

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

Eduarda Hallal Duval

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E GENOTÍPICA DE CEPAS  
INDUSTRIAIS GENETICAMENTE MODIFICADAS DE  
*SACCHAROMYCES CEREVISIAE***

**Florianópolis/SC  
2011**



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

Eduarda Hallal Duval

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E GENOTÍPICA DE CEPAS  
INDUSTRIAIS GENETICAMENTE MODIFICADAS DE  
*SACCHAROMYCES CEREVISIAE***

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Santa Catarina para obtenção do grau de Doutor em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Boris Ugarte Stambuk

**Florianópolis/SC  
2011**





UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

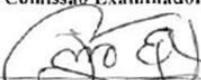
**“Caracterização fenotípica e genotípica de linhagens industriais geneticamente modificadas de *Saccharomyces cerevisiae*.”**

POR

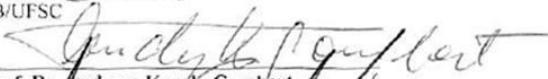
**Eduarda Hallal Duval**

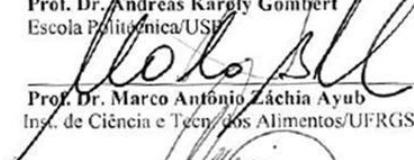
**Tese julgada e aprovada em sua forma final, pelo Orientador e membros da Comissão Examinadora.**

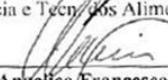
Orientador:

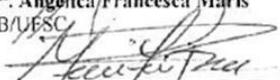
  
Prof. Dr. Boris Juan Carlos Ugarte Stambuk  
BQA/CCB/UFSC

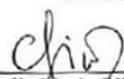
Comissão Examinadora:

  
Prof. Dr. Andreas Karoly Gombert  
Escola Politécnica/USP

  
Prof. Dr. Marco Antônio Láchia Ayub  
Inst. de Ciência e Tecn. dos Alimentos/UFRGS

  
Prof. Dr. Angélica Francesca Maris  
BEG/CCB/UFSC

  
Prof. Dr. Márcio José Rossi  
MIP/CCB/UFSC

  
Prof. Dr. Cláudia Maria Oliveira Simões – CIF/CCS/UFSC  
Coordenadora do Programa de  
Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências/CCB/UFSC  
Florianópolis, Abril de 2011.



**Mais uma vez...**  
**“Gracias a la vida**  
**que me ha dado tanto...”**  
(Violeta Parra)

*“Dedico este trabalho à minha família, meus pais, Eduardo e Rosa e minhas irmãs, Luciana, Marina e Luzia, em quem, mesmo nos momentos distantes, sempre encontrei conforto e segurança para a realização dos meus sonhos e objetivos; em quem sempre pude confiar as tristezas e compartilhar as alegrias; onde a dedicação e os ensinamentos são indispensáveis ao meu crescimento pessoal e profissional..  
- Todas as minhas vitórias pertencem especialmente a vocês!”*



## AGRADECIMENTOS

À Deus, pela minha vida;

À minha família, meus pais, Eduardo e Rosa e às minhas irmãs, Luciana, Marina e Luzia, pelo amor, apoio e dedicação sempre constantes; pela amizade e confiança; pelos sorrisos sempre intensos, pelas palavras e abraços, sempre motivadores, que mesmo distantes, sempre foram meu acalanto;

À amiga Cléia Duarte, pela amizade; por todos esses anos de incansável dedicação;

Ao amigo e orientador, Prof. Dr. Boris Ugarte Stambuk, pela orientação e pelos ensinamentos repassados e, especialmente, pela amizade;

Às amigas Catarina Figueiredo, Débora Trichez, Gabriela Müller e Marcela Purificação pela verdadeira amizade, incentivo e apoio sempre indispensáveis; pelos momentos de risos e descontração, extremamente importantes para a realização desse trabalho;

Às amigas Enis Mazzuco e Luciane Camilotti pelos sorrisos, amizade e carinho, sempre; pelo lar que me proporcionaram mesmo longe da minha família;

Aos amigos e colegas de trabalho do Laboratório de Biologia Molecular e Biotecnologia de Leveduras da UFSC pelo apoio nesses anos de convivência;

Ao Dr. Henrique Amorim da empresa Fermentec Ltda, ao Dr. Marco Antonio de Moraes Junior da Universidade Federal de Pernambuco, ao Dr. Jaime Finguerut do CTC (Centro de Tecnologia Canavieira - Antiga Copersucar) e ao Dr. Carlos A. Rosa da Universidade Federal de Minas Gerais, pelo fornecimento das cepas;

À Universidade Federal de Santa Catarina, em especial ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, que no decorrer destes anos, me proporcionou uma excelente acolhida e permitiu o desenvolvimento deste e de outros trabalhos;

À CAPES e ao CNPq pelas bolsas de doutorado e a FAPESP, FINEP e Usina Cerradinho Açúcar e Álcool Ltda pelo apoio financeiro;

A todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para a minha formação e para a realização deste trabalho, realmente desejando esta conquista, muito obrigada!



## SUMÁRIO

<b>AGRADECIMENTOS</b> .....	9
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	13
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	17
<b>RESUMO</b> .....	19
<b>ABSTRACT</b> .....	21
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	23
1.1. <b>ÁLCOOL COMBUSTÍVEL NO BRASIL</b> .....	24
1.2. <b>UTILIZAÇÃO DE AÇÚCARES POR <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i></b> .....	27
1.3. <b>PROCESSOS INDUSTRIAIS DE PRODUÇÃO DE ÁLCOOL COMBUSTÍVEL</b> .....	35
1.4. <b>DINÂMICA POPULACIONAL EM FERMENTAÇÕES INDUSTRIAIS</b> .....	37
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	41
2.1. <b>OBJETIVO GERAL</b> .....	41
2.2. <b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	41
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	43
3.1. <b>LINHAGENS UTILIZADAS</b> .....	43
3.2. <b>MEIOS DE CULTURA E CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO</b> .....	43
3.2.1. <b>Meios de cultura</b> .....	43
3.2.2. <b>Condições de crescimento</b> .....	45
3.2.3. <b>Cultivos em frascos agitados</b> .....	46
3.2.4. <b>Monitoramento de linhagens em processos fermentativos</b> .	46
3.2.5. <b>Crescimento e dominância em meios contendo vitaminas</b> .	46
3.3. <b>DETERMINAÇÕES ENZIMÁTICAS</b> .....	47
3.3.1. <b>Atividade invertase extracelular</b> .....	47
3.3.2. <b>Atividade invertase total</b> .....	47
3.3.3. <b>Atividade <math>\alpha</math>-glicosidase</b> .....	48
3.4. <b>DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE TRANSPORTE</b> .....	48
3.5. <b>DETERMINAÇÕES BIOQUÍMICAS</b> .....	48
3.5.1. <b>Determinação de açúcares</b> .....	48
3.5.2. <b>Determinação de etanol</b> .....	49
3.6. <b>MODIFICAÇÕES GENÉTICAS</b> .....	50
3.6.1. <b>Construção dos módulos de transformação por PCR</b> .....	51
3.6.2. <b>Transformação de leveduras</b> .....	52
3.6.3. <b>Confirmação das deleções por PCR</b> .....	55

3.7. LOCALIZAÇÃO DOS GENES <i>SUC</i> , <i>MALx1</i> , <i>Kan<sup>r</sup></i> E <i>AGT1</i> NO GENOMA DAS LEVEDURAS .....	55
3.7.1. Eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE) .....	56
3.7.2. Southern blotting .....	58
3.8. REPRODUTIBILIDADE DOS RESULTADOS .....	59
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>60</b>
4.1. METABOLIZAÇÃO DE MALTOSE E MALTOTRIOSE POR LINHAGENS INDUSTRIAIS .....	60
4.2. ANÁLISE DOS GENES <i>MALX1</i> E <i>AGT1</i> NO GENOMA DAS LINHAGENS INDUSTRIAIS .....	64
4.3. ANÁLISE DOS GENES <i>SUC</i> NO GENOMA DAS LINHAGENS INDUSTRIAIS .....	68
4.4. SUBSTITUIÇÃO DO GENE <i>SUC2</i> NA CEPA INDUSTRIAL CAT-1 .....	70
4.5. CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DA LINHAGEM INDUSTRIAL EHD-04 DELETADA EM UMA CÓPIA DO GENE <i>SUC2</i> .....	75
4.6. CRESCIMENTO E DOMINÂNCIA EM MEIOS CONTENDO VITAMINAS B1 E B6 .....	80
4.7. DESENVOLVIMENTO DE NOVOS MÓDULOS DE TRANSFORMAÇÃO DO GENE <i>SUC2</i> .....	82
<b>5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS .....</b>	<b>93</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>95</b>
<b>APÊNDICE .....</b>	<b>113</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Vendas internas no atacado de automóveis movidos à gasolina, álcool e <i>flex fuel</i> no Brasil .....	25
<b>Figura 2:</b> Evolução da exportação brasileira de álcool combustível .....	26
<b>Figura 3:</b> Vias de utilização dos açúcares por <i>S. cerevisiae</i> .....	28
<b>Figura 4:</b> Vias de utilização da sacarose por <i>S. cerevisiae</i> .....	30
<b>Figura 5:</b> Estrutura dos genes <i>SUC</i> e síntese das formas intra- e extracelular da invertase em <i>S. cerevisiae</i> .....	31
<b>Figura 6:</b> Organização e controle da expressão dos genes <i>MAL</i> .....	32
<b>Figura 7:</b> Estratégia para substituição do gene <i>SUC2</i> .....	52
<b>Figura 8:</b> Metabolização de maltose pelas cepas industriais .....	60
<b>Figura 9:</b> Metabolização de maltotriose pelas cepas CAT-1, PE-2 e VR-1 .....	62
<b>Figura 10:</b> Metabolização de maltotriose pelas cepas UFMG-1007 e UFPE-178 .....	63
<b>Figura 11:</b> Inibição do crescimento em maltotriose por antimicina A .....	65
<b>Figura 12:</b> Detecção dos genes <i>MALx1</i> e <i>AGT1</i> no genoma das leveduras .....	67
<b>Figura 13:</b> Detecção dos genes <i>SUC</i> no genoma das linhagens .....	69
<b>Figura 14:</b> Estratégia para construção do módulo de transformação da linhagem industrial CAT-1 .....	71

<b>Figura 15:</b> Confirmação da presença do gene <i>SUC2</i> no genoma da linhagem EHD-04 transformada .....	73
<b>Figura 16:</b> Confirmação da presença dos genes <i>SUC2</i> e <i>Kan<sup>r</sup></i> no genoma da linhagem EHD-04 transformada .....	74
<b>Figura 17:</b> Detecção dos genes <i>SUC2</i> e <i>Kan<sup>r</sup></i> no genoma das leveduras industriais transformadas .....	76
<b>Figura 18:</b> Atividade invertase nas linhagens industriais .....	77
<b>Figura 19:</b> Cultivo em frascos agitados em 20 g/L de sacarose ...	78
<b>Figura 20:</b> Cultivo em frascos agitados em ~200 g/L de sacarose .....	79
<b>Figura 21:</b> Competição entre as cepas diplóides de laboratório GSY-157 e industrial geneticamente modificada EHD-04 .....	81
<b>Figura 22:</b> Competição entre as cepas GSY-157 e EHD-04 em meio sintético definido contendo diferentes vitaminas .....	82
<b>Figura 23:</b> Substituição do gene <i>SUC2</i> com o módulo contendo o gene <i>AGT1</i> sobreexpresso .....	83
<b>Figura 24:</b> Confirmação da ausência do gene <i>SUC2</i> no genoma da linhagem EGY-01 .....	85
<b>Figura 25:</b> Confirmação da presença do gene <i>AGT1</i> no genoma da linhagem EGY-01 .....	86
<b>Figura 26:</b> Confirmação da inserção correta do gene <i>AGT1</i> no genoma da linhagem EGY-01 .....	87
<b>Figura 27:</b> Atividade invertase periplasmática e do transportador <i>AGT1</i> na linhagem modificada EGY-01 .....	88
<b>Figura 28:</b> Atividade $\alpha$ -glicosidase na linhagem modificada EGY-01 .....	88

**Figura 29:** Cultivo em frascos agitados em 20 g/L de sacarose  
pela cepa modificada EGY-01 ..... **89**

**Figura 30:** Cultivo em frascos agitados em ~200 g/L de sacarose  
pela cepa modificada EGY-01 ..... **90**



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Linhagens utilizadas neste trabalho .....	<b>44</b>
<b>Tabela 2:</b> Plasmídeos utilizados .....	<b>51</b>
<b>Tabela 3:</b> Iniciadores utilizados .....	<b>53</b>
<b>Tabela 4:</b> Produtos de PCR esperados para confirmar a correta inserção dos fragmentos de DNA nas linhagens transformantes e suas parentais .....	<b>56</b>



## RESUMO

DUVAL, E.H. (2011) **Caracterização fenotípica e genotípica de cepas industriais geneticamente modificadas de *Saccharomyces cerevisiae***. Tese de doutorado. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal de Santa Catarina.

Leveduras *Saccharomyces* têm sido utilizadas em processos biotecnológicos para produção de etanol, graças à capacidade de adaptação ao ambiente industrial e à habilidade de fermentar açúcares. Com o intuito de otimizar o processo fermentativo de produção de álcool combustível, foi realizada a caracterização fenotípica e genotípica de linhagens industriais produtoras de etanol combustível no Brasil. Todas as cepas analisadas apresentaram capacidade de utilizar e fermentar maltose, indicando funcionalidade dos genes *MAL*. Em relação à utilização de maltotriose vários fenótipos foram observados. Algumas cepas apresentaram utilização lenta ou tardia deste açúcar, enquanto que outras foram incapazes de utilizar esta fonte de carbono. Todas as cepas apresentaram apenas o gene *SUC2* no cromossomo IX, além de vários genes *MALx1* no genoma. Enquanto que algumas linhagens não apresentaram o gene *AGT1* no genoma, outras apresentaram pelo menos uma cópia no cromossomo VII, embora este gene, aparentemente, não seja funcional nestas linhagens industriais. Após substituição de uma cópia do gene *SUC2* do genoma diplóide da levedura industrial CAT-1 com um módulo de transformação contendo um gene marcador (KanMX6), obtido do genoma de uma levedura de laboratório já modificada, verificou-se que a linhagem geneticamente modificada EDH-04 apresentava aproximadamente metade da atividade invertase, mas continuava consumindo e fermentando a sacarose do meio como sua parental, indicando que a atividade invertase não é o fator limitante na fermentação deste açúcar. A seguir, foi desenvolvido um novo módulo de transformação para substituir o gene *SUC2* do genoma de leveduras utilizando o gene *AGT1* (sob controle de um promotor constitutivo) como marcador. Espera-se que esta estratégia, incluindo o uso de regiões flanqueadoras longas, permita obter linhagens industriais brasileiras utilizadas na produção de álcool combustível sem atividade invertase, porém com transporte e hidrólise intracelular do açúcar pelas células, permitindo eficiente fermentação de sacarose por *S. cerevisiae*.



## ABSTRACT

DUVAL, E.H. (2011) **Phenotypic and genotypic characterization of genetically modified industrial strains of *Saccharomyces cerevisiae***. PhD Thesis. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal de Santa Catarina.

*Saccharomyces* yeasts have been widely used in diverse biotechnological process for ethanol production, due to its adaptability to the industrial environment and the ability to ferment sugars. In order to optimize the fermentation process for fuel ethanol production, we performed a phenotypic and genotypic characterization of several industrial yeast strains that produce fuel ethanol in Brazil. All analyzed strains had the ability to use and ferment maltose, indicating functionality of the *MAL* genes. Regarding the utilization of maltotriose, several phenotypes were observed. Some strains showed slow or delayed utilization of this sugar, while other strains were unable to utilize this carbon source. All strains showed only the *SUC2* gene in chromosome IX, besides several *MALx1* genes in their genome. While some strains did not had the *AGT1* gene in their genome, others presented at least one copy in chromosome VII, although this gene is, apparently, not functional in these industrial strains. After the deletion of one copy of the *SUC2* gene from the diploid genome of the industrial yeast CAT1 with a transformation module containing a marker gene (KanMX6), obtained from a previous modified laboratory yeast, it was observed that the genetically modified EDH-04 strain had approximately half of the invertase activity, but continued to consume and ferment sucrose as the wild type strain, indicating that invertase activity is not a limiting factor for the fermentation of this sugar. Next, a new genetic modifying module was developed to delete the *SUC2* gene from the genome of yeasts utilizing the *AGT1* gene (under control of a constitutive promoter) as marker. It is expected that this strategy, including the use of long flanking regions to facilitate homologous recombination in industrial yeasts, will allow to obtain brazilian industrial strains used for fuel ethanol production that lack invertase activity, but with transport and intracellular hydrolysis of the sugar by the cells, allowing efficient fermentation of sucrose by *S. cerevisiae*.



## 1 INTRODUÇÃO

Leveduras, principalmente do gênero *Saccharomyces*, têm sido amplamente utilizadas em diversos processos biotecnológicos para produção de bebidas alcoólicas, produtos de panificação e etanol combustível, entre outros (Ingledeew, 1993). Sua utilização se deve à capacidade, apresentada por estas leveduras, de se adaptar e dominar o ambiente devido à habilidade de fermentar os açúcares presentes no meio, produzindo etanol, mesmo na presença de oxigênio (de Deken, 1966; Barford & Hall, 1979). 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 (Querol & Bond, 2009). 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 ricos em sacarose, como é o caso de caldo-de-cana e melaço (Wheals *et al.*, 1999; Zanin *et al.*, 2000; Schwan *et al.*, 2001).

O Brasil é o maior produtor e beneficiador de cana-de-açúcar do mundo, sendo responsável por 20% da produção mundial de açúcar. No ano de 2008, a produção brasileira de cana-de-açúcar totalizou 648,85 milhões de toneladas (Brasil, 2008), permitindo que na safra de 2008/2009 fossem produzidos 27,6 bilhões de litros de álcool. Porém, na safra de 2009/2010, esta produção caiu para 25,7 bilhões de litros de álcool, dos quais 7 bilhões de litros foram de álcool anidro e 18,7 bilhões de litros de álcool hidratado (Brasil, 2011).

Atualmente, são utilizados mostos (caldo-de-cana e melaço) contendo entre 150-200 g/L 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. Esse procedimento é realizado várias vezes consecutivas. Os processos de fermentação em batelada representam em torno de 75% das destilarias do país e podem

atingir em torno de 92% de conversão dos açúcares até etanol. Este é o principal objetivo na produção de álcool combustível e requer leveduras capazes de produzir altas concentrações de etanol durante as fermentações (Wheals *et al.*, 1999). Já na produção de bebidas alcoólicas e panificação, buscam-se leveduras que fermentem produzindo, além do álcool, outros compostos com funções organolépticas.

## 1.1 Álcool combustível no Brasil

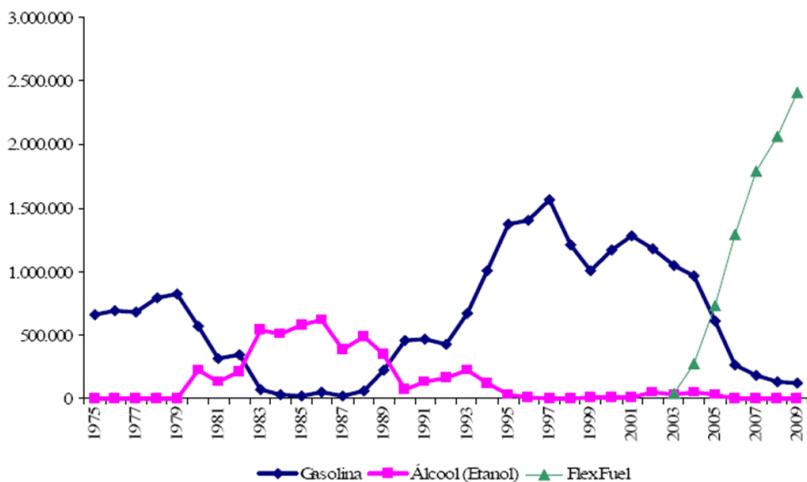
Mesmo após muito tempo de convívio com a indústria canavieira, apenas no século XX o Brasil descobriu o álcool (etanol) como uma opção energética interessante. Em 1920, várias agroindústrias sucroalcooleiras realizaram experimentos tentando promover o álcool como combustível no Brasil, o que passou a se tornar uma prática comum nas usinas. Em 1927, uma usina de Alagoas lançou o álcool-motor “USGA” (75% etanol e 25% éter), que logo em seguida foi copiado por várias outras indústrias. Em 1931, através do Decreto nº 19.717, o governo tornou obrigatória a mistura de álcool à gasolina importada e consumida no país, em uma proporção inicial de 5%. Já, em 1938, o Decreto-Lei obrigou a adição de 5% de álcool também à gasolina produzida no Brasil, promovendo a implantação da primeira refinaria nacional de petróleo (Brasil, 2011).

Em 1970, com a crise internacional do petróleo, novas alternativas foram buscadas como fonte de energia. Foi escolhido o etanol, considerado como substituto adequado à gasolina, pois havia no país várias indústrias com potencial para produção em grande escala, pela facilidade na ampliação do cultivo de cana-de-açúcar (principal substrato para a fermentação). Além disso, e principalmente, o etanol é fonte renovável de energia menos poluente que outros combustíveis alternativos. Nesse momento, o governo federal decidiu implementar fontes alternativas ao petróleo importado e o uso eficiente da energia, criando vários programas, entre eles o Programa Nacional do Álcool – PROÁLCOOL (Decreto 76.593 de 14/11/1975).

O álcool combustível passou a ser usado de duas formas no Brasil: adicionado a gasolina em teores de até 25% de álcool anidro e, como álcool puro, na forma de álcool hidratado. Historicamente, o setor sucroalcooleiro está entre as mais tradicionais indústrias não extrativas de manipulação e processamento da biomassa no país. Vários países produzem álcool combustível, mas o nosso país é o maior produtor usando cana-de-açúcar como substrato para

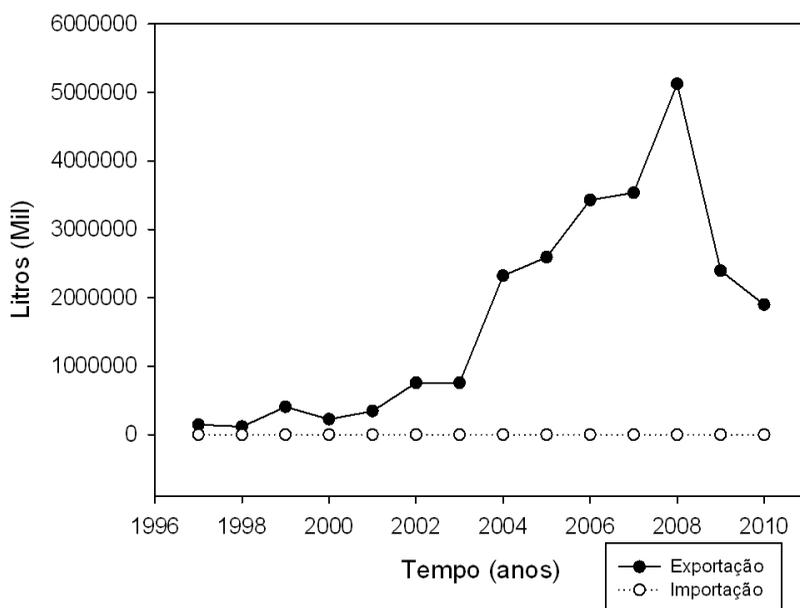
fermentação e o único a utilizar álcool em larga escala na sua frota automotiva (Brasil, 2011). Decorrente da política de governo e incentivos fiscais, nos anos 80 ocorreu um significativo incremento na frota de veículos movidos exclusivamente a álcool (Figura 1). Entretanto, nos anos 90 o governo parou os incentivos fiscais, o que provocou uma crise no setor e uma mudança no perfil do consumidor, o qual passou a adquirir novamente os carros movidos à gasolina. Esta tendência mudou no início deste século, principalmente após as guerras no Iraque e Afeganistão, que provocaram nova crise internacional no mercado de petróleo (UNICA, 2011).

A maior demanda do álcool combustível atualmente se dá pelo incremento na frota de veículos movidos à gasolina, uma vez que, adiciona-se a este combustível de 22 a 26% de etanol. Além disso, a tecnologia introduzida em 2003, dos motores *flex fuel*, incrementou bastante essa demanda. Esses veículos, capazes de funcionar com qualquer mistura álcool-gasolina, conquistaram rapidamente o consumidor e representam hoje, 95% dos veículos produzidos no país (Figura 1). Atualmente, os biocombustíveis abastecem cerca de 50% do total de automóveis e comerciais leves, enquanto que a participação daqueles movidos à gasolina está em torno de 43% (ANFAVEA, 2010).



**Figura 1: Vendas internas no atacado de automóveis movidos à gasolina, álcool e flex fuel no Brasil.** Dados correspondem ao período de 1975 a 2009 (ANFAVEA, 2010)

O Brasil vem trabalhando não só no sentido de aumentar sua produção de álcool etílico para fins carburantes, a partir de cana-de-açúcar, como também de transferir experiência e tecnologia para que outros países tropicais, que dispõem de terras e mão-de-obra, possam ser produtores e exportadores de álcool. O Brasil era o maior produtor de bioetanol no mundo, superado atualmente pelos EUA, mas ainda se apresenta como maior exportador mundial deste produto (Figura 2), gerando mais de 600.000 empregos diretos (Amorim *et al.*, 2004a; Valdes, 2007). Juntos, esses dois países são responsáveis por 70% da produção mundial.



**Figura 2: Evolução da exportação brasileira de álcool combustível.** Os dados apresentados correspondem ao período de 1996 a 2010 (Brasil, 2011).

O Brasil exporta álcool combustível para países como Japão, Jamaica, Nigéria, Coreia do Sul, Suécia, Países Baixos, Costa Rica, El Salvador e México, sendo os Estados Unidos da América os grandes importadores do álcool brasileiro (313 milhões de litros em 2010). Empresas brasileiras, buscando superar barreiras alfandegárias, também exportam para países da América Central e Caribe, etanol hidratado o qual é reindustrializado e exportado para

os EUA. Em 2009, os países da União Européia importaram do Brasil cerca de 876 milhões de litros de álcool. Em 2010, o Brasil exportou cerca de 1,9 bilhões de litros de álcool, volume 42,2% inferior ao de 2009 (Figura 2). As receitas obtidas com as exportações de álcool em 2010 foram de 1 bilhão de dólares, uma redução de 24% em relação a 2009 devido, principalmente, às barreiras alfandegárias adotadas por alguns países (Brasil, 2011).

