

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

Marcelo Goulart Dário

**Análise Molecular do Metabolismo de Sacarose por Linhagens de
Saccharomyces cerevisiae Utilizadas na Produção Industrial de Álcool
Combustível**

**FLORIANÓPOLIS
2007**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Marcelo Goulart Dário

**Análise Molecular do Metabolismo de Sacarose por Linhagens de
Saccharomyces cerevisiae Utilizadas na Produção Industrial de Álcool
Combustível**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Santa Catarina, visando à obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia.

Orientadores: Prof. Dr. Boris U. Stambuk
Prof. Dr. Hernán Terenzi

**FLORIANÓPOLIS
2007**

Dedico este trabalho aos
meus pais, Raul e Vilma,
e à minha irmã, Melissa.

AGRADECIMENTOS

Ao professor Boris, pela sua orientação, apoio, dedicação, paciência e sobretudo, pela oportunidade concedida a mim de fazer parte de seu grupo de trabalho, e pelo meu crescimento intelectual, profissional e pessoal.

Ao professor Hernán pelo empréstimo de seus equipamentos, pela doação de alguns reagentes e por se responsabilizar pela minha orientação junto ao programa de Pós-graduação em biotecnologia, durante o período de afastamento para aperfeiçoamento do professor Boris.

Aos professores Afonso e Risoleta, que permitiram o uso de seus equipamentos.

Aos professores e funcionários do departamento de bioquímica da UFSC, assim como à coordenadoria, secretaria e professores da pós-graduação em biotecnologia, pelo apoio e esclarecimentos prestados ao longo do curso.

Aos meus amigos de laboratório, Débora, Denise, Maria Luiza, Ricardo e Sérgio que de forma direta ou indireta, colaboraram para a execução deste trabalho, e em especial, Luiz e Paulo que realizaram as modificações em *Saccharomyces cerevisiae* através de engenharia genômica, dando origem às cepas LCM003 e PSY006.

Aos meus amigos e à minha família, pelo apoio durante a execução deste trabalho e pela torcida por minhas realizações e conquistas.

Ao Dr. Mario Lúcio Lopes da empresa Fermentec Ltda, ao Dr. Jaime Finguerut do CTC (Centro de Tecnologia Canavieira - Antiga Copersucar) e ao professor Dr. Marco Antonio de Moraes Junior da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), por fornecerem as linhagens industriais utilizadas no trabalho.

E finalmente, ao Conselho Científico e Tecnológico (CNPq), à Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	i
LISTA DE TABELAS	iii
LISTA DE ABREVIATURAS	iv
RESUMO	v
ABSTRACT	vi
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Histórico e Mercado do Álcool Combustível no Brasil	3
1.2 Utilização de açúcares por <i>S. cerevisiae</i>	10
1.3 Processo Fermentativo para a Produção de Álcool Combustível	16
2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS	22
3. MÉTODOS E PROCEDIMENTOS	23
3.1 Cepas Utilizadas	23
3.2 Meios de Cultura	24
3.2.1 Crescimento	24
3.2.2 Fermentação	24
3.3 Condições de Cultivo	25
3.3.1 Pré-Cultivo	25
3.3.2 Crescimento	26
3.3.3 Multiplicação das Linhagens de <i>S. cerevisiae</i> para uso Experimental	26
3.4 Determinação da Concentração Celular	26
3.5 Ensaio de Fermentação em Batelada	27
3.6 Determinação da Atividade de Transporte	28
3.7 Determinações Enzimáticas	28
3.7.1 Determinação da Atividade da Invertase Extracelular	28
3.7.2 Determinação da Atividade da α -glicosidase	29
3.7.3 Determinação da Atividade da Invertase Total	30
3.8 Análises Bioquímicas	30
3.8.1 Determinação de Glicose	31
3.8.2 Determinação de Sacarose	32
3.8.3 Determinação de Frutose	32
3.8.4 Determinação de Maltose	33
3.8.5 Determinação de Etanol	33
3.9 Técnicas Gerais de Manipulação de Ácidos Nucléicos	34
3.9.1 Extração e Purificação de Plasmídeos em Bactérias (Miniprep)	34
3.9.2 Hidrólise de Plasmídeos	35
3.9.3 Eletroforese e Purificação de DNA	35
3.10 Engenharia Genômica em <i>S. cerevisiae</i>	35
3.10.1 Plasmídeos e <i>Primers</i>	36
3.10.2 Construção dos Módulos de Mutação por PCR	38
3.10.3 Transformação das Linhagens de <i>S. cerevisiae</i>	39
3.10.4 Extração e Purificação de DNA de <i>S. cerevisiae</i>	41
3.10.5 Confirmação das Mutações nas Linhagens de <i>S. cerevisiae</i> por PCR	42
3.11 Determinação dos Parâmetros Cinéticos	42

3.11.1 Velocidade Específica de Crescimento	42
3.11.2 Velocidade de Consumo de Açúcares	43
3.11.3 Produção Máxima de Etanol e Rendimento do Processo Fermentativo	43
3.12 Reprodutibilidade dos Resultados	43
 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	 44
4.1 Utilização de Açúcares por Leveduras Industriais	44
4.2 Modificação Genética em <i>S. cerevisiae</i>	54
4.3 Fermentação de Sacarose pelas Linhagens Industriais e Engenhadas	63
 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS	 78
 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	 81

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 – Direcionamento do carbono na via glicolítica.	3
Figura 1.2 - Venda de veículos no Brasil, segundo o tipo de combustível utilizado, durante os anos de 1975 a 2005.	6
Figura 1.3 - Produção e consumo de álcool no Brasil, durante o período de 1974 a 2004.	8
Figura 1.4 - Representação das vias de utilização de açúcares por <i>S. cerevisiae</i> .	11
Figura 1.5 – Estrutura dos genes <i>MAL</i> .	12
Figura 1.6 - Estruturas químicas da maltose, maltotriose, sacarose e <i>pNPαG</i> .	13
Figura 1.7 – Estrutura dos genes <i>SUC</i> e, tradução das formas intra e extracelular da invertase de <i>S. cerevisiae</i> .	15
Figura 3.1 – Reações utilizadas na quantificação de açúcares e etanol.	31
Figura 3.2 – Engenharia genômica em <i>S. cerevisiae</i> (modificação genética por recombinação homóloga).	37
Figura 3.3 – Representação esquemática dos módulos de mutação utilizados na transformação das linhagens de levedura.	39
Figura 4.1 - Metabolização de glicose, maltose e sacarose pela linhagem CAT-1.	46
Figura 4.2 - Metabolização de glicose, maltose e sacarose pela linhagem PE-2.	47
Figura 4.3 - Parâmetros fermentativos das linhagens CAT-1, PE-2 e VR-1 durante o crescimento em glicose, maltose, maltotriose e sacarose.	48
Figura 4.4 - Metabolização de glicose, maltose e sacarose pela linhagem UFPE-135.	49
Figura 4.5 - Parâmetros fermentativos das linhagens BG, SA, UFPE-135 e UFPE-379 durante o crescimento em glicose, maltose e sacarose.	52
Figura 4.6 - Atividade invertase e α -glicosidase nas linhagens industriais.	53
Figura 4.7 - Metabolização de sacarose pela linhagem CEN.PK2-1C.	57
Figura 4.8 - Atividade invertase, α -glicosidase, e de transporte de α -glicosídeos nas linhagens engenhas.	58
Figura 4.9 - Construção de linhagens deletadas no gene <i>SUC2</i> .	59
Figura 4.10 - Metabolização de sacarose pela linhagem MGD-01.	60
Figura 4.11 - Parâmetros fermentativos das linhagens engenhas durante o crescimento em glicose, maltose e sacarose.	61
Figura 4.12 - Fermentação em batelada de 20 g/L de sacarose pela linhagem CAT-1.	64
Figura 4.13 - Fermentação em batelada de 200 g/L de sacarose pela linhagem CAT-1.	65
Figura 4.14 - Fermentação em batelada de 20 g/L de sacarose pela linhagem UFPE-135.	66

Figura 4.15 - Fermentação em batelada de 200 g/L de sacarose pela linhagem UFPE-135.	67
Figura 4.16 - Parâmetros fermentativos das linhagens industriais durante a fermentação em batelada de 20 e 200 g/L de sacarose.	69
Figura 4.17 - Fermentação em batelada de 20 g/L de sacarose pela linhagem CEN.PK2-1C.	70
Figura 4.18 - Fermentação em batelada de 200 g/L de sacarose pela linhagem CEN.PK2-1C.	71
Figura 4.19 - Fermentação em batelada de 20 g/L de sacarose pela linhagem MGD-01.	75
Figura 4.20 - Fermentação em batelada de 200 g/L de sacarose pela linhagem MGD-01.	76
Figura 4.21 - Parâmetros fermentativos das linhagens engenhas durante a fermentação em batelada de 20 e 200 g/L de sacarose.	77

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1 - Linhagens de microrganismos utilizados neste estudo e seus respectivos genótipos, bem como suas procedências.	23
Tabela 3.2 - Composição dos meios de cultura utilizados nos crescimentos dos microrganismos.	25
Tabela 3.3 - Composição dos meios de cultura utilizados nos ensaios de fermentação.	25
Tabela 3.4 – Tamanho dos fragmentos de DNA gerados, após hidrólise dos plasmídeos utilizados neste estudo, conforme enzimas de restrição indicadas.	35
Tabela 3.5 –Seqüência de bases nitrogenadas dos <i>primers</i> para a construção dos módulos de modificação, e para verificação.	38
Tabela 3.6 – Produtos de PCR esperados, após eletroforese em gel de agarose, para confirmar a correta inserção dos módulos de modificação no DNA das linhagens de <i>S. cerevisiae</i> de laboratório.	42

LISTA DE ABREVIATURAS

Abs	Absorbância
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbant Assay
HCl	Ácido Clorídrico
kDa	Quilo Dalton
LB	Meio Luria-Bertani
MOPS	Ácido 3-(N-morfolino) propanosulfônico
NaF	Fluoreto de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
pb	Pares de base nitrogenada
$P_{e\ max}$	Produção máxima de etanol
pH	Potencial hidrogeniônico
<i>p</i> NP α G	<i>p</i> -nitrofenil- α -D-glicopiranosídeo
Q.s.p	Quantidade suficiente para
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
Tris	2-amino-2-hidroximetil-1,3-propanediol
X	Concentração celular
$Y_{e/s}$	Rendimento do processo fermentativo
μ	Velocidade específica de crescimento celular

RESUMO

No Brasil, a levedura *Saccharomyces cerevisiae* é utilizada em grande escala para a produção de álcool combustível através da fermentação de mostos (caldo-de-cana e/ou melaço) contendo altas concentrações de sacarose. Neste processo, a elevada produtividade de álcool é altamente desejável (fermentação total dos açúcares em um curto espaço de tempo), pois resulta em maior rendimento na produção industrial. A análise molecular das vias de utilização deste açúcar por *S. cerevisiae* tem revelado a existência de duas rotas metabólicas: a hidrólise extracelular pela ação da invertase periplasmática (produzindo glicose e frutose que são a seguir captadas e fermentadas pelas células), e outra envolvendo o transporte ativo da sacarose com a posterior hidrólise intracelular do açúcar. Entretanto, a hidrólise extracelular do dissacarídeo é indesejada, pois contribui para incrementar o estresse osmótico das células, além de que os monossacarídeos liberados no meio podem servir de fonte de carbono para microorganismos contaminantes do processo fermentativo. Com o intuito de otimizar a produção de álcool combustível, levando em conta as características do setor industrial, neste trabalho foi realizada a também análise bioquímica de leveduras dominantes isoladas a partir desse processo industrial, e comparadas com linhagens de laboratório com genótipos conhecidos e modificadas através de engenharia genômica, de forma a expressar apenas uma das vias de utilização de sacarose. Nas leveduras industriais a capacidade de fermentar a sacarose é devida à expressão da invertase periplasmática, sendo que apenas uma das linhagens industriais analisadas apresentou amplificação dos genes *SUC*, e conseqüente alta atividade invertase. Algumas destas linhagens industriais foram capazes de fermentar também a maltose, indicando a presença de loci *MAL* funcionais nestas leveduras. Os resultados indicam também que embora algumas linhagens industriais possuam o gene da permease *AGT1*, apenas em algumas linhagens este transportador é funcional. Por outro lado, os resultados mostram que quando o gene *SUC2* foi deletado do genoma da linhagem de laboratório, as células continuaram fermentando eficientemente a sacarose, com a vantagem de não produzir glicose e frutose no meio. Nestas cepas engenhradas a sacarose é transportada diretamente para o interior da célula, onde é hidrolisada pela maltase (α -glicosidase) citoplasmática. A seguir, foram simuladas condições industriais de fermentação em batelada (altas concentrações de células e sacarose). Enquanto as linhagens industriais consumiram e fermentaram a sacarose com relativa eficiência (embora produzissem altas concentrações de glicose e frutose no meio), as leveduras modificadas sem atividade invertase não foram capazes de consumir totalmente a sacarose. Portanto, os resultados demonstram que as células de levedura são capazes de fermentar a sacarose mesmo sem atividade invertase (p.ex. pela deleção do gene *SUC2*), mas novos estudos ainda são necessários para otimizar a captação deste açúcar pelas células, especialmente em condições de fermentação em batelada com altas concentrações de sacarose. Acreditamos que a análise molecular das vias de utilização de sacarose por *S. cerevisiae* possibilitará melhorar a performance fermentativa das leveduras industriais, identificando os genes alvo para otimização via engenharia genômica.

Palavras-chave: Álcool Combustível, Etanol, Fermentação industrial, Invertase, Sacarose, *Saccharomyces cerevisiae*, Otimização de processos.

ABSTRACT

In Brazil the yeast *Saccharomyces cerevisiae* is used on a huge scale for fuel alcohol production through the fermentation of media (sugarcane juice or molasses) containing high sucrose concentrations. In this process, a total fermentation of the sugars in a short time period is highly desirable, as improves the industrial production yields. The molecular analysis of the pathways involved in the utilization of this sugar by *S. cerevisiae* has revealed the existence of two metabolic routes: the extracellular hydrolysis by the periplasmic invertase (producing glucose and fructose that are internalized and fermented by the cells), and another one involving the active transport of sucrose and its further intracellular hydrolysis. However, the extracellular hydrolysis of the disaccharide is undesired, as it contributes to increase the osmotic stress of the cells, and the monosaccharides released into the medium can be used as carbon sources for contaminant microorganisms present in the fermentative process. In order to optimize fuel ethanol production taking into account the characteristics of the industry, in this work we performed a biochemical analysis of dominant yeasts isolated from this industrial process, and compare them with laboratory strains of known genotypes and modified through genomic engineering in order to express only one of the sucrose utilization pathways. In the industrial yeasts the capability to ferment sucrose is due to periplasmic invertase expression, and only one of the strains showed amplification of *SUC* genes and high invertase activity. The majority of industrial strains were also able to ferment maltose, indicating the presence of functional *MAL* loci in these yeasts. Our results also indicate that although some of the industrial strains have the *AGT1* permease gene, only in some strains this gene seems to be functional. On another approach, our results show that when the *SUC2* gene was deleted from the genome of the laboratory strain, the cells continued fermenting sucrose efficiently, with the advantage of no glucose or fructose production in the medium. In these engineered strains sucrose is transported into the cells, where it is hydrolyzed by the cytoplasmic maltase (α -glucosidase). We next tried to simulate the industrial batch fermentation conditions with high cell concentration and >180 g/L sucrose. While the industrial strains consumed and fermented sucrose with relative high efficiency (although producing high glucose and fructose concentrations in the medium), the engineered strains lacking invertase activity were not able to completely consume all the sucrose. Thus, our results clearly indicate that yeast cells can ferment sucrose even without invertase activity (as, for example, through deletion of the *SUC2* gene), but new studies are required in order to optimize the uptake of this sugar by the cells, especially under industrial conditions with high sucrose concentrations. We believe that the molecular analysis of the sucrose utilization pathways in *S. cerevisiae* will allow fermentation performance improvements of the industrial yeasts, identifying target genes for optimization through genomic engineering.

Key-words: fuel alcohol, ethanol, industrial fermentation, invertase, sucrose, *Saccharomyces cerevisiae*, process optimization.

1. INTRODUÇÃO

A produção de bebidas alcoólicas é realizada desde os primórdios da humanidade. Há relatos de que há mais de 5.000 anos este processo biotecnológico é realizado utilizando leveduras do gênero *Saccharomyces*, destacando-se a espécie *S. cerevisiae*. Este microorganismo é muito importante do ponto de vista econômico, nutricional e cultural, desde os primórdios da sociedade humana. São exemplos clássicos da utilização desta espécie de levedura a panificação e a produção de bebidas alcoólicas, porém nas últimas décadas vem ganhando importância na produção de álcool combustível e na indústria química, além de serem utilizadas como modelo experimental para estudo da genética, bioquímica, biologia celular e molecular de células eucarióticas (BOTSTEIN e FINK, 1988; CAVALIERI *et al.*, 2003; LANDRY *et al.*, 2006; MCGOVERN *et al.*, 2004; WOOLFIT e WOLFE, 2005).

A sua capacidade de se adaptar e dominar o ambiente em que é encontrada se deve à habilidade de utilizar os açúcares presentes no meio e produzir altas concentrações de etanol, fazendo com que o ambiente se torne inóspito para a sobrevivência de outros microorganismos. Além disso, é capaz de fermentar mesmo na presença de oxigênio, de suportar altas concentrações de etanol, baixo nível de pH, o estresse osmótico pelas altas concentrações de açúcares, bem como as pressões hidrostáticas provocadas pelo grande volume de líquido contido nas dornas de fermentação (LAGUNAS, 1979, 1986; LANDRY *et al.*, 2006). Visando a obtenção de produtos de qualidade, a baixos custos e com máximo rendimento possível, cada setor industrial preocupa-se em realizar a seleção de linhagens de *S. cerevisiae* que estão presentes em cada processo fermentativo e que possuam as características mais próximas das desejadas (INGLEDEW, 1993; ROBERTS *et al.*, 1995; ROSE e VIJAYALAKSHMI, 1993; STEWART, 2000; WATSON, 1993).

Na produção de bebidas alcoólicas desejam-se leveduras que produzam compostos

secundários com função organoléptica, na indústria de produção de fermento biológico utilizado na panificação o desejável é que as leveduras respirem o açúcar para a máxima produção de biomassa, enquanto que na indústria química pretende-se diminuir os custos de produção e aumentar a rapidez e precisão do processo de catálise, devendo as leveduras serem capazes de se adaptar a meios de cultura com pouca água e repleto de solventes orgânicos. Por outro lado, na produção de álcool combustível almeja-se que as leveduras produzam altas concentrações de etanol durante a fermentação, e que apresentem tolerância às altas concentrações de açúcar, etanol e temperatura. Com este intuito, os setores industriais investem na obtenção de linhagens que sejam mais adequadas aos seus interesses (AQUARONE *et. al.*, 1975; NASCIMENTO *et al.*, 2002; WHEALS *et. al.*, 1999; ZANIN *et. al.*, 2000).

O passo limitante do processo de fermentação é a resposta fisiológica da levedura *S. cerevisiae* frente à concentração de açúcares presentes no meio. Enquanto que as enzimas da via glicolítica, assim como vários outros genes, foram conservados durante a evolução de *S. cerevisiae*, os mecanismos que controlam a metabolização das diferentes fontes de carbono e a produção de energia, se adaptam às necessidades de cada linhagem no setor industrial na qual estas estão inseridas. Com isto, estudos realizados para caracterizar a via de utilização destes açúcares são de grande importância do ponto de vista biotecnológico e econômico, permitindo desenvolver estratégias de forma a incrementar o desempenho das linhagens de levedura, tanto por modificações na condução do processo industrial, quanto desenvolvendo leveduras que possuam as características desejadas para cada setor industrial (FEREA *et al.*, 1999; IHMELS *et al.*, 2005; KELLYS *et al.*, 2004; LANDRY *et al.*, 2006; PFEIFFER *et al.*, 2001; QUEROL *et al.*, 2003).

Nessa levedura, a relação existente entre o complexo protéico da enzima piruvato desidrogenase (que direciona o fluxo de carbono para a respiração, produzindo CO₂ e

biomassa), e a enzima piruvato descarboxilase (que direcionar o fluxo de carbono para a fermentação, vide Figura 1.1), além do controle exercido pela glicose regulando a transcrição de uma série de enzimas requeridas para o metabolismo respiratório e de outras fontes de carbono, são pontos chaves na regulação metabólica (CARLSON, 1998; GANCEDO, 1998; GELADÉ *et al.*, 2003; ROLLAND *et al.*, 2002; VERSTREPEN *et al.*, 2004; YIN *et al.*, 2003). Quando as leveduras são crescidas na presença de oxigênio, com baixa concentração de açúcar, ou quando a captação de açúcar pelas células é lenta, o complexo da enzima piruvato desidrogenase direciona o fluxo glicolítico à respiração, já em anaerobiose ou em altas concentrações de açúcar a fermentação é favorecida, pois o carbono excedente não direcionado para a respiração é metabolizado pela enzima piruvato descarboxilase, favorecendo a fermentação (BADOTTI, 2005; FEREÁ *et al.*, 1999; POSTMA *et al.*, 1989).

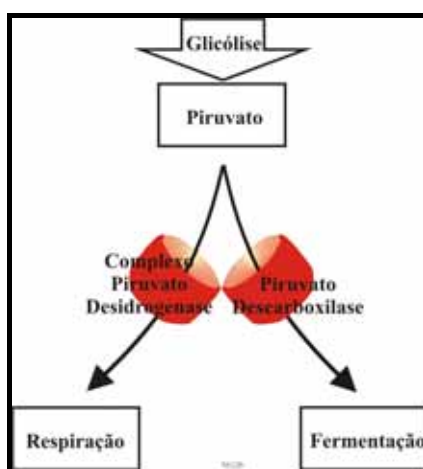


Figura 1.1 – Direcionamento do carbono na via glicolítica. Quando a quantidade de carbono na via glicolítica é baixa, o fluxo glicolítico é direcionado para a respiração devido à alta atividade catalítica do complexo da enzima Piruvato Desidrogenase. Por outro lado, a alta concentração de açúcar no meio, resulta em carbono excedente na glicólise que é metabolizado pela enzima Piruvato Descarboxilase, favorecendo a fermentação.

1.1 Histórico e Mercado do Álcool Combustível no Brasil

A possibilidade de utilizar o álcool produzido na fermentação do caldo de cana-de-açúcar como combustível automotivo é conhecida há mais de um século, embora a utilização deste combustível não fosse viável devido à disponibilidade de derivados de petróleo a preços baixos. Até a década de 50, o preço do petróleo era controlado por um grupo de 07 (sete)

multinacionais petrolíferas (*Exxon, Shell, Mobil, Anglo-Persian, Socal, Texaco e Gulf Oil*) que estabeleciam um sistema de preços, garantindo a apropriação das rendas geradas nos campos petrolíferos existentes até então, e impedindo que a queda dos custos resultante do desenvolvimento dos novos campos repercutisse nos preços internacionais. Controlavam também a produção, equilibrando a demanda em crescimento exponencial e a oferta das empresas já instaladas, sem permitir a entrada de novos produtores. Entretanto, a partir dos anos 70, o mundo passou por uma reorganização político-econômica, principalmente devido à Guerra Fria, aos conflitos entre os países árabes e a criação da OPEP (Organização dos Países Exportadores de Petróleo) em 1961 (COELHO, 1999; SANTOS, 1993; TAVARES, 2005).

Durante a década de 70, os países detentores de reservas petrolíferas revisaram as concessões de exploração dada às multinacionais e assumiram o controle das riquezas nacionais, visando utilizar a renda gerada pelo petróleo como principal fonte de financiamento do desenvolvimento econômico. Com isto, o controle da produção e das reservas de petróleo passou a ser realizado pelas empresas petrolíferas estatais recém-criadas nos países da OPEP. Com a nacionalização das reservas e do capital petrolífero, em 1973, esta nova organização passou a ditar o preço de comercialização do petróleo e o barril passou de US\$ 3,00 para US\$ 12,00. Entre os anos de 1978 e 1980, no auge do exercício do seu poder, houve a elevação do preço do barril de US\$ 18,00 para US\$ 36,00. Este quadro de instabilidade ficou conhecido como “choque do petróleo”, pois provocou uma grave crise energética, resultando na redução do ritmo de crescimento da economia mundial. Assim como em outros países, o Brasil também foi afetado pela crise, elevando os gastos com importação de petróleo de US\$ 600 milhões em 1973 para US\$ 2,5 bilhões em 1974, provocando um déficit na balança comercial de US\$ 4,7 bilhões, resultado que influiu diretamente na dívida externa brasileira e na escalada da inflação, que saltou de 15,5% em 1973 para 34,5% em 1974 (BERTELLI, 2005; BRASIL, 2005; COELHO, 1999; TAVARES, 2005).

Devido às consequências do primeiro “choque do petróleo”, os países consumidores buscaram reduzir a participação do petróleo nas matrizes energéticas de suas economias. Para isto, iniciou-se a busca de alternativas para a crise, reacendendo o interesse mundial por fontes alternativas de energia. Assim, o ainda futuro presidente da República General Ernesto Geisel formou uma força tarefa que debateu com o setor privado uma solução para a crise, utilizando fontes não convencionais de energia e que fornecesse subsídios ao novo governo (ALVES, 2002; BERTELLI, 2005; BRASIL, 2005; COELHO, 1999; TAVARES, 2005).

Em 1974, foi entregue ao Conselho Nacional do Petróleo um documento formulado com base nas preferências combinadas do Instituto do Açúcar e do Alcool – IAA (produção de álcool direto em destilarias autônomas) e da Cooperativa de Produtores de Cana-de-açúcar, Açúcar e Alcool do Estado de São Paulo - Copersucar (aproveitamento da capacidade ociosa das destilarias anexas às usinas açucareiras). Tais propostas tiveram por base um cenário já existente no Brasil, o qual possuía um setor açucareiro desenvolvido, terras e clima propício à cultura de cana-de-açúcar, mão-de-obra abundante no campo e experiência na fabricação de álcool industrial, do qual já era grande produtor-exportador. Somando-se a isto, a recém-modernização do setor açucareiro proporcionou uma elevada capacidade ociosa, que poderia ser reduzida com a produção de álcool combustível, proporcionando uma flexibilidade entre a produção de açúcar para exportação e a produção de álcool combustível para atender o mercado interno. Este estudo se tornou a semente do Programa Nacional do Alcool (Proálcool). Sendo assim, após intensos estudos e debates, e com o objetivo principal de substituir o uso da gasolina em veículos leves, o governo federal instituiu o Proálcool, através do decreto nº 76.593, de 14/11/1975 (ALVES, 2002; BERTELLI, 2005; BRASIL, 2005; COELHO, 1999; TAVARES, 2005).

A primeira fase do programa tinha por objetivo utilizar o álcool anidro como aditivo à gasolina, reduzindo desta forma a importação de petróleo. Porém, estímulos fiscais e

econômicos oferecidos ao programa, aliados aos interesses da indústria automobilística que passava por uma fase de recessão e o trabalho de conscientização ambiental para reduzir os níveis de poluição nos grandes centros urbanos, conferiram ao programa um impulso ainda maior. Assim, em 1979 iniciou a segunda fase do programa, que se caracterizou por produzir álcool hidratado para veículos com motores movidos exclusivamente a álcool. Neste período, o governo federal realizou um acordo com as montadoras de automóveis para a produção deste tipo de veículo, concedendo ainda subsídio aos seus compradores e também aos produtores deste combustível, culminando no aumento da frota nacional movida a álcool, onde 96 % da produção nacional de automóveis no ano de 1985 eram de carros a álcool, como pode ser observado na figura 1.2 (ROSILLO-CALLE e CORTEZ, 1998; COELHO, 1999; TAVARES, 2005).

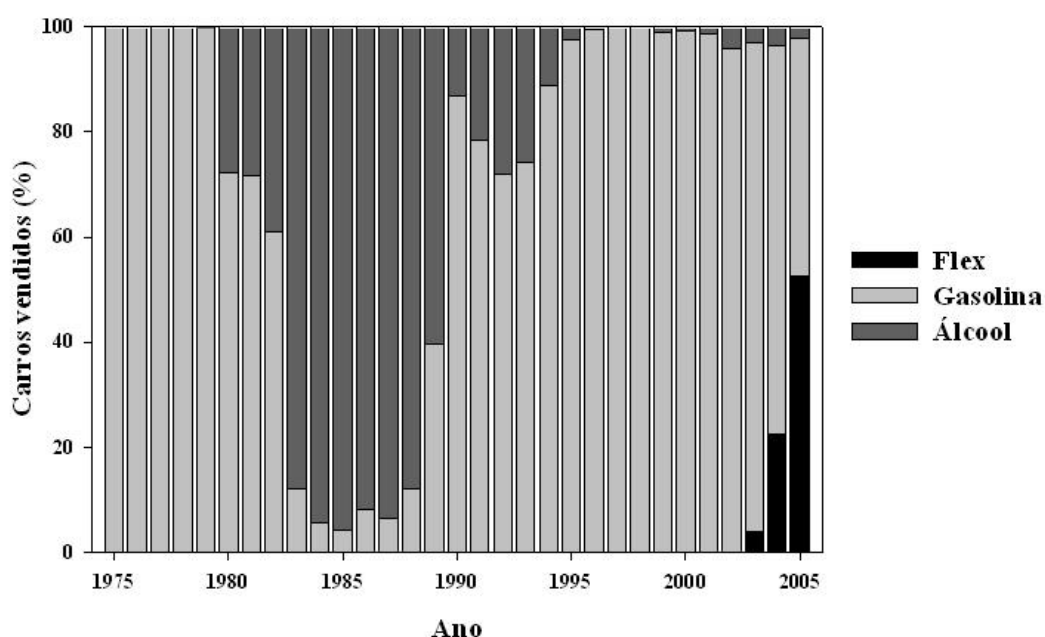


Figura 1.2 - Venda de veículos no Brasil, segundo o tipo de combustível utilizado, durante os anos de 1975 a 2005 (ANFAVEA, 2006).

Em 1986, dois fatores mexeram com o comércio de combustíveis no Brasil: o aumento da produtividade pela agroindústria sucroalcooleira e a redução no preço do petróleo e seus

derivados. Por consequência, houve sobra de álcool no mercado e a necessidade de comercialização do álcool hidratado a preços muito inferiores aos da gasolina, exigindo subsídios cada vez mais elevados para a sustentação econômica da produção. Nos anos seguintes, a baixa cotação do açúcar no mercado internacional e o álcool excedente no mercado interno, desestimularam o setor produtivo e, somando-se a isto, as políticas de incentivo ao consumo culminaram na safra de 1989/90 com um desabastecimento de álcool (vide Figura 1.3). Estes fatos geraram um aumento no preço do álcool combustível, forçando o governo a importar álcool para amenizar a crise. Com a crise de abastecimento, o corte na concessão de subsídios por parte do governo e os problemas apresentados com a frota de veículos movido a álcool (custo de manutenção e problemas de funcionamento, quando comparados com os veículos movidos à gasolina, por ex.: dificuldade de partida em dias frios e maior desgaste das peças devido corrosão), gerou desconfiança quanto ao desenvolvimento e viabilidade do programa. Desta forma, as montadoras reduziram a fabricação de carros movidos a álcool (Figura 1.2) e os usineiros se voltaram para a produção de açúcar refinado, já que este produto apresentava alta cotação no mercado internacional (BERG, 2005; ROSILLO-CALLE e CORTEZ, 1998; COELHO, 1999; TAVARES, 2005).

Após um período de incerteza sobre o seu futuro, a partir de 1994 o Proálcool recebeu um novo estímulo. Com a implantação de um novo plano econômico (Plano Real) e o alarde de que em um futuro próximo haveria a extinção das fontes de petróleo, o álcool passou a ser visto como a fonte alternativa de energia que iria contribuir e garantir o crescimento econômico nacional, além de ter a vantagem de ser renovável e menos poluente. Somando-se a isto, a crescente preocupação ambiental fez com que fossem decretadas leis de proteção ambiental, e a utilização do álcool (puro ou misturado à gasolina) juntamente com a eliminação do chumbo na gasolina, foram apontadas como medidas capazes de reduzir as emissões do monóxido de carbono (FARRELL *et al.*, 2006; HAHN-HÄGERDAL *et al.*,

2006; HILL *et al.*, 2006). Estuda-se cada vez mais a implementação de biocombustíveis em escala mundial, tanto para fins ecológicos quanto econômicos, como pode ser observado em alguns estados dos Estados Unidos da América (p. ex. Califórnia) que também já estão implementando estratégia semelhante. Somando-se a isto, a questão energética é tratada como questão de segurança nacional pelos norte-americanos (BENTLEY e DERBY, 2001; VERTÈS *et al.*, 2006).

