

VICTOR RIBEIRO DE GODOY

**Avaliação da funcionalidade do gene *AGT1* de leveduras industriais
Saccharomyces cerevisiae produtoras de álcool combustível**

Orientador: Dr. Boris Juan Carlos Ugarte Stambuk

Coorientadora: M.Sc. Gabriela Muller

Florianópolis, Fevereiro de 2013

GODOY, V.R.

Avaliação da funcionalidade do gene *AGTI* de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* produtoras de álcool combustível Florianópolis, SC, 2013.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) 60p.

1. Transporte de sacarose
2. Fermentação Alcoólica
3. Clonagem
4. *AGTI*.

VICTOR RIBEIRO DE GODOY

Avaliação da funcionalidade do gene *AGT1* de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* produtoras de álcool combustível

Florianópolis, 22 de Fevereiro de 2013

Profa. Maria Risoleta Freire Marques
Coordenadora do Curso de Ciências Biológicas

Banca Examinadora:

Boris Juan Carlos Ugarte Stambuk, Orientador
Universidade Federal de Santa Catarina

Dra. Angelica Francesca Maris
Universidade Federal de Santa Catarina

Dr. Márcio José Rossi
Universidade Federal de Santa Catarina

Este trabalho é dedicado aos meus pais, Oswaldo e Jacira, e a minha coorientadora, Gabriela.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Prof. Dr. Boris U. Stambuk pela orientação e substancial contribuição à minha formação.

À minha coorientadora Gabriela Muller pelos ensinamentos, pela atenção, pela paciência e pela amizade. Certamente os caminhos seriam mais difíceis sem o seu auxílio. Muito obrigado por tudo!

À Débora Trichez pelo aprendizado e auxílio nos momentos necessários.

Ao Prof. Dr. Márcio Rossi e à Prof. Dra. Angélica Maris por aceitarem compor a banca examinadora.

À minha melhor amiga e companheira de laboratório, Ana Schenkel, pelo carinho, pela compreensão e pela parceria nos diversos momentos da minha vida. Obrigado por me aturar!

Aos meus amigos Adriano Ferreira, Alceu Azambuja, Benito Sbruzzi e Hugo Kubo pela amizade e companheirismo. Sem dúvida grandes amigos!

Aos meus amigos da SIMBIOSIS pelos bons momentos juntos vividos e pelo grande aprendizado que cada um proporcionou.

Às minhas amigas de sala de aula pela ajuda e pela parceria ao longo desses quase cinco anos.

À todas as muitas pessoas que, por mais que não tenham seus nomes aqui escritos, foram fundamentais para o meu crescimento profissional e pessoal.

Aos meus pais pelo apoio incondicional desde sempre, pelo carinho, pelo afeto e pelos ensinamentos. Sem o apoio de vocês nada disso seria

possível. Tenham a certeza de que essa pessoinha que aqui escreve os ama
MUITO.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

"Viver é desenhar sem borracha."
(Millôr Fernandes)

RESUMO

Leveduras do gênero *Saccharomyces* são utilizadas em diversos processos industriais, dentre eles a fermentação da sacarose para a produção de etanol combustível. A utilização da sacarose ocorre pela sua hidrólise extracelular mediada pela enzima invertase codificada pelo gene *SUC2*. A hidrólise libera glicose e frutose no meio que são internalizadas pelos transportadores de hexoses codificados pelos genes *HXT*. Entretanto, a presença do transportador de membrana codificado pelo gene *AGT1* possibilita o transporte direto da sacarose para o interior da célula onde a mesma é hidrolisada pela invertase intracelular, ou pelas maltases. Apesar das linhagens industriais CAT-1 e PE-2 possuírem o gene *AGT1* no seu genoma, este gene parece ser não-funcional nessas linhagens. O objetivo deste trabalho foi sobre-expressar o gene *AGT1* das linhagens CAT-1 e PE-2 para avaliar a sua funcionalidade. Para tal, os genes amplificados por PCR foram inseridos no vetor de sobre-expressão pGRSd. Os novos vetores foram utilizados para transformar a levedura LCM003, que não possui o gene *AGT1* no seu genoma. Foi observado que as diferenças na composição de nucleotídeos do gene *AGT1* das linhagens CAT-1 e PE-2, em relação à linhagem de laboratório S288C, não interfere na atividade do mesmo quando esse está sobre o controle de um promotor forte. Após sequenciar a região promotora do gene *AGT1* nas linhagens industriais produtoras de etanol, podemos concluir que a falta de atividade deste gene está relacionada com uma região promotora defeituosa, recentemente descrita também em outras *S. cerevisiae* utilizadas em processos industriais.

Palavras-chave: Transporte de sacarose, Fermentação alcoólica, Clonagem, *AGT1*

ABSTRACT

Yeasts of the genus *Saccharomyces* are used in various industrial processes, including fermentation of sucrose for the production of fuel ethanol. The use of sucrose is mediated by this extracellular hydrolysis by the enzyme invertase encoded by *SUC2* gene. The hydrolysis release glucose and fructose in the medium that are internalized by hexose transporters encoded by the *HXT* genes. However, the presence of membrane transporter encoded by the *AGT1* gene enables direct transport of sucrose into the cell where it is hydrolyzed by intracellular invertase, or the maltases. Despite industrial strains CAT-1 and PE-2 having the *AGT1* gene in their genome, this gene appears to be nonfunctional in these strains. This work was over-express the gene *AGT1* strains CAT-1 and PE-2 to evaluate its functionality. To this end, the genes amplified by PCR were inserted into the vector overexpression pGRSd. The new vectors were used to transform the yeast LCM003, which lacks the *AGT1* gene in their genome. It has been observed that differences in the nucleotide composition of the *AGT1* gene of the strains CAT-1 and PE-2 compared to laboratory strain S288C does not interfere with activity even when it is under the control of a strong promoter. After sequencing the *AGT1* gene promoter in industrial ethanol-producing strains, we conclude that the lack of activity of this gene is linked to a defective promoter region recently described also in other *S. cerevisiae* used in industrial processes. Keywords: Transport of sucrose, Fermentation, Cloning, *AGT1*.

Lista de Figuras

Figura 1.1 - Número absoluto de automóveis licenciados no Brasil.....	18
Figura 1.2 - Invertase intracelular (monômero) e invertase extracelular.....	21
Figura 1.3 - Representação de um locus <i>MAL</i> completamente funcional.....	22
Figura 1.4 - Representação do locus <i>malg</i>	24
Figura 4.1 - A – Plasmídeo pGRSd-AGT1.....	37
Figura 4.1 - B – Digestão do pGRSd com BamHI.....	37
Figura 4.2 - Placa com meio de cultura sem uracila.....	38
Figura 4.3 - Curva de crescimento em 2 % de maltotriose.....	40
Figura 4.4 – Alinhamento da região promotora do gene <i>AGT1</i>	44
Figura 4.5 – Esquema do locus <i>MAL1</i> da S288C e CAT-1.....	47
Figura 4.6 – Comparação das regiões promotoras do gene <i>AGT1</i> presente nas linhagens A15 e CAT-1.....	48

Lista de Tabelas

Tabela 3.1 – Primers utilizados.....	27
Tabela 3.2 – Plasmídeos utilizados.....	27
Tabela 3.3 - Características dos micro-organismos utilizados.....	28
Tabela 4.1 - Polimorfismos na sequência de aminoácidos do gene <i>AGT1</i>	36

Sumário

1 INTRODUÇÃO.....	15
1.1 Álcool combustível.....	15
1.2 Utilização de açúcares por <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	19
2. OBJETIVOS.....	26
2.1 Objetivo geral.....	26
2.2 Objetivos específicos.....	26
3. Material e Métodos.....	27
3.1 Iniciadores, plasmídeos e microrganismos utilizados.....	27
3.2 Meios de cultura e condições de crescimento.....	29
3.3 Métodos de biologia molecular.....	30
3.4 Construção do vetor de expressão do gene <i>AGT1</i>	30
3.5 Transformação da linhagem LCM003 com o vetor de expressão contendo o gene <i>AGT1</i>	31
3.6 Transporte de <i>p</i> -nitrofenil- α -D-glicopiranosídeo (<i>p</i> NP α G).....	31
3.7 Determinação de glicose, maltose, maltotriose e etanol.....	32
3.8 Sequenciamento da região promotora do gene <i>AGT1</i>	33
4. Resultados e discussão.....	35
4.1 Funcionalidade do gene <i>AGT1</i> das linhagens CAT-1 e PE-2.....	35
4.2 Análise da região promotora do gene <i>AGT1</i> das linhagens CAT-1 e PE-2.....	41
4.3 Análise do locus <i>MAL1</i> da levedura CAT-1.....	47
5. Conclusões.....	48
6. Referências.....	49

1. INTRODUÇÃO

Leveduras do gênero *Saccharomyces*, destacando-se a espécie *S. cerevisiae*, são utilizadas em diversos processos industriais. São exemplos clássicos da utilização dessa espécie de levedura a panificação e a produção de bebidas alcoólicas, porém, nas últimas décadas ela vem ganhando importância na produção de álcool combustível (BOTSTEIN e FINK, 1988; CAVALIERI *et al.*, 2003; LANDRY *et al.*, 2006; MCGOVERN *et al.*, 2004; WOOLFIT e WOLFE, 2005). Sua utilização na produção de álcool se deve à capacidade que essas leveduras apresentam de se adaptar e dominar o ambiente através da habilidade de fermentar os açúcares presentes no meio, produzindo etanol, mesmo na presença de oxigênio (DE DEKEN, 1966; BARFORD e HALL, 1979). Além disso, suportam baixos níveis de pH, altas concentrações de etanol e também o estresse osmótico decorrente das altas concentrações de açúcares. Portanto, estudar o metabolismo de leveduras utilizadas nesses processos é extremamente importante para o crescimento dos setores industriais em questão.

