicação do primeiro genoma sequenciado de uma levedura *S. cerevisiae* (GOFFEAU et al., 1996; OLIVER, 1996), o próximo desafio foi realizar a caracterização dos produtos gênicos não identificados, aplicando a estratégia de deleção dos genes e análise dos fenótipos associados. Devido à elevada eficiência dos mecanismos de recombinação homóloga em *S. cerevisiae*, é possível realizar integração gênica utilizando regiões flanqueadoras de homologia com 30 - 45 pb, possibilitando que estes cassetes de deleção possam ser construídos em uma única reação de PCR (DEMARINI; CARLIN; LIVI, 2001; LONGTINE et al., 1994; SUGIYAMA et al., 2009). A utilização de marcadores dominantes heterólogos, que conferem resistência a antibióticos ou substâncias normalmente tóxicas para as leveduras, possibilitou a transformação de leveduras industriais, que não possuem marcas auxotróficas, como a levedura industrial produtora de biocombustível CAT-1 (STAMBUK et al., 2009). Os marcadores dominantes utilizados (*KanMX* e *Ble^r*) estão flanqueados por sequências *loxP*, que são sequências palindrômicas compostas de 32 nucleotídeos, utilizadas para a posterior excisão dos genes marcadores, que ocorre pela ação da enzima Cre-recombinase (GÜLDENER et al., 2002, 1996). É de conhecimento geral as dificuldades legais em utilizar microrganismos geneticamente modificados, que possuam genes exógenos ao seu genoma, em processos industriais. Por este motivo, nós retiramos todos os genes exógenos utilizados para as transformações da levedura industrial CAT-1, gerando linhagens GMYwo (*Genetic Modified Yeast without markers*), aptas para serem prontamente utilizadas nas usinas de álcool combustível.

É importante frisar que não foi possível a retirada dos marcadores de transformação diretamente das linhagens GMY08 e GMY15, pois as mesmas já possuem integrados em seus genomas os genes *KanMX* e *Ble^r*, utilizados para as modificações no locus *SUC2*, mesmos genes marcadores de transformação presentes nos plasmídeos para a expressão da Cre-recombinase pSHKAN ou pSH65, respectivamente. Devido a este motivo, tivemos que retornar às linhagens GMY06 (que originou a GMY08) e GMY11 (que originou a GMY15), que possuem uma única modificação no locus *SUC2* utilizando o marcador *KanMX*, para realizar a remoção do mesmo. Devemos ressaltar que na estratégia de modificação utilizada na linhagem GMY16, é necessária somente a excisão do marcador *KanMX*, uma vez que a deleção do gene *SUC2* e a sobre-expressão do gene *AGT1* (*suc2::AGT1*) foram realizadas em um único evento de recombinação homóloga (Figura 10). As linhagens industriais modificadas GMY06, GMY11 e GMY16 (Tabela 1), foram transformadas com o plasmídeo pSH65 (*Ble^r P_{GAL11}::cre*) para a excisão do gene marcador *KanMX*. Após a transformação e seleção dos clones em meio YP-agar contendo glicose mais zeocina, procedeu-se com a indução da expressão da enzima Cre-recombinase com galactose, como descrito na Seção 4.4.6. As linhagens obtidas foram testadas quanto a presença do gene *KanMX* por amplificação através de PCR do locus onde este gene estava inserido (cromossomo IX) e pelo plaqueamento

em meio YP-agar contendo glicose mais geneticina (G418). De acordo com o gel de agarose mostrado na Figura 17, utilizando os iniciadores V3-SUC2F (que anela no cromossomo IX) e V-KANrR (que anela no gene *KanMX*), nenhuma das linhagens transformantes analisadas apresentaram amplificação, indicando que este gene marcador foi excisado com sucesso do genoma. A linhagem GMY10 foi utilizada como controle e apresentou uma amplificação de ~1700 pb correspondente ao gene *KanMX* presente no cromossomo IX desta linhagem.

Uma outra maneira de analisar a excisão do gene marcador é amplificar a cópia *iSUC2* utilizando os iniciadores V3-SUC2F e SUC100R. Na linhagem controle GMY10 houve uma amplificação de ~3100 pb referentes ao gene *KanMX* e o promotor *ADHI* que controla a expressão do gene *iSUC2*. Já nas as linhagens que perderam o marcador, foi observado uma diminuição no tamanho do produto amplificado de ~1400 pb (para ~1700 pb), tamanho exato do cassete de expressão do gene *KanMX* e das sequências flanqueadoras *loxP*, indicando que o gene marcador foi, de fato, removido (Figura 17). Além da verificação por PCR, as células foram testadas quanto a sua habilidade de crescer em meio contendo geneticina. As linhagens que não possuem mais a capacidade de crescer em meio contendo G418, perderam o gene *KanMX* do seu genoma e foram denominadas de GMY06wo, GM11wo e GMY16wo. A retirada do plasmídeo pSH65 das linhagens sem o marcador *KanMX* foi realizada de acordo com a Seção 4.4.6, e a confirmação da perda do plasmídeo, após os repiques sucessivos em sacarose, foi realizada por plaqueamento em meio YP-agar contendo glicose mais zeocina (dados não mostrados). É importante lembrar que as linhagens parentais GMY06, GMY11 e GMY16 já possuem o gene *AGT1* sobre-expresso nos seus genomas, e que a estratégia de sobre-expressão deste gene não utiliza marcadores dominantes para a seleção dos clones, mas sim a atividade de transporte e fermentação de maltotriose na presença de antimicina A, própria da permease *Agt1p*.

As linhagens GMY06wo e GMY11wo foram utilizadas para dar continuidade ao trabalho, com a deleção da outra cópia do gene *SUC2* não modificada, utilizando o módulo que contém o gene de resistência *Ble^r*, seguindo a estratégia demonstrada na Figura 7. A confirmação da substituição de uma parte do gene *SUC2* pelo módulo *loxP-Ble^r-loxP* (Módulo 5) foi realizada por amplificação por PCR do locus modificado, utilizando os iniciadores mostrados na Figura A-26. Confirmada a integração do módulo de deleção do gene *SUC2* e a perda da atividade invertase extracelular (Tabela 6), o próximo passo foi retirar o marcador *Ble^r* do genoma das linhagens GMY26 (GMY06wo *suc2::Ble^r*) e GMY21 (GMY11wo *suc2::Ble^r*). Seguindo o protocolo de remoção dos marcadores, as linhagens acima foram transformadas com o plasmídeo pSHKAN, pré-crescidas em rafinose, recuperadas e inoculadas em meio contendo galactose para expressar a enzima Cre-recombinase. As linhagens obtidas foram testadas quanto a presença do gene *Ble^r* por amplificação por PCR do *locus* onde este gene estava inserido (Figura A-28) e pelo plaqueamento em meio rico YP-agar contendo glicose mais zeocina. Para a amplificação do DNA dos clones transformantes, foi utilizado o iniciador ss-SUC2F, cuja a sequência foi removida da cópia *iSUC2*, anelando especificamente na cópia que contem o gene *Ble^r*. Juntamente com o ss-SUC2F foi utilizado o iniciador V-SUC2R, e foi observado no gel de agarose (Figura A-28) uma diminuição no tamanho das bandas amplificadas



Figura 17 – Verificação em gel de agarose a remoção do gene *KanMX* do genoma das linhagens GMY06, GMY11 e GMY16. À esquerda do gel de agarose temos o resultado do PCR utilizando os iniciadores V3-SUC2F (magenta) e V-KANrR (verde), e os DNAs das linhagens GMY10 (linha 1), GMY06wo (linha 2), GMY11wo (linha 3) e GMY16wo (linha 4). No centro do gel temos o marcador de peso molecular (M). À esquerda do marcador as bandas resultantes da amplificação utilizando os iniciadores V3-SUC2F (magenta) e SUC100R (azul), seguindo a mesma ordem das linhagens descritas anteriormente.

nas linhagens onde o gene *Ble^r* foi excisado do genoma em relação ao controle (que possui o gene *Ble^r*). As linhagens que não possuem mais a capacidade de crescer em meio contendo zeocina, perderam o gene *Ble^r* do seu genoma e foram denominadas de GMY26wo e GMY21wo. Para a remoção do pSHKAN das leveduras, os clones foram inoculados em YP mais sacarose e antimicina A, e realizados repiques a cada 12 horas, durante 5 dias. A confirmação da perda do plasmídeo foi realizada por plaqueamento em meio YP-agar contendo glicose mais geneticina.

Após a obtenção das linhagens modificadas sem os marcadores (GMYwo), foi realizada a dosagem da atividade invertase total e periplasmática e da atividade de transporte ativo do substrato pNP α G (Tabela 6). Não foram observadas diferenças na atividade invertase periplasmática, indicando que o açúcar mensurado é realmente uma limitação da técnica, e que o gene *SUC2* continua sem sintetizar a invertase periplasmática (alelo *iSUC2*). Entretanto, podemos observar que, após todas as etapas de transformações nas quais as leveduras foram submetidas para obtermos as modificações necessárias nos genes alvos (no total sete eventos que compreendem

Tabela 6 – Dosagem da atividade invertase total e periplasmática, e transporte de pNP α G pela permease *AGTI* nas linhagens industriais modificadas (GMY e GMYwo) crescidas em sacarose.

Linhagens	Atividade Invertase (nmoles mg ⁻¹ min ⁻¹)		Transporte de pNP α G (nmoles mg ⁻¹ min ⁻¹)
	Total	Periplasmática	
GMY16	1687 ± 32	76 ± 3	2,5 ± 0,2
GMY21	1453 ± 46	46 ± 1	1,6 ± 0,0
GMY26	1334 ± 45	53 ± 0	2,0 ± 0,1
GMY16wo	1149 ± 5	39 ± 1	7,3 ± 0,0
GMY21wo	970 ± 36	53 ± 4	8,1 ± 0,1
GMY26wo	947 ± 21	57 ± 3	8,0 ± 0,1

de transformações até retirada de plasmídeos centroméricos), e a remoção dos genes marcadores de transformação, a atividade intracelular da enzima invertase caiu cerca de 58% e 77% nas leveduras sem marcadores GMY26wo e GMY21wo, quando comparadas as linhagens parentais GMY08 e GMY15 (vide Tabela 4), respectivamente. Outro dado interessante, é que ocorreu uma diminuição de, em média, 31% da atividade invertase intracelular, após a remoção do gene *Ble^r* e a seleção das linhagem em antimicina A mais sacarose, nas linhagens GMY16wo, GMY21wo e GMY26wo). Sabe-se que os eventos de recombinação homóloga em leveduras *S. cerevisiae* são sítio específicos, entretanto as sequências de homologia encontradas flanqueando os módulos genéticos, podem se integrar gerando uma mistura de nucleotídeos oriundos do módulo genético e de nucleotídeos presentes no cromossomo da levedura (que nem sempre tem identidade de 100%). Dessa forma, acreditamos que devido às várias modificações genômicas realizadas no cromossomo IX, no locus *SUC2*, como: inserção do promotor forte *ADHI* gerando linhagens *iSUC2*; inserção do gene marcador *Ble^r* para deleção do gene *SUC2*; e remoção dos genes marcadores inseridos em cromátides irmãs, por recombinação de sequências de DNA; podem ter ocorrido modificações na sequência de nucleotídeos do promotor *ADHI*, o que diminuiu a eficiência do mesmo para a sobre-expressão do gene *iSUC2*. Análises fenotípicas foram realizadas para identificar se esta menor atividade terá algum efeito sobre o consumo de sacarose. Certamente, estudos de sequenciamento desta região deverão ser realizados para uma maior compreensão das regiões onde ocorreram a recombinação do DNA.

