

Victor Ribeiro de Godoy

**FERMENTAÇÃO DE MALTOTRIOSE POR LEVEDURAS  
*SACCHAROMYCES CEREVISIAE* RECOMBINANTES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Biotecnologia e Biociências da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Mestre em Biotecnologia e Biociências.

Orientador: Prof. Dr. Boris Juan Carlos Ugarte Stambuk

Florianópolis  
2015

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

Godoy, Victor Ribeiro de  
FERMENTAÇÃO DE MALTOTRIOSE POR LEVEDURAS SACCHAROMYCES  
CEREVISIAE RECOMBINANTES / Victor Ribeiro de Godoy ;  
orientador, Bóris Juan Carlos Ugarte Stambuk -  
Florianópolis, SC, 2015.  
79 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa  
Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós  
Graduação em Biotecnologia e Biociências.

Inclui referências

1. Biotecnologia e Biociências. 2. Fermentação. 3.  
Engenharia genômica. 4. Invertase. 5. AGT1, SUC, MAL. I.  
Stambuk, Bóris Juan Carlos Ugarte . II. Universidade  
Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em  
Biotecnologia e Biociências. III. Título.





Dedico esta Dissertação de Mestrado  
aos meus pais, Oswaldo e Jacira, por  
serem a minha força.



## Agradecimentos

Agradeço à UFSC por todo o suporte institucional e à CAPES, ao CNPq e à FINEP pelo apoio financeiro.

Ao Prof. Dr. Boris U. Stambuk pela orientação e substancial contribuição à minha formação. Bem provável que, em toda sua carreira, eu tenha sido um dos alunos mais complicados de se lidar, mas agradeço e muito a sua paciência e compreensão.

Ao Prof. Dr. Carlos Peres que, além de fazer parte da banca examinadora, contribuiu com equipamentos, reagentes e, o mais importante, compartilhou seu conhecimento comigo. Certamente as coisas seriam mais difíceis sem o seu auxílio. Muito obrigado!

À Prof. Dr. Gabriela Muller pelos ensinamentos de longa data, pela ajuda quando solicitada, pela amizade e por aceitar fazer parte da banca. Esse trabalho é reflexo da sua dedicação como aluna e minha co-orientadora na passagem pelo LBMBL.

Ao Prof. Dr. Márcio Rossi e à Prof. Dra. Angélica Maris por aceitarem prontamente compor a banca examinadora. Mais uma vez estão me avaliando em um momento importante da minha vida. Obrigado!

Ao Prof. Dr. Hernán Terenzi por permitir a utilização de reagentes e equipamentos do CEBIME para o desenvolvimento deste trabalho. Também agradeço à Martina Blank e ao Jean Bertoldo pela substancial ajuda nos procedimentos realizamos nesse laboratório.

À Daniela Kunz pela ajuda constante no início deste trabalho e por estar sempre disposta a ajudar quando solicitada. Sua ajuda e dedicação foram essenciais. “O meu”, obrigado!

Aos companheiros e companheiras de laboratório pela atenção, pela amizade e pelas contribuições diretas e indiretas a este trabalho. Um abraço especial ao Davi, à Adriane e à Belisa.

À Gabriela Karasiaki, pela ajuda mais do que substancial nos experimentos realizados e pela amizade de longa data. Obrigado por ser simplesmente uma das pessoas mais importantes neste trabalho.

Aos meus grandes amigos Alceu Azambuja, Benito Sbruzzi, Denis Dall Agnolo e Gustavo Soares pela grande parceria de cada dia e por me fazerem entender o real significado da palavra amizade. Em especial um muitíssimo obrigado ao Denis, por simplesmente salvar a minha vida ao me tirar inconsciente da água após eu levar um choque. Você evitou a morte de um gênio, parabéns! :D

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 desde sempre, pelo carinho, pelo afeto, pelo amor incondicional, pelos ensinamentos e pela força que me deram nos momentos que pensei em desistir. Sem o carinho de vocês tudo seria mais difícil. Tenham a certeza de que eu os amo muito.



*"A única fonte de  
conhecimento é a experiência."  
Albert Einstein*



## RESUMO

GODOY, V. R. Otimização da fermentação de maltotriose por levedura *Saccharomyces cerevisiae* industrial. 87 fls. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia e Biociências) Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2015.

Na levedura *S. cerevisiae* os carboidratos sacarose, maltose e maltotriose são fermentados por vias metabólicas diferentes: a sacarose é hidrolisada pela invertase extracelular (codificada pelos genes *SUC*), enquanto maltose e maltotriose são ativamente transportadas para dentro da célula e hidrolisadas pelas  $\alpha$ -glicosidases presentes no citoplasma (ambas proteínas codificadas pelos genes *MAL*). Os genes *SUC* também permitem a síntese de uma forma intracelular da invertase, uma enzima com nenhuma função óbvia em leveduras. No entanto, a sacarose pode também ser metabolizada por células de levedura através dos transportadores e  $\alpha$ -glicosidases codificados pelos genes *MAL*. Nossos resultados mostram que a maltotriose pode ser também eficientemente fermentada pelas células de *S. cerevisiae* através de seu transporte ativo mediado pela permease *AGT1*, um transportador *MAL* necessário para utilização de maltotriose, e sua hidrólise intracelular mediada pela invertase intracelular. A cepa brasileira industrial utilizada na produção de etanol combustível CAT-1 não pode fermentar maltotriose eficientemente devido ao promotor do *AGT1* ser defeituoso. Para aumentar a fermentação de maltotriose por esta levedura, colocamos um promotor constitutivo ( $P_{GPD}$ ) à frente do gene *AGT1* presente na cepa CAT-1, gerando a linhagem GMY05. No entanto, esta linhagem não foi capaz de fermentar eficientemente a maltotriose. Por outro lado, quando esta linhagem foi modificada para sobre-expressar a forma intracelular da invertase, por substituição da sequência sinal do gene *SUC2* com o promotor constitutivo  $P_{ADH1}$ , a cepa *iSUC2* obtida (GMY08) fermentou maltotriose eficientemente. Utilizando condições em que os genes *MAL* não são expressos, foi possível mostrar que a forma intracelular da invertase é capaz de hidrolisar a maltotriose (mas não maltose ou p-nitrofenil- $\alpha$ -glicosídico). Assim, os nossos resultados indicam uma sobreposição inesperada no metabolismo de sacarose e maltotriose por células de levedura, indicando que a invertase intracelular pode hidrolisar da maltotriose, e oferece novas abordagens a ser aplicadas para otimizar várias fermentações industriais que utilizam hidrolisados de amido,

incluindo a panificação, produção de bebidas destiladas e cerveja, ou inclusive bioetanol.

**Palavras-chave:** Fermentação, Engenharia genômica, Invertase, *AGT1*, *SUC*, *MAL*, *Saccharomyces*

## ABSTRACT

GODOY, V. R. Optimization of maltotriose fermentation by industrial yeast *Saccharomyces cerevisiae*. 87 fls. Dissertation (Master in Biotechnology and Life Sciences) Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, 2014.

It is well known that in the yeast *S. cerevisiae* the sugars sucrose, maltose and maltotriose are metabolized by different pathways: sucrose is hydrolyzed by the extracellular invertase (encoded by *SUC* genes), while maltose and maltotriose are actively transported into the cell and hydrolyzed by intracellular  $\alpha$ -glucosidases (both proteins encoded by *MAL* genes). Furthermore, the *SUC* genes also allow the synthesis of an intracellular form of invertase, an enzyme with no obvious function in yeasts. We have already shown that sucrose can be metabolized by yeast cells through *MAL*-encoded transporters and  $\alpha$ -glucosidases. Now, our results will show that maltotriose can be efficiently fermented by *S. cerevisiae* cells through its active transport mediated by the *AGTI* permease, a *MAL* transporter required for maltotriose utilization, and its intracellular hydrolysis mediated by the cytoplasmic invertase. The Brazilian industrial fuel-ethanol strain CAT-1 cannot ferment maltotriose efficiently due to a defective promoter of the *AGTI* gene. To increase maltotriose fermentation by this strain, we placed a strong promoter ( $P_{GPD}$ ) in the *AGTI* gene of strain CAT-1, generating strain GMY05. While the *AGTI* gene was indeed over-expressed in this strain (measured by real-time PCR), maltotriose was still not fermented efficiently. However, when we over-expressed the intracellular form of invertase, by replacing the signal sequence of the *SUC2* gene with the strong  $P_{PGK}$  promoter, the resulting *iSUC2* strain GMY08 fermented maltotriose efficiently. Using conditions where the *MAL*-encoded  $\alpha$ -glucosidases could not be expressed, we showed that the intracellular form of invertase could hydrolyze maltotriose (but not maltose or p-nitrophenyl- $\alpha$ -glucoside). Thus, our results indicate an unexpected overlap in sucrose-maltotriose metabolism by yeast cells, showing that the intracellular invertase allows efficient maltotriose hydrolysis, and offers new approaches that can be applied to optimize several industrial fermentation processes that use starch hydrolysates, including production of bread, distilled beverages and beer, or even bioethanol.