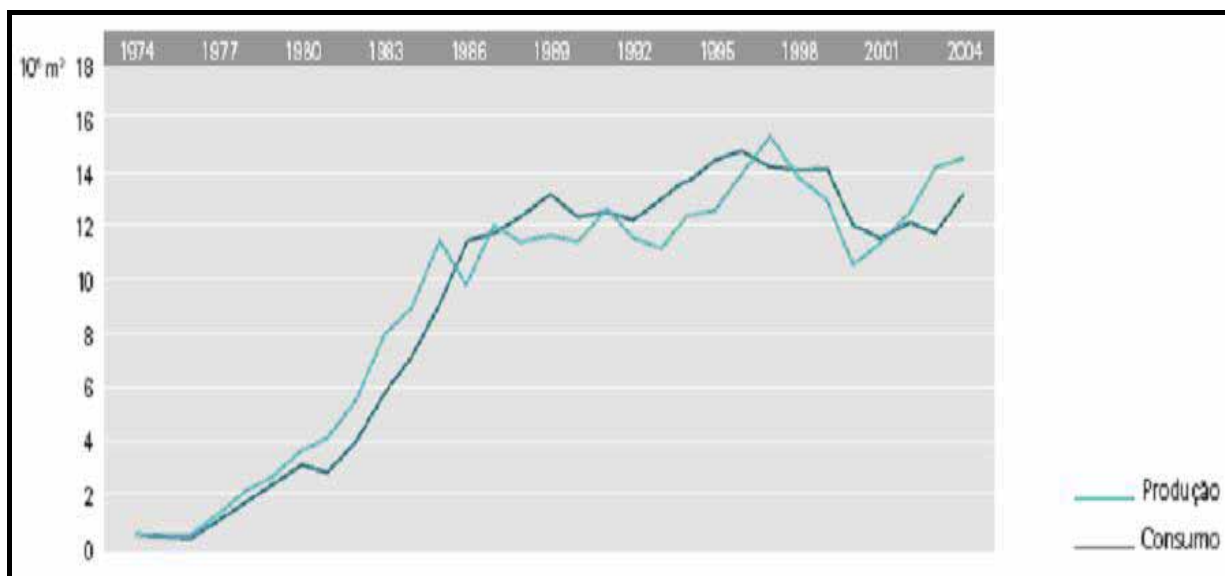


Figura 1.3 - Produção e consumo de álcool no Brasil, durante o período de 1974 a 2004 (BRASIL, 2005).

Estados Unidos, China, Índia e Rússia, também produzem álcool combustível, mas o Brasil é o maior produtor a partir da cana-de-açúcar e o único a implementar em larga escala a utilização deste combustível alternativo em substituição aos derivados de petróleo. Com o avanço tecnológico e o investimento em pesquisa, a técnica brasileira para a produção de álcool se tornou mais eficiente, resultando no decréscimo dos custos de produção e, por consequência, dando ao álcool nacional maior competitividade no mercado internacional. Desta forma, o Brasil assumiu um lugar de destaque no mercado consumidor, produtor e exportador de álcool combustível (MARRIS, 2006). Com isto, países como Japão e Alemanha vêm realizando acordos comerciais com o Brasil para a compra de álcool combustível e

tecnologia de produção (BERG, 2005; BRUNACCI, 2005; MANFREDINI, 2005; ORELLANA e NETO, 2006; WHEALS *et al.*, 1999; WYMAN, 1999; ZANIN *et al.*, 2000).

A produção de carros movidos exclusivamente a álcool não deverá ascender e até há a possibilidade de ser extinta. Entretanto, os produtores de álcool têm o importante papel de assegurar o abastecimento, pois os automóveis bicom bustíveis (com motores *flex*, que funcionam com gasolina e álcool em qualquer proporção), começam a ganhar espaço no mercado brasileiro (Figura 1.2). Este tipo de veículo garante ao consumidor um risco mínimo de desabastecimento e dá alternativas para superar crises como as ocorridas em meados do ano passado, quando o petróleo superou a marca de US\$ 61/barril (BERTELLI, 2005; MATTOS, 2006; TAVARES, 2005).

Demonstrando a viabilidade e a possibilidade de expansão do Proálcool nacional, aponta-se que o incremento do álcool como fonte energética representou uma economia de bilhões de dólares na compra de combustível e outros bilhões de dólares com os juros da dívida externa, no período 1976 a dezembro de 2004. Além de divisas econômicas, o Proálcool apresentou um importante papel nas áreas sociais e de desenvolvimento, uma vez que desde a sua criação, estima-se a geração de milhões de empregos diretos e indiretos (aproximadamente 80 % deles na área agrícola). Atualmente, as áreas aptas à cultura de cana de açúcar são mais de 12 % do território nacional, porém são utilizados apenas 0,6 % (BERTELLI, 2005).

Em suma, como relatado por Luiz Gonzaga Bertelli na matéria “A verdadeira história do Proálcool” publicado em 16/11/2005 no jornal O Estado de São Paulo: “O álcool, que sempre foi considerado um subproduto do açúcar, passou a desempenhar papel estratégico na economia brasileira e, diante do sucesso da iniciativa, deixou de ser encarado apenas como resposta a uma crise temporária, mas como solução permanente, quando vozes

autorizadas, ainda na esteira da crise, alertaram o mundo para o risco das reservas petrolíferas, lembrando que não seriam eternas”.

1.2 Utilização de açúcares por *S. cerevisiae*

Conforme descrito por LAGUNAS (1993), o passo inicial para o processo de fermentação é a captação dos açúcares para o interior da célula. A glicose e a frutose são monossacarídeos cuja captação ocorre via um sistema de difusão facilitada, através dos transportadores de hexose codificados pelos genes *HXT* (Figura 1.4). Este sistema de transporte é composto por uma família de aproximadamente 20 genes (*HXT1 – 17*, *GAL2*, *SNF3* e *RGT2*), diferindo uns dos outros tanto pela função e regulação, quanto pela afinidade aos açúcares presentes no meio. Sabe-se que os genes *HXT1–7* codificam as principais permeases responsáveis pelo transporte de hexoses (glicose, frutose e manose), e geralmente possuem afinidades menores pela frutose e manose do que pela glicose, motivo pelo qual este último carboidrato é captado mais rapidamente. Já o gene *GAL2* codifica para um transportador de galactose e glicose, porém induzido apenas pela galactose. Acredita-se que os demais genes desta família são responsáveis por codificar proteínas transportadoras envolvidas na captação de açúcares em condições específicas, ou ainda codificam para receptores dos níveis de carboidratos presentes no meio extracelular (*SNF3* e *RGT2*) que mediam a regulação a expressão dos genes *HXT* (BOLES e HOLLEMBERG, 1997; DIDERICH *et al.*, 1999; KRUCKEBERG *et al.*, 1999; OZCAN e JONHSTON, 1999).

Além do transporte de monossacarídeos via um sistema de difusão facilitada, existe um sistema de transporte ativo de dissacarídeos, e até mesmo trissacarídeos, envolvendo o co-transporte com H^+ . A maltose e a maltotriose são um dissacarídeo e trissacarídeo de glicose, respectivamente, unidas por uma ligação osídica $\alpha 1-4$, sendo levados para o interior da célula através de um co-transporte com prótons H^+ (Figura 1.4), onde são hidrolisados pela maltase,

liberando moléculas de glicose que serão metabolizadas (ZASTROW *et. al.*, 2001).

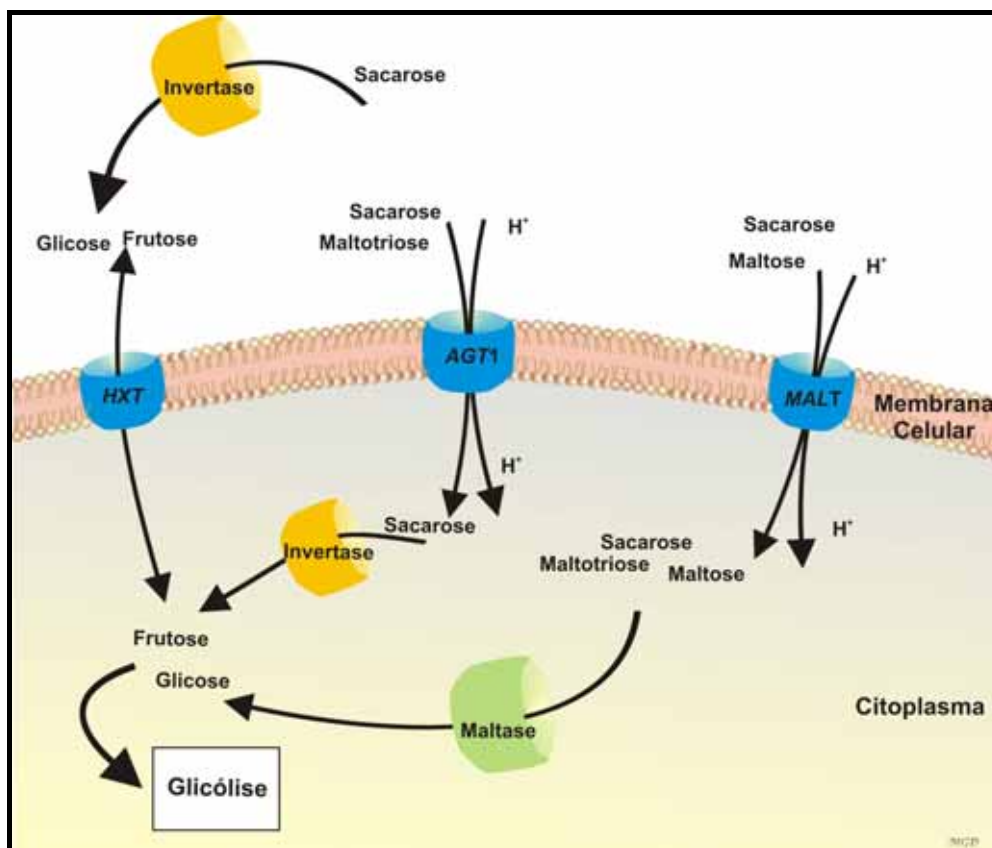


Figura 1.4 - Representação das vias de utilização de açúcares por *S. cerevisiae*. Vide o texto para detalhes sobre as enzimas e proteínas envolvidas.

Para que *S. cerevisiae* seja capaz de fermentar estes açúcares é necessária a presença no genoma das leveduras dos genes *MAL*. Esses genes podem ser encontrados em cinco diferentes loci, localizados nas regiões teloméricas de cromossomos distintos: *MAL1* (cromossomo VII), *MAL2* (III), *MAL3* (II), *MAL4* (XI) e *MAL6* (VIII). Conforme demonstra a Figura 1.5, em cada um desses loci podem ser encontrados três diferentes genes que codificam para proteínas com diferentes funções: o gene *MALT* ou *MALx1* (*x* representa o locus) codifica para o transportador de maltose, o gene *MALS* ou *MALx2* codifica a maltase, e o gene *MALR* ou *MALx3* codifica uma proteína reguladora responsável pela indução da expressão dos demais genes na presença de maltose ou outros α -glicosídeos, ligando-se à região UAS_{MAL} , presente entre os genes *MALT* e *MALR*. Por outro lado, a presença de glicose

no meio causa a ativação da proteína Mig1 que bloqueia as regiões promotoras UAS_{MAL} , reprimindo a expressão gênica (HORÁK, 1997; NEEDLEMAN, 1991; NOVAK *et al.*, 2004).

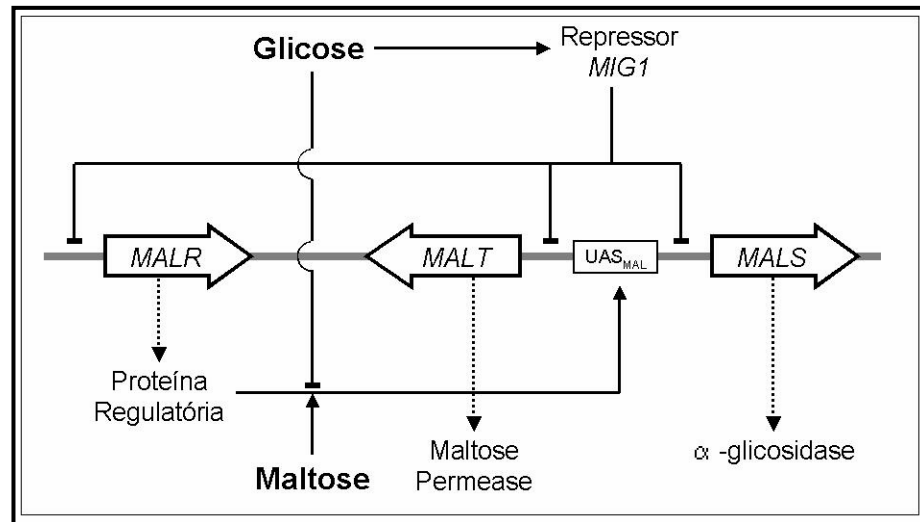


Figura 1.5 – Estrutura dos genes *MAL*. As setas maiores indicam a organização cromossômica de cada gene *MAL* (telômero à direita, centrômero à esquerda), as linhas pontilhadas indicam os produtos da transcrição e tradução de cada gene, a linha contínua com seta indica indução e as linhas contínuas com pontas rombas indicam repressão (STAMBUK, 1999).

Quando algum desses loci não possui o gene regulador *MALR* (*MALx3*), ele recebe a denominação *malg* para indicar que é parcialmente funcional (NAUMOV *et al.*, 1994). Ao analisarem alelos naturais do transportador de maltose presentes em locus *mal1g*, HAN *et al.* (1995) caracterizaram um gene que passou a ser chamado *AGT1* (*α-glucoside transporter*), responsável pelo transporte ativo de uma série de α -glicosídeos, sendo aparentemente regulado pelos mesmos mecanismos de regulação gênica dos demais genes *MAL*, uma vez que possui uma sequência UAS_{MAL} na sua região promotora (HAN *et al.*, 1995; STAMBUK *et al.*, 1998, 1999, 2000). Conforme descrito por STAMBUK *et al.* (2000) e STAMBUK e DE ARAUJO (2001), a permease *AGT1* é um transportador de alta afinidade para sacarose e trealose (e menor afinidade pela maltose, maltotriose e α -metil-glicosídeo), enquanto os transportadores *MALx1* possuem alta afinidade pela maltose (e transportam sacarose e trealose com baixa afinidade).

A maltase (α -glicosidase - E.C. 3.2.1.20) é uma enzima citoplasmática que possui um

pH ótimo em torno de 6,8 e é capaz de hidrolisar a ligação osídica com conformação “ α ”, presente em oligossacarídeos (Figura 1.6) tais como maltose, maltotriose e sacarose, além de substratos sintéticos como o *p*-nitrofenil- α -D-glicopiranosídeo (*p*NP α G) (Figura 1.5) (TABATA *et al.*, 1984; ZASTROW *et al.*, 2001). De fato, a sacarose é um dissacarídeo formado por uma molécula de glicose ligada a uma de frutose, através de uma ligação osídica de conformação Gli α 1- β 2 Fru (Figura 1.5). Este tipo de ligação confere à este carboidrato a possibilidade de sofrer a ação de hidrolases capazes de clivarem tanto a ligação osídica “ α ”, pela maltase (α -D-glicosidase), quanto a ligação “ β ”, neste caso catalisada pela enzima invertase ou β -D-frutosidase (EC 3.2.1.2.6).

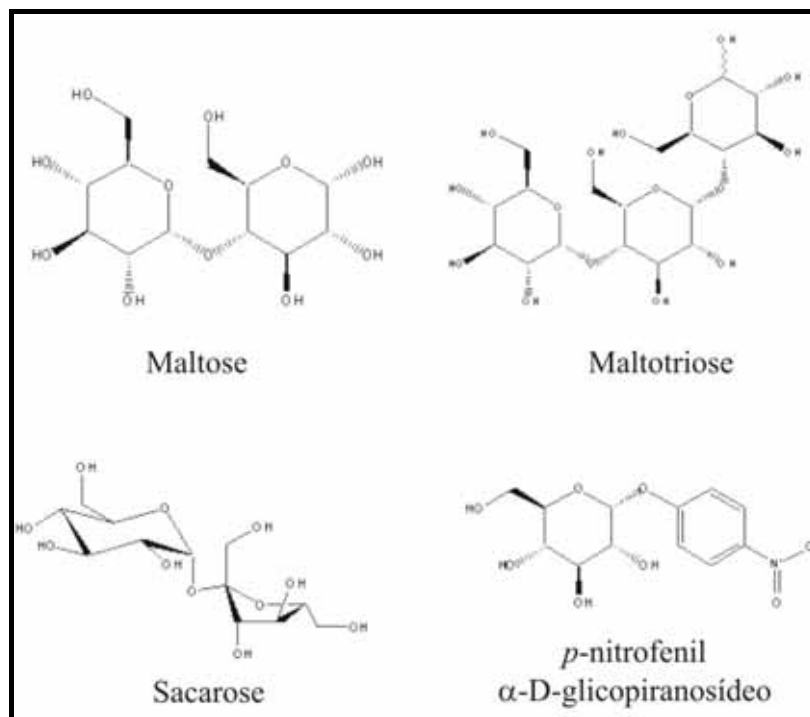


Figura 1.6 - Estruturas químicas da maltose, maltotriose, sacarose e *p*NP α G. A maltose é formada por duas moléculas de glicose unidas por uma ligação osídica α (1 $\rightarrow$ 4), assim como a maltotriose que é formada por três moléculas de glicose com a mesma ligação. A sacarose é formada por glicose e frutose, unidas através de uma ligação osídica α 1- β 2, enquanto o análogo estrutural da maltose (*p*NP α G) é formado por uma glicose unida ao *p*-nitrofenol através de uma ligação osídica de conformação α (CambridgeSoft, 2006).

A invertase tem sido extensivamente caracterizada bioquimicamente, e na levedura *S. cerevisiae* vários genes responsáveis pela sua síntese tem sido caracterizados. Os genes *SUC* codificam para esta enzima, sendo que o locus ancestral (aquele encontrado em todas as

leveduras *Saccharomyces*) é o denominado *SUC2*, localizado na região sub-telomérica do cromossomo IX. Através de processos de recombinação e amplificação gênica, este gene pode também ser encontrado nos telômeros de diferentes cromossomos, dando lugar aos genes *SUC1* (VII), *SUC3* (II), *SUC4* (XIII), *SUC5* (IV) e *SUC7* (VIII) (GROSSMANN e ZIMMERMANN, 1979; HOHMANN e ZIMMERMANN, 1986; KORSHUNOVA *et al.*, 2005; NAUMOV *et al.*, 1996). A análise deste processo de amplificação gênica em leveduras isoladas em diferentes ambientes industriais revelou que leveduras geralmente expostas a meios contendo sacarose (como o caldo-de-cana), como na produção de células, ou onde a sacarose é o principal açúcar a ser fermentado, apresentam alta atividade invertase e vários loci *SUC* em seu genoma. Isto inclui leveduras de panificação, cervejeiras e utilizadas na produção de destilados, enquanto que leveduras utilizadas na produção de vinho geralmente não apresentam esta amplificação gênica, uma vez que na produção desta bebida alcoólica a glicose é o principal açúcar a ser metabolizado (BIDENNE *et al.*, 1992; BENITEZ *et al.*, 1996; BENITEZ e CODON, 1995; CODON *et al.*, 1997, 1998; DENAYROLLES *et al.*, 1997; NADAL *et al.*, 1999; NESS e AIGLE, 1995).

Entretanto, as células de *S. cerevisiae* possuem dois tipos de invertase: uma forma extracelular (ou periplasmática) e outra intracelular. Como descrito por CARLSON e BOTSTEIN (1982), dois tipos de RNAs mensageiros são transcritos a partir dos genes *SUC*, sendo um transcrito maior (1,9 kb) que contém uma sequência responsável por codificar um peptídeo sinal (20 aminoácidos) responsável por direcionar a secreção da proteína para fora da célula (espaço periplasmático), e um outro transcrito menor (1,8 kb) sem essa sequência sinalizadora, que permite a síntese da enzima intracelular (Figura 1.7). Ambas enzimas possuem o mesmo pH ótimo ácido (pH 4,6-5,0) e mesma temperatura ótima (35-50 °C) e embora a sequência protéica seja idêntica, o peso molecular da forma intracelular é de 135 kDa e superior a 270 kDa (podendo chegar a complexos com mais de 800 kDa) para a

invertase extracelular. Esta diferença na massa se deve as glicosilações adicionadas à forma extracelular durante sua síntese e tráfego pela via secretória das células, modificações que conferem proteção contra a ação de proteases (não interferindo na ação invertásica), contribuindo para a formação de complexos protéicos na forma de tetrâmeros, hexâmeros e até mesmo octâmeros da enzima, garantindo sua retenção no espaço periplasmático da célula (ALVARADO *et al.*, 1990; ARRUDA e VITOLO, 1999; REDDY *et al.*, 1988).

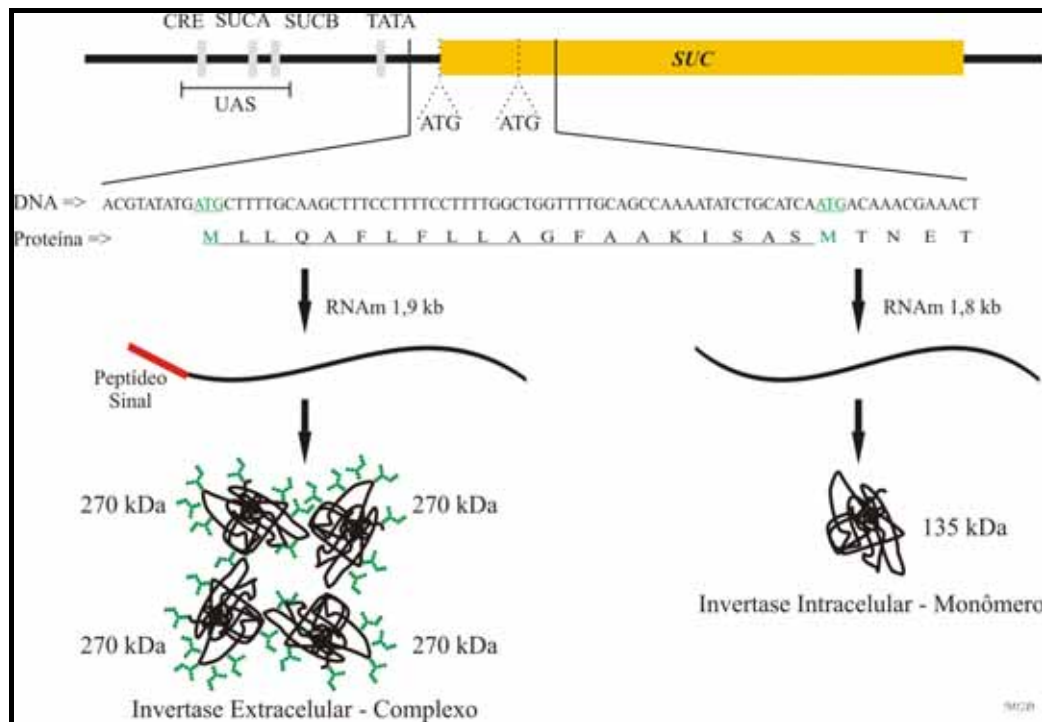


Figura 1.7 – Estrutura dos genes *SUC* e, tradução das formas intra e extracelular da invertase de *S. cerevisiae*. Localização da região de ativação da transcrição dos genes *SUC* (UAS – Upstream Activating Sequence) e os sítios de ligação de proteínas reguladoras (CRE, SUCA e SUCB), incluindo o TATA-box. O(s) códon(s) que permitem o início da transcrição em cada RNAm está representado em verde, e a sequência do peptídeo sinal sublinhada.

Enquanto a invertase intracelular é expressa constitutivamente, a expressão da forma extracelular é reprimida por altas concentrações de sacarose e seus produtos de hidrólise (glicose e frutose), ou inclusive outros açúcares como manose ou até xilose. Baixas concentrações de glicose são por outro lado, necessárias para a expressão ótima do gene. Embora até o presente, uma série de proteínas repressoras dos genes *SUC* (Mig1, Rgt1, Sfl1, Sko1 e outras) tenham sido caracterizadas, a identidade molecular do possível ativador da

transcrição ainda é desconhecida (BELINCHÓN e GANCEDO, 2006; BU e SCHMIDT, 1998; DYNESEN *et al.*, 1998; ECHEGARAY *et al.*, 2000; HAQ *et al.*, 2003; HERWING *et al.*, 2001; OZCAN *et al.*, 1997; REDDY *et al.*, 1988).

Portanto, duas vias de utilização de sacarose são conhecidas na levedura *S. cerevisiae* (vide Figura 1.3): pela ação da invertase extracelular a sacarose é hidrolisada em glicose e frutose, sendo seus produtos de hidrólise captados pelos transportadores *HXT* e fermentados, ou alternativamente a sacarose pode ser captada diretamente através do co-transporte com H^+ e hidrolisada internamente pela invertase intracelular ou maltase (BADOTTI *et al.*, 2006; BATISTA *et al.*, 2004; BARFORD *et al.*, 1992; MWESIGYE e BARFORD, 1996; ORLOWSKI e BARFORD, 1991; STAMBUK *et al.*, 2000; STAMBUK e DE ARAUJO, 2001).

1.3 Processo Fermentativo para a Produção de Álcool Combustível

Embora diversos produtos agrícolas ricos em açúcares sejam utilizados para a produção de álcool, como o milho e beterraba no caso dos EUA e França, no Brasil é utilizado o caldo de cana-de-açúcar (e seus derivados, o melaço) como substrato para o processo fermentativo. O caldo extraído da cana-de-açúcar é utilizado diretamente como substrato para o processo fermentativo de produção de aguardente e álcool combustível, já no ramo da panificação é empregado para produção do chamado “fermento biológico”, enquanto que na indústria alimentícia é usado para a produção de açúcar invertido pela hidrólise da sacarose em glicose e frutose (ALVA e LEÃO, 2003; INGLEDEW, 1993; PETERS, 2006; ROSE e VIJAYALAKSHMI, 1993; SCHWAN *et al.*, 2001; WHEALS *et al.*, 1999; ZANIN *et al.*, 2000). O caldo de cana utilizado como matéria-prima para os processos citados anteriormente é composto por 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, sendo a sacarose o

principal carboidrato presente no caldo de cana (AQUARONE *et al.*, 1975). Desta forma, calcula-se que mais da metade da produção mundial de etanol utilizam meios ricos em sacarose na fermentação.

Para um eficiente processo de fermentação, além da seleção e desenvolvimento de linhagens de levedura adequadas, deve-se levar em consideração a qualidade da cana de açúcar, pois é de suma importância para que ocorra uma fermentação com alto rendimento. Para incrementar o teor de sacarose no caldo de cana, há estudos investindo na seleção e no melhoramento genético em *Saccharum officinarum* (cana-de-açúcar) para incrementar a produção de açúcar (CALSA JR e FIGUEIRA, 2007; MCCORMICK *et al.*, 2006; SCHÄFER *et al.*, 2004; WU e BIRCH, 2007). Em paralelo a isto, deve ser considerada a diversidade do solo para o plantio das diferentes linhagens de cana-de-açúcar, a forma de colheita (a colheita manual é realizada com queima prévia do canavial, resultando na hidrólise da sacarose, enquanto que a mecanizada dispensa a queima) e as condições de higienização e processamento da cana (AQUARONE *et. al.*, 1975; CETEC, 1994).

O processo de produção do álcool combustível nas usinas brasileiras está relacionado diretamente com a produção de açúcar, conforme descrito sucintamente a baixo:

- a) Moenda - Após a colheita (manual ou mecanizada) da cana-de-açúcar se faz à moagem da cana para extrair o caldo rico em açúcar.
- b) Sulfitação - O caldo passa por colunas de sulfitação, onde o gás sulfito liberado da queima do enxofre é insuflado em contra corrente na coluna, promovendo o contato do gás com o caldo. O enxofre tem a propriedade de flocular diversos colóides dispersos no caldo e os tornar produtos insolúveis.
- c) Neutralização - Em seguida, é adicionado leite de cal, neutralizando o pH do caldo, tornando-o menos corrosivo e facilitando a decantação das impurezas sólidas.

- d) Aquecimento - O caldo é então, aquecido até fervura ($\simeq 105\text{ }^{\circ}\text{C}$) através de vapor d'água, favorecendo a perda de água e acelerando a floculação de impurezas.
- e) Decantação - Em tanques com grande capacidade, o caldo tratado e aquecido é decantado continuamente (de um lado entra o caldo aquecido e cheio de impurezas e do outro lado sai caldo limpo e clarificado), sendo as impurezas precipitadas retiradas pela parte inferior do decantador.
- f) Evaporação - Nos evaporadores parte da água presente no caldo é evaporada, resultando em um líquido espesso denominado xarope. A concentração de açúcar no caldo de cana que inicia o processo (antes da sulfitação) é em torno de $16,0^{\circ}$ Brix (medida da concentração de açúcares dissolvidos em solução), e na saída do xarope apresenta-se em torno de $60,0^{\circ}$ Brix.
- g) Cristalização - O xarope é clarificado por flotação, onde são eliminadas mais impurezas, e então enviado a cosedores a vácuo, que concentram ainda mais o xarope, até que pela supersaturação do meio ocorra o fenômeno da cristalização, formando a chamada “massa cozida” que são cristais de açúcar envoltos por solução açucarada chamada mel.
- h) Centrifugação - Nas centrifugas, faz-se a separação dos cristais de açúcar e do mel, a partir da massa cozida. Ao fim do processo, os cristais são conduzidos ao secador, e o mel sofre novo processo de cristalização, até extrair o máximo possível de açúcar, quando se obtém o melaço, que é encaminhado para a produção de álcool.
- i) Produção de álcool - Caldo de cana e melaço são misturados e diluídos com água, de forma a atingir a concentração desejada de açúcar, formando o mosto. Esse é enviado às dornas de fermentação, onde são inoculadas leveduras selecionadas que consome o açúcar, produzindo etanol e biomassa. O mosto fermentado é centrifugado para separar o “vinho” e as células de levedura. O vinho é enviado às colunas de destilação,

enquanto que o fermento sofre tratamento com ácido para reduzir a contaminação por bactérias, para em seguida retornar à dorna de fermentação e iniciar um novo ciclo fermentativo, realizado sucessivamente até o fim da safra de colheita da cana-de-açúcar. Nas colunas de destilação o álcool é separado do vinho, originando a vinhaça (rica em matéria orgânica, potássio e outros nutrientes importantes para as plantas), que é misturada com a água de lavagem de cana (antes do processo de moagem) e usada na fertilização e irrigação do canavial (AQUARONE *et al.*, 1975; DE ARAÚJO, 2002; CETEC, 1994; WHEALS *et al.*, 1999).

Embora *S. cerevisiae* seja o principal microrganismo utilizado pelas usinas produtoras de álcool combustível, as técnicas utilizadas para a obtenção do mosto e a forma como é conduzido o processo fermentativo (em condições não estéreis), favorecem a proliferação de microrganismos contaminantes (leveduras e bactérias), ou mesmo uma sucessão de linhagens selvagens de *S. cerevisiae*. Contaminações por lactobacilos e *Acetobacter* provocam perdas significativas na produtividade, e contaminações por outras leveduras (p.ex. *Dekkera bruxellensis*) podem significar perdas maiores, uma vez que estes microrganismos são resistentes a bactericidas e/ou antibióticos. Apesar disso, uma série de trabalhos demonstram a existência de linhagens de *S. cerevisiae* capazes de dominar a dorna de fermentação até o fim da safra, apresentando alta produtividade. Uma série de usinas emprega, atualmente, desde o início do processo, linhagens isoladas nos processos fermentativos, adaptadas aos estresses encontrados no ambiente industrial mantendo a sua viabilidade e vitalidade ao longo dos ciclos fermentativos (AMORIM *et al.*, 2004; DA SILVA FILHO *et al.*, 2005a, 2005b; GUERRA *et al.*, 2001; LIBERAL *et al.*, 2005, 2007; PARAZZI JR, 2006; PATARO *et al.*, 2000; WHEALS *et al.*, 1999).

Nas últimas décadas, têm-se realizado o isolamento e seleção de linhagens mais apropriadas para a produção industrial de álcool. Estas são analisadas quanto as suas

habilidades fermentativas e robustez genômica, em outras palavras, que possuam alta eficiência fermentativa e capacidade de tolerância às condições estressantes, como alto teor alcoólico, pH e temperatura, competição com microorganismos contaminantes, etc. As condições estressantes exercem uma pressão seletiva, forçando a adaptação e evolução das diferentes linhagens presentes no meio. As leveduras industriais são geralmente poliplóides, característica que é apontada como responsável por tornar estes microorganismos mais resistentes às condições de estresse e mutação, ao contrário das cepas de laboratório que são haplóides (AA *et al.*, 2006; FEREA *et al.*, 1999; IHMELS *et al.*, 2005; LANDRY *et al.*, 2006; LIBERAL *et al.*, 2005; PARAZZI JR, 2006; QUEROL, *et al.*, 2003).