1.1 Álcool combustível

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 desse combustível não tenha dado certo devido à disponibilidade de derivados de petróleo a preços baixos (KOVARIK, 1998; MUSSATTO *et al.*, 2010). O preço do petróleo até metade do século XX era controlado pelas multinacionais petrolíferas, 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. No entanto, após a criação da OPEP (Organização dos Países Exportadores de Petróleo) em 1961 mudou-se a configuração pré-existente do estabelecimento do preço do petróleo (COELHO, 1999; SANTOS, 1993; TAVARES, 2005).

Durante a década de 70, os países detentores de reservas petrolíferas revisaram 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 isso, 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, essa nova organização passou a ditar o preço de comercialização do petróleo e o barril passou de US\$ 3 para US\$ 12. Entre os anos de 1978 e 1980, no auge do exercício do seu poder, houve a elevação do preço do barril de US\$ 18 para US\$ 36 (BERTELLI, 2005; COELHO, 1999; TAVARES, 2005). Esses eventos foram denominados choques do petróleo porque provocaram uma grave crise energética e contribuíram para reduzir o 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 (BERTELLI, 2005; COELHO, 1999; TAVARES, 2005).

Devido à escalada dos preços do petróleo nos anos 70, os países consumidores buscaram reduzir a participação do petróleo nas matrizes energéticas de suas economias. Para isso iniciou-se a busca de alternativas para a crise, reacendendo o interesse mundial por fontes alternativas de energia. 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 Pro-Álcool, através do decreto nº 76.593, de 14/11/1975 (ALVES, 2002; BERTELLI, 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 conferiram 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.

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. 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 à corrosão), gerou

desconfiança quanto ao desenvolvimento e viabilidade do programa. Dessa forma, as montadoras (Figura 1.1) reduziram a fabricação de carros movidos a álcool (ROSILLO-CALLE e CORTEZ, 1998; COELHO, 1999; TAVARES, 2005).

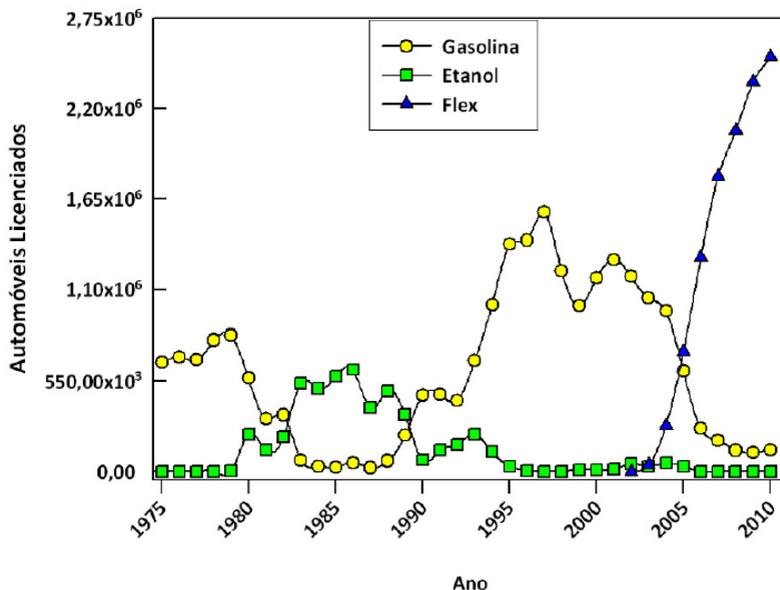


Figura 1.1 – Número absoluto de automóveis licenciados no Brasil, segundo tipo de combustível, durante os anos de 1975 a 2010 (ANFAEVA, 2011)

Após esse período de incerteza em relação ao consumo de álcool combustível, houve um novo estímulo. O Plano Real que acabara de ser implementado e o alarde de que o petróleo seria extinto num futuro relativamente próximo trouxe às pessoas uma visão otimista sobre o álcool, sendo esse considerado como uma fonte alternativa de energia que iria contribuir e garantir o crescimento econômico nacional, além de ter a

vantagem de ser renovável e menos poluente que os derivados do petróleo, grandes causadores do efeito estufa e mudanças climáticas.

Em 2003, foi introduzida a tecnologia dos motores *flex* (que funcionam com gasolina e álcool em qualquer proporção), possibilitando aos consumidores escolher qual combustível colocar no seu veículo, baseado no

preço de cada um. Com isso, houve uma maior procura pelos carros *flex*, que passaram a dominar o mercado (Figura 1.1), fazendo com que no ano de 2010 o volume de etanol consumido (hidratado e anidro) ficasse acima do volume de gasolina (AMORIM et al., 2011; MUSSATTO et al., 2010). Por outro lado, a demanda por álcool combustível a nível mundial também sofreu um incremento significativo, estimulando a produção deste combustível renovável.

1.2 Utilização de açúcares por *Saccharomyces cerevisiae*

Para que ocorra o processo de fermentação em leveduras *S. cerevisiae* é necessário que haja, como passo inicial, o transporte dos açúcares do meio extracelular para o interior das células (LAGUNAS, 1993). Os monossacarídeos glicose e frutose são transportador para o interior da célula através de um sistema de difusão facilitada, que utiliza transportadores de hexoses de alta (K_m 1 a 2 mM) e baixa (K_m 50-100 mM) afinidade, codificados pelos genes *HXT*.

A sacarose é um dissacarídeo formado por uma molécula de glicose ligada a uma de frutose, através de uma ligação osídica α 1- β 2. Essa ligação permite que esse carboidrato seja hidrolisado por duas enzimas: por α -D-glicosidases, que reconhecem a ligação “Gli- α 1”, e por β -D-frutosidases, que reconhecem a ligação “ β 2-Fru”. Isso confere duas rotas de

utilização para a sacarose em *S. cerevisiae*. Um delas é através da sua hidrólise no meio extracelular, pela ação da invertase (β -D-frutosidase) extracelular, gerando os monossacarídeos glicose e frutose que são internalizados por transportadores HXT. Outra forma de captação de sacarose é através do transporte direto do açúcar para o interior da célula através do co-transporte de prótons. Esse transporte é realizado com alta afinidade (K_m 7 mM) pela permease codificada pelo gene *AGT1* e com baixa afinidade (K_m >100 mM) pelos transportadores de maltose, codificados pelos genes *MALx1* da família *MAL*. Após a internalização a sacarose é hidrolisada pela invertase intracelular ou pela maltase (α -D-glicosidase) (BADOTTI; BATISTA; STAMBUK, 2006; BADOTTI et al., 2008; BARFORD; PHILLIPS; ORLOWSKI, 1992; BATISTA; MILETTI; STAMBUK, 2004; MWESIGYE; BARFORD, 1996; ORLOWSKI; BARFORD, 1991).

Como mencionado acima, a invertase, em *S. cerevisiae* possui duas formas: uma extracelular (periplasmática) e outra intracelular. Elas podem ser codificadas por qualquer um dos genes *SUC* (*SUC1* a *SUC5* e *SUC7* a *SUC10*), os quais se encontram localizados nos cromossomos II (*SUC3*), IV (*SUC5*), VII (*SUC1*), VIII (*SUC7*), IX (*SUC2*), X (*SUC8*), XIII (*SUC4* e *SUC10*), XIV (*SUC9*) e XVI (*SUC10*) (NAUMOV et al., 1996, NAUMOV et al., 2010a e 2010b). O que define se uma invertase vai ser intra ou extracelular é o RNA mensageiro (RNAm) do qual as enzimas são traduzidas. Uma das formas do RNAm apresenta um peptídeo sinal, responsável por direcionar a enzima produzida ao espaço periplasmático, dando origem à invertase extracelular. A outra forma de RNAm é menor, visto que não contém a informação para a síntese do peptídeo sinal, e produz a forma intracelular da invertase. Ambas enzimas possuem

características semelhantes no que se refere a pH ótimo (4,6 a 5,0), temperatura ótima de atividade (35 a 50 °C), afinidade pela sacarose (K_m 25 mM) e a quantia de aminoácidos (532). No entanto, elas possuem massas molares diferentes, sendo $\cong 135$ K. Daltons para a forma intracelular e valores superiores a 270 K. Daltons para a forma extracelular, que pode formar complexos enzimáticos com massa superior a 800.000 Daltons (Figura 1.2) (ANDJELKOVIC; PICURIC; VUJICIC, 2010; GASCÓN; NEUMANN; LAMPEN, 1968).

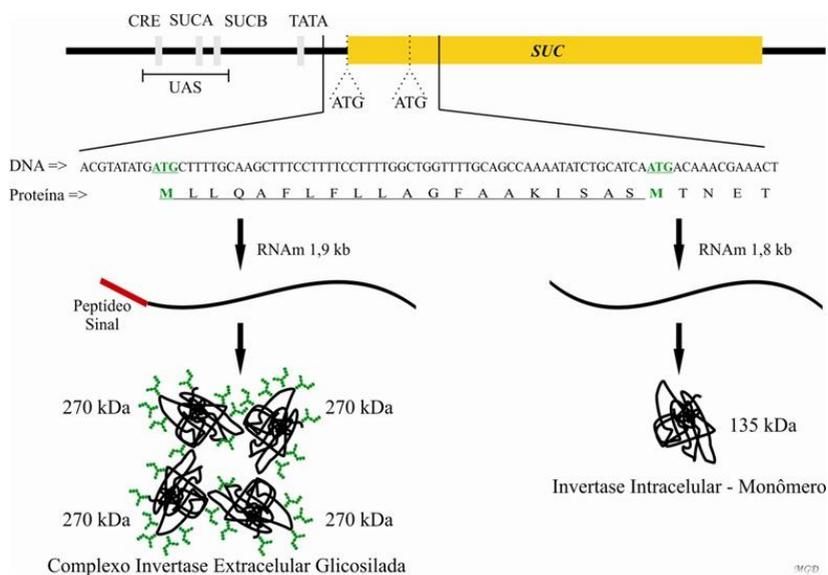


Figura 1.2 – Estrutura dos genes *SUC*, e síntese da invertase intracelular e extracelular. Fonte: Dário (2012).