**Key words:** Fermentation, Genomic Engineering, Invertase, *AGT1*, *SUC*, *Saccharomyces*.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 - Os 40 maiores consumidores per capita de cerveja no mundo.....	23
Figura 1.2 - Comparação entre faturamento do setor de panificação (em bilhões R\$) e seu respectivo crescimento (em %).....	24
Figura 1.3 - Utilização de maltose e maltotriose por <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	28
Figura 1.4 - Representação de um locus <i>MAL</i> .....	29
Figura 1.5 - Representação de um locus <i>MAL</i> contendo o gene <i>AGT1</i> .....	30
Figura 1.6 - Comparação do Loci <i>MAL1</i> contendo o gene <i>AGT1</i> de leveduras <i>Saccharomyces sensu stricto</i> .....	34
Figura 1.7 - Comparação das regiões promotoras do gene <i>AGT1</i> presente as linhagens A15 e CAT-1.....	36
Figura 1.8 - Estrutura tridimensional da enzima invertase de <i>S. cerevisiae</i> .....	38
Figura 1.9 - Estrutura dos genes <i>SUC</i> e síntese da invertase intracelular e extracelular.....	40
Figura 4.1 - Crescimento celular das cepas CAT-1, GMY05 e GMY08.....	54
Figura 4.2 - Análise da expressão genica relativa dos genes <i>SUC2</i> , <i>AGT1</i> , <i>MALx1</i> , <i>MALx2</i> , <i>MALx3</i> e <i>IMA5</i> .....	54
Figura 4.3 - Atividade enzimática com células permeabilizadas sob pH 5,0 e pH 6,8.....	56
Figura 4.4 - Cromatografia de troca iônica aniônica.....	57
Figura 4.5 - Ensaio de atividade enzimática com as frações cromatográficas .....	59
Figura 4.6 - Análise da fração cromatográfica com maior atividade enzimática.....	60

Figura 4.7 – Espectrometria de massas.....	60
Figura 4.8 - Inativação térmica.....	62
Figura 4.9 - Gráfico duplo-recíproco.....	63
Figura 4.10 - Gráficos duplo-recíprocos da hidrólise de sacarose.....	65
Figura 4.11 - Representação do oligômero formado pela invertase intracelular.....	66
Figura 4.12 - Representação do oligômero formado pela invertase extracelular.....	67



## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1. - Linhagens de <i>S. cerevisiae</i> utilizadas nesse trabalho.....	<b>43</b>
Tabela 2 - Iniciadores utilizados neste trabalho .....	<b>44</b>



## SUMÁRIO

<b>1.INTRODUÇÃO.....</b>	<b>21</b>
1.1 Mercado global de pães e cervejas .....	21
1.2 Utilização de maltose e maltotriose por <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	25
1.3 Invertase.....	36
<b>2.OBJETIVOS.....</b>	<b>41</b>
2.1 Objetivo geral .....	41
2.2 Objetivos específicos .....	41
<b>3.MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>43</b>
3.1 Meios de cultivo e condições de crescimento.....	43
3.2 Linhagens e iniciadores .....	43
3.3 Análise da expressão gênica por PCR em tempo real .....	44
3.4 Cultivos Celulares.....	45
3.4.1 Pré-cultivos .....	45
3.4.2 Crescimento em frasco agitado .....	46
3.5 Determinações Bioquímicas .....	46
3.6 Determinação da atividade de transporte de pNF $\alpha$ G .....	46
3.7 Purificação da Enzima Invertase .....	47
3.7.1 Obtenção do Extrato Celular .....	47
3.7.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência .....	47
3.8 Quantificação de Proteínas .....	48
3.9 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida Contendo SDS (lauril sulfato de sódio).....	48
3.10 Coloração com Coomassie Blue R-250.....	48
3.11 Coloração com Nitrato de Prata .....	49
3.12 Ensaio enzimáticos.....	49
3.13 Ensaio de hidrólise de substratos no gel de poliacrilamida.....	49
3.14 Quantificação de glicose.....	50
3.15 Quantificação de açúcar redutor.....	50
3.16 Espectrometria de Massa (MALDI-TOF).....	50
<b>4.RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>53</b>
4.1 Utilização de maltotriose pela levedura industrial CAT-1.....	53
4.2 Hidrólise de di- e oligossacarídeos pela linhagem industrial GMY08.....	55
<b>5.CONCLUSÕES.....</b>	<b>69</b>
<b>6.REFERÊNCIAS.....</b>	<b>71</b>



## 1. INTRODUÇÃO

Os seres humanos desenvolvem processos biotecnológicos utilizando leveduras há milhares de anos. Por exemplo, leveduras do complexo *Saccharomyces sensu stricto*, em especial a espécie *Saccharomyces cerevisiae*, são utilizadas na panificação e na produção de cervejas (QUEROL e BOND, 2009). Esses processos biotecnológicos, que são importantes para o desenvolvimento da nossa civilização, dependem da eficiente fermentação dos principais produtos da hidrólise do amido: glicose, maltose e maltotriose (VITTI, 2001; WILLAERT, 2001). Portanto, estudar o metabolismo desses açúcares por leveduras, visando otimizar os processos fermentativos, é importante para o crescimento dos setores industriais em questão.

### 1.1. Mercado global de pães e cervejas

A cerveja tem sua história iniciada há pelo menos 8.000 anos, onde indícios arqueológicos sugerem que o seu consumo era praticado na região da antiga Mesopotâmia. Assim como na panificação, os egípcios tiveram um papel fundamental na história da cerveja, visto que foram encontrados hieróglifos que comprovam a existência de uma cervejaria rudimentar datada de 5400 anos a.C (antes de Cristo) no Egito. Foram eles os responsáveis por divulgar a bebida entre os povos orientais, introduzi-la na Europa, e a seguir o mundo todo (SAMUEL, 1996). Durante o Império Romano os germânicos destacaram-se como grandes fabricantes de cerveja e, em 1516, a lei da pureza (Reinheitsgebot) foi instituída pelo Duque Wilhelm IV da Baviera. Tal lei tinha por objetivo padronizar a elaboração da bebida e garantir a fabricação de um produto de qualidade. Portanto, a bebida deveria ter como ingredientes apenas a água, o lúpulo e a cevada (nessa época ainda não era conhecido o fermento). Embora a lei da pureza tenha sido importante para a padronização da cerveja e por conferir maior qualidade ao produto, foi graças aos estudos de Louis Pasteur e Emil Christian Hansen que um maior controle de qualidade tornou-se possível. Louis Pasteur criou um processo no qual era possível garantir a conservação da cerveja por mais tempo, processo esse denominado de Pasteurização. Já Hansen comprovou que a utilização de culturas puras de leveduras na fabricação de cervejas era fundamental para a padronização do processo.

A evolução do processo de produção dessa bebida continuou ganhando forças com o aprimoramento de técnicas e equipamentos, permitindo maior diversificação dos seus tipos disponíveis no mercado. Sobretudo, áreas como a bioquímica, microbiologia, engenharia de

processo e biotecnologia agregaram e continuam agregando muito para o setor, de modo que consegue-se obter um processo de produção mais uniforme e com menor custo, gerando um produto cada vez mais padronizado e com maior facilidade de acesso ao mercado.

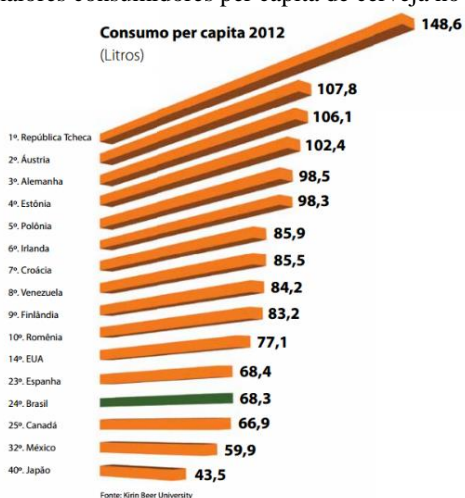
O grau de relevância do setor cervejeiro para a economia da UE (União Europeia) é esclarecido em um estudo da consultora ERNST & YOUNG. Tal estudo demonstra a contribuição do setor para a geração de empregos e para a competitividade econômica nos últimos anos na UE, que é a segunda maior produtora de cerveja do mundo com 39 bilhões de litros produzidos em 2012, ficando atrás apenas da China, com 44,3 bilhões de litros, enquanto que o consumo pela UE no mesmo ano foi de 35,9 bilhões de litros. Com aproximadamente 4500 cervejarias e uma variedade bastante grande de tipos de cervejas, o setor é de grande importância para a UE e seu impacto econômico direto constitui apenas uma pequena fração do impacto total que este mercado tem na economia. Cerca de 125.400 trabalhadores foram empregados diretamente dentro das fábricas de cerveja em 2012. No entanto, foi evidenciado que o setor cervejeiro também foi muito importante para o turismo (1,4 milhões de postos de trabalho), o setor de varejo (118.900 empregos) e setores de fornecimento (315,8 mil vagas). Aproximadamente 19 % da cerveja produzida pela UE é exportada e gera uma receita de 3.2 bilhões de euros. Já a sua importação lhe confere um gasto de 234 milhões, gerando um balanço positivo de 3 bilhões de euros. Essa é uma importante contribuição para economia europeia uma vez que o déficit na importação (considerando todos os setores) é de 105.3 bilhões.

Embora a UE seja a segunda maior produtora de cerveja do mundo, ao avaliarmos os países com maior produção nós temos a China em primeiro lugar, Estados Unidos da América (EUA) em segundo com 23 bilhões de litros, Brasil em terceiro com 13,4 bilhões de litros e em quarto a Rússia com 9,7 bilhões de litros. No Brasil, essa alta produção de cerveja reflete nos postos de trabalho, fazendo com que o setor cervejeiro seja um dos que mais empregam no país. Atualmente, cerca de 2,7 milhões de postos de trabalho - entre empregos diretos, indiretos e induzidos - estão ligados a esse mercado.

No entanto, ao passo que o Brasil aparece como terceiro na lista de produção anual de cervejas, o consumo per capita dessa bebida não acompanha tal feito. Segundo anuário de 2014 publicado pela CERVBRAIL (Associação Brasileira da Indústria da Cerveja) o Brasil ocupada apenas a 24ª posição no ranking de consumo (Figura 1.1) com uma média de 68 litros ao ano, sendo consideravelmente menor do que o

observado em países como república Tcheca (148,6 litros), Áustria (107,8 litros) e Alemanha (106,1 litros), os maiores consumidores mundiais de cerveja. Isso se deve principalmente ao baixo poder aquisitivo de boa parte dos consumidores brasileiros e à alta incidência de impostos sobre a produção e comercialização da cerveja em nosso país. Assim, embora na saída da fábrica seu custo seja um dos menores do mundo, a incidência de uma série de tributos até chegar ao consumidor final, encarece consideravelmente o preço final desta bebida (SINDICERV - Sindicato Nacional da Indústria da Cerveja).

Figura 1.1 - Os 40 maiores consumidores per capita de cerveja no mundo.



Fonte: Kirin Beer University

Com a grande produtividade desse setor no Brasil e o baixo consumo per capita em relação aos líderes mundiais é possível ver que há um grande potencial de crescimento para o País, tanto no que tange à produção como ao consumo. Para que esse potencial seja explorado é necessário que haja melhorias no desempenho das empresas envolvidas e, para que essas melhorias possam ser alcançadas, uma melhor compreensão da fisiologia e do metabolismo da levedura *Saccharomyces cerevisiae* é imprescindível.