Outro dado interessante apresentado na Tabela 6, é o incremento na atividade de transporte ativo do substrato pNP α G mediado pela permease *AGTI*, nas linhagens GMY16wo, GMY21wo e GM26wo que foram submetidas a repiques sucessivos em 20 g L⁻¹ de sacarose acrescida de antimicina A para remoção dos plasmídeos. Este composto é um inibidor da cadeia respiratória, utilizado para permitir apenas o crescimento fermentativo das células, simulando culturas com limitação de oxigênio. Diversos autores já demonstraram que o cultivo de células de leveduras por várias

gerações em quimiostatos em condições de anaerobiose e limitação de substrato selecionou uma população de células leveduras que apresentaram um metabolismo adaptado às condições onde estavam sendo cultivadas e por conseguinte, apresentaram um aumento na fermentação alcoólica de dissacarídeos (BASSO et al., 2011; CASTRILLO et al., 1996; WEUSTHUIS et al., 1993). O repique sucessivo neste meio foi capaz de selecionar leveduras que tivessem a atividade da permease Agt1p aumentada, responsável pelo transporte ativo da sacarose.

Para analisar o comportamento das linhagens modificadas sem os marcadores GMY16wo, GMY21wo e GMY26wo, foram realizados crescimentos de acordo com a Seção 4.4.3 em meio rico YP contendo 20 g L⁻¹ de glicose ou sacarose. Observando o crescimento em glicose podemos notar um aumento na fase lag das leveduras, levando praticamente 9 horas para iniciar o consumo da glicose (Figura 18), quando compradas a 4 horas de fase lag das linhagens analisadas anteriormente e não selecionadas em antimicina A (Figura 13). Esse aumento na fase lag pode estar relacionado com alguma modificação dos níveis de AMPc nas células. O AMPc atua nas células, como segundo mensageiro, na ativação da proteína quinase A (PKA), a qual é responsável pela fosforilação de proteínas intracelulares, que participam na regulação da transcrição e da expressão gênica (FORSBERG; LJUNGDAHL, 2001; GANCEDO, 2008). Sabe-se, que a adição de glicose às células, em fase estacionária de crescimento ou crescendo em fontes de carbono não fermentáveis, e a acidificação intracelular são condições que causam ativação da via PKA, por desencadear o aumento na concentração intracelular de AMPc. Durante a fase inicial de crescimento, já foram observados aumentos na concentração de AMPc em células de leveduras, porém este aumento é transiente e está relacionado com a fase lag de crescimento. Já foi demonstrado que, mutantes de *S. cerevisiae* defeituosos na inibição da síntese do AMPc, apresentam uma extensa fase lag quando cultivados em glicose, devido a um acúmulo temporário de AMPc (MA et al., 1997). Além do aumento da fase lag, podemos notar uma melhora em todos os parâmetros cinéticos obtidos durante o crescimento exponencial nas linhagens sem marcadores quando comparadas com a linhagem parental CAT-1 (Figura 13B). A velocidade específica de crescimento (μ_X) das linhagens sem marcador GMY16wo (0,36 h⁻¹), GMY21wo (0,37 h⁻¹) e GMY26wo (0,37 h⁻¹) esta diminuída em relação à levedura CAT-1 (0,45 h⁻¹, vide Figura 13B acima), bem como os valores de rendimento de conversão do substrato a biomassa ($Y_{X/S}^{Exp}$), como mostra a Figura 18B. O rendimento de conversão de substrato a produto é praticamente o dobro nas linhagens sem os marcadores GMY16wo (0,47 g Eta g Gli⁻¹), GMY21wo (0,48 g Eta g Gli⁻¹), ou GMY26wo (0,48 g Eta g Gli⁻¹), em relação à linhagem parental CAT-1 (0,28 g Eta g Gli⁻¹), bem como a velocidade de produção de etanol (μ_P), que foi a mesma para todas as linhagens sem marcador (μ_P 0,08 h⁻¹) e menor em relação à CAT-1 (μ_P 1,6 h⁻¹).

Quando analisado o crescimento das linhagens sem os marcadores em meio contendo sacarose, podemos visualizar com mais detalhes os reais efeitos da seleção em antimicina A (simulando a limitação de oxigênio) na presença de um substrato específico, a sacarose, sobre as células de leveduras (Figura 19). Da mesma forma como observado no crescimento em glicose, é nítido o aumento na fase lag de crescimento das linhagens sem marcadores cultivadas em sacarose. Fato este, que

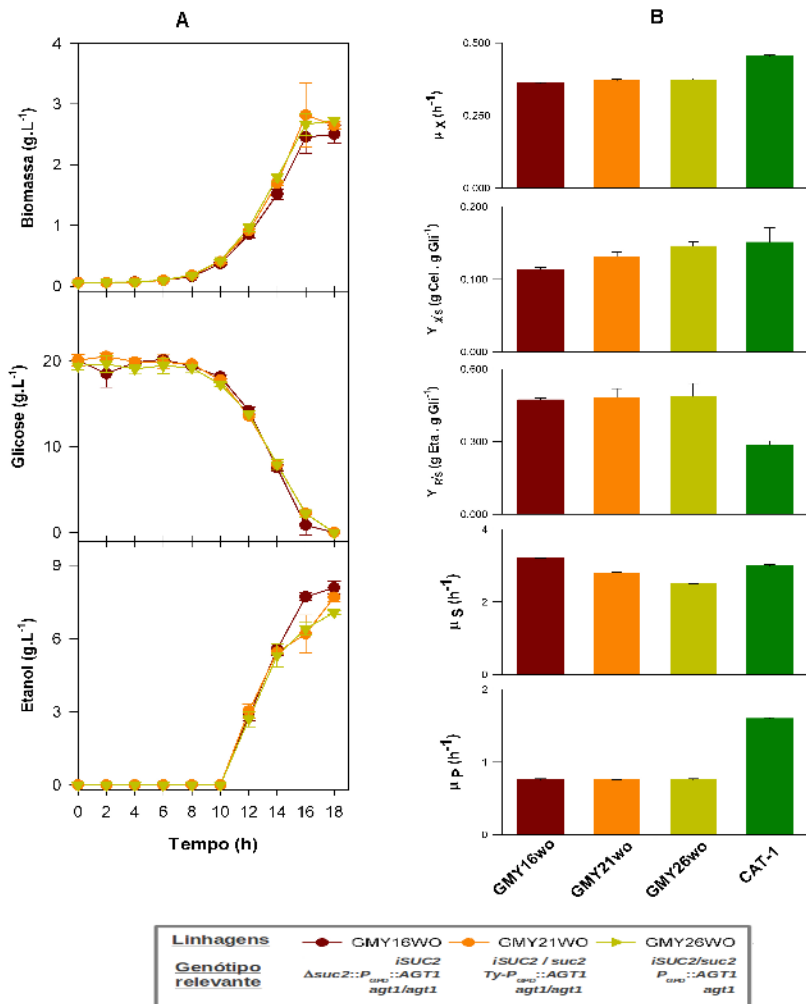


Figura 18 – Crescimento em glicose (20 g L^{-1}) e parâmetros fisiológicos das linhagens modificadas sem os marcadores (GMYwo). A) Crescimento em frascos agitados demonstrando a formação de biomassa, o consumo de glicose e produção de etanol. B) Parâmetros cinéticos extraídos do crescimento em meio rico (YP) com glicose.

pode ser novamente atribuído aos níveis de AMPc presentes nas células. Sabe-se também que em *S. cerevisiae*, o receptor de membrana Gpr1p apresenta alta afinidade para a sacarose (LEMAIRE et al., 2004; VELDE; THEVELEIN, 2008) e desencadeia a ativação de uma via de sinalização responsável pela formação de AMPc, o qual participa da regulação de vários processos celulares importantes como: na glicólise, na floculação, no crescimento filamentosos e outros (VERSTREPEN et al., 2004; THEVELEIN; WINDE, 1999; LORENZ et al., 2000). Sabe-se que alterações intracelulares (p. ex.: acidificação intracelular e alteração na relação AMP/ATP) podem desencadear formação de AMPc, e o aumento na atividade de transporte ativo da sacarose, com simporte de próton, observados para as linhagens sem os marcadores (Tabela 6), pode de forma transiente, aumentar a acidificação do meio e logo, aumentar os níveis de AMPc durante a fase lag mais extensa. Os parâmetros fisiológicos (Figura 19B) corroboram que as linhagens sem os marcadores, apresentaram velocidade específica de crescimento (μ_X) mais lenta, entretanto a linhagem parental CAT-1 apresentou um rendimento na conversão de substrato a células ($Y_{X/S}^{Exp}$) levemente menor que as linhagem GMYwo. O maior rendimento na conversão de substrato a etanol ($Y_{P/S}^{Exp}$) foi verificado para as linhagens modificadas sem os marcadores GMY16wo (0,52 g Eta g Sac⁻¹), GMY21wo (0,55 g Eta g Sac⁻¹) e GMY26wo (0,52 g Eta g Sac⁻¹) em relação a parental CAT-1 (0,36 g Eta g Sac⁻¹). Os resultados de velocidade específica de produção de etanol (μ_P^{Exp}) e de velocidade específica de consumo da sacarose (μ_S^{Exp}), indicam a um metabolismo mais lento das leveduras sem os marcadores, selecionadas em antimicina A mais sacarose. Por outro lado, em outra análise sobre os resultados de atividade da invertase intracelular, observa-se que as células sem os marcadores apresentaram atividade aproximadamente 31% inferior que as células que não foram submetidas aos repiques em antimicina A mais sacarose (Tabela 6). Esse resultado vai ao encontro ao observado por DÁRIO (2011), onde células de leveduras que continham o plasmídeo carregando o gene *CYR1* (codifica AMPc) apresentaram a mesma diminuição na atividade invertase (31%) e por conseguinte uma menor velocidade de crescimento em sacarose, mas melhoras nos rendimentos a etanol.

Também podemos observar que, quando as linhagens *iSUC2* são submetidas a crescimentos com baixas densidades celulares e em baixas concentrações de sacarose (20 g L⁻¹), é detectada a presença de glicose e frutose no meio de cultivo (Figuras 14 e 19), independentemente das linhagens terem sido pré-selecionadas ou não em antimicina A. A sacarose foi consumida do meio de cultivo após 16 horas de crescimento, tempo que coincidiu com o pico máximo de produção de etanol para todas as linhagem GMYwo.