Por outro lado, a utilização de maltose e maltotriose pelas leveduras inicia-se pelo transporte ativo para o interior da célula, através do simporte com H^+ . A seguir esses carboidratos são hidrolisados por maltases

(α -glicosidases), liberando as moléculas de glicose que serão metabolizadas até etanol pela glicólise (ZASTROW et al., 2001). Para que haja a utilização desses açúcares é necessário que haja a presença dos genes *MAL* no genoma da levedura. Em *S. cerevisiae* existem cinco loci *MAL*, sendo que cada locus encontra-se em um cromossomo diferente. Esses loci podem conter três genes que codificam, cada qual, um proteína específica: o gene *MALx1* (onde x representa o locus) codifica o transportador de maltose; o gene *MALx2* codifica a maltase; e o gene *MALx3* codifica uma proteína reguladora que, na presença de maltose, induz a expressão dos genes *MAL* (Figura 1.3). Esta proteína se liga ao DNA na região promotora entre os genes *MALx1* e *MALx2* (na chamada sequencia UAS_{MAL}), induzindo a transcrição dos outros genes *MAL* (CHANG et al., 1988; GOLDENTHAL et al., 1987; LEVINE et al., 1992; SIRENKO et al., 1995).

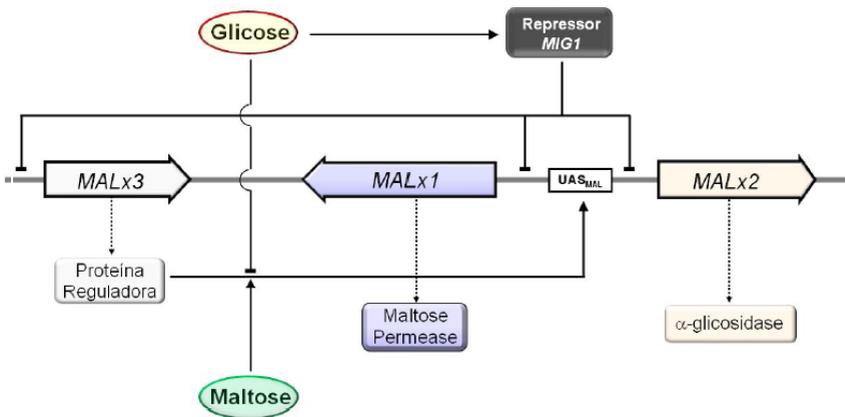


Figura 1.3 - Representação de um locus *MAL*. As setas maiores (coloridas) indicam a posição de cada gene *MAL* no cromossomo. As linhas pontilhadas indicam as proteínas codificadas por cada gene; as linhas

contínuas com setas, indução; e as linhas contínuas com pontas rombas, repressão. Fonte: Alves Jr. (2010).

A presença de glicose, por outro lado, pode reprimir a expressão desses genes através de duas maneiras: inibindo a ativação da proteína reguladora Malx3p pela maltose, e ativando o repressor Mig1p, que impede a transcrição dos três genes *MAL* ao se ligar à região promotora de cada um deles (KIM e MICHELS, 1988; WANG e NEEDLEMAN, 1996).

Ao analisarem alelos naturais do transportador de maltose, Han et al. (1995) descobriram um gene que passou a ser chamado *AGT1*, o qual codifica

uma permease responsável pelo transporte ativo de uma série de α -glicosídeos, incluindo sacarose, trealose, maltose e maltotriose. Essa permease é um transportador com alta afinidade (K_m 7-9 mM) para sacarose e trealose, mas transporta maltose e maltotriose com baixa afinidade (K_m >20 mM) quando comparada aos transportadores Malx1p, que possuem alta afinidade (K_m 2-5 mM) pela maltose (STAMBUK e DE ARAÚJO, 2001; STAMBUK et al., 2000; VAN DER REST et al., 1995; WEUSTHUIS et al., 1993). Segundo Alves e colaboradores (2008), o Agt1p é o único transportador de maltotriose em *S. cerevisiae*, e o mesmo é necessário para promover eficiente fermentação desse açúcar (ALVES-JR et al., 2008). Embora seja um transportador com especificidade distinta quando comparado aos transportadores de maltose codificados pelos genes *MALx1* (específicos para maltose e turanose), a permease Agt1p é aparentemente regulada pelos mesmos mecanismos de regulação gênica dos outros genes *MAL*, pois possui uma sequência UAS_{MAL} na sua região promotora (Figura 1.4) (HAN et al., 1995).



Figura 1.4 - Representação de um locus *MAL* contendo o gene *AGT1*. É importante salientar que o gene regulador é mutante e não funcional (*mal13*). Fonte: Alves Jr. (2010).

A fermentação de sacarose pelo mecanismo de hidrólise extracelular (gerando glicose e frutose) rende 4 mol de ATP por molécula de açúcar. Quando a sacarose é internalizada pelo transporte ativo e metabolizada intracelularmente, o próton que é transportado junto com a sacarose (STAMBUK et al., 2000) é expelido da célula pela proteína de membrana H^+ -ATPase

(codificada pelo gene *PMA1*) para manter a força motriz através da membrana e prevenir a acidificação intracelular. Para cada H^+ transportado para fora da célula pela H^+ -ATPase é utilizado uma molécula de ATP (WEUSTHUIS et al., 1993), reduzindo assim o rendimento energético total da fermentação de sacarose em 25% (3 mol de ATP por molécula de açúcar, em vez dos 4 mol de ATP). Como consequência, as células que possuem transporte ativo e hidrólise intracelular do dissacarídeo irão produzir 25% menos biomassa, e 8% mais etanol, quando comparado com a fermentação dos monossacarídeos (WEUSTHUIS et al., 1993).

Recentemente, o nosso grupo de pesquisa construiu uma linhagem de laboratório haplóide, geneticamente modificada (substituindo os primeiros 60 nucleotídeos que codificam para o peptídeo sinal responsável pela secreção da invertase), visando a utilização da sacarose somente pela via intracelular. Essa linhagem apresentou um aumento de 4 % no rendimento de etanol durante a fermentação anaeróbia em quimiostatos (BASSO et al.,

2011). Após seleção nesse meio por várias gerações, as células evoluídas apresentavam um aumento de 10 vezes na atividade de simporte H⁺-sacarose, resultando em um aumento de 11 % no rendimento de etanol a partir de sacarose. Uma análise transcricional apresentou aumento na expressão de genes relacionados com o metabolismo de maltose, incluindo o gene *AGTI*, que se encontrava amplificado nas leveduras evoluídas (BASSO et al., 2011).

No intuito de tentar melhorar a produção de álcool combustível no Brasil, nosso grupo de pesquisa inicialmente verificou se a permease *AGTI* é funcional nas leveduras industriais selecionadas para a produção de etanol a partir da sacarose (Basso *et al.*, 2008). As leveduras industriais CAT-1 e PE-2 são utilizadas na produção de álcool combustível e, juntas, são responsáveis por 60 % da produção anual de álcool combustível no Brasil (ANDRIETTA et al., 2007; BASSO *et al.*, 2008). Foi verificado que as linhagens industriais CAT-1 e PE-2 possuem o gene *AGTI* no cromossoma VII, embora aparentemente nestas linhagens este cromossoma também possua o gene *MAL11* (DUVAL et al., 2010). Apesar dessas linhagens possuírem o gene *AGTI*, este não é funcional uma vez que as mesmas não fermentam eficientemente a maltotriose (DUVAL *et al.*, 2010), característica que requer o transportador codificado pelo gene *AGTI* (ALVES-JR *et al.*, 2008).

A funcionalidade do gene *AGTI* nas linhagens industriais produtoras de etanol combustível é de extrema importância para que possamos modificar o mecanismo de captação de sacarose nessas linhagens. Dessa forma, o presente trabalho visa entender as modificações estruturais encontradas no cromossomo VII, onde está localizado o locus do gene *AGTI* nas linhagens industriais produtoras de etanol combustível CAT-1 e

PE-2, e identificar as bases moleculares que determinam a aparente não-funcionalidade desta permease.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O presente trabalho tem como objetivo geral estudar e avaliar a funcionalidade do gene *AGTI* das leveduras industriais CAT-1 e PE-2, a fim de identificar se a não-funcionalidade desse gene nessas leveduras é oriunda de alterações na sua sequência de aminoácidos, ou alterações na sua região promotora.

2.2 Objetivos específicos

- Isolar o gene *AGTI* das linhagens industriais CAT-1 e PE-2 por PCR;
- Clonar os genes *AGTI-cat* (da linhagem CAT-1) e *AGTI-pe* (da linhagem PE-2) em vetor de expressão;
- Transformar a levedura de laboratório LCM003 com os vetores de expressão;
- Avaliar a funcionalidades das regiões codificadoras clonadas;
- Analisar a região promotora do gene *AGTI* das linhagens industriais CAT-1 e PE-2.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Iniciadores, plasmídeos e microrganismos utilizados.

Os iniciadores, plasmídeos e microrganismos utilizados nesse trabalho estão descritos, respectivamente, nas Tabelas 3.1 a 3.3 abaixo.