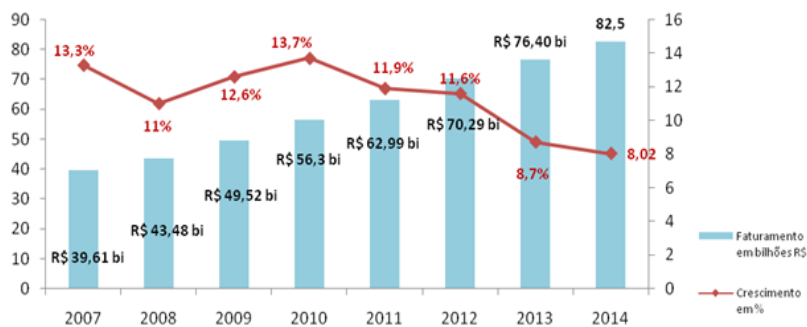
Ao passo que a produção de cerveja é um grande exemplo da utilização de leveduras, nós temos também a produção de pão. Esse, por sua vez, surgiu há pelo menos 10 mil anos e, nessa época, sua receita

consistia no cozimento de farinha de trigo e água, sem a adição de fermento. O resultado era uma massa achatada, dura por fora e macia por dentro (VITTI, 2001). A adição do fermento à receita é atribuída aos egípcios, o que os caracterizam como precursores do pão moderno. Arqueólogos encontraram, em ruínas egípcias, câmaras de cozimento e pedras para moer grãos (SAMUEL, 1996).

Ao passo que os egípcios iniciaram à produção do pão moderno, os gregos foram responsáveis por introduzir o pão na Europa. Isso foi bem recebido pelos Romanos que aprenderam a arte de fazer pão muito bem. Mas foi na Idade Moderna, com o avanço dos métodos de fabricação, que o pão ganhou o mundo. Logo mais, com o início da revolução industrial, as panificadoras mecanizaram os seus processos e diversificaram o produto (VITTI, 2001). Louis Pasteur, em 1859, verificou que o fermento se alimentava da farinha de trigo e produzia gás carbônico, fazendo a massa expandir e o pão crescer.

No Brasil o hábito do consumo de pão só chegou no século XIX, através dos imigrantes, que fabricavam caseiramente o pão e o vendiam pelas ruas. Entretanto, a expansão da panificação brasileira só ocorreu no início do século XX, período que a padaria ganha status de negócio. A partir daí, o processo de produção do pão sofreu avanços, as técnicas foram aprimoradas, com exemplos pioneiros por todo o país. Hoje as padarias oferecem grande variedade de produtos, suficiente para atender à crescente demanda de consumo.

Figura 1.2 - Comparação entre faturamento do setor de panificação (em bilhões R\$) e seu respectivo crescimento (em %).



Fonte: IPTC – ABIP

Segundo indicadores de 2014 publicados pela ABIP (Associação Brasileira da Indústria de Panificação), hoje há no Brasil mais de 63,2 mil



empresas de panificação que receberam cerca de 41,5 milhões de clientes diários no último ano. Tais empresas são responsáveis por gerar 850 mil empregos diretos e 1,85 milhão de forma indireta. O índice de crescimento das empresas de Panificação e Confeitaria em 2014 foi de 8,02 % com o faturamento atingindo R\$ 82,5 bilhões. No entanto, a alta foi considerada abaixo das expectativas, já que foi o segundo ano em que o setor registrou índice de crescimento inferior a 10% (Figura 1.2). Essa desaceleração é decorrente principalmente da alta de custos experimentada pela panificação.

O consumo per capita de pães no Brasil está situado na faixa dos 33 quilos por habitante/ano, o que vem a ser, segundo a ABIP, pouco mais da metade dos 60 quilos/habitante/ano recomendados pela OMS (Organização Mundial da Saúde) e pela FAO (Food Agricultural Organization). Além do baixo poder aquisitivo da população, fatores como hábitos culturais e qualidade do produto estão diretamente ligados ao baixo consumo desse alimento. Isso é refletido pelas grandes diferenças socioculturais entre as regiões em nosso país. Enquanto na região Nordeste o consumo é, em média, de 10 kg/habitante/ano, nas regiões Sul e Sudeste – composta pelos estados que mais investem nesse setor – a média é de 40-45 kg/habitante/ano. Em relação a outros países, o consumo no Brasil também é baixo, já que na Argentina são consumidos 73 kg per capita/ano e no Chile, 93 Kg percapita/ano; Alemanha, Bélgica, Portugal e Dinamarca possuem uma média de 75 kg por pessoa/ano, e na recordista, Turquia, cada pessoa consome 154 kg por ano. Contudo, vemos que embora o faturamento do setor tenha aumentado, o crescimento foi baixo em relação aos anos anteriores, além do que o consumo brasileiro tem muito o que crescer quando comparado aos demais países. Isso justifica o investimento no setor e, também, pesquisas que contribuam para a sua melhoria e para o aprimoramento do processo produtivo.

## **1.2. Utilização de maltose e maltotriose por *Saccharomyces cerevisiae***

Para se chegar no produto final, seja ele a cerveja ou o pão, há a necessidade de um processo enzimático que consiste na hidrólise do amido. Na produção de cerveja esse processo ocorre durante a mosturação, quando malte, lúpulo e água são misturados para formar o mosto cervejeiro. Ali, as enzimas  $\alpha$ - e  $\beta$ -amilases –que foram sintetizadas durante a maltagem dos grãos– agem sobre o amido do malte. As  $\alpha$ -amilases promovem uma hidrólise inicial do amido, produzindo oligossacarídeos contendo 5-10 resíduos de glicose. Em seguida, esses

oligosacarídeos sofrem a ação das  $\beta$ -amilases, que, a cada duas unidades de glicose, hidrolisam ligações glicosídicas do tipo  $\alpha$  1-4, liberando moléculas de maltose (com dois resíduos de glicose) e maltotriose (com três) (VENTURINI-FILHO e CEREDA, 2001).

Para a produção de pão existem duas categorias básicas, com a adição de sacarose na massa e sem essa adição. Na primeira categoria são empregadas leveduras selecionadas pela capacidade de fermentar eficientemente a sacarose, já que esse açúcar pode compor até 30% do peso seco da massa (BELL et al., 2001; HIGGINS et al., 2001). Já na segunda são empregadas leveduras que utilizam os principais carboidratos obtidos com a hidrólise do amido (glicose, maltose e maltotriose) para realizar o crescimento da massa através do processo fermentativo (HIGGINS et al., 1999a).

Através da receita tradicional, sem adição de sacarose, o processo de hidrólise do amido tem início com a moagem dos grãos de trigo para a obtenção da farinha. Ali são liberados o amido, presente no endosperma, e as enzimas  $\alpha$  e  $\beta$ -amilases, presentes no gérmen. Assim, a farinha obtida nesse processo é composta tanto pelo amido quanto pelas amilases presentes no grão de trigo (VITTI, 2001). Com o sovamento da massa, as  $\alpha$  e  $\beta$ -amilases agem sobre o amido do malte, assim como na produção de cerveja, liberando no mosto moléculas de glicose, maltose e maltotriose (VITTOLO, 2001; VITTI, 2001).

Tanto no setor cervejeiro como na panificação, para se ter uma produção eficiente, é necessário que as leveduras utilizadas no processo estejam aptas a utilizar os açúcares provenientes da hidrólise do amido. Na produção de cerveja, por exemplo, os três carboidratos em questão (glicose, maltose e maltotriose) respondem por 70-80% do total de açúcares, sendo o restante representado pela frutose (2-5%), pela sacarose (3-6%) e por açúcares não fermentáveis (20-30%). A maltose é o açúcar presente em maior quantidade (45-65% do total) no mosto cervejeiro. O segundo açúcar fermentável mais abundante é a maltotriose (15-20%) e o terceiro, a glicose, com 10-15% do total de açúcares encontrados em diversos tipos de mosto cervejeiro (GIBSON et al., 2007; WILLAERT, 2001).

Desses, a glicose é consumida mais rapidamente e, normalmente, após metade deste açúcar ser consumido é que ocorre a metabolização da maltose e maltotriose, sendo o metabolismo de maltotriose ainda mais lento do que o de maltose em *Saccharomyces*. Essa dificuldade de fermentar eficientemente a maltotriose tem impacto principalmente no setor cervejeiro, onde, muitas vezes, quantidades significativas desse

açúcar deixam de ser fermentadas (MENESES e JIRANEK, 2002; STEWART et al., 1979; ZASTROW et al., 2000; ZHENG et al., 1994). Tal fato gera perda econômica para esse setor, pois a lenta utilização de maltotriose reflete em um baixo rendimento de etanol e presença de açúcar fermentável no produto final, podendo ocasionar, ainda, um sabor atípico. Portanto, as velocidades de utilização dos  $\alpha$ -glicosídeos influenciam na obtenção de um produto final de qualidade (D'AMORE et al., 1989; ERNANDES et al., 1993).

A utilização de maltose e maltotriose pelas leveduras inicia-se pelo transporte ativo para o interior da célula, através do simporte com H<sup>+</sup> (vide Figura 1.3). A seguir esses carboidratos são hidrolisados por maltases ( $\alpha$ -glicosidases), liberando as moléculas de glicose que serão metabolizadas até etanol pela glicólise (ZASTROW et al., 2001).

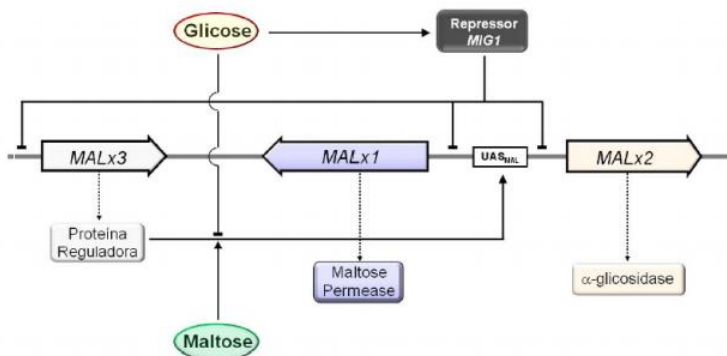
Para que uma cepa de *S. cerevisiae* seja capaz de fermentar a maltose é necessária a presença de pelo menos um dos cinco loci *MAL* existentes nessa levedura. Todos os cinco loci *MAL* são subteloméricos e cada locus se encontra em um cromossomo diferente: o locus *MAL1* se localiza no cromossomo VII; o *MAL2*, no cromossomo III; o *MAL3*, no II; o *MAL4*, no XI; e, o *MAL6*, no VIII. Esses cinco loci *MAL* podem ser constituídos pelos três genes necessários à metabolização da maltose: o gene *MALx1* (onde x representa o locus), que codifica o transportador de maltose; o gene *MALx2*, que codifica a maltase; e o gene *MALx3*, que codifica uma proteína reguladora que induz a expressão dos genes *MAL* na presença de maltose no meio. Uma cepa de *S. cerevisiae* necessita, para a utilização da maltose, de apenas um desses loci completos, ou seja, apenas um locus contendo ao menos uma cópia dos genes *MALx1*, *MALx2* e *MALx3* é suficiente para garantir uma fermentação eficiente desse açúcar (NEEDLEMAN, 1991; NOVAK et al., 2004). Além desses loci completamente funcionais (contendo os três diferentes genes citados acima), existem ainda pelo menos três tipos de loci *MAL* parcialmente funcionais (*malp*, *malg* e *mal<sup>0</sup>*). O locus *malp* contém apenas o gene regulador *MALx3*, o locus *malg* contém apenas os genes para o transportador de maltose e para a  $\alpha$ -glicosidase (*MALx1* e *MALx2*, respectivamente) e o locus *mal<sup>0</sup>* apenas o gene para a  $\alpha$ -glicosidase (MICHELS et al., 1992; NAUMOV et al., 1994).