Os processos fermentativos podem ser classificados em três grandes grupos, segundo a maneira através do qual o substrato é adicionado e o produto retirado: contínuo, descontínuo (batelada simples) ou semicontínuo (batelada alimentada). No processo contínuo, mosto novo é adicionado à dorna de fermentação com a mesma vazão em que o mosto fermentado é removido. Nos processos em batelada simples, o mosto é inicialmente carregado na dorna de fermentação e, ao término do processo, o mosto fermentado é removido, enquanto que nos processos de batelada alimentada, a fermentação ocorre da mesma forma que em batelada simples, porém ao fim do processo de fermentação, retira-se da dorna um certo volume de mosto fermentado e adiciona-se igual volume mosto novo, procedimento esse, realizado às vezes por vários meses consecutivos (BORZANI, *et al.*, 1975).

No processo brasileiro, atualmente são utilizados mostos contendo aproximadamente 180 g/L de açúcares totais, em sistemas de fermentação contínua ou batelada. Os processos de fermentação em batelada representam cerca de 75 % das destilarias do país, produzindo até 87 g/L de etanol, representando uma eficiência de 92 %. Ambos processos apresentam vantagens e desvantagens entre si, como: tempo de fermentação, instalações e equipamentos necessários, automatização, manutenção das condições de esterilidade por longos períodos de tempo, etc.

(BORZANI, *et al.*, 1975; WHEALS *et al.*, 1999). Com isto, dependendo do processo adotado pela usina, a forma e velocidade de alimentação das dornas de fermentação com o caldo de cana podem resultar na rápida hidrólise da sacarose pelas células, fato que gera um significativo estresse osmótico devido às altas concentrações de glicose e frutose produzidas (ocorrido principalmente nos processos em batelada e reduzido no contínuo). Isto causa alterações significativas na expressão de genes e revela diversas adaptações metabólicas, incluindo a produção de compostos com função protetora e reserva energética celular (trealose, glicerol e glicogênio), além da produção de ácidos (acético e succínico), causando gasto energético e diminuição no rendimento da fermentação (ALCARDE e BASSO, 1997; ERASMUS *et al.*, 2003; MYERS *et al.*, 1997; VERSTREPEN *et al.*, 2004). Outra forma de perda no rendimento da produção de etanol é a fermentação incompleta da frutose existente no meio, uma vez que algumas linhagens de *S. cerevisiae* não captam eficientemente este açúcar (BERTHELS *et al.*, 2004). Todos estes fatores podem contribuir para a proliferação de bactérias e leveduras contaminantes.

Apesar de a seleção ter favorecido linhagens com genótipos e características desejadas, melhorias ainda são necessárias para aumentar a produtividade e diminuir custos nas aplicações industriais dessa levedura. Por exemplo, no processo realizado em cervejarias, altas concentrações de açúcares (predominantemente maltose e maltotriose) são fermentadas eficientemente devido à captação direta destes açúcares pelas células (sem ocorrer hidrólise extracelular), gerando um rápido equilíbrio entre a concentração dos açúcares no interior e exterior da célula, impedindo o estresse osmótico (THOMAS *et al.*, 1996; ZASTROW *et al.*, 2001). Considerando que a sacarose pode ser eficientemente fermentada através do transporte ativo do açúcar (BADOTTI *et al.*, 2006; BATISTA *et al.*, 2004), seria interessante desenvolver, por exemplo, leveduras incapazes de hidrolisar a sacarose extracelularmente, mas que continuem fermentando este açúcar eficientemente.

2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

Como salientado na Introdução, a obtenção de cepas de levedura capazes de fermentar sacarose sem que ocorra a hidrólise extracelular deste açúcar à glicose e frutose, poderia trazer significativos benefícios às usinas de produção de álcool combustível no Brasil. Estas leveduras dariam uma maior flexibilidade à condução do processo industrial, permitindo alimentar as dornas de fermentação com grandes volumes de mosto contendo concentrações maiores de açúcar, a uma velocidade maior, mas reduzindo o estresse osmótico causado pela hidrólise extracelular do dissacarídeo e diminuindo a quantidade de glicose e frutose disponíveis para bactérias e leveduras contaminantes.

Desta forma, o presente trabalho tem como objetivo analisar e caracterizar molecularmente a utilização de açúcares por leveduras industriais e por leveduras de laboratório com genótipos conhecidos, de forma a desenvolver linhagens de *S. cerevisiae* capazes de fermentar sacarose, mas sem possuir atividade invertase (intra e extracelular).

Mais especificamente:

- Analisar a utilização de açúcares (crescimento celular, consumo de açúcares e produção de etanol) por linhagens industriais utilizadas na produção de álcool combustível no Brasil, assim como por linhagens de laboratório;
- Modificar geneticamente linhagens de laboratório de forma a produzir leveduras incapazes de hidrolisar sacarose extracelularmente, por não possuírem o gene *SUC2*;
- Determinar o perfil enzimático (atividades invertase e maltase) e a atividade de transporte ativo de sacarose nas linhagens;
- Analisar a fermentação em batelada da sacarose pelas linhagens industriais, bem como pelas linhagens modificadas em laboratório e em suas parentais.

3. MÉTODOS E PROCEDIMENTOS

3.1 Cepas utilizadas

Foram analisadas 07 (sete) linhagens de *S. cerevisiae* selecionadas para a produção de álcool combustível no Brasil. A linhagem de laboratório CEN.PK2-1C foi utilizada para a obtenção de 03 (três) linhagens deletadas nos genes *SUC2* e/ou *AGT1* (Tabela 3.1), conforme descrito abaixo. A cepa de *Escherichia coli* DH5 α foi utilizada para armazenar e replicar os plasmídeos usados nos procedimentos de modificação genética das células de levedura.

Tabela 3.1 - Linhagens de microrganismos utilizados neste estudo e seus respectivos genótipos, bem como suas procedências.

Cepa	Característica	Procedência*
<u><i>S. cerevisiae</i>:</u>		
CAT-1	Levedura Industrial	1
PE-2	“	1
VR-1	“	1
BG	“	2
SA	“	2
UFPE135	“	3
UFPE379	“	3
CEN.PK2-1C	<i>MATa MAL21 MAL22 MAL23-8^c AGT1 MAL12 mal13 SUC2 ura3-52 his3Δ1 leu2-3,112 trp1-289</i>	4
LCM003	CENPK2-1C <i>agt1Δ::Kan^R</i>	Este Trabalho
MGD-01	CENPK2-1C <i>suc2Δ::Kan^R</i>	Este Trabalho
PSY006	CENPK2-1C <i>agt1Δ::Kan^R suc2Δ::URA3</i>	Este Trabalho
<u><i>E. coli</i>:</u>		
DH5 α	<i>F- recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17(vK-mk+) supE44 rel1 Δ(argF-lacZya) U169 (ϕ80 lacZΔM15)λ</i>	Stratagene

*1) Fermentec Ltda; 2) Centro de Tecnologia Canavieira (CTC), antiga COPERSUCAR Ltda; 3) Prof. Dr. Marco Antônio de Moraes Jr da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE); 4) EUROSCARF (European *Saccharomyces cerevisiae* Archive for Functional Analysis) e descrita por ENTIAN e KÖTTER (1998).

3.2 Meios de Cultura

3.2.1 Crescimento

Foi utilizado meio rico completo (YP), contendo a fonte de carbono de interesse, ou meio sintético completo (SC) suplementado com aminoácidos e/ou bases nitrogenadas de interesse, conforme descrito na Tabela 3.2. Os meios tiveram seu pH ajustado com solução de HCl para $5,0 \pm 0,1$ e esterilizados em autoclave a 120 °C por 20 min. Quando indicado, os meios recém esterilizados foram deixados em temperatura ambiente até atingirem a temperatura aproximada de 60 °C e adicionou-se 100 µg/mL de Geneticina/G418 esterilizada previamente por filtração, utilizando filtros de nitrocelulose com porosidade de 0,22 µm (HAWP; Millipore). Filtros e demais componentes do processo de filtração foram previamente esterilizados em autoclave a 120 °C por 20 min. Para o crescimento das células de *E. coli*, foi utilizado meio LB com Ampicilina (Tabela 3.2), com pH ajustado para $7,5 \pm 0,1$ com solução de NaOH e esterilizados em autoclave a 120 °C por 20 min. Os meios recém esterilizados foram deixados em temperatura ambiente até atingirem a temperatura aproximada de 60 °C e adicionou-se 100 µg/mL de Ampicilina esterilizada previamente por filtração, conforme descrito acima. Todos os reagentes utilizados no preparo dos meios de cultivo foram de grau analítico (Sigma Chemical Co.).

3.2.2 Fermentação

Foram preparados meios ricos completos (YP 2 vezes concentrado) contendo, 4 % de sacarose para os ensaios de fermentação com 20 g/L de açúcar, e 40 % de sacarose para os ensaios de fermentação com 200 g/L de açúcar. Os meios tiveram seu pH ajustado com solução de HCl para $5,0 \pm 0,1$ e armazenados em frascos a -20 °C (Tabela 3.3).

Tabela 3.2 - Composição dos meios de cultura utilizados nos crescimentos dos microrganismos.

Meio	Componentes	Nomenclatura
Rico Completo (YP) ^a	1 g de Extrato de Leveduras (Yeast Extract); 2 g de Peptona; 2 g de Fonte de Carbono; - Glicose (D); - Maltose (M); - Maltotriose (Mt) - Sacarose (S); 2 g de Agar ¹ ; Ajustar com HCl o pH $5,0 \pm 0,1$; Água Destilada Q.s.p ² 100 mL.	YPD 2%; YPM 2%; YPMt 2%; YPS 2%.
Sintético Completo (SC) ^a	0,67 g de Yeast Nitrogen Base (s/ aminoácidos); 2 g de Glicose; ? g Drop-out ³ ; 2 g de Agar ¹ ; Ajustar com HCl o pH $5,0 \pm 0,1$; Água Destilada Q.s.p ² 100 mL.	Sem Uracila – SC ^{-URA} . Sem Triptofano – SC ^{-TRP} .
L (LB) ^b	1 g de Triptona; 0,5 g de Extrato de Leveduras (Yeast Extract); 2 g de Agar ¹ ; 100 µg/mL de Ampicilina; Ajustar com NaOH o pH $7,5 \pm 0,1$; Água Destilada Q.s.p ² 100 mL.	LB c/ Ampicilina.

¹ Acrescido na confecção de meios sólidos; ² Quantidade suficiente para...; ³ Mistura de todos os aminoácidos e bases nitrogenadas necessárias ao crescimento das células, exceto a substância envolvida na transformação das leveduras. Quantidade a ser colocada nos meios depende da suplementação requerida. ^a SHERMAN (2005); ^b MANIATIS *et al.* (1982).

Tabela 3.3 - Composição dos meios de cultura utilizados nos ensaios de fermentação.

Meio	Componentes	Nomenclatura
Rico Completo (YP 2 vezes concentrado) ^a	2 g de Extrato de Leveduras (Yeast Extract); 4 g de Peptona; 4 ou 40 g de sacarose (S); Ajustar com HCl o pH $5,0 \pm 0,1$; Água Destilada Q.s.p ¹ 100 mL.	YPS 4 %; YPS 40 %.

¹ Quantidade suficiente para... ^a BADOTTI (2005).

3.3 Condições de Cultivo

3.3.1 Pré-cultivo

As células foram inoculadas em tubos de ensaio, contendo 3 mL de meio líquido YPD 2 %, e incubadas por 48 h a temperatura ambiente sob agitação de 40 rpm em uma incubadora giratória para tubos de ensaio (DIST – 431).

3.3.2 Crescimento

Uma alíquota do pré-cultivo (0,1 mL) foi transferida para erlenmeyers contendo 1/5 do seu volume de meio líquido YP, contendo como fonte de carbono glicose, maltose, sacarose ou maltotriose. As culturas foram colocadas em uma incubadora orbital de frascos (Nova Ética 430) a 28 °C e 160 rpm. A partir de alíquotas (0,5-1,0 mL) coletadas em intervalos de tempo pré-estabelecidos, foi determinado o crescimento celular através da densidade óptica (DO) medida em espectrofotômetro (Beckman DU-7) a 570 nm, e os sobrenadantes obtidos por centrifugação de 3.000 g, por 3 min, armazenados a -20 °C para posterior análise de açúcares e etanol.

3.3.3 Multiplicação das Linhagens de *S. cerevisiae* para Uso Experimental

Uma alíquota do pré-cultivo (0,5 mL) foi transferida para erlenmeyers contendo 1/5 do seu volume de meio líquido YPS 2%. As culturas foram incubadas como descrito acima por 6 – 8 h até atingir o início da fase exponencial de crescimento ($\simeq 1$ g/L). As células de levedura foram removidas do meio de cultivo por centrifugação a 3.000 g, por 5 min, lavadas três vezes com água destilada a 4 °C, e resuspensas em água destilada a 4 °C, de forma a atingir uma concentração celular de 20 ± 1 g/L.

3.4 Determinação da Concentração Celular

A concentração celular (X), conforme demonstra a equação 1, foi determinada pela relação entre a leitura da Densidade Óptica (DO) em espectrofotômetro a 570 nm (Beckman DU-7) e os valores de peso seco das células, utilizando um Fator de Cálculo (Fc).

$$X_{g/L} = DO \cdot Fc \quad (1)$$

O Fator de Cálculo (2) é a razão entre o peso seco celular (determinação gravimétrica) e a densidade óptica da cultura (3).

$$Fc = \frac{p_{\text{seco}}}{DO} \quad (2)$$

$$DO = Abs_{570nm} \cdot \text{Diluição} \quad (3)$$

Para isto, as linhagens de *S. cerevisiae* foram crescidas em 5 mL de meio YPD 2 %, por 48 h, a 28 °C e 160 rpm. Fez-se a determinação da densidade óptica das culturas, sendo respeitada a faixa linear de absorbância (0,030 – 0,300) e, em seguida, as mesmas foram filtradas em membrana de nitrocelulose com porosidade de 0,45 µm (HAWP; Millipore). Os filtros contendo as células foram lavados 03 (três) vezes com água destilada, e secos a 85 °C, por 3 h. Após este período, fez-se a estimativa do peso seco celular em balança analítica. Os fatores determinados para as diferentes linhagens resultaram no Fator de Cálculo (Fc) médio de 0,27.

3.5 Ensaio de Fermentação em Batelada

Foram misturadas quantidades de mesmo volume, da suspensão celular 20 g/L (obtida como descrito no item 3.3.3) e de meio YPS 4 % em erlenmeyers de 50 mL, de forma a atingir uma concentração final de 10 g/L de células, 10 g/L de Extrato de Leveduras, 20 g/L de Peptona e 20 g/L de sacarose. Alternativamente, a suspensão celular foi misturada com meio YPS 40 % em erlenmeyers de 50 mL, de forma a atingir uma concentração final de 10 g/L de células, 10 g/L de Extrato de Leveduras, 20 g/L de Peptona e 200 g/L de sacarose. Em ambas as estratégias os frascos foram incubados a 28 °C e 160 rpm, e amostras removidas e processadas em tempos pré-estabelecidos como descrito acima.

3.6 Determinação da Atividade de Transporte

A atividade de transporte de α -glicosídeos foi determinada utilizando-se o substrato *p*-nitrofenil- α -D-glicosídeo (*p*NP α G) como descrito por HOLLATZ e STAMBUK (2001). Brevemente, um volume de 100 μ L de células (20 g/L) foi misturado a 100 μ L de Substrato de Transporte (100 mM Tris-succinato pH 5,0; contendo 10 mM de *p*NP α G) e incubados à temperatura ambiente por 5-10 min. As reações foram interrompidas pela adição de 1 mL de bicarbonato de sódio 2 M e as amostras foram centrifugadas a 12.000 g, por 3 min. Retiraram-se 800 μ L do sobrenadante e fez-se a estimativa da absorbância do *p*-nitrofenol liberado a 400 nm ($\Delta\epsilon = 14,8 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, no pH > 9,0). Todas as determinações foram realizadas em triplicata e utilizando controles negativos com células fervidas em duplicata. As atividades de transporte foram expressas em nmoles de *p*-nitrofenol liberado, por mg^{-1} , por min^{-1} (4).

$$\text{Atividade de Transporte} = \frac{(\text{Abs}_{\text{Amostra}} - \text{Abs}_{\text{MCControl}}) \cdot 1000}{t_{\text{min}} \cdot X_{\text{mg}} \cdot \Delta\epsilon} \quad (4)$$

3.7 Determinações Enzimáticas

Para as análises descritas a seguir, foi utilizada uma suspensão celular a 20 g/L preparada conforme descrito no item 3.3.3.

3.7.1 Determinação da Atividade Invertase Extracelular

A atividade da invertase extracelular foi determinada utilizando-se células íntegras (não permeabilizadas) como descrito por SILVEIRA *et al.* (1996). Um volume de 100 μ L da suspensão celular foi misturado a 100 μ L de Tampão NaF (150 mM de Tris-succinato pH 5,0; 150 mM de NaF) e incubado em banho maria por 30 min, a 30 °C. Após o término do tempo, foi adicionado 100 μ L de sacarose 300 mM e novamente incubados em banho maria por 5 min, a 30 °C. Em seguida, as amostras foram colocadas a 100 °C, por 5 min, e a glicose

formada, presente no sobrenadante, foi determinada como descrito a seguir (item 3.8.1). Todas as determinações foram realizadas em triplicata e utilizando controles negativos com células fervidas em duplicata. A atividade da invertase é expressa em nmoles de glicose produzida, por mg^{-1} de células, por min^{-1} (5).

$$\text{Atividade da Invertase Extracelular} = \frac{(\text{Abs}_{\text{Amostra}} - \text{Abs}_{\text{MControle}}) \cdot 55,5 \cdot 30}{\text{Abs}_{\text{padrão}} \cdot t_{\text{min}} \cdot X_{\text{mg}}} \quad (5)$$

3.7.2 Determinação da Atividade da α -glicosidade

A atividade α -glicosidase foi determinada utilizando-se células permeabilizadas como descrito por STAMBUK (1999). Um volume de 100 μL de células foi centrifugado por 3 min a 5.000 g, lavadas com 500 μL do Tampão A (100 mM MOPS-NaOH pH 6,8) e posteriormente resuspendidas em 200 μL do Tampão B (20% glicerol, 1mM EDTA, 1mM DTT, 100mM MOPS-NaOH pH 6,8). Para permeabilizar as células foram adicionados 12 μL do Tampão C (1:4:1 tolueno, etanol, Triton X-100 10%, v:v:v) e homogeneizou-se os tubos vigorosamente por 1 min. As células foram centrifugadas por 3 min, a 5.000 g e lavadas com 1 mL do Tampão B e em seguida resuspendidas em 1 mL do Tampão A. Um volume de 50 μL dessa suspensão de células permeabilizadas foi adicionado a 950 μL de uma solução de $p\text{NP}\alpha\text{G}$ ou 50 μL de uma solução de carboidrato (200mM de carboidrato; 100 mM MOPS-NaOH pH 6,8).

Nas determinações de α -glicosidase utilizando $p\text{NP}\alpha\text{G}$ as amostras foram incubadas a 30 °C, por 1 min, e 5 min quando utilizado carboidratos. Em seguida, os tubos foram incubados a 100 °C, por 5 min e utilizou-se o sobrenadante para determinar a atividade enzimática, estimando-se a absorbância do p -nitrofenol liberado a 400 nm ($\Delta\epsilon = 7,28 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, no pH 6,8) ou através da determinação da glicose formada (como descrito no item 3.8.1), no caso dos carboidratos. As determinações foram feitas em triplicata e os controles

em duplicata com células previamente incubadas a 100 °C, por 5 min. A atividade α -glicosidase é expressa em nmoles glicose produzida, por mg^{-1} de células, por min^{-1} (6) e/ou nmoles de *p*-nitrofenol liberado, por mg^{-1} de células, por min^{-1} (7).

$$\text{Atividade da } \alpha\text{-glicosidase} = \frac{(\text{Abs}_{\text{Amostra}} - \text{Abs}_{\text{MControle}}) \cdot 55,5 \cdot 10}{\text{Abs}_{\text{padrão}} \cdot t_{\text{min}} \cdot X_{\text{mg}}} \quad (6)$$

$$\text{Atividade da } \alpha\text{-glicosidase} = \frac{(\text{Abs}_{\text{Amostra}} - \text{Abs}_{\text{MControle}}) \cdot 1000}{t_{\text{min}} \cdot X_{\text{mg}} \cdot \Delta\epsilon} \quad (7)$$

3.7.3 Determinação da Atividade Invertase Total

A atividade invertase total foi determinada utilizando-se as células permeabilizadas como descrito acima, porém utilizando tampões A e B preparados com 100 mM Tris-succinato pH 5,0. Um volume de 50 μL dessa suspensão de células permeabilizadas foi adicionado a 50 μL de uma solução de sacarose (200 mM de sacarose; 100 mM Tris-succinato pH 5,0). As amostras foram incubadas a 30 °C, por 5 min, e em seguida a 100 °C, por 5 min. Utilizou-se o sobrenadante para determinar a atividade enzimática através da determinação da glicose formada. As amostras foram feitas em triplicata e os controles em duplicata com células previamente incubadas a 100 °C por 5 min. A atividade da invertase é expressa em nmoles glicose produzida, por mg^{-1} de células, por min^{-1} (6).

3.8 Análises Bioquímicas

Foram realizadas através de métodos colorimétricos (Figura 3.1) utilizando um espectrofotômetro (Beckman DU-7), e um leitor para placas de ELISA (TECAN SUNRISE) ligado a um computador com interface ao programa Magellan V.3.11.

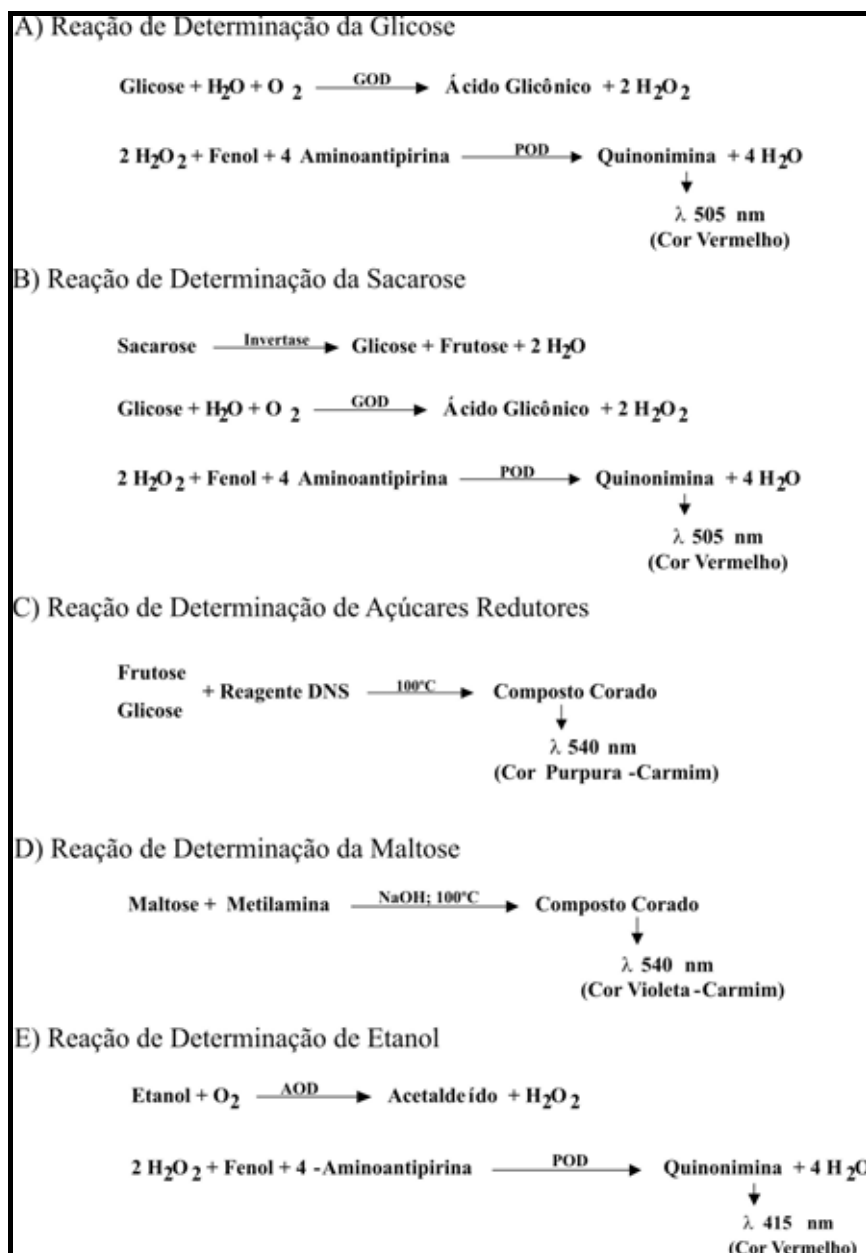


Figura 3.1 – Reações utilizadas na quantificação de açúcares e etanol.

3.8.1 Determinação de Glicose

Foram utilizados kits comerciais (BioTécnica) que utilizam o método enzimático da glicose oxidase (GOD)/peroxidase (POD) (Figura 3.1 A). As análises foram realizadas seguindo as instruções do fabricante: 10 µL de amostra incubado com 1 mL de Reagente de Cor (GOD > 15000 U/L, POD > 1200 U/L, 0,3 mM 4-aminoantipirina, 10 mM Fenol e 182,42 mM Tampão Fosfato pH 7,0), a 37 °C, por 10 min e em seguida fez-se a leitura de

absorbância a 505 nm. A concentração de glicose foi determinada, correlacionando a absorbância apresentada pela amostra, com a absorbância apresentada por uma solução padrão de glicose 0,1 % (1 g/L) (8).

$$[\text{glicose}] = \frac{\text{Abs}_{\text{Amostra}} \cdot 1}{\text{Abs}_{\text{Padrão}}} \cdot \text{diluição da amostra} \quad (8)$$

3.8.2 Determinação de Sacarose

A sacarose foi quantificada enzimaticamente utilizando protocolo adaptado de HOLMES (1996). Um volume de 20 µL das amostras foram incubados com 80 µL de uma solução de invertase (1 mg/mL de invertase em tampão CPB (0,05 M Ácido Cítrico; 0,09 M Fosfato Dibásico de Sódio pH 4,5)) a 37 °C, por 30 min e em seguida a 100 °C, por 5 min. Desta forma, a sacarose presente nas amostras, hidrolisada pela invertase (Figura 3.1 B), foi determinada quantificando-se a glicose antes e depois da adição da solução de invertase (9).

$$[\text{sacarose}] = \left\{ \frac{[\text{Abs}_{\text{Amostra}} \cdot 5 \cdot \text{diluição da amostra}]}{\text{Abs}_{\text{Padrão}}} - [\text{glicose da amostra}] \right\} \times 2 \quad (9)$$

3.8.3 Determinação de Frutose

A frutose foi calculada pela diferença da concentração de glicose e de açúcares redutores. Os açúcares redutores foram determinados por método químico adaptado de MILLER (1959), utilizando 50 µL de amostra e incubada com 150 µL de Reagente DNS (1 % de Ácido Dinitrosalicílico, 2 % de NaOH; 20 % de Tartarato de Sódio e Potássio e 0,2 % de Fenol) a 100 °C, por 10 min (Figura 3.1 C), sendo em seguida adicionados 800 µL de água destilada. Através de espectrofotometria a 540 nm, fez-se as determinações de absorbância, correlacionando as absorbâncias apresentadas pelas amostras, com a equação de reta (10) extraída de uma Curva Padrão, construída a partir de uma solução de glicose 0,2 % (2 g/L).

$$y = (ax + b) \cdot \text{diluição da amostra} - [\text{glicose da amostra}] \quad (10)$$

3.8.4 Determinação de Maltose

A maltose foi determinada por método químico que utiliza Metilamina em meio alcalino, adaptado de CÁCERES *et al.* (2000). Um volume de 600 µL (amostra + água destilada) foram incubados com 300 µL de NaOH 1 M e 300 µL de Metilamina 1 %, a 100 °C, por 5 min (Figura 3.1 D). Através de espectrofotometria a 540 nm, a concentração de maltose foi determinada, correlacionando a absorbância apresentada pela amostra, com a equação de reta (11) extraída de uma Curva Padrão, construída a partir de uma solução de maltose 2%.

$$y = (ax + b) \cdot \text{diluição da amostra} \quad (11)$$

3.8.5 Determinação de Etanol

O etanol foi quantificado enzimaticamente através da reação com a álcool oxidase(AOD)/peroxidase(POD) (Figura 3.1 E) descrito por HERBERTS (2006), adaptado dos protocolos descrito por SALGADO *et al.* (2000) e RODIONOV *et al.* (2002). Uma alíquota das amostras (10 µL) foi incubada em placas de ELISA (96 orifícios de fundo plano) mantidas sobre o gelo, com 200 µL de Reagente Enzimático (0,5 U/mL de Álcool Oxidase (AOD, de *P. pastoris*, Sigma), 4,0 U/mL de Peroxidase (POD, de raiz-forte, Toyobo, Brasil), 14 mM de 4-Aminoantipirina e 60 mM de Fenol em Tampão Fosfato de Sódio 0,1 M pH 7,5). Após incubação de 1 h, a 37 °C, determinou-se a absorbância em 415 nm utilizando um leitor para placas de ELISA. A concentração de etanol foi determinada pela correlação de absorbância apresentada pelas amostras, com a equação de reta (12) extraída de uma Curva Padrão, construída com soluções padrão de etanol 1-10 g/L.

$$y = (ax + b) \cdot \text{diluição da amostra} \quad (12)$$

3.9 Técnicas Gerais de Manipulação de Ácidos Nucléicos

3.9.1 Extração e Purificação de Plasmídeos em Bactérias (Miniprep)

Foi utilizado o método descrito por MANIATIS *et al.* (1982). A bactéria DH5 α contendo o plasmídeo de interesse, foi semeada em placas contendo meio LB sólido com Ampicilina 100 $\mu\text{g/mL}$ e incubadas *overnight*, a 37 °C, em estufa bacteriológica. No dia seguinte, uma única colônia foi inoculada em 5 mL de meio LB líquido com Ampicilina 100 $\mu\text{g/mL}$ e incubada *overnight*, a 37 °C, e 145 rpm. A cultura foi centrifugada por 3 min, a 6.000 g, e as células separadas do meio de cultivo, resuspendidas em 100 μL de GTE (50mM Glicose, 25mM Tris-HCl pH 8,0 e 10mM EDTA). Após incubação de 5 minutos em temperatura ambiente, foram adicionados 200 μL de NaOH/SDS (0,2 M NaOH e 1 % SDS) sob agitação vigorosa e incubada no gelo por 5 min. Em seguida, foram adicionados 150 μL de Acetato de Potássio 5 M sob agitação e incubou-se novamente no gelo por 5 min. Após centrifugar por 5 min, a 5.000 g, o sobrenadante foi transferido para um novo tubo, no qual foram adicionados 800 μL de etanol 95 %, com posterior incubação a temperatura ambiente de 2 min. O sobrenadante foi removido por centrifugação de 15 min, a 12.000 g, e o precipitado lavado com 1 mL de etanol 70 %. Após centrifugar novamente por 15 min, a 12.000 g, retirou-se totalmente o sobrenadante e os tubos contendo o DNA precipitado foram secos por 1 h, em capela de fluxo laminar sobre uma toalha de papel absorvente. Em seguida, o precipitado foi resuspenso em 30 μL de tampão TE (10 mM Tris-HCl e 1 mM EDTA pH 8,0) estéril, adicionou-se 1 μL de RNase (1 mg/mL) e incubou-se em estufa a 37 °C, por 1 h. Os tubos contendo os plasmídeos foram armazenados sob refrigeração a -20 °C. Para confirmar a estrutura dos plasmídeos, fez-se a análise do perfil de hidrólise com enzimas de restrição e eletroforese em gel de agarose.

3.9.2 Hidrólise de Plasmídeos

Os plasmídeos purificados foram hidrolisados com as enzimas de restrição apresentadas na tabela 3.4. A mistura reacional (5 μ L de plasmídeo, 1 μ L de Tampão de enzima 10x concentrado [específica para cada enzima], 1 μ L de enzima de restrição e 2 μ L de água MiliQ) foi incubada por 1 h, a 37 °C, e em seguida fez-se a análise do perfil de restrição através de eletroforese em gel de agarose, como a seguir (MANIATIS *et al.*, 1982).

Tabela 3.4 – Tamanho dos fragmentos de DNA gerados, após hidrólise dos plasmídeos utilizados neste estudo, conforme enzimas de restrição indicadas.

Plasmídeo	Enzimas de Restrição	Fragmento (pb)
pFA6a-kanMX6	<i>Bam</i> HI/ <i>Eco</i> RI	~1480
pAG60	<i>Hind</i> III/ <i>Hpa</i> I	~1600
pFA6a-TRP1-PADH1	<i>Bam</i> HI/ <i>Eco</i> RI	~1660

3.9.3 Eletroforese e Purificação de DNA

Às amostras de DNA (10 μ L) foram adicionados 2 μ L de Tampão de Corrida 10 vezes concentrado (20 % Ficoll 400, 0,1 M EDTA, 1,6 % SDS e 0,05 % de Azul de Bromofenol). Foi utilizado gel de agarose 0,7 % em Tampão TBE 0,5 vezes (45 mM Tris-borato, 1 mM EDTA pH 8,0) contendo Brometo de Etídio 2,5 μ g/mL. Depois de solidificado o gel, aplicaram-se as amostras, 5 μ L de padrão e fez-se a corrida eletroforética a 100 V, em Tampão TBE 0,5 vezes até a migração total do Azul de Bromofenol. Após a corrida, sob luz ultravioleta o gel foi fotografado e analisado (MANIATIS *et al.*, 1982).