De qualquer forma, nos últimos anos a produção mundial de álcool tem aumentado significativamente, chegando a aproximadamente 50 bilhões de litros. Isto se deve às preocupações na matriz energética e políticas ambientais adotadas por vários países, o que faz com que atualmente 70% do etanol produzido no mundo seja utilizado como combustível (Farrell *et al.*, 2006; Hill *et al.*, 2006; Richard, 2006; UNICA, 2011). Esta tecnologia já é implementada em diversos países da Comunidade Européia, nos Estados Unidos da América, México, Índia, Argentina, Japão entre outros, principalmente pelos benefícios estratégicos e ambientais que representa (Wyman, 1999; Farrel *et al.*, 2006; Hill *et al.*, 2006). Grandes investimentos estão sendo realizados para viabilizar a produção de álcool a partir de celulose.

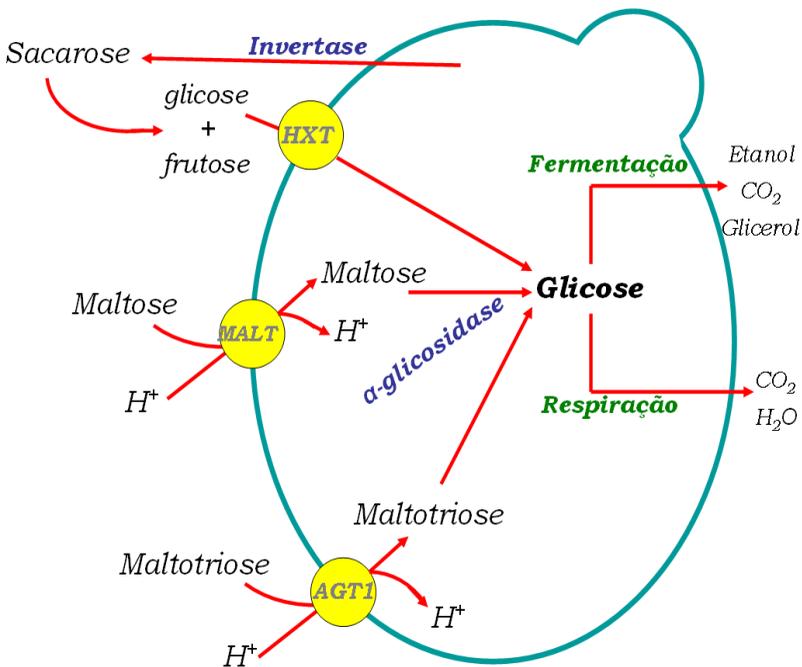
Devido a estes fatores, nos próximos anos a demanda internacional por este produto sofrerá um forte incremento, trazendo inúmeras oportunidades para a indústria sucroalcooleira no Brasil. Para isso, será necessário um aumento na produção e, principalmente, na eficiência do processo, a fim de não elevar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

## **1.2 Utilização de açúcares por *Saccharomyces cerevisiae***

Para que ocorra a fermentação, utilização dos açúcares com produção de etanol, inicialmente é necessário que ocorra o transporte dessas moléculas para o interior da célula da levedura. Sempre que as leveduras são crescidas na presença de oxigênio e em baixas concentrações de açúcares, a captação dos açúcares é bastante lenta, permitindo que o complexo da enzima piruvato desidrogenase direcione o fluxo de carbono para a respiração. Já na ausência de oxigênio ou em altas concentrações de açúcares, a captação eficiente do açúcar aumenta o fluxo glicolítico e permite que a enzima piruvato descarboxilase metabolize o carbono excedente para a fermentação (Rolland *et al.*, 2002).

Os monossacarídeos (glicose, frutose, manose, galactose, etc) são transportados para o interior da célula via difusão facilitada por transportadores de hexoses, os quais são codificados pelos genes

*GAL2* e *HXT*, uma família de aproximadamente 20 genes em *S. cerevisiae* que codificam permeases com afinidades diversas pelos açúcares (Diderich *et al.*, 1999). No caso dos  $\alpha$ -glicosídeos maltose e maltotriose, um dissacarídeo e um trissacarídeo de glicose unidos por ligação osídica  $\alpha$ 1-4, respectivamente, a internalização ocorre através da membrana, sendo mediada por sistemas de transporte ativo com co-transporte de prótons (Figura 3) e, posteriormente, hidrólise no citoplasma da célula através da enzima maltase ( $\alpha$ -glicosidase). Como conseqüência, moléculas de glicose são liberadas e metabolizadas através da via glicolítica (Novak *et al.*, 2004; Alves Jr *et al.*, 2007).



**Figura 3: Vias de utilização dos açúcares por *S. cerevisiae*.** Os monossacarídeos são captados via difusão facilitada, enquanto que di- e trissacarídeos são transportados ativamente para o interior da célula. A hidrólise ocorre através das enzimas invertase e/ou  $\alpha$ -glicosidase, e a fermentação ou respiração dos açúcares depende, entre vários fatores, da velocidade de captação dos açúcares e do fluxo glicolítico.

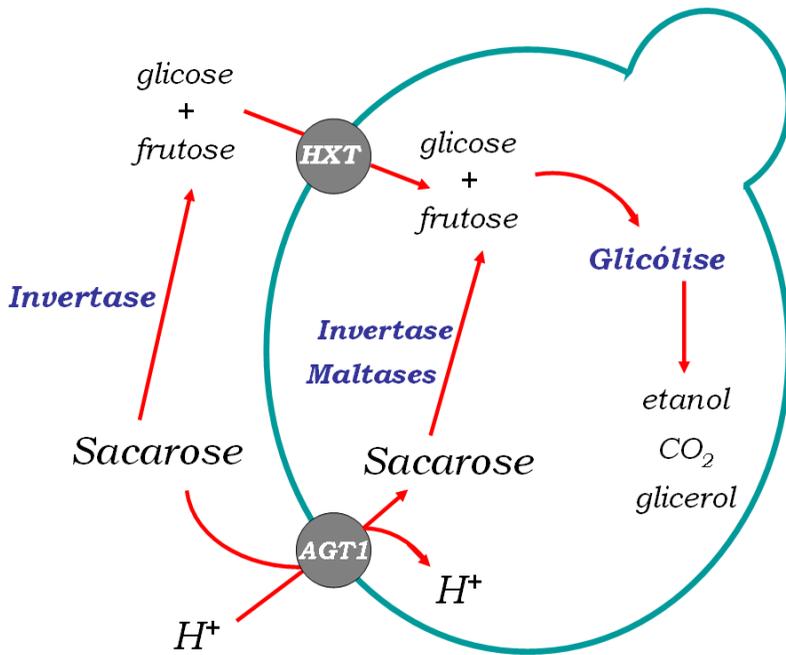
Na fabricação de etanol combustível e cachaça no Brasil, o principal açúcar encontrado no caldo de cana-de-açúcar é a sacarose. Para a utilização de sacarose pelas leveduras, um dissacarídeo formado pelos monossacarídeos glicose e frutose unidos por uma ligação osídica de conformação  $\text{Glc}\alpha 1\text{-}\beta 2\text{Fru}$ , a principal via de metabolização é mediada por uma enzima extracelular (ou periplasmática) denominada invertase ( $\beta$ -D-frutosidase), que hidrolisa o açúcar presente no meio formando glicose e frutose. Esses produtos de hidrólise são captados para o interior da célula pelas permeases *HXT*, e posteriormente metabolizados até etanol,  $\text{CO}_2$  e glicerol através da via glicolítica (Figura 3).

Entretanto, este dissacarídeo também pode ser internalizado através de transporte ativo, por um sistema de co-transporte com prótons (Orlowski & Barford, 1991; Barford *et al.*, 1992; Mwesigye & Barford, 1996; Stambuk *et al.*, 2000). Neste caso, o açúcar é transportado para o interior da célula e hidrolisado no citoplasma pela enzima invertase intracelular (citoplasmática), ou ainda pelas maltases ( $\alpha$ -glicosidases) que também são capazes de hidrolisar sacarose (Kahn *et al.*, 1973; Badotti *et al.*, 2006; 2008). Posteriormente, os produtos de hidrólise (glicose e frutose) são metabolizados pela via glicolítica (Figura 4).

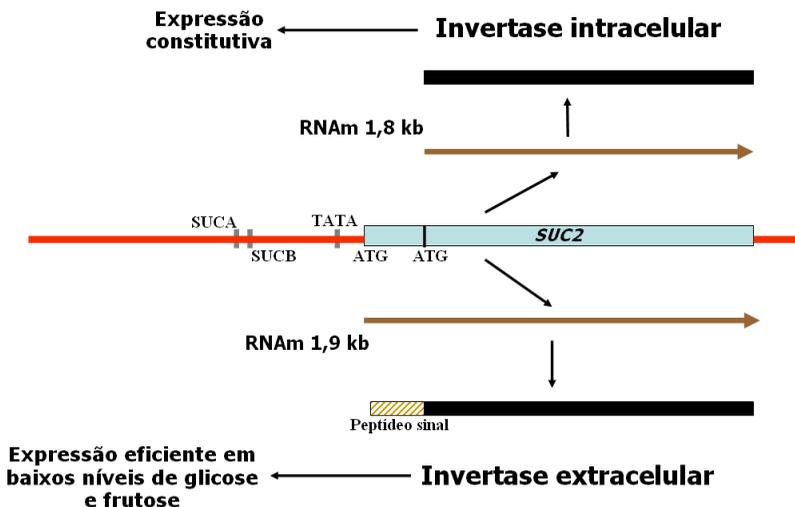
Segundo Carlson & Botstein (1983), a invertase pode ser codificada por qualquer um dos seis genes *SUC* (*SUC1* - *SUC5* e *SUC7*). Todos os genes *SUC*, exceto *SUC2*, estão posicionados em regiões teloméricas de vários cromossomas: *SUC1* encontra-se no cromossoma VII, *SUC3* no cromossoma II, *SUC4* no cromossoma XIII, *SUC5* no cromossoma IV e *SUC7* no cromossoma VIII. O gene *SUC2* está localizado no final do cromossoma IX, porém em uma região não telomérica. Este gene é considerado o locus ancestral dos genes *SUC*, uma vez que toda linhagem de *Saccharomyces* possui este gene no seu genoma (Naumov *et al.*, 1996; Korshunova *et al.*, 2005). Mais recentemente foram descritos novos genes *SUC* teloméricos, sendo os genes *SUC8*, localizado no cromossoma X, *SUC9* no cromossoma XIV e *SUC10* no cromossoma XVI ou XIII (Naumov e Naumova, 2010a; 2010b).

A partir desses genes, dois tipos de RNAs mensageiros são transcritos (Carlson & Botstein, 1982). Um transcrito maior (1,9 Kb), contendo uma sequência que codifica um peptídeo sinal formado por 20 aminoácidos, o qual é responsável por direcionar a enzima para o retículo endoplasmático rugoso e promover sua secreção para fora da célula (espaço periplasmático) e um transcrito menor (1,8 Kb) constitutivo, sem a sequência sinalizadora, que permite a

síntese de uma enzima retida no interior da célula (Figura 5). Embora a sequência destas proteínas seja idêntica (o peptídeo sinal é removido durante a secreção), o peso molecular da forma intracelular é de 135 kDa e superior a 270 kDa na forma periplasmática. Essa diferença de massa se deve a glicosilações que ocorrem na forma extracelular, durante a síntese e tráfego pela via secretória das células. Ambas as enzimas possuem pH ótimo em torno de 4,6-5,0, temperatura ótima igual a 30°C e  $K_m$  para sacarose como substrato de 25,6 mM (Gascón *et al.*, 1968; Andjelkovic *et al.*, 2010).



**Figura 4: Vias de utilização de sacarose por *S. cerevisiae*.** A sacarose pode ser hidrolisada no meio extracelular, com posterior internalização dos produtos (glicose e frutose), pela invertase periplasmática, ou o açúcar pode ser transportado ativamente para o interior da célula, onde é hidrolisado pela invertase intracelular e/ou maltases.



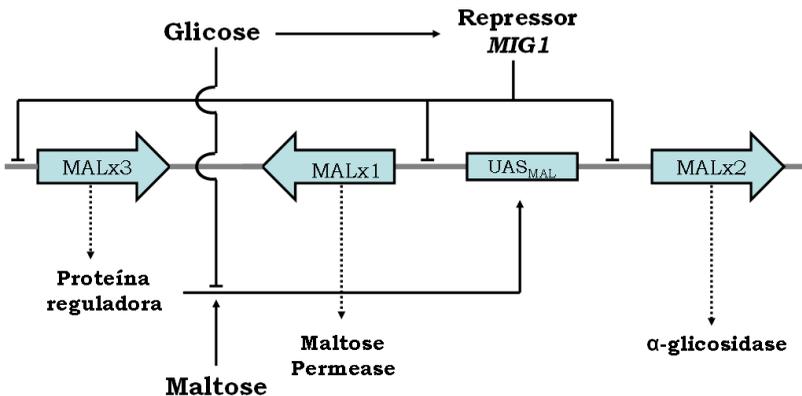
**Figura 5: Estrutura dos genes *SUC* e síntese das formas intra- e extracelular da invertase em *S. cerevisiae*.** A partir do gene *SUC2* são transcritos dois tipos de RNA mensageiros: um transcrito menor que codifica para invertase intracelular sintetizada a partir do segundo códon ATG, e um maior contendo o peptídeo sinal que direciona a enzima para o meio extracelular. As regiões SUCA e SUCB regulam a expressão do transcrito maior.

A expressão da invertase extracelular requer baixas concentrações de açúcar, pois altas concentrações de sacarose ou seus produtos de hidrólise reprimem sua expressão, enquanto que a forma intracelular é expressa constitutivamente (Ozcan *et al.*, 1997; Dynesen *et al.*, 1998; Herwig *et al.*, 2001; Haq *et al.*, 2003). Embora já tenham sido caracterizados vários fatores de transcrição (p.ex. *MIG1*, *MIG2*) envolvidos na repressão dos genes *SUC*, as proteínas envolvidas na ativação da transcrição ainda são desconhecidas (Klein *et al.*, 1996; Belinchón e Gancedo, 2007).

Como citado anteriormente, a sacarose pode também ser internalizada através de um co-transporte com prótons. Segundo estudos descritos por Stambuk e colaboradores (1999), esse sistema de transporte ativo é mediado por uma permease codificada pelo gene *AGT1* (*Alpha-Glucoside Transporter*), a qual realiza o transporte de sacarose e trealose com alta afinidade ( $K_m \sim 7$  mM) e

maltose, maltotriose e  $\alpha$ -metil-glicosídeo com baixa afinidade ( $K_m$ , 20-50 mM) (Stambuk *et al.*, 2000; Stambuk & de Araújo, 2001).

Estudos anteriores identificaram o gene *AGT1* de *S. cerevisiae* como pertencente à família dos genes *MAL* (Han *et al.*, 1995). Esses genes são encontrados em cinco diferentes loci, sendo que cada locus está localizado na região telomérica de cromossomos distintos: *MAL1* (cromossomo VII), *MAL2* (cromossomo III), *MAL3* (cromossomo II), *MAL4* (cromossomo XI) e *MAL6* (cromossomo VIII). Em cada um desses loci podem ser encontrados três diferentes genes (Figura 6), os quais codificam três diferentes proteínas. O gene *MALT* ou *MALx1* (onde *x* representa o locus) codifica o transportador de maltose, o gene *MALS* ou *MALx2* codifica a maltase, responsável pela hidrólise intracelular do açúcar e o gene *MALR* ou *MALx3* codifica uma proteína reguladora responsável pela indução da expressão dos demais genes *MAL*. Para que ocorra a utilização da maltose por uma cepa de *S. cerevisiae*, é necessário a presença de apenas uma cópia dos genes *MALx1*, *MALx2* e *MALx3*, que podem estar presentes em um único locus *MAL*, ou em loci *MAL* parcialmente funcionais contendo apenas alguns dos genes *MAL* (Needleman, 1991; Novak *et al.*, 2004).



**Figura 6: Organização e controle da expressão dos genes *MAL*.** As setas largas indicam a organização cromossômica dos genes *MAL*, setas pontilhadas indicam os produtos da transcrição e tradução, as setas contínuas indicam indução, e as linhas contínuas com ponta romba indicam repressão (Stambuk, 1999).

Além dos 5 loci *MAL* citados anteriormente, existem 3 tipos de loci parcialmente funcionais (*malp*, *malg* e *mal<sup>o</sup>*). As cepas de leveduras que são incapazes de fermentar maltose geralmente possuem um desses loci. O locus *malp* possui apenas o gene regulador *MALx3*, o locus *mal<sup>o</sup>* possui apenas o gene para a  $\alpha$ -glicosidase e, quando apenas o gene regulador *MALx3* está ausente, recebe a denominação *malg* (Naumov *et al.*, 1994). Este é o caso do locus *mal1g*, onde é normalmente encontrado o gene *AGT1*, alelo natural dos transportadores de maltose codificados pelos genes *MALx1*. Embora seja um transportador com especificidade distinta quando comparado aos transportadores de maltose codificados pelos genes *MALx1* (específicos para maltose e turanose), a permease *AGT1* é aparentemente regulada pelos mesmos mecanismos de regulação gênica dos demais genes *MAL*, pois possui uma sequência  $UAS_{MAL}$  na sua região promotora. Assim, na presença de maltose ou outros  $\alpha$ -glicosídeos, a proteína reguladora se liga a região  $UAS_{MAL}$  presente entre os genes *MALx1* e *MALx2*, induzindo a transcrição da proteína transportadora e da  $\alpha$ -glicosidase (Figura 6). Porém, na presença de glicose, o repressor *MIG1* é ativado, se ligando à região promotora e impedindo a transcrição dos genes (revisto por Needleman, 1991; Novak *et al.*, 2004). Normalmente a expressão do gene *AGT1* requer a presença de maltose e/ou outros  $\alpha$ -glucosídeos no meio de cultivo, ou então a presença de um regulador *MALx3<sup>c</sup>* constitutivo (Han *et al.*, 1995).

Na indústria cervejeira, maltose e maltotriose são os dois açúcares predominantes no mosto (50-60% de maltose e 15-20% de maltotriose), seguidos de glicose (10-15%), frutose (2-5%) e outros carboidratos (Willaert, 2001). Embora os dois primeiros açúcares apareçam em maiores quantidades como substrato para a fermentação, a glicose é preferida pelas células, sendo prontamente utilizada pelas leveduras. Após a utilização de pelo menos metade da glicose presente no meio, as leveduras iniciam o consumo de maltose e maltotriose, porém com uma velocidade de consumo bem mais lenta para maltotriose do que para maltose (Zheng *et al.*, 1994b). Para a eficiência do processo e qualidade do produto, os açúcares do mosto devem ser fermentados completamente, incluindo maltose e maltotriose, pois sua lenta e incompleta fermentação representa uma perda econômica significativa para as indústrias, gerando cervejas com elevado conteúdo de açúcares fermentáveis e sabor atípico (Zheng *et al.* 1994b; Yoon *et al.* 2003).

O transporte de maltose nas células é necessário para a completa indução dos genes *MAL*. Vários estudos têm também

mostrado que o transporte desse açúcar é o passo limitante para a fermentação (Kodama *et al.* 1995; Wang *et al.* 2002; Rautio & Londesborough, 2003). Esse transporte vem sendo extensivamente estudado tanto em cepas de laboratório como em cepas industriais, revelando a presença de transportadores de alta e baixa afinidade (Crumplen *et al.*, 1996; Zastrow *et al.*, 2001; Rautio & Londesborough, 2003), o que justifica a existência de leveduras com distintos fenótipos de crescimento nestas fontes de carbono.

Estudos iniciais sobre a utilização de maltotriose pelas leveduras relatam que maltose e maltotriose são aparentemente transportadas por diferentes permeases e indicam a possibilidade de haver um transportador específico para maltotriose (Zheng *et al.*, 1994a; Zastrow *et al.*, 2001). Como já descrito anteriormente, são conhecidos dois genes que codificam transportadores de maltose e maltotriose em *S. cerevisiae*. O gene *AGT1* codifica uma permease que transporta maltose e maltotriose com baixa afinidade quando comparado aos transportadores *MALx1* que transportam maltose com alta ( $K_m \sim 2-5$  mM) afinidade (Stambuk *et al.*, 2000; Alves Jr. *et al.*, 2007; 2008). Em *S. pastorianus*, um híbrido natural de *S. cerevisiae* e *S. bayanus*, utilizado na produção de cervejas do tipo *lager*, o gene *MTY1* (também conhecido como *MTT1*) codifica para uma permease que transporta maltotriose também com baixa afinidade ( $K_m \sim 20$  mM) porém, apresenta maior afinidade por este açúcar do que pela maltose ( $K_m \sim 70$  mM) e outros  $\alpha$ -glicosídeos (Salema-Oom *et al.*, 2005; Dietvorst *et al.*, 2005). Além desses transportadores, Day e colaboradores (2002a; 2002b) mostraram que os genes *MPH2* e *MPH3* também codificam permeases capazes de transportar este açúcar.

Algumas cepas industriais são capazes de crescer utilizando maltotriose como fonte de carbono apesar de não fermentarem o açúcar, através do metabolismo respiratório (Zastrow *et al.*, 2000). O isolamento e a caracterização de cepas capazes de fermentar a maltotriose permitiram identificar o transporte desse açúcar através da membrana plasmática das células como sendo o passo limitante na sua fermentação (Zastrow *et al.*, 2001). Em relação à maltotriose não se sabe com clareza o que é responsável (maltotriose e/ou maltose obtida da hidrólise parcial da primeira) pela indução da expressão dos genes responsáveis pela sua internalização.

Considerando que a sacarose pode também ser hidrolisada por outras glicosidases intracelulares, como a maltase ( $\alpha$ -glicosidase), que tem a mesma afinidade e atividade com sacarose e maltose (Kahn *et al.*, 1973), o transporte ativo desse açúcar justificaria a existência da invertase intracelular constitutiva. Estes

dados apontam uma inesperada interrelação metabólica entre a utilização de maltose e sacarose em *S. cerevisiae*, o que pode ser explorado para otimizar a produção de etanol combustível.

### 1.3 Processos industriais de produção de álcool combustível

O álcool pode ser obtido a partir de várias biomassas como plantas e matérias ricas em açúcar, como cana-de-açúcar e beterraba, ricas em amido, como mandioca, batata, milho e/ou ricas em celulose, como madeira, bambu, bagaço (Lynd *et al.*, 1991). O caldo de cana-de-açúcar, utilizado diretamente como substrato para o processo fermentativo no Brasil (Rose & Vijayalakshmi, 1993), possui como principais constituintes, 78-86% de água, 11-18% de sacarose, 0,2-1,0% de açúcares redutores, 0,3-0,5% de cinzas e 0,5-1,0% de compostos nitrogenados (Aquarone *et al.*, 1983).

Para a produção de álcool, caldo-de-cana e melaço são misturados com água até atingir a concentração adequada de açúcar, constituindo o mosto. Nas dornas de fermentação, as leveduras utilizam os açúcares formando etanol, CO<sub>2</sub> e biomassa. Após centrifugação, o “vinho” é enviado para a destilação (purificação do álcool) e as células são tratadas e devolvidas às dornas para iniciar um novo ciclo fermentativo (Aquarone *et al.*, 1983).

Durante o processo fermentativo industrial, por utilizar mostos não-estéreis, ocorre multiplicação de outras leveduras e bactérias contaminantes, provocando perdas significativas no rendimento. Atualmente, a maioria das indústrias está utilizando linhagens isoladas durante os processos industriais, adaptadas às condições estressantes encontradas nesse ambiente. Essas condições exercem uma pressão seletiva forçando a adaptação e a evolução das linhagens presentes no meio, permitindo a manutenção da viabilidade das leveduras durante os vários ciclos fermentativos, mesmo sob as condições adversas geradas durante a produção industrial do bioetanol (Amorim *et al.*, 2004b; Silva-Filho *et al.*, 2005a, 2005b). Além disso, as leveduras industriais são geralmente poliplóides, o que as torna mais resistentes às condições de estresse (Querol *et al.*, 2003). Mesmo que a seleção tenha favorecido linhagens com genótipos e características desejadas, ainda são necessárias melhorias a fim de aumentar o rendimento e diminuir os custos nos processos industriais.

Devido à forma e velocidade de alimentação do mosto nas condições industriais, associadas à rápida hidrólise da sacarose, ocorre um significativo estresse osmótico (provocado pelas altas

concentrações de glicose e frutose produzidas no meio), causando alterações significativas na expressão de genes, gasto energético e diminuição no rendimento da fermentação devido à produção de glicerol e succinato (Erasmus *et al.*, 2003; Verstrepen *et al.*, 2004). Além disso, algumas cepas não conseguem captar eficientemente a frutose do meio, o que muitas vezes leva à fermentação incompleta desse açúcar e perdas na produção de álcool (Berthels *et al.*, 2004). Por outro lado, bactérias e leveduras contaminantes (não-*Saccharomyces*) podem se beneficiar utilizando preferencialmente o excesso de glicose e frutose acumulado no meio de fermentação, contribuindo para a queda na capacidade fermentativa. De fato, recentemente foi mostrado que mais de 90% da glicose e frutose produzidas durante a hidrólise extracelular da sacarose se difundem para o meio, não sendo necessariamente metabolizados pela célula que produziu a invertase (Gore *et al.*, 2009). Nos processos fermentativos que utilizam altas concentrações de açúcares, como a produção de cerveja pela tecnologia “very-high-gravity”, os açúcares (predominantemente maltose e maltotriose) não são hidrolisados extracelularmente, mas transportados diretamente para o interior da célula, ocorrendo um rápido equilíbrio entre a concentração dos açúcares no interior e exterior da célula, impedindo o estresse osmótico (Thomas *et al.*, 1996).

Recentemente, foi demonstrado que o transporte ativo de sacarose também permite a eficiente fermentação desse açúcar, pois as cepas que são incapazes de fermentar glicose e frutose, por não possuírem transportadores desses açúcares, ou as cepas sem atividade de invertase extracelular, continuam fermentando sacarose (Batista *et al.*, 2004; Badotti *et al.*, 2006). Sendo assim, a expressão do gene *AGT1*, responsável pela permease que transporta a sacarose através do simporte com prótons, demonstra ser de extrema importância em processos nos quais essa fonte de carbono é o principal açúcar a ser fermentado. Por estas razões, deseja-se obter cepas de leveduras industriais capazes de fermentar sacarose sem que ocorra a hidrólise extracelular em glicose e frutose. Estes objetivos já foram alcançados em linhagens de levedura de laboratório (Dário *et al.*, 2005; 2006), onde as linhagens foram deletadas no gene *SUC2*. As cepas transformadas continuaram fermentando eficientemente baixas concentrações de sacarose (20 g/L), não produzindo glicose e frutose no meio extracelular, pois o transporte deste dissacarídeo ocorre diretamente para o interior da célula, onde sofre hidrólise pela ação das maltases ( $\alpha$ -glicosidases). No entanto, nas fermentações em batelada com altas concentrações de sacarose (200 g/L), as linhagens de laboratório transformadas

sem atividade invertase foram incapazes de consumir totalmente a sacarose (Dário, 2007).