Tabela 3.1. – Primers utilizados

Iniciador	Sequência ^a (5' → 3')
AGT1promF	AGTACGCATCAACGGAGTGT
AGT1promR	CTCTTATCATGGCGAAGTCA
BamAGT1F	GAGGATCC ATCCATGAAAAATATCATTTCAT
BamAGT1R	CG GGATCCT CATTAACATTTATCAGCTGCAT
E51G-L55H-R	AAAGGCACTATCCTTTTTCCCTTCTTC

^aOs nucleotídeos em negrito denotam o sítio de restrição para *Bam*HI, e as sequencias sublinhadas correspondem ao início e final do gene *AGT1*.

Tabela 3.2 – Plasmídeos utilizados

Plasmídeo	Genótipo	Fonte
pGRSd	<i>CEN6 amp^r URA3 PGPD-TPGK</i>	JULES et al. (2004)
pGRSd-AGT1C	<i>CEN6 amp^r URA3 PGPD-AGT1C-TPGK</i>	Este trab.
pGRSd-AGT1P	<i>CEN6 amp^r URA3 PGPD-AGT1P-TPGK</i>	Este trab.
pCR2.1-TOPO	<i>amp^r kan^r ori P_{LAC}-msc-LacZα</i>	Invitrogen

Tabela 3.3 - Características dos micro-organismos utilizados.

Cepa	Genótipo ou descrição	Referência
<i>Escherichia</i>	F- mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ 80lacZ Δ M15 Δ lacX74 recA1 deoR	Invitrogen
<i>coli TOP 10</i>	araD139 Δ (ara λ eu)7697 galU galK rpsL (StrR) ENDa1 nupG .	
<i>Saccharomyces.</i>		
<i>cerevisiae</i>		
LCM003	MATa mal13 agt1 Δ ::kan ^r MAL12 MAL2-8 ^c SUC2 ura3-52 his3 Δ 1 leu2-3,112 trp1-289	ALVES- JR et al. (2008).
CAT-1	Linhagem Industrial isolada na Usina VO Catanduva, São Paulo/SP, em 1998/1999	BASSO et al. (2008)
PE-2	Linhagem Industrial isolada na Usina da Pedra, São Paulo/SP, em 1993/1994	BASSO et al. (2008)

3.2 Meios de cultura e condições de crescimento

Para o cultivo da cepa de *E. coli TOP10* foi utilizado o meio LB (Luria-Bertani) contendo 10 g/L de triptona, 5 g/L de extrato de levedura e 5 g/L de NaCl, sendo adicionado 15 g/L de bacto-agar e/ou 200 µg/mL de ampicilina quando necessário.

Para a manutenção das leveduras foi utilizado meio rico (YP) composto de 10 g/L de extrato de levedura e 20 g/L de peptona. A este meio foram adicionados 20 g/L dos açúcares glicose, maltose ou maltotriose. Quando necessário foi adicionado 3 mg/L de antimicina A (um inibidor da cadeia respiratória que permite a seleção de leveduras com somente crescimento fermentativo). Alternativamente, foi utilizado um meio sintético contendo 6,7 g/L base nitrogenada para leveduras e acrescido de 1,92 g/L de suplementos nutricionais para leveduras sem uracila (ambos da Sigma), contendo 20 g/L dos açúcares glicose, maltose ou maltotriose. Para a preparação de meios sólidos foram adicionados 20 g/L de bacto-agar. Todos os meios para leveduras tiveram seu pH ajustado para 5,0 com ácido clorídrico.

Para analisar o crescimento das leveduras, as células foram pré-crescidas por 48 h em meio YP contendo 20 g/L maltose, e a seguir foi transferido 1% do volume de meio de células para frascos Erlenmeyer e incubados com agitação (160 rpm) a 28°C. Foram retiradas amostras em intervalos de tempo pré-determinados e acompanhado o crescimento celular por medida da densidade ótica num comprimento de onda de 570 nm. Também foram determinadas a produção de etanol e o consumo dos açúcares no meio de cultura, obtido após centrifugação das células a 5000 rpm por 5 min.

3.3 Métodos de biologia molecular

Fragmentos de DNA foram analisados quanto a sua qualidade e concentração através de eletroforese em tampão TBE (50 mM Tris, 500 mM de ácido bórico e 25 mM de EDTA) utilizando gel de agarose a 1% corado com brometo de etídio (0,5 µg/mL) e visualizado sob luz ultravioleta. Para purificação de plasmídeos, uma colônia da bactéria contendo o plasmídeo desejado foi inoculada em meio LB líquido contendo ampicilina, incubada “overnight” a 37°C e 160 rpm. A cultura foi centrifugada (5000 g por 3 min), ressuspensa em 100 µL de solução GTE contendo 50 mM glicose, 25 mM Tris-HCl pH 8,0, 10 mM EDTA e 1 µL de RNase A (1 mg/mL), e mantida em temperatura ambiente por 5 minutos. A seguir, foram adicionados 200 µL de uma solução 0,2 M NaOH/ 1% SDS e 150 µL de acetato de potássio 5 M. Após incubação a 0°C, essa mistura foi centrifugada (10.000 g por 5 min) e o sobrenadante foi transferido para um novo tubo estéril, no qual foi acrescentado 800 µL de álcool 95%. O DNA foi precipitado por centrifugação (12.000 g por 10 minutos), lavado com álcool 70%, e ressuspensa em tampão TE (10 mM Tris-HCl e 1 mM EDTA pH 8,0). Os plasmídeos foram armazenados sob refrigeração a -20°C.

3.4 Construção do vetor de expressão do gene *AGT1*

O gene *AGT1* foi amplificado do genoma das linhagens industriais CAT-1 e PE-2 utilizando os iniciadores BamAGT1F e BamAGT1R (Tabela 3.3). Após a amplificação, os produtos de PCR obtidos foram clonados no plasmídeo pCR2.1-TOPO (Invitrogen) e utilizados para transformar a linhagem de *E. coli* TOP10. As bactérias transformadas foram selecionadas em meio LB agar contendo 200 µg/mL de ampicilina.

O DNA obtido dos clones transformados foi então analisado por digestão enzimática utilizando a enzima de restrição *Bam*HI. A recuperação dos fragmentos correspondentes as ORFs dos genes *AGT1* foi realizada utilizando o Kit *GFX PCR DNA and Gel Band Purification* (Amersham Biosciences, GE Healthcare) de acordo com as instruções do fabricante. Os fragmentos purificados foram então subclonados no vetor de expressão pGRSd (JULES *et al.* 2004) previamente digerido com *Bam*HI, utilizando a enzima T4 DNA ligase (Invitrogen). Após a reação de ligação o sistema foi utilizado para transformar a linhagem de *E.coli* TOP10. Os clones transformantes foram novamente selecionados em meio LB agar contendo ampicilina.

3.5 Transformação da linhagem LCM003 com o vetor de expressão contendo o gene *AGT1*

Confirmada a correta construção do vetor de expressão pGRSd contendo os genes *AGT1-cat* e *AGT1-pe*, foi realizada a transformação da linhagem LCM003 (Tabela 3.3) utilizando o método descrito por GIETZ *et al.* (2006). A seleção dos clones transformantes foi realizada em meio YP suplementado com 20 g/L de maltotriose e 3 mg/L de antimicina A. As culturas foram incubadas a 28°C e mantidas até 7 dias na estufa.

3.6 Transporte de *p*-nitrofenil- α -D-glicopiranosídeo (*p*NP α G)

A atividade da permease *Agt1p* foi avaliada colorimetricamente, utilizando-se o substrato sintético *p*-nitrofenil- α -D-glicopiranosídeo (*p*NP α G) como descrito por HOLLATZ *et al.* (2001). Depois de crescidas em meio mínimo com maltose, as células de leveduras foram centrifugadas, lavadas com água e ressuspensas de modo a atingirem a concentração celular de 20 g/L. Um volume de 100 μ L dessa

suspensão foi adicionado a 100 μ L do substrato de transporte (100 mM Tris-succinato pH 5,0; contendo 10 mM de *p*NP α G) e incubado à temperatura ambiente por 5-10 minutos. A reação foi interrompida pela adição de 1 mL de bicarbonato de sódio 2 M (pH >9,0). A seguir as células foram centrifugadas (12.000 g por 3 minutos) e o *p*-nitrofenol liberado no sobrenadante estimado por espectrofotometria a 400 nm. Todas as determinações foram realizadas em triplicata e os controles negativos, com células previamente fervidas, em duplicata. As atividades de transporte foram expressas em nmoles de *p*-nitrofenol liberado por mg de células (peso seco) por min.

3.7 Determinação de glicose, maltose, maltotriose e etanol

Ao longo do crescimento celular amostras foram retiradas para a determinação do consumo de açúcares e da produção de etanol. A glicose foi determinada através de um kit enzimático comercial de acordo com as instruções do fabricante (BioDiagnostica-Laborclin). Para essa análise, 10 μ L de cada amostra reagem com 1 mL do reagente de cor desse kit (composto pelas enzimas glicose oxidase e peroxidase) através de incubação de 10 min a 37°C. Em seguida, a quinonimina (produto de cor avermelhada) produzida na reação foi estimada a 505 nm, permitindo a determinação da concentração de glicose em cada amostra através da correlação com a absorbância apresentada pela solução padrão (1 g/L).

As concentrações de maltose e maltotriose foram determinadas colorimetricamente através da reação com metilamina, em pH alcalino, segundo protocolo adaptado de CÁCERES *et al.* (2000). Inicialmente, 600 μ L de amostra diluída foram adicionados a 600 μ L da solução reagente (NaOH 0,5 M, Metilamina 0,5%). Em seguida, essa mistura foi incubada por 5 min a 100°C. Por

fim, o composto corado gerado pela reação foi estimado a 540 nm e as concentrações de maltose ou maltotriose foram determinadas correlacionando-se a absorbância de cada amostra com a equação de reta extraída de uma curva padrão construída a partir de uma solução 2% do açúcar correspondente (maltose ou maltotriose, conforme o caso).