Quando comparamos o crescimento das linhagens sem os marcadores em meios contendo glicose ou sacarose, podemos observar que, apesar destas linhagens apresentarem os maiores rendimentos na conversão de etanol, certamente ocorreu algum efeito deletério no metabolismo das mesmas, após a remoção do plasmídeo Cre-recombinase e posterior seleção em antimicina A mais sacarose. O comportamento semelhante das linhagens GMYwo crescendo em glicose e sacarose não era esperado, uma vez que só foram modificados, por engenharia genômica, os genes alvos para a utilização de sacarose (*AGT1* e *SUC2*). Em outro trabalho

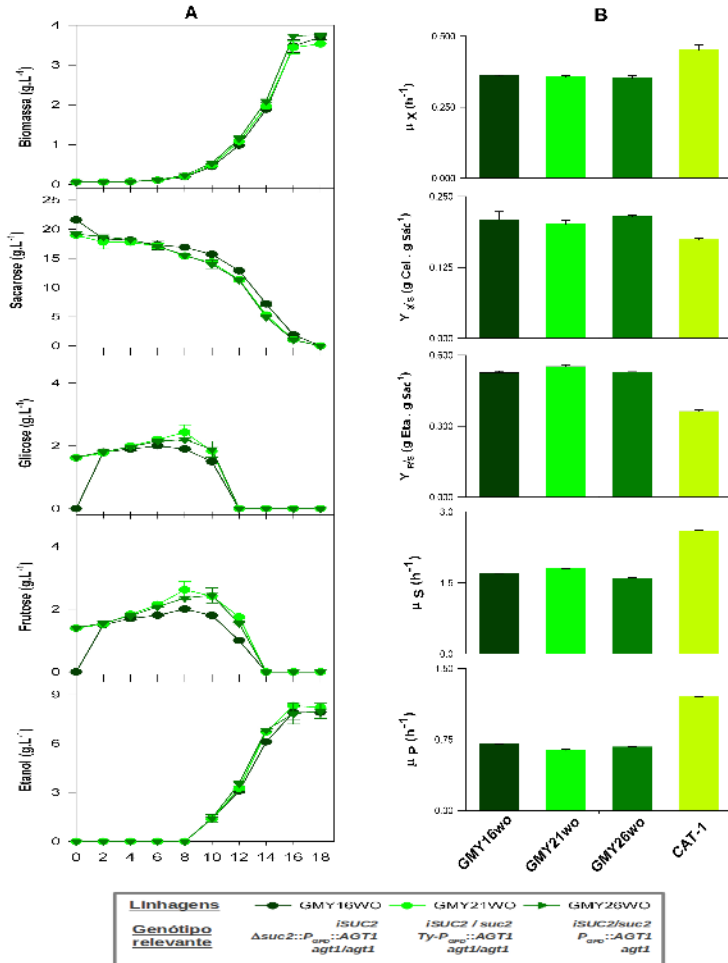


Figura 19 – Crescimento em sacarose (20 g L⁻¹) e parâmetros fisiológicos das linhagens modificadas sem os marcadores (GMYwo). A) Crescimento em frascos agitados demonstrando a formação de biomassa, o consumo de sacarose, formação e consumo de glicose e frutose e produção de etanol. B) Parâmetros cinéticos extraídos do crescimento em meio rico (YP) com sacarose.

foi demonstrado que, em mutantes de leveduras *S. cerevisiae* direcionados para utilizar de forma simultânea e eficiente maltose e glicose, ocorreu uma desregulação severa nos sistemas de indução/repressão de genes *HXT*. Análises por *Northern Blot* revelaram que a linhagem mutante expressa somente os genes *HXT6/7*, independente da concentração de glicose presente no meio, sendo incapaz de detectar concentrações abundante de glicose, tanto através de vias de repressão de indução gênica (SALEMA-OOM et al., 2011). Koschwanez, Foster e Murray (2013) também evoluíram populações de *S. cerevisiae* em baixas concentrações de sacarose, e observaram que a população de células evoluídas apresentaram modificações na expressão dos transportadores de hexoses (*HXT*). Esses resultados podem explicar a lenta velocidade de consumo da glicose e o aumento da fase lag nas linhagens GMYwo crescidas em glicose, que foram previamente selecionadas em antimicina A mais sacarose.

A seguir analisamos o desempenho das linhagens modificadas sem marcador (GMYwo) em fermentações em batelada simples contendo 200 g L^{-1} de sacarose em condições próximas às utilizadas na indústria de produção de etanol combustível no Brasil (AMORIM et al., 2011). Na Figura 20, foi observado que, para as linhagens modificadas GMYwo mesmo após 10 horas de fermentação, ainda restava sacarose no meio extracelular, enquanto que, para a levedura parental CAT-1, por ação da invertase extracelular a sacarose foi completamente hidrolisada após 4 horas de fermentação (Figura 15). A linhagem GMY16wo foi a que consumiu a maior quantidade de sacarose, restando no meio apenas 11 g L^{-1} , enquanto que para a linhagem GMY21wo restaram 21 g L^{-1} e para a linhagem GMY26wo 46 g L^{-1} . Como esperado, não foi detectada a presença de glicose e frutose no meio extracelular, mesmo resultado observado nas fermentações utilizando as linhagens com marcadores GMY08 e GMY15 (Figura 15). Outro dado interessante, é a ausência de secreção de glicerol durante a fermentação em altas concentrações de sacarose pelas linhagens modificadas GMYwo. Já tinha sido observada uma diminuição de 50% na produção de glicerol em fermentações com o transporte ativo de sacarose e sua hidrólise intracelular, nas linhagens GMY08 e GMY15. Como, nas linhagens GMYwo, a sacarose não é hidrolisada extracelularmente, e não foi gerado nenhum tipo de estresse celular que pudesse aumentar a síntese deste osmolito, foi observado que a não síntese de glicerol incrementou a produção de etanol nas linhagens modificadas sem os marcadores (Figura 20). O fato de não ser gerado glicose e frutose no meio extracelular previne que microrganismos contaminantes cresçam nas dornas de fermentação. Em ensaios preliminares, realizados em um tanque de fermentação de 1000 litros, utilizando melaço diluído em água ($\sim 180 \text{ g L}^{-1}$ de açúcares totais) como meio fermentativo, as linhagens GMY08 e GMY15, que não possuem atividade invertase extracelular, não necessitaram a adição de antibiótico para controle da contaminação bacteriana durante aproximadamente 10 ciclos fermentativos, enquanto que para a linhagem parental CAT-1, adições de antibiótico foram necessárias a cada reciclo (dados não mostrados).

Podemos perceber que a formação de biomassa, consumo de sacarose e produção de etanol pela linhagens modificadas GMYwo, ocorreram de forma praticamente linear (Figura 20), quando comparadas as linhagens modificadas contendo os marcadores (GMY) analisadas na Figura 15, e acreditamos que essa

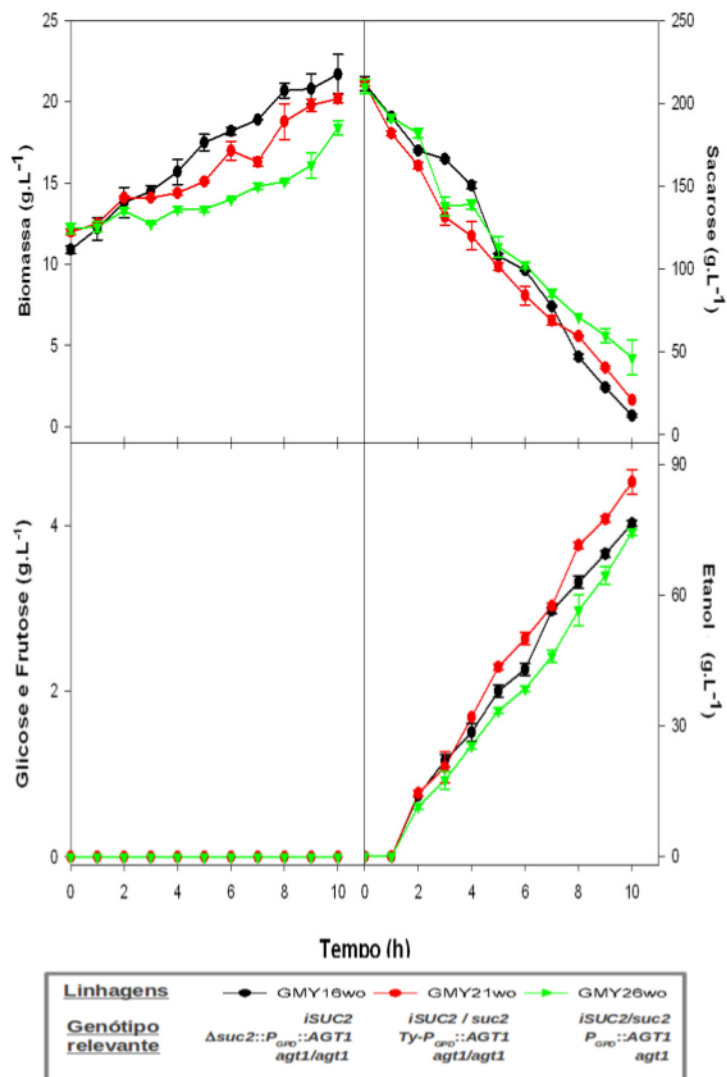


Figura 20 – Fermentação em batelada simples contendo 200 g L⁻¹ de sacarose e 10 g L⁻¹ de células iniciais, utilizando as linhagens modificadas sem os marcadores - GMYwo.

diferença possa estar relacionada com a menor atividade da enzima invertase intracelular frente a sacarose (Tabela 6) e/ou uma menor velocidade de metabolização da sacarose pela via glicolítica. Acreditamos que o transporte ativo da sacarose, nesse caso, não é o passo limitante da fermentação, pois as linhagens GMYwo, tiveram sua atividade de transporte aumentada após os repiques sucessivos em antimicina A mais sacarose (Tabela 6). Entretanto trabalhos recentes descrevem que a evolução de linhagens de leveduras em condições limitantes de substrato podem melhorar o desempenho das células em outros substratos, porém nas mesmas condições limitantes também. Quando estas mesmas células são expostas a ambientes ricos em substratos, foi observado um desempenho inferior no metabolismo destas células, inclusive na presença do mesmo substrato utilizado para a evolução dirigida (WENGER et al., 2011). Compensações metabólicas podem resultar deste processo de evolução de linhagens em condições limitantes de substrato, uma vez que em altas concentrações de sacarose as linhagens GMYwo não conseguiram utilizar eficientemente este açúcar, quer por aquisições de mutações adaptativas intrínsecas às células ou pela acumulação de mutações neutras em outra parte no genoma.

Analisando os parâmetros cinéticos obtidos durante a fermentação (Figura 21), podemos perceber que o rendimento da conversão de substrato em célula ($Y_{X/S}^{Global}$), permaneceu muito similar para as linhagens GMY16wo (0,108 g Cel g Sac⁻¹), GMY21wo (0,106 g Cel g Sac⁻¹), GMY26wo (0,112 g Cel g Sac⁻¹), e para a linhagem parental CAT-1 (0,106 g Cel g Sac⁻¹), enquanto que o rendimento da conversão de substrato a etanol ($Y_{P/S}^{Global}$), foi maior para as linhagens GMY21wo (0,450 g Eta g Sac⁻¹) e GMY26wo (0,454 g Eta g Sac⁻¹) em relação à linhagem GMY16wo (0,382 g Eta g Sac⁻¹) e à linhagem CAT-1 (0,405 g Eta g Sac⁻¹). No caso das linhagens GMYwo, como já foi identificado previamente, a velocidade de consumo do substrato é muito lenta, atingindo o final da fermentação após um período mais demorado. Em números, foi obtido um aumento de cerca de 12% no rendimento de conversão de substrato a etanol pelas linhagens GMYwo em relação a parental CAT-1, e uma diminuição de 100% na síntese e secreção de glicerol (não foi detectado glicerol no meio de fermentação das linhagens GMYwo, dados não mostrados). Não foram observadas correlações entre o transporte ativo de sacarose e a menor produção de biomassa, porém as fermentações realizadas em Erlenmeyer não possuem parâmetros de controle efetivos para uma comparação real.