Tendo em vista que a sacarose é o carboidrato presente em maior quantidade no caldo-de-cana (Aquarone *et al.*, 1983) e considerando as condições de fermentação das destilarias brasileiras, leveduras com transporte de sacarose (sem ocorrer hidrólise extracelular) apresentam potencial para trazer benefícios para a fermentação. Dentre estes benefícios, podemos citar a redução de estresse osmótico causado pela hidrólise extracelular da sacarose, maior flexibilidade na condução do processo industrial aumentando a velocidade de alimentação nas dornas, quantidades menores de glicose e frutose disponíveis para bactérias e leveduras contaminantes (não-*Saccharomyces*) e maior rendimento na fermentação alcoólica devido à redução da quantidade de açúcar desviada para o crescimento celular e formação de glicerol (Weusthuis *et al.*, 1993).

Devido aos fatores citados acima, estudos visando caracterizar a utilização dos açúcares por *Saccharomyces cerevisiae* são de grande importância do ponto de vista biotecnológico e econômico. A caracterização dos genes envolvidos no metabolismo permite o desenvolvimento de estratégias para incrementar o desempenho das linhagens de leveduras, fazendo com que essas sejam otimizadas segundo as características desejadas para cada processo industrial.

#### **1.4 Dinâmica populacional em fermentações industriais**

No Brasil, os processos de fermentação utilizam altas densidades celulares de leveduras, em mostos contendo 150-200 g/L de açúcares totais, produzindo altas concentrações de etanol (9-12% v/v) e alta produtividade (cada ciclo de fermentação dura em torno de 6-10 horas, podendo ser realizadas em torno de 3 fermentações por dia). As leveduras são usualmente recicladas, sendo que em torno de 90% das células são reutilizadas entre uma fermentação e outra. Isso resulta em uma alta densidade celular no interior dos fermentadores, contribuindo para um curto tempo de fermentação. Após esse período, as células são coletadas por centrifugação, lavadas com ácido sulfúrico e reutilizadas várias vezes por dia durante uma safra de 200-250 dias (Basso *et al.*, 2008). Alta densidade celular, reciclagem das células e altas concentrações de etanol contribuem para a redução da taxa de crescimento das leveduras, as quais permitem uma alta produção de etanol (90-92 % do açúcar é convertido em etanol).

No período final de uma safra, é bastante comum se isolar leveduras diferentes daquelas inseridas no processo. Estudos sobre a dinâmica microbiológica de fermentadores industriais revelaram uma rápida sucessão das culturas “starters” durante as fermentações, pois não possuem capacidade de competir no ambiente industrial, sendo substituídas por *S. cerevisiae* endógenos do processo. Apenas as leveduras isoladas das dornas de fermentação conseguem se manter viáveis por 180-190 dias (Basso *et al.*, 1993; Silva-Filho *et al.*, 2005a; Basso *et al.*, 2008).

O processo de fermentação de caldo de cana-de-açúcar, para produção de cachaça, por exemplo, começa naturalmente com leveduras derivadas do próprio caldo. Essa microbiota natural é usualmente preparada por um método conhecido como “fermento caipira”, para o qual não existe um padrão de produção. Consequentemente, devido à variação nas leveduras, as cachaças apresentam diferenças na qualidade em função da região produzida. Processos modernos de fermentação adicionam cepas de *S. cerevisiae* selecionadas, para incrementar o processo fermentativo aumentando os níveis de metabólitos desejáveis e prevenindo a produção de componentes deletérios pela microbiota contaminante. O uso de culturas puras de leveduras, geralmente na forma liofilizada, é o padrão utilizado nos processos, mas utilizar leveduras endógenas isoladas na produção pode assegurar o controle da fermentação e preservar as contribuições positivas oferecidas por estas leveduras, além de ser uma alternativa viável economicamente para padronizar a produção dessa bebida (Gomes *et al.*, 2007; Campos *et al.*, 2010).

Durante a fermentação alcoólica para produção de vinho, Lurton e colaboradores (1995) verificaram que a persistência de *S. cerevisiae* permite não apenas a produção de etanol, mas também compostos secundários como glicerol, ésteres, álcoois e outros compostos responsáveis pelo aroma que é característico do produto. Bactérias contaminantes em altas concentrações prejudicam a qualidade da bebida fermentada por aumentar a acidificação do meio. Basso *et al.* (2008) ao estudarem a fermentação alcoólica para a produção de álcool combustível, mostraram a persistência e dominância de cepas não selecionadas de *S. cerevisiae* durante o processo fermentativo.

Estudos indicam que além de ser importante para o próprio metabolismo e para várias outras rotas metabólicas, a forma biologicamente ativa da vitamina B6 (piridoxina) é precursor da vitamina B1 (tiamina) em *S. cerevisiae* (Rodríguez-Navarro *et al.*, 2002; Nosaka, 2006). Esta, por sua vez, é essencial para a

utilização dos açúcares, em particular durante a fermentação (Bataillon *et al.*, 1996; Hohmann e Meacock, 1998; Mojzita e Hohmann, 2006). Outros estudos têm mostrado uma significativa regulação positiva dos genes do metabolismo da tiamina em células fermentadoras em vários processos industriais como produção de vinho, saque e pão (Rossignol *et al.*, 2003; Tanaka *et al.*, 2006; Wu *et al.*, 2006), ou inclusive em leveduras cultivadas em melaços (Shima *et al.*, 2005), indicando que existe uma alta demanda por essa vitamina (e seu precursor) nestas condições industriais. No entanto, sabe-se que para *S. cerevisiae* e outras leveduras do complexo *Saccharomyces sensu stricto*, a presença da tiamina no meio tem um efeito negativo no início da fase de crescimento, não afetando a densidade celular final. Isso ocorre devido ao efeito de repressão dessa vitamina (B1) na biossíntese do seu precursor piridoxina (Minami *et al.*, 1982; Mojzita e Hohmann, 2006). Considerando que a análise do genoma de uma série de leveduras industriais brasileiras utilizadas na eficiente produção de álcool combustível, através de cariotipagem por *microarrays* (Stambuk *et al.*, 2009), indicou que as mesmas apresentavam amplificação dos genes teloméricos *SNO* e *SNZ* envolvidos na síntese de piridoxina e, conseqüentemente tiamina (Rodriguez-Navarro *et al.*, 2002; Dong *et al.*, 2004; Fitzpatrick *et al.*, 2007; Neuwirth *et al.*, 2009),

Geralmente, os trabalhos que analisam a dinâmica de populações em fermentações industriais utilizam técnicas baseadas em PCR, eletroforese em gel de campo pulsado ou análise do DNA mitocondrial após hidrólise com enzimas de restrição (mtDNA-RFLP) para identificar as várias linhagens de levedura presentes durante o processo fermentativo (Bernardi *et al.*, 2008; Marini *et al.*, 2009; Badotti *et al.*, 2010; Campos *et al.*, 2010).

Mais estudos focando o transporte, principal ponto para a eficiente utilização dos açúcares por leveduras, são extremamente necessários para otimizar os processos industriais onde *S. cerevisiae* é utilizada em grande escala. Estes estudos requerem uma abordagem integrada do metabolismo, genética e regulação gênica das células, fundamental para determinar as melhores estratégias visando incrementar a performance fermentativa das leveduras. Transferir estes conhecimentos e estratégias para o setor industrial constitui um desafio maior ainda.



## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

O presente trabalho teve como objetivo caracterizar fenotipicamente e genotipicamente cepas industriais de *S. cerevisiae* utilizadas na produção de álcool combustível no Brasil, em relação à utilização de açúcares e funcionalidade dos genes envolvidos nesse metabolismo, bem como realizar modificações genéticas a fim de otimizar a capacidade fermentativa e/ou permitir um maior controle do processo industrial.

### 2.2 Objetivos específicos

Para a realização do objetivo geral deste trabalho, buscamos especificamente:

- analisar a utilização de açúcares (maltose e maltotriose) por cepas industriais de *S. cerevisiae*, avaliando crescimento celular, consumo dos açúcares e produção de etanol;
- verificar a presença, nas linhagens estudadas, dos genes envolvidos na metabolização dos açúcares (genes *AGT1*, *MALx1* e *SUC2*) e analisar a funcionalidade desses genes em diferentes condições de cultivo;
- desenvolver estratégias para realizar modificações genéticas específicas nas cepas industriais e de laboratório e avaliar o desempenho em diferentes meios de cultivo, incluindo diferentes concentrações de sacarose;
- avaliar a capacidade de transporte de açúcares e o perfil enzimático (invertase, maltase) apresentado pelas cepas parentais e pelas linhagens transformadas.



## 3 MATERIAL E MÉTODOS

### 3.1 LINHAGENS UTILIZADAS

A lista das linhagens de *S. cerevisiae* utilizadas no presente trabalho encontra-se detalhada na Tabela 1. Foram usadas 5 cepas isoladas de meios industriais para produção de álcool combustível que apresentam boa atividade fermentativa e dominância nos fermentadores, sendo 3 fornecidas pela FERMENTEC Ltda. (CAT-1, PE-2 e VR-1), uma (SA-1) pelo Centro de Tecnologia Canavieira (ex COOPERSUCAR) e uma (UFPE-178) pela Universidade Federal de Pernambuco, além de uma cepa produtora de cachaça (UFMG-1007), fornecida pela Universidade Federal de Minas Gerais. As cepas MGD-01 (*suc2Δ::Kan<sup>r</sup>*) e LCM003 (*agt1Δ::Kan<sup>r</sup>*) foram obtidas a partir da linhagem controle CEN.PK2-1C (Dário, 2007) e foram utilizadas para as transformações genéticas. Como cepa referência e como marcador cromossômico de levedura, foi utilizada a cepa de laboratório S288C (ou sua diplóide GSY-157), cujo genoma pode ser encontrado na base de dados “*Saccharomyces* Genome Data Base” (SGD; <http://www.yeastgenome.org>). A cepa de *Escherichia coli* DH5α foi usada para armazenar e replicar os plasmídeos utilizados na construção dos módulos de transformação.

### 3.2 MEIOS DE CULTURA E CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO

#### 3.2.1 Meios de cultura

Rotineiramente foram utilizados meios ricos YP contendo 2% de peptona, 1% de extrato de levedura (Difco), ou meios sintéticos contendo 6,7 g/L de base nitrogenada sem aminoácidos (Difco) e 1,92 g/L de uma mistura de aminoácidos necessários ao crescimento das células de levedura, sem uracila (ura drop-out supplement, Sigma). Os meios foram acrescidos de 2% da fonte de carbono de interesse (glicose, maltose, maltotriose ou sacarose), ou 2% etanol mais 3% glicerol, ou ainda estas duas fontes de carbono acrescidas de 0,1% glicose. Aos meios sólidos foram acrescentados 2% de bacto-agar e, sempre que necessário, foram adicionados 200 mg/L de geneticina ou 3 mg/L de antimicina A. Os meios tiveram o pH ajustado para 5,0 com HCl e foram esterilizados por autoclavagem a 120°C durante 20 min. Para os crescimentos em meios contendo determinadas vitaminas, foram utilizados meios sintéticos (Verduyn *et al.*, 1992),

**Tabela 1: Linhagens utilizadas neste trabalho**

<b>Cepa</b>	<b>Genótipo ou Descrição</b>	<b>Fonte ou Referência</b>
<i>S. cerevisiae</i>		
CEN.PK2-1C	<i>MATa</i> <i>mal13 AGT1 MAL12 MAL2-8<sup>o</sup> SUC2 ura3-52 his3Δ1 leu2-3,112 trp1-289</i>	Entian & Kotter (1998)
S288C	<i>MATa</i> <i>mal13 AGT1 MAL12 mal33 MAL31 MAL32 mel gal2 SUC2</i>	Mortiner & Johnston (1986)
LCM003	CEN.PK2-1C, <i>agr1Δ::kanMX6</i>	Dário, M.G. (2007)
MGD-01	CEN.PK2-1C, <i>suc2Δ::kanMX6</i>	"
GSY-157	S288C diploide, <i>GAL2/GAL2</i>	Stambuk et al. (2009)
CAT-1	Linhagem isolada em 1998/1999 da <i>Usina VO Catanduva</i> , SP.	Basso et al. (2008)
PE-2	Linhagem isolada em 1993/1994 da <i>Usina da Pedra</i> , SP.	"
VR-1	Linhagem isolada em 1993/1994 da <i>Usina Vale do Rosario</i> , SP.	"
SA-1	Linhagem isolada em 1989/1990 da <i>Usina Santa Adélia</i> , SP.	"
UFMG-1007	Linhagem isolada em 1996 da <i>Destilaria Seleta &amp; Boazinha</i> , MG.	Gomes et al. (2007)
UFPE-178	Linhagem isolada em 2002/2003 da <i>Usina Trapiche S/A</i> , PE.	Silva-Filho et al. (2005a)
EHD03	CAT-1, <i>SUC2/suc2Δ::kanMX6</i>	Este trabalho
EHD04	CAT-1, <i>SUC2/suc2Δ::kanMX6</i>	"
EGY01	LCM003, <i>suc2Δ::ppgD-AGT1-tpgK</i>	"
<i>E. coli</i>		
DH5α	<i>F- recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17(vK-mk+) supE44 rel1 Δ(argF-lacZya) U169 (φ80 lacZΔM15)</i> <sup>+</sup>	Stratagene

contendo por litro de água desmineralizada: 5,0 g de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 3,0 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,5 g de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 15,0 mg de EDTA, 4,5 mg de  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,3 mg de  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 1,0 mg de  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 0,3 mg de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , 4,5 mg de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 3,0 mg de  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,4 mg de  $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 1,0 mg de  $\text{H}_3\text{BO}_3$  e 0,1 mg de KI. Após esterilização em autoclave, foi adicionada uma solução de vitamina esterilizada por filtração (filtro de nitrocelulose, 0,22  $\mu\text{m}$ ; Millipore) contendo 0,05 mg/L de biotina, 1 mg/L de pantotenato de cálcio, 1 mg/L de ácido nicotínico, 25 g/L de inositol, 0,2 mg/L de ácido para-aminobenzóico e 1 mg/L de piridoxina e/ou tiamina. Uma solução de glicose foi também esterilizada por filtração e adicionada ao meio em concentração de 20 g/L.

Para o crescimento das células de *Escherichia coli*, foi utilizado o meio Luria-Bertani (LB) acrescido de 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de ampicilina esterilizada por filtração. Este meio teve sempre o pH ajustado para 7,5 e foi esterilizado por autoclavagem.

### 3.2.2 Condições de crescimento

As células foram pré-crescidas durante 48 horas em temperatura ambiente, em tubos de ensaio contendo 3 mL de YP adicionado de 2% da fonte de carbono de interesse. Para determinar as curvas de crescimento, um volume deste pré-crescimento foi inoculado em erlenmeyers contendo 1/5 do seu volume de meio líquido YP, contendo como fonte de carbono glicose, sacarose, maltose ou maltotriose. As culturas foram incubadas em um agitador orbital (160 rpm) a 28°C. Alíquotas de 500  $\mu\text{L}$  foram retiradas em intervalos de tempo pré-estabelecidos e o crescimento celular foi determinado por densidade óptica a 570 nm, assim como a concentração dos açúcares e etanol nos sobrenadantes obtidos através de centrifugação (3.000 g, 2 min). A densidade óptica a 570 nm foi correlacionada com o peso seco das células, obtido com células filtradas (filtro de nitrocelulose, 0,45  $\mu\text{m}$ ; Millipore), lavadas 3 vezes com água e secas em forno de microondas (2-3 min) até atingirem peso constante, como descrito por Badotti *et al.* (2008).

Para analisar a capacidade de crescimento das cepas em condições semelhantes às oferecidas nas fermentações em batelada e determinação das atividades enzimáticas e de transporte, as células foram crescidas até atingirem o início da fase exponencial (~1 g/L de células). A seguir, as células foram removidas do meio por centrifugação (3.000 g, 5 min), lavadas três vezes com água

destilada a 4°C e ressuspensas em água, de forma a atingirem uma concentração celular de  $20 \pm 1,0$  g/L.

### 3.2.3 Cultivos em frascos agitados

Para analisar a capacidade de crescimento das cepas em condições semelhantes às oferecidas nas fermentações em batelada, as células pré-crescidas como descrito acima foram misturadas com meio rico YP (pH 5,0) acrescido de sacarose, de forma que a concentração final atingisse 10 g/L de células, 2% de peptona, 1% de extrato de levedura e 20 ou 200 g/L de açúcar. Em intervalos de tempo pré-estabelecidos, alíquotas de 500 µL foram removidas e utilizadas para determinar o crescimento celular, consumo dos açúcares e formação de etanol.

### 3.2.4 Monitoramento de linhagens em processos fermentativos

Para caracterizar a capacidade da cepa industrial CAT-1 de sobreviver e competir com outras linhagens durante os ciclos de fermentação, a derivada EHD04 (CAT1, *SUC2/suc2Δ::kanMX6*) foi crescida juntamente com a levedura de laboratório S288C diplóide (GSY-157). Quantidades equivalentes de células de cada linhagem foram misturadas e crescidas em meios rico YP e sintético YNB, ambos contendo 2% glicose. A cada 24 horas, alíquotas iguais de células foram sucessivamente repicadas para novos meios de cultivo e, ao mesmo tempo, semeadas em YP-2% de glicose, com e sem geneticina para diferenciar as linhagens e quantificar a proporção de cada linhagem na população.

### 3.2.5 Crescimento e dominância em meios contendo vitaminas

Para avaliar a capacidade de crescimento e dominância em meios contendo as vitaminas B6 (piridoxina) e B1 (tiamina), da cepa industrial CAT-1, foram realizados ensaios de competição entre a cepa derivada EHD04 (CAT1, *SUC2/suc2Δ::kanMX6*) e a cepa de laboratório S288C diplóide (GSY-157). As duas linhagens foram crescidas juntamente, em 4 tipos de meios: com e sem ambas as vitaminas, com apenas tiamina e com apenas piridoxina, em meio sintético definido (Verduyn *et al.*, 1992). Posteriormente, alíquotas iguais de células foram sucessivamente, a cada 24 horas, repicadas para novos meios de cultivo e, nos tempos indicados, semeadas em placas contendo YP-2% glicose, com e sem geneticina para

distinguir as linhagens e quantificar a proporção de cada linhagem da população.

### **3.3 DETERMINAÇÕES ENZIMÁTICAS**

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 diferiam em menos de 10%.

#### **3.3.1 Atividade invertase extracelular**

A atividade da invertase extracelular foi determinada utilizando-se células íntegras conforme descrito por Silveira *et al.* (1996). Para isso, 100 µL de solução tampão 150 mM Tris-succinato pH 5,0, contendo 150 mM NaF, foi misturado com 100 µL de células e incubado em banho-maria a 30°C por 30 min. Posteriormente, adicionou-se 100 µL de 300 mM sacarose e incubou-se 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 (vide a seguir). A atividade da invertase extracelular foi expressa em nmoles de glicose produzida por mg de células (peso seco) por min.

#### **3.3.2 Atividade invertase total**

A atividade de invertase total foi determinada utilizando-se células permeabilizadas (Stambuk, 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. Alíquotas 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

invertase (produção de glicose) foi determinada como descrito acima.

### 3.3.3 Atividade $\alpha$ -glicosidase

A atividade  $\alpha$ -glicosidase foi determinada utilizando células permeabilizadas conforme descrito por Stambuk (1999). Para isso, 2 mg de células foram permeabilizadas e lavadas como descrito acima. Foram adicionados 50  $\mu$ L da suspensão celular a 950  $\mu$ L de uma solução de 2 mM *p*-nitrofenil- $\alpha$ -D-glicosídeo (*p*NF $\alpha$ G) em tampão A. Para determinar a atividade de hidrólise de maltose ou sacarose, 40  $\mu$ L de células permeabilizadas foram adicionados a 60  $\mu$ L de uma solução 0,2 M maltose ou sacarose em tampão A. Após incubação a 30°C por 1 min (*p*NF $\alpha$ G) ou 5 min (maltose ou sacarose), as reações foram interrompidas através de fervura a 100°C durante 3 min e centrifugadas (3.000 *g*, 1 min). Os sobrenadantes foram usados para determinar o *p*-nitrofenol produzido a 400 nm ( $\Delta\epsilon = 7,28 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ , pH 6,8) ou a glicose liberada pela quebra dos açúcares.

## 3.4 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE TRANSPORTE

A atividade de transporte de  $\alpha$ -glicosídeos foi determinada conforme o método colorimétrico proposto por Hollatz e Stambuk (2001), utilizando o substrato *p*NF $\alpha$ G. A partir da suspensão celular de  $20 \pm 1,0 \text{ g/L}$ , 100  $\mu$ L foram incubados juntamente com 100  $\mu$ L de *p*NF $\alpha$ G durante 5-10 min a temperatura ambiente. As reações foram interrompidas através da adição de 1 mL de 2 M 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 ( $\Delta\epsilon = 14,8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ , pH 9,0) em 800  $\mu$ L 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  $\text{mg}^{-1}$  de células (peso seco) por  $\text{min}^{-1}$ .

## 3.5 DETERMINAÇÕES BIOQUÍMICAS

### 3.5.1 Determinação de açúcares

A glicose foi determinada através de kits enzimáticos comerciais (BioDiagnostica-Laborclin) com glicose oxidase e

peroxidase, de acordo com as recomendações do fabricante. Para isso, 10 µL de amostra foram incubados com 1,0 mL de reagente de cor (contendo as enzimas), a 37°C durante 10 min. A absorbância da amostra foi determinada por espectrofotometria a 505 nm e correlacionada com a absorbância apresentada pela solução padrão de glicose (1 g/L).

A determinação da concentração de sacarose foi realizada enzimaticamente, através de um método indireto, adaptado de Holmes (1996). Primeiramente determinou-se a concentração de glicose nas amostras e, em seguida, as células foram incubadas com uma solução de invertase (Sigma) na concentração de 1 mg/mL, a 37°C por 30 min. Após essa incubação as amostras foram fervidas a 100°C por 5 min e a determinação da concentração de glicose, gerada pela hidrólise da sacarose, foi determinada no sobrenadante.

Para determinar a concentração de frutose nas amostras, foi calculada a diferença entre glicose e açúcares redutores presentes na amostra, os quais foram determinados através do método químico adaptado de Miller (1959). Para isso, 50 µL de amostra foram incubados com 150 µL de reagente DNS (1% de ácido dinitrosalicílico, 2% de NaOH; 20% de tartarato de sódio e potássio e 0,2% de Fenol) por 10 min a 100°C. A seguir, foram adicionados 800 µL de água destilada e a absorbância foi determinada por espectrofotometria a 540 nm, correlacionando a absorbância das amostras com uma equação de reta extraída de uma curva padrão construída a partir de uma solução de glicose 2,0 g/L.

Os α-glicosídeos maltose e maltotriose foram determinados colorimetricamente através da reação com metilamina, em pH alcalino (Cáceres *et al.*, 1999). Em um primeiro momento, 600 µL de amostra foram diluídos até a concentração adequada e adicionados a 600 µL de reagente (0,5% metilamina em 0,5 M NaOH). Essa mistura foi incubada a 100°C durante 5 min e a concentração de maltose ou maltotriose foi determinada através de espectrofotometria a 540 nm, correlacionando a absorbância das amostras com uma equação de reta extraída de uma curva padrão construída a partir de solução de 2% maltose ou maltotriose, conforme o caso.

### **3.5.2 Determinação de etanol**

A concentração de etanol foi determinada enzimaticamente através da reação da álcool oxidase (de *Pichia pastoris*, Sigma) e

peroxidase (de raiz-forte, Toyobo do Brasil), seguindo metodologias adaptadas dos protocolos descritos por Salgado *et al.* (2000) e Rodionov *et al.* (2002). Alíquotas de 10 µL de amostra foram incubadas em placa de 96 poços com 200 µL de reagente enzimático (0,5 U/mL de álcool oxidase, 4,0 U/mL de peroxidase, 14 mM 4-aminoantipirina e 60 mM fenol em tampão 0,1 M fosfato de sódio, pH 7,5) por uma hora a 37°C. Após incubação, a absorbância foi determinada a 415 nm em leitor de placas (Tecan GENios microplate reader) e a concentração foi determinada correlacionando a absorbância apresentada pelas amostras e a equação de reta extraída da curva padrão construída com soluções de etanol entre 1,0 e 10,0 g/L.

### 3.6 MODIFICAÇÕES GENÉTICAS

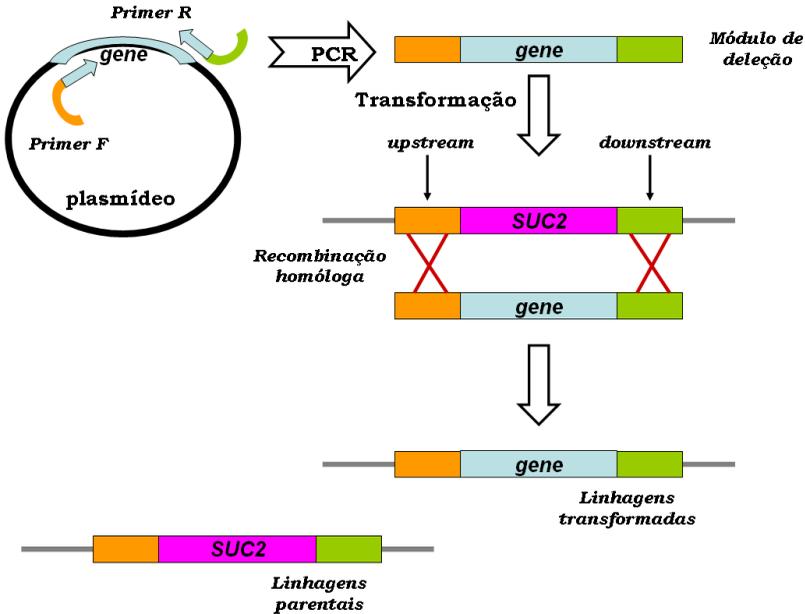
As regiões dos genes *SUC2* foram modificadas no genoma da cepa industrial CAT-1 e no genoma da cepa de laboratório LCM003 por recombinação homóloga (Figura 7) e metodologias baseadas em Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) como descrito por Longtine *et al.* (1998), Puig *et al.* (1998), DeMarini *et al.* (2001), Petracek & Longtine (2002) e Batista *et al.* (2004). Resumidamente, um gene marcador (p. ex. um gene de resistência a um antibiótico ou um gene que restaura um requerimento nutricional), flanqueado por promotores e terminadores que permitam sua correta expressão em leveduras, foi amplificado por PCR com iniciadores contendo na sua extremidade 5' aproximadamente 40 nucleotídeos de homologia à região do cromossoma que se quer modificar (Figura 7). Após a amplificação, as células de levedura foram transformadas com o módulo de modificação (DNA linear) e as células onde ocorreu a integração do módulo por recombinação homóloga foram selecionadas em meios contendo o antibiótico ou o requerimento nutricional apropriado. Nas Tabelas 2 e 3 encontram-se a lista de todos os plasmídeos e iniciadores utilizados neste trabalho, respectivamente.