Em todos esses loci, a proteína reguladora, ao ser ativada pela maltose, é responsável pela indução da expressão tanto do gene que codifica o transportador desse açúcar quanto do gene que codifica a maltase ( $\alpha$ -glicosidase). Em *Saccharomyces cerevisiae*, a proteína reguladora *Malx3p*, na presença de maltose (vide Figura 1.4), se liga ao



Ao passo que a maltose funciona como indutora dos genes *MAL*, a glicose atua como repressora desses genes. Isso pode acontecer de duas maneiras: (1) inibindo a ativação da proteína reguladora Malx3p pela maltose e (2) ativando o repressor Mig1p, que impede a transcrição dos três genes *MAL* ao se ligar à região promotora de cada um deles (Figura 1.4) (HU et al., 1995, 2000; KIM e MICHELS, 1988; WANG e NEEDLEMAN, 1996). O repressor Mig1p reprime a expressão não só dos genes que codificam o transportador de maltose e a  $\alpha$ -glicosidase, mas também do gene *MALx3* que codifica a proteína reguladora. Tal processo é conhecido como repressão catabólica (SANTANGELO, 2006).

Figura 1.4 - 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.



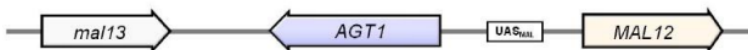
Fonte: Alves Jr. (2010).

Os processos de indução e a repressão não são os únicos processos de regulação que controlam a fermentação da maltose. Já foi caracterizada, por exemplo, a existência de alelos para alguns dos genes *MAL* que determinam a expressão independente da indução pela maltose, fenótipo esse encontrado nas chamadas cepas *MAL* constitutivas (*MAL<sup>c</sup>*). Esses alelos são mutações dos loci *MAL*, principalmente nos genes que codificam a proteína reguladora (CHARRON e MICHELS, 1987; GIBSON et al., 1997; WANG e NEEDLEMAN, 1996). Tais mutações promovem, por si só, uma conformação distinta na proteína reguladora que já a torna ativa, sem a necessidade da presença de maltose, de modo a permitir a expressão das proteínas Malx1p e Malx2p (GIBSON et al.,

1997; WANG e NEEDLEMAN, 1996). Geralmente as cepas industriais são *MAL* constitutivas, sendo essa característica altamente desejável em cepas de cervejaria e panificação (HIGGINS et al., 1999a; KODAMA et al., 1995; MENESES e JIRANEK, 2002; ODA e OUCHI, 1990). No entanto, cepas *MAL* constitutivas podem ainda apresentar tanto sensibilidade como insensibilidade à repressão pela glicose (CHARRON e MICHELIS, 1987; GIBSON et al., 1997; HIGGINS et al. 1999b; ALVES-JR et al., 2014).

Apesar de inúmeros trabalhos já terem detalhado os mecanismos moleculares envolvidos no metabolismo de maltose em *Saccharomyces cerevisiae*, poucos estudos objetivaram analisar, como enfoque principal, a fermentação de maltotriose. 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  $\alpha$ -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). O Agt1p é o único transportador de maltotriose em *S. cerevisiae*, e o mesmo é necessário para promover a 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<sub>MAL</sub>* na sua região promotora (Figura 1.5) (HAN et al., 1995).

Figura 1.5 - 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).

Ao encontro da importância que o transporte de maltotriose tem em alguns segmentos industriais, constatou-se que praticamente todas as

linhagens de cervejaria contêm o gene *AGTI* (JESPERSEN et al., 1999; Vidgren et al., 2005). Embora o gene *AGTI* seja encontrado em cepas ale (*S. cerevisiae*) e lager (*S. pastorianus*, um híbrido natural de *S. cerevisiae* e *S. eubayanus*), ele codifica uma proteína truncada e não funcional em cepas lager (Vidgren et al., 2005; Nakao et al., 2009). Além disso, análises de transcriptoma de leveduras do tipo ale têm indicado altos níveis de expressão dessa permease durante a fermentação do mosto cervejeiro (JAMES et al., 2003; MENESES e JIRANEK, 2002; VIDGREN et al., 2005). Essa alta expressão gênica pôde ser observada também quando as cepas ale foram crescidas em glicose (repressor), maltose (indutor) e em uma mistura de ambos os açúcares. Em todos os 3 meios a expressão do gene *AGTI* foi muito fraca em cepas lager e bastante forte em cepas ale. Também foi claramente observado que a glicose reprime a expressão do *AGTI* e a maltose a induz em ambas as cepas (Vidgren et al., 2005).

VIDGREN et al., (2011) analisaram o locus *MAL1* de cepas industriais de *S. cerevisiae*, *S. paradoxus* e *S. mikatae* e compararam com a levedura de laboratório S288c. Eles observaram (Figura 1.6) que o locus *MAL1* da S288c contém o gene *IMA1*, 73 % idêntica ao *MALx2*, em adição ao locus *MAL* clássico (*MAL11*, *MAL12* e *MAL32*). O *IMA1* codifica uma  $\alpha$ -glicosidase, capaz de hidrolisar isomaltose e  $\alpha$ -metil-glicosídeo, (Teste et al., 2010). Esse gene também foi encontrado nas demais cepas analisadas, sendo que na *S. cerevisiae* ele codifica uma proteína truncada. Nas cepas *S. paradoxus* e *S. mikatae* foi observado uma ORF com uma sequência similar (88% em *S. paradoxus* e 84% em *S. mikatae*) ao gene que codifica para o transportador de maltose/maltotriose *MTT1* (Salema-Oom et al., 2005; Dietvorst et al., 2005). O loci *MAL* contendo o gene *AGTI* das cepas industriais apresenta outros genes *MALx* e, portanto, é mais extensivo que o locus *MAL* clássico encontrado na cepa S288c. Com base na análise da sequência de todo o genoma, *S. mikatae* divergiu do ancestral comum mais cedo do que *S. cerevisiae* e *S. paradoxus* (Kellis et al., 2003). A presença do loci *MAL* contendo o gene *AGTI* é muito semelhante em *S. paradoxus* e *S. mikatae*, o que sugere que essa é a estrutura do locus inicial no ancestral comum, ou seja, os genes *MAL* já haviam sido multiplicados no locus da cepa ancestral da qual estas estirpes de *Saccharomyces sensu stricto* foram originadas. As divergências encontradas em *S. cerevisiae* industriais e laboratoriais em relação ao ancestral parecem ter sido acompanhadas pela exclusão de algumas dessas repetições. O lócus da *S. cerevisiae* RM11-1a poderia ter sido derivada da *S. mikatae* e *S. paradoxus* loci por eliminação da sequência entre a primeira e terceira ORF *MALx3* (Figura 1.6). Esta

exclusão faria remover apenas cópias extras do transportador de maltose (Mtt1p) e genes *MALx3* (ativadores). Estirpes laboratoriais, tais como S288c, são originalmente derivadas a partir de isolados naturais e durante a sua evolução em condições laboratoriais podem ter se diferenciado desde as suas origens naturais. O locus *MAL1* de *S. cerevisiae* S288c poderia ser derivado da RM11-1a através de mais deleção, mas desta vez entre a sequência entre o gene *AGT1* e o primeiro *MALx2* (Figura 1.6). A instabilidade excepcional das regiões teloméricas promove reorganização frequente do loci *MAL*. Esta característica é benéfica para a rápida adaptação a novos ambientes. Por exemplo, a duplicação de genes *MAL* seguido de divergência funcional gerando novos alelos pode permitir que o metabolismo de carboidratos diferentes. Brown et al. (2010) sugerem que a reorganização ocorre com frequência em *MAL* loci e, depois de divergida da estirpe ancestral, as espécies de *Saccharomyces* evoluíram seus *MAL* loci de modo a serem capazes de utilizar determinados hidratos de carbono.

Dentro do complexo *Saccharomyces sensu stricto*, a permease Agt1p, entretanto, não pode ser considerada a única responsável pelo transporte de maltotriose através da membrana plasmática das células. Na espécie *Saccharomyces pastorianus*, um híbrido natural de *S. cerevisiae* e *S. bayanus*, utilizado na produção de cervejas do tipo lager, foi caracterizada uma permease com maior afinidade por maltotriose (Km ~20 mM) que por maltose (Km ~70 mM) (SALEMA-OOM et al., 2005). Essa permease, codificada pelo gene denominado *MTT1*, é essencial para o transporte de maltotriose em cepas de *S. pastorianus*, uma vez que a expressão da permease Agt1p é praticamente nula nessas leveduras e, além disso, tal permease é truncada e não funcional nas cepas do tipo lager (Vidgren et al., 2005; Nakao et al., 2009). A permease Mtt1p apresenta 91% de similaridade aos transportadores Malx1p e 62% de similaridade ao Agt1p (DIETVORST et al., 2005). Segundo Salema-Oom et al. (2005), a montante e a jusante do gene *MTT1*, também são encontrados genes que codificam, respectivamente, uma  $\alpha$ -glicosidase e uma proteína reguladora Malx3p.