3.10 Engenharia Genômica em *S. cerevisiae*

Os genes *AGT1* e *SUC2* foram deletados do genoma das cepas de levedura pelo processo de recombinação homóloga, através de metodologias baseadas em PCR como descrito por BATISTA *et al.* (2004), PETRACEK e LONGTINE (2002) e PUIG *et al.* (1998). Para isto, conforme demonstra a Figura 3.2, inicialmente foi produzido um fragmento linear

de DNA que apresenta homologia ao alvo de interesse no genoma da levedura, fragmento este chamado “módulo de mutação”. Para isto, plasmídeos contendo genes que são utilizados como marcadores de seleção de interesse (por ex.: *Kan^r*, *TRP1* ou *URA3*), foram utilizados em uma reação de PCR, juntamente com oligonucleotídeos iniciadores de transcrição (*primers*) construídos de forma a conter regiões de homologia ao plasmídeo e às regiões alvo no DNA da levedura. Quando as células são transformadas com o módulo, ele tende a integrar-se por homologia ao DNA da levedura, resultando em uma linhagem que expressa o marcador de seleção no lugar do gene (ou região genômica) de interesse (Fig. 3.2). Após a transformação, os mutantes são então selecionados em placas de Petri contendo meio de cultivo confeccionado com a suplementação requerida, sendo posteriormente realizada a confirmação por PCR utilizando *primers* que permitem verificar se houve ou não a inserção correta do módulo no genoma da levedura.

3.10.1 Plasmídeos e *Primers*

Como DNA molde na produção dos módulos de mutação foram utilizados 3 (três) plasmídeos: pFA6a-kanMX6 (*amp^r ori P_{TEF}-kan^r-T_{TEF}*) possui o gene *kan^r* de *Escherichia coli* (confere resistência à G418/Geneticina em leveduras), pAG60 (*amp^r ori P_{TEF}-CAURA3-T_{TEF}*) possui o gene *URA3* de *Candida albicans* (envolvido na síntese de uracila) e pFA6a-TRP1-PADH1 (*amp^r ori TRP1 P_{ADH1}*) possui o gene *TRP1* de *S. cerevisiae* (envolvido na síntese de triptofano), além de uma versão truncada do promotor forte *ADH1* (álcool desidrogenase) de *S. cerevisiae* (DEMARINI *et al.*, 2001; GOLDSTEIN *et al.*, 1999; LONGTINE *et al.*, 1998).

O plasmídeo pJW5 (*CEN URA3 MAL63^c*) foi utilizado como controle positivo no processo de transformação das leveduras (WANG e NEEDLEMAN, 1995).

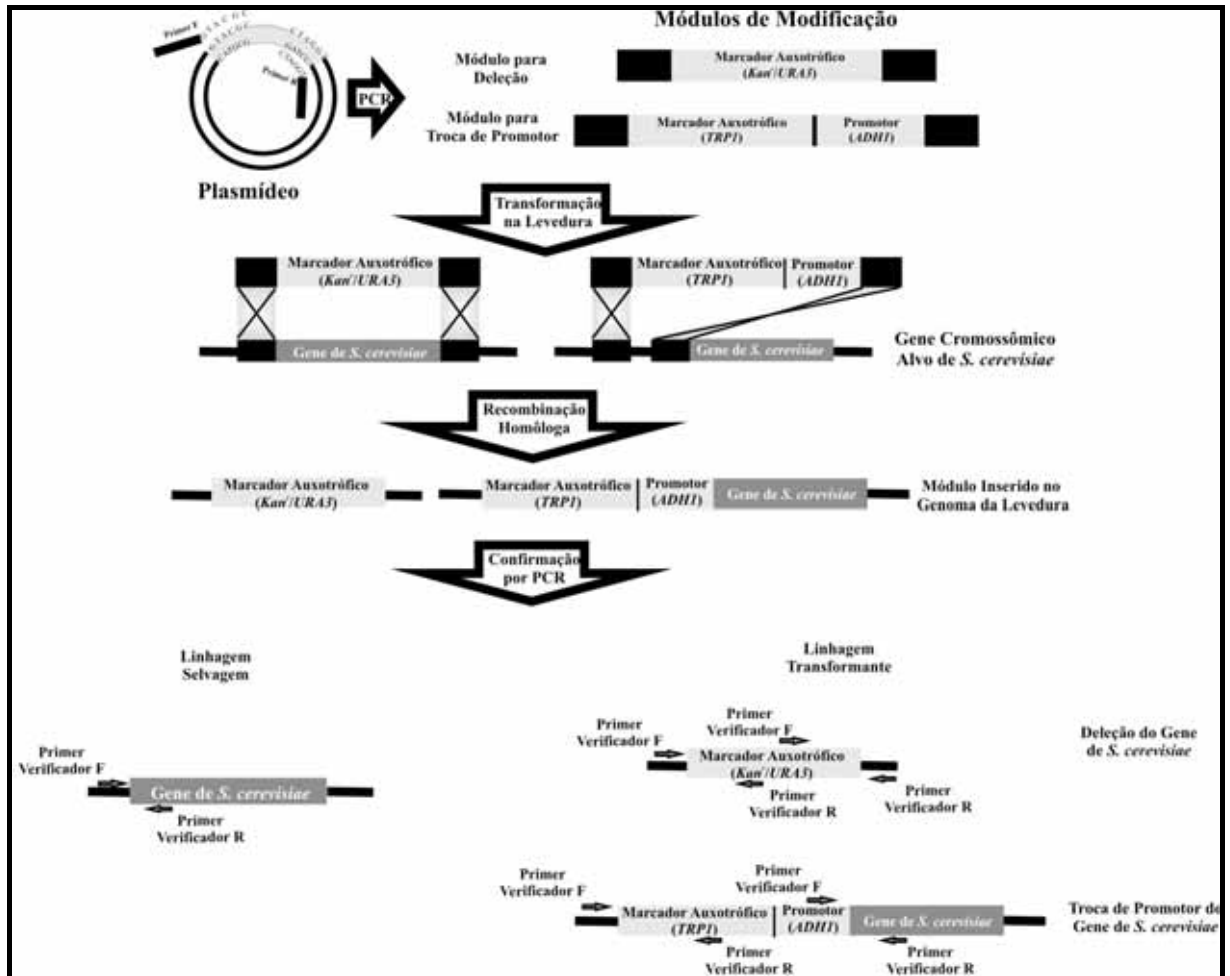


Figura 3.2 – Engenharia genômica em *S. cerevisiae* (modificação genética por recombinação homóloga). Vide o texto para detalhes sobre o fundamento da técnica.

Os *primers* utilizados para a obtenção dos módulos de mutação possuem ~20 nucleotídeos com homologia aos plasmídeos e ~40 nucleotídeos homólogos às regiões alvo no genoma da levedura, sendo que os *primers* F (*forward*) são complementares a fita 3'→5' e os *primers* R (*reverse*) são complementares a fita 5'→3' (Tabela 3.5). Sequências de ~20 nucleotídeos foram utilizadas para verificar a inserção dos módulos nos locais corretos dentro do genoma da levedura (Tabela 3.5). As sequências de bases que constituem o genoma de *S. cerevisiae* foram obtidas a partir do *Saccharomyces* Genome Database (vide <http://www.yeastgenome.org>).

Tabela 3.5 – Seqüência de bases nitrogenadas dos *primers* para a construção dos módulos de modificação, e para verificação.

Primer	¹ Seqüência 5' → 3'	Proposta
AGT1 – F1	TACATAGAAGAACATCAAACAACATAAAAAATAGTATAAT <u>CCA</u> <u>GCTGAAGCTTCGTACGC</u> (-40 a -1)	Deleção do gene <i>AGT1</i>
AGT1 – R1	TTCCTTATTTCTTCCAAAAAACAACCCCTTTAC <u>GCA</u> <u>AGGCCACTAGTGGATC</u> (1888 a 1848)	Deleção do gene <i>AGT1</i>
SUC2 – F1	CAAGCAAAACAAAAAGCTTTTCTTTTCACTAACGTATATG <u>CCA</u> <u>GCTGAAGCTTCGTACGC</u> (-40 a -1) ²	Deleção do gene <i>SUC2</i>
SUC2 – R1	CTTTTGAAAAAATAAAAAAGACAATAAGTTTATAACCT <u>GCA</u> <u>TAGGCCACTAGTGGATC</u> (1636 a 1597)	Deleção do gene <i>SUC2</i>
SUC2 – F5	TTTCCTTTTGGCTGGTTTTGCAGCCAAAATATCTGCATCAG <u>AATT</u> <u>CGAGCTCGTTTAAAC</u> (18 a 57)	Troca de Promotor do gene <i>SUC2</i>
SUC2 – R4	GTGTGAAGTGGACCAAAGGTCTATCGCTAGTTTCGTTTGT <u>CATT</u> <u>GTATATGAGATAGTTG</u> (100 a 61)	Troca de Promotor do gene <i>SUC2</i>
V-ADH1-F	CTCCCCCGTTGTTGTCTCAC (1266 a 1285)	Verificação
V-AGT1-F	GAATTTTCGGGTTGGTG (-71 a -54)	Verificação
V-AGT1-R	ACATTTATCAGCTGC (1845 a 1830)	Verificação
V-Kan ^r -R	GGAATCGAATGCAACCGG (845 a 828)	Verificação
V-SUC2-F	GAAATTATCCGGGGGCGAAG (-447 a -428)	Verificação
V-SUC950-R	GGCACTGTACTCCCAGTT (942 a 925)	Verificação
V-URA3-R	CGCTGTGCTACTGGTGAGGC (512 a 493)	Verificação

¹ As seqüências em itálico e sublinhadas são homólogas os plasmídeos utilizados no estudo (PETRACEK e LONGTINE, 2002); as seqüências em letra normal nos *primers* para a deleção e troca de promotor foram obtidas a partir do *Saccharomyces* Genome Database. ² Correspondente a posição dos nucleotídeos no genoma da levedura, a partir do códon de início da tradução do gene.

3.10.2 Construção dos Módulos de Mutação por PCR

Foram realizadas 05 (cinco) reações de PCR com volume final de 100 µL, contendo: 2,0 µL de dNTP 10mM, 3 µL de MgCl₂ 50 mM, 1 µL de cada *primer* 20 pmol/µL (*primer* F e *primer* R), 10 µL de tampão 10x concentrado da *Taq* DNA polimerase, 2 U de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen), 4 µL de Plasmídeo (obtido como descrito no item 3.7.1) e água MiliQ até completar o volume de 100 µL. Foi utilizado um Mastercycler Gradient®.

(Eppendorf), com um passo inicial de 2 min a 94°C, seguidos por 30 ciclos de 30 s a 94°C, 15 s a 55°C e 3 min a 72°C. No final foi realizada uma extensão de 10 min, a 72°C.

Os produtos das reações de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose (item 3.7.3), sendo as bandas de interesse recortadas do gel e purificadas utilizando o Kit Concert DNA Purification System (Gibco BRL), seguindo as instruções do fabricante. Estes fragmentos de DNA linear purificado foram utilizados para transformar as linhagens de *S. cerevisiae* (Figura 3.3).

Módulo de Mutação	Plasmídeo	Primers ¹	Produto de PCR (pb)
	pFA6a-kanMX6	F1 e R1	~ 1623
	PAG60	F1 e R1	~ 1629
	pFA6a-TRP1-PADH1	F5 e R4	~ 1725

Figura 3.3 – Representação esquemática dos módulos de modificação utilizados na transformação das linhagens de levedura. Setas em preto indicam o sentido de transcrição dos genes. Terminador *TEF* de *A. gossypii*, retângulos cinza escuros; Promotor *TEF* de *A. gossypii*, retângulos brancos; Homologia com o genoma da levedura, retângulo preto. ¹ Primers utilizados para a construção do módulo.

3.10.3 Transformação das linhagens de *S. cerevisiae*

As linhagens de levedura foram transformadas conforme descrito por KNOP *et al.* (1999). As células foram pré-crescidas em 3 mL de YPD 2%, *overnight*, a 28°C e 160 rpm. Um volume do pré-cultivo contendo 5×10^6 células/mL foi transferido para 50 mL de YPD 2% e crescidas por 6-8 h, a 28 °C e 160 rpm até uma concentração de 2×10^7 cel/mL. As células foram coletadas por centrifugação, lavadas uma vez com água destilada estéril a 4 °C e uma vez com solução SORB (100 mM Acetato de Lítio; 10 mM de Tris-HCl pH 8; 1 mM de EDTA-NaOH pH 8; 1 M de Sorbitol – esterilizada por filtração) e centrifugadas por 5 min a 3.000 g, sendo o sobrenadante descartado. Uma suspensão celular foi preparada adicionando-se 360 µL de SORB e 40 µL de SS DNA carreador 10 mg/mL (previamente desnaturado a

100 °C, por 10 min e resfriado em banho de gelo), sendo aliquoteada em frações de 50 µL para tubos estéreis e armazenados a -80 °C. No momento da transformação em 3 (três) tubos foram adicionados 10 µL de: módulo de mutação (Transformação), água MilliQ (Controle negativo) ou plasmídeo pJW5 (Controle Positivo). Em seguida, à cada tubo foram adicionados 360 µL de solução PEG (100 mM Acetato de Lítio; 10 mM de Tris-HCl pH 8; 1 mM de EDTA-NaOH pH 8; 40 % de PEG 3350) e incubou-se em temperatura ambiente por 30 min. Após, foram adicionados 47 µL de DMSO puro e incubou-se a 42 °C, por 20 min, e a seguir centrifugou-se por 3 min, a 3.000 g, e as células tratadas conforme descrito em A) ou B);

A) Transformação com gene envolvido em auxotrofias: foram adicionados 100-200 µL de água destilada estéril e inoculado 100 µL por placa contendo meio sólido SC suplementado com aminoácidos, exceto o que está envolvido na transformação das células (ex.: transformação com gene *URA3*, usar meio SC^{-URA} ou transformação com gene *TRP1*, usar meio SC^{-TRP}).

B) Resistência à Geneticina (G418): foram adicionados 3 mL de YPD 2% e incubado por 3 h a temperatura ambiente e 40 rpm, em uma incubadora de tubos. As células foram separadas do meio de cultivo por centrifugação de 3 min, a 3.000 g, resuspendidas em 100-200 µL de água destilada estéril e inoculadas 100 µL por placa contendo meio sólido YPD 2% acrescido de Geneticina 100 µg/mL.

As placas de cultura foram incubadas a 28 °C, em estufa bacteriológica, por 3 a 5 dias e após esse tempo, as colônias crescidas foram inoculadas em meio de cultivo YPD 2% para realizar a extração de DNA e, posteriormente, utilizou-se o DNA extraído para verificar por PCR a inserção do módulo de mutação no local correto, dentro do genoma da levedura, como descrito a seguir.

3.10.4 Extração e Purificação de DNA de *S. cerevisiae*

Conforme descrito por BURKE *et al.* (2000), as células foram pré-crescidas *overnight*, a 28 °C, em 5 mL de meio de cultura YPD 2%. No dia seguinte, a cultura foi centrifugada a 6.000 g, por 3 min, e descartou-se o sobrenadante. As células foram resuspendidas com 500 µL de Solução I (Sorbitol 1 M e EDTA/NaOH 100 mM pH 7,5), foram adicionados 20 µL de Zimoliase 100T 2,5 mg/mL e incubou-se por 1 h, a 37 °C. Em seguida, centrifugou-se a 6.000 g, por 3 min, descartou-se o sobrenadante e as células foram resuspendidas com 500 µL de Solução II (Tris/HCl 50 mM pH 7,4 e EDTA/NaOH 20 mM pH 7,5). Adicionaram-se 50 µL de SDS 10 % e após homogeneização incubou-se a 65 °C, por 30 min. Em seguida foram adicionados 200 µL de Acetato de Potássio 5 M e incubou-se em banho de gelo, por 1 h. Após o término do período, as células foram centrifugadas por 5 min a 6.000 g e o sobrenadante foi transferido para outro tubo estéril. Ao sobrenadante, foram adicionados 800 µL de isopropanol 100 % e deixaram-se as amostras 5 min, a temperatura ambiente. Em seguida, o sobrenadante foi removido por centrifugação de 5 min, a 12.000 g, e o precipitado resuspenso com 300 µL de tampão TE (10 mM Tris-HCl e 1 mM EDTA pH 8,0) estéril e 15 µL de RNase (1 mg/mL), sendo os tubos colocados em estufa a 37 °C, por 1 h. A seguir, o DNA foi precipitado com 30 µL de Acetato de Sódio 3 M e 200 µL de isopropanol 100 %. Após centrifugar novamente por 5 min, a 12.000 g, retirou-se totalmente o sobrenadante e os tubos contendo o DNA precipitado foram secos por 1 h, em capela de fluxo laminar sobre uma toalha de papel absorvente. Em seguida, o precipitado foi resuspenso em 100 – 300 µL de tampão TE estéril e os tubos contendo DNA foram armazenados sob refrigeração a –20 °C.

3.10.5 Confirmação das Mutações nas Linhagens de *S. cerevisiae* por PCR

Foram realizadas reações de PCR com volume final de 25 μL contendo: 0,5 μL de dNTP 10mM, 0,75 μL de MgCl_2 50 mM, 1 μL de cada *primer* verificador 20 pmol/ μL (*primer* V-F e *primer* V-R, vide Tabela 3.4 e 3.5), 2,5 μL de tampão 10x concentrado da Taq DNA polimerase, 0,5 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen), 1 μL de DNA (obtido como descrito no item 3.10.4) e água MiliQ até o volume de 25 μL . Foi utilizado um Mastercycler Gradient® (Eppendorf), com um passo inicial de 2 min a 94°C, seguido por 30 ciclos de 30 s a 94°C; 15 s a 55°C e 3 min a 72°C. Ao final dos ciclos foi realizada uma extensão de 10 min, a 72°C. Em seguida, a reação de PCR foi analisada através de eletroforese em gel de agarose (item 3.9.3), sendo observada a presença dos produtos de PCR esperados para cada transformação, conforme apresenta a Tabela 3.6.

Tabela 3.6 – Produtos de PCR esperados, após eletroforese em gel de agarose, para confirmar a correta inserção dos módulos de modificação no DNA das linhagens de *S. cerevisiae* de laboratório.

Fenótipo	Primer Forward	Primer Reverse	Produto de PCR (pb)
Selvagem			
<i>SUC2</i>	V-SUC2-F	V-SUC950-R	1392
<i>AGT1</i>	V-AGT1-F	V-AGT1-R	1919
Sem Invertase			
(G418+) = <i>suc2Δ::Kan^r</i>	V-SUC2-F	V-Kan ^r -R	1292
(URA+) = <i>suc2Δ::URA3</i>	V-SUC2-F	V-URA3-R	959
Invertase intracelular sobre-expressa			
(TRP+) = <i>TRP1-pADH1::iSUC2</i>	V-ADH1-F	V-SUC950-R	1264

3.11 Determinação dos Parâmetros Cinéticos

3.11.1 Velocidade Específica de Crescimento

A velocidade específica de crescimento celular (μ) expressa em h^{-1} foi determinada através da regressão linear da reta obtida plotando-se a concentração celular (X) em escala logarítmica natural, em função do tempo em horas, durante a fase exponencial de crescimento do microrganismo, utilizando o programa de computador SigmaPlot 9.0.

3.11.2 Velocidade de Consumo de Açúcares

A velocidade de consumo dos açúcares, expressa em $\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$, foi determinada estimando-se a concentração de açúcar (glicose, maltose e sacarose) em um espaço de tempo, através da regressão linear da reta obtida na fase de consumo dos carboidratos durante a fase exponencial de crescimento do microrganismo. Nos ensaios de fermentação, além da velocidade de consumo da sacarose (na forma de dissacarídeo), foi determinada a velocidade de consumo dos açúcares totais presentes no meio (sacarose e seus produtos de hidrólise), conforme descrito anteriormente.

3.11.3 Produção Máxima de Etanol e Rendimento do Processo Fermentativo

A produção máxima de etanol ($P_{e \text{ max}}$) expressa em g/L, foi obtida no tempo em que o açúcar presente no meio foi totalmente consumido.

O rendimento do processo fermentativo ($Y_{e/s}$) é a razão entre a concentração máxima de etanol produzido e a quantidade de açúcar consumido pelas células, conforme apresenta a equação 13.

$$Y_{e/s} = \frac{P_{e \text{ max}}}{[\text{sacarose consumida pelas células}]} \quad (13)$$

3.12 Reprodutibilidade dos Resultados

Os experimentos foram repetidos ao menos duas vezes, sendo que os resultados obtidos entre as diferentes cepas e/ou condições foram sempre semelhantes. Resultados representativos foram apresentados. Nas determinações das atividades realizadas em triplicata, são apresentados os valores médios, com os respectivos desvio padrão.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Utilização de açúcares por leveduras Industriais

Inicialmente foi realizada a análise do padrão de utilização de açúcares por linhagens industriais de *S. cerevisiae*, selecionadas pela sua significativa performance nas usinas de produção de álcool combustível. Além da glicose e sacarose (substratos normalmente encontrados nesse processo industrial), foi verificada a utilização de maltose e maltotriose pelas leveduras. A Figura 4.1 demonstra o crescimento fermentativo da cepa CAT-1 em meios contendo glicose, maltose e sacarose, enquanto que na Figura 4.2 encontram-se os mesmos resultados obtidos para a linhagem PE-2. As cepas apresentaram um crescimento exponencial nas primeiras 20-30 horas, onde consumiram o açúcar presente no meio e produziram etanol (Fig. 4.1 e 4.2). Com o término do açúcar, houve a chamada “parada diaúxica”, onde o crescimento celular cessou e as células passam a sintetizar a maquinaria enzimática que permite respirar o etanol produzido durante a primeira fase de crescimento exponencial, uma vez que não estão mais reprimidas pela fonte de carbono (açúcar) (LEWIS *et al.*, 1993). O etanol produzido e acumulado no meio foi utilizado como fonte de carbono para o crescimento aeróbico por todas as linhagens, que geralmente se estendia até umas 100 horas de cultivo (dados não mostrados).

O padrão de utilização da sacarose mostra que as células dessas linhagens promovem a hidrólise extracelular do açúcar, pois significativas quantidades de glicose e frutose passam a ser detectadas no meio durante o consumo da sacarose, indicando que estas leveduras possuem genes *SUC* funcionais no seu genoma (Fig. 4.1 e 4.2). Foram analisadas também a utilização dos α -glicosídeos maltose e maltotriose para verificar a funcionalidade dos genes *MAL* (incluindo o gene *AGT1*) nestas leveduras. Todas as linhagens isoladas pela Fermentec (CAT-1, PE-2, VR-1) foram capazes de fermentar e crescer em maltose (Figuras 4.1, 4.2 e

4.3), indicando que nessas linhagens ao menos um locus *MAL* é funcional, contendo portanto, os 3 genes necessários à metabolização desse açúcar, *MALx1*, *MALx2*, *MALx3*.

No caso da maltotriose (Figura 4.3), embora as três linhagens fossem capazes de crescer nesta fonte de carbono (com cinéticas diferentes), apenas a linhagem CAT-1 foi capaz de fermentar a maltotriose. De acordo com ALVES-JR (2005) a presença do transportador codificado pelo gene *AGT1*, é necessário para que as células de *S. cerevisiae* sejam capazes de fermentar a maltotriose, indicando que apenas a cepa CAT-1 possui este gene funcional. A análise dos transportadores *MAL* nestas linhagens, através de eletroforese de cromossomos e hibridização com sondas específicas, confirmou que estas linhagens possuem os transportadores *MAL11* e *MAL31*, e embora as linhagens CAT-1 e PE-2 possuam o gene *AGT1*, a cepa VR-1 não possui nenhuma sequência deste gene no seu genoma (DÁRIO *et al.*, 2006) (dados não mostrados). Estes resultados sugerem que a linhagem PE-2 possui um gene *AGT1* não funcional no seu genoma (como já descrito para algumas linhagens industriais), como também confirma que o crescimento aeróbico em maltotriose é provavelmente mediado pelos transportadores *MALx1*, que possuem baixíssima afinidade por este α -glicosídeo (STAMBUK *et al.*, 2006; VIDGREN *et al.*, 2005; ZASTROW *et al.*, 2000, 2001).

Na Figura 4.4 é mostrado o perfil de crescimento da linhagem UFPE-135, que mostrou algumas diferenças em relação às linhagens até agora apresentadas (Figs. 4.1-4.3). Esta cepa consumiu rapidamente a sacarose, produzindo até o dobro de glicose e frutose no meio de cultivo (quando comparada com as outras linhagens), e foi incapaz de utilizar a maltose, indicando que não possui um locus *MAL* funcional (embora possua os genes *MAL11* e *AGT1* no seu genoma) (dados não mostrados).

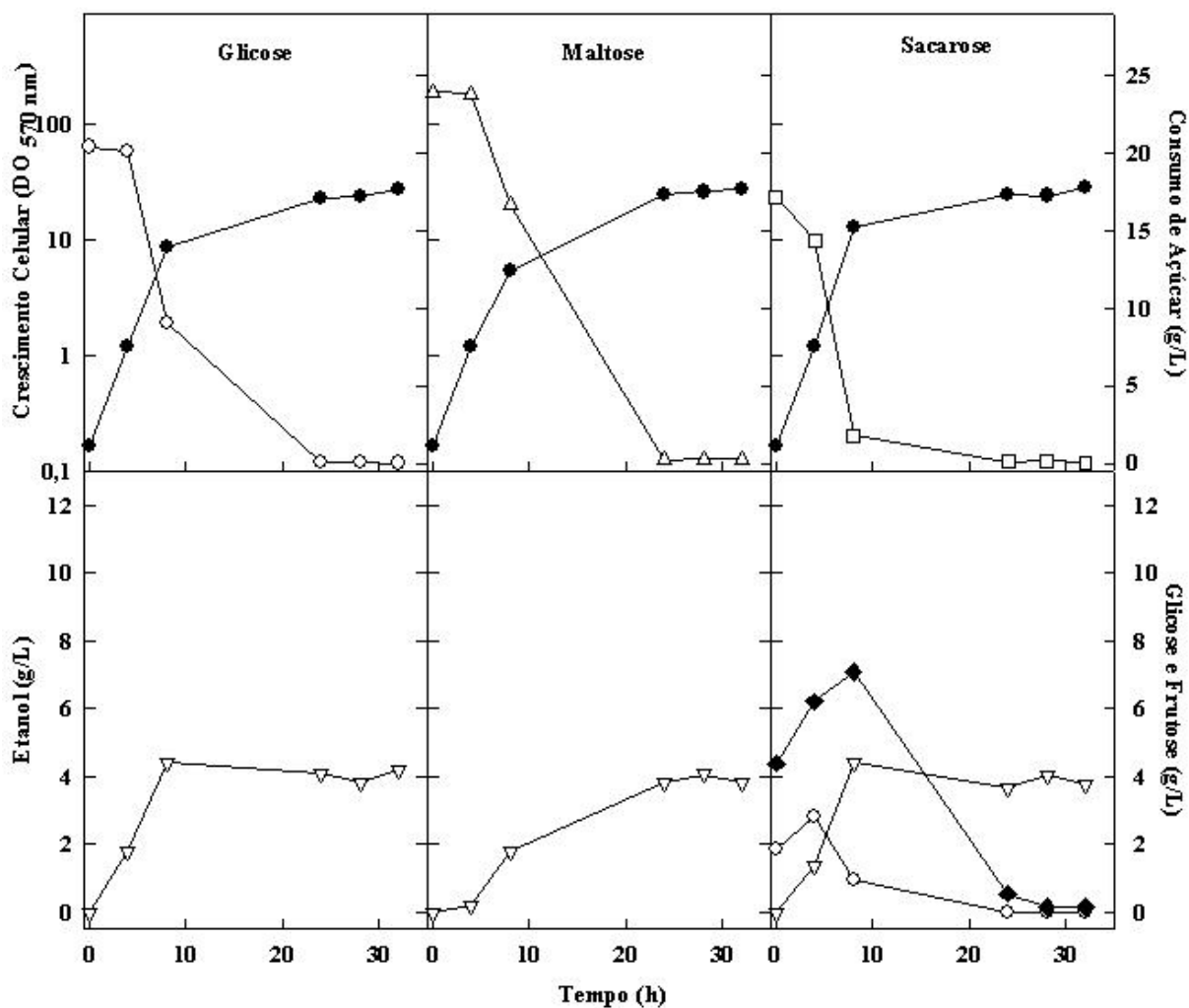


Figura 4.1 - Metabolização de glicose, maltose e sacarose pela linhagem CAT-1. Durante o crescimento em meio YP contendo 2 % de glicose (○), maltose (△) ou sacarose (□) como fonte de carbono, foi determinada a densidade ótica (●) da cultura, formação de frutose (◆), glicose (○), e etanol (▽), e apresentadas conforme descrito em Métodos e Procedimentos.

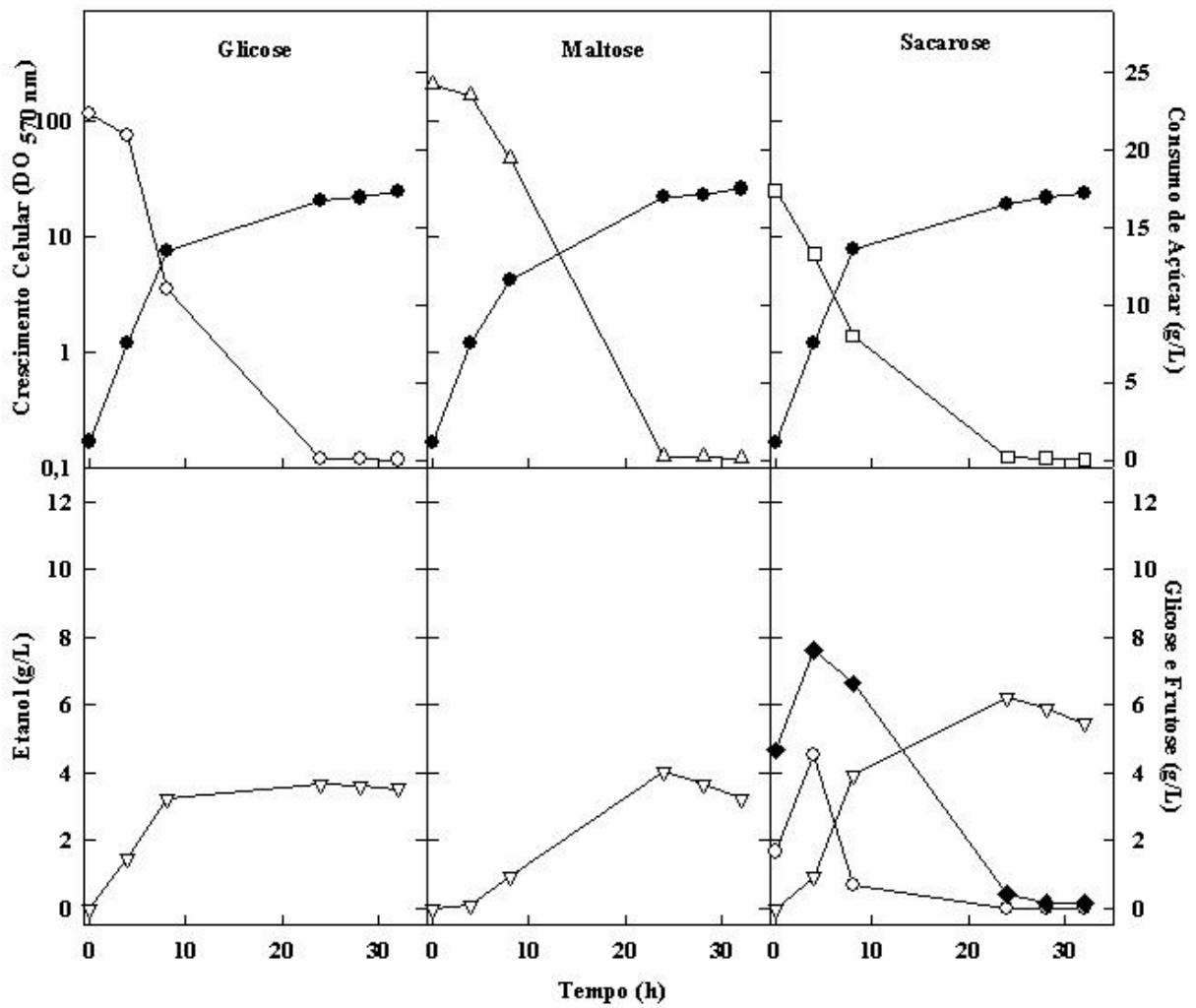


Figura 4.2 - Metabolização de glicose, maltose e sacarose pela linhagem PE-2. Durante o crescimento em meio YP contendo 2 % de glicose (o), maltose (Δ) ou sacarose ($\square$) como fonte de carbono, foi determinada a densidade ótica ($\bullet$) da cultura, formação de frutose ($\blacklozenge$), glicose (o), e etanol (∇), e apresentadas conforme descrito em Métodos e Procedimentos.