**Tabela 2: Plasmídeos utilizados**

<b>Plasmídeo</b>	<b>Genótipo</b>	<b>Fonte</b>
pFA6a-kanMX6	<i>ori amp<sup>r</sup><sub>PTEF</sub>-Kan<sup>r</sup><sub>-TTEF</sub></i>	Petracek e Longtine (2002)
pGRSd-AGT1	<i>ori amp<sup>r</sup><sub>PPGD-AGT1-T<sub>PGK</sub> URA3 CEN6</sub></i>	Jules <i>et al.</i> (2004)
pGRSd-AGT1-GFP	<i>ori amp<sup>r</sup><sub>PPGD-AGT1-GFP-Kan<sup>r</sup>-T<sub>PGK</sub> URA3 CEN6</sub></i>	Trichez (2007)

### 3.6.1 Construção dos módulos de transformação por PCR

Para obter os módulos de transformação por PCR foram realizadas 10 reações, sendo adicionados, para cada 50  $\mu$ L de reação, 2  $\mu$ L de DNA molde (plasmídeo ou DNA genômico), 1  $\mu$ L de 10 mM dNTP, 1  $\mu$ L de cada primer (20 pmol/ $\mu$ L), 1 U de enzima (Phusion High-Fidelity DNA polimerase; Finnzymes), 10  $\mu$ L de tampão 5x concentrado apropriado para a enzima (Phusion HF buffer) e água miliQ até completar o volume final. As reações foram realizadas em um termociclador (Eppendorf), o qual foi rotineiramente programado para 30 ciclos de 1 min a 98°C, 1 min a 55°C e 1,5 min a 72°C e, uma extensão final de 10 min a 72°C. Os produtos das reações foram submetidos à eletroforese em gel de 0,8% agarose (Sigma) em tampão TBE 0,5X (50 mM Tris-base, 50 mM ácido bórico, 1 mM EDTA, pH 8,0) a 90 V por 30-60 min. Os géis foram corados com 0,5 mg/mL de brometo de etídeo em TBE 0,5X durante 30 min para visualização do DNA sob luz ultravioleta. As bandas de interesse foram recortadas e purificadas do gel utilizando kits comerciais (GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit, GE Healthcare), para posterior utilização nas transformações.



**Figura 7: Estratégia para substituição do gene *SUC2*.** Iniciadores (Primer F e R) com regiões de homologia a região a jusante (em laranja) e a montante (em verde) do gene *SUC2*, foram utilizados para amplificar por PCR um gene marcador presente em um plasmídeo. O fragmento linear de DNA (módulo de transformação), por recombinação homóloga, foi inserido no DNA cromossômico da levedura, substituindo o gene *SUC2* nas linhagens transformadas.

### 3.6.2 Transformação de leveduras

Para as transformações, as células foram pré-crescidas em 3 mL de meio rico YP-2% glicose, durante a noite, a 28°C e 160 rpm. As linhagens de levedura foram transformadas conforme metodologia descrita por Knop *et al.* (1999). Um volume do pré-crescimento contendo  $5 \times 10^6$  células/mL foi transferido para 50 mL de meio rico YP-2% glicose e crescidas por 6-8 h, a 28°C e 160 rpm até uma concentração de  $2 \times 10^7$  células/mL.

Tabela 3: Iniciadores utilizados

Primer	Seqüência* (5' → 3')	Uso
SUC2-F	GAAATTAATCCGGGGCGAAG	Amplificação módulo <i>suc2Δ::Kan<sup>r</sup></i>
SUC-R	CAGGTAAC TGGGGTCGGGAG	Amplificação módulo <i>suc2Δ::Kan<sup>r</sup></i>
SUC2-F1	TTTCCTTTTGGCTGGTTTGCAGCCAAAATACTGCATCAUGAA TTCGAGCTCGTTAAAC	Substituição gene <i>SUC2</i>
SUC2-R1	GTGTGAAGTGGACCAAGGCTATCGCTAGTTTGGTTTGTUCA TTGTATATGAGATAGTIG	Substituição gene <i>SUC2</i>
V-SUC2-F	GAAATTAATCCGGGGCGAAG	Verificação gene <i>SUC2</i>
V2-SUC2-F	GAGTTGTTGTCTAGCGTAG	Verificação genes <i>SUC</i>
V2-SUC2-R	TCCATTTCCCTCACTACTTC	Verificação genes <i>SUC</i>
SUC1320-R	GGACCGTGGTAACTCTAAGG	Sonda/verificação genes <i>SUC</i>
SUC100-F	GCGATAGACCTTTGGTCCAC	Sonda/verificação genes <i>SUC</i>
SUC950-R	GGCACTGTACTCCCAGTT	Verificação genes <i>SUC</i>
AGT1-F	AGGAGCTCATGAAAAATATCATTTCATTGG	Sonda/verificação gene <i>AGT1</i>
AGT1-R	TTGGATCCACATTTATCAGCTGC	Sonda/verificação gene <i>AGT1</i>
MALx1-F	CCATACCTTGTGTGAGTGG	Sonda genes <i>MALx1</i>
MALx1-R	TCATTTGTTCCACAACAGATG	Sonda genes <i>MALx1</i>
V-Kan <sup>r</sup> -F	CCGGTTGCATTCCGATCC	Verificação gene <i>KanMX6</i>
V-Kan <sup>r</sup> -R	GGAAATCGAATGCAACCCGG	Verificação gene <i>KanMX6</i>
SUC::AGT1-F	GCTCCCAAAGCGTAACGATTCAGGTGCTTCTCTGGCTCCCATG GTGGTTTCGAGTTTATCAATCAATAC	Amplificação módulo <i>suc2Δ::AGT1</i>
SUC::AGT1-R	GCGTTACCGGTGTCATGAAGTAGTATTTGTAGAAACCACAT CTCCCCAGAAATTTTCGAGTTATTAACCTTAAAA	Amplificação módulo <i>suc2Δ::AGT1</i>

\*Seqüências sublinhadas são homólogas ao plasmídeo pF46a-kanMX6 e, em itálico ao plasmídeo pGRSd-AGT1.

As células foram coletadas por centrifugação (3.000 g, 3 min), lavadas com água destilada estéril a 4°C, posteriormente com solução SORB (100 mM acetato de lítio, 10 mM de Tris-HCl pH 8, 1 mM de EDTA-NaOH e 1 M de sorbitol) e centrifugadas por 5 min a 3.000 g, sendo o sobrenadante descartado. As células competentes foram preparadas ressuspensando as células com 360 µL de SORB e 40 µL de DNA carreador SS (10 mg/mL de DNA de esperma de salmão da Sigma, desnaturado a 100°C por 10 min) e dividida em frações de 50 µL para tubos estéreis. No momento da transformação, foram adicionados 10 µL do módulo de transformação, água MilliQ (como controle negativo) ou plasmídeo pGRSd-AGT1-GFP (como controle positivo) às células competentes. Em seguida, foram adicionados 360 µL de solução PEG (100 mM acetato de lítio, 10 mM de Tris-HCl pH 8, 1 mM de EDTA-NaOH e 40% de PEG 3350) a cada tubo e incubados a temperatura ambiente por 30 min. Posteriormente, foram adicionados 47 µL de dimetilsulfóxido e incubados a 42°C, por 20 min.

Alternativamente, as linhagens foram transformadas conforme metodologia descrita por Gietz e Woods (2002). Um volume de células pré-crescidas foi transferido para 50 mL de meio rico YP-2% glicose, para atingir uma densidade óptica na cultura (absorbância com leitura em 570 nm) igual 0,4. A cultura foi incubada a 28°C, sob agitação orbital (160 rpm) até uma densidade óptica a 570 nm igual a 1,0. As células foram coletadas por centrifugação (3.000 g, 5 min) e lavadas em 1 mL de 0,1 M acetato de lítio. Novamente, foram centrifugadas, ressuspensadas em 300 µL (para uma  $DO_{570nm}$  da cultura igual a 0,9) ou em 500 µL (para uma  $DO_{570nm}$  da cultura igual a 1,5) de 0,1 M acetato de lítio e alíquotadas em frações de 50 µL, em tubos estéreis. A cada tubo, foi adicionado 300 µL de solução PLI (1 mL de 1 M acetato de lítio, 1 mL de H<sub>2</sub>O e 8 mL de 50% PEG 3350), 50 µL de DNA carreador SS e 50 µL do produto de PCR (módulo de transformação), água MilliQ (controle negativo), ou plasmídeo pGRSd-AGT1-GFP (controle positivo). Em seguida, as células foram incubadas a 42°C durante 30 min em banho-maria, centrifugadas (2 min, 3.000 g) e ressuspensadas em água MilliQ.

Em ambos os protocolos, as células transformadas foram semeadas e incubadas em placas contendo meio rico YP-2% glicose sólido, acrescido de 200 µg/mL de geneticina (seleção por resistência ao antibiótico) ou em placas contendo meio rico YP-2% maltotriose sólido, acrescido de 3 mg/L de antimicina A. As placas foram incubadas a 28°C, por 3 a 5 dias.

### 3.6.3 Confirmação das deleções por PCR

As deleções do gene *SUC2* no genoma das leveduras foram verificadas por PCR utilizando os iniciadores V-Kan<sup>r</sup>-F e V2-SUC2-R (vide Tabela 3 e seção 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO) para verificar a presença do gene *Kan<sup>r</sup>* substituindo o gene *SUC2* no genoma da cepa transformada e, os iniciadores SUC100-F e V2-SUC2-R e V2-SUC2-F e SUC950-R para verificar a presença do gene *SUC2*. No caso da substituição do gene *SUC2* pelo módulo *pPGD-AGT1- $\tau$ PGK*, as células transformadas foram analisadas utilizando os iniciadores V2-SUC2-F e SUC1320-R para confirmar a deleção do gene *SUC2* e os iniciadores V-SUC2-F e *AGT1-R* (vide Tabela 3) para verificar a inserção do gene *AGT1* no local correto do genoma da levedura. Após a transformação, foi extraído o DNA das colônias crescidas nos meios seletivos. Para isso, as células foram crescidas em 5 mL de meio rico YP-2% glicose, durante a noite, a 28°C. Posteriormente, a cultura foi centrifugada (6.000 g, 3 min), o sobrenadante desprezado e o DNA da suspensão celular foi extraído utilizando kits comerciais de extração de DNA de leveduras (YeaStar™ Genomic DNA Kit – Zymo Research). As condições das reações foram as mesmas utilizadas para a construção dos módulos de transformação, adaptando os tempos de incubação a 72°C conforme os produtos esperados (Tabela 4). Os produtos das reações foram submetidos à eletroforese em gel de 0,8% agarose e corados com brometo de etídeo para visualização das bandas em luz ultravioleta, conforme descrito anteriormente.

### 3.7 LOCALIZAÇÃO DOS GENES *SUC*, *MALx1*, *Kan<sup>r</sup>* E *AGT1* NO GENOMA DAS LEVEDURAS

Para a localização dos genes de interesse no genoma das cepas de *S. cerevisiae* utilizadas nesse estudo e também para verificar a correta integração dos fragmentos lineares de DNA produzidos para o gene *SUC2*, os cromossomos das leveduras foram separados através de eletroforese de campo pulsado (PFGE – *pulsed-field gel electrophoresis*) e, em seguida, transferidos para uma membrana de nylon onde foram hibridizados com sondas específicas para os genes *SUC*, *MALx1*, *Kan<sup>r</sup>* e *AGT1* através de *Southern blotting*.

**Tabela 4: Produtos de PCR esperados para confirmar a correta inserção dos fragmentos de DNA nas linhagens transformantes e suas parentais**

Genótipo	Primer F	Primer R	Produto (pb) esperado
( <i>SUC2/SUC2</i> )	SUC100-F	V2-SUC2-R	1977
( <i>SUC2/SUC2</i> )	V-Kan <sup>r</sup> -F	V2-SUC2-R	AUSÊNCIA
( <i>SUC2/SUC2</i> )	V2-SUC2-F	V2-SUC2-R	2728
( <i>SUC2/suc2Δ::Kan<sup>r</sup></i> )	SUC100-F	V2-SUC2-R	1977
( <i>SUC2/suc2Δ::Kan<sup>r</sup></i> )	V-Kan <sup>r</sup> -F	V2-SUC2-R	1170
( <i>SUC2/suc2Δ::Kan<sup>r</sup></i> )	V2-SUC2-F	V2-SUC2-R	2728 e 2670
( <i>SUC2 agt1Δ::Kan<sup>r</sup></i> )	V2-SUC2-F	SUC1320-R	2000
( <i>SUC2 agt1Δ::Kan<sup>r</sup></i> )	V2-SUC2-F	AGT1-R	AUSÊNCIA
( <i>suc2Δ::AGT1 agt1Δ::Kan<sup>r</sup></i> )	V2-SUC-F	SUC1320-R	AUSÊNCIA
( <i>suc2Δ::AGT1 agt1Δ::Kan<sup>r</sup></i> )	V-SUC2-F	AGT1-R	3355
( <i>suc2Δ::AGT1 agt1Δ::Kan<sup>r</sup></i> )	AGT1-F	AGT1-R	1850

### 3.7.1 Eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE)

Antes de serem separados através de PFGE, os cromossomos de cada cepa foram imobilizados em agarose *low-melting point* (LMP agarose, Sigma). Inicialmente, as células foram crescidas em glicose até atingirem a fase estacionária. Em seguida, foi transferido 1 mL dessas culturas para microtubos onde as células foram centrifugadas, lavadas duas vezes com 1 mL de solução Tris/EDTA (10,0 mM Tris, 50,0 mM EDTA, pH 7,5) e ressuspensas em 150 µL dessa mesma solução. Depois disso, 1 µL de 20 mg/mL Zimoliase (ZimoResearch) em 10 mM fosfato de sódio (pH 7,5) foi adicionado a essa suspensão celular, a qual foi incubada a 42°C por 30 segundos. Após esta incubação, adicionou-se aos microtubos 250 µL de 1% LMP agarose em 0,125 M EDTA (pH 7,5). Essa mistura foi em seguida pipetada em moldes, que foram posteriormente colocados no gelo para a polimerização dos blocos de LMP agarose contendo as células (cromossomos) de cada cepa. Depois da polimerização, os blocos foram transferidos para um novo tubo onde foram, primeiramente, incubados por 8 horas a 37°C em uma solução contendo 0,5 M EDTA e 10 mM Tris (pH 7,5) e, posteriormente, incubados durante a noite, a 50°C em uma solução contendo 0,5 M EDTA, 10 mM Tris (pH 9,5), 1% *N*-lauroilsarcosina e

2 mg/mL de proteinase K. Por último, os blocos foram lavados quatro vezes (1 hora para cada lavagem) com a solução Tris/EDTA (pH 7,5). Os blocos não utilizados imediatamente foram armazenados nessa mesma solução a 4°C.

Para a separação dos cromossomos através de PFGE, os blocos foram depositados nos poços de um gel de 1% agarose para PFGE (Sigma) preparado em tampão TBE 0,5X. A eletroforese foi realizada durante 27 horas a 200 V, em 2,5 litros de TBE 0,5 X a 10°C, no equipamento Gene Navigator (Pharmacia Biotec). Os tempos de pulsos foram de 70 segundos nas primeiras 15 horas e de 120 segundos nas últimas 12 horas. Após a corrida, o gel foi corado com brometo de etídeo e fotografado.

### 3.7.2 Southern Blotting

Para a verificação da presença dos genes *SUC*, *MAL* e *AGT1* no genoma das cepas de *S. cerevisiae* utilizadas, bem como para verificar as modificações realizadas (presença do gene *Kan<sup>r</sup>*), os cromossomos das leveduras, após terem sido separados por PFGE, o DNA foi transferido para uma membrana de nylon (Bodyne A, Gibco BRL) onde foram hibridizados com sondas específicas através de *Southern blotting* com o kit AlkPhos (GE Healthcare).

A transferência dos cromossomos para a membrana de Nylon foi realizada segundo Ausubel *et al.* (1992). Após corar e fotografar o gel, o mesmo foi lavado uma vez com 0,2 M HCl durante 10 min, três vezes com H<sub>2</sub>O destilada durante 5 min, duas vezes com a solução de denaturação (1,5 M NaCl e 0,5 M NaOH) durante 15 min e uma vez com a solução de neutralização (3,0 M NaCl e 0,5 M Tris pH 7,0) durante 30 min. Em seguida, foi montada a pirâmide de transferência contendo, da base ao topo da mesma, os seguintes materiais: uma tira de papel filtro 3 MM, parcialmente embebida em SSC 20X (3,0 M NaCl, 0,3 M citrato de sódio, pH 7,0), o gel contendo os cromossomos das cepas, a membrana de Nylon para onde os cromossomos foram transferidos, uma pilha de papéis filtro 3 MM, uma pilha de papéis toalha de 4 cm de espessura e uma placa de vidro com um peso de aproximadamente 0,4 kg. Após a montagem da pirâmide, a transferência foi realizada durante 12 horas e, ao final da mesma, a membrana foi umedecida em SSC 2X, colocada em contato com papel filtro 3 MM e deixada secar a temperatura ambiente. Depois disso, e antes de realizar a hibridização, a membrana foi exposta à luz ultravioleta em um

transiluminador para que ocorresse o *cross-linking* entre o DNA e a membrana.

Para a produção das sondas para os genes *SUC*, *MAL* e *AGT1* inicialmente foi necessário amplificar esses genes a partir do genoma de *S. cerevisiae*. Para isso, foi utilizado, juntamente com o DNA genômico da cepa CEN.PK2-1C, os iniciadores SUC100-F e SUC1320-R para amplificação da quase totalidade da *Open Reading Frame* (ORF) do gene *SUC2*, gerando um fragmento de ~1300 pb, os iniciadores AGT1-F e AGT1-R para a amplificação da ORF do gene *AGT1*, gerando um fragmento de ~1800 pb e os iniciadores MALx1-F e MALx1-R para amplificar a ORF dos genes *MALx1* quase na sua totalidade, gerando um fragmento de ~1900 pb. Para a verificação do correto local de integração do módulo para do gene *SUC2*, foi utilizada como sonda o próprio fragmento linear gerado por PCR para modificação da região. Todos esses produtos de PCR produzidos foram desnaturados e posteriormente marcados utilizando-se o kit AlkPhos (GE Healthcare) seguindo as instruções do fabricante.

A hibridização foi realizada *overnight* a 55°C, com a membrana sendo incubada no tampão de hibridização do kit AlkPhos juntamente com as sondas marcadas e purificadas. Após a hibridização, a membrana foi lavada em tampões que acompanham o kit e, em seguida, incubada com o reagente de detecção que contém o substrato para a fosfatase alcalina, a qual foi utilizada na marcação das sondas e geração da quimioluminescência. Depois dessa incubação, a membrana foi colocada em contato com um filme autorradiográfico (Hiperfilm™ ECL, Kodak) e deixada junto a este no escuro durante 2 horas, até ser revelado, para a verificação da presença dos genes de interesse. A mesma membrana foi utilizada por mais de uma vez, sendo alternativamente incubada com sondas para os genes *SUC*, *AGT1*, *MAL* ou para a modificação da região de interesse (gene *Kan<sup>r</sup>*).

### 3.8 REPRODUTIBILIDADE DOS RESULTADOS

Todos os experimentos foram repetidos pelo menos duas vezes, com transformantes e/ou culturas independentes, apresentando tendências e/ou padrões altamente consistentes, isto é, as diferenças entre linhagens foram reprodutíveis. Neste trabalho são mostrados resultados representativos para cada linhagem.

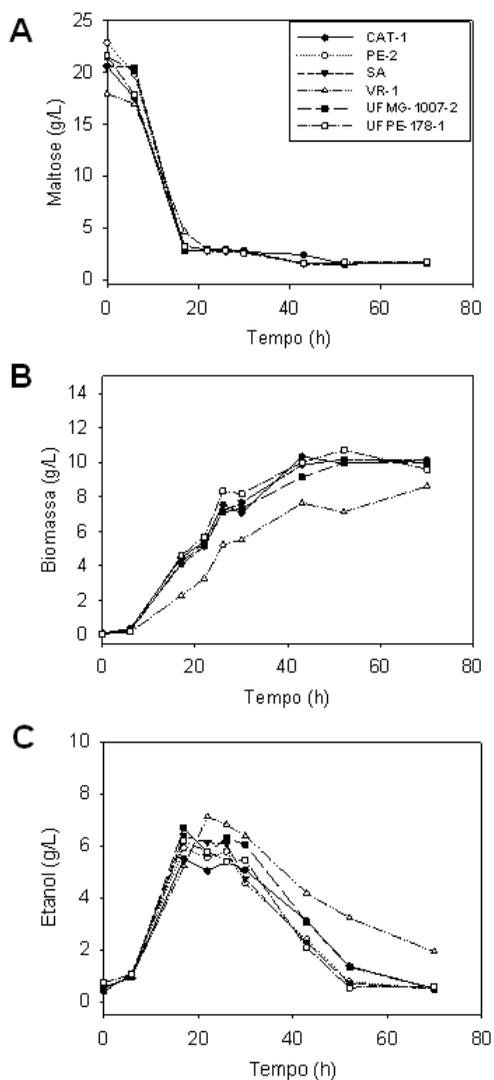
## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com o objetivo de modificar geneticamente leveduras industriais para otimizar o processo fermentativo de produção de álcool combustível a partir da cana-de-açúcar, foi necessário inicialmente fazer uma caracterização fenotípica e genotípica das linhagens industriais (vide Tabela 1 acima) atualmente utilizadas para a produção de álcool combustível no Brasil (Silva-Filho *et al.*, 2005a; Bassó *et al.*, 2008), incluindo uma linhagem selecionada para a produção de cachaça (Gomes *et al.*, 2007). Considerando as vias de utilização de sacarose em *S. cerevisiae* e sua inter-relação com o metabolismo de maltose e maltotriose, avaliamos inicialmente a presença e a funcionalidade dos genes dos transportadores *MALx1* e/ou *AGT1* nas linhagens de leveduras escolhidas pois, para que ocorra o transporte ativo da sacarose, é necessário que estes genes estejam presentes e sejam funcionais no genoma das cepas de interesse (Badotti *et al.*, 2006; Batista *et al.*, 2004). A seguir foram analisados os genes *SUC*, alvo das modificações genéticas do presente trabalho.

### 4.1 METABOLIZAÇÃO DE MALTOSE E MALTOTRIOSE POR LINHAGENS INDUSTRIAIS

Dentre as cepas analisadas, foram incluídas cinco cepas industriais brasileiras produtoras de álcool combustível e uma produtora de cachaça, conforme descrito na Tabela 1. A performance fermentativa de cepas de *Saccharomyces* já foi caracterizada em diferentes linhagens e, a eficiente utilização de maltose por exemplo, tem sido mostrada como característica altamente variável entre cepas industriais e de laboratório (Naumov *et al.*, 1994; Han *et al.*, 1995; Bell *et al.*, 2001; Meneses & Jiranek, 2002; Meneses *et al.*, 2002). Assim, as cepas foram crescidas em meios ricos YP contendo 2% maltose como fonte de carbono e todas as linhagens testadas (CAT-1, PE-2, VR-1, SA-1, UFMG-1007 e UFPE-178) mostraram capacidade de utilizar e fermentar esse açúcar (Figura 8), indicando total funcionalidade dos genes *MAL*, necessários para a metabolização desse açúcar (Rautio & Londesborough, 2003).

Nossos resultados mostraram crescimento com produção de etanol de todas as cepas nos meios contendo 2% maltose, chegando à fase estacionária em torno de 15-30 horas de

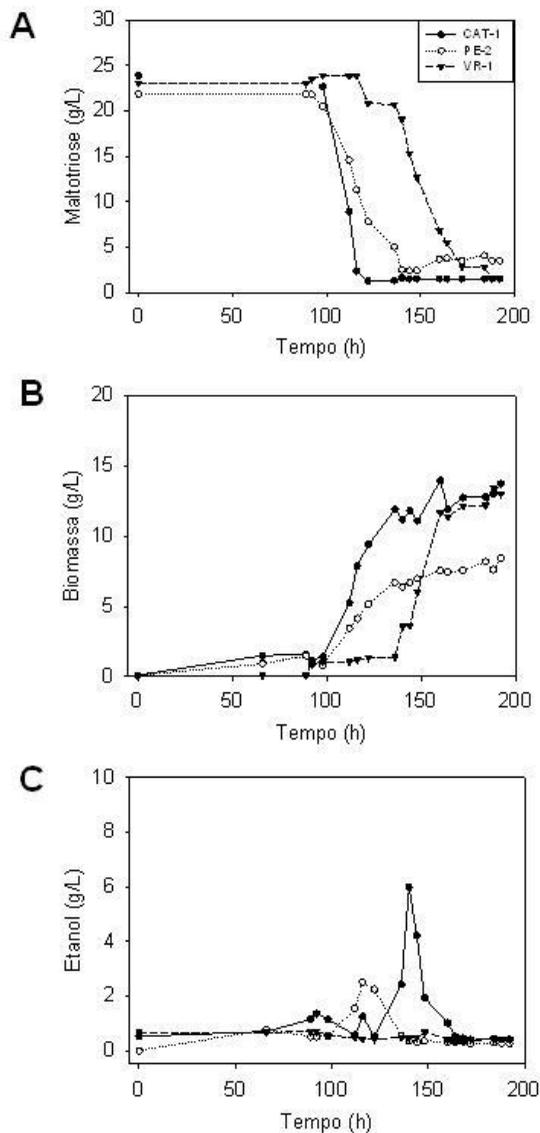


**Figura 8: Metabolização de maltose pelas cepas industriais.** As linhagens CAT-1, PE-2, SA, VR-1, UFMG-1007 e UFPE-178 foram avaliadas em relação ao (A) consumo de maltose; (B) produção de biomassa; e (C) produção de etanol durante o crescimento em meio YP-2% maltose.