A levedura industrial utilizada neste trabalho foi a CAT-1, uma das responsáveis pela maior parte da produção de álcool combustível a partir de sacarose no Brasil (Basso et al., 2008). Essa levedura é bastante importante nesse cenário, visto que possui alta resistência ao estresse presente nas dornas de fermentação, uma alta capacidade de reciclo celular e de fermentar mesmo na presença de oxigênio. Esses fatores foram evidenciados também em um estudo realizado por AMORIM NETO et

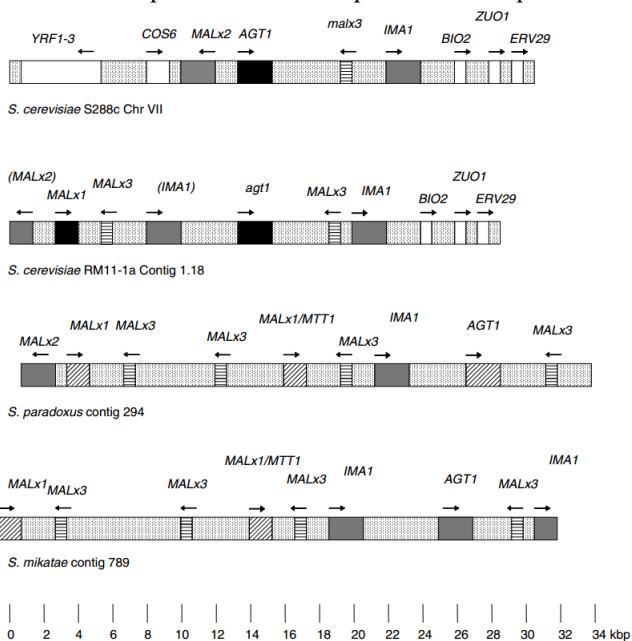


al., (2009), onde a CAT-1 foi utilizada para a produção de uísque escocês e comparada com leveduras já otimizadas desse processo. O resultado foi bastante surpreendente, visto que a CAT-1 apresentou maior capacidade de tolerância ao estresse do meio e as características sensoriais produzidas se mantiveram dentro dos padrões estabelecidos para esse uísque. A temperatura utilizada para os testes foi de 30°C, mas ao realizarem testes à 40°C a CAT-1 se mostrou com maior habilidade fermentativa do que a levedura já utilizada nesses processos. Além disso, um fator considerável foi que ao final da fermentação elas se mantiveram com uma ótima viabilidade, o que é bastante interessante, pois a morte de leveduras ao final do processo interfere nas características sensoriais do produto e dificulta o reciclo celular, sendo esse mais um ponto positivo à favor da utilização dessa levedura em processos industriais de produção de uísque. No entanto, ao passo que a CAT-1 possui essas características importantes para tal processo, a sua incapacidade de fermentar a maltotriose é um problema, visto que o substrato para essa produção é proveniente do amido, onde a quantidade de maltotriose é bastante representativa (DUVAL et al., 2010; AMORIM NETO et al., 2009). Portanto, a otimização do metabolismo de maltotriose por essa levedura industrial é bastante importante para o desenvolvimento de processos com hidrolisados de amido onde ela seja empregada.

Dados obtidos por ALVES-JR. (2010) e DUVAL e colaboradores (2010) demonstraram que a linhagem CAT-1 é incapaz de fermentar eficientemente a maltotriose, e que somente é capaz de consumi-la este açúcar, e produzir quantidades ínfimas de etanol, após uma extensiva fase *lag* (>100-120 h). Essa utilização tardia da maltotriose ocorre através da hidrólise extracelular liberando glicose e maltose, que são internalizadas pelos transportadores Hxtp e Malx2p, respectivamente. ALVES-JR. (2010) mostrou que a hidrólise extracelular ocorre pela ação da enzima codificada pela ORF *YJL216C*, que até então só havia sido predita como  $\alpha$ -glicosidase. No entanto, TESTE et al., (2010) demonstraram que essa ORF, juntamente com mais quatro (*YGR287c*, *YIL172c*, *YJL221c* e *YOL157c*), fazem parte de uma família multigênica localizada em regiões teloméricas de diferentes cromossomos. Esses genes apresentam alta similaridade entre si (66-100%), e com os genes das maltases *MALx2* (63-74%), mas ao contrário das maltases que hidrolisam ligações  $\alpha$ -1-4, as enzimas codificadas por esses genes hidrolisam preferencialmente ligações  $\alpha$ -1-6. Esse fato confere a elas a habilidade de hidrolisar a isomaltose, o que foi decisivo para que os autores renomeassem esses

genes como *IMAx* (*IMA1* ao *IMA5*) e, portanto, a enzima passou a ser denominada isomaltase.

Figura 1.6 – Comparação do Loci *MAL1* contendo o gene *AGT1* de leveduras *Saccharomyces sensu stricto*. Genes em letra minúscula indica genes não funcionais. Genes entre parênteses indica expressão de uma proteína truncada.



Fonte: VIDGREN et al., (2011).

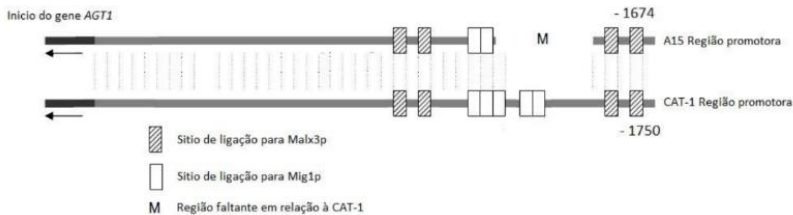
Embora essa hidrólise extracelular da maltotriose pela isomaltase tenha sido a única forma que a cepa CAT-1 conseguiu utilizar esse açúcar, tal utilização ocorreu de forma tardia e sem produzir quantidades consideráveis de etanol. Como ALVES-JR. e colaboradores (2008) demonstraram que, em *Saccharomyces cerevisiae*, a presença da permease *Agt1p* na membrana plasmática das células é indispensável para a rápida utilização da maltotriose e para a consequente fermentação desse açúcar, a ausência do gene *AGT1* ou da falta de expressão do mesmo faz com que as células sejam incapazes de transportar esse açúcar através da membrana plasmática. Como já foi descrita a presença do gene *AGT1* no cromossomo VII da levedura industrial CAT-1 (DUVAL et al., 2010), o fato de tal cepa não fermentar a maltotriose sugeria que a permease

provavelmente não era funcional. No entanto, a sequência da região codante (ORF) do gene *AGT1* presente na CAT-1 (ALVES-Jr, 2010; BABRZADEH et al., 2012) revelou polimorfismos na permease Agt1p já encontradas em outras permeases Agt1p sequenciadas de linhagens industriais (SMIT et al., 2007; VIDGREN et al., 2005), e que codificam para uma proteína funcional com 616 aminoácidos. De fato, Godoy clonou a ORF do gene *AGT1* da linhagem CAT-1, e a inseriu no plasmídeo pGRSd-*AGT1*, o qual possui um promotor constitutivo ( $P_{GPD}$ ). Esse plasmídeo foi inserido em leveduras de laboratório que não possuíam o gene *AGT1* (*agt1Δ*) e que não eram capazes de utilizar maltotriose. As cepas transformadas com o plasmídeo passaram a consumir e fermentar a maltotriose, demonstrando que a não funcionalidade da permease Agt1p na linhagem industrial CAT-1 é decorrente de alterações na sua região promotora, e não na sequência do gene (GODOY 2013). GODOY (2013) clonou a ORF do gene *AGT1* e a inseriu no plasmídeo pGRSd-*AGT1*, o qual possui um promotor constitutivo ( $P_{GPD}$ ). Esse plasmídeo foi inserido em leveduras de laboratório que não possuíam o gene *AGT1* e nem eram capazes de utilizar maltotriose. Após ensaios de crescimento e fermentação as cepas modificadas com o plasmídeo passaram a consumir e fermentar a maltotriose. Por outro lado, a grande semelhança entre a região promotora das linhagens CAT-1 e A15 (Figura 1.7), 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. Desse modo, tal trabalho demonstrou que a não funcionalidade da permease Agt1p é decorrente de alterações na sua região promotora, decorrente da diminuição de um sítio de ligação do ativador MALx3

À época, a linhagem CAT-1 sobre-expressando o gene *AGT1* estava sendo utilizada para otimizar a fermentação da sacarose pela realocação da atividade da invertase nas células de levedura (BASSO et al., 2011; MULLER, 2013). Quando duas dessas cepas recombinantes foram analisadas mediante a utilização de maltotriose obtivemos um resultado bastante intrigante, visto que a cepa GMY08 (sobre-expressando o gene *AGT1* e *iSUC2*, sem expressar o gene *SUC2*) estava apresentando melhor consumo de maltotriose do que a cepa GMY05 (sobre-expressando o gene *AGT1* e expressando normalmente o gene *SUC2*). Esse dado nos levou a crer que a invertase intracelular sobre-expressa (codificada pelo gene

iSUC2) estava sendo responsável por otimizar a utilização de maltotriose pela cepa GMY08.

Figura 1.7 – Comparação das regiões promotoras do gene AGT1 presente as linhagens A15 e CAT-1.



Portanto, com o intuito de melhorar a compreensão do metabolismo de maltotriose em *S. cerevisiae* e a fermentação desse açúcar, resolvemos avaliar neste trabalho esse perfil de utilização de maltotriose curioso e inesperado ainda não descrito na literatura.

### 1.3. Invertase

A enzima invertase tem um papel fundamental no metabolismo de *S. cerevisiae* frente à produção de álcool combustível à partir da cana-de-açúcar no Brasil. Hoje nosso país é o segundo maior produtor de álcool combustível do mundo e, também, o mais competitivo, com um mercado doméstico bem desenvolvido e cada vez mais estimulado pelas vendas crescentes de carros bicombustíveis. A produção de etanol combustível tem sido apoiada pelo desenvolvimento de novas variedades de cana, variáveis meteorológicas favoráveis, solos férteis e meteorologias agrícolas (LEITE et al., 2009). Para que esse processo aconteça é imprescindível que a levedura utilizada seja capaz de fermentar eficientemente a sacarose (uma molécula de glicose ligada a uma de frutose, através de uma ligação osídica  $\alpha$ 1- $\beta$ 2), visto que essa representa 90% dos açúcares presentes na cana-de-açúcar. A ligação osídica da sacarose permite que ela seja hidrolisada por duas enzimas: por  $\alpha$ -D-glicosidases, que reconhecem a ligação “Gli- $\alpha$ 1”, e por  $\beta$ -D-frutosidases, que reconhecem a ligação “ $\beta$ 2-Fru”. Isso confere duas rotas de utilização para a sacarose em *S. cerevisiae*. Uma delas é através da sua hidrólise no meio extracelular, pela ação da invertase ( $\beta$ -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 ( $\alpha$ -D-glicosidase) (BADOTTI; BATISTA; STAMBUK, 2006; BADOTTI et al., 2008; BARFORD; PHILLIPS; ORLOWSKI, 1992; BATISTA; MILETTI; STAMBUK, 2004; MWESIGYE; BARFORD, 1996; ORLOWSKI; BARFORD, 1991).