O etanol produzido foi quantificado enzimaticamente através da reação com a álcool oxidase (AOD, de *Pichia pastoris*, Sigma) e peroxidase (POD, de raiz-forte, Toyobo) seguindo metodologias adaptadas dos protocolos descritos por SALGADO *et al.* (2000). Para essa determinação, 10 uL de amostra foram incubados em placas de 96 poços (de fundo plano) com 200 uL do reagente enzimático (0,5 U de 43 AOD/mL, 4 U/mL de POD, 14 mM de 4-aminoantipirina e 60 mM de fenol em tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,5) por 1 h a 37°C. Após incubação, a absorbância foi medida a 415 nm em um leitor de placas (Tecan GENios microplate reader) e a concentração de etanol foi determinada pela correlação do valor de absorbância apresentada para cada amostra com a equação de reta extraída de uma curva padrão construída com soluções padrão de etanol (1-10 g/L).

3.8 Sequenciamento da região promotora do gene *AGT1*

Para o sequenciamento da região promotora presente nas cepas CAT-1 e PE-2, foi necessário, primeiramente, extrair o DNA genômico das mesmas segundo protocolo padrão descrito na literatura (AUSUBEL *et al.*, 1992). Em seguida, o DNA de cada linhagem foi amplificado por PCR com os primers E51G-L55H-R e AGT1promR. Esses produtos de PCR foram então purificados (kit Wizard – Promega) e encaminhados para sequenciamento (Centro de estudos do genoma humano, USP – São Paulo) com o primer AGT1promF.

As sequências da região promotora das leveduras CAT-1 e PE-2 foram alinhadas com os promotores do gene *AGT1* das linhagens A60 (GenBank: EU864229.1), A15 (GenBank: EU864227.1), RM11-1a (www.broad.mit.edu) e S288C (www.yeastgenome.org/) utilizando o programa Clustalw (www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/) ou BLASTN (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast). Alternativamente, foi utilizado o contig2 do genoma sequenciado da CAT-1 (Babrzadeh et al., 2012).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Funcionalidade do gene *AGTI* das linhagens CAT-1 e PE-2

As leveduras industriais CAT-1 e PE-2 são utilizadas na produção de álcool combustível, mas estas leveduras aparentemente não possuem o gene *AGTI* funcional por que não fermentam a maltotriose (Alves-Jr et al., 2008; Duval et al., 2010), embora foi descrita a presença do gene *AGTI* no cromossomo VII destas linhagens (Duval et al., 2010; Babrzadeh et al., 2012). Alves-Jr (2010) sequenciou a região codificante (ORF) do *AGTI* das linhagens CAT-1 e PE2 no intuito de investigar se haveria alguma mutação (ou polimorfismo) no alelo *AGTI* presente nessas linhagens que pudesse provocar a perda de funcionalidade da permease codificada, como já descrito na literatura (VIDGREN et al., 2005). Curiosamente, verificou-se que todas as mutações observadas na permease Agt1p presente nas cepas CAT-1 e PE-2 (Tabela 4.1) já foram encontradas em diversas permeases Agt1p sequenciadas de outras linhagens industriais e que codificam uma proteína com 616 aminoácidos (SMIT et al., 2007; VIDGREN et al., 2005). Os polimorfismos na sequência de aminoácidos da CAT-1 e PE-2 é praticamente idêntica à encontrada no *AGTI* da linhagem industrial A60 (embora a proteína desta linhagem possua outros polimorfismos não mostrados na Tabela 4.1), com exceção da região C-terminal onde duas modificações encontradas são idênticas às descritas no gene *AGTI* da linhagem WH310. Este resultado sugere, em princípio, que o *AGTI* das linhagens CAT-1 e PE-2 poderiam codificar uma proteína funcional. Por outro lado, vale ressaltar que, apesar das mutações já terem sido encontradas em alelos que codificam permeases funcionais, o sequenciamento por si só não permite descartar a hipótese de perda de funcionalidade desse transportador em virtude da combinação das mutações presentes.

Tabela 4.1 Polimorfismos na sequência de aminoácidos do gene *AGT1* em diferentes linhagens de levedura, comparado com a linhagem S288C.

Posição	S288C	CAT-1	PE-2	A60	A15	WH310	WH314
40	D	N	N	N	N	N	N
78	M	T	T	T		T	T
102	K	I	I	I		I	I
128	S	N	N	N	N	N	N
164	L	Q	Q	Q	Q	Q	Q
175	T	P	P	P	T	P	P
215	I	V	V	V	V	V	V
219	I	M	M	M	M	M	M
226	S	G	G	G	G	G	G
228	A	T	T	T	T	T	T
333	V	I	I	I		I	I
359	N	D	D	D	D	D	D
375	T	A	A		A		
381	S	T	T	T	T		
385	V	C	C	C	C	C	C
395	E				Stop		
409	L	V	V	V	V	V	V
448	I	V	V	V	V		
459	S	G	G	G		G	G
488	A	T	T	T		T	T
509	L	I	I			I	I
556	T	S	S			S	

Devido à importância do transporte ativo de sacarose na fermentação alcoólica, resolvemos estudar se as combinações de mutações encontradas no gene *AGT1* de cada linhagem industrial tornam a proteína não-funcional. Para tal, inserimos a ORF do gene *AGT1* da CAT-1 e PE2 no plasmídeo de expressão pGRSd (Figura 4.1). Após a recuperação dos plasmídeos recombinantes, para confirmar a construção correta dos plasmídeos, foi realizada digestão do DNA com a enzima de restrição *Bam*HI, que liberou um fragmento de aproximadamente 1,8 Kb correspondente ao gene *AGT1* (Figura 4.1). Os novos plasmídeos foram nomeados de pGRSd-AGT1C (*AGT1* da linhagem CAT-1) e pGRSd-AGT1P (*AGT1* da PE-2). A seguir estes plasmídeos foram introduzidos na levedura de laboratório LCM003 (*agt1* Δ), que não possui o gene *AGT1* (vide Tabela 3.3).

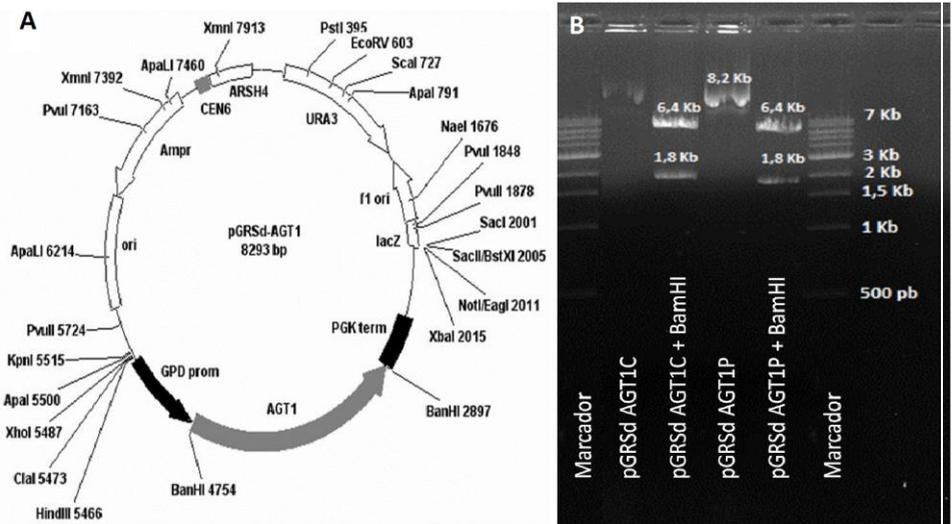


Figura 4.1. A – Estrutura do plasmídeo pGRSd-AGT1. B – Gel de agarose mostrando os produtos da digestão com a enzima *Bam*HI.

Os clones transformantes foram selecionados de duas formas: primeiramente foram inoculados em placas com meio mínimo sem uracila, pois o plasmídeo pGRSd contém o gene *URA3* (Figura 4.1) como marcador da transformação. Após, os clones *URA+* (Figura 4.2) foram inoculados em placas contendo maltotriose mais antimicina A, pois somente os transformantes que estavam sobre-expressando o gene *AGT1* seriam capazes de crescer neste meio. Este foi o primeiro indício de que as OFRs do gene *AGT1* das linhagens CAT-1 e PE-2 codificavam para proteínas funcionais. Foram selecionados os clones LCM003C (com o plasmídeo contendo o gene *AGT1* da CAT-1) e LCM003P (com o gene *AGT1* da PE2) para a continuação dos experimentos.

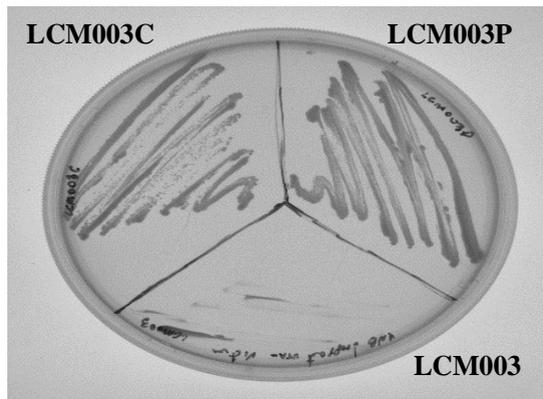


Figura 4.2 - Crescimento no meio de cultura sem uracila. Na placa foram inoculadas as cepas LCM003, LCM003C e LCM003P.