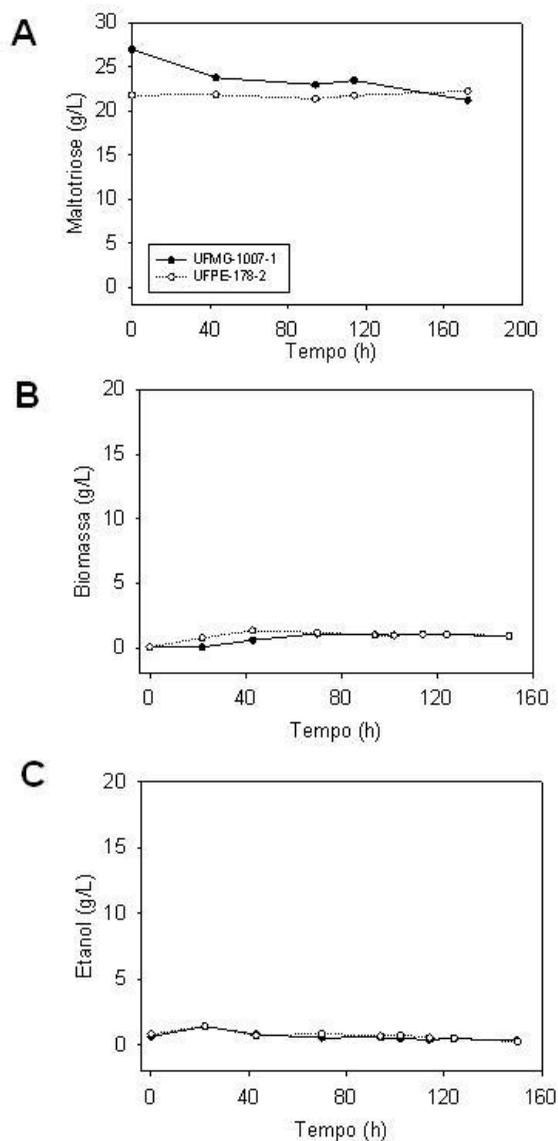
incubação, com consumo total do açúcar disponível e produção de etanol (Figura 8). Após terminarem os açúcares no meio, houve uma parada no crescimento celular e as leveduras iniciaram a seguir o consumo e respiração do etanol produzido durante a fermentação (Figura 8). Isso ocorre devido ao término da repressão promovida pela presença da fonte de carbono, permitindo que as leveduras passem a respirar os produtos da fermentação (Lewis *et al.*, 1993).

Já, a análise da utilização de maltotriose pelas linhagens industriais, revelou padrões extremamente variáveis em relação ao consumo e fermentação deste açúcar, apesar da eficiente fermentação da maltose. Algumas cepas (CAT-1, PE-2 e VR-1) apresentaram utilização lenta ou tardia de maltotriose (Figura 9), enquanto que as cepas UFPE-178 e UFMG-1007 foram incapazes de utilizar este açúcar como fonte de carbono (Figura 10). Este é um dos grandes problemas encontrados em muitas cervejarias, pois a incompleta utilização da maltotriose provoca uma alta concentração de açúcares fermentáveis no final do processo, baixa produção de etanol e aromas atípicos no produto final (Zheng *et al.*, 1994b). Ao analisarmos em maiores detalhes as cepas CAT-1, PE-2 e VR-1 (Figura 9) quando crescidas em maltotriose, foi verificado que o crescimento não só ocorre após uma extensa fase *lag* (em torno de 120 horas de incubação), como também a produção de etanol a partir de maltotriose é muito variável. A linhagem VR-1 mostrou um padrão de utilização de maltotriose totalmente aeróbio, sem produção de etanol (Figura 9C), característica já descrita para algumas linhagens industriais de *S. cerevisiae* (Zastrow *et al.*, 2000; 2001). Já a linhagem PE-2 produziu pouquíssimo etanol, quando comparada com a linhagem CAT-1 (Figura 9C). Este resultado está de acordo com o reportado por Berbert de Amorim Neto e colaboradores (2009), que indicam a linhagem CAT-1 (entre várias linhagens industriais brasileiras utilizadas na produção de álcool combustível analisadas) como a mais apropriada para fermentar hidrolisados de malte (ricos em maltose e maltotriose) utilizados na produção de Whisky escocês.

Os resultados encontrados em relação à tardia utilização de maltotriose indicaram um novo fenótipo em relação ao metabolismo deste açúcar. Londesborough (2001) mostrou que cepas de levedura industriais poderiam apresentar uma fase *lag* maior (20-30 h) durante o crescimento em maltotriose, especialmente quando as células eram pré-crescidas em glicose. Entretanto, o padrão de utilização de maltotriose, observado nas cepas analisadas no presente trabalho, é diferente, não só pela fase *lag*



**Figura 9: Metabolização de maltotriose pelas cepas CAT-1, PE-2 e VR-1.** As linhagens pré-crescidas em maltose foram avaliadas em relação ao (A) consumo do açúcar, (B) produção de biomassa e (C) produção de etanol durante o crescimento em meio YP-2% maltotriose.



**Figura 10: Metabolização de maltotriose pelas cepas UFMG-1007 e UFPE-178.** As linhagens pré-crescidas em maltose foram avaliadas em relação ao (A) consumo do açúcar, (B) produção de biomassa e (C) produção de etanol durante o crescimento em meio YP-2% maltotriose.

significativamente mais extensa, como pelo fato das células terem sido pré-crescidas em maltose, um açúcar não repressor e sim, indutor dos genes *MAL*.

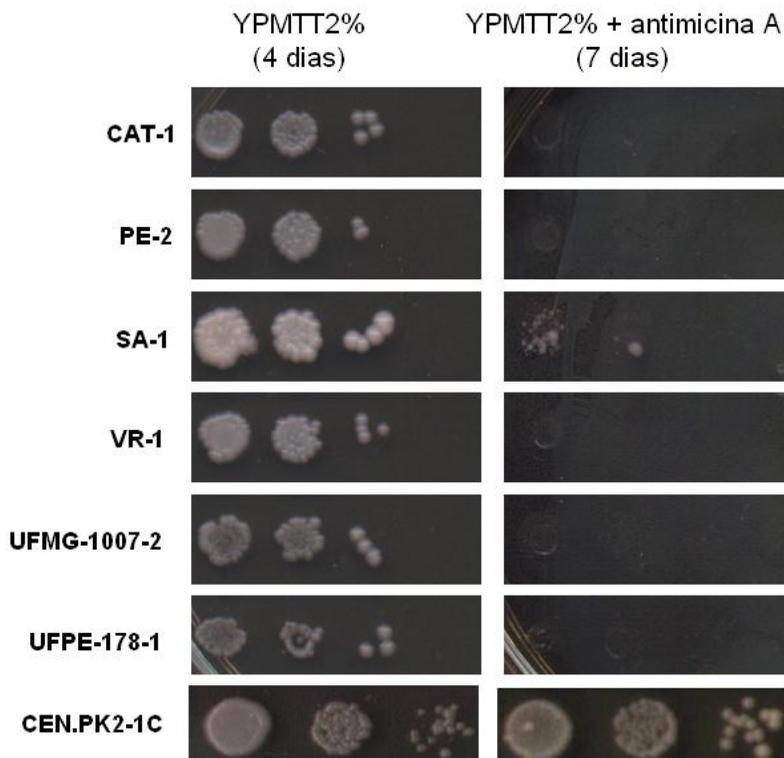
A seguir, foi analisado o efeito do inibidor mitocondrial antimicina A na utilização de maltotriose pelas linhagens. Cepas de *S. cerevisiae* com metabolismo respiratório em um açúcar (incluindo maltotriose) têm seu crescimento inibido quando antimicina A é adicionado ao meio (Malluta *et al.*, 2000; Zastrow *et al.*, 2000; 2001; Jules *et al.*, 2004). Porém, quando as leveduras são crescidas em açúcares fermentáveis (p.ex. glicose ou maltose) como fonte de carbono, o mesmo efeito não é observado (Zastrow *et al.*, 2001; Dietvorst *et al.*, 2005; Salema-Oom *et al.*, 2005). Quando incubadas em meios ricos YP-2% maltotriose, as cepas industriais analisadas apresentaram crescimento abundante em 4 dias (Figura 11), porém, quando adicionado ao meio 3 mg/L de antimicina A, mesmo após 7 dias de incubação não houve crescimento nesta fonte de carbono (Figura 11). As mesmas cepas, quando inoculadas em meios ricos YP contendo 2% maltose ou glicose, na presença de antimicina A, não tiveram o crescimento inibido (dados não mostrados).

Cabe salientar que a única cepa que apresentou poucas colônias no meio de maltotriose com antimicina A foi a linhagem SA (Figura 11). De fato, essa linhagem foi capaz de crescer mais rapidamente em maltotriose do que o restante de cepas industriais analisadas (dados não mostrados). Entretanto, após analisar vários isolados distintos desta linhagem, verificou-se que a capacidade de fermentar maltotriose foi extremamente variável, indicando possíveis variações fenotípicas (e/ou genômicas) entre os isolados, ou ainda, provavelmente esta linhagem (fornecida pelo Centro de Tecnologia Canaveira) não é uma cultura pura. Com base nestes resultados extremamente variáveis, a cepa SA passou a ser excluída das outras análises realizadas neste trabalho.

## **4.2 ANÁLISE DOS GENES *MALx1* E *AGT1* NO GENOMA DAS LINHAGENS INDUSTRIAIS**

A análise dos transportadores *MAL* nas linhagens industriais, através de eletroforese dos cromossomos e hibridização com sondas específicas para os genes *MALx1* e *AGT1*, revelaram a presença de vários genes que codificam para transportadores de  $\alpha$ -glicosídeos nestas cepas industriais (Figura 12). As cepas VR-1, UFMG-1007 e UFPE-178 possuem o gene *MAL11* no cromossoma

VII e o gene *MAL31* no cromossomo II. Padrão semelhante de genes *MALx1* (*MAL11* e *MAL31*) foi observado na linhagem CAT-1 (Alves Jr, 2010; Duval *et al.*, 2010; dados não mostrados). A linhagem PE-2 foi similar a estas cepas, mas também apresentou a permease *MAL41* no cromossomo XI (Figura 12).

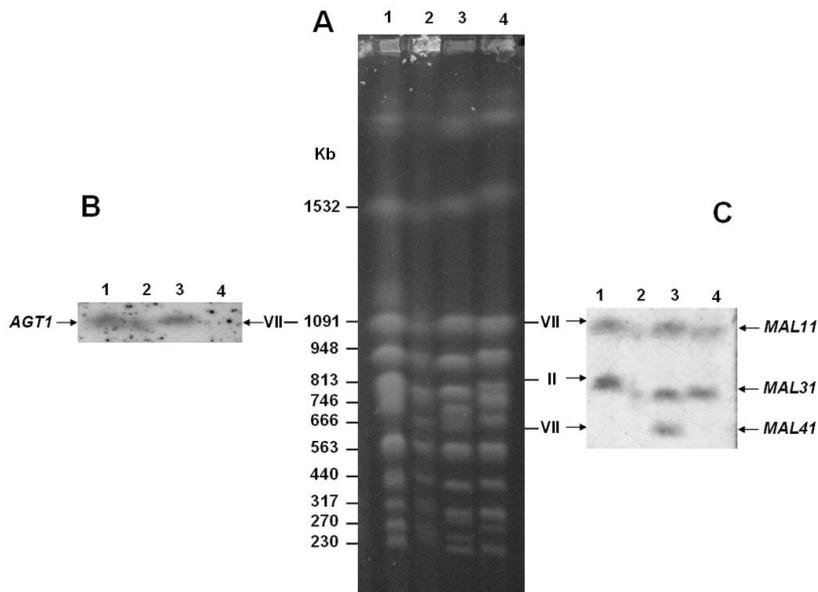


**Figura 11: Inibição do crescimento em maltotriose por antimicina A.**

Três diluições seriadas das cepas industriais de *S. cerevisiae* indicadas, incluindo a cepa de laboratório CEN.PK2-1C utilizada como controle, foram inoculadas em meios ricos YP-2% maltotriose e fotografadas após 4 dias de crescimento (esquerda), ou inoculadas no mesmo meio acrescido de 3 mg/L de antimicina A e fotografadas após 7 dias de incubação (direita).

Esses resultados explicam a eficiente capacidade apresentada pelas leveduras industriais de fermentar maltose (Figura 8), mas demonstram também que presença de vários genes *MALx1* (*MAL11*, *MAL31*, e *MAL41*) no genoma das leveduras não necessariamente permite o consumo eficiente de maltotriose (Figura 9 e 10) pelas cepas de *S. cerevisiae*. Estes resultados fortalecem o reportado por Alves Jr. *et al.* (2008), que ao testarem várias leveduras *MAL*-constitutivas apresentando as permeases codificadas pelos genes *MAL21*, *MAL31*, *MAL41* e/ou *MPH2* e *MPH3*, verificaram que estas não apresentavam capacidade de crescer em maltotriose. Mas, contrariam os resultados apresentados por Day *et al.* (2002b), que afirmaram que a maltotriose pode ser transportada, com a mesma afinidade do que a maltose, por transportadores *MALx1*. Por outro lado, Zastrow *et al.* (2001) observaram que as leveduras abrigam uma série de isoformas de maltase e que essas isoformas são induzidas tanto por maltose quando por maltotriose, aceitando ambos os açúcares como substrato. Esses resultados indicam que a hidrólise intracelular dos açúcares não explica as diferenças entre a utilização destes  $\alpha$ -glicosídeos. De qualquer forma, já foi demonstrado que a expressão constitutiva dos genes *MAL* promove uma melhor fermentação dos açúcares presentes em processos industriais, por incrementar a capacidade fermentativa das linhagens quando crescidas em maltose (Meneses & Jiranek, 2002).

De acordo com Alves Jr. *et al.* (2008), a presença do transportador codificado pelo gene *AGT1* é necessário para que as células de *S. cerevisiae* sejam capazes de fermentar a maltotriose. Fortalecendo a importância desse gene para a fermentação de maltotriose, James *et al.* (2003) verificaram uma alta expressão do gene *AGT1* no mosto de fermentação de cervejaria e a sobre-expressão deste gene permitindo transportar o açúcar com mais eficiência, o que melhora a fermentação de maltotriose por leveduras industriais (Stambuk *et al.*, 2006). Neste trabalho, a cepa VR-1 foi a única linhagem testada que não apresentou o gene desta permease no genoma (Figura 12) e, como pode-se notar pela Figura 9, esta cepa utiliza maltotriose após uma extensa fase *lag*, sem fermentar o açúcar, pois não foi capaz de produzir etanol a partir dessa fonte de carbono. De fato, algumas linhagens de levedura de laboratório, quando deletadas especificamente no gene *AGT1*, também passam a utilizar maltotriose aerobicamente após uma extensa fase *lag* (Duval *et al.*, 2010).



**Figura 12: Detecção dos genes *MALx1* e *AGT1* no genoma das leveduras. (A)** Gel corado com brometo de etídeo mostrando os cromossomas das cepas UFMG-1007 (linhas 1), UFPE-178 (2), PE-2 (3) e VR-1 (4), separados através de PFGE, e *Southern Blotting* com sonda para o gene *AGT1* (B) ou com sonda para os genes *MALx1* (C). À esquerda do gel mostrado em A encontram-se definidos os tamanhos dos cromossomas e à direita a numeração dos principais cromossomas contendo genes *MAL*.

Todas as outras cepas analisadas através de eletroforese dos cromossomos e hibridização com uma sonda específica para o gene *AGT1*, possuem pelo menos uma cópia deste gene no cromossomo VII (Figura 12), mostrando um genótipo bastante similar entre as linhagens, mesmo aquelas que apresentem lenta/tardia ou nenhuma utilização de maltotriose (Figura 9 e 10). Dados obtidos por Alves Jr. (2010), ao sequenciar o gene *AGT1* presente nas leveduras CAT-1 e PE-2, mostraram que a permease codificada pelo gene é aparentemente funcional (não apresenta mutações que truncam a sequência de leitura), indicando uma possível falha na região promotora do gene.

Devido à incapacidade de fermentar maltotriose, sugere-se que o crescimento aeróbio nesse açúcar (p.ex. pela linhagem VR-1)

seja mediado por glucoamilases extracelulares, capazes de hidrolisar maltotriose até glicose, como ocorre tipicamente em cepas de *S. cerevisiae var diastaticus* (Pretorius *et al.*, 1991; Vivier *et al.*, 1999). A utilização da glicose, formada a partir da lenta hidrólise da maltotriose, justificaria o crescimento nesse açúcar após uma extensa fase *lag*, já que as glucoamilases são geralmente expressas tardiamente durante crescimento de *S. cerevisiae var diastaticus* em amido (Pretorius *et al.*, 1991; Vivier *et al.*, 1999).

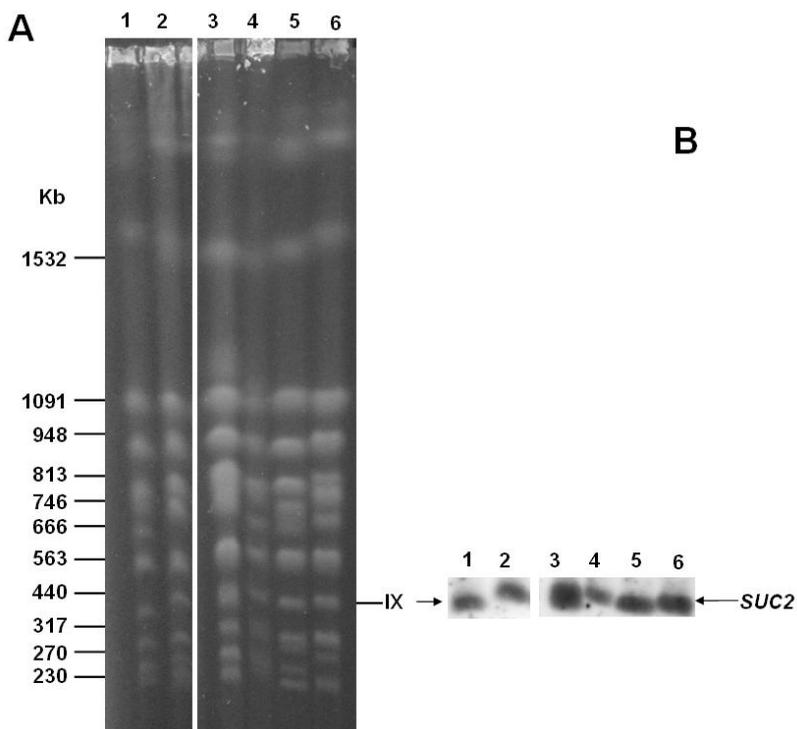
Os resultados acima, tanto em relação à presença dos genes para os transportadores *MALx1* quanto para a permease *AGT1*, estão de acordo com determinações do número de cópias destes genes no genoma das linhagens através de cariotipagem utilizando microarrays (Duval *et al.*, 2010). Por outro lado, mostram que algumas das linhagens industriais utilizadas na produção de álcool combustível no Brasil podem até possuir o gene *AGT1* no seu genoma, mas aparentemente este transportador de sacarose (Stambuk *et al.*, 2000; Batista *et al.*, 2004; Badotti *et al.*, 2006) não é funcional ou não é expresso, mesmo incubando as células em maltotriose.

#### **4.3 ANÁLISE DOS GENES *SUC* NO GENOMA DAS LINHAGENS INDUSTRIAIS**

Visando realizar modificações gênicas nas cepas industriais para otimizar a fermentação da sacarose, realizou-se uma análise cromossômica para verificar a presença dos genes *SUC* no genoma das células. Esta análise é necessária uma vez que uma série de trabalhos tem mostrado que linhagens industriais que normalmente são crescidas em melaço (p.ex. linhagens de panificação) ou ainda linhagens usadas na fermentação de melaço (p.ex. linhagens usadas para produção de bebidas destiladas) apresentam, além do gene sub-telomérico *SUC2*, vários outros genes *SUC* teloméricos amplificados no seu genoma (Benitez *et al.*, 1996; Naumov *et al.*, 1996; Codon *et al.*, 1998; Naumov & Naumova, 2010a).

A presença de várias cópias do gene *SUC* no genoma das leveduras industriais brasileiras, utilizadas na produção de álcool combustível a partir de caldo de cana-de-açúcar, inviabilizaria qualquer tentativa de modificar geneticamente a forma destas leveduras utilizarem sacarose. Entretanto, todas as cepas analisadas (CAT-1, PE-2, VR-1, UFMG-1007 e UFPE-178) apresentaram apenas um gene *SUC* no cromossoma IX (Figura 13),

num padrão semelhante ao observado na linhagem de laboratório S288C que possui apenas o gene *SUC2* no seu genoma (Figura 13 e [www.yeastgenome.org](http://www.yeastgenome.org)).



**Figura 13: Detecção dos genes *SUC* no genoma das linhagens. (A)** Gel corado com brometo de etídeo mostrando os cromossomas das cepas de laboratório S288C (linhas 1) e das linhagens industriais CAT-1 (2), UFMG-1007 (3), UFPE-178 (4), PE-2 (5) e VR-1 (6) separados através de PFGE e **(B)** *Southern Blotting* hibridizado com sonda para genes *SUC*, mostrando a presença do gene *SUC2* no cromossoma IX. À esquerda do gel mostrado em **A** encontram-se definidos os tamanhos dos cromossomas.

Este resultado indica que, nas condições industriais utilizadas para a produção de álcool combustível a partir de caldo de cana-de-açúcar no Brasil, provavelmente a hidrólise de sacarose pela invertase não é um fator limitante na fermentação deste açúcar

pelas leveduras. Cabe salientar que a não-amplificação do gene *SUC* nas leveduras industriais brasileiras ficou evidente quando o genoma destas linhagens foi analisado por Argueso *et al.* (2009) e Stambuk *et al.* (2009), confirmado também pelos resultados apresentados na Figura 13.

#### 4.4 SUBSTITUIÇÃO DO GENE *SUC2* NA CEPA INDUSTRIAL CAT-1

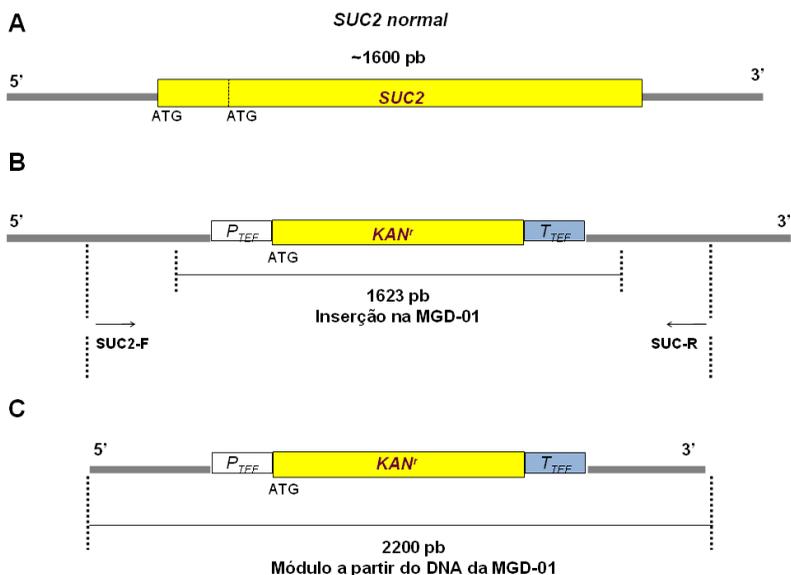
Após verificar a presença apenas uma cópia do gene *SUC2* no genoma das leveduras industriais, inicialmente tentou-se substituir este gene do genoma da linhagem CAT-1 (esta linhagem industrial foi escolhida por ser a que apresentou a maior produção de etanol a partir de maltotriose, embora com todas as dificuldades já discutidas), sendo substituído pelo gene *Kan<sup>r</sup>* através de técnicas baseadas em PCR e recombinação homóloga (vide Materiais e Métodos e Figura 7).

Esta estratégia já tinha sido utilizada com sucesso por Dário (2007) em uma linhagem de laboratório (CEN.PK2-1C), produzindo a linhagem MGD-01 (*suc2Δ::kanMX6*) que, apesar de não possuir atividade invertase, continua fermentando sacarose eficientemente. Com este objetivo, utilizando-se o plasmídeo pFA6a-kanMX6 e os iniciadores *SUC2-F1* e *SUC2-R1* (vide Tabela 2), ambos com 20 pb de homologia ao plasmídeo e na extremidade 5' aproximadamente 40 pb de homologia às regiões flanqueadoras do gene *SUC2* (Dário 2007), foi produzido um fragmento de DNA linear contendo o gene *Kan<sup>r</sup>* (confere resistência a geneticina), flanqueado por seqüências com homologia à região promotora e à região após o gene *SUC2*. Após modificar a linhagem CAT-1 com este módulo de transformação, duas colônias (linhagens EHD-01 e EHD-02) foram obtidas em placas contendo o antibiótico geneticina (G-418). Entretanto, ao serem submetidas ao PCR de verificação e à análise cromossomal e hibridização com sondas específicas (para os genes *SUC* e *Kan<sup>r</sup>*), os resultados indicaram que a substituição do gene *SUC2* pelo *Kan<sup>r</sup>* não havia ocorrido. Este resultado é diferente daquele reportado por Remize e colaboradores (2000) que, utilizando a mesma estratégia acima, foram capazes de substituir duas cópias do gene *ALD6* presentes no genoma de uma linhagem industrial (haplóide) utilizada na fabricação de vinho.

O motivo pelo qual não foi possível substituir especificamente o gene *SUC2* na linhagem CAT-1 através desta estratégia é

desconhecido, mas acredita-se na deficiência apresentada pelas linhagens industriais diplóides em realizar recombinação com seqüências curtas de homologia à região de interesse no(s) seu(s) cromossoma(s). Assim, foi necessário modificar a estratégia de transformação genética na linhagem industrial.

Com este objetivo, os iniciadores SUC2-F e SUC2-R (vide Tabela 2) foram utilizados para produzir por PCR, a partir da região genômica da levedura MGD-01 já modificada (*suc2Δ::kanMX6*), um fragmento linear de DNA de aproximadamente 2200 pb contendo externamente longas regiões de homologia às regiões a montante (450 pb) e a jusante (160 pb) do gene *SUC2* e, internamente o gene *Kan<sup>r</sup>*, substituindo parcialmente o gene *SUC2* (Figura 14) e conferindo resistência à geneticina.