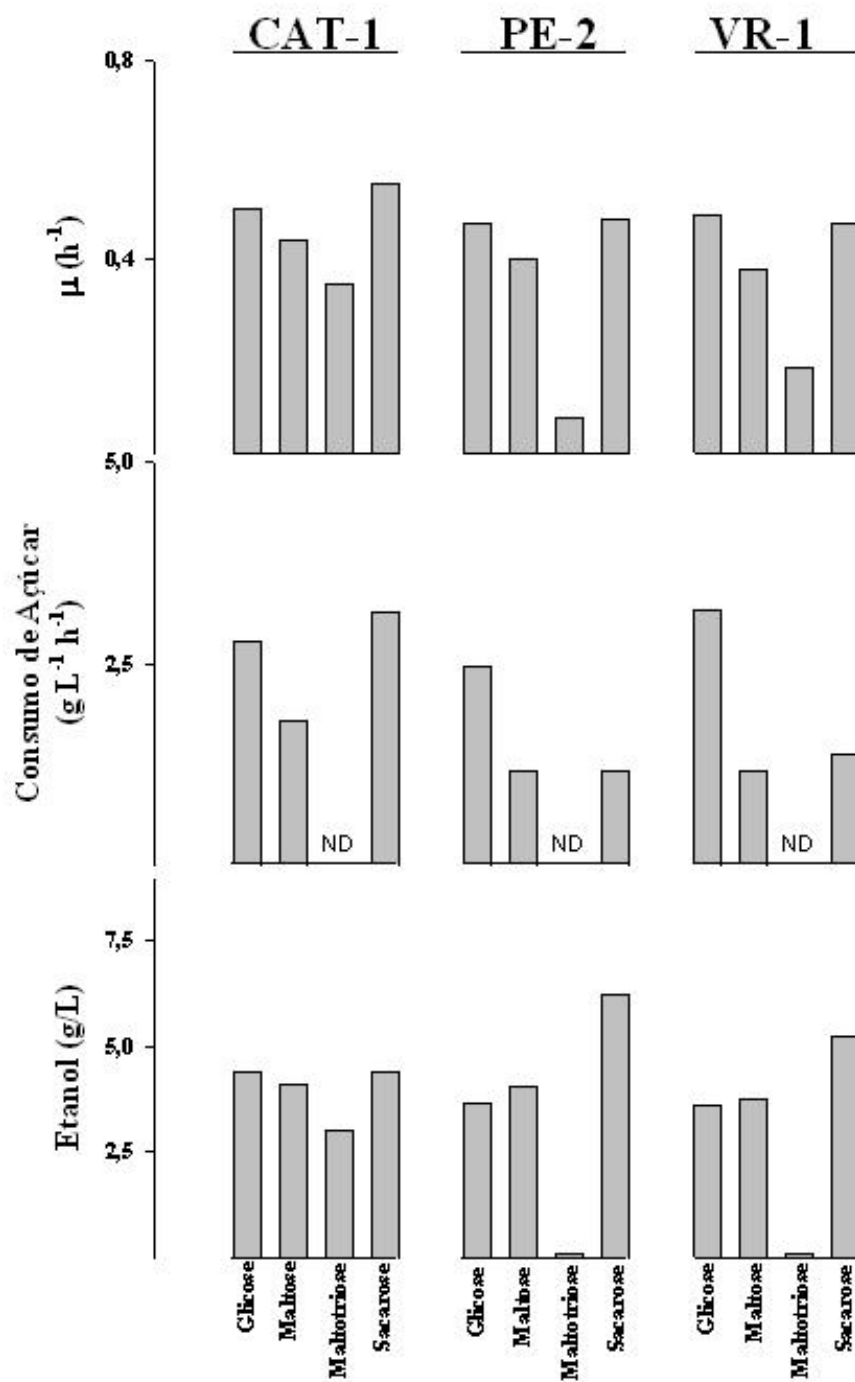


Figura 4.3 - Parâmetros fermentativos das linhagens CAT-1, PE-2 e VR-1 durante o crescimento em glicose, maltose, maltotriose e sacarose. Durante o crescimento em meio YP contendo 2 % das diferentes fontes de carbono, foi determinada a velocidade específica de crescimento (μ), o consumo dos açúcares, e a concentração máxima de etanol produzido, e apresentadas conforme descrito em Métodos e Procedimentos. ND = não determinado.

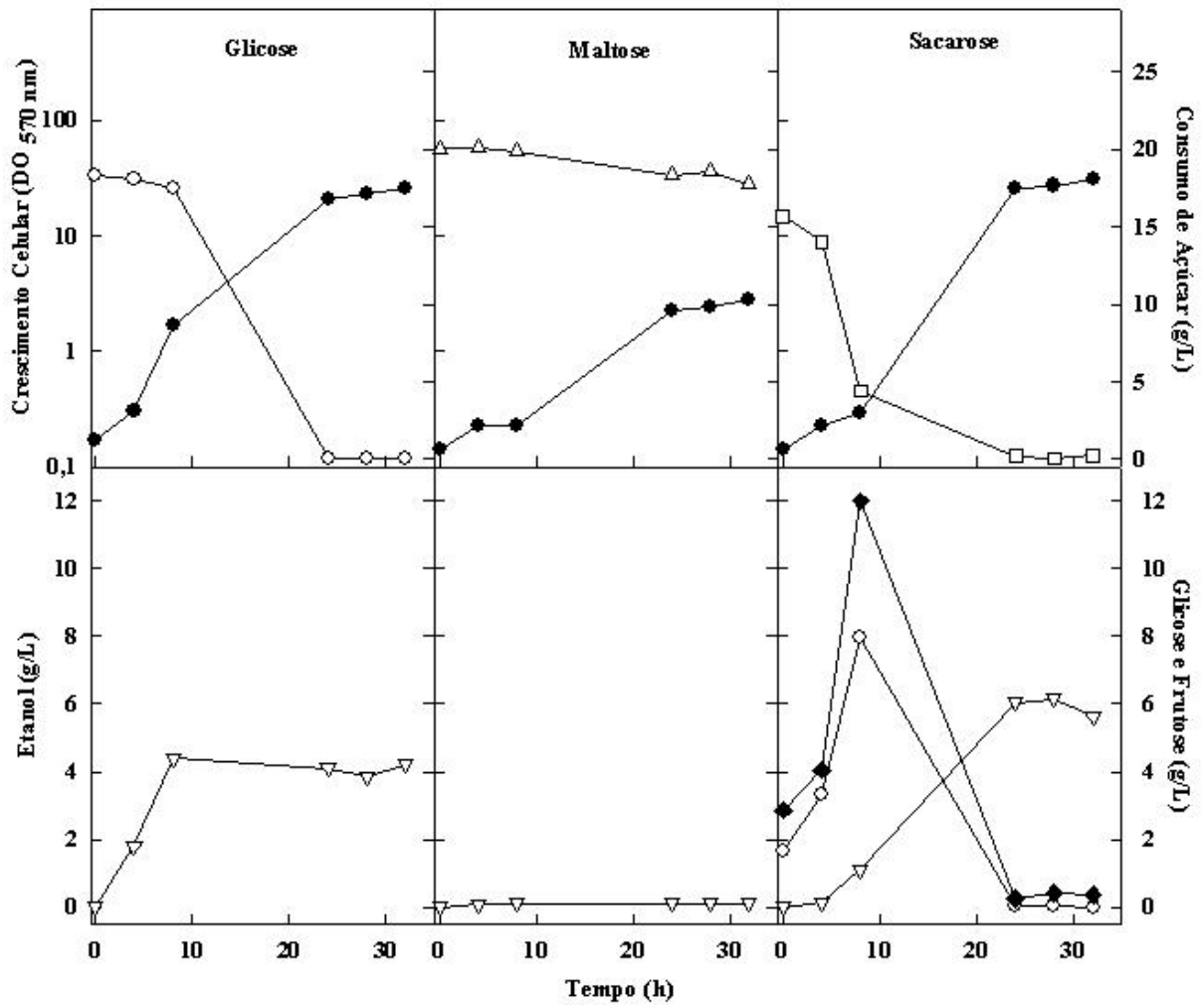


Figura 4.4 - Metabolização de glicose, maltose e sacarose pela linhagem UFPE-135. Durante o crescimento em meio YP contendo 2 % de glicose (○), maltose (Δ) ou sacarose (□) como fonte de carbono, foi determinada a densidade ótica (●) da cultura, formação de frutose (◆), glicose (○), e etanol (▽), conforme descrito em Métodos e Procedimentos.

Enquanto que as linhagens SA e UFPE-379 são capazes de fermentar a maltose (como descrito acima para as linhagens CAT-1, PE-2 e VR-1), a cepa BG foi incapaz de utilizar este açúcar (Figura 4.5). Para as linhagens SA e UFPE-379 não foi avaliada, ainda, a capacidade de fermentar a maltotriose.

Nos crescimentos realizados com sacarose, foram detectadas no sobrenadante do meio de cultura significativas concentrações de glicose e frutose, fato devido à hidrólise do dissacarídeo pela ação da invertase periplasmática. A determinação dessa atividade enzimática, nas células crescidas em meio rico YP contendo 2 % sacarose, revelou que todas as linhagens industriais apresentaram atividade na ordem de 150 a 450 nmoles $\text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ (Figura 4.6 A), com exceção à cepa UFPE-135 que apresentou atividade aproximadamente 3 vezes maior (1.500 nmoles $\text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$). Esses dados são condizentes com a análise da presença dos genes *SUC* nessas leveduras, pois todas as linhagens apresentaram apenas o locus *SUC2*, exceto a cepa UFPE-135 que apresentou também o locus *SUC4* (DÁRIO *et al.*, 2006) (dados não mostrados).

Na Figura 4.6 A, são mostrados também os valores de atividade de invertase total (intra e extracelular), onde pela comparação com os valores obtidos para a invertase periplasmática, verifica-se que aproximadamente 90% da invertase sintetizada pelas células são secretados para o espaço periplasmático (forma extracelular), e apenas 10% correspondem à invertase intracelular. Os dados (Figura 4.6 B) mostram ainda que estas células crescidas em sacarose, não apresentam atividade maltase ou α -glicosidase (determinado tanto com *pNP* α G como com maltose), como também foram incapazes de transportar o *pNP* α G (dados não mostrados). Esse resultado indica que durante o crescimento em sacarose estas leveduras não expressam os genes *MAL*, podendo inclusive a sacarose estar atuando como repressora desses genes (HORÁK, 1997; NEEDLEMAN, 1991; NOVAK *et al.*, 2004; STAMBUK, 1999). De fato, após o crescimento em maltose as leveduras

apresentaram significativa atividade maltase ($1000\text{-}2000\text{ nmoles mg}^{-1}\text{ min}^{-1}$) (dados não mostrados). Finalmente, a Figura 4.6 B mostra também os valores de hidrólise da sacarose, determinados no pH ótimo da maltase (ausente nestas células, vide a Fig. 4.6). Esses resultados indicam que mesmo no pH encontrado no citoplasma das células (pH ~ 7), a invertase apresenta atividade enzimática, pois se observa um perfil de atividade idêntico ao da atividade invertase nas respectivas linhagens.

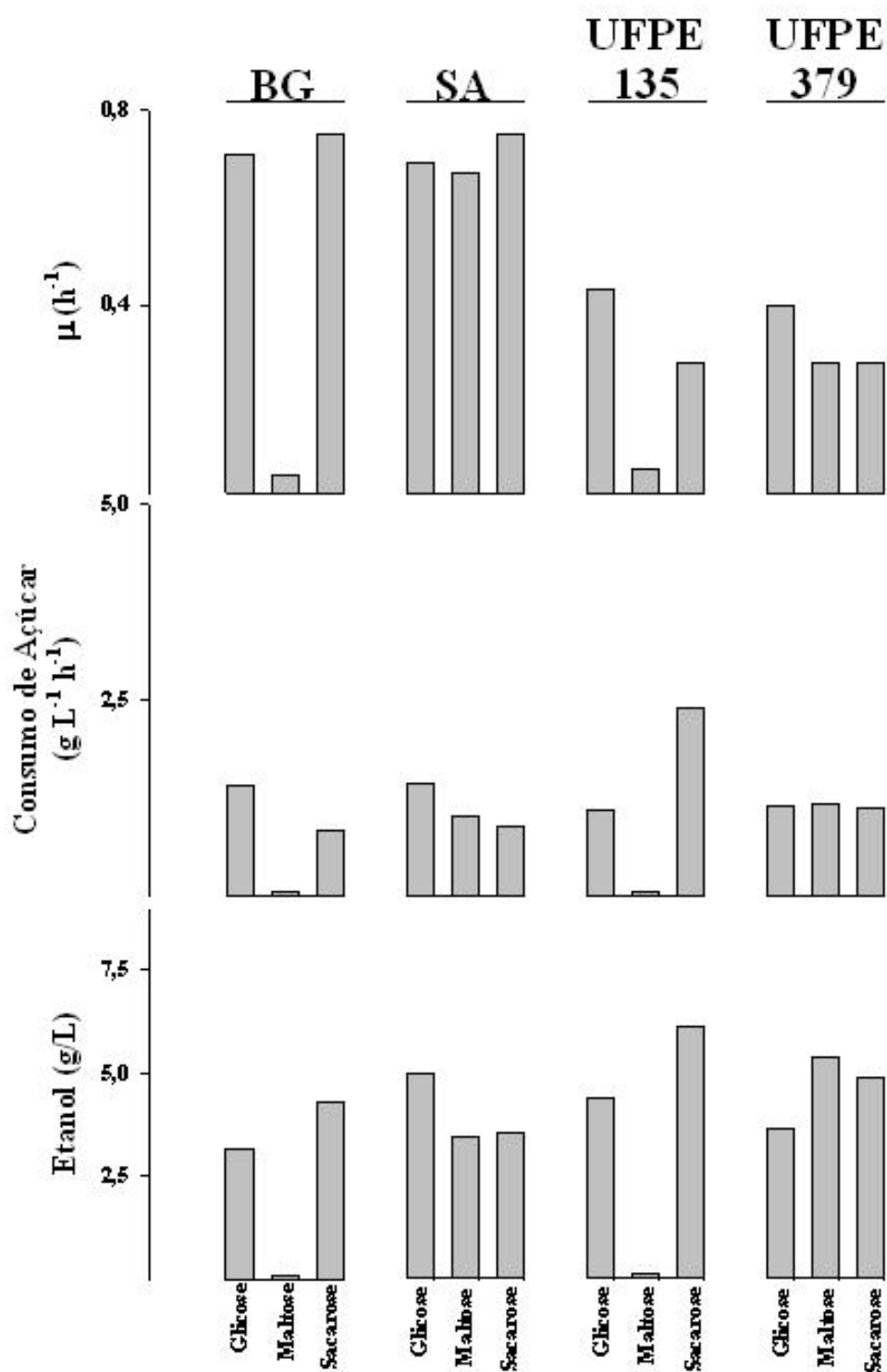


Figura 4.5 - Parâmetros fermentativos das linhagens BG, SA, UFPE-135 e UFPE-379 durante o crescimento em glicose, maltose e sacarose. Durante o crescimento em meio YP contendo 2 % das diferentes fontes de carbono, foi determinada a velocidade específica de crescimento (μ), o consumo dos açúcares, e a concentração máxima de etanol produzido, e apresentadas conforme descrito em Métodos e Procedimentos.

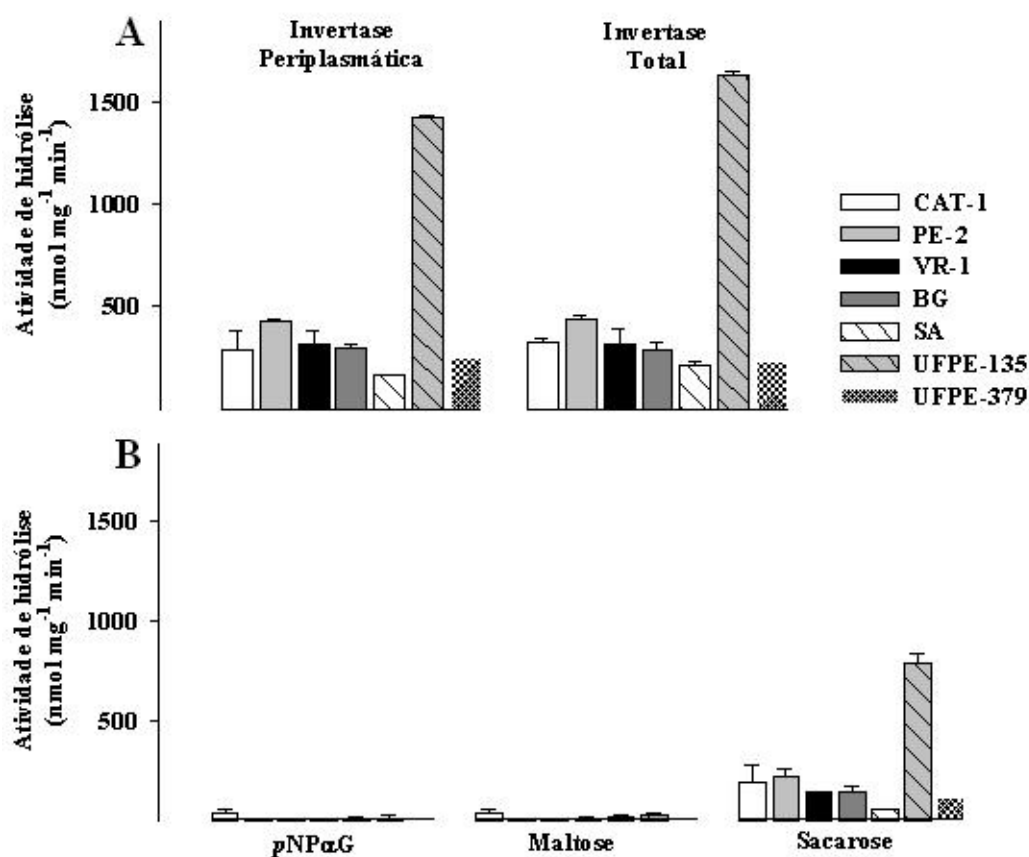


Figura 4.6 - Atividade invertase e α -glicosidase nas linhagens industriais. Após crescimento em meio YP contendo 2 % de sacarose, foi determinada a atividade invertase (**A**) nas células inteiras (invertase periplasmática) ou células permeabilizadas (invertase total), bem como a atividade α -glicosidase (**B**) nas células permeabilizadas (analisada com os substratos indicados), e apresentadas conforme descrito em Métodos e Procedimentos.

4.2 Modificação genética em *S. cerevisiae*

Conforme descrito anteriormente, *S. cerevisiae* possui duas diferentes vias de metabolização para a sacarose. Uma depende dos genes *SUC*, que permite a síntese da invertase, enquanto que a outra via (transporte ativo e hidrólise intracelular) depende dos genes *MAL* (p.ex. transportador *MALx1* e ou *AGT1*) para ser funcional. De fato, para que as células de levedura sejam capazes de transportar ativamente a sacarose (vide BADOTTI *et al.*, 2006 e BATISTA *et al.*, 2004) elas precisam ser previamente crescidas em maltose (indutor dos genes *MAL*), ou então a linhagem de levedura ter um genótipo *MAL^c* (constitutivo), isto é, a expressão dos genes *MAL* ocorre independentemente da presença de maltose no meio (NEEDLEMAN, 1991; NOVAK *et al.*, 2004).

Com o intuito de analisar o metabolismo de sacarose em maiores detalhes e desenvolver ferramentas que permitam otimizar a utilização desse açúcar pelas leveduras, foi analisado o perfil de utilização de sacarose por uma linhagem de *S. cerevisiae* (CEN.PK2-1C, vide Tabela 2.1) cujo genótipo é conhecido. Essa linhagem foi escolhida por estar sendo ultimamente sugerida como modelo para estudos fisiológicos de *S. cerevisiae*, pois apresenta a capacidade de utilizar eficientemente vários açúcares, enquanto que a maioria das linhagens de laboratório com genótipo conhecido são incapazes de utilizar, por exemplo, a maltose. Na verdade a linhagem CEN.PK2-1C é *MAL* constitutiva por possuir o alelo *MAL2-8^c* (DARAN-LAPUJADE *et al.*, 2003, 2004; HOLLATZ e STAMBUK, 2003; VAN DIJKEN *et al.*, 2000).

A Figura 4.7 mostra que durante crescimento em sacarose a linhagem CEN.PK2-1C (selvagem ou “WT”) não ocorre acúmulo de glicose e frutose no meio de cultura ao consumir a sacarose, ao contrário do que foi observado para as leveduras industriais. Esse resultado pode ser consequência de uma alta capacidade de captação dos monossacarídeos, ou então ser consequência da lenta hidrólise de sacarose, uma vez que a cepa WT apresenta menor atividade invertase (aproximadamente 140 nmoles mg⁻¹ min⁻¹, Figura 4.8), quando comparada

com as atividades determinadas nas linhagens industriais contendo o gene *SUC2* (CAT-1, SA, PE-2, etc., vide Fig. 4.6). Aparentemente, na levedura de laboratório WT os produtos de hidrólise da sacarose são captados na medida em que são formados, enquanto que nas leveduras industriais a rápida hidrólise ocasiona saturação do sistema de transporte de monossacarídeos, fazendo com que os mesmos se acumulem no meio de cultura. A menor atividade invertase na cepa WT (~50%) pode ser reflexo da diferença genética entre as linhagens industriais (diplóides) e as cepas de laboratório (haplóides), já que em ambos os casos o alelo *SUC2* é o único presente nestas linhagens (com exceção da cepa UFPE-135, vide Fig. 4.6).

Como é sabido que a levedura WT possui os genes *SUC2* e *AGT1* (possui também os genes *MAL21*, *MAL31* e *MAL41*, dados não mostrados), a seguir estes dois genes foram deletados do genoma da linhagem CEN.PK2-1C, isoladamente ou em combinação, através da tecnologia denominada “engenharia genômica” (PETRACEK e LONGTINE, 2002). Nessa metodologia, os genes e/ou seqüências de DNA são modificadas diretamente nos cromossomos da levedura através de recombinação homóloga (vide Figura 2.2, e item 3.10). A Figura 4.9 mostra a confirmação via PCR, da construção da cepa MGD-01 que é deletada no gene *SUC2* (linhagem CEN.PK2-1C, mas *suc2Δ::Kan^r*). Neste caso, para que a deleção acontecesse, um fragmento de DNA linear foi confeccionado de modo a possuir em suas extremidades regiões de homologia ao genoma da levedura na região de interesse (p.ex. a região cromossômica acima e após o gene *SUC2*), e tendo o gene *kan^r* entre essas extremidades. A cepa CEN.PK2-1C foi então transformada com esse fragmento linear de DNA, e em algumas células houve a integração do módulo de deleção por recombinação homóloga, substituindo o gene *SUC2* pelo gene *kan^r* (*suc2Δ::Kan^r*). Em seguida, as células transformadas foram selecionadas em meios contendo Geneticina, e analisadas por PCR utilizando-se *primers* de verificação (Figura 4.9 A). Na Figura 4.9 B é possível verificar a

presença do gene *SUC2* na cepa CEN.PK2-1C, enquanto que na cepa MGD-01 este gene está ausente, e no seu lugar genômico se tem a presença do gene *Kan^r*. Tecnologia semelhante foi utilizada para deletar o gene *AGT1* tanto na linhagem WT (originando à cepa LCM003, WT mas *agt1Δ::Kan^r*), como também permitiu a criação da linhagem PSY006 (CEN.PK2-1C, mas *agt1Δ::Kan^r* e *suc2Δ::URA3*). Como pode se observar na Figura 4.8 A, a linhagem deletada no gene *AGT1* (LCM003) continuou apresentando a mesma atividade invertase que a cepa WT, enquanto que as linhagens deletadas no gene *SUC2* (MGD-01 e PSY006) passaram a não mais apresentar atividade da invertase periplasmática, ou mesmo da invertase intracelular.

Entretanto, as células utilizadas para determinar a atividade da invertase foram crescidas em sacarose, e como mostra a Figura 4.10, a linhagem MGD-01 apresentou os mesmos parâmetros de crescimento em sacarose que a cepa CEN.PK2-1C (comparar com a Fig. 4.7), assim como as linhagens LCM003 (deletada no gene *AGT1*) e PSY006 (deletada nos genes *AGT1* e *SUC2*, vide Figura 4.11). É importante salientar que o crescimento e/ou fermentação em glicose e maltose pelas cepas engenhradas é também normal e semelhante a da cepa selvagem (Figura 4.11). Os resultados apresentados na Figura 4.8 B permitem verificar que embora as cepas deletadas no gene *SUC2* (MGD-01 e PSY006) não possuam atividade invertase, nessas células o crescimento em sacarose é possível graças à presença da atividade maltase nas células, determinada pela hidrólise de *pNPαG*, maltose, e a própria sacarose, bem como a um incremento na atividade de transporte de *pNPαG* (vide Fig. 4.8 C).

A linhagem PSY006 apresentou um comportamento inesperado (crescimento e fermentação eficiente da sacarose), já que outras linhagens sem atividade invertase e deletadas no gene *AGT1*, apresentam problemas na fermentação da sacarose (BADOTTI, 2005; BADOTTI *et al.*, 2006; BATISTA *et al.*, 2004). Esses resultados também vão contra dados já publicados por HOLLATZ e STAMBUK (2001), que demonstraram a necessidade

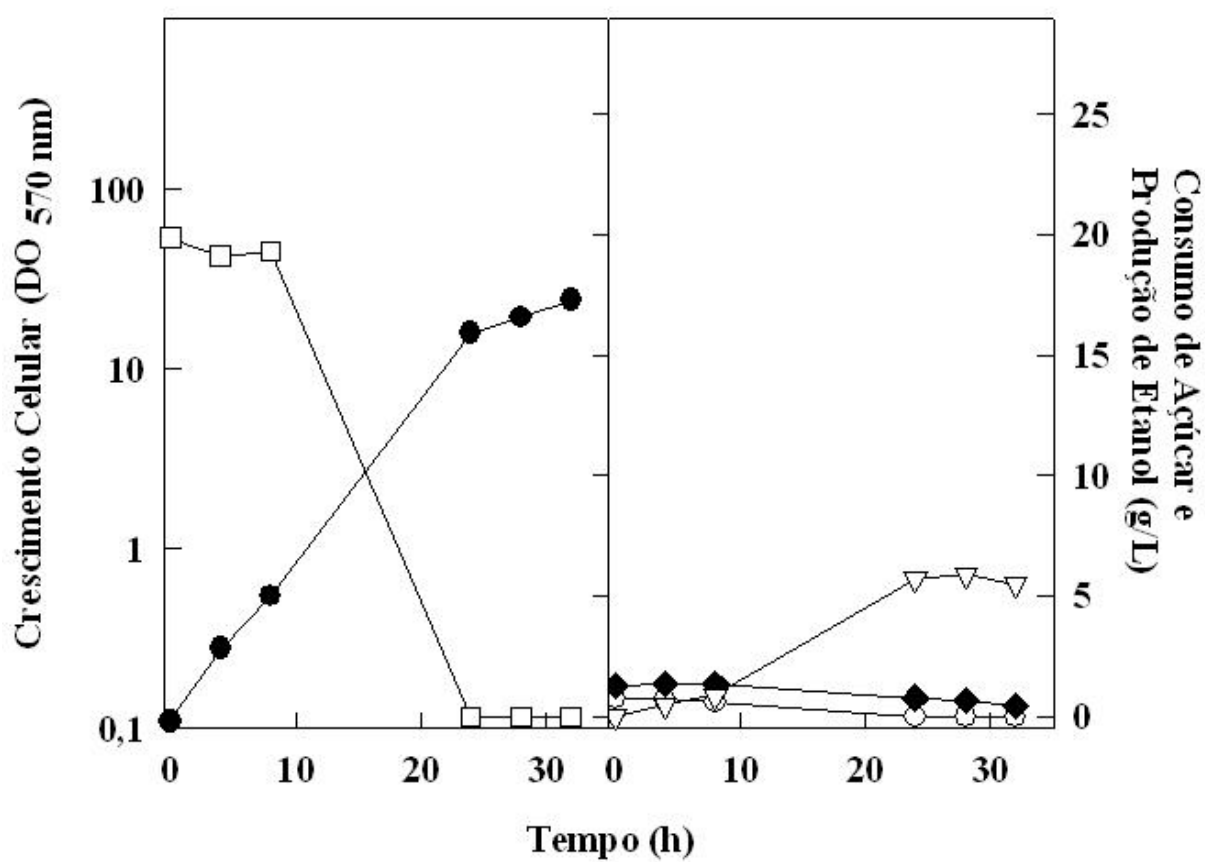


Figura 4.7 - Metabolização de sacarose pela linhagem CEN.PK2-1C. Durante o crescimento em meio YP contendo 2 % de sacarose (□) como fonte de carbono, foi determinada a densidade ótica (●) da cultura, formação de frutose (♦), glicose (o), e etanol (∇), e apresentadas conforme descrito em Métodos e Procedimentos.

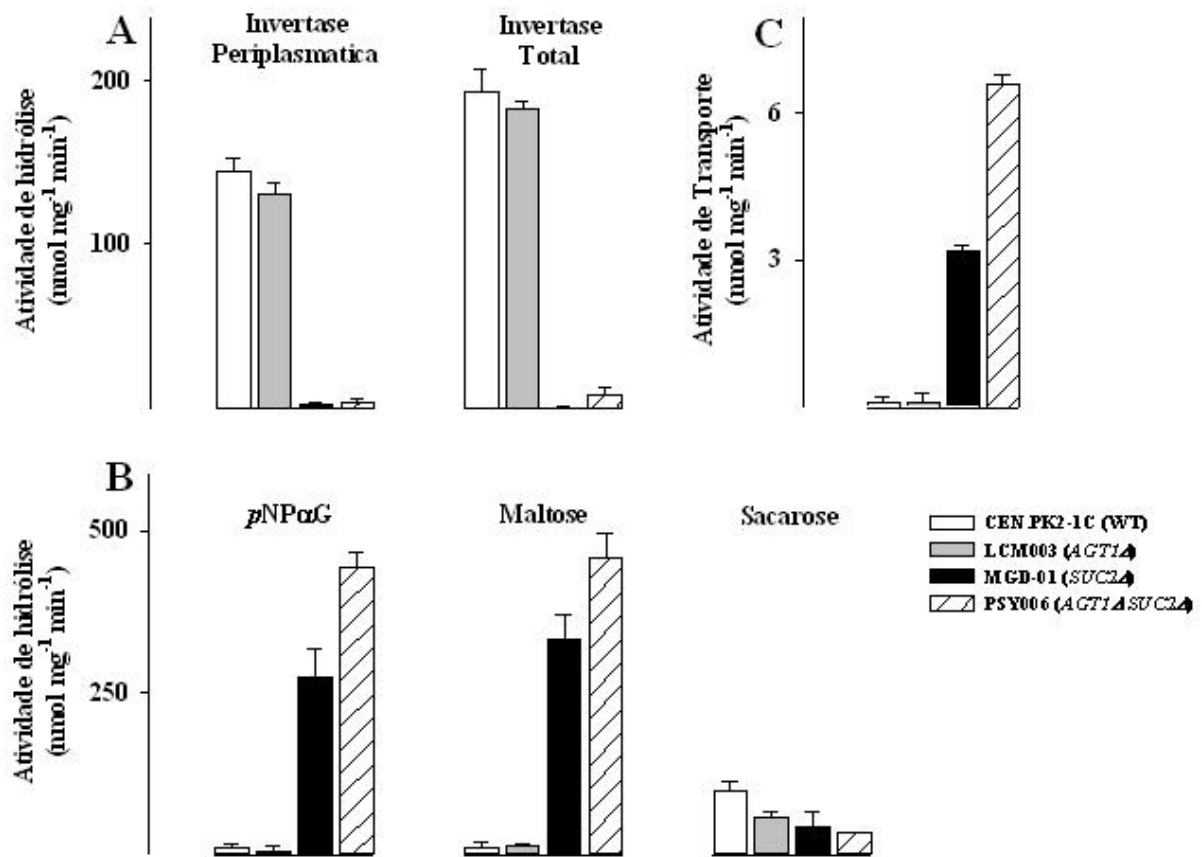


Figura 4.8 - Atividade invertase, α -glicosidase, e de transporte de α -glicosídeos nas linhagens engenhadas. Após crescimento em meio YP contendo 2 % de sacarose, foi determinada a atividade invertase (A) nas células inteiras (invertase periplasmática) ou células permeabilizadas (invertase total), bem como a atividade α -glicosidase (B) nas células permeabilizadas (analisada com os substratos indicados), ou ainda a atividade de transporte de pNP α G (C), e apresentadas conforme descrito em Métodos e Procedimentos.