A fim de avaliar se as células transformadas apresentavam a permease *Agt1p* funcional, realizamos o ensaio de transporte de *pNP α G*, substrato sintético

transportado com alta afinidade pela permease *AGT1* (Hollatz & Stambuk, 2000). Enquanto que a linhagem LCM003 (*agt1* Δ) não é capaz de transportar de *pNP α G*, com os clones transformantes LCM003C e LCM003P foi obtida uma atividade de transporte de 0,54 nmol mg⁻¹ min⁻¹ e 1,44 nmol mg⁻¹ min⁻¹, respectivamente. Para aprofundar a análise sobre a permease em questão, foi realizada uma cinética de crescimento com maltotriose como substrato, uma vez que a levedura LCM003 não é capaz de transportar este açúcar (Alves-Jr et al., 2008). A sacarose não foi utilizada como substrato, pois a LCM003 possui o gene *SUC2* normal no seu genoma, o que levaria a completa hidrólise da sacarose extracelularmente, antes dela ser transportada.

O crescimento, consumo e fermentação de maltotriose pelas leveduras transformadas com o pGRSd-AGT1C e pGRSd-AGT1P podem ser visualizados na Figura 4.3. As transformantes apresentaram uma produção de biomassa semelhante, enquanto que a parental LCM003 não foi capaz de crescer neste meio. A maltotriose foi completamente consumida após 12 horas de crescimento pelas leveduras transformantes, que produziram cerca de 6,5 g/L de etanol (Figura 4.3). Como esperado, a cepa parental LCM003 não foi capaz de consumir a maltotriose mesmo após 36 horas de crescimento. Esses dados comprovam que a ORF do gene *AGT1*, das leveduras CAT-1 e PE2, é capaz de gerar transcritos funcionais, e que a combinação de mutações não altera a atividade da mesma. Portanto, a seguir analisamos se a possível causa do problema encontra-se na região promotora deste gene.

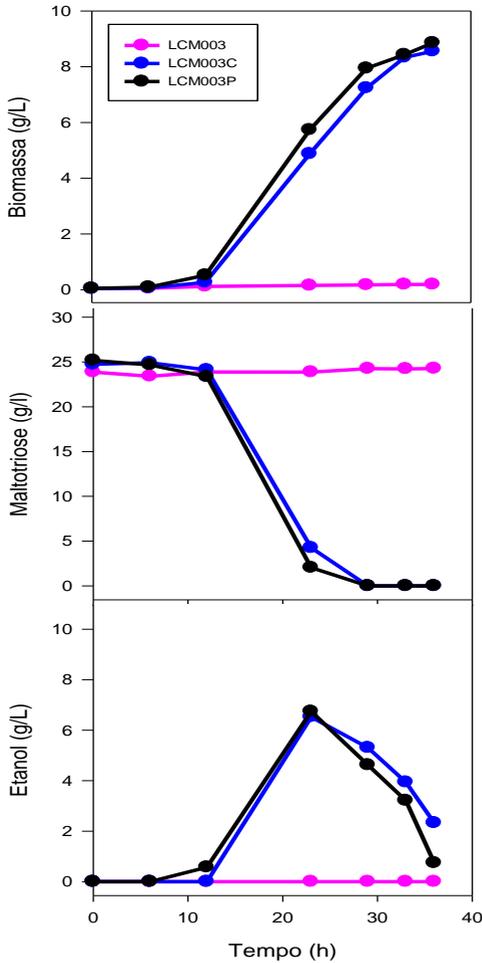


Figura 4.3. Curva de crescimento (painel superior), consumo (painel do meio) e fermentação (painel inferior) de 2% de maltotriose pelas linhagens LCM003, e esta mesma linhagem transformada com os plasmídeos pGRSd-AGT1C (LCM003C) e pGRSd-AGT1P (LCM003P).

4.2 Análise da região promotora do gene *AGTI* das linhagens CAT-1 e PE-2

Quando Han e colaboradores (1995) descreveram o gene *AGTI*, foi mostrado que este gene faz parte de um locus *mal1g* parcialmente funcional (um locus com apenas o transportador e maltase funcionais), sendo que entre os genes *AGTI* e *MAL12* (maltase) existe uma região UAS_{MAL} a aproximadamente 415 nucleotídeos do começo do gene *AGTI* (vide Figura 1.4), numa estrutura comum à região promotora de vários outros genes *MAL* (p.ex. *MAL31* e *MAL32*, ou *MAL61* e *MAL62*) presentes em leveduras, incluindo o locus *mal3g* da linhagem de laboratório S288C, que também possui o locus *mal1g* contendo o gene *AGTI* (HONG & MARMUR, 1987; FEUERMANN et al., 1995; VOLCKAERT et al., 1997). Entretanto, quando Alves-Jr (2010) tentou amplificar a região promotora das linhagens CAT-1 e PE-2 utilizando primers que anelavam na sequência UAS_{MAL} do locus *mal1g* (HAN et al., 1995), não foi possível obter qualquer fragmento de DNA, indicando que a região promotora do gene *AGTI* nestas linhagens industriais era provavelmente diferente à existente nas linhagens de laboratório.

De fato, recentemente Vidgren e colaboradores (2011) mostraram que a região promotora do gene *AGTI* presente em várias leveduras *Saccharomyces*, incluindo a linhagem RM11-1a e as leveduras industriais A15 e A60, era diferente de aquela encontrada normalmente nas leveduras de laboratório, e enquanto que o promotor presente na linhagem A60 é induzido por maltose, o promotor presente no gene *AGTI* da linhagem A15 não é induzível por maltose (VIDGREN et al., 2011). Cabe salientar que o gene *AGTI* da linhagem A15 é truncado e não funcional por possuir uma mutação que introduz um códon de parada de leitura no lugar do aminoácido 395 do *AGTI* normal (vide Tabela 4.1 acima). O gene *AGTI*

da linhagem RM11-1a é também truncado e não funcional (DUVAL et al., 2010), mas o da linhagem A60 codifica uma permease funcional (vide Tabela 4.1).

Os primeiros 314 nucleotídeos nestes promotores são idênticos aos encontrados nos genes *AGT1* de linhagens de laboratório, mas a partir desse ponto a sequência de nucleotídeos difere significativamente. Alves-Jr (2010) mostrou que utilizando os primers AGT1promF e AGT1promR (Tabela 3.1 acima), desenhados com base na sequência do promotor da linhagem A15, era possível obter um fragmento de DNA de aproximadamente 1.300 nucleotídeos a partir do DNA das linhagens CAT-1 e PE-2, indicando uma possível semelhança entre estas regiões promotoras do *AGT1* presente em linhagens industriais (ALVES-JR, 2010). Para podermos analisar as modificações existentes na região promotora do gene *AGT1* nas leveduras industriais, foi amplificado a região promotora das cepas CAT-1 e PE-2 com os primers E51G-L55H-R e AGT1promR (Tabela 3.1), obtendo-se fragmentos de aproximadamente 1.730 nucleotídeos para ambas as linhagens. Após realizado o sequenciamento destes fragmentos, a Figura 4.4 mostra o alinhamento das sequências obtidas da região promotora da CAT-1 e PE2 com a região promotora do gene *AGT1* das cepas A15, A60, RM11-1a e S288C. Os dados desse alinhamento nos permitiu verificar que a região do nucleotídeo -1 ao -314 (contado a partir do códon de iniciação do gene *AGT1*) da levedura S288C apresenta alta homologia com as demais sequências analisadas, mas após o nucleotídeo -314, essa homologia cai drasticamente. A partir deste ponto as regiões promotoras da CAT-1 e PE-2 passam a ser muito semelhantes a aquelas encontradas nas linhagens A15, A60 e RM11-1a, sendo que a maior identidade de sequência (>99%) ocorre com a região promotora da linhagem RM11-1a e A15, e é menor com o promotor da linhagem A60 por esta possuir mais uma região de ligação ao ativador *MALx3* localizado numa região exclusiva