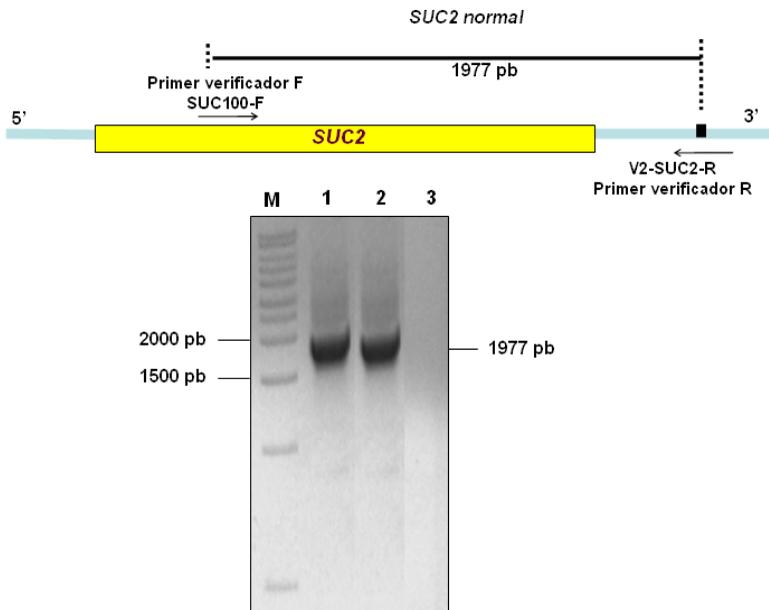


**Figura 14: Estratégia para construção do módulo de transformação da linhagem industrial CAT-1. (A)** estrutura do gene *SUC2* normal (~1600 pb); **(B)** gene *SUC2* deletado (*suc2Δ::KanMX6*) na cepa de laboratório MGD-01 e local de anelamento dos iniciadores para construção do módulo para transformar a linhagem industrial com regiões longas de homologia; **(C)**: módulo de transformação (2200 pb) produzido a partir do DNA da linhagem MGD-01.

Utilizando esta nova estratégia de modificação (longas regiões de homologia, a partir do DNA genômico de uma cepa de laboratório previamente transformada) com a linhagem CAT-1 foram obtidas quatro cepas transformantes (EHD-03, EHD-04, EHD-05 e EHD-06, Tabela 1) nas quais uma cópia do gene *SUC2* em um dos cromossomas IX foi substituída pelo marcador *kan<sup>r</sup>*, enquanto que no outro cromossoma IX o gene *SUC2* permaneceu inalterado. É importante salientar que a linhagem CAT-1, bem como várias outras linhagens industriais brasileiras analisadas no presente trabalho, são linhagens diplóides normais (sem aneuploidias) de *S. cerevisiae* possuindo, portanto, duas cópias de cada cromossoma (Argueso *et al.*, 2009). Após a seleção em meios contendo geneticina, as células transformadas foram analisadas por PCR com os iniciadores de verificação V2-SUC2-R e V-kan<sup>r</sup>-F e/ou SUC100-F, a fim de confirmar a substituição (além da presença de uma cópia normal do gene *SUC2*) no seu genoma. Enquanto que a presença do gene *SUC2* pode ser visualizada na cepa parental (CAT-1) e também na modificada geneticamente (p.ex. EHD04) através de uma banda de ~1977 pb quando usados os iniciadores V-SUC100-F e V2-SUC2-R (Figura 15), a presença do gene *Kan<sup>r</sup>* substituindo o *SUC2* foi possível de verificar apenas nas cepas modificadas (banda de ~1170 pb quando usados os iniciadores V-kan<sup>r</sup>-F e V2-SUC2-R, vide Figura 16), mostrando a substituição de somente uma cópia do gene na linhagem EHD04.

Recentemente, algumas leveduras industriais têm sido modificadas através de recombinação homóloga, utilizando também fragmentos com regiões de homologia longas. Por exemplo, Zhang e colaboradores (2008), a fim de diminuir a produção de diacetil durante a produção de cerveja, introduziram o gene marcador *LSD1* (gene que codifica para uma dextranase de *Lipomyces starkeyi*) no genoma de uma levedura industrial de *S. cerevisiae*, interrompendo o gene *ILV2* (gene que codifica para a  $\alpha$ -acetolactato sintetase) e tornando as leveduras modificadas capazes de crescer usando dextranas como fonte de carbono. Com este objetivo, foi utilizado um fragmento de DNA linear de 4.600 pb (*ILV2-L-P<sub>PGK1</sub>-LSD1-ILV2-R*) obtido a partir de uma construção feita em um plasmídeo. Em um trabalho seguinte, com o objetivo de limitar a produção de acetoaldeído durante a produção de cerveja com baixas calorias, o mesmo grupo introduziu o módulo *P<sub>PGK1</sub>-MF $\alpha$ -SGA1* (construção que permite a sobre-expressão e secreção do gene que codifica para a glucoamilase de *S. cerevisiae*) para substituir o gene *ADH2* (gene que codifica para a álcool desidrogenase). Para isso, cepas

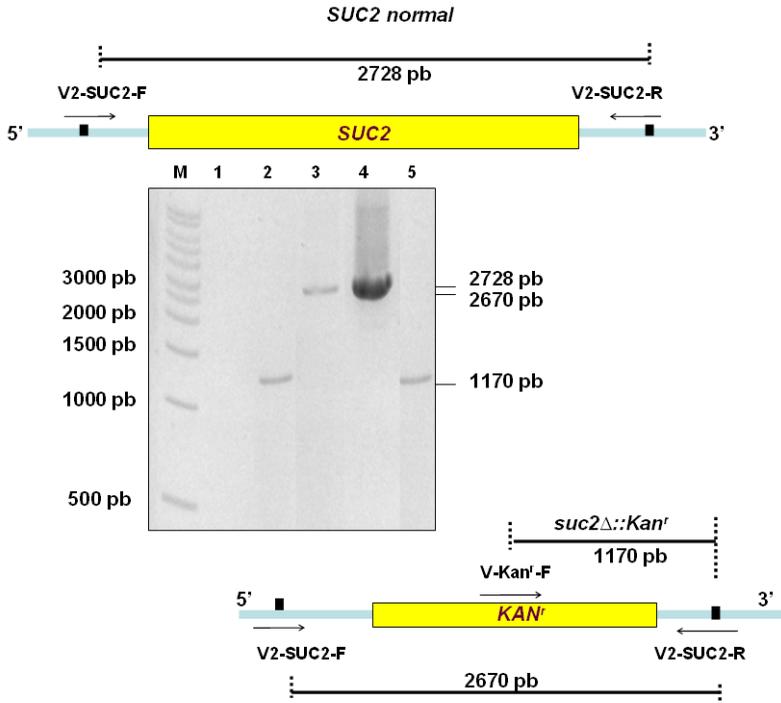
recombinantes *adh2Δ* foram geradas utilizando um cassete de transformação de 5.000 pb (*ADH2-L-CUP1-P<sub>PGK1</sub>-MFα-SGA1-ADH2-R*), linearizado a partir de um plasmídeo, sendo a seleção dos transformantes promovida pela resistência ao cobre proporcionada pelo gene *CUP1* (Wang *et al.*, 2010).



**Figura 15: Confirmação da presença do gene *SUC2* no genoma da linhagem EHD-04 transformada.** Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR. Iniciadores utilizados: V-SUC100-F e V2-SUC2-R. Coluna: M – marcador de peso molecular 1 Kb (Sigma); Coluna 1 – EHD-04; coluna 2 – CAT-1; coluna 3 – MGD-01.

Liu e colaboradores (2009) também transformaram cepas industriais de *S. cerevisiae* produtoras de cerveja, através de recombinação homóloga, interrompendo o gene *PEP4* (gene que codifica a enzima proteolítica proteinase A) pela integração do gene *GAI* (gene que codifica para uma glucoamilase de *Saccharomycopsis fibuligera*). Para isso, o fragmento de 5.000 pb *PEP4L-P<sub>PGK1</sub>-MFα-GAI-T<sub>ADH1</sub>-PEP4R*, com longas regiões de homologia ao gene *PEP4*, foi linearizado a partir de um plasmídeo e

inserido no genoma da levedura industrial, sendo as leveduras transformadas selecionadas em meio contendo amido como fonte de carbono.



**Figura 16: Confirmação da presença dos genes *SUC2* e *Kan<sup>r</sup>* no genoma da linhagem EHD-04 transformada.** Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR. Linhas: M – marcador de peso molecular 1 Kb (Sigma); coluna 1 – CAT-1 (iniciadores V-kan<sup>r</sup>-F e V2-SUC2-R); coluna 2 – MGD-01 (V-kan<sup>r</sup>-F e V2-SUC2-R); coluna 3 – EHD04 (V2-SUC2-F e V2-SUC2-R); coluna 4 – CAT-1 (V2-SUC2-F e V2-SUC2-R); coluna 5 – EHD04 (V-kan<sup>r</sup>-F e V2-SUC2-R).

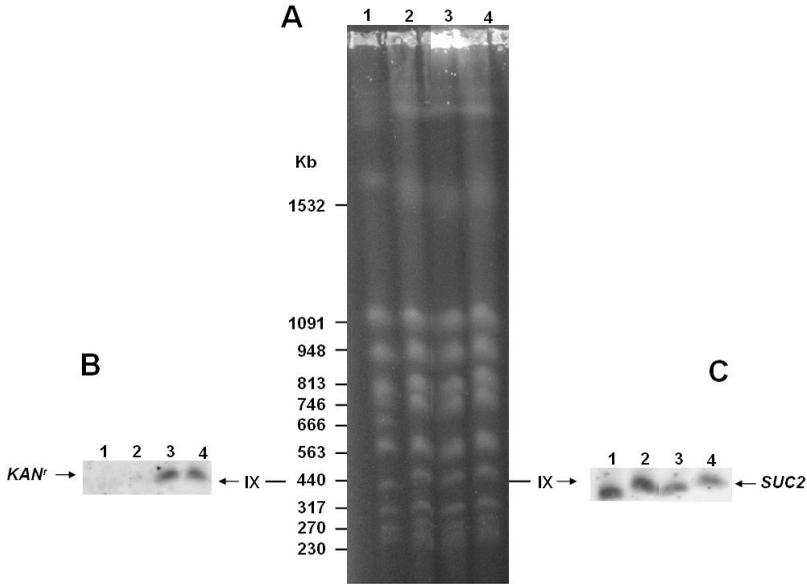
Alguns destes trabalhos mostraram a modificação de apenas uma cópia do gene de interesse em leveduras industriais diplóides. Wang e colaboradores (2010) ao verificarem, por PCR, a correta inserção do módulo *ADH2-L-CUP1-P<sub>PGK1</sub>-MFA-SGA1-ADH2-R* no locus do gene *ADH2* no genoma das leveduras transformadas,

notaram a presença de dois fragmentos de tamanhos diferentes (5.000 e 1.700 pb), indicando que apenas uma cópia do gene havia sido deletada. Verificaram ainda que a atividade da enzima álcool desidrogenase foi mantida, porém reduzida à metade quando comparada com a atividade apresentada pela linhagem parental, possuindo as duas cópias do gene intactas.

A análise da presença do gene *SUC2* e do gene *Kan<sup>r</sup>* através de eletroforese dos cromossomos e hibridização com sondas específicas (Figura 17), confirmaram os resultados apresentados quando o PCR foi utilizado (Figuras 15 e 16). Inclusive, é importante salientar que na Figura 17 a intensidade da banda correspondente ao gene *SUC2* no cromossoma IX das linhagens não modificadas (S288C e CAT-1), é visivelmente mais intensa do que no mesmo cromossoma nas linhagens *suc2Δ::Kan<sup>r</sup>*, uma vez que o outro cromossoma apresenta o gene *KanMX6* no lugar de uma das cópias do gene *SUC2*.

#### **4.5 CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DA LINHAGEM INDUSTRIAL EDH-04 DELETADA EM UMA CÓPIA DO GENE *SUC2***

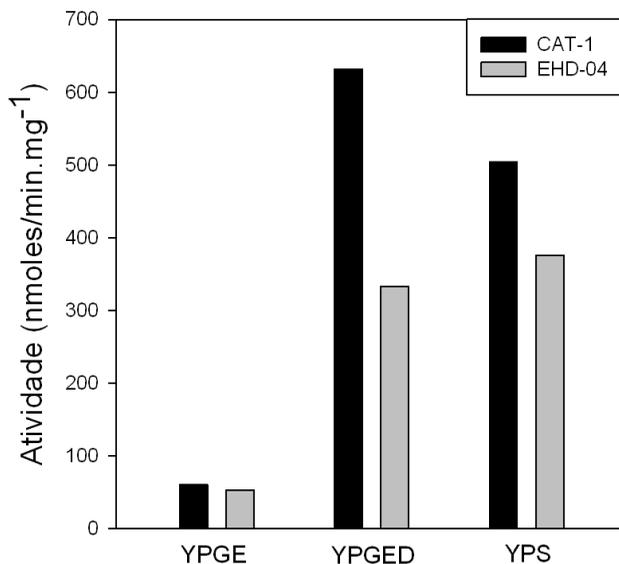
Como mostrado anteriormente, na linhagem industrial geneticamente modificada EHD04, uma das cópias do gene *SUC2* no cromossoma IX foi deletada e substituída pelo gene *KanMX6*, conferindo às células resistência à geneticina. Fazia-se, portanto, necessário verificar o impacto que esta modificação teria na expressão da invertase, bem como na fermentação da sacarose pela linhagem EHD04. Na Figura 18 é possível verificar que, quando comparada à linhagem parental CAT-1, a linhagem EHD04 apresenta uma atividade invertase que corresponde a, aproximadamente, metade daquela encontrada na sua parental quando as células foram crescidas em meio YP-2% sacarose e também inferior àquela encontrada na cepa CAT-1 quando crescidas na melhor condição conhecida para induzir a expressão da invertase, sendo meios YP contendo 3% glicerol, 2% etanol e 0,1% glicose (Ozcan *et al.*, 1997; Dynesen *et al.*, 1998; Herwig *et al.*, 2001). Quando as células foram crescidas em apenas 3% glicerol e 2% etanol não foi observada diferença entre as linhagens, embora nesta condição a atividade invertase seja menor do que a observada nos outros dois meios descritos acima (Figura 18).



**Figura 17: Detecção dos genes *SUC2* e *Kan<sup>r</sup>* no genoma das leveduras industriais transformadas. (A) Gel corado com brometo de etídeo mostrando os cromossomas das cepas S288C (linhas 1), CAT-1 (2), EHD03 (3) e EHD04 (4) e *Southern Blotting* (B) hibridizado com sonda para o gene de resistência a geneticina (*KAN<sup>r</sup>*), mostrando a presença do gene no cromossoma IX, e (C) hibridizado com sonda para o gene *SUC2*, mostrando sua presença no cromossomo IX.**

Para analisar a capacidade de crescimento das linhagens modificadas em condições semelhantes às oferecidas nas fermentações em batelada, foram realizados cultivos em frascos agitados, com altas concentrações de células (~10 g/L). A Figura 19 mostra o perfil de consumo da sacarose pelas cepas CAT-1 e EHD-04 em meios contendo 20 g/L de açúcar, mostrando que as células consumiram o açúcar disponível no meio em ~1 hora, com a presença dos produtos de hidrólise no meio (glicose e frutose), os quais passaram também a serem consumidos na primeira hora de incubação, além do etanol, produto da fermentação do(s) açúcar(es). No caso dos cultivos em altas concentrações de açúcar (~200 g/L de sacarose), para que a produção de etanol chegasse ao máximo e para que todo o açúcar disponível fosse consumido, foram necessárias em torno de 6 horas para ambas as linhagens (Figura

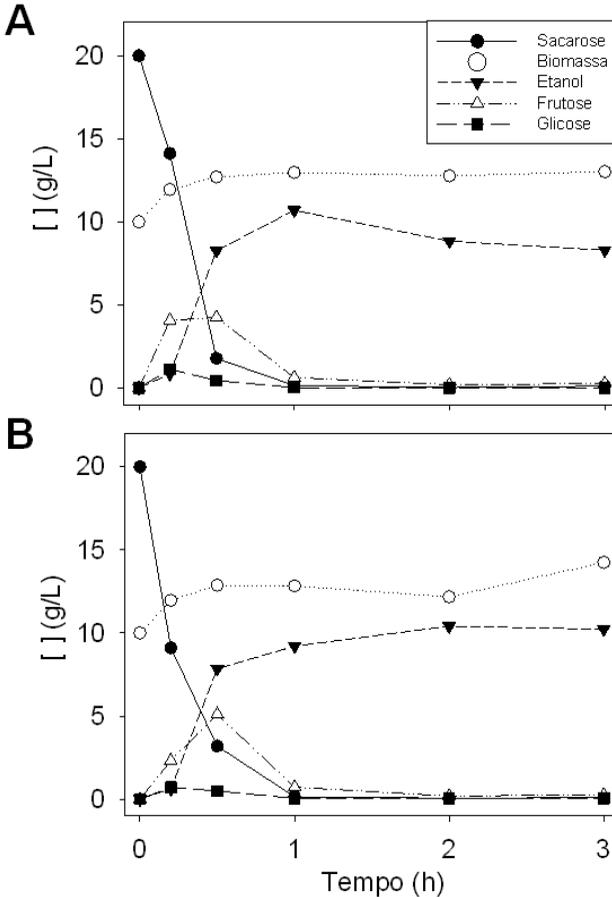
20). Novamente, estes resultados indicam que a atividade invertase nas células de levedura não é o fator limitante na fermentação deste açúcar, uma vez que linhagens industriais diplóides com apenas um gene *SUC2* (p.ex. cepa EHD-04), continuam fermentando sacarose eficientemente.



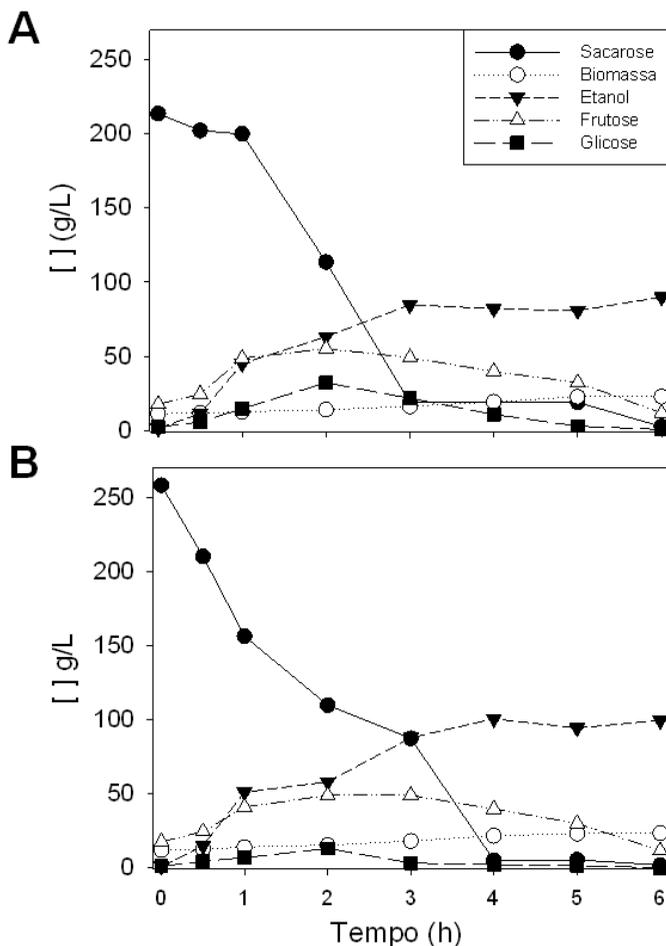
**Figura 18: Atividade invertase nas linhagens industriais.** A atividade invertase periplasmática foi determinada na cepa parental CAT-1 (*SUC2/SUC2*) e na transformante EHD04 (*SUC2/suc2Δ::kan<sup>r</sup>*), após crescimento das células em meio rico YP contendo 3% glicerol e 2% etanol 2% (YPGE), nesse mesmo meio acrescido de 0,1% glicose (YPGED) ou em meio YP-2% sacarose (YPS).

Durante o desenvolvimento das linhagens EHD03 e EHD04, cepas de levedura resistentes à geneticina por possuírem o módulo *suc2Δ::kanMX6* inserido no cromossoma IX, surgiu a idéia de usar este gene marcador para acompanhar a linhagem modificada durante processos fermentativos industriais com reciclo de células que, como salientado na introdução, se caracterizam por uma intensa competição entre diferentes linhagens, algumas das quais tendem a dominar e persistir nos fermentadores. Assim, estas duas linhagens foram cedidas em colaboração à empresa FERMENTEC

Ltda (Piracicaba, SP), para avaliar seu possível uso em fermentações industriais, incluindo estudos da dinâmica de populações nas condições industriais de produção de álcool combustível no Brasil.



**Figura 19: Cultivo em frascos agitados em 20 g/L de sacarose:** Células da linhagem industrial CAT-1 (A) ou sua transformante EHD-04 (B), pré-crescidas em meio YP-2 % sacarose, foram utilizadas para testar a capacidade fermentativa em 20 g/L de sacarose em meio rico YP e a concentração dos açúcares, células e etanol determinados no meio de cultura ao longo do tempo.



**Figura 20: Cultivo em frascos agitados em ~200 g/L de sacarose:** Células da linhagem industrial CAT-1 (**A**) ou sua transformante EHD-04 (**B**), pré-crecidas em meio YP-2% sacarose, foram utilizadas para testar a capacidade fermentativa ~200 g/L de sacarose em meio rico YP e a concentração dos açúcares, células e etanol determinados no meio de cultura ao longo do tempo.

Os resultados reportados pela FERMENTEC Ltda indicaram que a cepa EHD04, quando avaliada em fermentações industriais com reciclo do levedo em mostos contendo 19% de açúcares totais (50% melaço e 50% caldo de cana-de-açúcar), apresentou um rendimento de produção de etanol durante 8 ciclos fermentativos

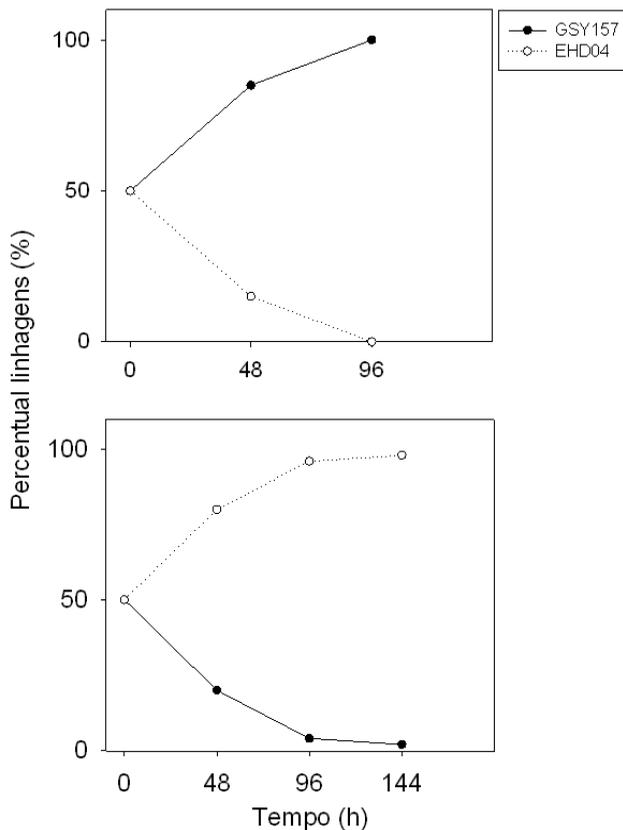
ligeiramente maior do que a linhagem CAT-1, produzindo menos glicerol. Também indicaram que estas linhagens geneticamente modificadas não sobrevivem ao processo de destilação utilizado para purificar o etanol, podendo ser utilizadas pelas indústrias na produção de etanol, apesar de apresentarem o marcador KanMX6, conferindo resistência à geneticina (Freiberger *et al.*, 2009). Atualmente estas linhagens estão sendo avaliadas quanto à dominância e persistência em fermentações que simulam o ambiente industrial.

De qualquer forma e, considerando que a presença do módulo KanMX6 integrado no genoma pode ser facilmente detectada e quantificada durante sucessivas fermentações pela resistência das células modificadas à geneticina adicionada ao meio de cultivo, a linhagem EHD04 foi utilizada em ensaios de competição entre uma linhagem industrial e uma linhagem diplóide de laboratório (cepa GSY-157, vide Tabela 1) em meios contendo glicose como fonte de carbono. Cabe salientar que durante o crescimento em glicose a expressão do gene *SUC2* é desnecessária e até dispensável, uma vez que a glicose normalmente reprime a expressão deste gene. Os resultados obtidos mostram a cepa industrial sendo totalmente dominada e substituída pela linhagem de laboratório após 96 horas de crescimento e repique em meio rico YP-2% glicose, em função da capacidade de adaptação das cepas de laboratório em meios ricos (Figura 21). Já em meio sintético YNB-2% glicose, meios mais próximos das condições industriais, a cepa EHD-04 foi capaz de dominar o meio de cultivo, de forma que após 168 horas (Figura 21) não existiam mais leveduras de laboratório (GSY-157) presentes na cultura.

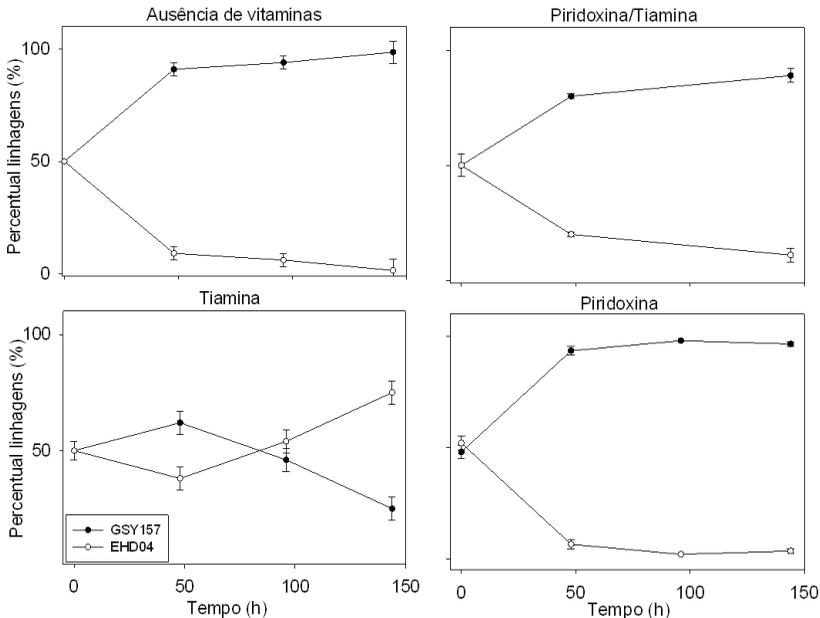
#### **4.6 CRESCIMENTO E DOMINÂNCIA EM MEIOS CONTENDO VITAMINAS B1 E B6**

Considerando que a análise do genoma de uma série de leveduras industriais brasileiras utilizadas na eficiente produção de álcool combustível, através de cariotipagem por *microarrays* (Stambuk *et al.*, 2009), indicou que as mesmas apresentavam amplificação dos genes teloméricos *SNO* e *SNZ* envolvidos na síntese de piridoxina e, conseqüentemente, tiamina (Rodriguez-Navarro *et al.*, 2002; Dong *et al.*, 2004; Fitzpatrick *et al.*, 2007; Neuwirth *et al.*, 2009), foi analisado o crescimento e a dominância da cepa industrial EHD04 e da cepa de laboratório GSY-157 em

meios de cultura definidos contendo várias combinações destas vitaminas.