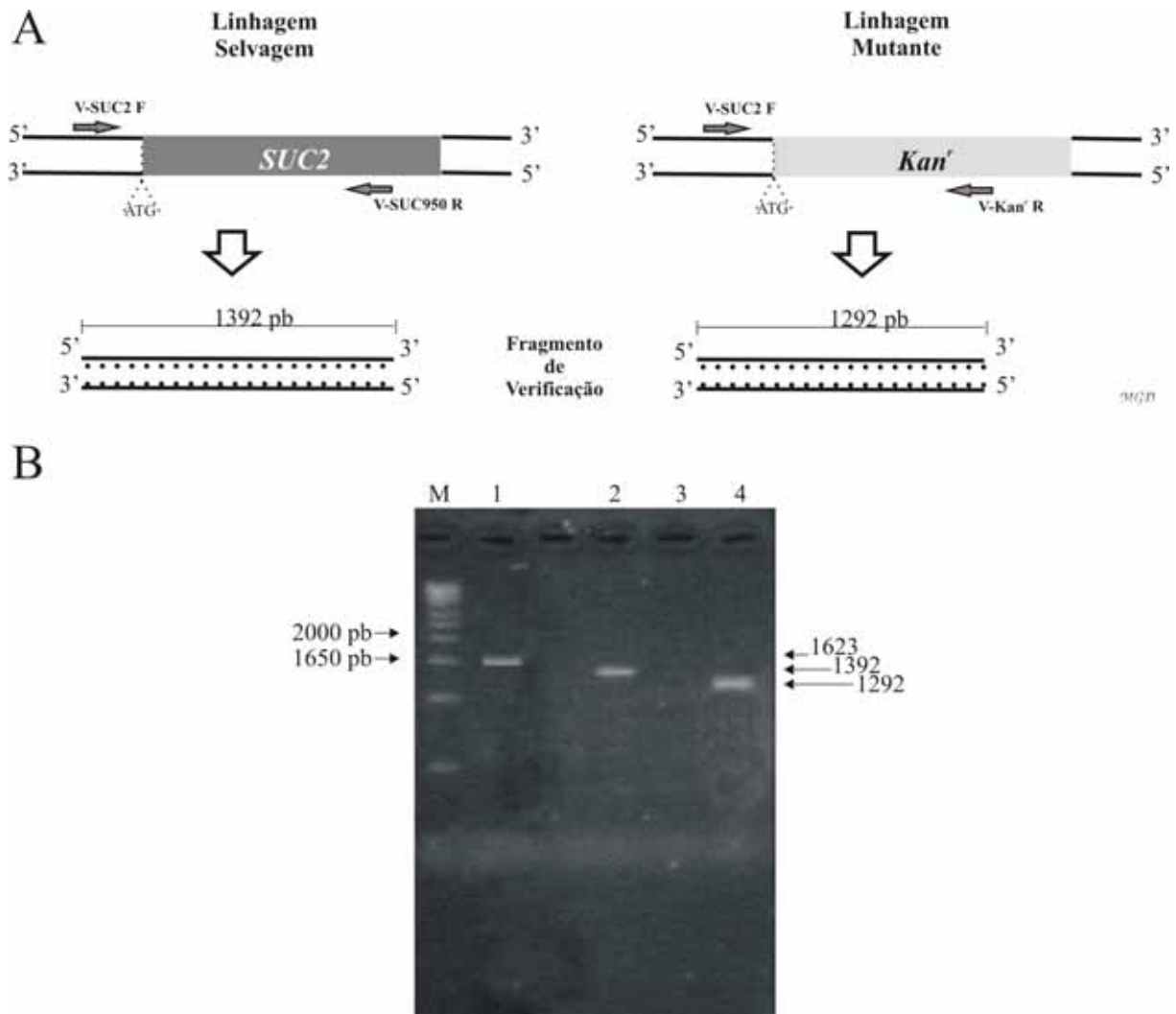


Figura 4.9 - Construção de linhagens deletadas no gene *SUC2*. **A)** Verificação da inserção do módulo de deleção no genoma da levedura. Utilizando o *primer* V-SUC2 F e *primers* específicos para o gene *SUC2* (V-SUC950 R) ou *Kan^R* (V-Kan^R R), é possível confirmar a substituição do gene *SUC2* pelo *Kan^R*. **B)** Eletroforese em gel de agarose do marcador molecular 1 kb (linha M) e o módulo de deleção (1623 pb, linha 1), o produto de PCR com o DNA da cepa CEN.PK2-1C e o *primer* específico para o gene *SUC2* (1392 pb, linha 2), os mesmos *primers* com o DNA da cepa MGD-01 (ausência de banda, linha 3), e o DNA desta mesma cepa com os *primers* específicos para o gene *Kan^R* (1292 pb, linha 4).

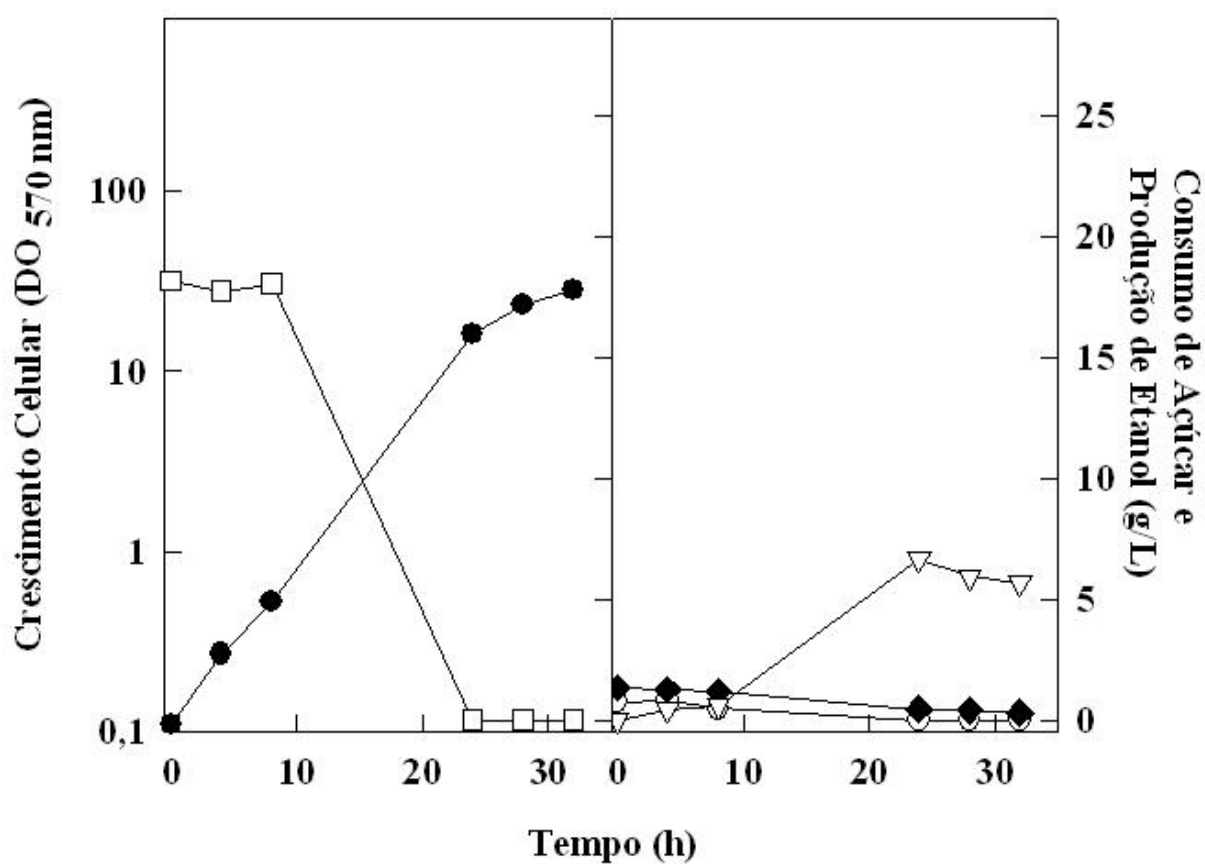


Figura 4.10 - Metabolização de sacarose pela linhagem MGD-01. Durante o crescimento em meio YP contendo 2 % de sacarose (□) como fonte de carbono, foi determinada a densidade ótica (●) da cultura, formação de frutose (◆), glicose (○), e etanol (▽), e apresentadas conforme descrito em Métodos e Procedimentos.

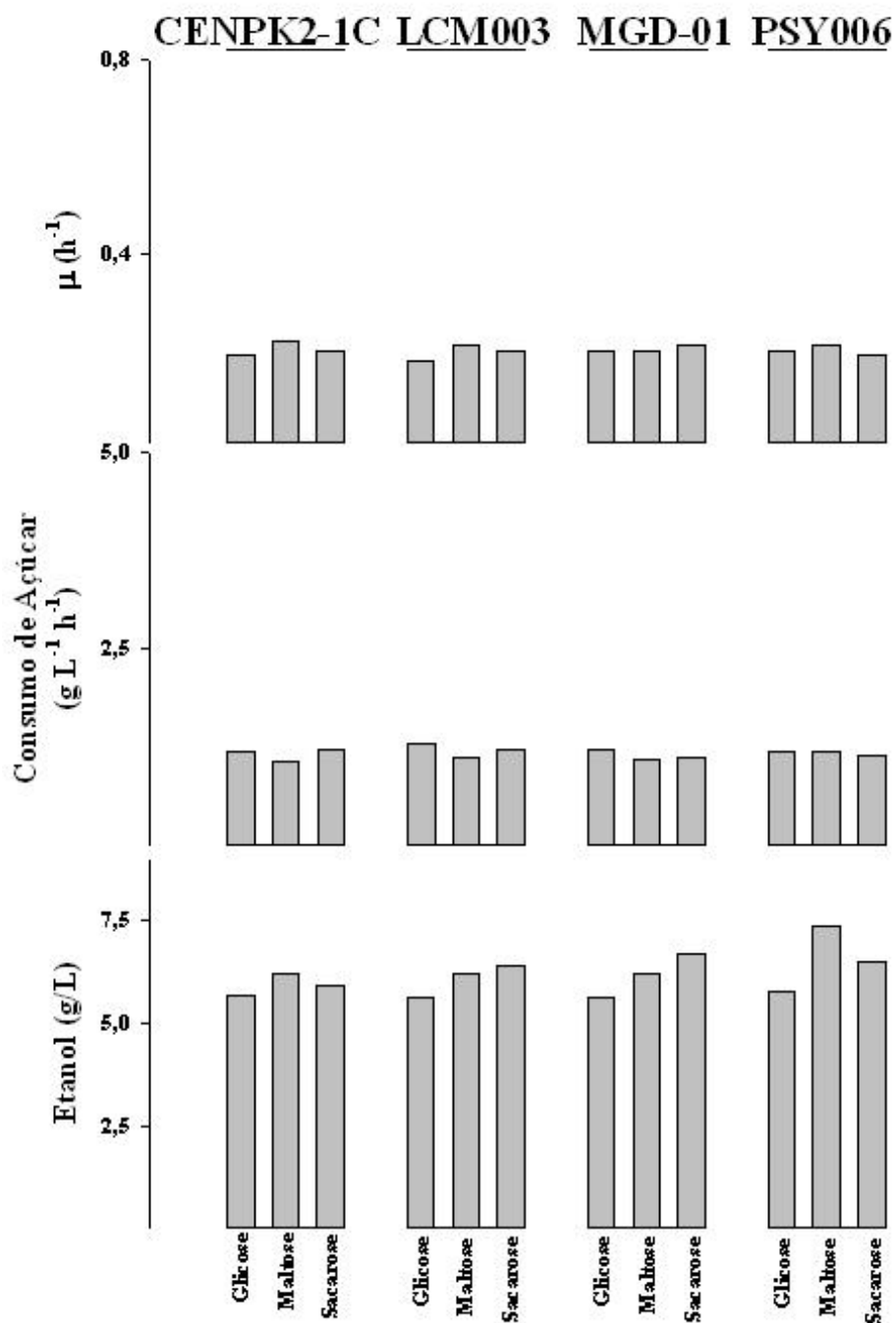


Figura 4.11 - Parâmetros fermentativos das linhagens engenhradas durante o crescimento em glicose, maltose e sacarose. Durante o crescimento em meio YP contendo 2 % das diferentes fontes de carbono, foi determinada a velocidade específica de crescimento (μ), o consumo dos açúcares, e a concentração máxima de etanol produzido, e apresentadas conforme descrito em Métodos e Procedimentos.

da expressão do gene *AGT1* para que ocorra o transporte de *pNPαG* por *S. cerevisiae*. Portanto, os resultados indicam que a cepa CEN.PK2-1C deve provavelmente possuir outras permeases (por ex.: *MAL31*) capazes de permitir o transporte eficiente de sacarose e *pNPαG*, que são expressas quando o transportador *AGT1* é deletado do seu genoma. A identidade molecular deste transportador será avaliada em trabalhos futuros. Da mesma forma, já obtivemos linhagens de levedura onde a região promotora do gene *SUC2* foi modificada de forma a sobre-expressar apenas a forma intracelular da invertase (vide Métodos e Procedimentos), no entanto, a caracterização bioquímica e fisiológica destas leveduras está sendo ainda avaliada e serão objetos de trabalhos futuros.

De qualquer forma, os objetivos de obter linhagens de *S. cerevisiae* capazes de fermentar a sacarose sem ocorrer hidrólise extracelular do dissacarídeo foram atingidos, sendo que a seguir foi analisada a performance fermentativa das linhagens engenhas assim como das linhagens industriais, em condições que simulam as fermentações industriais, isto é, fermentações em batelada com altas concentrações de células.

4.3 Fermentação de Sacarose pelas Linhagens Industriais e Engenhadas

Para avaliar a performance fermentativa das linhagens simulando condições industriais, foram realizadas fermentações de sacarose em batelada com altas concentrações de células (aproximadamente 10 g/L de peso seco, 30 g/L peso úmido). As Figuras 4.12 e 4.13 mostram o perfil de consumo da sacarose da cepa CAT-1 em meios contendo 20 g/L e 200 g/L desse açúcar, respectivamente. É possível observar a hidrólise extracelular do dissacarídeo e acúmulo de glicose e frutose no meio (semelhante ao observado quando esta cepa cresce em sacarose, vide item 4.1). Nas fermentações com 20 g/L, as cepas consumiram totalmente os açúcares disponíveis no meio em um período de 2 horas, tempo em que a produção máxima de etanol foi alcançada, enquanto que nas fermentações de 200 g/L, foram necessárias 9 horas para que os açúcares fossem totalmente consumidos, e alcançasse a produção máxima de etanol.

O perfil de fermentação da sacarose foi semelhante para todas as linhagens industriais (vide abaixo), com exceção da linhagem UFPE-135 (Figuras 4.14 e 4.15) que hidrolisou rapidamente a sacarose, produzindo até 2 vezes mais glicose e frutose, especialmente nas fermentações com 20 g/L. Já nas fermentações de altas concentrações de sacarose (200 g/L) a quantidade de glicose e frutose acumulada no meio foi praticamente a mesma do que a observada com o restante das linhagens (compare as Fig. 4.13 e 4.15). Este resultado sugere que a alta atividade invertase devida à amplificação dos genes *SUC* (~3 vezes maiores na linhagem UFPE-135, vide Figura 4.6) poderia significar uma vantagem competitiva quando as concentrações de sacarose são baixas, mas em altas concentrações deste açúcar a alta atividade da invertase não garantiu uma fermentação mais rápida da sacarose.

A Figura 4.16 mostra que as linhagens industriais apresentam uma velocidade média de consumo da sacarose nos meios contendo 20 g/L de sacarose de $\sim 30 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$, e $\sim 2,5$ vezes maior quando a concentração aumentou 10 vezes. Por outro lado, calculando a

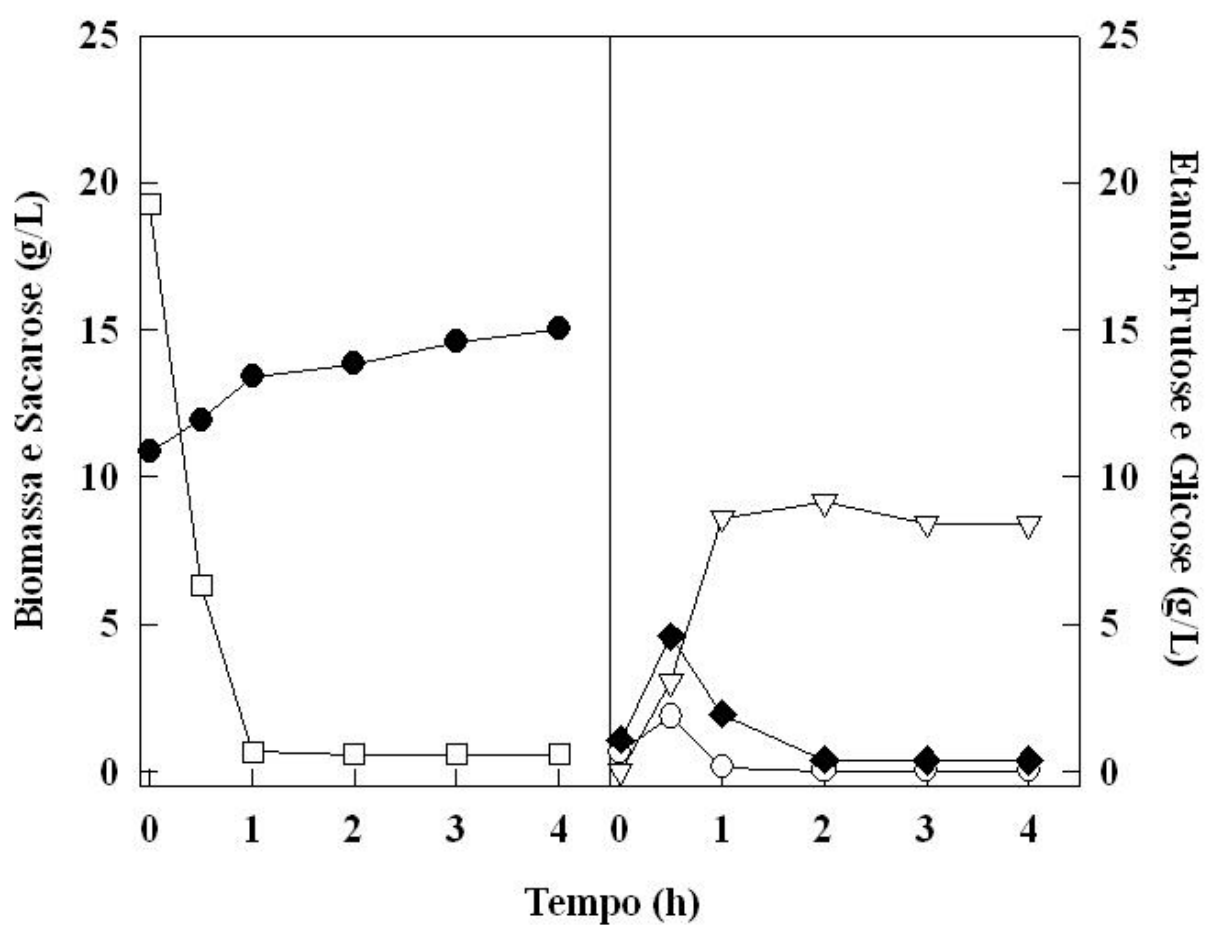


Figura 4.12 - Fermentação em batelada de 20 g/L de sacarose pela linhagem CAT-1. Durante a fermentação em meio YP contendo 2 % de sacarose (□), foi determinada a concentração celular (●) da cultura, formação de frutose (♦), glicose (○), e etanol (▽), e apresentadas conforme descrito em Métodos e Procedimentos.

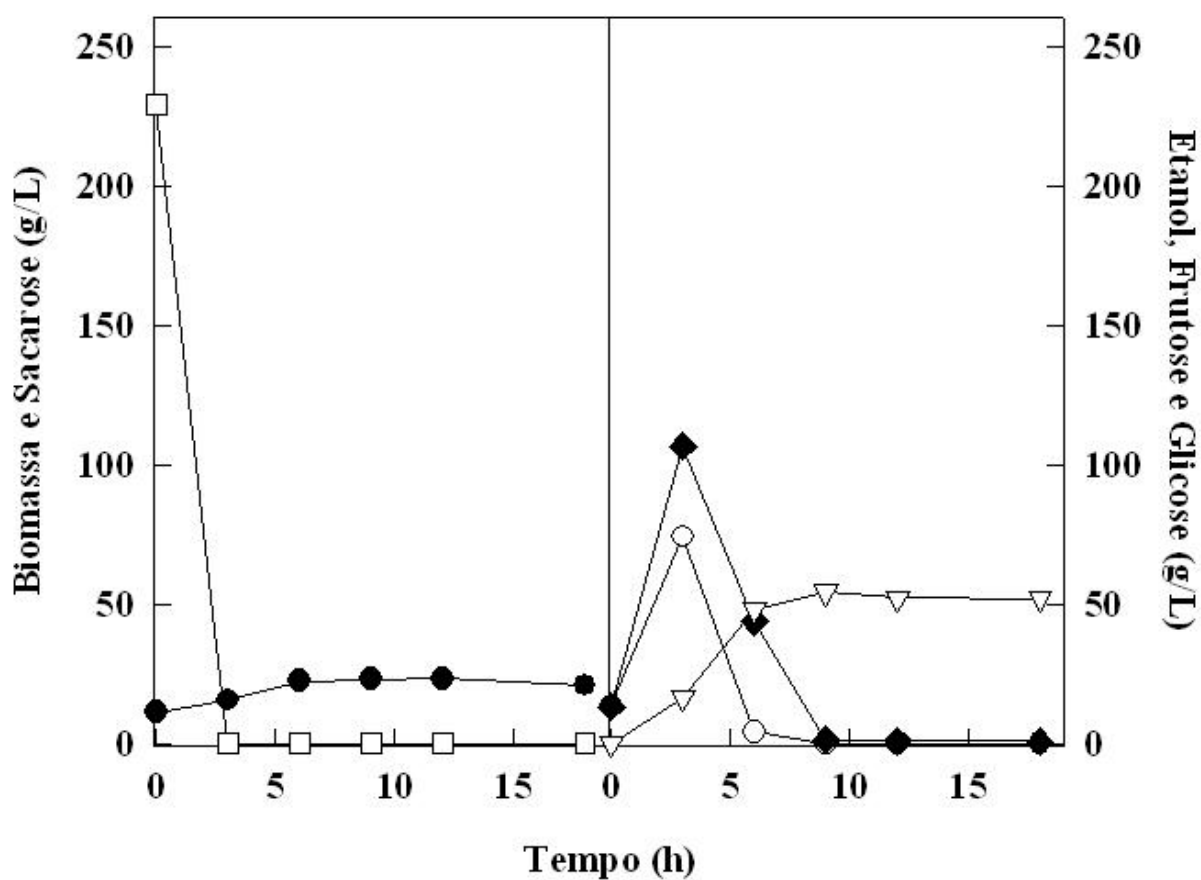


Figura 4.13 - Fermentação em batelada de 200 g/L de sacarose pela linhagem CAT-1. Durante a fermentação em meio YP contendo 20 % de sacarose ($\square$), foi determinada a concentração celular ($\bullet$) da cultura, formação de frutose ($\blacklozenge$), glicose ($\circ$), e etanol (∇), e apresentadas conforme descrito em Métodos e Procedimentos.

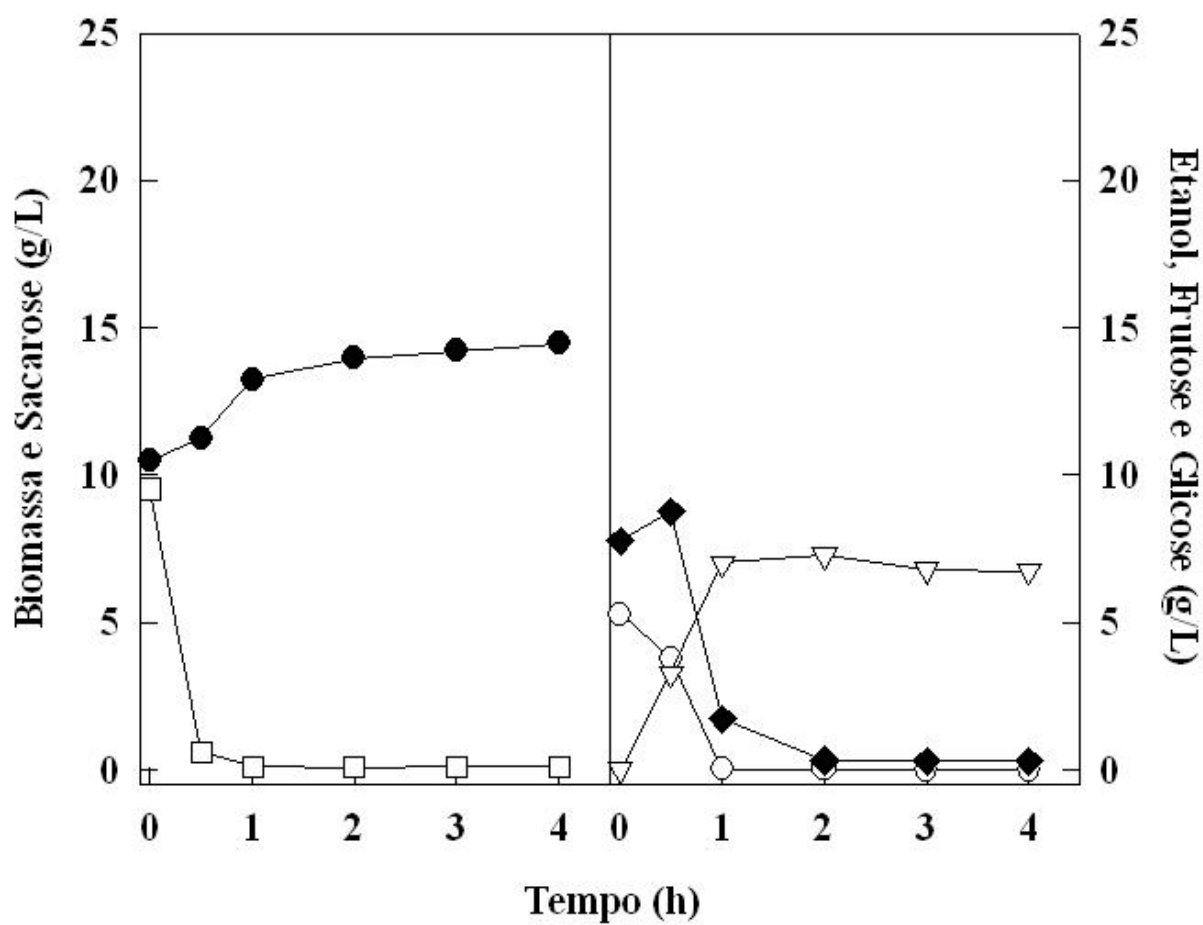


Figura 4.14 - Fermentação em batelada de 20 g/L de sacarose pela linhagem UFPE-135. Durante a fermentação em meio YP contendo 2 % de sacarose (□), foi determinada a concentração celular (●) da cultura, formação de frutose (◆), glicose (○), e etanol (▽), e apresentadas conforme descrito em Métodos e Procedimentos.

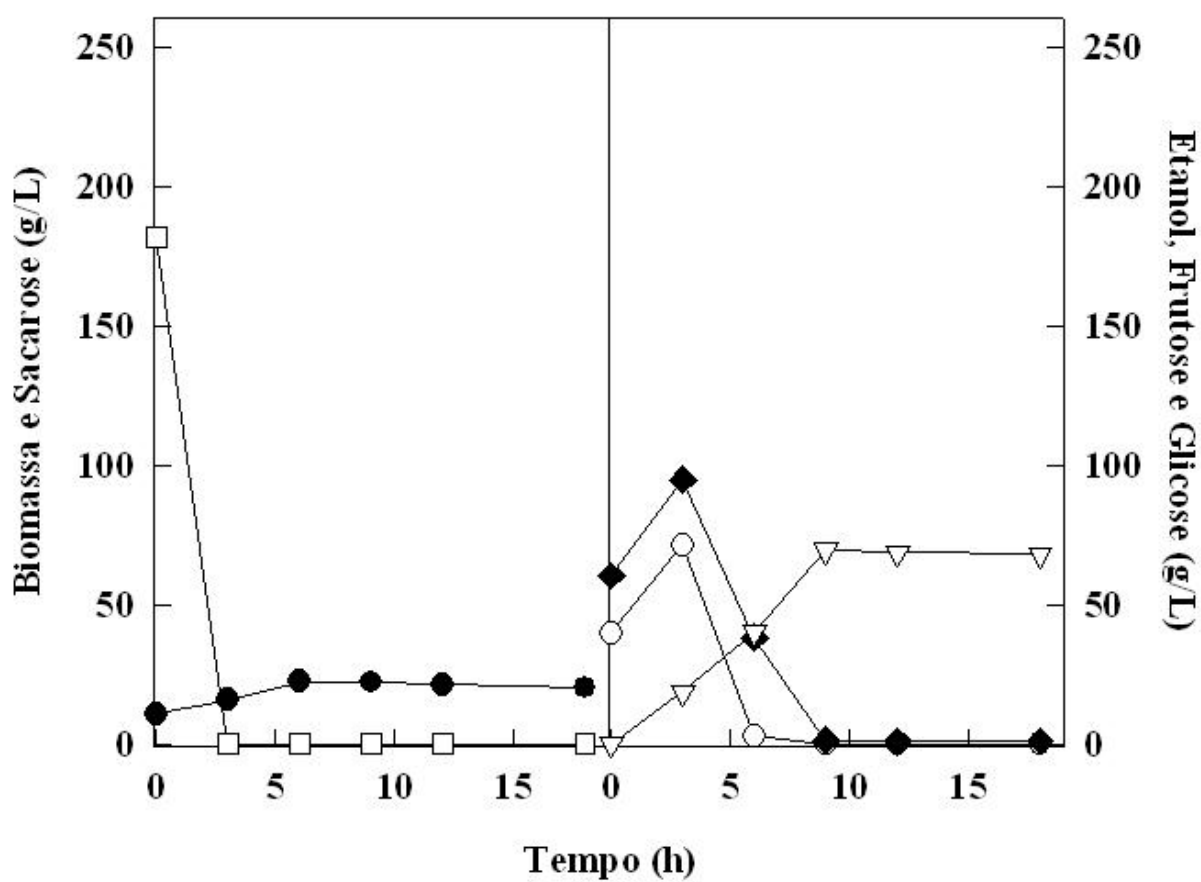


Figura 4.15 - Fermentação em batelada de 200 g/L de sacarose pela linhagem UFPE-135. Durante a fermentação em meio YP contendo 20 % de sacarose ($\square$), foi determinada a concentração celular ($\bullet$) da cultura, formação de frutose ($\blacklozenge$), glicose ($\circ$), e etanol (∇), e apresentadas conforme descrito em Métodos e Procedimentos.

velocidade de consumo dos açúcares totais (considerando a glicose e frutose acumulada transitoriamente no meio), no meio onde a concentração de sacarose é alta (200 g/L) a velocidade de consumo dos açúcares é aproximadamente 50% maior do que no meio contendo 20 g/L de sacarose. A produção de etanol apresentou também um significativo incremento (5-6 vezes) quando as linhagens fermentaram altas concentrações de sacarose (~ 9 g/L versus ~ 65 g/L). Entretanto, quando o rendimento da fermentação é calculado, as fermentações com altas concentrações de sacarose são menos eficientes ($Y_{e/s} \sim 0,33$) do que as fermentações com 20 g/L de sacarose ($Y_{e/s} \sim 0,45$).

As Figuras 4.17 e 4.18 mostram o padrão de fermentação em batelada de sacarose pela cepa WT (CEN.PK2-1C) em meios contendo 20 g/L e 200 g/L do açúcar, respectivamente. Embora durante o crescimento desta linhagem em sacarose não tenha sido observado acúmulo de glicose e frutose no meio (vide Figura 4.7), durante a fermentação em batelada foi observado o acúmulo dos monossacarídeos no meio, comportamento semelhante ao apresentado nas leveduras industriais. Perfil semelhante foi observado com a linhagem deletada no gene *AGT1* (LCM003), sendo que estes resultados confirmam que nestas duas linhagens a sacarose está sendo fermentada via hidrólise extracelular mediada pela invertase periplasmática. De forma idêntica às cepas industriais, as leveduras CEN.PK2-1C e LCM003 metabolizaram totalmente os açúcares e alcançaram o pico máximo de produção de etanol após 2 horas de incubação com 20 g/L de sacarose. Mas, quando foram utilizados 200 g/L, as cepas de laboratório consumiram os açúcares do meio no dobro do tempo que as industriais (comparar Figs. 4.12 e 4.15 com 4.17), embora produzissem a mesma quantidade de etanol. Esta diferença na cinética de consumo dos açúcares é provavelmente devida à saturação do sistema de transporte dos monossacarídeos, ou mais provavelmente à baixa atividade da invertase periplasmática que estas linhagens de laboratório possuem (quando se compara com as leveduras industriais, vide Figs. 4.6 e 4.8).