Diversos trabalhos demonstram a importância do transporte ativo de dissacarídeos e posterior hidrólise intracelular gerando um aumento no rendimento da produção de etanol, como o transporte de açúcares utilizados na produção de etanol de segunda geração (celobiose e xilose) (HA et al., 2010). Através de engenharia genética, os autores inseriram os genes responsáveis pelo transporte ativo de ciclodextrinas (*CDT1* e *CDT2*) e pela síntese da β -glicosidade intracelular (GH1-1) em leveduras *S. cerevisiae*, que naturalmente não são capazes de fermentar esse açúcares (LI et al., 2010; GALAZKA et al., 2010). A celobiose, originada da hidrólise da celulose por celulasas, é transportada para o citosol celular por transportadores de ciclodextrinas de alta afinidade e hidrólise intracelular por β -glicosidases, apresentando um aumento no rendimento de substrato à etanol, além de minimizar os efeitos deletérios das altas concentrações de glicose sobre as celulasas

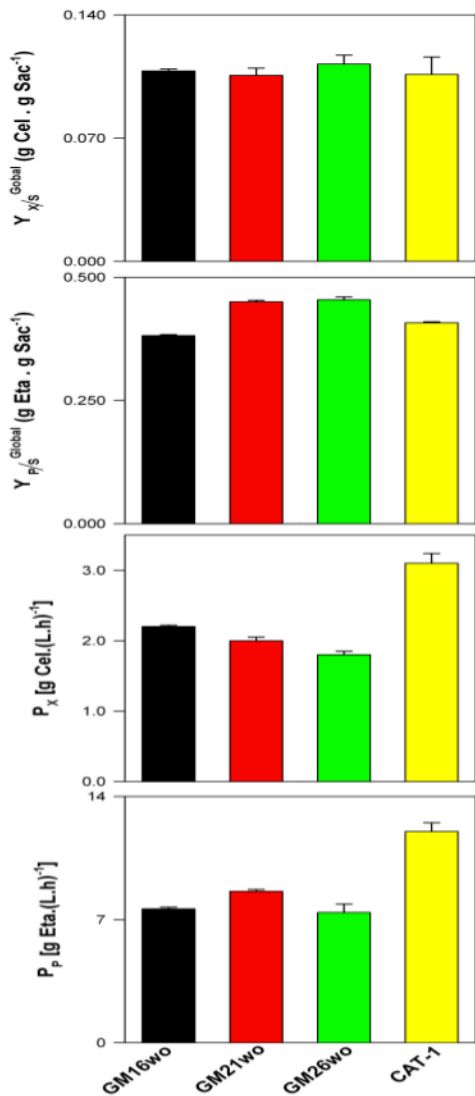


Figura 21 – Parâmetros cinéticos das linhagens industriais modificadas sem marcadores - GMYwo - obtidos durante a fermentação em batelada simples contendo 200 g L⁻¹ de sacarose.

envolvidas na hidrólise de celulose. Além dos genes para fermentação de celobiose, foram inseridos em leveduras *S. cerevisiae*, a via de metabolização de xilose, pentose originada da hidrólise ácida da hemicelulose, para co-fermentação de xilose e celobiose (HA et al., 2010). A xilose é transportada por difusão facilitada pelos transportadores de hexoses (*HXT*), que sofrem repressão na presença de glicose, diminuindo a capacidade de captação desse açúcar do meio. Foi descrito que o transporte ativo da celulose e posterior hidrólise intracelular, aumentam o rendimento da co-fermentação destes açúcares por não haver glicose no meio extracelular. Dessa forma, a ausência de repressão por glicose em fermentações com misturas de açúcares por *S. cerevisiae* melhorou a eficiência de utilização total de açúcares e produtividade em etanol, o que é altamente desejável na produção de etanol combustível de diferentes fontes. Seguindo o mesmo raciocínio de co-fermentação de xilose e celulose, podemos propor a co-fermentação de xilose e sacarose, uma vez que as leveduras modificadas apresentam a metabolização intracelular da sacarose.

Para analisar a expressão dos genes *iSUC2* e *AGT1* durante a fermentação de 200 g L⁻¹ de sacarose pelas linhagens modificadas sem marcadores (GMYwo), foi realizada a amplificação do cDNA destas linhagens por PCR em tempo real. As amostras foram coletadas nos tempos zero, cinco e 10 horas após o início da fermentação, isolado o rNAm e posteriormente dosadas quanto a expressão relativa dos genes *iSUC2* e *AGT1* (Figura 22). O gene *ACT1*, expresso constitutivamente em leveduras, foi utilizado como normalizador da reação e apresentou dados de Cts semelhantes para todas as linhagens (dados não mostrados). A linhagem parental CAT-1 foi utilizada como calibrador para o cálculo da expressão relativa dos genes testados.

Logo que as células foram inoculadas no meio contendo alta concentração de sacarose, a expressão relativa do gene *iSUC2* já se apresentava aumentada cerca de 15 vezes para todas as linhagens testadas. Este dado demonstra que as células que possuem a invertase sobre o controle do promotor constitutivo do gene *ADHI* expressam altos níveis dessa enzima de forma constitutiva. Decorridas 5 horas de fermentação, podemos observar que a linhagem GMY21wo possui a expressão do gene *iSUC2* aumentada cerca de 80 vezes. Aumentos significativos na expressão relativa do gene *iSUC2* também foram verificadas nas linhagens GMY16wo e GYM26wo. Ao término da fermentação (10 horas) a quantidade de transcritos gerado a partir do gene *iSUC2* decaiu para um nível intermediário, e a expressão relativa deste gene se mantém cerca de 40 vezes aumentada (em relação ao *SUC2* da CAT-1) nas três linhagens analisadas. A maior expressão relativa do gene *iSUC2* mensurada na linhagem modificada GMY21wo pode estar relacionada com a maior produção de etanol por esta linhagem durante a fermentação de altas concentrações de sacarose (Figura 20). Acreditamos que o aumento na expressão relativa do gene *iSUC2* após 5 horas do início da fermentação é decorrente da maior disponibilidade intracelular de glicose, oriunda da hidrólise intracelular da sacarose, capaz de induzir fortemente o promotor *ADHI* (Figura 22). Com os dados aqui apresentados, podemos concluir que o consumo mais lento da sacarose, e que as fermentações incompletas após 10 horas não são consequências de problemas na hidrólise da sacarose no interior da célula.

De acordo com os dados de expressão relativa obtidos para o gene *iSUC2*, a

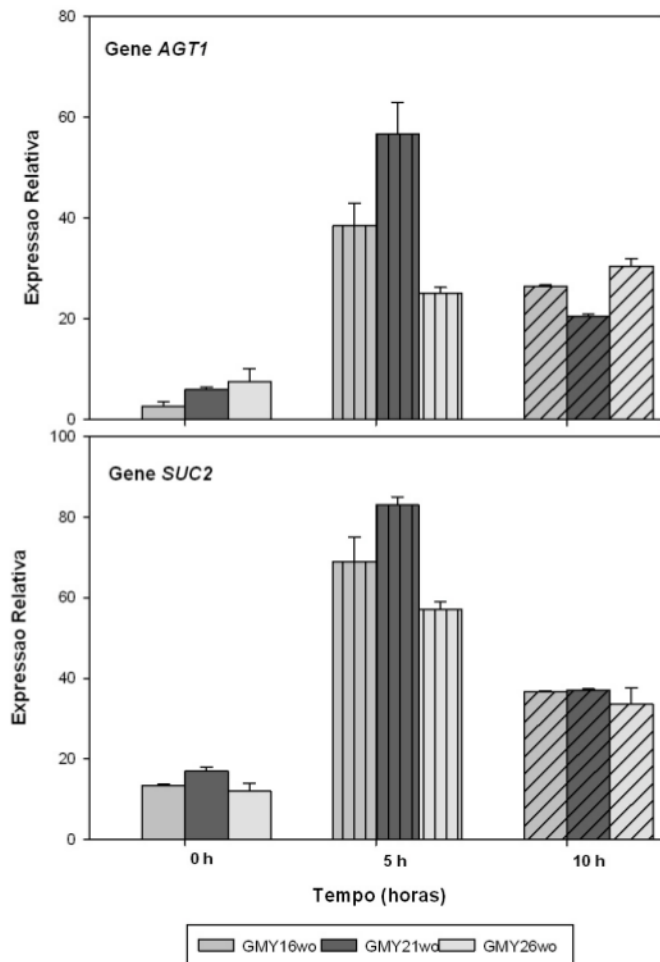


Figura 22 – Expressão relativa dos genes *iSUC2* e *AGT1* durante a fermentação de 200 g L^{-1} de sacarose. As amostras foram obtidas nos tempos zero, 5 e 10 horas após o início da fermentação. O gene *ACT1* foi utilizado como normalizador da reação, e a expressão dos genes *SUC2* e *AGT1* na linhagem parental CAT-1 foi utilizada como calibrador para a realização dos cálculos de expressão relativa.

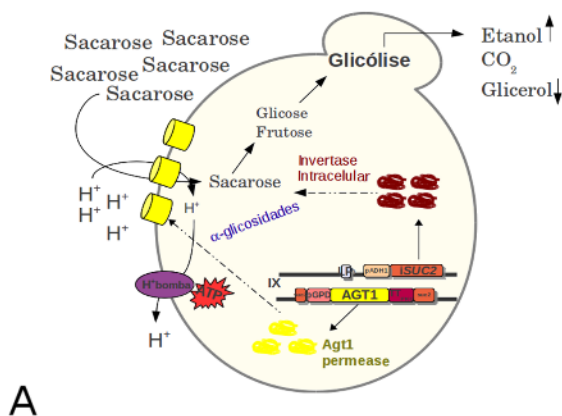
análise da expressão relativa do gene *AGT1* identificou um aumento na quantidade de transcrito após 5 horas de fermentação, quando as células de leveduras estão com os genes envolvidos no metabolismo de sacarose mais ativados (Figura 20). No tempo inicial da fermentação, foi observado um aumento tímido na quantidade de transcritos do gene *AGT1* sintetizados em todas as linhagens GMYwo. Já após 5 horas do início da fermentação é possível observar um aumento de até 56 vezes na expressão relativa deste gene na linhagem GMY21wo. Juntamente com os dados observados para a expressão relativa do gene *iSUC2*, podemos inferir que esta linhagem produziu uma maior concentração de etanol ao final da fermentação devido a maior atividade dos principais genes envolvidos nas primeiras etapas da metabolização da sacarose. A expressão do gene *AGT1* foi detectada até o final da fermentação, indicando que o transporte ativo da sacarose não foi a etapa limitante do processo de utilização de sacarose. Vale a pena mencionar, que experimentos de batelada alimentada com ciclos celulares e utilizando meio contendo sacarose (200 g L⁻¹), foram conduzidos em nosso laboratório e foi constatado que os ciclos celulares apresentaram maior rendimento na conversão de substrato a etanol, indicando uma adaptação do metabolismo dessas leveduras industriais ao meio onde estão expostas (dados não mostrados).