deste promotor, que se inicia a aproximadamente -730 nucleotídeos do gene *AGT1* (Figura 4.4).

```

S288C      ATTATACATATTTTTTAGTTGGTTTGATCTTCTCTATGTAGCATCAGAAAGAAACACCAA   CCCGAAAATTCCTCAAACAATCAATACCAAACCGCTTTATATAAAAAATTAAGATGTGGA
A60        ATTATAATATTTTTTAGTTGGTTTGATGTTCTCTATGTAGCATCAGAAAGAAACACCAA   CCCGAAAATTCCTCAAACAATCAATACCAAACCGCTTTATATAAAAAATTAAGATGTGGA
A15        ATTATAATATTTTTTAGTTGGTTTGATGTTCTCTATGTAGCATCAGAAAGAAACACCAA   CCCGAAAATTCCTCAAACAATCAATACCAAACCGCTTTATATAAAAAATTAAGATGTGGA
AGT1_promP ATTATAATATTTTTTAGTTGGTTTGATGTTCTCTATGTAGCATCAGAAAGAAACACCAA   CCCGAAAATTCCTCAAACAATCAATACCAAACCGCTTTATATAAAAAATTAAGATGTGGA
AGT1_promC ATTATAATATTTTTTAGTTGGTTTGATGTTCTCTATGTAGCATCAGAAAGAAACACCAA   CCCGAAAATTCCTCAAACAATCAATACCAAACCGCTTTATATAAAAAATTAAGATGTGGA
RM11-1a    ATTATAATATTTTTTAGTTGGTTTGATGTTCTCTATGTAGCATCAGAAAGAAACACCAA   CCCGAAAATTCCTCAAACAATCAATACCAAACCGCTTTATATAAAAAATTAAGATGTGGA
*****

S288C      CATTCCCTATTTTTTACTGAGTTCGTTAAAAGTGGGTACACTCTTGATTACTGTAATTTG   CTCTGTATGTCCTTCAAGCCC-GTACGTTGTCAATTTCTAGTAGCGCATCAAGCGAGTGT
A60        CATTCCCTATTTTTTACTGAGTTCGTTAAAAGTGGGTACACTCTTGATTACTGTAATTTG   CTCTGTATGTCCTTCAAGCCCAGCGTACGTTGTCAATTTCTAGTAGCGCATCAAGCGAGTGT
A15        CATTCCCTATTTTTTACTGAGTTCGTTAAAAGTGGGTACACTCTTGATTACTGTAATTTG   CTCTGTATGTCCTTCAAGCCCAGCGTACGTTGTCAATTTCTAGTAGCGCATCAAGCGAGTGT
AGT1_promP CATTCCCTATTTTTTACTGAGTTCGTTAAAAGTGGGTACACTCTTGATTACTGTAATTTG   CTCTGTATGTCCTTCAAGCCCAGCGTACGTTGTCAATTTCTAGTAGCGCATCAAGCGAGTGT
AGT1_promC CATTCCCTATTTTTTACTGAGTTCGTTAAAAGTGGGTACACTCTTGATTACTGTAATTTG   CTCTGTATGTCCTTCAAGCCCAGCGTACGTTGTCAATTTCTAGTAGCGCATCAAGCGAGTGT
RM11-1a    CATTCCCTATTTTTTACTGAGTTCGTTAAAAGTGGGTACACTCTTGATTACTGTAATTTG   CTCTGTATGTCCTTCAAGCCCAGCGTACGTTGTCAATTTCTAGTAGCGCATCAAGCGAGTGT
*****
*****

S288C      ACATGATAGATAGACCAGTAGAATCTAATGGCTATGGGGTAATAAAACCTTAAAGCTC   CTTTCGCTGCCATA-----
A60        ACATGATAGATAGACCAGTAGAATCTA-TGGCTATGGGGTAATAAAACCTTAAAGCTC   CTTTCGCTGCCATAGTTCGTGATATTCCTGGAGGACCAAACCCAAAGGCAAAATATTTA
A15        ACATGATAGATAGACCAGTAGAATCTA-TGGCTATGGGGTAATAAAACCTTAAAGCTC   CTTTCGCTGCCATAGTTCGTGATATTCCTGGAGGACCAAACCCAAAGGCAAAATATTTA
AGT1_promP ACATGATAGATAGACCAGTAGAATCTA-TGGCTATGGGGTAATAAAACCTTAAAGCTC   CTTTCGCTGCCATAGTTCGTGATATTCCTGGAGGACCAAACCCAAAGGCAAAATATTTA
AGT1_promC ACATGATAGATAGACCAGTAGAATCTA-TGGCTATGGGGTAATAAAACCTTAAAGCTC   CTTTCGCTGCCATAGTTCGTGATATTCCTGGAGGACCAAACCCAAAGGCAAAATATTTA
RM11-1a    ACATGATAGATAGACCAGTAGAATCTA-TGGCTATGGGGTAATAAAACCTTAAAGCTC   CTTTCGCTGCCATAGTTCGTGATATTCCTGGAGGACCAAACCCAAAGGCAAAATATTTA
*****
*****

S288C      GGCAARAGGAAAAAACCTTGTTCCTCGCGCGAAAAAGTACACAAAAATAGAAGCGGAACAA   AAGAAAACGTTTAAACCAAGCACGATAAATTGAGAAGGTAAGCCAAAGCCGTTCAATGGCATG
A60        GGCAARAGGAAAAAACCTTGTTCCTCGCGCGAAAAAGTACACAAAAATAGAAGCGGAACAA   AAGAAAACGTTTAAACCAAGCACGATAAATTGAGAAGGTAAGCCAAAGCCGTTCAATGGCATG
A15        GGCAARAGGAAAAAACCTTGTTCCTCGCGCGAAAAAGTACACAAAAATAGAAGCGGAACAA   AAGAAAACGTTTAAACCAAGCACGATAAATTGAGAAGGTAAGCCAAAGCCGTTCAATGGCATG
AGT1_promP GGCAARAGGAAAAAACCTTGTTCCTCGCGCGAAAAAGTACACAAAAATAGAAGCGGAACAA   AAGAAAACGTTTAAACCAAGCACGATAAATTGAGAAGGTAAGCCAAAGCCGTTCAATGGCATG
AGT1_promC GGCAARAGGAAAAAACCTTGTTCCTCGCGCGAAAAAGTACACAAAAATAGAAGCGGAACAA   AAGAAAACGTTTAAACCAAGCACGATAAATTGAGAAGGTAAGCCAAAGCCGTTCAATGGCATG
RM11-1a    GGCAARAGGAAAAAACCTTGTTCCTCGCGCGAAAAAGTACACAAAAATAGAAGCGGAACAA   AAGAAAACGTTTAAACCAAGCACGATAAATTGAGAAGGTAAGCCAAAGCCGTTCAATGGCATG

S288C      TACCGGAAATATCACTTTTTTCATGGTAAATTCACCAATATAGACACAGATTGCTAG----   -----CATAAATGACCATAAATATATCTCATAATAGGTAACCGCGATT
A60        TACCGGAAATATCACTTTTTTCATGGTAAATTCACCAATATAGACACAGATTGCTAG----   ATATGACCATAAATATCTCATAAATGACCATAAATATATCTCATAATAGGTAACCGCGATT
A15        TACCGGAAATATCACTTTTTTCATGGTAAATTCACCAATATAGACACAGATTGCTAGCATA   ATATGACCATAAATATCTCATAAATGACCATAAATATATCTCATAATAGGTAACCGCGATT
AGT1_promP TACCGGAAATATCACTTTTTTCATGGTAAATTCACCAATATAGACACAGATTGCTAGCATA   ATATGACCATAAATATCTCATAAATGACCATAAATATATCTCATAATAGGTAACCGCGATT
AGT1_promC TACCGGAAATATCACTTTTTTCATGGTAAATTCACCAATATAGACACAGATTGCTAGCATA   ATATGACCATAAATATCTCATAAATGACCATAAATATATCTCATAATAGGTAACCGCGATT
RM11-1a    TACCGGAAATATCACTTTTTTCATGGTAAATTCACCAATATAGACACAGATTGCTAGCATA   ATATGACCATAAATATCTCATAAATGACCATAAATATATCTCATAATAGGTAACCGCGATT

```



```

S288C -----
A60      AGTAGATGAGAAAACCTAGTCACAGTTATTCTTGAGTCAATATAGTGAAAAAGCAGGAA TGGACTTCATTTTATTTGCAGCTCAAAGGAAACTCCATAATAATATATGTGGTTCCTGG
A15      AGTAGATGAGAAAACCTAGTCACAGTTATTCTTGAGTCAATATAGTGAAAAAGCAGGAA TGGACTTCATTTTATTTGCAGCTCAAAGGAAACTCCATAATAATATATGTGGTTCCTGG
AGT1_promP AGTAGATGAGAAAACCTAGTCACAGTTATTCTTGAGTCAATATAGTGAAAAAGCAGGAA TGGACTTCATTTTATTTGCAGCTCAAAGGAAACTCCATAATAATATATGTGGTTCCTGG
AGT1_promC AGTAGATGAGAAAACCTAGTCACAGTTATTCTTGAGTCAATATAGTGAAAAAGCAGGAA TGGACTTCATTTTATTTGCAGCTCAAAGGAAACTCCATAATAATATATGTGGTTCCTGG
RM11-1a  AGTAGATGAGAAAACCTAGTCACAGTTATTCTTGAGTCAATATAGTGAAAAAGCAGGAA TGGACTTCATTTTATTTGCAGCTCAAAGGAAACTCCATAATAATATATGTGGTTCCTGG

S288C -----
A60      CCACGATTACCTTCAAATTTGACTGTGTTAAACAGTAAAGTATCAATACAATATGACCAT GGGTCATTCTATAACTATCCTTAGGAAAGATATGCATTACAAT
A15      CCACGATTACCTTCAAATTTGACTGTGTTAAACAGTAAAGTATCAATACAATATGACCAT GGGTCATTCTATAACTATCCTTAGGAAAGATATGCATTACAAT
AGT1_promP CCACGATTACCTTCAAATTTGACTGTGTTAAACAGTAAAGTATCAATACAATATGACCAT GGGTCATTCTATAACTATCCTTAGGAAAGATATGCA-TACAAT
AGT1_promC CCACGATTACCTTCAAATTTGACTGTGTTAAACAGTAAAGTATCAATACAATATGACCAT GGGTCATTCTATAACTATCCTTAGGAAAGATATGCA-TACAAT
RM11-1a  CCACGATTACCTTCAAATTTGACTGTGTTAAACAGTAAAGTATCAATACAATATGACCAT GGGTCATTCTATAACTATCCTTAGGAAAGATATGCATTACAAT

```

Figura 4.4. Alinhamento das regiões promotoras do gene *AGT1* presente nas linhagens S288C, A60, A15, PE-2 (AGT1_promP), CAT-1 (AGT1_promC), e RM11-1a. Em verde encontram-se os sítios de ligação para o ativador *MALx3*, e em caixas pretas o sítio de ligação para o repressor *MIG1*.

4.3 Análise do locus *MAL1* da levedura CAT-1

Graças ao sequenciamento completo do genoma da CAT-1 (BABRZADEH et al., 2012), foi possível analisar em mais detalhe o locus *MAL1* em que está presente o gene *AGT1* nessa levedura. Nossos resultados (Figura 4.5) indicam que de fato a região telomérica do cromossoma VII destas duas leveduras difere significativamente, uma vez que o gene *AGT1* está distanciado aproximadamente 12,2 Kb do gene da maltase (*MAL12*), enquanto que na cepa S288C esta distância é de apenas 785 nucleotídeos.