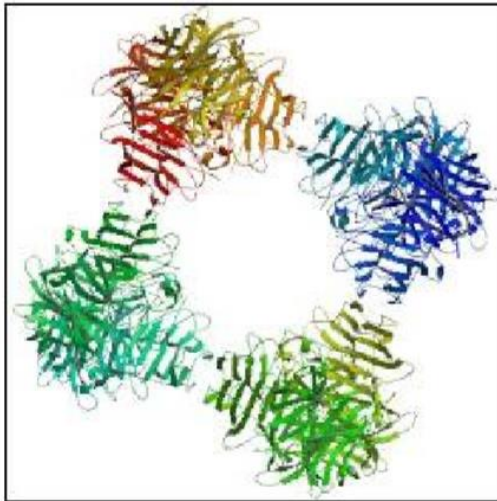
A invertase (EC 3.2.1.26), pertence à família 32 glicosilhidrolase (GH32) e possui dois domínios distintos. O domínio N-terminal forma uma estrutura de hélice com cinco folhas beta ( $\beta$  hélice), onde encontram-se os sítios de ligação ao substrato. Já o domínio C-terminal apresenta uma estrutura de sanduíche de folhas betas ( $\beta$  sanduíche), característico das enzimas pertencentes à família GH32 (HENRISSAT et al., 1995).

Apesar da invertase de *S. cerevisiae* ter sido uma das primeiras enzimas estudadas na bioquímica, até recentemente sua estrutura ainda não tinha sido resolvida. SAINZ-POLO et al. (2013) publicaram a estrutura tridimensional da invertase da linhagem de *S. cerevisiae* S288C, onde é observada uma estrutura quaternária não usualmente encontrada em outras invertases. Os monômeros associam-se em dois tipos diferentes de dímeros que estão por sua vez unidas em um octâmero, melhor descrito como um tetrâmero de dímeros. A dimerização desempenha um papel determinante na especificidade do substrato, pois essa estrutura limita o acesso do dissacarídeo (sacarose), ou oligossacarídeos (inulina) curtos de até quatro unidades ao sítio ativo da enzima. A análise comparativa de enzimas de GH32 mostra que a formação da invertase em octâmeros ocorre através de uma extensão das folhas  $\beta$  que parece única para esta enzima. A interação entre dímeros é determinada por uma sequência curta de aminoácidos no início do domínio sanduíche  $\beta$ . Na estrutura tridimensional, representada na Figura 1.8, podemos observar a enzima invertase de *S. cerevisiae* S288c na conformação de octâmero, melhor denominada como tetrâmero de dímeros.

A enzima invertase, como mencionado anteriormente, possui um papel importante no metabolismo de açúcares pelas leveduras e catalisa a hidrólise do dissacarídeo sacarose (produzindo monômeros de glicose e frutose) e do trissacarídeo rafinose (Galactose  $\alpha$ -1,6 Glicose  $\beta$ -1,2 Frutose), produzindo frutose e melibiose (GASCON; NEUMANN; LAMPEN, 1968; TAUSSIG; CARLSON, 1983). Embora as linhagens de leveduras possam conter qualquer número e combinação dos genes *SUC*,

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

Figura 1.8 – Estrutura tridimensional da enzima invertase de *S. cerevisiae* (SAINZ-POLO et al., 2013).



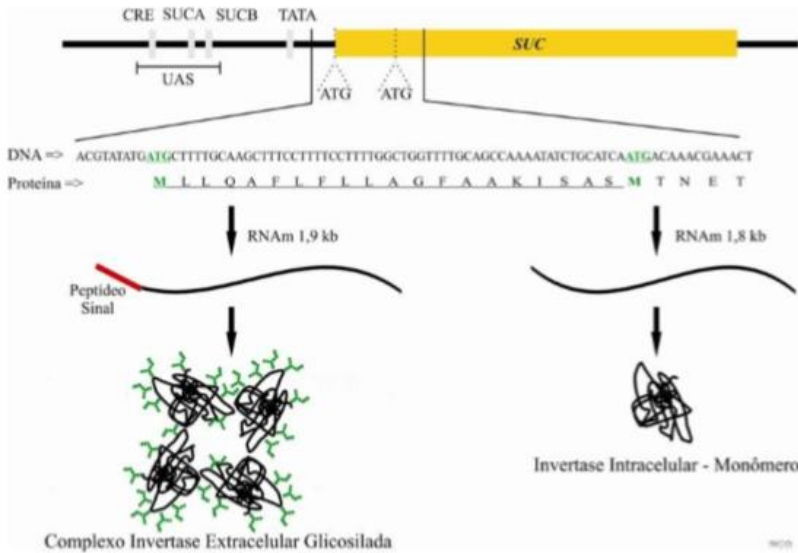
Fonte: Protein Data Base

Dados presentes na literatura sugerem uma alta amplificação gênica nos genes da família *SUC* em leveduras *S. cerevisiae*. O gene da  $\beta$ -frutosidase *SUC2* é, geralmente, o responsável pela síntese da invertase. Entretanto, existem diversos outros genes *SUC* descritos na literatura. Todos os genes da família *SUC*, com exceção do *SUC2*, estão localizados em regiões teloméricas de diferentes cromossomos: *SUC1* está localizado no cromossomo VII, *SUC3* no cromossomo II, *SUC4* no cromossomo XIII, *SUC5* no cromossomo IV, *SUC7* no cromossomo VIII, *SUC8*,

localizado no cromossoma X, *SUC9* no cromossoma XIV e *SUC10* no cromossoma XVI ou XIII (CARLSON; BOTSTEIN, 1983; CARLSON; CELENZA; ENG, 1985; NAUMOV; NAUMOVA, 2010a, 2010b). As ampliações genicas nos genes *SUC* é resultado da recombinação de sequências teloméricas homólogas de vários cromossomos. Pelo fato do *SUC2* estar localizado na parte terminal do cromossomo IX, porém, não na região telomérica, assume-se este gene como ancestral dessa família de genes. (CARLSON; BOTSTEIN, 1983; CARLSON; CELENZA; ENG, 1985).

Durante a expressão do gene *SUC2* são codificadas duas formas da invertase, uma extracelular e outra intracelular. A invertase extracelular é um homodímero altamente glicosilado que é secretado para o espaço periplasmático da célula, onde ocorre a hidrólise extracelular da sacarose. A invertase intracelular também é um homodímero, entretanto, não sofre glicosilação, pois permanece no citoplasma celular (GASCON; NEUMANN; LAMPEN, 1968; TRIMBLE; MALEY, 1977). Durante a síntese da invertase é que ocorre a diferenciação das suas duas formas devido à geração de dois tipos de mRNA (Figura 1.9), que diferem somente na sua região 5'. O transcrito maior, que codifica para a invertase extracelular, tem aproximadamente 1900 pares de base (pb) e uma sequência sinal (20 aminoácidos) que direciona a proteína que está sendo sintetizada para o sistema secretório. Esta sequência sinal não é encontrada no transcrito menor, de aproximadamente 1800 pb, que codifica então para a invertase intracelular (CARLSON; BOTSTEIN, 1982, 1983). Durante a secreção da invertase periplasmática o peptídeo sinal é retirado por proteólise e a proteína madura é glicosilada. Ambas possuem 532 aminoácidos, mas massas moleculares diferentes: próximo de 135 kDa para a forma intracelular e valores superiores a 270 kDa para a invertase extracelular, que pode formar complexos com mais de 800 kDa. A diferença na massa molecular, entre as diferentes formas dessa enzima, se deve pela existência de glicosilações na forma extracelular, adicionadas durante o processo de síntese e secreção da proteína. Essa modificação não interfere na atividade de hidrólise da enzima, mas confere proteção contra a ação de proteases e contribui para a formação de complexos proteicos na forma de tetrâmeros, hexâmeros e até mesmo octâmeros da forma extracelular, garantindo a retenção dessa enzima no espaço periplasmático das células (ALVARADO et al., 1990; REDDY et al., 1988).

Figura 1.9 – Estrutura dos genes SUC e síntese da invertase intracelular e extracelular.



Fonte: Dário (2012)

Conforme descrito anteriormente, a invertase de *S. cerevisiae* tem um papel muito importante na produção de álcool combustível, visto que é responsável pela hidrólise da sacarose presente no processo de produção desse. Também, tem sua importância na panificação, seja pela utilização de receitas com adição de sacarose ou seja pelo pré-crescimento do fermento, que é realizado com melão.



## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo geral

Avaliar a fermentação de maltotriose por leveduras *Saccharomyces cerevisiae* recombinantes e a possível hidrólise da maltotriose pela invertase intracelular.

### 2.2. Objetivos específicos

- **Analisar a utilização de maltotriose por leveduras recombinantes:** avaliar a utilização de maltotriose (consumo e produção de etanol) em cepas geneticamente modificadas, e comparar com a linhagem parental.
- **Analisar a atividade das enzimas e transportadores envolvidos na metabolização de maltotriose:** purificar e analisar cineticamente as enzimas envolvidas na fermentação da maltotriose pela linhagem CAT-1 geneticamente modificada.



### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Meios de cultivo e condições de crescimento

Para o cultivo das linhagens de leveduras foi utilizado meio rico (YP) composto de 10 g/L de extrato de levedura (Fluka), 20 g/L de peptona bacteriológica (Fluka) e suplementado com diferentes fontes de carbono, como glicose ou maltotriose. O pH do meio foi ajustado para 5,0 com a adição de ácido clorídrico. Para avaliação do crescimento celular foram utilizadas concentrações de 20 g/L de maltotriose (Sigma). Alternativamente, para a produção de extrato celular a partir de células reprimidas pela glicose foi utilizada a concentração de 40 g/L de glicose, e as células coletadas no meio da fase exponencial do crescimento (com 20 g/L de glicose presente no meio). Para a preparação de meio sólido foi adicionado 20 g/L de Bacto-agar (Fluka) antes da esterilização do meio. O armazenamento das leveduras foi realizado em meio YP-ágar com 20 g/L de glicose (Vetec) em tubos inclinados e armazenados a 4°C por até quatro meses.

#### 3.2 Linhagens e iniciadores

A linhagem parental utilizada neste trabalho foi a CAT-1 (Tabela 1), isolada da Usina VO Catanduva/SP em 1998/1999 (BASSO et al., 2008), e as leveduras recombinantes foram a GMY05 e GMY08 (MULLER, 2013). Os iniciadores utilizados neste trabalho estão descritos na Tabela 1.