Do ponto de vista energético o transporte ativo de dissacarídeos e de trissacarídeos em *S. cerevisiae* é realizado através do co-transporte com íons H⁺, que devem ser removidos da célula pela H⁺-ATPase de membrana (codificadas pelo gene *PMA1*), para garantir a manutenção da homeostase do pH intracelular. O transporte ativo da maltose é realizado com estequiometria 1:1, ou seja, uma molécula de açúcar juntamente com uma de próton. Na manutenção do pH citoplasmático ocorre o gasto de 01 (uma) molécula de ATP para cada próton lançado pelas H⁺-ATPases, obtendo-se assim no saldo final do balanço energético, 3 moles de ATP por mol de maltose consumido pelas células. WEUSTHUIS et al. (1993), descreveu ganho às células de 3 moles de ATP por mol de maltose consumido, e de 4 moles de ATP para 2 moles de glicose consumida (quantidade equivalente a um mol de maltose), proporcionando um menor rendimento energético (saldo de ATP) às células que transportam ativamente a maltose. Da mesma forma, esperar-se-ia que as leveduras modificadas no gene *SUC2* apresentariam aumento no metabolismo celular para repor a energia perdida na manutenção do pH citoplasmático, e para formar a mesma quantidade de biomassa que as células não modificadas, apresentando maior produção de etanol. Nosso grupo de pesquisa construiu uma linhagem de laboratório haploide geneticamente modificada na expressão do gene *SUC2* visando a utilização da sacarose somente pela via intracelular (*iSUC2*). Esta linhagem apresentou um aumento de 4% no rendimento de etanol durante a fermentação anaeróbica em quimiostatos com limitação de substrato, e após 90 gerações nesse meio, foi detectado um aumento de 10 vezes na atividade de simporte de H⁺, resultando em um aumento em 11% no rendimento de etanol a partir de sacarose. Uma análise transcricional revelou aumento na expressão de genes relacionados com o metabolismo de maltose, incluindo o gene *AGT1*, que encontra-se amplificado nas leveduras evoluídas (BASSO et al., 2011). Acreditamos que de maneira semelhante, a expressão dos genes *MAL* possam estar aumentadas nas linhagens modificadas GMYwo, devido ao aumento na atividade de transporte de

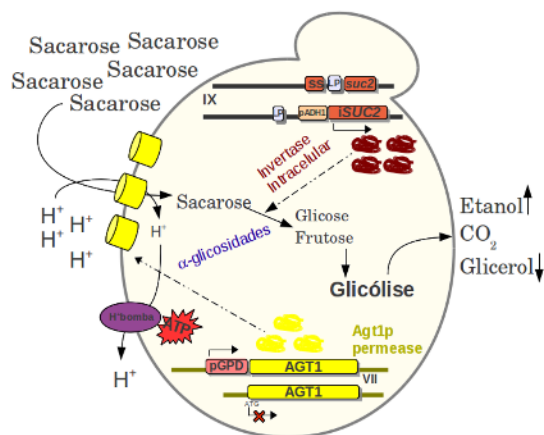
pNP α G, que também é dependente da atividade da enzima maltase, codificada pelo gene *MALx2*.

Apesar de um maior rendimento nas taxas de conversão de sacarose em etanol, e de apresentar expressão constitutiva dos genes *iSUC2* e *AGT1* durante a fermentação, as linhagens modificadas sem os marcadores (GM_Ywo) utilizam muito lentamente a sacarose e resultam em fermentações incompletas, quando comparadas com as linhagens que possuem as mesmas construções mas contendo os marcadores de seleção (p. ex. GM_Y08 e GM_Y15). Acreditamos, que devido aos vários eventos de inserção de genes ou promotores no genoma, à excisão dos genes marcadores do genoma, e principalmente à remoção dos plasmídeos centroméricos (para expressão da Cre-recombinase) nas linhagens GM_Ywo (além da seleção em baixas concentrações de sacarose mais antimicina A), estas linhagens possam ter sofrido modificações no seu metabolismo já que tanto o crescimento e fermentação de glicose (Figura 18) e sacarose (Figura 19) foram afetadas. Aparentemente, as adaptações metabólicas ocorridas não levaram também a uma eficiente fermentação de altas concentrações de sacarose. Uma estratégia que pode ser empregada para melhorar a eficiência da fermentação em sacarose das linhagens modificadas, com ou sem marcadores, é a engenharia evolutiva, onde a população de leveduras presentes em quimiostato limitado pela fonte de carbono é direcionada a apresentar características desejáveis a um processo industrial (vide (BASSO et al., 2011)).

Este trabalho teve como objetivo modificar a via "tradicional" de metabolização de sacarose, aplicando técnicas de engenharia genômica. Essa modificação consistiu em modular a expressão de dois genes chaves neste processo, *AGT1* e *SUC2*, para que as células passassem a expressar constitutivamente o transportador de membrana para sacarose (Agt1p) e a enzima invertase intracelular (alelo *iSUC2*). Esta estratégia de utilização intracelular da sacarose apresentou bons resultados quanto ao incremento no rendimento da conversão de substrato a etanol, podendo gerar resultados satisfatórios em dornas industriais, aumentando a produção sem precisar investir em equipamentos para a fábrica ou aumento da área plantada de cana-de-açúcar. Na Figura 23 é ilustrado as etapas do metabolismo intracelular da sacarose, com as principais enzimas e transportadores de membrana envolvidos neste sistema, além dos rearranjos nos cromossomos pelas modificações genéticas inseridas no genoma das linhagens GM_Y16wo (Figura 23A) e na linhagem GM_Y26wo (Figura 23B).



A



B

Figura 23 – Representação esquemática do novo modelo de utilização de sacarose por leveduras industriais de *S. cerevisiae* modificadas. A) Representação dos genes envolvidos nas etapas iniciais de metabolização da sacarose na linhagem GMY16wo, onde ocorre a sobre-expressão do gene *iSUC2* e do gene *AGT1*, ambas modificações envolvendo o locus *SUC2* do cromossomo IX. Esta linhagem foi obtida em dois eventos de recombinação homóloga e utilizando somente um gene marcador heterólogo. B) Representação das modificações genômicas realizadas na linhagem GMY26wo. Os dois genes *SUC2* no cromossomo IX foram modificados, enquanto que a sobre-expressão do gene *AGT1* foi obtida modificando este gene no cromossomo VII. Para a obtenção desta linhagem foram necessários três eventos de recombinação homóloga e a utilização de dois genes marcadores heterólogos diferentes.

6 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Este trabalho, que objetivou melhorar a eficiência na produção de etanol combustível a partir de sacarose através de modificações genômicas em leveduras industriais *Saccharomyces cerevisiae* isoladas de dornas de fermentação, permitiu concluir que:

1. As técnicas de engenharia genômica utilizadas neste trabalho foram eficientes para modificar com sucesso a via de utilização de sacarose em linhagens industriais diplóides de *S. cerevisiae*, modulando a expressão de genes envolvidos no transporte ativo e hidrólise intracelular de sacarose.
2. A utilização de regiões de homologia curtas ou longas flanqueando os módulos genéticos permitiu a integração destes módulos no genoma das leveduras com elevada especificidade. Não foram observadas diferenças na frequência de transformantes obtidos utilizando regiões curtas ou regiões longas de homologia ao DNA. Dessa forma, todos os módulos genéticos construídos neste trabalho se mostraram eficientes para a modificação genômica de leveduras industriais.
3. As modificações envolveram sobre-expressar o gene *AGT1* (*AGT1*⁺) e a invertase intracelular (alelo *SUC2*), e evitar a expressão da invertase periplasmática. Como a levedura industrial utilizada é diploide, foi necessário deletar a segunda cópia do gene *SUC2* (*suc2Δ*), ou substituir este gene pelo módulo de sobre-expressão da permease *AGT1* (*suc2::AGT1*⁺). Nas linhagens *iSUC2 / suc2Δ* o gene do transportador de sacarose foi também sobre-expresso (*AGT1*⁺) a partir do seu próprio locus cromossomal, ou pela inserção do módulo de sobre-expressão deste gene nos elementos *Ty1*.
4. Durante o crescimento celular ou fermentações em batelada foi observado que nas linhagens de levedura geneticamente modificadas que ainda apresentavam atividade invertase extracelular, a sacarose é hidrolisada mais rapidamente que a capacidade de transporte da mesma pela permease *AGT1* (inclusive em linhagens *AGT1*⁺ que sobre-expressam este gene), gerando glicose e frutose no meio extracelular, indicando que o mecanismo proposto para a utilização intracelular da sacarose não é funcional na presença de atividade invertase extracelular.
5. Nas linhagens sem atividade invertase extracelular (*iSUC2 / suc2::AGT1*⁺ ou *iSUC2 / suc2Δ AGT1*⁺) não foi observado acúmulo de glicose e frutose no meio extracelular durante o crescimento, e embora apresentaram uma menor velocidade de utilização de sacarose e menor velocidade de produção de etanol, o rendimento na conversão de substrato (sacarose) a produto (etanol)

foi maior. Nas fermentações em batelada com altas concentrações de sacarose estes parâmetros fermentativos para cada linhagem foram confirmados, e sugerem ainda uma diminuição na pressão osmótica sobre as leveduras pela redução na produção e excreção de glicerol nas linhagens sem invertase extracelular.

6. Foram também desenvolvidas estratégias e módulos flanqueados por regiões *loxP* para permitir a integração destes módulos no genoma, seguido da excisão dos genes marcadores com o uso da Cre-recombinase. Apesar do sucesso nas modificações genéticas propostas (incluindo a correta remoção dos genes marcadores), as leveduras modificadas sem marcadores apresentaram uma extensa fase lag durante o crescimento tanto em glicose ou sacarose, embora com maior rendimento de conversão do açúcar em etanol.

Levando em consideração que leveduras industriais possuem um metabolismo mais robusto e são facilmente adaptável as condições industriais onde estão expostas, acreditamos que utilizando linhagens de leveduras modificadas na via de metabolização da sacarose será possível conduzir fermentações em batelada alimentada com concentrações mais elevadas de sacarose ($\approx 250 \text{ g L}^{-1}$), produzindo maiores concentrações de etanol, com consequências interessantes para as usinas como menor gasto na destilação, menor geração de vinhaça e aumento na produção de etanol sem a necessidade de aumento na área de cana-de-açúcar plantada ou investimentos em maquinaria da usina. Entretanto, existe a necessidade de estudos para identificar o melhor modelo de alimentação nas bateladas e da concentração máxima de sacarose que as células podem fermentar de forma eficiente.

A utilização intracelular da sacarose apresentou um aumento no rendimento de conversão de sacarose a etanol. Mas as vantagens desta modificação no metabolismo incluem a ausência de glicose e frutose no meio extracelular, que evita efeitos deletérios nas células incluindo o desvio do carbono para a produção de outros metabólitos secundários (glicerol) pelo estresse osmótico nas células, além de ajudar a minimizar também a contaminação por bactérias e leveduras selvagens que não conseguem utilizar a sacarose. A presença de frutose no meio extracelular pode também gerar perdas na produção de etanol, uma vez que este monossacarídeo é lentamente consumido e geralmente sobra como açúcar residual nas fermentações por *S. cerevisiae*.

O desenvolvimento de estratégias de engenharia genômicas para leveduras industriais diplóides, incluindo aquelas sem a presença de genes marcadores exógenos ao DNA de *S. cerevisiae*, abre um grande leque de oportunidades para a modificação do metabolismo de leveduras visando incrementar a eficiência fermentativa das leveduras industriais, incluindo a produção de outras moléculas de interesse como biocombustíveis (butanol, iso-propanol, etc.), ou ainda a produção de outras biomoléculas de interesse químico ou farmacêutico.