**Figura 21: Competição entre as cepas diplóides de laboratório GSY-157 e industrial geneticamente modificada EHD04.** Quantidades iguais de células de cada linhagem foram misturadas e inoculadas em **(A)** meio rico YP-2% glicose, ou **(B)** meio sintético YNB-2% glicose e repicadas a cada 24 horas para novos meios de cultivo. Nos tempos indicados a proporção de cada linhagem na população foi determinada semeando as células em placas contendo meio rico YP-2% glicose acrescidos (ou não) de 200 mg/L de geneticina.

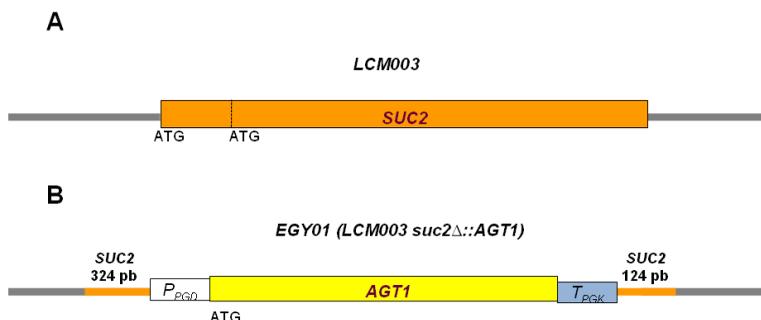


**Figura 22: Competição entre as cepas GSY-157 e EHD04 em meio sintético definido contendo diferentes vitaminas.** Quantidades iguais de células de cada linhagem foram misturadas e inoculadas em meios definidos contendo 20% glicose com as vitaminas indicadas (apenas tiamina, apenas piridoxina, tiamina e piridoxina, ou ausência das duas vitaminas), e repicadas a cada 24 horas para novos meios de cultivo. Nos tempos indicados a proporção de cada linhagem na população foi determinada semeando as células em placas contendo meio rico YP-2% glicose acrescidos (ou não) de 200 mg/L de geneticina.

#### 4.7 DESENVOLVIMENTO DE NOVOS MÓDULOS DE TRANSFORMAÇÃO DO GENE *SUC2*

No intuito de substituir no genoma de linhagens diplóides a outra cópia do gene *SUC2* presente nas linhagens industriais já modificadas em um dos cromossomas IX (*SUC2/ suc2Δ::kanMX6*), seria necessário usar um outro gene marcador conferindo resistência a outro antibiótico ou então um gene próprio de *S. cerevisiae*, podendo não ser apenas utilizado na construção de um módulo de , como também permitir a seleção das linhagens transformadas. Para que as leveduras possam fermentar

eficientemente sacarose através do transporte ativo do açúcar e posterior hidrólise intracelular é necessário a expressão constitutiva da permease *AGT1* (Stambuk *et al.*, 2000; Batista *et al.*, 2004; Badotti *et al.*, 2006) e, considerando que nas linhagens industriais brasileiras utilizadas na produção de álcool combustível este gene é aparentemente não-funcional (pela dificuldade apresentada por estas linhagens de fermentar maltotriose), foi desenvolvida uma nova estratégia de modificação dos genes *SUC* utilizando o próprio gene *AGT1* como módulo de transformação genética e seleção dos transformantes (Figura 23).



**Figura 23: Substituição do gene *SUC2* com o módulo contendo o gene *AGT1* sobreexpresso. A:** gene *SUC2* normal (laranja) com 1599 pb presente na cepa LCM003; **B:** gene *SUC2* parcialmente deletado (laranja) na linhagem EGY-01 (*suc2Δ::PPGD-AGT1-TPGK*).

Desta forma, um fragmento de DNA linear (~3.000 pb) foi construído a partir do plasmídeo pGRSd-*AGT1* ( $P_{PGD}$ -*AGT1*- $T_{PGK}$ ), que possui o gene *AGT1* flanqueado pelo promotor constitutivo  $P_{PGD}$  (promotor da fosfogluconato desidrogenase) e pela seqüência terminadora  $T_{PGK}$  da fosfoglicerato quinase, flanqueado por seqüências correspondentes ao início (preservando as primeiras 324 pb) e final (preservando os últimos 124 pb) do gene *SUC2*. Neste contexto, é importante mencionar que a presença de seqüências promotoras e terminadoras de genes distintos controlando a expressão do gene *AGT1* impedem que este gene se insira no locus da fosfogluconato desidrogenase ou da fosfoglicerato quinase (Figura 23). As seqüências do gene *SUC2* (324 pb iniciais e 124 pb finais) deixadas no genoma permitirão futuramente introduzir este módulo na linhagem EHD-04 já deletada numa cópia do *SUC2*

(neste caso, a recombinação homóloga só poderá acontecer no cromossoma IX contendo o gene *SUC2* normal).

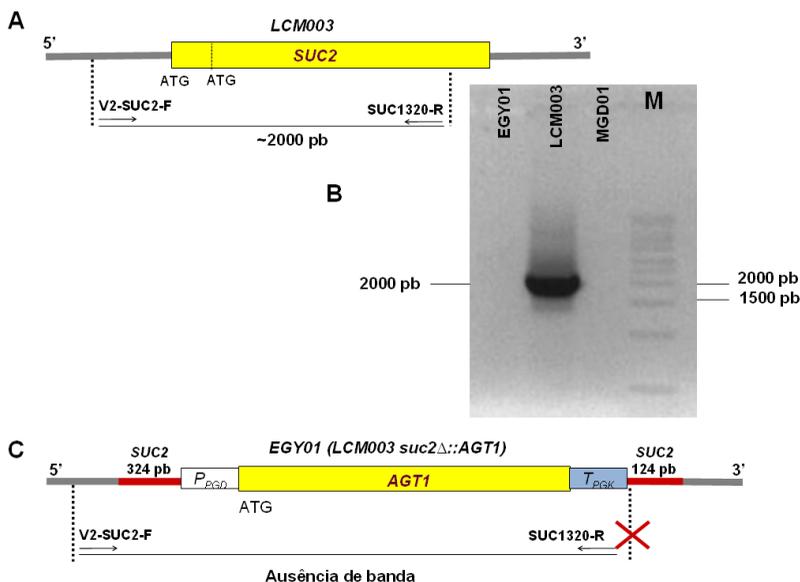
Como o uso de regiões curtas de homologia não permite realizar modificações genéticas específicas nas linhagens industriais, nossos resultados indicavam que as modificações teriam que ser realizadas inicialmente no genoma de uma linhagem haplóide de laboratório, para depois amplificar o módulo de transformação diretamente do cromossoma modificado. Assim, a linhagem de laboratório LCM003 (CEN.PK2-1C *agt1* $\Delta$ ::KanMX6) foi escolhida por não ser capaz de utilizar maltotriose como fonte de carbono (Alves Jr *et al.*, 2008). Após a transformação, as células selecionadas em meio sólido YP contendo 2% de maltotriose acrescido de 3 mg/L de antimicina A, foram analisadas por PCR a fim de confirmar a ausência do gene *SUC2* e a inserção do gene *AGT1* no genoma das células transformadas.

De fato, o gene *SUC2* foi observado apenas na cepa parental (LCM003) através de uma banda de 2.000 pb, usando os iniciadores de verificação V2-SUC2-F e SUC1320-R (Figura 24). Na cepa modificada geneticamente (EGY-01), foi observada uma banda de 1.850 pb quando foram utilizados os iniciadores AGT1-F e AGT1-R (Figura 25), confirmando a presença do gene *AGT1* no genoma da linhagem transformada (que era deletada neste gene) e uma banda de 3.355 pb, quando foram utilizados os iniciadores V-SUC2-F e AGT1-R, confirmando a inserção do gene do transportador no local correto (Figura 26).

A seguir foi determinada a atividade da invertase extracelular, bem como a atividade da permease *AGT1* (determinado com o substrato  $pNF\alpha G$ , conforme descrito por Hollatz & Stambuk, 2001) nas células da linhagem EGY-01 e sua parental LCM003, crescidas em meio rico YP-2% sacarose. Nossos resultados confirmaram que a linhagem transformada (EGY-01) não apresenta atividade invertase pela ausência do gene *SUC2*, porém apresenta uma alta atividade de transporte de  $pNF\alpha G$  devido à sobreexpressão do gene *AGT1* (Figura 27).

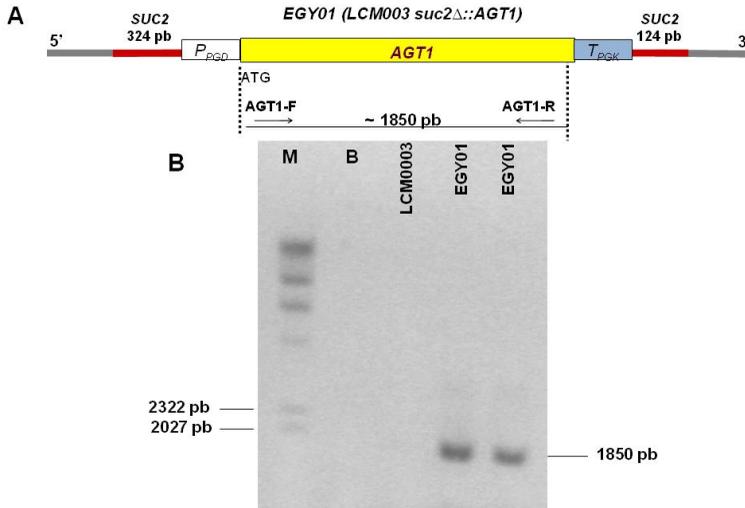
Como mencionado anteriormente, a linhagem modificada EGY-01 cresce utilizando sacarose como fonte de carbono, apesar de não possuir atividade invertase (Figura 27). Nesta linhagem a sacarose é metabolizada pelas leveduras em função do transporte para o interior da célula (pela atividade da permease *AGT1*, Figura 27) e, a posterior hidrólise intracelular deste açúcar ocorre pelas maltases codificadas pelos genes *MALx2* (Dário, 2007). De fato, na linhagem EGY-01 crescida em sacarose é possível observar uma

significativa atividade maltase intracelular, que também apresenta atividade de hidrólise de sacarose (Figura 28). Embora a linhagem LCM003 não apresente atividade maltase quando crescida em sacarose, em função da repressão dos genes *MALx2* pela presença de glicose no meio (produto de hidrólise da sacarose pela invertase), é observada uma significativa atividade invertase, mesmo no pH 6,8 utilizado para determinar a atividade maltase (hidrólise de sacarose, Figura 28).



**Figura 24: Confirmação da ausência do gene *SUC2* no genoma da linhagem EGY-01.** Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR utilizando os iniciadores V2-SUC2-F e SUC1320-R obtidos das linhagens EGY-01 (*suc2Δ::PPGD-AGT1-TPGK agt1Δ::KanMX6*), LCM003 (*SUC2 agt1Δ::KanMX6*) e MGD-01 (*suc2Δ::KanMX6 AGT1*). M – marcador de peso molecular 1 Kb (Sigma).

A seguir foram realizadas fermentações de sacarose em sistema de batelada com altas concentrações de células (10 g/L) para analisar a capacidade fermentativa da linhagem geneticamente modificada EGY-01.

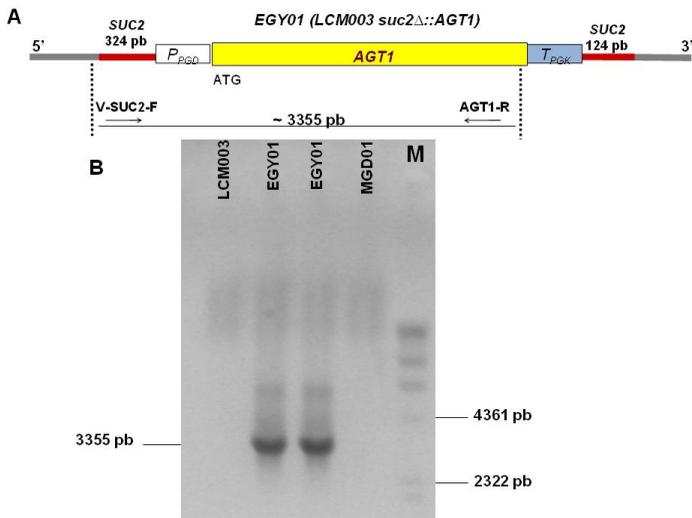


**Figura 25: Confirmação da presença do gene *AGT1* no genoma da linhagem EGY-01.** Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR utilizando os iniciadores AGT1-F e AGT1-R obtidos das linhagens EGY-01 (*suc2Δ::P<sub>PGD</sub>-AGT1-T<sub>PGK</sub> agt1Δ::KanMX6*) e LCM003 (*SUC2 agt1Δ::KanMX6*). M – marcador de peso molecular  $\lambda$ /HindIII (Sigma). B – poço vazio.

A Figura 29 mostra o perfil fermentativo de sacarose pelas cepas LCM003 e EGY-01 em meios contendo 20 g/L de açúcar. Estas células (LCM003 e EGY-01) consumiram e fermentaram eficientemente a sacarose disponível no meio em 1,5 horas (Figura 29). Enquanto que a presença dos produtos da hidrólise extracelular da sacarose (glicose e frutose) durante a fermentação pela linhagem parental LCM003 é evidente, não presença no meio, na cepa transformada EGY-01, confirma a presença do gene *SUC2* nesta linhagem (Figuras 29 e 30).

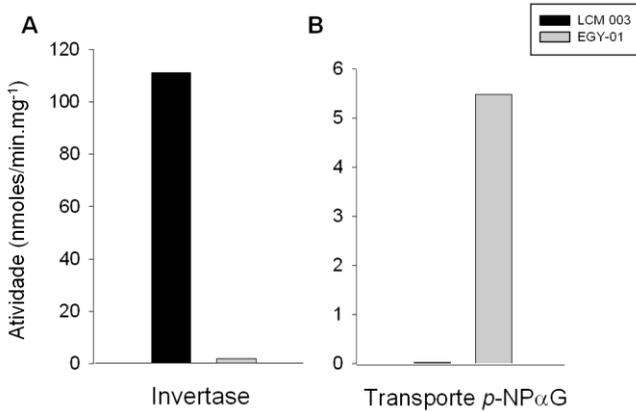
Já nas fermentações de altas concentrações de sacarose (>200 g/L), a cepa parental LCM003 consome a sacarose em aproximadamente 7 horas, liberando grandes quantidades de glicose e principalmente frutose no meio, que passam a ser consumidos e fermentados pelas células até as 18-20 horas de incubação (Figura 30, e dados não mostrados). Já a linhagem modificada geneticamente EGY-01 não foi capaz de consumir toda a sacarose presente no meio. Embora a fermentação da sacarose consumida nas primeiras horas tenha sido eficiente (sem presença

de glicose e frutose no meio), mesmo após 24 horas, em torno de 30% do açúcar não havia sido utilizado (Figura 30). Estes resultados corroboram os reportados por Dário (2007), que também observou fermentações incompletas quando a linhagem de laboratório MGD-01 deletada no gene *SUC2* (isogênica à LCM003 e EGY-01) foi incubada na presença de 200 g/L de sacarose.

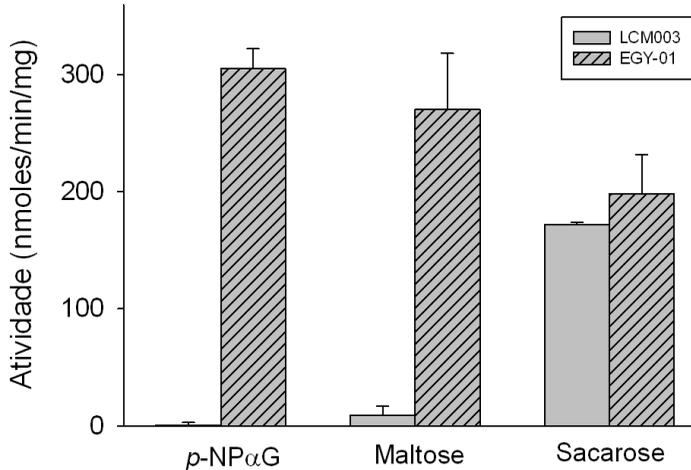


**Figura 26: Confirmação da inserção correta do gene *AGT1* no genoma da linhagem EGY-01.** Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR utilizando os iniciadores V-SUC2-F e AGT1-R obtidos das linhagens EGY-01 (*suc2Δ::P<sub>PGD</sub>-AGT1-T<sub>PGK</sub> agt1Δ::KanMX6*), LCM003 (*SUC2 agt1Δ::KanMX6*) e MGD-01 (*suc2Δ::KanMX6 AGT1*). M – marcador de peso molecular  $\lambda$ /HindIII (Sigma).

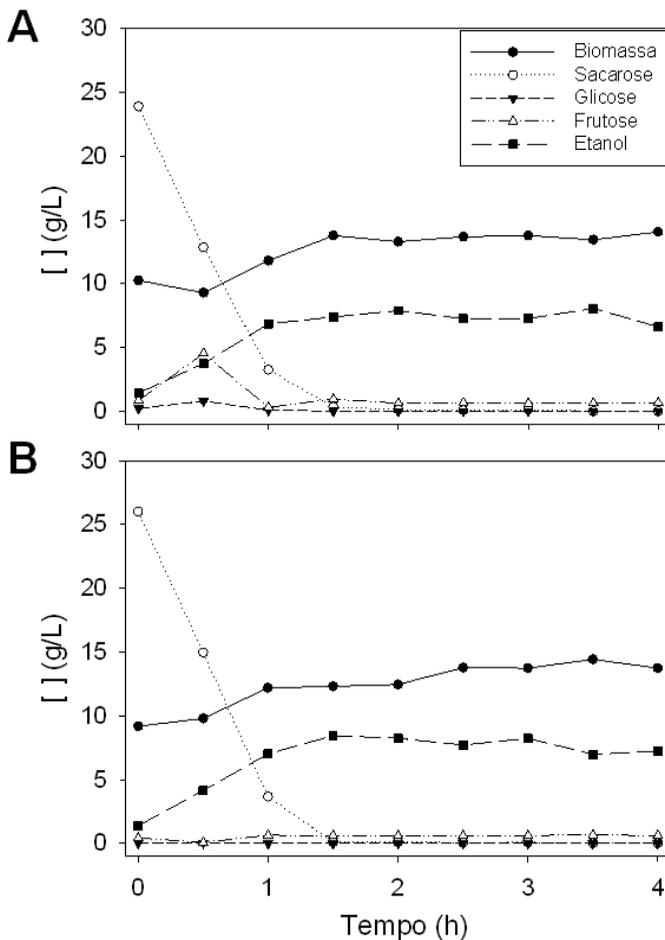
Resultados preliminares indicam que nestas condições (altas concentrações de sacarose) o açúcar não é consumido totalmente porque o transportador *AGT1* sofre o processo de inativação catabólica, isto é, o transportador é removido da membrana por endocitose e degradado no vacúolo (Hollatz & Stambuk, 2001; Stambuk, 2002, dados não mostrados). Este fenômeno aparentemente ocorre na linhagem EGY-01, que esta sobreexpressando a permease *AGT1*.



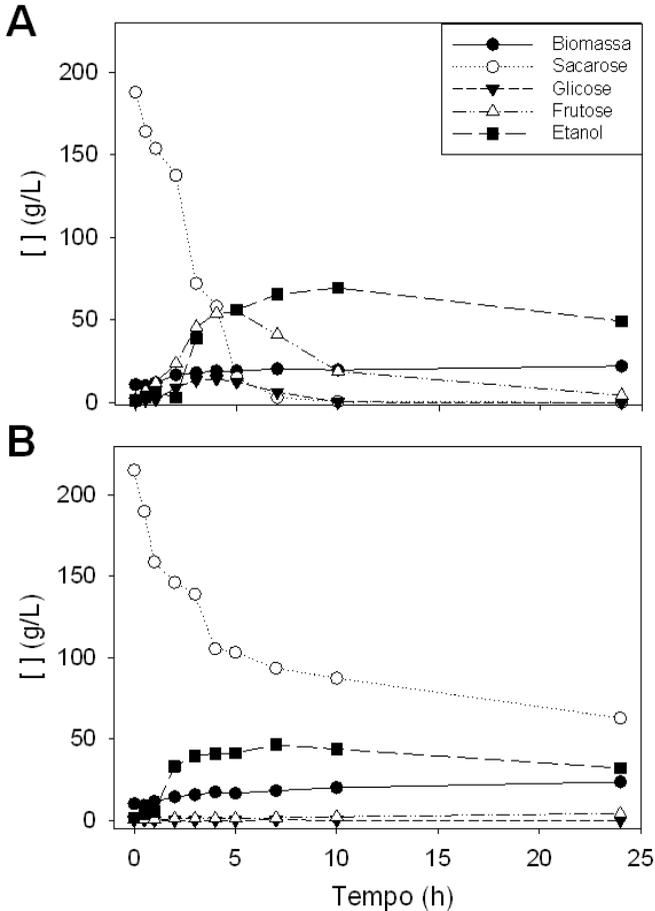
**Figura 27: Atividade invertase periplasmática e do transportador *AGT1* na linhagem modificada EGY-01.** A atividade de hidrólise de sacarose (A) e de transporte de *p*NPαG (B) foi determinado na linhagem de laboratório LCM003 (*SUC2 agt1Δ::KanMX6*) e sua derivada EGY-01 (*suc2Δ::PPGD-AGT1-TPGK agt1Δ::KanMX6*), crescidas em meio rico YP-2% sacarose.



**Figura 28: Atividade α-glicosidase na linhagem modificada EGY-01.** A atividade maltase intracelular foi determinada em células permeabilizadas da linhagem de laboratório LCM003 e sua derivada EGY-01, crescidas em YP-2% sacarose, utilizando *p*-NPαG, maltose ou sacarose como substrato.



**Figura 29: Cultivo em frascos agitados em 20 g/L de sacarose pela cepa modificada EGY-01.** Células da linhagem parental LCM003 (A) ou sua transformante EGY-01 (B), pré-crescidas em meio YP-2% sacarose, foram utilizadas para testar a capacidade fermentativa em 20 g/L de sacarose em meio rico YP, e a concentração dos açúcares, células e etanol determinados ao longo do tempo.



**Figura 30: Cultivo em frascos agitados em ~200 g/L de sacarose pela cepa modificada EGY-01.** Células da linhagem parental LCM003 (A) ou sua transformante EGY-01 (B), pré-crecidas em meio YP-2% sacarose, foram utilizadas para testar a capacidade fermentativa em ~200 g/L de sacarose em meio rico YP, e a concentração dos açúcares, células e etanol determinados ao longo do tempo.

Entretanto, esta característica parece ser cepa-dependente, uma vez que outras linhagens de *S. cerevisiae* sem atividade invertase (e *MAL* constitutivas) fermentam normalmente 200 g/L de sacarose (Badotti *et al.*, 2008). Aparentemente, os níveis de hidrólise de sacarose são críticos para fermentar altas

concentrações deste açúcar, já que as linhagens sem invertase, que fermentam altas concentrações de sacarose eficientemente, apresentam atividades de maltase maiores do que as observadas na linhagem de laboratório CEN.PK2-1C e suas derivadas (Badotti *et al.*, 2006).

Os resultados apresentados neste estudo mostraram linhagens de laboratório modificadas geneticamente, possuindo o gene *SUC2* substituído com um módulo de transformação contendo o gene do transportador *AGT1* sobreexpresso como marcador. Esperamos que num futuro próximo esta estratégia, incluindo o uso de regiões flanqueadoras longas para facilitar a recombinação homóloga, permita obter linhagens industriais brasileiras utilizadas na produção de álcool combustível sem atividade invertase, mas com captação direta do açúcar e hidrólise intracelular pelas células, o que permitirá uma eficiente fermentação de sacarose por *S. cerevisiae*.



## 5 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

Os resultados apresentados neste trabalho permitem concluir que:

- As linhagens industriais de *Saccharomyces cerevisiae* produtoras de álcool combustível a partir de caldo de cana-de-açúcar, testadas neste estudo, possuem a capacidade de utilizar e fermentar eficientemente maltose, indicando presença e funcionalidade dos genes *MAL* no genoma dessas linhagens. Porém, a presença dos vários genes *MALx1* no genoma não necessariamente permite o consumo de maltotriose. O gene *AGT1* é indispensável para a rápida utilização deste açúcar e, consequentemente, para sua eficiente fermentação. Frente à ausência ou falha da expressão desse gene, dois fenótipos são encontrados em relação à utilização de maltotriose: ausência total de crescimento, mesmo após extensos períodos, ou fermentação e/ou crescimento tardio, sem (ou pouca) produção de etanol.
- As leveduras industriais utilizadas na produção de álcool combustível a partir de cana-de-açúcar, analisadas neste trabalho, possuem o gene *SUC2* funcional no genoma e a fermentação da sacarose ocorre, principalmente, pela expressão da invertase periplasmática. A cepa industrial modificada geneticamente (deletada em uma cópia do gene *SUC2*) continua fermentando eficientemente sacarose, apesar de apresentar atividade invertase reduzida quando comparada à sua parental. Estes resultados indicam que esta atividade enzimática não é um fator limitante na fermentação de sacarose por leveduras industriais. Já uma cepa de laboratório haplóide, modificada para não expressar atividade de invertase, continua fermentando eficientemente apenas baixas concentrações de sacarose, sem liberar glicose ou frutose no meio, enquanto que em altas concentrações de sacarose foi incapaz de consumir o açúcar na sua totalidade.
- Linhagens de *S. cerevisiae* que possuem uma cópia do gene *SUC2* substituído pelo módulo KanMX6 podem ser utilizadas em ensaios de competição e persistência entre linhagens durante processos fermentativos, por serem facilmente detectadas e quantificadas em função da resistência à genética apresentada

pelas células modificadas, o que poderá permitir um maior controle do processo fermentativo industrial.