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

Linhagens	Genoma	Referência
CAT-1	genoma diploide	(BASSO et al., 2008)
GMY05	CAT-1 <i>SUC2 SUC2 P<sub>GPD</sub>::AGT1 AGT1</i>	(MULLER, 2013)
GMY08	VRG02 <i>loxP-KanMX-loxP P<sub>ADH1</sub>::iSUC2 suc2::loxP-Ble<sup>r</sup>-loxP::suc2</i>	(MULLER, 2013)

Tabela 2 – Iniciadores utilizados neste trabalho

Iniciador	Seqüência	Aplicação
ACT1F	GCCTTGGACTTCGAACAAGA	qPCR
ACT1R	TCCTTCTGTTTTGGGTTTGG	qPCR
AGT1-1347F	TGGTGGGAATGGGTTTTGGTT	qPCR
AGT1-1397R	CCACCGGCACCACTACTAGC	qPCR
qPCR-SUC2-F	TCCGCTTTTGCCGACTTATC	qPCR
qPCR-SUC2-R	ACCACGGTCCAAAAGAAGG	qPCR
qPCR- MALx1-F	CTCATGGCGCTAAAAATGGGT	qPCR
qPCR- MALx1-R	AAGAACGCGACAACCATTAGAAG	qPCR
qPCR- MALx2-F	GGCGTTGATGCTATTTGGGTTTGT	qPCR
qPCR- MALx2-R	GAGGTCTCCAGAAGAACCAGTCAC	qPCR
qPCR- MALx3-F	GTATTTACTGTACCAGG	qPCR
qPCR- MALx3-R	TCTTCAGTGCAAGAA	qPCR
qPCR- IMA5 - F	ACAATGACGGATGGGGTGATTTAGC	qPCR
qPCR- IMA5 - R	CAACAATAACCTTGATACCTCTCTTATGAGC	qPCR

### 3.3 Análise da expressão gênica por PCR em tempo real

Para a análise da expressão dos genes *AGT1*, *SUC2*, *MALx1*, *MALx2*, *MALx3* e *IMA5*, as células foram coletadas, centrifugadas (7.000 g, 4 min) e em seguida realizada a extração do RNA total utilizando o RNeasy Mini Kit (Qiagen), de acordo com as instruções do fabricante. Em seguida, 0,5 µg de RNA total foram utilizados para a síntese de cDNA com o QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen), conforme instruções do fabricante. Para realização do PCR em tempo real, foi utilizado o QuantiFast Sybr Green PCR Kit (Qiagen). As reações de 20 µL continham 10 µL de SYBR Green qPCR Mix 1x e o volume restante continha o cDNA para cada amostra e os iniciadores. Os oligonucleotídeos específicos para cada gene utilizado nessas reações estão descritos na Tabela 3. Para a reação de amplificação, a concentração de oligonucleotídeos foi 0,3 µM. Também foram calculadas as eficiências de amplificação dos pares de oligonucleotídeos através da amplificação de uma curva padrão de cDNA com cinco pontos (400 ng; 200 ng; 100 ng; 50 ng e 25 ng) para cada par de oligonucleotídeo. Assim, a concentração de cDNA estipulada para as reações foi de 100 ng.

As reações de PCR em tempo real foram realizadas no equipamento Rotor-Gene Q (Qiagen), e a ciclagem ocorreu em duas etapas: 40 ciclos de 5 segundos de desnaturação a 95 °C e 10 segundos de anelamento dos iniciadores e extensão. Ao final da última etapa de cada ciclo ocorreu a aquisição de fluorescência. Os dados gerados a partir dessas reações foram analisados a partir do software próprio do equipamento. Em cada

ensaio, foi gerada uma curva de dissociação (ou curva de melting) para confirmar a amplificação de apenas um produto.

Para análise da expressão relativa, foram subtraídos dos valores de Cts (Tempo de Ciclagem) do gene de interesse dos valores de Cts do gene constitutivo de cada amostra. Desse valor gerado, foi subtraído o valor médio do controle para cada amostra, incluindo o próprio controle. Finalmente, cada valor gerado serviu como um expoente negativo de base 2. A fórmula do método comparativo  $\Delta\Delta CT$ ,  $2^{-\Delta\Delta CT}$ , foi proposta por SCHMITTGEN e LIVAK (2008), e foi utilizada para realizar os cálculos da expressão relativa neste trabalho (Equação 3.1).

$$\Delta\Delta CT = (Ct_{alvo} - Ct_{constitutivo})^{teste} - (Ct_{alvo} - Ct_{constitutivo})^{controle} \quad (3.1)$$

O gene normalizador utilizado em nossas reações foi o *ACT1*, responsável pela síntese de  $\beta$ -actina e expresso constitutivamente em leveduras *S. cerevisiae*. Já a expressão dos genes *SUC2*, *AGT1*, *MALx1*, *MALx2*, *MALx3* e *IMA5* na linhagem industrial CAT-1 foram utilizados como calibrador para o cálculo da expressão relativa.

### 3.4 Cultivos Celulares

#### 3.4.1 Pré-cultivos

Os pré-cultivos das leveduras foram realizados em 4 mL de meio rico YP acrescidos 20 g/L de glicose e incubados a 28°C, por 48 horas a 160 rpm. Para determinação da massa seca de leveduras, foi utilizada a equação 3.2. Primeiramente foi medida a densidade óptica da amostra em comprimento de onda de 570 nm, devendo a leitura da absorbância ficar entre 0,030 a 0,300. Ao valor da absorbância mensurada, multiplicou-se o Fator de Conversão 0,27 para a determinação da concentração celular. Esse valor foi obtido pela razão entre a massa seca de células e a absorbância da cultura.

$$X_{biomassa} = ABS_{amostra} \cdot D \cdot FC \quad (3.2)$$

$X_{biomassa}$  = Concentração da biomassa celular na amostra expressa em g L<sup>-1</sup>;

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

D = Fator de diluição da amostra;

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

### 3.4.2 Crescimento em frasco agitado

A partir da pré-cultura descrita anteriormente, foi adicionado 1/100 do volume de células em relação ao volume de meio rico YP contendo 20 g/L de maltotriose. As células foram crescidas sob agitação constante de 160 rpm, a 28°C. As amostras foram retiradas em intervalos de tempo no intuito de coletar o maior número de pontos dentro da fase exponencial de crescimento celular. A partir dessas amostras, foi realizada a leitura da absorbância em 570 nm e alíquotas de 500 µL foram centrifugadas (5.000 g, 4 min), o sobrenadante coletado e estocado a 20°C (freezer) para posterior análise dos açúcares e etanol.

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

### 3.5 Determinações Bioquímicas

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

### 3.6 Determinação da atividade de transporte de pNF $\alpha$ G

A atividade de transporte nas linhagens analisadas foi determinada utilizando células intactas conforme o método colorimétrico proposto por HOLLATZ E STAMBUK (2001). O princípio do método baseia-se na utilização do p-nitrofenil- $\alpha$ -D-glucopiranosídeo, substrato sintético estruturalmente análogo à maltose, para avaliar a capacidade das leveduras em transportar  $\alpha$ -glucosídeos. Em *S. cerevisiae*, esse substrato é transportado com alta afinidade pelo transportador Agt1p, e a seguir é hidrolisado por  $\alpha$ -glicosidases. A liberação do p-nitrofenol, composto químico de cor amarela, permite estimar a atividade de transporte, através

da intensidade de cor medida em espectrofotômetro. Partindo de suspensões celulares (20 g/L), 100 µL foram transferidos para 02 tubos e fervidos a 100°C, a fim de preparar os controles negativos. Outros 100 µL foram adicionados juntamente com 100 µL de pNFαG (tampão MOPS-NaOH pH 6,8) durante 5 ou 10 min a temperatura ambiente, dependendo se a linhagem possui ou não, respectivamente, a permease Agt1p no genoma. As reações foram interrompidas através da adição de 1 mL de 2 M de bicarbonato de sódio. As amostras foram centrifugadas a 12.000 rpm por 3 min e o p-nitrofenol liberado foi medido por absorvância a 400 nm utilizando 800 µL do sobrenadante. Todas as análises foram feitas em triplicatas e os controles negativos com células fervidas, em duplicata. As atividades de transporte foram expressas em nmoles de p-nitrofenol liberado por mg de células (massa seca) por min.

### **3.7 Purificação da Enzima Invertase**

#### **3.7.1 Obtenção do Extrato Celular**

Para a obtenção do extrato celular de células reprimidas por glicose, as células foram crescidas meio rico YP contendo 40 g/L de glicose. O crescimento foi mantido sob agitação constante de 160rpm, a 28°C. Após 9 horas, aproximadamente, quando a concentração de açúcar no meio estava em 20 g/L de glicose, as células foram coletadas em tubos Falcon de 50 mL e centrifugadas a 3.000g por 5 minutos. Após isso elas foram lavadas 3 vezes com água destilada à 4 °C. Depois foram lavadas com tampão A (100 mM MOPS-NaOH pH 6,8), mas dessa vez centrifugadas à 5.000 g por 3 minutos e o sobrenadante foi descartado. Foi adicionado ao Falcon 10 mL de tampão B (20% glicerol, 1mM EDTA, 1mM DTT e tampão A) e aproximadamente 5 mL de bolinhas de vidro tratadas com ácido (Sigma, 425-600 µm). O Falcon foi vortexado por 1 minuto e ficou no gelo por 1 minuto, de modo que esse processo se repetiu por 5 vezes. Com esse processo concluído as células foram centrifugadas à 5.000 g por 3 minutos e o sobrenadante (extrato) foi coletado com uma pipeta e armazenado em Falcons de 15 mL no freezer à -20 °C.

#### **3.7.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência**

A coluna de troca iônica usada neste processo foi a Resource Q (GE Healthcare) de 1 mL, ligada a um equipamento AktaPrime Plus (GE Healthcare). A coluna foi equilibrada em tampão A (10 mM Tris-HCl, pH 8), e após injeção da amostra, a coluna foi lavada com 5 vezes o seu volume com tampão A para que as proteínas que não se ligaram sejam

eluídas. A seguir iniciamos a passagem do Tampão B (10 mM Tris-HCl contendo 1M NaCl, pH 8) com um gradiente linear de 30% a 80%. Depois o gradiente foi elevado a 100%, e passados 5 volumes da coluna. Todas as soluções usadas nesse processo foram desgaseificadas e filtradas em filtro milipore de 0,22 µm (o extrato celular foi somente filtrado). As amostras coletadas foram de 0,5 mL e, então, submetidas às análises bioquímicas. O processo de purificação foi avaliado mediante análises de atividade das frações sobre substratos específicos, assim como por SDS-Page e espectrometria de massas.