O ambiente industrial, que tem como a principal característica ser um ambiente estressante, pois não existe o controle de temperatura na fermentação, assepsia em relação aos microrganismos endógenos da cana-de-açúcar, ciclos celulares durante toda a safra da cana-de-açúcar, e muitas vezes utilizam o melaço (sub-produto do refino do açúcar pobre em nutrientes) como mosto para fermentação, é um importante teste para a real avaliação do metabolismo das linhagens modificadas com ou sem marcadores. A utilização das linhagens industriais modificadas com os marcadores, abre ainda a possibilidade de serem realizados estudos de competição nas dornas de fermentação, uma vez que estas linhagens são facilmente identificadas devido à resistência a geneticina ou zeocina.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVARADO, E. et al. Localization of α 1-3-linked mannoses in the n-linked oligosaccharides of *Saccharomyces cerevisiae* *mn* mutants. *Biochemistry*, v. 29, n. 10, p. 2471–2482, 1990.
- ALVES, J. S. L. *Genômica do metabolismo de maltotriose em Saccharomyces cerevisiae: o papel determinante do gene AGT1*. Tese (Doutorado) — Universidade de São Paulo, 2010.
- ALVES, J. S. L. et al. Molecular analysis of maltotriose active transport and fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* reveals a determinant role for the *AGT1* permease. *Applied Environmental Microbiology*, v. 74, n. 5, p. 1494–1501, 2008.
- AMORIM, H. V. . et al. Scientific challenges of bioethanol production in brazil. *Applied Environmental Microbiology*, v. 91, p. 1267–1275, 2011.
- ANDJELKOVIC, U.; PICURIC, S.; VUJCIC, Z. Purification and characterisation of *Saccharomyces cerevisiae* external invertase isoforms. *Food Chemistry*, v. 120, p. 799–804, 2010.
- ANDO, A. et al. Identification and classification of genes required for tolerance to high-sucrose stress revealed by genome-wide screening of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res*, v. 6, n. 2, p. 249–267, 2006.
- ANDRIETTA, M. G. S. et al. Bioethanol - brazil, 30 years of proálcool. *International Sugar Journal*, v. 109, p. 195–200, 2007.
- ARGUESO, J. L. et al. Genome structure of a *Saccharomyces cerevisiae* strain widely used in bioethanol production. *Genome Research*, v. 19, p. 2258–2270, 2009.
- ARRUDA, L. M. O.; VITOLO, M. Characterization of invertase entrapped into calcium alginate beads. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 81, p. 23–33, 1999.
- AUSUBEL, F. et al. *Short protocols in molecular biology*. [S.l.]: New York: Greene Publishing Associates, 1992.
- BABRZADEH, F. et al. Whole-genome sequencing of the efficient industrial fuel-ethanol fermentative *Saccharomyces cerevisiae* strain cat-1. *Molecular Genetics Genomics*, v. 287, p. 485–494, 2012.
- BADOTTI, F.; BATISTA, A. S.; STAMBUK, B. U. Sucrose active transport and fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 48, p. 119–127, 2005.
- BADOTTI, F. et al. Switching the mode of sucrose utilization by *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbial Cell Factories*, v. 7, n. 4, p. <http://www.microbialcellfactories.com/content/7/1/4>, 2008.
- BAILEY, J. E. Toward a science of metabolic engineering. *Science*, v. 252, p. 1668–1675, 1991.

- BARNETT, J. A. A history of research on yeasts 5: the fermentation pathway. *Yeast*, v. 20, p. 509–543, 2003.
- BASÍLIO, A. C. M. et al. Detection and identification of wild yeast contaminants of the industrial fuel ethanol fermentation process. *Current Microbiology*, v. 56, p. 322–326, 2008.
- BASSO, L. C. et al. Yeast selection for fuel ethanol production in brazil. *FEMS Yeast Research*, v. 8, p. 1155–1163, 2008.
- BASSO, T. O. et al. Engineering topology and kinetics of sucrose metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* for improved ethanol yield. *Metabolic Engineering*, v. 13, n. 6, p. 694–703, 2011.
- BATISTA, A. S.; MILETTI, L. C.; STAMBUK, B. U. Sucrose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* lacking hexose transport. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, v. 8, p. 26–33, 2004.
- BELINCHON, M. M.; GANCEDO, J. M. Glucose controls multiple processes in *Saccharomyces cerevisiae* through diverse combinations of signaling pathways. *FEMS Yeast Research*, v. 7, p. 808–818, 2007.
- BERTHELS, N. et al. Discrepancy in glucose and fructose utilisation during fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast strains. *FEMS Yeast Research*, v. 4, p. 683–689, 2004.
- BERTHELS, N. J. et al. Correlation between glucose/fructose discrepancy and hexokinase kinetic properties in different *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast strains. *Appl Microbiol Biotechnol*, v. 77, p. 1083–1091, 2008.
- BIDENNE, C. et al. Analysis of the chromosomal dna polymorphism of wine strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Current Genetics*, v. 22, p. 1–7, 1992.
- BISSON, L. F. et al. Yeast sugar transporters. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, v. 28, n. 4, p. 259–308, 1993.
- BISSON, L. F.; FRAENKEL, D. G. Involvement of kinases in glucose and fructose uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 80, p. 1730–1734, 1983.
- BLOMBERG, A.; ADLER, L. Roles of glycerol and glycerol-3-phosphate dehydrogenase (nad⁺) in acquired osmotolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology*, v. 171, n. 2, p. 1087–1092, 1989.
- BOLES, E.; HOLLENBERG, C. P. The molecular genetics of hexose transport in yeasts. *FEMS Microbiology Reviews*, v. 21, p. 85–111, 1997.
- BRINK, J. Van den et al. New insights into the *Saccharomyces cerevisiae* fermentation switch: Dynamic transcriptional response to anaerobicity and glucose-excess. *BMC Genomics*, v. 09, p. 100, 2008.
- BROWN, C. A.; MURRAY, A. W.; VERSTREPEN, K. J. Rapid expansion and functional divergence of subtelomeric gene families in yeasts. *Current Biology*, v. 20, p. 895–903, 2010.

- BRUMM, P. J.; HEBEDA, R. E. Glycerol production in industrial alcohol fermentations. *Biotechnology Letters*, v. 10, n. 9, p. 677–682, 1988.
- BU, Y.; SCHMIDT, M. C. Identification of cis-acting elements in the *SUC2* promoter of *Saccharomyces cerevisiae* required for activation of transcription. *Nucleic Acids Research*, v. 26, n. 4, p. 1002–1009, 1998.
- CARLSON, M. Regulation of sugar utilization in *Saccharomyces* species. *Journal of Bacteriology*, v. 169, n. 11, p. 4873–4877, 1987.
- CARLSON, M.; BOTSTEIN, D. Two differentially regulated mRNAs with different 5' ends encode secreted and intracellular forms of yeast invertase. *Cell*, v. 28, p. 145–154, 1982.
- CARLSON, M.; BOTSTEIN, D. Organization of the *suc* gene family in *Saccharomyces*. *Molecular and Cellular Biology*, v. 3, n. 3, p. 351–359, 1983.
- CARLSON, M.; CELENZA, J. L.; ENG, F. J. Evolution of the dispersed *SUC* gene family of *Saccharomyces* by rearrangements of chromosome telomeres. *Molecular and Cellular Biology*, v. 5, n. 11, p. 2894–2902, 1985.
- CASTRILLO, J. I. et al. High-cell-density cultivation of yeasts on disaccharides in oxygen-limited batch cultures. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 49, p. 621–628, 1996.
- CHENG, Q.; MICHELS, C. A. *MAL11* and *MAL61* encode the inducible high-affinity maltose transporter of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology*, v. 173, n. 5, p. 1817–1820, 1991.
- CORDIER, H. et al. A metabolic and genomic study of engineered *Saccharomyces cerevisiae* strains for high glycerol production. *Metabolic Engineering*, v. 9, n. 4, p. 364–378, 2007.
- CRONWRIGHT, G. R.; ROHWER, J. M.; PRIOR, B. A. Metabolic control analysis of glycerol synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 68, p. 4448–4456, 2002.
- DÁRIO, M. G. *Análise Molecular do Metabolismo de Sacarose por Linhagens de Saccharomyces cerevisiae Utilizadas na Produção Industrial de Alcool Combustível*. Dissertação (Mestrado) — Universidade Federal de Santa Catarina, 2007.
- DÁRIO, M. G. *Efeito da alteração na captação de sacarose ao metabolismo de Saccharomyces cerevisiae*. Tese (Doutorado) — Universidade de São Paulo, 2011.
- DEMARINI, D. J.; CARLIN, E. M.; LIVI, G. P. Constitutive promoter modules for PCR-based gene modification in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, v. 18, p. 723 – 728, 2001.
- DENAYROLLES, M. et al. Incidence of *suc-rtm* telomeric repeated genes in brewing and wild wine strains of *Saccharomyces*. *Current Genetics*, v. 31, p. 457–461, 1997.
- DIJKEN, J. P. V.; SCHEFFERS, W. A. Redox balances in the metabolism of sugars by yeasts. *FEMS Microbiology Letters*, v. 43, p. 275–278, 1986.

- DUVAL, E. et al. Microarray karyotyping of maltose-fermenting *Saccharomyces* yeasts with differing maltotriose utilization profiles reveals copy number variation in genes involved in maltose and maltotriose utilization. *Journal of Applied Microbiology*, v. 109, p. 248–259, 2010.
- DUVAL, E. H. *Caracterização Fenotípica e Genotípica de cepas Industriais Geneticamente Modificadas de Saccharomyces cerevisiae*. Tese (Doutorado) — Universidade Federal de Santa Catarina, 2010.
- ECHEGARAY, O. et al. Fed-batch culture of *Saccharomyces cerevisiae* in sugar-cane blackstrap molasses: invertase activity of intact cells in ethanol fermentation. *Biomass and Bioenergy*, v. 19, p. 39–50, 2000.
- ERASMUS, D. J.; MERWE, G. K. van der; VUUREN, H. J. van. Genome-wide expression analyses: Metabolic adaptation of *Saccharomyces cerevisiae* to high sugar stress. *FEMS Yeast Research*, v. 3, p. 375–399, 2000.
- ESPÍRITO-SANTO, J. C. A. D. *Aperfeiçoamento da Fermentação de Sacarose Através da Modificação da Expressão dos genes SUC2 e AGT1 em Linhagens Diploides de Saccharomyces cerevisiae*. Tese (Doutorado) — Universidade de São Paulo, 2012.
- FIGUEIRÊDO, C. M. de. *Estudo da influência do gene FLO8 em fenótipos de linhagens de Saccharomyces cerevisiae isoladas em processos de produção de etanol combustível no Brasil*. Tese (Doutorado) — Universidade de São Paulo, 2012.
- FLOOD, A. E.; JOHNS, M. R.; WHITE, E. T. Mutarotation of d-fructose in aqueous-ethanolic solutions and its influence in crystallization. *Carbohydrate Research*, v. 288, p. 45–56, 1996.
- FOLCH-MALLOL, J. L.; GARAY-ARROYO, A.; LLEDIAS, F. La respuesta a estrés en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. *Rev. Lat. Amer. Microbiol.*, v. 46, p. 24–46, 2004.
- FORSBERG, H.; LJUNGDAHL, P. Sensors of extracellular nutrients in *Saccharomyces cerevisiae*. *Current Gen*, v. 40, n. 2, p. 91–109, 2001.
- GALAZKA, J. M. et al. Cellodextrin transport in yeast for improved biofuel production. *Science*, v. 330, p. 84–86, 2010.
- GANCEDO, J. M. The early steps of glucose signalling in yeast. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, v. 32, p. 673–704, 2008.
- GASCÓN, S.; NEUMANN, N. P.; LAMPEN, J. O. Comparative study of the properties of the purified internal and external invertases from yeast. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 243, p. 1573–1577, 1968.
- GIETZ, R.; WOODS, R. Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier dna/polyethylene glycol method. *Methods in Enzymology*, v. 350, p. 87–96, 2002.
- GOFFEAU, A. et al. Life with 6000 genes. *Science*, v. 274, p. 546–567, 1996.
- GOLDEMBERG, J. The brazilian biofuels industry. *Biotechnology for Biofuels*, v. 1, p. 6, 2008.