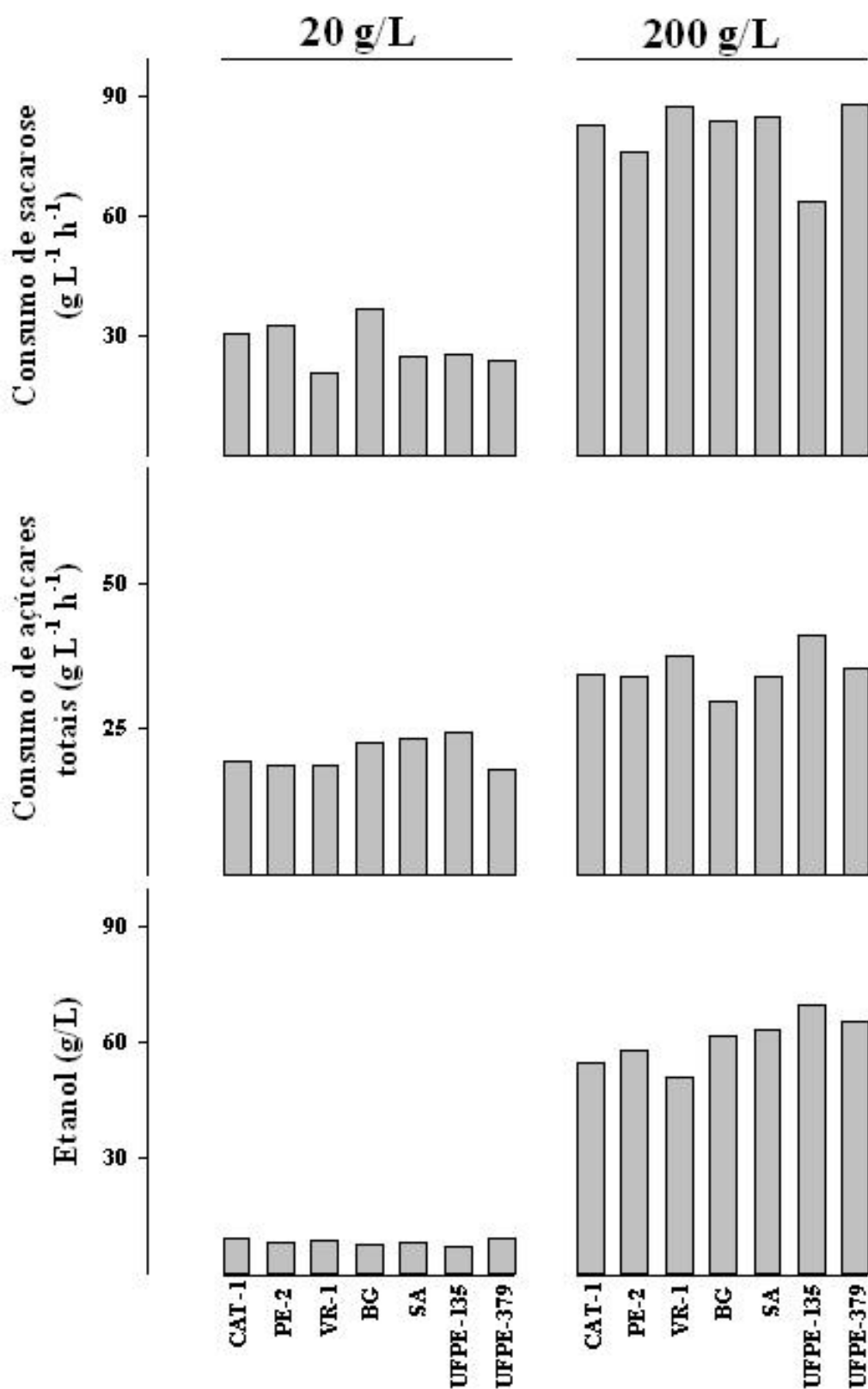


Figura 4.16 – Parâmetros fermentativos das linhagens industriais durante fermentação em batelada de 20 e 200 g/L de sacarose. Durante a fermentação em meio YP contendo as diferentes concentrações de sacarose, foi determinado, o consumo de sacarose e dos açúcares totais (incluindo a frutose e glicose, produzidas durante a hidrólise da sacarose), bem como a concentração máxima de etanol produzido, e apresentadas conforme descrito em Métodos e Procedimentos.

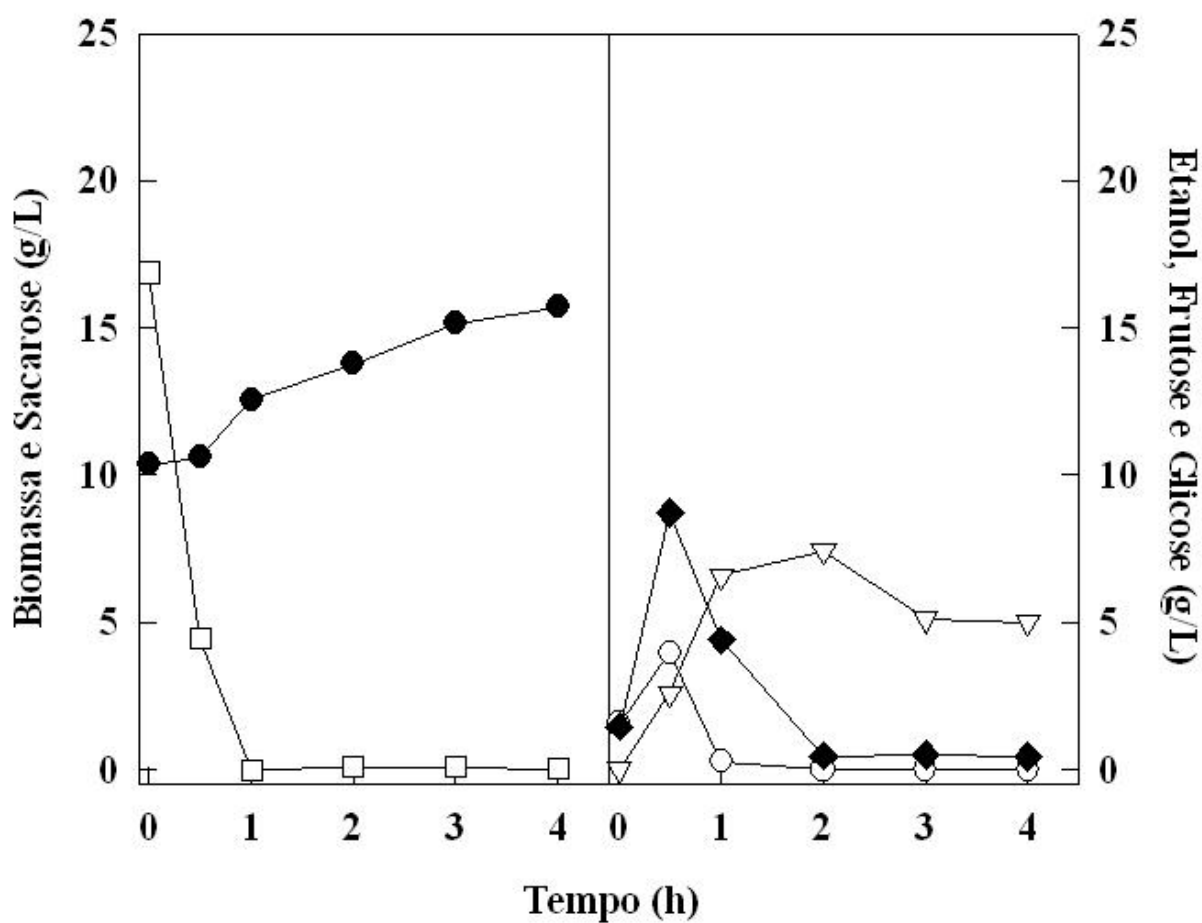


Figura 4.17 - Fermentação em batelada de 20 g/L de sacarose pela linhagem CEN.PK2-1C. Durante a fermentação em meio YP contendo 2 % de sacarose (□), foi determinada a concentração celular (●) da cultura, formação de frutose (♦), glicose (o), e etanol (▽), e apresentadas conforme descrito em Métodos e Procedimentos.

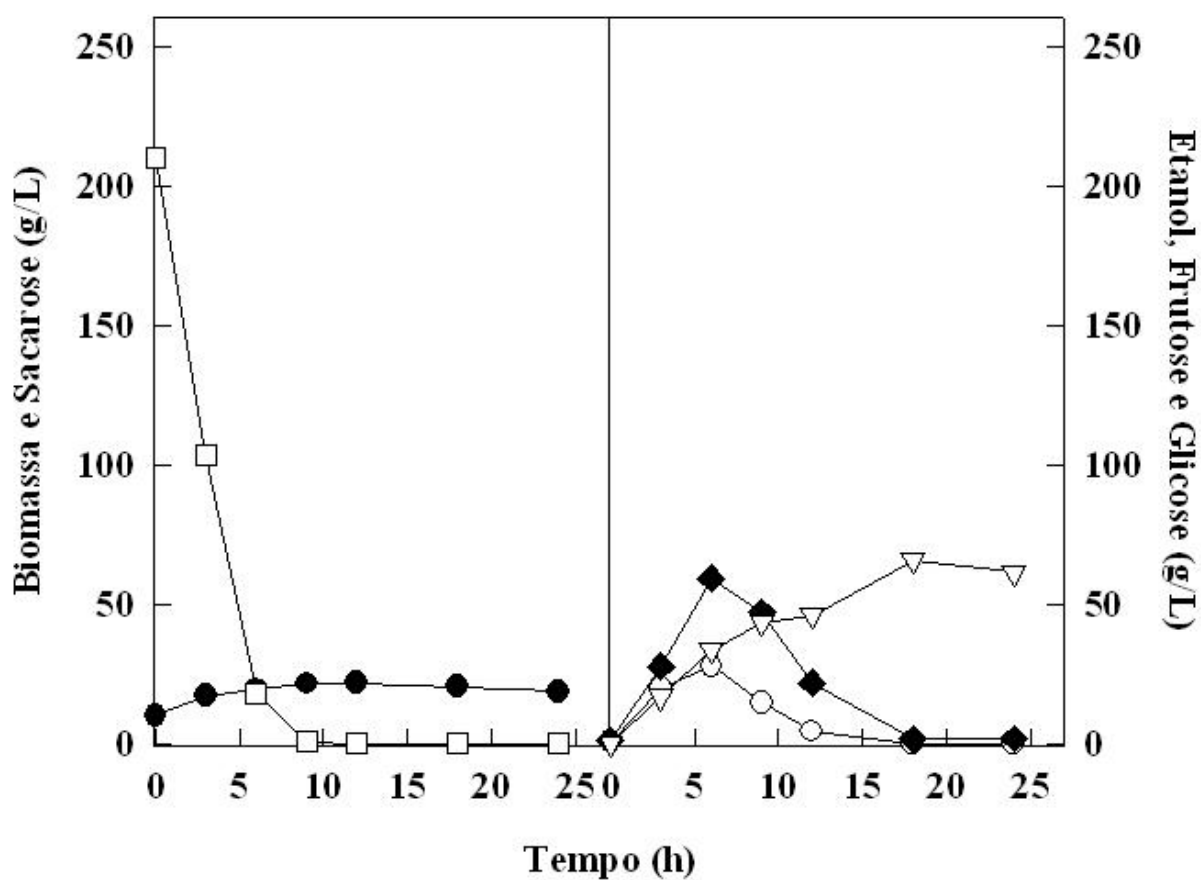


Figura 4.18 - Fermentação em batelada de 200 g/L de sacarose pela linhagem CEN.PK2-1C. Durante a fermentação em meio YP contendo 20 % de sacarose (□), foi determinada a concentração celular (●) da cultura, formação de frutose (◆), glicose (○), e etanol (▽), a apresentadas conforme descrito em Métodos e Procedimentos.

A Figura 4.19 mostra o perfil de fermentação da sacarose pela cepa MGD-01 (a linhagem deletada no gene *SUC2*) em meios contendo 20 g/L de açúcar. Como esperado devido à ausência do gene *SUC2* nesta linhagem, não houve a hidrólise extracelular do dissacarídeo, e a sacarose foi totalmente fermentada em aproximadamente 2 h com rendimento de etanol semelhante ao apresentado pelas linhagens industriais. Nesta linhagem a sacarose é transportada para o interior da célula, e clivada no citoplasma pela maltase (vide Figura 4.8). Entretanto, nas fermentações em batelada com 200 g/L de sacarose (Figura 4.20), a cepa desprovida de atividade invertase apresentou uma fermentação incompleta, já que as células foram incapazes de consumir totalmente a sacarose após ~ 10 horas de incubação. Perfil semelhante foi observado com a linhagem deletada nos genes *AGT1* e *SUC2* (cepa PSY006). Uma possível explicação para esta parada no consumo da sacarose seria a inativação catabólica (via ubiquitinação, endocitose e degradação vacuolar) do(s) transportador(es) responsáveis pela captação de sacarose nestas linhagens, fenômeno já amplamente caracterizado para vários transportadores de açúcares em *S. cerevisiae* (*GAL2*, *HXT*, *MAL61*, *AGT1*, vide MEDINTZ *et al.*, 1996, 2000; RIBALLO *et al.*, 1995; STAMBUK, 2002). Novos experimentos seriam necessários para caracterizar o processo molecular envolvido na fermentação incompleta de altas concentrações de sacarose por estas linhagens sem atividade invertase.

A Figura 4.21 mostra que as linhagens de laboratório contendo invertase periplasmática (CEN.PK2-1C e LCM003), apresentam uma velocidade média de consumo da sacarose de aproximadamente $35 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ nos meios contendo 20 g/L de sacarose, enquanto que as células deletadas no gene *SUC2* (MGD-01 e PSY006) consumiram o açúcar com uma velocidade em torno da metade desse valor ($\sim 17 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$). No meio onde a concentração de sacarose foi aumentada 10 vezes (200 g/L), a velocidade de consumo desse açúcar pelas cepas WT e suas isogênicas sem atividade invertase (MGD-01 e PSY006), permaneceram próximos

aos valores determinados no meio com 20 g/L, enquanto que a cepa LCM003 apresentou um aumento de $\sim 1,5$ vezes (em comparação com a velocidade estimada no meio com 20 g/L de sacarose). Portanto, estas leveduras apresentaram um comportamento distinto ao das industriais, sendo observado um incremento na velocidade de consumo do açúcar quando altas concentrações de sacarose foram utilizadas.

Entretanto, ao calcular a velocidade de consumo dos açúcares totais (considerando a glicose e frutose acumulada no meio), verifica-se que as linhagens com atividade invertase apresentam praticamente a mesma velocidade de consumo dos açúcares que as cepas deletadas no gene *SUC2*, tanto com 20 g/L como com 200 g/L de sacarose (Figura 4.21). Apesar da relativa baixa velocidade de consumo da sacarose pelas linhagens de laboratório, principalmente nas altas concentrações do açúcar, a produção de etanol apresentou um incremento de 9-10 vezes nas linhagens WT, LCM003 e PSY006 (~ 7 g/L versus ~ 65 g/L), enquanto a cepa MGD-01 produziu apenas 5 vezes mais etanol (~ 8 g/L versus ~ 40 g/L). Quando são analisados os rendimentos fermentativos, nas fermentações com altas concentrações de sacarose as cepas WT e LCM003 são menos eficientes ($Y_{e/s} \sim 0,33$) do que as fermentações com 20 g/L de açúcar ($Y_{e/s} \sim 0,38$). Já as cepas MGD-01 e PSY006 (deletadas no gene *SUC2*), apresentaram $Y_{e/s} \sim 0,38$ e $\sim 0,43$, na fermentação de 20 g/L, respectivamente, enquanto que na fermentação com 200 g/L de sacarose essas linhagens apresentaram rendimento próximo ao teórico ($Y_{e/s} \sim 0,51$), uma vez que foram incapazes de consumir totalmente o açúcar do meio.

A performance fermentativa apresentada pela linhagem PSY006 (deletada nos genes *AGT1* e *SUC2*) difere dos resultados apresentados em outros trabalhos. Neste trabalho, demonstra-se que as células desprovidas desses genes fermentam normalmente baixas concentrações de sacarose (20 g/L), enquanto que no meio com alta concentração (200 g/L) são incapazes de metabolizar totalmente o açúcar. Por outro lado, BADOTTI (2005) e

PARAZZI JR, (2006) demonstraram que cepas desprovidas desses genes apresentam lento consumo de sacarose com predominância para o metabolismo oxidativo (respiração) e com conseqüente perda no rendimento da produção de etanol, quando analisadas em baixa concentração de sacarose (20 g/L), enquanto que em alta concentração (200 g/L) são capazes de metabolizar os açúcares de forma semelhante à cepa parental. Desta forma, caracterizações moleculares mais detalhadas quanto às diferenças entre as linhagens que foram estudadas neste trabalho e as linhagens analisadas por BADOTTI (2005) e PARAZZI JR, (2006), seriam necessárias para elucidar os processos envolvidos no transporte ativo e fermentação de sacarose por *S. cerevisiae*.

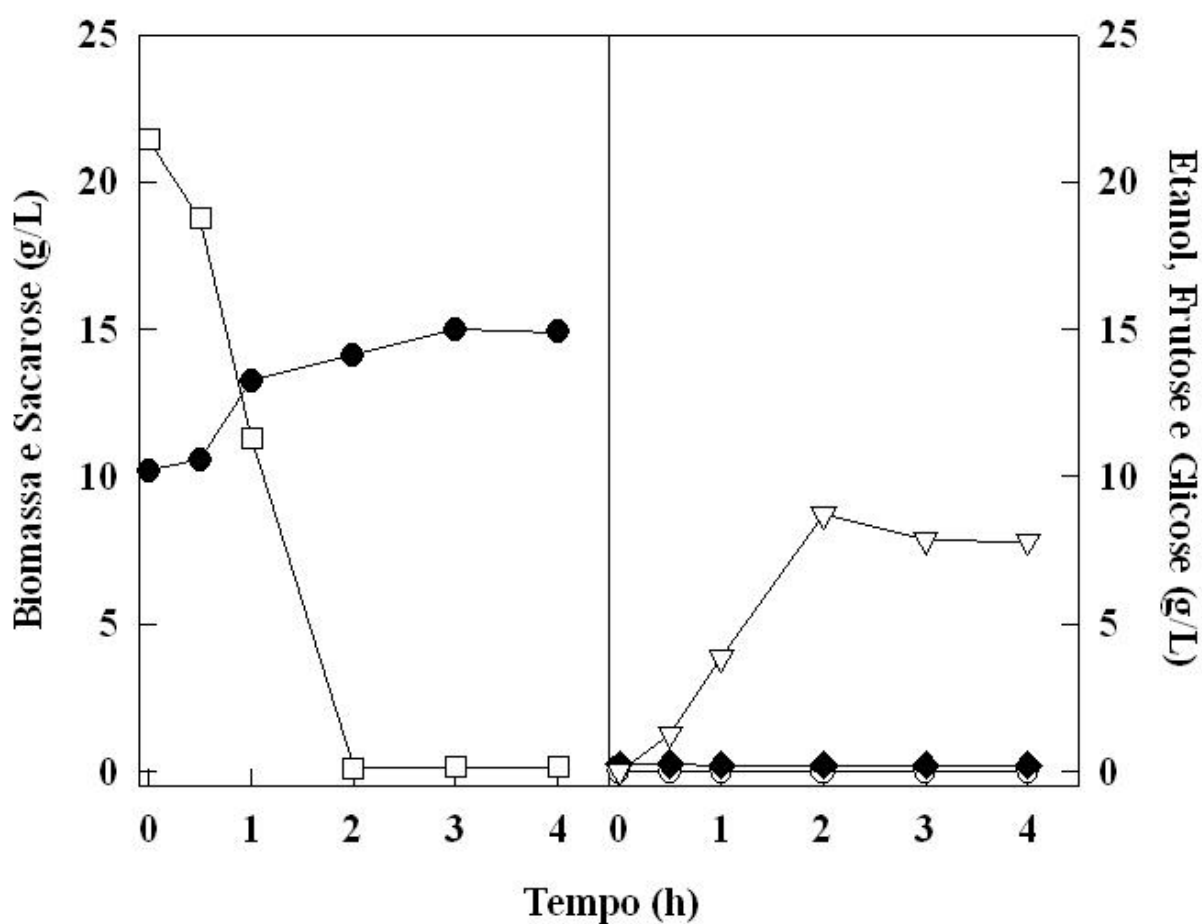


Figura 4.19 - Fermentação em batelada de 20 g/L de sacarose pela linhagem MGD-01. Durante a fermentação em meio YP contendo 2 % de sacarose (□), foi determinada a concentração celular (●) da cultura, formação de frutose (♦), glicose (o), e etanol (▽), e apresentadas conforme descrito em Métodos e Procedimentos.

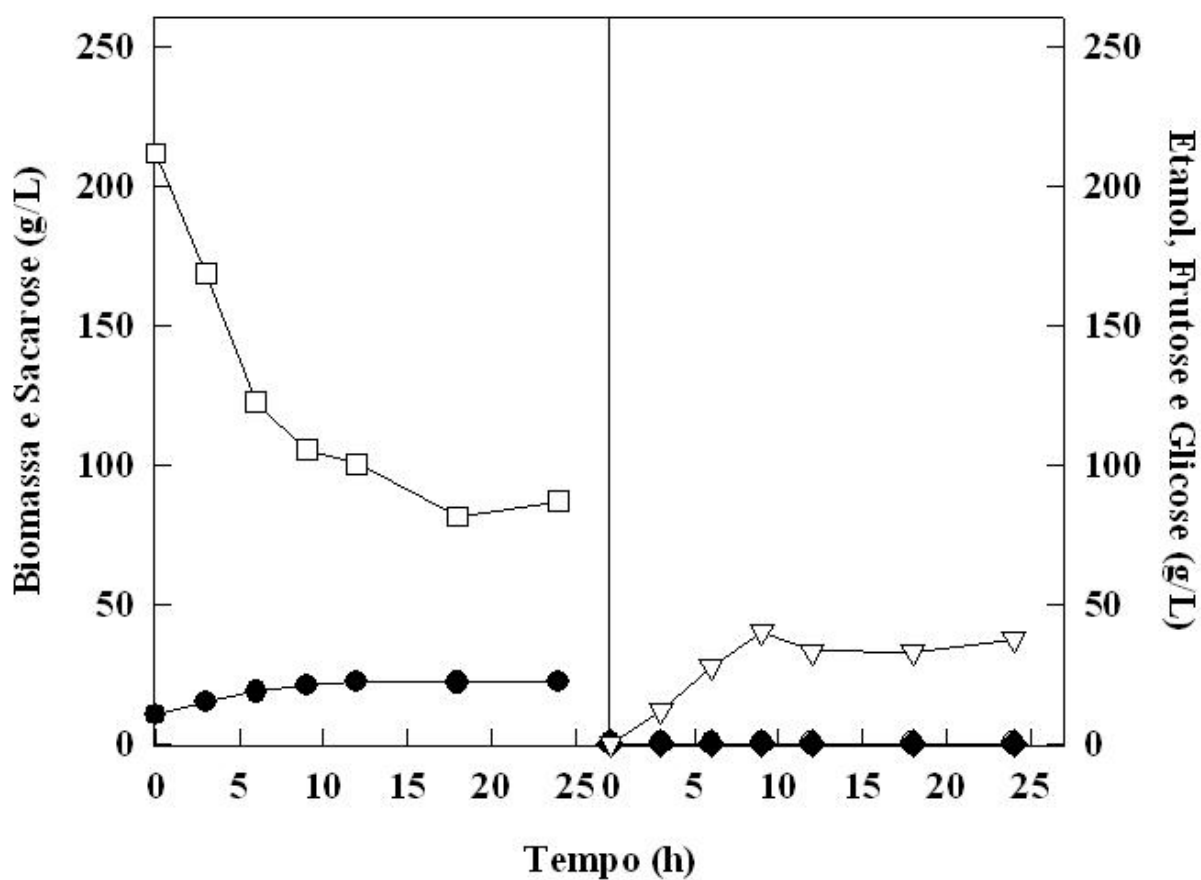


Figura 4.20 - Fermentação em batelada de 200 g/L de sacarose pela linhagem MGD-01. Durante a fermentação em meio YP contendo 20 % de sacarose (□), foi determinada a concentração celular (●) da cultura, formação de frutose (♦), glicose (○), e etanol (▽), e apresentadas conforme descrito em Métodos e Procedimentos.

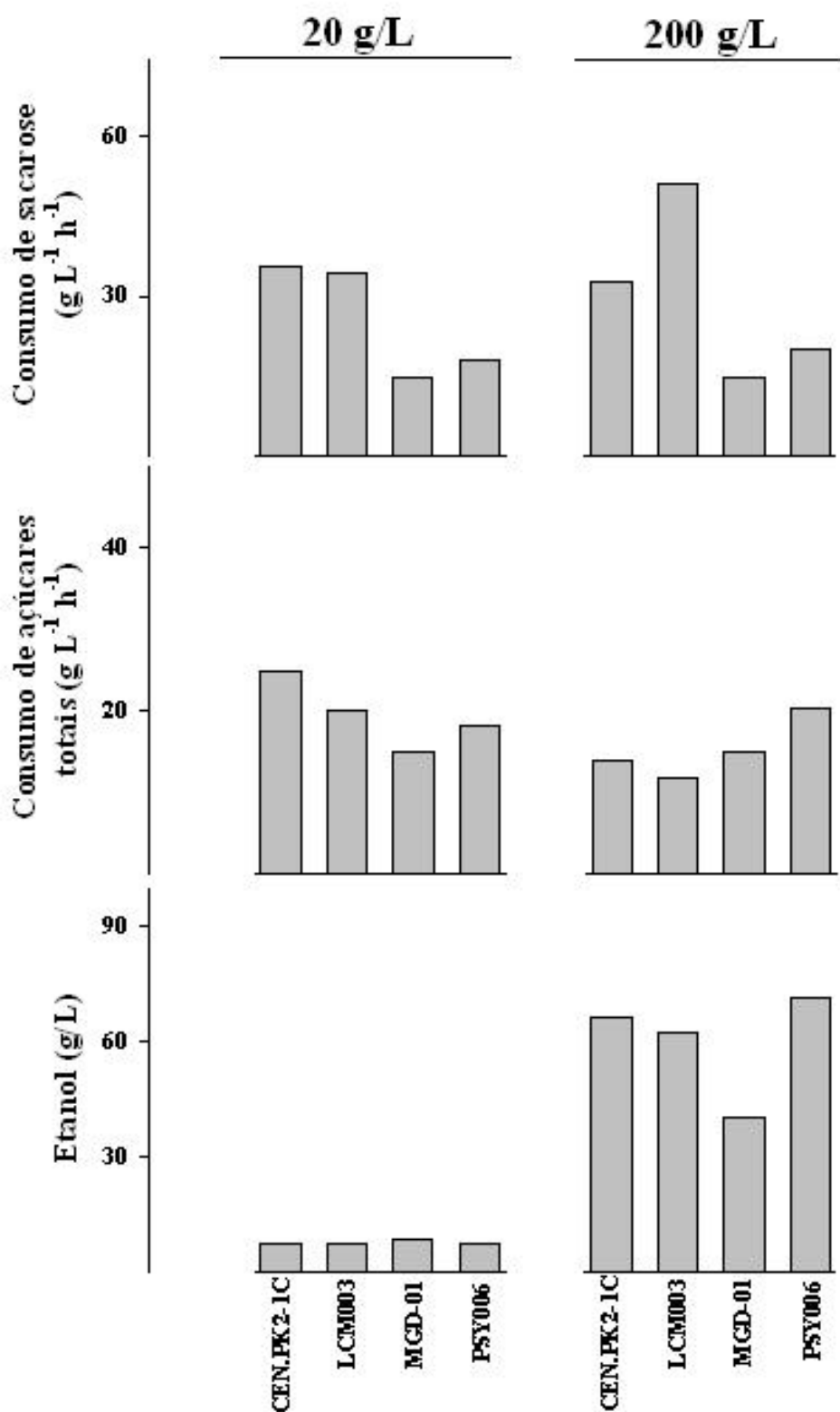


Figura 4.21 - Parâmetros fermentativos das linhagens engenhas durante fermentação em batelada de 20 e 200 g/L de sacarose. Durante a fermentação em meio YP contendo as diferentes concentrações de sacarose, foi determinado, o consumo de sacarose e dos açúcares totais (incluindo a frutose e glicose, produzidas durante a hidrólise da sacarose), bem como a concentração máxima de etanol produzido, e apresentadas conforme descrito em Métodos e Procedimentos.

5 - CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

A levedura *S. cerevisiae* possui várias aplicações industriais, sendo o principal microorganismo utilizado no processo de produção de álcool combustível no Brasil, que é realizado através da fermentação de mostos contendo alta concentração de sacarose. Almejando-se incrementar a performance fermentativa deste microrganismo, através da fermentação total dos açúcares em um curto espaço de tempo, é imprescindível analisar as rotas metabólicas envolvidas na fermentação da sacarose nesta levedura. Com este objetivo o presente trabalho analisou a utilização de açúcares por linhagens industriais isoladas e selecionadas pela sua significativa performance fermentativa nas usinas de produção de álcool combustível. Foram analisadas também linhagens de laboratório, modificadas através de engenharia genômica, contendo (ou não) os genes *AGT1* e *SUC2* envolvidos na metabolização de sacarose por *S. cerevisiae*.

Os resultados indicam que nas leveduras industriais a fermentação da sacarose é devida em grande parte à expressão da invertase periplasmática, indicando que estas leveduras possuem genes *SUC* funcionais no seu genoma. Apenas uma das linhagens industriais analisadas apresentou amplificação dos genes *SUC* e maior atividade invertase, embora esta amplificação não tenha significado vantagem fermentativa (fermentação mais rápida da sacarose) em altas concentrações deste açúcar, quando comparada com as demais leveduras industriais. Somando-se a esse fato, apesar de algumas linhagens industriais aparentemente possuírem o gene *AGT1*, os resultados indicam que na maioria das linhagens o gene é não funcional.

Considerando que para otimizar a produção de álcool combustível seria interessante evitar a hidrólise extracelular da sacarose, por contribuir para o estresse osmótico sofrido pelas células e favorecer a proliferação de microorganismos contaminantes do processo fermentativo, linhagens de laboratório com genótipos conhecidos tiveram o gene *SUC2*

deletado dos seus genomas. Os resultados mostram que as cepas engenhas para não apresentaram atividade invertase continuaram fermentando eficientemente baixa concentração de sacarose, com a vantagem de não produzir glicose e frutose no meio, uma vez que o dissacarídeo é transportado diretamente para o interior da célula onde sofre hidrólise pela maltase (α -glicosidase). Entretanto, quando foram simuladas condições industriais de fermentação em batelada com alta concentração de células e 200 g/L de sacarose, as linhagens industriais fermentaram a sacarose com relativa eficiência (embora produzissem glicose e frutose no meio), enquanto que as leveduras engenhas sem atividade invertase não produziram glicose e frutose no meio, mas apresentaram incapacidade de consumir totalmente a sacarose. Estes resultados demonstram a necessidade de novos estudos para otimizar a captação deste açúcar pelas células, principalmente no meio com altas concentrações de sacarose, e assim evitar a fermentação incompleta de sacarose por estas linhagens sem atividade invertase.

Conforme comentado anteriormente, nas leveduras industriais a capacidade de fermentar eficientemente a sacarose é devida em grande parte à expressão da invertase, uma vez que nessas células a permease *AGT1* não é funcional, além de que as células apresentaram baixa atividade da α -glicosidase. Desta forma, linhagens engenhas de modo a possuir a região promotora do gene *SUC2* trocado, fazendo com que as células aumentem a expressão da forma intracelular da invertase e impedindo a síntese da forma extracelular, são vistas como uma boa alternativa para incrementar a fermentação da sacarose, por perderem a capacidade de hidrolisar o dissacarídeo no meio extracelular. Durante o desenvolvimento deste projeto, foram engenhas linhagens com esse tipo de modificação genômica, porém ainda estão sendo realizadas caracterizações, sendo alvos de estudos em um futuro próximo.