- A estratégia de modificação genética utilizando módulos de transformação com longas regiões de homologia, amplificados a partir de DNA genômico de cepas de laboratório já contendo a modificação de interesse, mostrou ser uma boa alternativa para modificar leveduras industriais diplóides.

Nossos resultados indicam também a necessidade de novos estudos a fim de otimizar a captação direta da sacarose pelas leveduras *S. cerevisiae* e sua posterior hidrólise intracelular pelas maltases e/ou invertase intracelular. Por exemplo, a construção de linhagens industriais de *S. cerevisiae* geneticamente modificadas possuindo a região promotora do gene *SUC2* substituída pela sequência que codifica apenas a invertase na forma intracelular, poderia ser uma alternativa interessante. Este estudo permitiu também desenvolver um módulo para modificar geneticamente a região do gene *SUC2* em linhagens de laboratório, utilizando o gene do transportador *AGT1* sobreexpresso como marcador. Este módulo, com o uso de regiões flanqueadoras longas que facilitam a recombinação homóloga, poderá facilitar a obtenção de linhagens industriais brasileiras utilizadas na produção de álcool combustível sem atividade invertase, porém com transporte de sacarose para o interior da célula, melhorando o rendimento em fermentações de sacarose por *S. cerevisiae*.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES JR. (2010) Genômica do metabolismo de maltotriose em *Saccharomyces cerevisiae*: o papel determinante do gene *AGT1*. Tese de doutorado. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia. Universidade de São Paulo, São Paulo. 130 p.

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

ALVES JR., S.L.; HERBERTS, R.A.; HOLLATZ, C.; TRICHEZ, D.; MILETTI, L.C.; DE ARAUJO, P.S.; STAMBUK, B.U. (2008) Molecular analysis of maltotriose active transport and fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* reveals a determinant role for the *AGT1* permease. Appl. Environ. Microbiol., 74: 1494-14501.

AMORIM, H.V.; BASSO, I.C.; LOPES, M.L. (2004a) Evolution of ethanol production in Brazil. In: Distilled Spirits: Tradition and Innovation, p. 143-148, Bryce JH & Stewart GG (ed.), Nottingham University Press, UK.

AMORIM, H.V.; BASSO, L.C.; OLIVEIRA, A.J.; GODOY, A., CHERUBIN, R.; LOPES, M.L. (2004b) Identification and selection of yeast strains from alcoholic fermentations in Brazil by electrophoretic karyotyping. In Eleventh International Congress on Yeast, Rio de Janeiro, Book of Abstracts..... pg. 51.

ANDJELKOVIC, U.; PICURIC, S.; VUJCIC, Z. (2010) Purification and characterisation of *Saccharomyces cerevisiae* external invertase isoforms. Food Chem., 120: 799-804.

ANFAVEA (2010). Anuário da Indústria Automobilística Brasileira. Autoveículos: Produção, vendas internas e exportações. Cap. 2: 62-146. São Paulo.

AQUARONE, E.; LIMA, U.A.; BORZANI, W. (1983) Alimentos e bebidas produzidos por fermentação. São Paulo: Edgard Blücher, p.243.

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

AUSUBEL, F.M.; BRENT, R.; KINGSTON, R.E.; MOORE, D.D.; SEIDMAN, J.G.; SMITH, J.A.; STRUHL, K. (1992) Short protocols in molecular biology. 2nd ed. New York: Greene Publishing Associates, John Wiley & Sons.

BADOTTI, F., BATISTA A.S., STAMBUK, B.U. (2006) Sucrose active transport and fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Braz. Arch. Biol. Technol.*, 49: 115-123.

BADOTTI, F.; BELLOCH, C.; ROSA, C.A.; BARRIO. E.; QUEROL. A. (2010) Physiological and molecular characterisation of *Saccharomyces cerevisiae* cachaça strains isolated from different geographic regions in Brazil. *World. J. Microbiol. Biotechnol.*, 26: 579-587.

BADOTTI, F., DÁRIO, M.G., ALVES-JR., S., CORDIOLI, M.L.A., MILETTI, L.C., ARAÚJO, P.S., STAMBUK, B.U. (2008) Switching the mode of sucrose utilization by *Saccharomyces cerevisiae*. *Microb. Cell Fact.* 7:4.

BARFORD, J.P., PHILLIPS, P.J., ORLOWSKI, J.H. (1992) A new model of uptake of multiple sugars by *S. cerevisiae*, II. *Bioprocess Eng.*, 7: 303-307.

BARFORD, J.P., HALL, R.J. (1979) An examination of the crabtree effect in *Saccharomyces cerevisiae*: the role of respiratory adaptation. *J. Gen. Microbiol.*, 114: 267-275.

BASSO, L.C., AMORIM, H.V., OLIVEIRA, A.J.; LOPES, M. L. (2008) Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil. *FEMS Yeast Res.*, 8: 1155–1163.

- BASSO, L.C.; OLIVEIRA, A.J.; ORELLI, V.F.D.M.; CAMPOS, A.A.; GALLO, C.R.; AMORIM, H.V. (1993) Dominância das leveduras contaminantes sobre as linhagens industriais avaliada pela técnica da cariotipagem. Anais Congresso Nacional da STAB, 5: 246–250.
- BATAILLON M, RICO A, SABLAYROLLES JM, SALMON JM, BARRE P. (1996) Early thiamin assimilation by yeasts under enological conditions: Impact on alcoholic fermentation kinetics. J. Ferment. Bioeng., 82: 145–150.
- BATISTA, A.S.; MILETTI, L.C.; STAMBUK, B.U. (2004) Sucrose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* lacking hexose transport. J. Mol. Microbiol. Biotechnol., 8: 26-33.
- BELL, P.J.L.; HIGGINS, V.J.; ATTFIELD, P.V. (2001) Comparison of fermentative capacities of industrial baking and wild-type yeasts of the species *Saccharomyces cerevisiae* in different sugar media. Lett. Appl. Microbiology, 32: 224-229.
- BELINCHÓN, M.M.; GANCEDO, J.M. (2007) Different signalling pathways mediate glucose induction of *SUC2*, *HXT1* and pyruvate decarboxylase in yeast. FEMS Yeast Res., 7: 40-47.
- BENITEZ, T.; GASENT-RAMIREZ, J.M.; CASTREJON, F.; CODON, A.C. (1996). Development of new strains for the food industry. Biotechnol. Prog., 12: 149-163.
- BERBERT DE AMORIM NETO, H.; YOHANNAN, B.K.; BRINGHURST, T.A.; BROSNAN, J.M.; PEARSON, S.Y.; WALKER, J.W.; WALKER, G.M. (2009) Evaluation of a brazilian fuel alcohol yeast strain for scotch whisky fermentations. J. Inst. Brew., 115 (3): 198-207.
- BERNARDI, T.L.; PEREIRA, G.V.M.; CARDOSO, P.G.; DIAS, E.S.; SCHWAN, R.F. (2008) *Saccharomyces cerevisiae* strains associated with the production of cachaca: identification and characterization by traditional and molecular methods (PCR, PFGE and mtDNA-RFLP). World J Microbiol Biotechnol., 24: 2405-2412.

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

BRASIL (2008) Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. *Setor sucoalcooleiro - produção de cana, açúcar e álcool*. Brasília, DF. 3p.

BRASIL (2011) Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior. *Biocombustíveis*. Brasília, DF. Disponível em: <<http://www.mdic.gov.br>> Acesso dia 14 de fevereiro de 2011.

CÁCERES, A.; CÁRDENAS, A.; GALLEGRO, M., VALCÁRVEL, M. (1999) A continuous spectrophotometric system for the discrimination/determination of monosaccharides and oligosaccharides in foods. *Anal. Chim. Acta*, 404: 121-129.

CAMPOS, C.R.; SILVA, C.F.; DIAS, D.R.; BASSO, L.C.; AMORIM, H.V.; SCHWAN, R.F. (2010) Features of *Saccharomyces cerevisiae* as a culture starter for the production of the distilled sugar cane beverage, cachaça in Brazil. *J. Appl. Microbiology*, 108: 1871-1879.

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

CARLSON, M. AND BOTSTEIN, D. (1983) Organization of the *SUC* gene family in *Saccharomyces*. *Mol. and Cell. Biology*, 3 (3): 351-359.

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

CRUMPLEN, R.M.; SLAUGHTER, J.C.; STEWART, G.G. (1996) Characteristics of maltose transporter activity in an ale and lager strain of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Lett. Appl. Microbiology*, 23: 448-452.

DÁRIO, M.G. (2007) Análise Molecular do Metabolismo de Sacarose por Linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* utilizadas na produção industrial de álcool combustível. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 90 p.

DÁRIO, M.G.; BADOTTI, F. CORDIOLI, M.L.A.; SCHLOGL, P.S.; MILETTI, L.C.; STAMBUK, B.U. (2006) Análise molecular do metabolismo de sacarose por *Saccharomyces cerevisiae*. In: 25ª Reunião de Genética de Microrganismos, São Pedro, SP, Brasil. Livro de Resumos..., p. 185.

DÁRIO, M.G.; BADOTTI, F.; BATISTA, A.S.; CORDIOLI, M.L.A.; HERBERTS, R.A.; MILETTI, L.C.; STAMBUK, B.U. (2005) Efficient active sucrose transport and fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. In: 5o Simposio Internacional de Producción de Alcoholes y Levaduras, Campos do Jordão, SP, Brasil, Programa y Libro de Resúmenes..., p. 24-25.

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

DAY, R.E.; ROGERS, P.J.; DAWES, I.W.; HIGGINS, V.J. (2002b) Molecular Analysis of Maltotriose Transport and Utilization by *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Envir. Microbiology*, v.68, n.11: 5326–5335.

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

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

DIDERICH, J.A.; SCHEPPER, M.; HOEK, P.van; LUTTIK, M.A.H.; DIJKEN, J.P.van; PRONK, J.T.; KLAASSEN, P.; BOELEN, H.F.M.; MATTOS, M.J.T.; DAM, K.van; KRUCKEBERG, A.L. (1999) Glucose uptake kinetics and transcription of *HXT* genes in chemostat cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chemistry*, 274 (22): 15350-15359.

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

DONG, Y.X.; SUEDA, S.; NIKAWA, J.; KONDO, H. (2004) Characterization of the products of the genes *SNO1* and *SNZ1* involved in pyridoxine synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.*, 271: 745–752.

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

DYNESEN, J., SMITS, H.P., OLSSON, L.; NIELSEN, J. (1998) Carbon catabolite repression of invertase during batch cultivations of *Saccharomyces cerevisiae*: the role of glucose, fructose and mannose. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 50: 579-582.

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

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

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

FITZPATRICK, T.B.; AMRHEIN, N.; KAPPES, B.; MACHEROUX, P.; TEWS, I.; RASCHLE, T. (2007) Two independent routes of de novo vitamin B6 biosynthesis: Not that different after all. *Biochem. J.* 407: 1–13.

FREIBERGER, T.; PAULLILO, S.C.L.; COSTA, V.M.; ANTONIO, M.B.; DUVAL, E.H.; STAMBUK, B.U.; LOPES, M. L.; AMORIM, H.V. (2009) Sobrevivência de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* geneticamente transformadas após destilação em laboratório. VI Congresso Brasileiro de Biossegurança e I Simpósio Internacional de Biossegurança e Pesquisa de Uso Duplo. Rio de Janeiro, Anais dos Eventos v. 1, p. 220.

GASCÓN, S.; NEUMANN, N.P.; LAMPEN, J.O. (1968) Comparative study on the properties of the purified internal and external invertases from yeast. *J. Biol. Chemistry*, 243 (7): 1573-1577.

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

GOMES, F.C., SILVA, C.L., MARINI, M.M., OLIVEIRA, E.S.; ROSA, C.A. (2007) Use of selected indigenous *Saccharomyces cerevisiae* strains for the production of the traditional cachaça in Brazil. *J. Appl. Microbiol.*, 103: 2438-2447.

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

HAN E.K.; COTTY, F.; SOTTAS, C.; JIANG, H.; MICHELS, C.A. (1995) Characterization of *AGT1* encoding a general  $\alpha$ -glucoside transporter from *Saccharomyces*. *Mol. Microbiol.*, 17: 1093-1107.

HAQ, I.U., SHAFIQ, K.; ALI, S. (2003) Substrate-induced repression of invertase synthesis by *Saccharomyces cerevisiae* in submerged culture. *Pak. J. Botany.*, 35: 527-531.

HERWIG, C.; DOERRIES, C.; MARISON, I.; VON STOCKAR, U. (2001) Quantitative analysis of the regulation scheme of invertase expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Bioeng.*, 76: 247-258.

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

- HOHMANN S, MEACOCK PA. (1998) Thiamin metabolism and thiamin diphosphate-dependent enzymes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: Genetic regulation. *Biochim. Biophys. Acta*, 1385: 201–219.
- HOLLATZ, C.; STAMBUK, B.U. (2001) Colorimetric determination of active  $\alpha$ -glucoside transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Microbiol. Methods*, 46: 253-259.
- HOLMES, E.W. (1996) Coupled enzymatic assay for the determination of sucrose. *Anal. Biochem.*, 244: 103-109.
- INGLEDEW, W.M. (1993) Yeasts for production of fuel ethanol In: *The Yeasts*, Rose, A.H. and Harrison, J.S. (eds), Academic Press, San Diego, USA, 5: 245-291.
- JAMES; T.C.; CAMPBELL, S.; DONNELLY, D.; BOND, U. (2003) Transcription profile of brewery yeast under fermentation conditions. *J. Appl. Microbiology*, 94: 432–448.
- JULES, M.; GUILLOU, V.; FRANÇOIS, J.; PARROU, J. L. (2004) Two distinct pathways for trehalose assimilation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70: 2771-2778.
- KHAN, N.A.; ZIMMERMANN, F.K.; EATON, N.R. (1973) Genetic and biochemical evidence of sucrose fermentation by maltase in yeast. *J. Mol. Gen. Genet.*, 123: 43-50.
- KLEIN, C.J.L.; OLSSON, L.; RONNOW, B.; MIKKELSEN, J.D.; NIELSEN, J. (1996) Alleviation of glucose repression of maltose metabolism by *MIG1* disruption in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Env. Microbiol.*, 62 (12): 4441-4449.
- KODAMA, Y.; FUKUI, N.; ASHIKARI, T.; SHIBANO, Y.; MORIOKA-FUJIMOTO, K.; HIRAKI, Y.; NAKATANI, K. (1995) Improvement of maltose fermentation efficiency: constitutive expression of *MAL* genes in brewing yeasts. *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, 53: 24-29.
- KORSHUNOVA, I.V.; NAUMOVA, E.S.; NAUMOV, G.I. (2005) Comparative molecular genetic analysis of  $\beta$ -fructosidases of yeasts *Saccharomyces*. *Molecular Biology*, 39 (3): 366-371.

KNOP, M.; SIEGERS, K.; PEREIRA, G.; ZACHARIAE, W.; WINSOR, B.; NASMYTH, K.; SCHIEBEL, E. (1999) Epitope tagging of yeast genes using a PCR-based strategy: more tags and improved practical routines. *Yeast*, 15: 963-972.

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

LYND, L.R.; CUSHMAN, J.H.; NICHOLS, R.J.; WYMAN, C.E. (1991) Fuel ethanol from cellulosic biomass. *Science*, 251: 1318-1323.

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

LONDESBOROUGH, J. (2001) Fermentation of maltotriose by brewer's and baker's yeasts. *Biotechnol. Lett.*, 23: 1995-2000.

LONGTINE, M.S.; MCKENZIE, A.; DEMARINI, D.J.; SHAH, N.G.; WACH, A.; BRACHAT, A.; PHILIPPSEN, P.; PRINGLE, J.R. (1998) Additional modules for versatile and economical PCR-based gene deletion and modification in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 14: 953-961.

LURTON, L., SNAKKERS, G., ROULLAND, C. AND GALY, B. (1995) Influence of the fermentation yeast strain on the composition of wine spirits. *J. Sci. Food Agric.*, 67: 485-491.

MALLUTA, E.F.; DECKER, P.; STAMBUK, B.U. (2000) The Kluyver effect for trehalose in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Basic Microbiol.*, 40 (3): 199-205.

MARINI, M.M.; GOMES, F.C.O.; SILVA, C.L.C.; CADETE, R.M.; BADOTI, F.; OLIVEIRA, E.S.; CARDOSO, C.R.; ROSA, C.A. (2009) The use of selected starter *Saccharomyces cerevisiae* strains to produce traditional and industrial cachaça: a comparative study. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 25: 235-242.

MENESES, F.J., HENSCHKE, P.A.; JIRANEK, V. (2002) A survey of industrial strains of *Saccharomyces cerevisiae* reveals numerous altered patterns of maltose and sucrose utilisation. J. Inst. Brew., 108: 310-321.

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

MILLER, G.L. (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Anal. Chem., 31: 426-429.

MINAMI, J.; KISHI, T.; KONDO, M. (1982). Effects of thiamin on vitamin B6 synthesis in yeasts. J. Gen. Microbiol., 128: 2909–2917.  
MOJZITA, D.; HOHMANN, S. (2006). Pdc2 coordinates expression of the *THI* regulon in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Mol. Genet. Genomics, 276: 147–161.

MORTIMER, R.K. AND JOHNSTON, J.R. (1986) Genealogy of principal strains of the yeast genetic stock center. Genetics 113, 35-43.

MWESIGYE, P.K. & BARFORD, J.P. (1996) Batch growth and transport kinetics of utilization of mixtures of sucrose and maltose by *Saccharomyces cerevisiae*. J. Ferment. Bioeng., 82: 101-108.

NAUMOV, G.I. AND NAUMOVA, E.S. (2010a) Comparative genetics of yeasts: a novel beta-fructosidase gene *SUC8* in *Saccharomyces cerevisiae*. Genetika 46 (3): 364-372.

NAUMOV, G.I. AND NAUMOVA, E.S. (2010b) Polygenic control for fermentation of  $\beta$ -fructosides in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: New genes *SUC9* and *SUC10*. Microbiology, 79 (2): 160-166.

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

NAUMOV, G.I.; NAUMOVA, E.S.; SANCHO, E.D.; KORHBLA, M.P. (1996) Polymeric *SUC* genes in natural populations of *Saccharomyces cerevisiae*. FEMS Microbiol. Lett., 135: 31-35.

NEEDLEMAN, R. (1991) Control of maltase synthesis in yeast. Mol. Microbiol., 5: 2079-2084.

NEUWIRTH, M.; STROHMEIER, M.; WINDEISEN, V.; WALLNER, S.; DELLER, S.; KIPPE, K.; SINNING, I.; MACHEROUX, P.; TEWS, I. (2009) X-ray crystal structure of *Saccharomyces cerevisiae* Pdx1 provides insights into the oligomeric nature of PLP synthases. FEBS Lett., 583: 2179–2186.

NOSAKA, K. (2006) Recent progress in understanding thiamin biosynthesis and its genetic regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 72: 30–40.

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

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

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

PETRACEK, M.E.; LONGTINE, M.S. (2002). PCR-base a engineering of yeast genome. Methods Enzymol., 350: 445-469.

PRETORIUS, I.S., LAMBRECHTS, M.G.; MARMUR, J. (1991) The glucoamylase multigene family in *Saccharomyces cerevisiae* var. diastaticus: an overview. Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol., 26: 53-76.

PRÓALCOOL (1975). Decreto 76.593 de 14/11/1975. Disponível em: < <http://www.brasil.gov.br/linhadotempo/epocas/1975/proalcool>>. Acesso em 09 de fevereiro de 2011.

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

QUEROL, A.; BOND, U. (2009) The complex and dynamic genomes of industrial yeasts. *FEMS Microbiol. Lett.*, 293: 1–10.

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

RAUTIO, J.; LONDESBOROUGH, J. (2003) Maltose transport by brewer's yeast in brewer's wort. *J. Inst. Brew.*, 109: 251-261.

REMIZE, F.; ANDRIEU, E.; DEQUIN, S. (2000) Engineering of the pyruvate dehydrogenase bypass in *Saccharomyces cerevisiae*: role of the cytosolic  $Mg^{2+}$  and Mitochondrial  $K^+$  acetaldehyde dehydrogenases Ald6p and Ald4p in acetate formation during alcoholic aermmentation. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66 (8): 3151-3159.

RICHARD, C. (2006) Brazil: a world leader. *Sugar J.*, 69: 11–15.

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

RODRIGUEZ-NAVARRO, S.; LLORENTE, B.; RODRIGUEZ-MANZANEQUE, M.T.; RAMNE, A.; UBER, G.; MARCHESAN, D.; DUJON, B.; HERRERO, E.; SUNNERHAGEN, P.; PEREZ-ORTIN, J.E. (2002) Functional analysis of yeast gene families involved in metabolism of vitamins B1 and B6. *Yeast*, 19: 1261–1276.

ROLLAND, F.; WINDERICKX, J.; THEVELEIN, J.M. (2002) Glucose-sensing and -signalling mechanisms in yeast. *FEMS Yeast Res.*, 2:183-201.

ROSE, A.M.; VIJAYALAKSHMI. (1993) Baker's yeasts. In: ROSE, A. M.; HARRISON, J. S. (eds). *The yeasts*. 2th ed. San Diego: Academic Press.

ROSSIGNOL, T.; DULAU, L.; JULIEN, A.; BLONDIN, B. (2003). Genome-wide monitoring of wine yeast gene expression during alcoholic fermentation. *Yeast*, 20: 1369–1385.

----- Saccharomyces Genome Database. Disponível em: <<http://www.yeastgenome.org>>. Acesso em: 09 de fevereiro de 2011.

SALEMA-OOM, M.; PINTO, V.V.; GONÇALVES, P.; SPENCER-MARTINS, I. (2005) Maltotriose utilization by industrial *Saccharomyces* strains: characterization of a new member of the  $\alpha$ -glucoside transporter family. *Appl. Envir. Microbiology*, 71(9): 5044–5049.

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

SCHWAN, R.F.; MENDONÇA, A.T.; DA SILVA JR.; J.J.; RODRIGUES, V.; WHEALS, A.E. (2001) Microbiology and physiology of cachaça (aguardadente) fermentations. *Antonie van Leeuwenhoek*, 79: 89-96.

SHIMA, J.; KUWAZAKI, S.; TANAKA, F.; WATANABE, H.; YAMAMOTO, H.; NAKAJIMA, R.; TOKASHIKI, T.; TAMURA, H. (2005). Identification of genes whose expressions are enhanced or reduced in baker's yeast during fed-batch culture process using molasses medium by DNA microarray analysis. *Int. J. Food Microbiol.*, 102: 63–71.

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

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

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

STAMBUK, B. U. A (1999) simple experiment illustrating metabolic regulation: induction versus repression of yeast  $\alpha$ -glucosidase. *Biochem. Educ.*, 27: 177-180.

STAMBUK, B.U. & DE ARAÚJO, P.S. (2001) Kinetics of active  $\alpha$ -glucoside transport by *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res.*, 1: 73-78.

STAMBUK, B.U.; ALVES JR, S.L.; HOLLATZ, C.; ZASTROW, C.R. (2006) Improvement of maltotriose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Let. Appl. Microbiology*, 43: 370–376.

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

STAMBUK, B.U.; DA SILVA, M.A.; PANEK, A.D.; DE ARAÚJO, P.S. (1999) Active  $\alpha$ -glucoside transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 170: 105-110.

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

TANAKA, F.; ANDO, A.; NAKAMURA, T.; TAKAGI, H.; SHIMA, J. (2006). Functional genomic analysis of commercial baker's yeast during initial stages of model dough-fermentation. *Food Microbiol.*, 23: 717–728.

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

TRICHEZ, D. (2007) Identificação de resíduos de aminácidos envolvidos no transporte ativo de açúcares pela permease *AGT1* de *Saccharomyces cerevisiae*. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

UNICA - União da Indústria da Cana-de-açúcar. (2011). Disponível em: <<http://unica.com.br>> Acesso em: 30 de março de 2011.

VALDES, C. (2007) Ethanol demand driving the expansion of Brazil's sugar industry. *Sugar J.*, 70: 9-11.

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

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

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

WANG, J.J.; WANG, Z.Y.; LIU, X.F.; GUO, X.N.; HE, X.P.; WENSEL, P.C.; ZHANG, B. R. (2010) Construction of an industrial brew yeast strain to manufacture beer with low caloric content and improved flavor. *J. Microbiol. Biotec.*, 20 (4): 767-774.

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

WEUSTHUIS, R.A.; ADAMS, H.; SCHEFFERS, W.A. & VAN DIJKEN, J.P. (1993) Energetics and kinetics of maltose transport in *Saccharomyces cerevisiae*: a continuous culture study. *Appl. Environ. Microbiol.*; 59: 3102-3109.

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

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

WU, H.; ZHENG, X.; ARAKI, Y.; SAHARA, H.; TAKAGI, H.; SHIMOI, H. (2006). Global gene expression analysis of yeast cells during sake brewing. *Appl. Environ. Microbiol.*, 72: 7353–7358.

WYMAN, C.E. (1999) Biomass ethanol: technical progress, opportunities, and commercial challenges. *Ann. Rev. Energ. Environ.*, 24: 189-226.

YOON, S.H., MUKERJEA, R.; ROBYT, J.F. (2003) Specificity of yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) in removing carbohydrates by fermentation. *Carbohydr. Res.*, 338: 1127-1132.

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

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

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

ZHANG, Y.Z.; WANG, Z.Y.; HE, X.P.; LIU, N.; ZHANG, B.R. (2008) New industrial brewing yeast strains with *ILV2* disruption and *LSD1* expression. *Int. J. Food Microbiology*, 123: 18-24.

ZHENG, X., D'AMORE, T., RUSSELL, I.; STEWART, G.G. (1994a) Transport kinetics of maltotriose in strains of *Saccharomyces*. *J. Ind. Microbiol.*, 13: 159-166.

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



## APÊNDICE

### Publicações em periódicos vinculadas a este doutoramento

DUVAL, E.H.; ALVES, S.L. JR.; DUNN, B., SHERLOCK, G.; STAMBUK, B.U. (2010) Microarray karyotyping of maltose-fermenting *Saccharomyces* yeasts with differing maltotriose utilization profiles reveals copy number variation in genes involved in maltose and maltotriose utilization. **J. Appl. Microbiol.**, 109: 248-259.

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

### Publicação em revista/magazine vinculada a este doutoramento

DÁRIO, M.G.; ESPÍRITO SANTO, J. C. A.; SCHLOGL, P. S.; DUVAL, E. H.; MULLER, G.; MACHADO, L.O.; TRICHEZ, D.; ALVES JR, S.L.; STAMBUK, B. U. (2010) A engenharia genética de leveduras como propulsora da otimização da fermentação de sacarose. Revista **ÁLCOOL**brás, p. 40 - 44.