- GUERRA, O. G. et al. A novel system of genetic transformation allows multiple integrations of a desired gene in *Saccharomyces cerevisiae* chromosomes. *Journal of Microbiological Methods*, v. 67, p. 437–445, 2006.
- GÜLDENER, U. et al. A new efficient gene disruption cassette for repeated use in budding yeast. *Nucleic Acids Research*, v. 24, n. 13, p. 2519–2524, 1996.
- GÜLDENER, U. et al. A second set of *loxP* marker cassettes for cre-mediated multiple gene knockouts in budding yeast. *Nucleic Acids Research*, v. 30, n. 6, p. e23, 2002.
- HA, S.-J. et al. Engineered *Saccharomyces cerevisiae* capable of simultaneous cellobiose and xylose fermentation. *PNAS*, v. 108, n. 2, p. 504–509, 2010.
- HAN, E.-K. et al. Characterization of *AGT1* encoding a general α -glucoside transporter from *Saccharomyces*. *Molecular Microbiology*, v. 17, n. 6, p. 1093–1107, 1995.
- HENRISSAT, B. et al. Conserved catalytic machinery and the prediction of a common fold for several families of glycosyl hydrolases. *PNAS*, v. 92, n. 15, p. 7090–7094, 1995.
- HERSEN, P. et al. Signal processing by the hog map kinase pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 105, p. 7165–7170, 2008.
- HOLLATZ, C.; STAMBUK, B. U. Colorimetric determination of active α -glucoside transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Microbiological Methods*, v. 46, p. 253–259, 2001.
- JANSEN, M. L. A.; WINDE, J. H. D.; PRONK, J. T. Hxt-carrier-mediated glucose efflux upon exposure of *Saccharomyces cerevisiae* to excess maltose. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 69, n. 9, p. 4259–4265, 2002.
- JULES, M. et al. Two distinct pathways for trehalose assimilation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 70, n. 5, p. 2771 – 2778, 2004.
- KALITERNA, J. et al. Coordination of sucrose uptake and respiration in the yeast *Debaryomyces hansenii*. *Microbiology*, v. 141, p. 1567–1574, 1995.
- KOSCHWANEZ, J.; FOSTER, K.; MURRAY, A. Sucrose utilization in budding yeast as a model for the origin of undifferentiated multicellularity. *PLoS Biol*, v. 9, p. e1001122, 2011.
- KOSCHWANEZ, J. H.; FOSTER, K. R.; MURRAY, A. W. Improved use of a public good selects for the evolution of undifferentiated multicellularity. *e-Life*, v. 2, p. e00367, 2013.
- LEDERBERG, J.; LEDERBERG, E. M. Replica plating and indirect selection of bacterial mutants. *Journal of Bacteriology*, v. 63, n. 3, p. 399–406, 1952.
- LEITE, R. C. C. et al. Can brazil replace 5% of the 2025 gasoline world demand with ethanol. *Energy*, v. 34, p. 655 – 661, 2009.

- LEMAIRE, K. et al. Glucose and sucrose act as agonist and mannose as antagonist ligands of the g protein-coupled receptor *gpr1* in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell*, v. 16, p. 293–299, 2004.
- LEWIS, J. G. et al. The need for consistent nomenclature and assessment of growth phases in diauxic cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Genetics and Microbiology*, v. 139, p. 835–839, 1993.
- LI, S. et al. Overcoming glucose repression in mixed sugar fermentation by co-expressing a cellobiose transporter and a β -glucosidase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular BioSystems*, v. 6, p. 2129–2132, 2010.
- LIMA, U. A.; BASSO, L. C.; AMORIM, H. V. Produção de etanol. In: LIMA, U. A. et al. (Ed.). *Biotecnologia Industrial*. [S.l.]: Editora Blucher, 2001. v. 3, p. 1–43.
- LONGTINE, M. S. et al. Additional modules for versatile and economical pcr-based gene deletion and modification in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, v. 14, p. 953–961, 1994.
- LORENZ, M. C. et al. The g protein-coupled receptor *gpr1* is a nutrient sensor that regulates pseudohyphal differentiation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, v. 154, n. 2, p. 609–622, 2000.
- MA, P. et al. The lag phase rather than the exponential-growth phase on glucose is associated with a higher *capk* level in wild-type and *capk*-attenuated strains of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology*, v. 143, p. 3451–3459, 1997.
- MALLUTA, E.; DECKER, P.; STAMBUK, B. The *klu*ver effect for trehalose in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Basic Microbiology*, v. 40, n. 3, p. 199–205, 2000.
- MANIATIS, T.; FRITSCH, E. F.; SAMBROOK, J. *Molecular cloning: a laboratory manual*. [S.l.]: New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1982.
- MWESIGYE, P. K.; BARFORD, J. H. Mechanism of sucrose utilization by *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of General and Applied Microbiology*, v. 42, p. 297–306, 1996.
- NADAL, D. et al. Analysis and dynamics of the chromosomal complements of wild sparkling-wine yeast strains. *Applied Environmental Microbiology*, v. 65, p. 1688–1695, 1999.
- NAUMOV, G. I.; NAUMOVA, E. S. Comparative genetics of yeasts: A novel β -fructosidase gene *SUC8* in *Saccharomyces cerevisiae*. *Russian Journal of Genetics*, v. 46, p. 323–330, 2010.
- NAUMOV, G. I.; NAUMOVA, E. S. Polygenic control for fermentation of β -fructosides in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: New genes *suc9* and *suc10*. *Microbiology*, v. 79, p. 160–166, 2010.
- NEEDLEMAN, R. Control of maltase synthesis in yeast. *Molecular Microbiology*, v. 5, p. 2079–2084, 1991.
- NETO, H. B. de A. et al. Evaluation of a brazilian fuel alcohol yeast strain for scotch whisky fermentations. *J. Inst. Brew.*, v. 115, n. 3, p. 198–207, 2009.

- NOVAK, S.; ZECHNER-KRPAN, V.; MARIE, V. I. Regulation of maltose transport and metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Technol. Biotechnol.*, v. 42, p. 213–218, 2004.
- OLIVER, S. G. From dna sequence to biological function. *Nature*, v. 379, p. 597–600, 1996.
- ÓZCAN, S. et al. Expression of the *SUC2* gene of *Saccharomyces cerevisiae* is induced by low levels of glucose. *Yeast*, v. 13, p. 127–137, 1997.
- PETRACEK, M. E.; LONGTINE, M. S. Pcr-based engineering of yeast genome. In: _____. [S.l.]: Elsevier Inc., 2002. v. 350, cap. 25, p. 445–469.
- PORTO, S. I.; NETO, A. A. D. O.; SOUSA, F. O. B. D. *Acompanhamento de safra brasileira : cana de açúcar, terceiro levantamento, dezembro/2012*. [S.l.], 2012.
- REDDY, V. A. et al. Characterization of the glycosylation sites in yeast external invertase. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 263, p. 6978–6985, 1988.
- REIFENBERGER, E.; BOLES, E.; CIRIACY, M. Kinetic characterization of individual hexose transporters of *Saccharomyces cerevisiae* and their relation to the triggering mechanisms of glucose repression. *European Journal Biochemistry*, v. 245, p. 324–333, 1997.
- SAINZ-POLO, M. et al. The three-dimensional structure of *Saccharomyces* invertase: role of a non-catalytic domain in oligomerization and substrate specificity. *J Biol Chem*, Nã£o impresso, 2013.
- SALEMA-OOM, M. et al. Derepression of a baker's yeast strain for maltose utilization is associated with severe deregulation of *HXT* gene expression. *J Appl Microbiol*, v. 110, p. 364–374, 2011.
- SANTOS, M. H. C. *Política e Políticas de uma energia alternativa: o caso do Proálcool*. [S.l.]: Rio de Janeiro, 1993.
- SCHMIDELL, W. et al. Engenharia bioquímica. In: LIMA, U. D. A. et al. (Ed.). *Biotechnologia Industrial*. [S.l.]: São Paulo: Editora Blucher, 2001. v. 2.
- SCHMITTGEN, T.; LIVAK, K. Analyzing real-time pcr data by the comparative ct method. *Nature Protocols*, v. 3, n. 6, p. 1101–1108, 2008.
- SILVA-FILHO, E. A. da et al. Yeast population dynamics of industrial fuel-ethanol fermentation process assessed by pcr-fingerprinting. *Antonie van Leeuwenhoek*, v. 88, p. 13–23, 2005.
- SILVEIRA, M. C. F.; CARVAJAL, E.; BON, E. P. S. Assay for in vivo yeast invertase activity using naf. *Analytical Biochemistry*, v. 238, p. 26–28, 1996.
- STAMBUK, B. U. et al. Kinetics and energetics of trehalose transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *European Journal Biochemistry*, v. 237, p. 876–881, 1996.
- STAMBUK, B. U.; ARAUJO, P. S. de. Kinetics of active α -glucoside transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Research*, v. 1, p. 73–81, 2001.
- STAMBUK, B. U.; BATISTA, A. S.; ARAUJO, P. S. D. Kinetics of active sucrose transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 89, p. 212–214, 2000.

- STAMBUK, B. U. et al. Industrial fuel ethanol yeasts contain adaptive copy number changes in genes involved in vitamin b1 and b6 biosynthesis. *Genome Research*, v. 19, p. 2271–2278, 2009.
- STAMBUK, B. U. et al. Brazilian potential for biomass ethanol: Challenge of using hexose and pentose co-fermenting yeast strains. *Journal of Scientific & Industrial Research*, v. 67, p. 918–926, 2008.
- STAMBUK, B. U. et al. Active α -glucoside transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Letters*, v. 170, p. 105–110, 1999.
- SUGIYAMA, M. et al. Advances in molecular methods to alter chromosomes and genome in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol*, v. 84, p. 1045–1052, 2009.
- TAKESHIGE, K.; OUCHI, K. Factors affecting the ethanol productivity of yeast in molasses. *JOURNAL OF FERMENTATION AND BIOENGINEERING*, v. 79, n. 5, p. 449–452, 1995.
- TAUSSIG, R.; CARLSON, M. Nucleotide sequence of the yeast *SUC2* gene for invertase. *Nucleic Acids Research*, v. 11, n. 6, p. 1943–1954, 1983.
- THEVELEIN, J. M.; WINDE, J. H. D. Novel sensing mechanisms and targets for the camp-protein kinase a pathway in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microb*, v. 33, p. 904–918, 1999.
- TRICHEZ, D. *Identificação de resíduos de aminoácidos envolvidos no transporte ativo de açúcares pela permease Agt1p de Saccharomyces cerevisiae*. Dissertação (Mestrado) — Universidade Federal de Santa Catarina, 2007.
- TRICHEZ, D. *Análise estrutural da permease Agt1p de Saccharomyces cerevisiae*. Tese (Doutorado) — Universidade de São Paulo, 2012.
- TRIMBLE, R. B.; MALEY, F. Subunit structure of external invertase from *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 252, n. 12, p. 4409–4412, 1977.
- VELDE, S. V. D.; THEVELEIN, J. M. camp-pka and snf1 signaling mechanisms underlie the superior potency of sucrose for induction of filamentation in yeast. *Eukar. Cell*, v. 7, p. 286–293, 2008.
- VERSTREPEN, K. J. et al. Glucose and sucrose: hazardous fast-food for industrial yeast? *Trends Biotech*, v. 22, p. 531–537, 2004.
- VIDGREN, V. et al. Identification of regulatory elements in the *AGT1* promoter of ale and lager strains of brewer's yeast. *Yeast*, v. 28, n. 8, p. 579–594, 2011.
- WENGER, J. et al. Hunger artists: yeast adapted to carbon limitation show trade-offs under carbon sufficiency. *PLoS Genet*, v. 7, n. 8, p. e1002202, 2011.
- WEUSTHUIS, R. A. et al. Energetics and kinetics of maltose transport in *Saccharomyces cerevisiae*: a continuous culture study. *Applied Environmental Microbiology*, v. 59, n. 9, p. 3102–3109, 1993.
- WHEALS, A. E. et al. Fuel ethanol after 25 years. *TIBTECH*, v. 17, p. 482–487, 1999.