Embora as linhagens engenhas desenvolvidas e analisadas neste trabalho possuam limitações do ponto de vista industrial, são de suma importância na análise molecular das vias

de utilização de sacarose por *S. cerevisiae*, abrindo a possibilidade de melhorar a performance fermentativa das leveduras industriais pela identificação de genes alvo para otimização via engenharia genômica. Assim, almeja-se associar a robustez genômica das cepas industriais (atribuída a poligenia) com as características metabólicas desejadas para as leveduras utilizadas no processo de produção do álcool combustível no Brasil.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AA, E.; TOWNSEND, J.P.; ADAMS, R.I.; NIELSEN, K.M.; TAYLOR, J.W. Population structure and gene evolution in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Research*, v.6, p.706-715, 2006.
- ALCARDE, A.R.; BASSO, L.C. Efeito da trealose na manutenção da viabilidade de células de leveduras desidratadas por liofilização. *Sci. Agric.*, v.54, n.3, p. 189-194, 1997.
- ALVA, J.C.R.; LEÃO, M.H.M.R. A strategic study using mutant-strain entrapment in calcium alginate for the production of *Saccharomyces cerevisiae* cells with high invertase activity. *Biotechnol. Appl. Biochem.* v. 38, p. 43-51, 2003.
- ALVARADO, E.; BALLOU, L.; HERNANDEZ, L.M.; BALLOU, C.E. Localization of alpha 1-3-linked mannoses in the N-linked oligosaccharides of *Saccharomyces cerevisiae* mnn mutants. *Biochem.* v.29, p.2471-2482, 1990.
- ALVES, L.R.A. Transmissão de preços entre produtos do setor sucroalcooleiro do Estado de São Paulo. Dissertação de mestrado em Ciências, Área de concentração: Economia aplicada, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz/ Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.
- ALVES-JR S.L. Análise molecular do transporte ativo e da fermentação de maltotriose por cepas de *Saccharomyces cerevisiae*. Trabalho de Conclusão de Curso em Ciências Biológicas. Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2005.
- AMORIM, H.V.; BASSO, L.C.; LOPES, M.L. Evolution of ethanol fermentation in Brazil. In: "Distilled Spirits: Tradition and Innovation" Bryce J. H., Stewart G. G. (eds), *Nottingham University Press*, p. 143-148, 2004.
- ANFAVEA. Autoveículos – Produção, vendas internas e exportação; In: ANFAVEA. Anuário da Indústria Automobilística Brasileira. cap.2, p.52-126, 2006.
- AQUARONE, E.; LIMA, U.A.; BORZANI, W. Alimentos e bebidas produzidos por fermentação. São Paulo: Edgard Blücher, Ed. da Universidade de São Paulo, 1975.
- ARRUDA, L.; VITOLO, M. Characterization of invertase entrapped into calcium alginate beads. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, v.81, p.23-33, 1999.

- BADOTTI, F. Modificando o metabolismo de sacarose em *Saccharomyces cerevisiae*. In: Caracterização de populações de leveduras associadas à produção de cachaça artesanal e estudos bioquímicos do metabolismo de sacarose por linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*. Dissertação de mestrado em Ciências dos Alimentos. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005.
- BADOTTI, F.; BATISTA, A.S.; STAMBUK, B.U. Sucrose active transport and fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Braz. Arch. Biol. Technol.* v.48, p.119-127, 2006.
- BARFORD, J.P.; PHILLIPS, P.J.; ORLOWSKI, J.H. A new model of uptake of multiple sugars by *S. cerevisiae*. Part 2. *Bioproc. Eng.*, v.7, p.303-307, 1992.
- BATISTA, A.S.; MILETTI, L.C.; STAMBUK, B.U. Sucrose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* lacking hexose transport. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.*, v.8, p.26-33, 2004.
- BELINCHÓN, M.M.; GANCEDO, J.M. Different signalling pathways mediate glucose induction of *SUC2*, *HXT1* and pyruvate decarboxylase in yeast. *FEMS Yeast Research*, v.xx, p.1-8 2006.
- BENITEZ, T.; MARTINEZ, P.; CODON, A.C. Genetic constitution of industrial yeast. *Microbiologia*. v.12, p.371-384, 1996.
- BENITEZ, T.; CODON, A.C. Genetic bases of the chromosomal polymorphism of industrial yeast. *Microbiologia*. v.11, p.383-385, 1995.
- BENTLEY, J.; DERBY, R. Ethanol & Fuel Cells: Converging paths of opportunity. *Renewable Fuel Association*, 2001
- BERG, C. World fuel ethanol - analysis and outlook. Disponível em:<<http://www.distill.com/World-Fuel-Ethanol-A&O-2004.html>>. Acesso em: 1 jul. 2005, 11:42:00.
- BERTELLI, L.G.A verdadeira história do Proálcool. Artigo: O Estado de S. Paulo. 16/11/2005.
- BERTHELS, N.J.; OTERO, R.R.C.; BAUER, F.F.; THEVELEIN, J.M.; PRETORIUS, I.S. Discrepancy in glucose and fructose utilization during fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast. *FEMS Yeast Res.*, v.4, p.683-689, 2004.

- BIDENNE, C.; BLONDIN, B.; DEQUIN, S.; VEZINHET, F. Analysis of the chromosomal DNA polymorphism of wine strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet.* v.22, p.1-7, 1992.
- BOLES, E.; HOLLEMBERG, C. The molecular genetics of hexoses transport in yeast. *FEMS Microbiology Review*, v. 21, p. 111, 1997.
- BORZANI, W; LIMA, U. A.; AQUARONE, E. Engenharia bioquímica. São Paulo: Edgard Blücher, Ed. da Universidade de São Paulo, 1975.
- BOTSTEIN, D; FINK, G.R. Yeast: an experimental organism for modern biology. *Science*, v.240, p. 1439-1443, 1988.
- BRASIL, M. M. E. Balanço Energético Nacional. *Ministério de Minas e Energia*, 2005.
- BRUNACCI, A. Setores prioritários são infra-estrutura, etanol e TI. Disponível em: <http://www.desenvolvimento.gov.br/sitio/ascom/noticias/noticia.php?cd_noticia=6444>. Acesso em: 20 jul. 2005, 14:46.
- BU, Y. SCHMIDT, M.C. Identification of *cis*-acting elements in the *SUC2* promoter of *Saccharomyces cerevisiae* required for activation of transcription. *Nucleic Acids Research*, v.26, n.4. p. 1002-1009, 1998.
- BURKE, D.; DAWSON, D.; STEARNS, T. Methods in yeast genetics: a Cold Spring Harbor Laboratory course manual. (2000).
- CÁCERES, A.; CÁRDENAS, A.; GALLEGU, M.; VALCÁRVEL, M.A continuous spectrophotometric system for the discrimination/determination of monosaccharides and oligosaccharides in foods. *Anal. Chim. Acta* 404: 121-129, 2000.
- CALSA JR, T.; FIGUEIRA, A. Serial analysis of expression in sugarcane (*Saccharum* spp.) leaves revealed alternative C₄ metabolism and putative antisense transcripts. *Plant Mol. Biol.* In press.
- CAMBRIDGESOFT CORPORATION. Disponível em: <<http://www.chemfinder.com>>. Acesso em: 13 dez. 2006, 12:48. 2006.

- CARLSON, M. Regulation of glucose utilization in yeast. *Curr. Opin. Genet. Dev.* v.8, p.560-564, 1998.
- CARLSON, M.; BOTSTEIN, D. Two differentially regulated mRNAs with different 5' ends encode secreted and intracellular forms of yeast invertase. *Cell*, v.28, p.145-154, 1982.
- CAVALIERI, D.; MCGOVERN, P.E.; HARTI, D.L.; MORTIMER, R.; POLSINELLI, M. Evidence for *S. cerevisiae* fermentation in ancient wine. *J. Mol. Evol.*, v. 57, p. S226-S232, 2003.
- CETEC (Centro Tecnológico de Minas Gerais). Manual para produção de artesanal de cachaça. Belo Horizonte: CETEC, 1994.
- COELHO, S.T. Mecanismos para implementação da co-geração de eletricidade a partir de biomassa. Um modelo para o Estado de São Paulo. Tese de Doutorado em Energia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1999.
- CODON, A.C.; BENITEZ, T.; KORHOLA, M. Chromosomal reorganization during meiosis of *Saccharomyces cerevisiae* baker's yeasts. *Curr. Genet.* v.32, p.247-259, 1997.
- CODON, A.C.; BENITEZ, T.; KORHOLA, M. Chromosomal polymorphism and adaptation to specific industrial environments of *Saccharomyces* strains. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* v.49, p.154-163, 1998.
- DA SILVA FILHO, E.A.; DOS SANTOS, S.K.B.; RESENDE, A. DO M.; DE MORAIS, J.O.F.; DE MORAIS JR, M.A.; SIMÕES, D.A. Yeast population dynamics of industrial fuel-ethanol fermentation process assessed by PCR-fingerprinting. *Antonie van Leeuwenhoek*, v.88, p.13-23, 2005a.
- DA SILVA FILHO, E.A.; DE MELO, H.F.; ANTUNES, D.F.; DOS SANTOS, S.K.B.; RESENDE, A. DO M.; SIMÕES, D.A.; DE MORAIS JR, M.A. Isolation by genetic physiological characteristics of a fuel-ethanol fermentative *Saccharomyces cerevisiae* strain with potential for genetic manipulation. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, v.32, p.481-486, 2005b.
- DARAN-LAPUJADE, P.; DARAN, J.M.; KOTTER, P.; PETIT, T.; PIPER, M.D.; PRONK, J.T. Comparative genotyping of the *Saccharomyces cerevisiae* laboratory strains S288C and CEN.PK113-7D using oligonucleotide microarrays. *FEMS Yeast Res.* v. 4, p.259-269, 2003.

- DARAN-LAPUJADE, P.; JANSEN, M.L.; DARAN, J.M.; VAN GULIK, W.; DE WINDE, J. H.; PRONK, J.T. Role of transcriptional regulation in controlling fluxes in central carbon metabolism of *Saccharomyces cerevisiae*. A chemostat culture study. *J. Biol. Chem.* v. 279, p. 9125-9138, 2004.
- DÁRIO, M.G.; CORDIOLI, M.L.A.; ALVES-JR, S.L.; BADOTTI, F.; KLINKOWSTROM, A.M.; MILETTI, L.C.; SCHLOGL, P.S.; STAMBUK, B.U. Análise molecular e genômica dos genes necessários para a fermentação de sacarose por *Saccharomyces cerevisiae*. 52º Congresso Brasileiro de Genética, Foz do Iguaçu, PR, Brasil, 2006.
- DE ARAÚJO, A. Indicadores da função motomecanização aplicados em usina de açúcar e álcool em um ambiente gerenciado por processos: Um estudo de caso. Dissertação de mestrado em Engenharia de Produção. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2002.
- DEMARINI, D.J.; CARLIN, E.M.; LIVI, G.P. Constitutive promoter modules for PCR-based gene modification in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, v.18, p.723-728, 2001.
- DENAYROLLES, M.; DE VILLECHENON, E.P.; LONVAUD-FUNEL, A.; AIGLE, M. Incidence of SUC-RTM telomeric repeated genes in brewing and wild wine strains of *Saccharomyces*. *Curr. Genet.*, v.31, p.457-461, 1997.
- DIDERICH, J.A.; SCHEPPER, M.; VAN HOEK, P.; LUTTIK, M.A.H.; VAN DIJKEN, J.P.; PRONK, J.T.; KLAASSEN, P.; BOELEN, H.F.M.; DE MATTOS, M.J.T.; VAN DAM, K.; KRUCKEBERG, A.L. Glucose uptake kinetics and transcription of *HXT* genes in chemostat cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* v.274, n.22, p.15350-15359, 1999;
- DYNESEN, J.; SMITS, H.P.; OLSSON, L.; NIELSEN, J. Carbon catabolite repression of invertase during batch cultivations of *Saccharomyces cerevisiae*: the role of glucose, fructose, and mannose. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v.50, p.579-582, 1998.
- ECHEGARAY, O.F.; CARVALHO, J.C.M.; FERNANDES, A.N.R.; SATO, S.; AQUARONE, E.; VITOLO, M. Fed-batch culture of *Saccharomyces cerevisiae* in sugar-cane blackstrap molasses: invertase activity of intact cells in ethanol fermentation. *Biomass Bioenergy*, v.19, p.39-50, 2000.
- ENTIAN, K.D.; KÖTTER, P. Yeast mutant and plasmid collections. *Methods Microbiol.* v.26, p.431-449, 1998.

- ERASMUS, D.J.; VAN DER MERWE, G.K.; VAN VUUREN, H.J.J. Genome-wide expression analyses: metabolic adaptation of *Saccharomyces cerevisiae* to high sugar stress. *FEMS Yeast Research* v.3, p.375-399, 2003.
- FARRELL, A.E.; PLEVIN, R.J.; TURNER, B.T.; JONES, A.D.; O'HARE, M.; KAMMEN, D.M. Ethanol Can Contribute to Energy and Environmental Goals. *Science*, v.311, p.506-508, 2006.
- FEREA, T.L.; BOTSTEIN, D.; BROWN, P.O.; ROSENZWEIG, F. Systematic changes in gene expression patterns following adaptive evolution in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. v.96, p.9721-9726, 1999.
- GANCEDO, J. Yeast carbon catabolite repression. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, v.62, p.334-361, 1998.
- GELADÉ, R.; VAN DE VELDE, S.; VAN DIJCK, P.; THEVELEIN, J.M. Multi-level response of the yeast genome to glucose. *Genome Biol.*, v.4, r.233, p.1-5, 2003.
- GOLDSTEIN, A.L.; PAN, X.; MCUSKER, H. Heterologous URA3MX cassettes for gene replacement in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, v.15, p.507-511, 1999.
- GROSSMANN, M.K.; ZIMMERMANN, F.K. The structural genes of internal invertases on *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet.* v.175, p.223-229, 1979.
- GUERRA, J.B.; ARAUJO, R.A.; PATARO, C.; FRANCO, G.R.; MOREIRA, E.S.; MENDONÇA-HAGLER, L.C.; ROSA, C.A. Genetic diversity of *Saccharomyces cerevisiae* strains during the 24 h fermentative cycles for the production of the artisanal Brazilian cachaça. *Letters Appl. Microbiol.* v.33, p.106-111, 2001.
- HAHN-HÄGERDAL, B.; GALBE, M.; GORWA-GRAUSLUND, M.F.; LIDÉN, G.; ZACCHI, G. Bio-ethanol – the fuel of tomorrow from the residues of today. *Trends Biotechnol.* v.24, p.549-556, 2006.
- HAN, E.K.; COTTY, F.; SOTTAS, C. JIANG, H. MICHELS, C.A. Characterization of *AGT1* encoding a general α -glucoside transporter from *Saccharomyces*. *Mol. Microbiol.* v.17, p.1093-1107, 1995.
- HAQ, I.U.; SHAFIQ, K.; ALI, S. Substrate-induced repression of invertase synthesis by *Saccharomyces cerevisiae* in submerged culture. *Pak. J. Botany.*, v.35, p.527-531, 2003.

- HERBERTS, R.A. Transporte ativo de α -glicosídeos: Uma metodologia para avaliar a vitalidade de leveduras cervejeiras. Dissertação de mestrado em Biotecnologia. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2006.
- HERWING, C.; DOERRIES, C.; MARISON, I.; VON STOCKAR, U. Quantitative analysis of the regulation scheme of invertase expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Bioeng.*, v.76, p.247-258, 2001.
- HILL, J.; NELSON, E.; TILMAN, D.; POLASKY, S.; TIFFANY, D. Environmental, economic, and energetic costs and benefits of biodiesel and ethanol biofuels. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. v.103, p.11206-11210, 2006.
- HOHMANN, S.; ZIMMERMANN, F.K. Cloning and expression on a multicopy vector of five invertase genes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet.* v.11, p.217-225, 1986.
- HOLLATZ, C.; STAMBUK, B.U. Colorimetric determination of active α -glucoside transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Microbiol. Methods* v.46, p.253-259, 2001.
- HOLLATZ, C.; STAMBUK, B.U. Regulation of *Saccharomyces cerevisiae* maltose fermentation by cold temperature and CSF1. *Brazilian J. Microbiol.*, São Paulo, v. 34, n. Supl.1, p. 99-101, 2003.
- HORÁK, J. Yeast nutrient transporters. *Biochem. Biophys. Acta*. v.331, p.41-79, 1997.
- HOLMES, E.W. Coupled enzymatic assay for the determination of sucrose. *Anal. Biochem.*, v.244, p.103-109, 1996.
- IHMELS, J.; BERGMANN, S.; GERAMI-NEJAD, M.; YANAI, I.; MCCLELLAN, M.; BERMAN, J.; BARKAI, N. Transcriptional network through the evolution of motif usage. *Science*, v. 309, p.938-940, 2005.
- INGLEDEW, W.M. Yeasts for production of fuel ethanol. In: ROSE, A. H.; HARRISON, J. S. (eds). *The yeasts*. San Diego, USA: Academic Press. v.5, p.245-291, 1993.
- KELLYS, M.; BIRREN, B.W.; LANDER, E.S. Proof and evolutionary analysis of ancient genome duplication in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature*, v.428, p.617-624, 2004.

- KNOP, M.; SIEGERS, K.; PEREIRA, G.; ZACHARIAE, W.; WINSOR, B.; NASMYTH, K.; SCHIEBEL, E. Epitope Tagging of Yeast Genes using a PCR-based Strategy: More Tags and Improved Practical Routines. *Yeast*, v.15, p. 963-972, 1999.
- KORSHUNOVA, I.V.; NAUMOVA, E.S.; NAUMOV, G.I. Comparative molecular-genetic analysis of the beta-fructosidases in yeast *Saccharomyces*. *Mol. Biol. (Mosk)*. v.39, p.413-419, 2005.
- KRUCKEBERG, A.L.; YE, L.; BERDEN, J.A.; DAM, K.V. Functional expression, quantification and cellular localization of the Hxt2 hexose transporter of *Saccharomyces cerevisiae* tagged with the green fluorescent protein. *Biochem. J.*, v.339, p.299-307, 1999.
- LAGUNAS, R. Energetic irrelevance of aerobiosis for *S. cerevisiae* growing on sugars. *Mol. Cel. Biochem.*, v.27, p.139-146, 1979.
- LAGUNAS, R. Misconceptions about the energy metabolism of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, v.2, p.221-228, 1986.
- LAGUNAS, R. Sugar transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Rev.*, v. 104, p.1107-1112, 1993.
- LANDRY, C.R.; TOWNSEND, J.P.; HARTL, D.L.; CAVALIERI, D. Ecological and evolutionary genomics of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Ecol.*, v.15, p.575-591, 2006.
- LEWIS, J.G.; NORTHCOTT, C.J.; LEARMONTH, R.P.; ATTFIELD, P.V.; WATSON, K. The need for consistent nomenclature and assessment of growth phases in diauxic cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Gen. Microbiol.*, v.139, p.835-839, 1993.
- LIBERAL, A.T.DE S.; DA SILVA-FILHO, E.A.; DE MORAIS, J.O.F.; SIMÕES, D.A.; DE MORAIS JR,M.A. Contaminant yeast detection in industrial ethanol fermentation must by rDNA-PCR. *Letters. Appl. Microbiol.*, v.40, p.19-23, 2005.
- LIBERAL, A.T. DE S.; BASILIO, A.C.; RESENDE, A. DO M.; BRASILEIRO, B.T.; DA SILVA-FILHO, E.A.; DE MORAIS, J.O.F.; SIMÕES, D.A.; DE MORAIS JR,M.A. Identification of *Dekkera bruxellensis* as a major contaminant yeast in continuous fuel ethanol fermentation. *J. Appl Microbiology*, v.102, p.538-547, 2007.
- LONGTINE, M.S.; MCKENZIE, A.; DEMARINI, D.J.; SHAH, N.G.; WACH, A.; BRACHAT, A.; PHILIPPSSEN, P.; PRINGLE, J.R. Additional modules for versatile and

economical PCR-based gene deletion and modification in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, v.14, p.953-961, 1998.

MANFREDINI, C. Brasil e Alemanha: parceria no biodiesel e etanol. Disponível em: <http://www.desenvolvimento.gov.br/sitio/ascom/noticias/noticia.php?cd_noticia=6309>. Acesso em: 20 jul. 2005, 14:49.

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

MATTOS, A. Procura por carro "flex" deve seguir forte. Disponível em: <<http://www1.folha.uol.com.br/folha/dinheiro/ult91u103944.shtml>>. Acesso em: 10 nov. 2006, 17:50.

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

MCCORMICK, A.J.; CRAMER, M.D.; WATT, D.A. Sink strength regulates photosynthesis in sugarcane. *New Phytology*. v.171, p.759-770, 2006.

MCGOVERN, P.E.; ZHANG, J.; TANG, J.; ZHANG, Z.; HALL, G.R.; MOREAU, R.A.; NUÑEZ, A.; BUTRYM, E.D.; RICHARDS, M.P.; WANG, C-S.; CHENG, G.; ZHAO, Z.; WANG, C. Fermented beverages of pre- and proto-historic China. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v.101, p.17593-17598, 2004.

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

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

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

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

- MYERS, D.K.; LAWLOR, D.T.M.; ATTFIELD, P.V. Influence of invertase activity and glycerol synthesis and retention on fermentation of media with a high sugar concentration by *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.63, p.145-150, 1997.
- NADAL, D.; CARRO, D.; FERNANDEZ-LARREA, J.; PINA, B. Analysis and dynamics of the chromosomal complements of wild sparkling-wine yeast strains. *Appl. Environ. Microbiol.* v.65, p.1688-1695, 1999.
- NESS, F.; AIGLE, M. RTM1: a member of a new family of telomeric repeated genes in yeast. *Genetics*. v.140, p.945-956, 1995.
- NASCIMENTO, M.G.; ZANOTTO, S.P.; MELEGARI, S.P.; MORAN, P.J.S. Estudos de proteção da célula de *Saccharomyces cerevisiae* para utilização em reações de redução em meio orgânico. *Química Nova*. v. 25, n. 4, p. 567-571, 2002.
- NAUMOV, G.I.; NAUMOVA, E.S.; MICHELS, C.A. Genetic variation of the repeated *MAL* loci in natural population of *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces paradoxus*. *Genetics*, v.136, p.803-812, 1994.
- NAUMOV, G.I.; NAUMOVA, E.S.; SANCHÓ, E.D.; KORHOLA, M.P. Polymeric *SUC* genes in natural populations of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Letters.*, v.135, p.31-35, 1996.
- NEEDLEMAN, R. Control of maltase synthesis in yeast. *Mol. Microbiol.* v.5, p.2079-2084, 1991.
- NOVAK, S.; ZECHNER-KRPAN, V.; MARIÉ, V. Regulation of maltose transport and metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Technol. Biotechnol.* v.42, p.213-218, 2004.
- ORELLANA, C.; NETO, R.B. Brasil and Japan give fuel to ethanol market. *Nature Biotechnol.* v.24, n.3. p.232, 2006.
- ORLOWSKI, J.H.; BARFORD, J.P. Direct uptake of sucrose by *Saccharomyces cerevisiae* in batch and continuous culture. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, v.37, p.215-218, 1991.
- OZCAN, S.; JOHNSTON, M. Function and regulation of yeast hexose transporters. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, v. 63, p. 554-559, 1999.

- OZCAN, S.; VALLIER, L.G.; FLICK, J.S.; CARLSON, M.; JOHNSTON, M. Expression of the *SUC2* gene of *Saccharomyces cerevisiae* is induced by low levels of glucose. *Yeast*, v.13, p.127-137, 1997.
- PARAZZI JR, O. Metabolização de açúcares em linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* com transportador de sacarose e diferentes atividades de invertase. Dissertação de Mestrado em Ciências e tecnologia de alimentos. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”/Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.
- PATARO, C.; GUERRA, J.B.; PETRILLO-PEIXOTO, M.L.; MENDONÇA-HAGLER, L.C.; LINARDI, V.R.; ROSA, C.A. Yeast communities and genetic polymorphism of *Saccharomyces cerevisiae* strains associated with artisanal fermentation in Brazil. *J. Appl. Microbiol.* v.89, p.24-31, 2000.
- PETERS, D. Carbohydrates for fermentation. *Biotechnol J.* v.1, p.806-814, 2006.
- PETRACEK, M.E.; LONGTINE, M.S. PCR-based engineering of yeast genome. *Methods in Enzymol.* v.350, p.445-469, 2002.
- PFEIFFER, T.; SCHUSTER, S.; BONHOEFFER, S. Cooperation and competition in the evolution of ATP-Producing pathways. *Science*, v.292, p.504-507, 2001.
- POSTMA, E.; SCHEFFERS, W.A.; VAN DIJKEN, J.P. Kinetics of growth and glucose transport in glucose-limited chemostat cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, v.5, p.159-165, 1989.
- PUIG, O.; RUTZ, B.; LUUKKONEN, B.G.M.; KANDELS-LEWIS, S.; BRAGADO-NILSSON, E.; SERAPHIN, B. New constructs and strategies for efficient PCR-based gene manipulations in yeast. *Yeast*, v.14, p.1139-1146, 1998.
- QUEROL, A.; FERNÁNDEZ-ESPINAR, M.T.; DEL OLMO, M.; BARRIO, E. Adaptive evolution of wine yeast. *Inter. J. Food Microbiol.* v.86, p.3-10, 2003.
- REDDY, A.; JOHNSON, R.S.; BIEMANN, K.; WILLIAMS, R.S.; ZIEGLER, F.D.; TRIMBLE, R.B.; MALEY, F. Characterization of the glycosylation sites in yeast external invertase. *J. Biol. Chem.*, v.263, n.15, p.6978-6985, 1988.
- RIBALLO, E.; HERWIJER, M.; WOLF, D.H.; LAGUNAS, R. Catabolite inactivation of the yeast maltose transporter occurs in the vacuole after internalization by endocytosis. *J. Bacteriol.* v.177: p.5622-5627, 1995.

- ROBERTS, S.M.; TURNER, N.J.; WILLETTS, J.; TURNER, M.K. Introduction to biocatalysis using enzymes and micro-organisms. New York: Cambridge University Press, 1995.
- RODIONOV, Y.V.; KEPPEN, O.I.; SUKHACHEVA, M.V. A photometric assay for ethanol. *Appl. Biochem. Microbiol.*, v. 38, p. 395-396, 2002.
- ROLLAND, F.; WINDERICKX, J. THEVELEIN, J.M. Glucose-sensing and -signaling mechanisms in yeasts. *FEMS Yeasts Res.*, v.2, p.183-201, 2002.
- ROSE, A.M.; VIJAYALAKSHMI. Baker's yeasts. In: ROSE, A. M.; HARRISON, J. S. (eds). *The yeasts*. 2th ed. San Diego: Academic Press, 1993.
- ROSILLO-CALLE, F.; CORTEZ, L.A.B. Towards proálcool II – A review of the brazilian bioethanol programme. *Biomass and Bioenergy*, v.14, n.2, p. 115-124, 1998.
- SALGADO, A.M.; FOLLY, R.O.M.; VALDMAN, B.; CÓS, O.; VALERO, F. Colorimetric method for the determination of ethanol by flow injection analysis. *Biotechnol. Letters*. v. 22, p. 327-330, 2000.
- SANTOS, M.H. de C. Política e Políticas de uma energia alternativa: o caso do Proálcool. Rio de Janeiro: Notrya, 1993.
- SCHÄFER, W.E.; ROHWER, J.M.; BOTHA, F.C.A kinetic study of sugarcane sucrose synthase. *Eur. J. Biochem*, v.271, p.3971-3977, 2004.
- SCHWAN, R.F.; MENDONÇA, A.T.; DA SILVA, JR. J.J.; RODRIGUES, V.; WHEALS, A. E. Microbiology and physiology of cachaça (aguardante) fermentations. *Antonie van Leeuwenhoek*. v.79, p.89-96, 2001.
- SHERMAN, F. Getting started with yeast. Disponível em: <http://dbb.urmc.rochester.edu/labs/sherman_f/startedyeast.pdf>. Acesso em: 13 dez. 2005, 17:50.
- SILVEIRA, M.C.F.; CARVAJAL, E.; BON, E.P.S. Assay for *in vivo* yeast invertase activity using NaF. *Anal. Biochem.*, v.238, p.26-28, 1996.

- STAMBUK, B.U. A simple experiment illustrating metabolic regulation: induction versus repression of yeast α -glucosidase. *Biochem. Educ.* v. 27, p. 178-181, 1999.
- STAMBUK, B.U. Transcriptional and posttranslational regulation of a membrane nutrient transporter. *Biochem. Mol. Biol. Educ.*, v.30, p.388-393, 2002.
- STAMBUK, B.U.; PANEK, A.D.; CROWE, J.H.; CROWE, L.M.; DE ARAUJO, P.S. Expression of high-affinity trehalose- H^+ symport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta.* v.1379, p.118-128, 1998.
- STAMBUK, B.U.; DA SILVA, M.A.; PANEK, A.D.; DE ARAUJO, P.S. Active α -glucoside transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Letters.* v.170, p.105-110, 1999.
- STAMBUK, B.U.; BATISTA, A.S.; DE ARAUJO, P.S. Kinetics of active sucrose transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biosci. Bioeng.* v. 89, p. 212-214, 2000.
- STAMBUK, B.U.; DE ARAUJO, P.S. Kinetics of active α -glucoside transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res.* v.1, p. 73-78, 2001.
- STAMBUK, B.U.; ALVES JR, S.L.; HOLLATZ, C.; ZASTROW, C.R. Improvement of maltotriose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Letters Appl. Microbiol*, v.43, p. 370-376, 2006.
- STEWART, J.D. Organic transformations catalyzed by engineered yeast cells and related systems. *Curr. Opin. Biotech.* v. 11, n. 3, p. 344-348, 2000.
- TABATA, S.; IDE, T.; UMEMURA, Y.; TORII, K. Purification and characterization of α -glucosidases produced by *Saccharomyces* in response to three distinct maltose genes. *Biochim. Biophys. Acta*, v.797, p.231-238, 1984.
- TAVARES, M.E.E. Análise do refino no Brasil: Estado e perspectivas – Uma análise “Cross-section”. Tese de Doutorado em Ciências em Planejamento Energético, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2005.
- THOMAS, K.C.; HYNES, S.H.; INGLEDEW, W.M. Practical and theoretical considerations in the production of high concentrations of alcohol by fermentation. *Process Biochem.* v.31, p.321-331, 1996.

- VAN DIJKEN, J.P.; BAUER, J.; BRAMBILLA, L.; DUBOC, P.; FRANCOIS, J.M.; GANCEDO, C.; GIUSEPPIN, M.L.; HEIJNEN, J.J.; HOARE, M.; LANGE, H.C.; MADDEN, E.A.; NIEDERBERGER, P.; NIELSEN, J.; PARROU, J.L.; PETIT, T.; PORRO, D.; REUSS, M.; VAN RIEL, N.; RIZZI, M.; STEENSMA, H.Y.; VERRIPS, C.T.; VINDELOV, J.; PRONK, J. T. An interlaboratory comparison of physiological and genetic properties of four *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Enzyme Microb. Technol.* v.26, p.706-714, 2000.
- VERSTREPEN, K.J.; ISERENTANT, D.; MALCORPS, P.; DERDELINCKX, G.; VAN DIJCK, P.; WINDERICKX, J.; PRETORIOUS, I.S.; THEVELEIN, J.M.; DELVAUX, F.R. Glucose and sucrose: hazardous fast-food for industrial yeast? *Trends Biotechnol.* v.22, p.531-537, 2004.
- VERTÈS, A.A.; INUI, M.; YUKAWA, H. Implementing biofuel on a global scale. *Nature Biotechnology*. v.24, n.7, p.761-764 2006.
- VIDGREN, V.; RUOHONEN, L.; LONDESBOROUGH, J. Characterization and Functional Analysis of the *MAL* and *MPH* Loci for Maltose Utilization in Some Ale and Lager Yeast Strains. v.71, p.7846-7857, 2005.
- WANG, J.; NEEDLEMAN, R. Removal of a Mig1p binding site converts a *MAL63* constitutive mutant derived by interchromosomal gene conversion to glucose insensitivity. *Genetics*. v.142, p.51-63, 1995.
- WATSON, D.C. Yeasts in distilled alcoholic-beverage production. In: ROSE, A.M.; HARRISON, J.S. (eds). *The yeasts*. 2th ed. San Diego: Academic Press, 1993.
- WHEALS, A.E.; BASSO, L.C.; ALVES, D.M.; AMORIM, H.V. Fuel ethanol after 25 years. *Trends biotechnol.*, v.17, p.482-487, 1999.
- WOOLFIT, M.; WOLFE, K. The gene duplication that greased society's wheels. *Nat. Genet.*, v.37, p.566-567, 2005.
- WU, L.; BIRCH, R.G. Doubled sugar content in sugarcane plants modified to produce a sucrose isomer. *Plant Biotechnol. J.*, v.5, p.109–117, 2007.
- WYMAN, C.E. Biomass Ethanol: Technical progress, opportunities, and Commercial challenges. *Annual Rev. Energy Environ.*, v.24, p.189-226, 1999.

- YIN, Z.; WILSON, S.; HAUSER, N.C.; TOURNU, H.; HOHEISEL, J.D.; BROWN, A.J. Glucose triggers different global responses in yeast, depending on the strength of the signal, and transiently stabilizes ribosomal protein mRNAs. *Mol. Microbiol.*, v.48, p.713-724, 2003.
- ZANIN, G.M.; SANTANA, C.C.; BON, E.P.; GIORDANO, R.C.; DE MORAES, F.F.; ANDRIETTA, S.R.; DE CARVALHO NETO, C.C.; MACEDO, I.C.; FO, D.L.; RAMOS, L.P.; FONTANA, J.D. Brazilian bioethanol program. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, v.84-86, p.1147-1161, 2000.
- ZASTROW, C.R.; MATTOS, M.A.; HOLLATZ, C.; STAMBUK, B.U. Maltotriose metabolism by *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology Letters*. v.22, p.455-459, 2000.
- ZASTROW, C.R.; HOLLATZ, C.; DE ARAUJO, P.S.; STAMBUK, B.U. Maltotriose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* v.27, p.34-38, 2001.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)