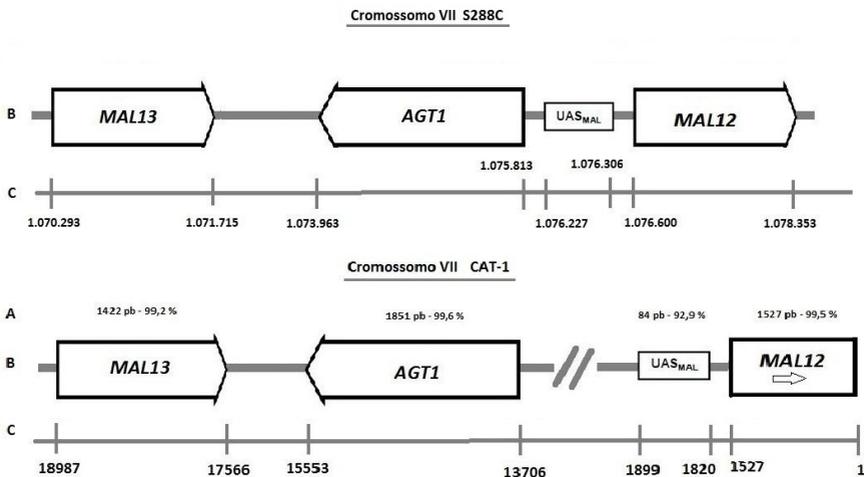


Figura 4.5. Representação do locus *MAL1* presente no cromossoma VII das linhagens S288C e CAT-1. Em (A) está representada a quantidade de nucleotídeos homólogos entre regiões correspondentes, e a porcentagem de homologia, em (B) esta a representação dos genes e região UAS_{MAL} , e em (C) a posição relativa de cada sequência no cromossoma VII da cepa S288C ou contig2 da cepa CAT-1.

Por outro lado, a grande semelhança entre a região promotora das linhagens CAT-1 e A15 (Figura 4.6), com a presença de apenas 2 sítios de ligação para o ativador *MALx3* próximos ao gene *AGT1*, podem explicar a não funcionalidade desta permease nas linhagens industriais uma vez que Vidgren e colaboradores (2011) já demonstraram que a região promotora da linhagem A15 não é induzida por maltose. Embora Bell e colaboradores (1997) tenham mostrado que conforme aumenta a distância do sítio UAS_{MAL} em relação ao início do gene, menor é a indução dos genes pela maltose, o promotor da linhagem A60 (semelhante ao das linhagens A15, RM11-1a, CAT-1 e PE-2) é normalmente induzido pela maltose, indicando que não apenas a distância da região UAS_{MAL} é importante, mas principalmente a presença de 3 sítios para a ligação do ativador *MALx3* encontrado no promotor da A60 (Figura 4.4) e S288C, parece ser fundamental para a ativação dos genes *MAL* (VIDGREN et al., 2011).

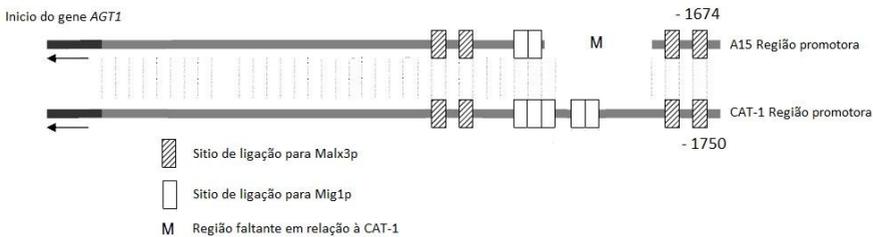


Figura 4.6. Comparação das regiões promotoras do gene *AGT1* presente nas linhagens A15 e CAT-1.

5. CONCLUSÕES

Nossos resultados indicam que a não-funcionalidade da permease *AGTI* nas linhagens industriais brasileiras CAT-1 e PE-2, utilizadas na produção de álcool combustível, não é decorrente de alterações na sequência de aminoácidos do gene *AGTI*, já que após a clonagem dos respectivos genes e sobre-expressão numa linhagem *agt1Δ*, a mesma passou a crescer, consumir e fermentar eficientemente maltotriose.

A nossa análise da região promotora das cepas industriais estudadas revelou que provavelmente seja a falta de indução do gene *AGTI* o responsável pela não-funcionalidade desta permease. Este resultado fornece informações que podem ser úteis para a produção/modificação de leveduras industriais brasileiras com um melhor perfil fermentativo para sacarose (através do transporte ativo deste açúcar), assim como para a fermentação de mostos ricos em maltotriose obtidos da hidrólise de amido, incluindo a produção de cerveja e uísque, e panificação.

6. REFERÊNCIAS

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

ALVES JR., S.L.; HERBERTS, R.A.; HOLLATZ, C.; TRICHEZ, D.; MILETTI, L.C.; DE ARAUJO, P.S.; STAMBUK, B.U. Molecular analysis of maltotriose active transport and fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* reveals a determinant role for the *AGT1* permease. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.74: p.1494-1450, 2008.

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.

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

BASSO, T. O.; DE KOK, S.; DARIO, M.; DO ESPIRITO-SANTO, J. C. A.; MULLER, G.; SCHLOLG, P. S.; SILVA, C. P.; TONSO, A.; DARAN, J. M.; GOMBERT, A. K.; VAN MARIS, A. J. A.; PRONK, J. T.; STAMBUK, B. U. Engineering topology and kinetics of sucrose metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* for improved ethanol yield. *Metab. Eng.*, v.13, n.6, p.694-703, 2011.

DÁRIO, M. G. Efeito da alteração na captação de sacarose ao metabolismo de *Saccharomyces cerevisiae*. **Tese de doutorado**. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

AMORIM, H.; LOPES, M. R.; DE CASTRO OLIVEIRA, J.; BUCKERIDGE, M.; GOLDMAN, G. Scientific challenges of bioethanol production in Brasil. **Appl. Microbiol. Biotech.**, v.91, n.5, p.1267-1275, 2011.

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

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

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

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

BABRZADEH F.; JALILI R.; WANG C.; SHOKRALLA S.; PIERCE S.; ROBINSON-MOSHER A.; NYREN P.; SHAFER R. W.; BASSO L. C.; DE AMORIM H.V.; DE OLIVEIRA A. J.; DAVIS R. W.; RONAGUI M.,

GHARIZADEH B.; STAMBUK B. U. Whole-genome sequencing of the efficient industrial fuel-ethanol fermentative *Saccharomyces cerevisiae* strain CAT-1. ***Mol Genet Genomics.***, v.287 n.6, p.485-494, 2012.

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

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

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

BARFORD, J. P.; PHILLIPS, P. J.; ORLOWSKI, J. H. A new model of uptake of multiple sugars by *S. cerevisiae*. ***Bioproc. Eng.***, v.7, p.3030-307, 1992.

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

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

BELL P. J. L.; HIGGINS V. J.; DAWES I. W.; BISSINGER P. H. Tandemly repeated 147 bp elements cause structural and functional variation in divergent *MAL* promoters of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* v.13: p.1135–1144, 1997.

BERTELLI, L.G.A verdadeira história do Proálcool. Artigo: *O Estado de S. Paulo*. 16/11/2005.

BERTHELIS, 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.

BOTSTEIN, D; FINK, G.R. Yeast: an experimental organism for modern biology. *Science*, v.240, p. 1439-1443, 1988.

CÁCERES, A.; CÁRDENAS, A.; GALLEGO, M.; VALCÁRVEL, M. A continuous spectrophotometric system for the discrimination/determination of monosaccharides and oligosaccharides in foods. *Anal. Chim. Acta*, v. 404, p. 121-129, 2000.

CAVALIERI, D.; MCGOVERN, P.E.; HARTI, D.L.; MORTIMER, R.; POLSINELLI, M. Evidence for *Saccharomyces cerevisiae* fermentation in ancient wine. *J. Mol. Evol.*, v. 57, p. S226-S232, 2003.

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

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.

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

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

FEUERMAN, M., L. CHARBONNEL, J. DE MONTIGNY, J. C. BLOCH, S. POTIER, AND J. L. SOUCIET. Sequence of a 9.8 kb segment of yeast chromosome II including the three genes of the *MAL3* locus and three unidentified open reading frames. *Yeast* v.11, p.667-672, 1995.

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

GIETZ RD, WOODS RA. Yeast transformation by the LiAc/SS carrier DNA/PEG method. *Methods. Mol Biol.*, v.313, p.107–120, 2006.

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

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.

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

Hong S. H.; Marmur J. Upstream regulatory regions controlling the expression of the yeast maltase gene. *Mol Cell Biol.* v.7, p.2477-83, 1987.

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

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

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

KOVARIK, B. HENRY FORD, CHARLES F. Kettering and the fuel of the future. *Autom. Hist. Rev.*, v.32, p.7-27, 1988.

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.

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

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

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

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.T17593-17598, 2004.

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

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

NAUMOV, G.I.; NAUMOVA, E.S.; SANCHO, E.D.; KORHOLA, M.P. Polymeric *SUC* genes in natural populations of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Letters.*, v.135, p.31-35, 1996.

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

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

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.

ROSILLO-CALLE, F.; CORTEZ, L.A.B. Towards proalcool 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 etanol by flow injection analisys. *Biotechnol. Letters*. v. 22, p. 327-330, 2000.

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

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

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

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.

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.

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

VIDGREN V.; KANKAINEN M.; LONDESBOROUGH J.; RUOHONEN L. Identification of regulatory elements in the *AGT1* promoter of ale and lager strains of brewer's yeast. *Yeast.*, v.28: p.579–594, 2011.

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

VOLCKAERT, G.; VOET, M.; ROBBEN, J. Sequence analysis of a near-subtelomeric 35.4 kb DNA segment on the right arm of chromosome VII from *Saccharomyces cerevisiae* carrying the *MAL1* locus reveals 15 complete open reading frames, including *ZUO1*, *BGL2* and *BIO2* genes and a ABC transporter gene. *Yeast* v.13 p.251-259, 1997.

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

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

WOOLFIT, M.; WOLFE, K. The gene duplication that greased society's wheels. **Nat. Genet.**, v.37, p.566-567, 2005.

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.