WIECZORKE, R. et al. Concurrent knock-out of at least 20 transporter genes is required to block uptake of hexoses in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letters*, v. 464, p. 123–128, 1999.

YOUNG, E. T. et al. Multiple pathways are co-regulated by the protein kinase snf1 and the transcription factors adr1 and cat8. *J. Biol. Chem.*, v. 278, p. 26146–26158, 2003.

ZANIN, G. M. et al. Brazilian bioethanol program. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 84-86, p. 1147–1161, 2000.

ZASTROW, C. R. et al. Maltotriose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, v. 27, p. 34–38, 2001.

ZASTROW, C. R. et al. Maltotriose metabolism by *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology Letters*, v. 22, p. 455–459, 2000.

APÊNDICE A – Confirmação em gel de agarose das transformações genômicas

A.1 CONSTRUÇÃO DO MÓDULO *ISUC2* CONTENDO O GENE MARCADOR *KANMX*

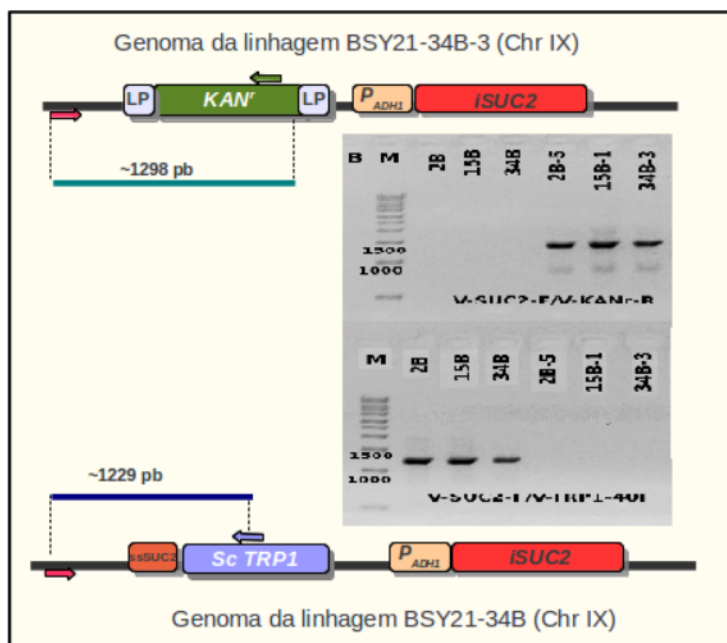


Figura 24 – Confirmação da substituição do gene *TRP1* pelo gene *KanMX*. Linha 1 - BSY21-2B; Linha 2 - BSY21-15B; Linha 3 - BSY21-34B (linha 3); Linha 4 - BSY21-2B5; Linha 5 - BSY21-15B1 e Linha 6 - BSY21-34B3. O marcador de peso molecular aparece na linha 1 (M). A inserção do Módulo 1 nas linhagens modificadas (linhas 4, 5 e 6) foi confirmada por PCR utilizando os iniciadores V-SUC2F (rosa) e V-KANrR (verde), sendo observada uma amplificação de ~1298 pb nestas linhagens, indicando a presença do gene *KanMX* no seus genomas, e ausência de amplificação nas linhagens parentais (linhas 1, 2 e 3). Por outro lado, para confirmar a remoção do gene *TRP1* foram utilizados os iniciadores V-SUC2F e V-TRP1-40F (azul) que amplificou uma banda de ~1229 pb presente somente nas linhagens parentais, e ausência de amplificação nas linhagens modificadas, indicando que o gene *TRP1* foi substituído do genoma das transformantes.

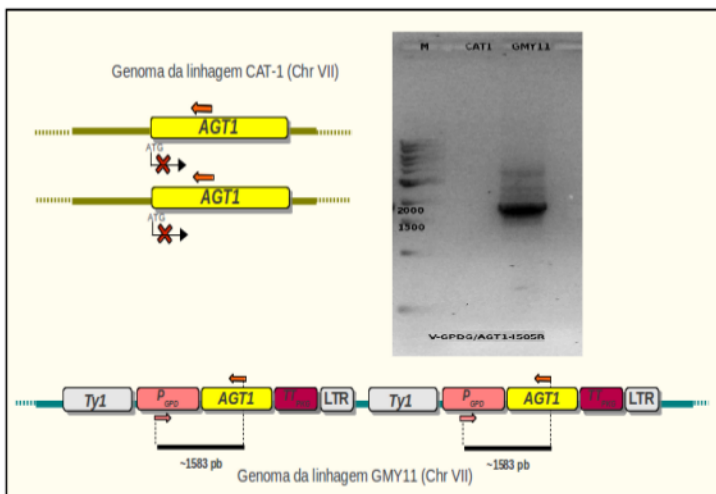
A.2 SOBRE-EXPRESSÃO DO GENE *AGT1* EM MÚLTIPLAS CÓPIAS

Figura 25 – Verificação em gel de agarose a integração do Módulo 4 após amplificação por PCR com os iniciadores V-GPDF (salmão) e AGT1-I505TR (laranja) e o DNA total das linhagens CAT-1 (linha 2) e GMY11 (LINHA 3). Na linha 1 é observado o marcador de peso molecular (M). A amplificação de uma banda de ~1853 pb correspondente ao promotor *GPD* seguido do gene *AGT1*, confirmou a integração do Módulo 4 na linhagem modificada GMY11. A ausência de amplificação na linhagem parental CAT-1, confirma que esta construção não existia nesta linhagem.

A.3 DELEÇÃO DA SEGUNDA CÓPIA DO GENE *SUC2* EM LINHAGENS INDUSTRIAIS *ISUC2*

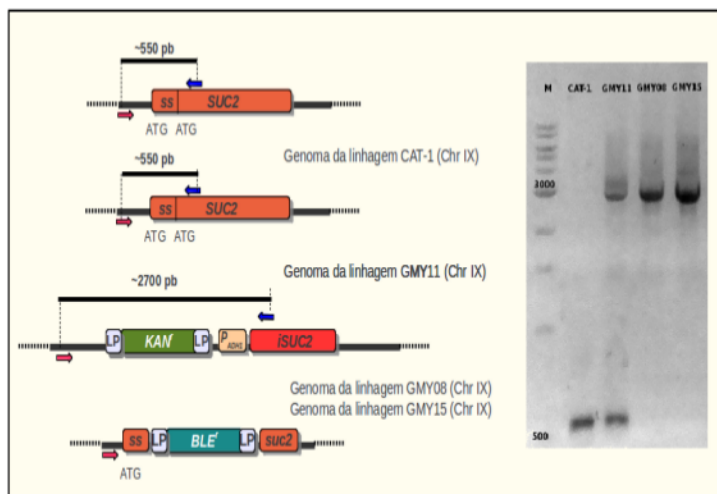


Figura 26 – A verificação em gel de agarose da deleção da segunda cópia do gene *SUC2*, foi realizada após amplificação do loci *SUC2*, utilizando os iniciadores V-*SUC2*F (rosa) e *SUC100*R (azul). No gel podemos observar uma amplificação de ~550 pb, do loci *SUC2* normal, como observado na linhagem CAT-1 (linha 2). Já a linhagem modificada GMY11 (linha 3) (*iSUC2/SUC2*), apresenta a mesma banda de ~550 pb, porém apresenta mais uma amplificação de ~2700 pb referente a cópia modificada *iSUC2*. Nas linhagens modificadas GMY08 (linha 4) e GMY15 (linha 5), não é mais observada a banda referente ao loci *SUC2* normal, indicando que um fragmento deste gene foi removido, enquanto que a amplificação da cópia *iSUC2* aparece como esperado.

A.4 DELEÇÃO DA SEGUNDA CÓPIA DO GENE *SUC2* POR SUBSTITUIÇÃO PELO MÓDULO DE SOBRE-EXPRESSÃO DO GENE *AGT1*

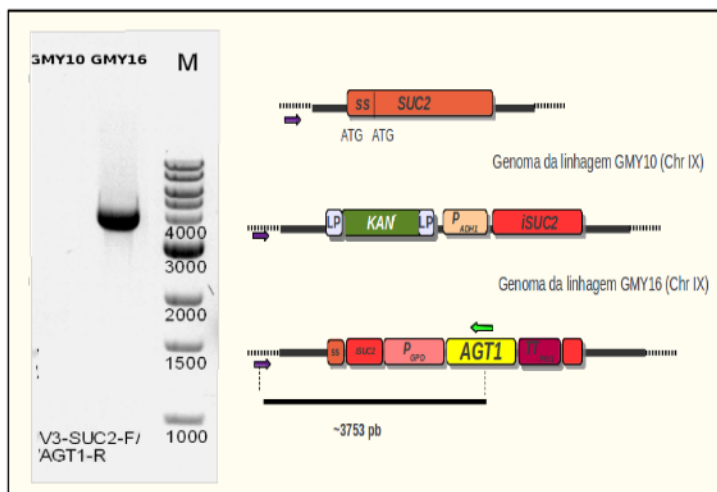


Figura 27 – Verificação em gel de agarose a substituição do gene *SUC2* pelo módulo de sobre-expressão do gene *AGT1* após amplificação do DNA das linhagens GM10 (linha 1) e GMY16 (linha 2) utilizando os iniciadores V3-SUC2F (magenta) e V-AGT1R (verde claro). O marcador de peso molecular está na linha 3 (M). A amplificação de uma banda de ~3753 pb a partir do DNA da linhagem modificada GMY16 confirma a correta integração do Módulo 6 no alelo *SUC2*. Já, utilizando o DNA da linhagem parental GMY10, não é observada amplificação, pois a mesma não possui o gene *AGT1* no *loci SUC2*.

A.5 EXCISÃO DO GENE MARCADOR *BLE^R* NAS LINHAGENS INDUSTRIAIS

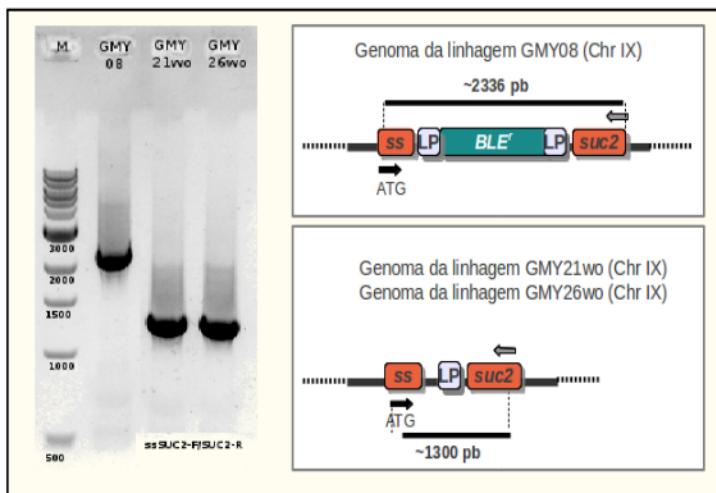


Figura 28 – Verificação em gel de agarose a remoção do gene *ble^r* das linhagens industriais de *S. cerevisiae* utilizando os iniciadores ss-SUC2F (preto) e SUC2-R (cinza). No gel é visualizado o marcador de peso molecular (M - linha 1), a linhagem GMY08 (linha 2) utilizada por apresentar o gene *Ble^r* integrado no seu genoma e as linhagens sem marcadores GMY21wo (linha 3) e GMY26wo (linha 4).