### **3.8 Quantificação de Proteínas**

A concentração de proteína foi determinada de acordo com o método de Bradford (1976), utilizando a ovo albumina como padrão.

### **3.9 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida Contendo SDS (lauril sulfato de sódio)**

As proteínas foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida (Page) contendo SDS (LAEMMLI, 1970). Foram utilizadas placas de vidro de tamanho 8 x 10 cm e espaçadores de 1,0 mm. O gel de separação de 10% acrilamida foi preparado misturando-se 3,34 mL de solução acrilamida-bisacrilamida (30:0,8), 4,01 mL de água destilada, 2,5 mL de tampão 1,5 M Tris/HCl, pH 8,8, 0,1 mL de 10% SDS, 0,05 mL de 10 % persulfato de amônio, e 0,005 mL de TEMED, perfazendo um volume final de 10,005 mL. O gel de aplicação (“stacking”) foi preparado misturando-se 2,1 mL de água destilada, 0,5 mL de acrilamida-bisacrilamida (30:0,8), 0,38 mL de tampão 1,0 M Tris/HCl pH 6,8, 0,05 mL de 10% SDS, 0,025 mL de 10% persulfato de amônio, e 0,005 mL de TEMED, perfazendo um volume final de 3,06 mL. O tampão de corrida utilizado na cuba de eletroforese foi o tampão 25 mM Tris, 192 mM glicina e 0,1% SDS, pH 8,3.

As amostras foram dissolvidas em tampão de amostra (0,5 M Tris/HCl pH 6,8 contendo 10% glicerol, 10% SDS, e 1% de azul de bromofenol). A eletroforese foi processada a uma voltagem constante de 150 V durante aproximadamente 1 hora. Após a corrida, o gel foi corado com Coomassie blue R ou nitrato de prata. O marcador de peso molecular utilizado foi o BenchMark Prestained (Novex) composto por 10 proteínas com pesos moleculares variando de 6 kDa à 180 kDa.

### **3.10 Coloração com Coomassie Blue R-250**



Após SDS-Page o gel foi colocado numa solução fixadora contendo 30% de etanol e 10% de ácido acético (v/v) e mantidos sob agitação por 30 min. Em seguida a solução fixadora foi trocada pela solução de coomassie 0,025% (m/v), e o gel ficou overnight para obter coloração. Decorrido este tempo, a solução de corante foi retirada do recipiente contendo o gel e o excesso de coomassie foi eliminado através de diversas incubações em solução descorante (20% etanol e 5% ácido acético (v/v)). Após o término do procedimento, o gel permaneceu numa solução preparada com 5% de ácido acético (v/v) para preservar o gel.

### **3.11 Coloração com Nitrato de Prata**

As proteínas presentes nos géis foram reveladas por precipitação com nitrato de prata (BLUM et al., 1987). Os géis foram fixados em 50% de metanol contendo 5% de ácido acético por 20 min. Após a fixação, os géis foram incubados em 5% de metanol por 10 min. Em seguida foram lavados em água ultrapura. Após esse período os géis foram sensibilizados com 0,02% de tiosulfato de sódio por 1 min, lavados com água ultrapura por 1 min, e incubados com 2 g/L de  $\text{AgNO}_3$  por 20 min. A seguir os géis foram lavados com água ultrapura por 1 min, e a revelação realizada com 2% carbonato de sódio contendo 0,4% de formaldeído 37%, e parada com 5% ácido acético por 20 min. Os géis foram armazenados em 2% ácido acético.

### **3.12 Ensaio enzimáticos**

A hidrólise de 100 mM de maltotriose, maltose, sacarose ou rafinose, ou ainda 2 mM de pNF $\alpha$ G, foi avaliada utilizando-se células permeabilizadas (STAMBUK 1999), extratos celulares, frações das cromatografias, ou ainda frações do gel de poliacrilamida, utilizando-se tampão 100 mM Mops-NaOH, pH 6,8, ou alternativamente tampão 0,5 M Succinato-Tris, pH 5,0. As reações foram incubadas à 30°C por 15-60 minutos e, após decorrido esse tempo, foram fervidas a 100°C para inativar as enzimas. A seguir foram quantificados os produtos formados (glicose, frutose, melibiose ou p-nitrofenol). Para o ensaio de inativação térmica a solução contendo atividade enzimática foi incubada em banho maria à 44°C durante 60 minutos, sendo que a cada 10 minutos foram retiradas alíquotas, que ficavam armazenadas no gelo até ser avaliada a hidrólise dos diferentes substratos. Para a determinação dos parâmetros cinéticos foi determinada a  $V_0$  (velocidade inicial) de hidrólise utilizando-se 10 diferentes concentrações de substrato, e plotadas no

gráfico de Michaelis-Menten ou no gráfico duplo-recíproco de Lineweaver-Burk.

### **3.13 Ensaio de hidrólise de substratos no gel de poliacrilamida**

O ensaio em gel de poliacrilamida usando o TTC (Triphenyl Tetrazolium Chloride) permite a visualização de bandas vermelhas quando há presença de açúcares redutores na mesma. Após o término da corrida do gel esse foi transferido para um recipiente com 50 ml de 2,5% Triton X-100, e incubado à temperatura ambiente por 30 min. A seguir o gel foi transferido para outro recipiente contendo o substrato (0,5 M de sacarose ou rafinose em 100 mM de fosfato de sódio, pH 6,0) e incubado por 15 minutos a 30°C. Após a incubação o gel foi transferido para uma solução de 0,5 M de NaOH contendo 0,05% de TTC, e revelado em banho maria à 90°C (GABRIEL, 1971). Alternativamente, após a corrida do gel cada raia foi cortada em 12 pedaços de 0,5 mm, e cada pedaço de gel foi incubado em 50 µl de Mops-NaOH pH 6,8 a 30°C por 15 min na presença dos substratos de interesse, para posterior dosagens dos produtos formados.

### **3.14 Quantificação de glicose**

A concentração de glicose foi determinada através de kit enzimático comercial (GLICOSE PAP Liquiform - Labtest Diagnóstica S.A). O princípio do método consiste na oxidação da glicose pela enzima glicose oxidase (GOD), produzindo ácido glicônico e peróxido de hidrogênio. Em seguida, a enzima peroxidase (POD) catalisa a reação entre o peróxido de hidrogênio, a 4-aminoantipirina e o fenol, formando a quinonimina, que é um complexo químico de cor vermelha. A intensidade de cor, medida numa Leitora Multifuncional (TECAN, modelo M200) com comprimento de onda de 505 nm, é proporcional à concentração de glicose nas amostras.

### **3.15 Quantificação de açúcar redutor**

A concentração de açúcar redutor (frutose ou melibiose) foi determinada quimicamente utilizando um protocolo adaptado de Miller (1959). O princípio do método consiste na reação dos açúcares redutores com o ácido dinítrosalicílico em meio alcalino para formar um complexo de cor púrpura-carmin. A intensidade de cor formada foi determinada numa Leitora Multifuncional (TECAN) no comprimento de onda de 540 nm.

### 3.16 Espectrometria de Massa (MALDI-TOF)

Amostras de proteína foram tiradas de um gel corado com Coomassie blue, as bandas foram descoradas com uma solução contendo 50% de acetonitrila em 25 mM de bicarbonato de amônio e foram desidratadas com acetonitrila pura e secas em vácuo. Em seguida, fez-se a digestão com tripsina a uma concentração final de 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  em 25 mM de bicarbonato de amônio pH 8.0, incubando no escuro a 37 °C durante 12 horas. Para a extração dos polipeptídios usou-se uma solução contendo 50% de acetonitrila e 5% TFA (ácido trifluoroacético). A matriz utilizada foi de  $\alpha$ -ciano (10 mg de ácido  $\alpha$ -ciano- 4-hidrocinâmico em 10 mL de 1:1 acetonitrila 5% com 3% TFA) e, juntamente com uma solução padrão de peptídeo, foi colocada (1  $\mu\text{L}$  de cada) em uma placa de platinum. Após as amostras secarem completamente foi adicionado 2  $\mu\text{L}$  de TFA 0,1% para ressuspender os peptídeos. As amostras foram encaminhadas ao espectrômetro de massa MALDI autoflex III smartbeam (Bruker) e os espectros de massa foram coletados na faixa de massas de 600 a 3000 m/z. Esses espectros foram analisados com o software MASCOT que os confronta com o banco de dados NCBI (National Center for Biotechnology Information).



## 4. Resultados e Discussão

### 4.1 Utilização de maltotriose pela levedura industrial CAT-1

Conforme descrito na introdução deste trabalho, o perfil de utilização de maltotriose observado em cepas recombinantes sobre-expressando o gene *AGT1*, que estavam sendo utilizadas pelo nosso grupo de pesquisa (BASSO et al., 2011; MULLER, 2013), foi bastante curioso e inesperado. Como forma inicial no processo de investigação da possível atividade da invertase intracelular sobre a maltotriose realizamos um crescimento celular com o intuito de avaliar o perfil de utilização de maltotriose pelas cepas recombinantes e comparar com a cepa parental.

Como já observado em trabalhos anteriores, a cepa CAT-1 não foi capaz de crescer utilizando como fonte de carbono a maltotriose, visto que é possível observar na Figura 4.1 que não há produção de biomassa e nem consumo de maltotriose por essa levedura durante as primeiras ~120 h de cultivo. No entanto, quando observamos o padrão de crescimento e consumo de maltotriose pela linhagem geneticamente modificada GMY05 verifica-se que embora ela consiga consumir a maltotriose e gerar biomassa, isso não ocorre de forma eficiente, visto que mesmo depois de 120 horas de crescimento a maltotriose não foi totalmente consumida. Quando analisamos a produção de álcool verificamos que a linhagem GMY05 não o produziu, o que indica que a utilização da maltotriose, por ter ocorrido lentamente, direcionou a glicose originada para a via respiratória. Portanto, este resultado indicava que no caso da linhagem industrial CAT-1 a sobre-expressão da permease *Agt1* melhorava o consumo do açúcar, mas não permitiu a eficiente fermentação deste  $\alpha$ -glicosídeo.

De qualquer forma, ao determinar a atividade de transporte de pNF $\alpha$ G, um substrato específico para a permease *AGT1* (HOLLATZ e STAMBUK, 2001), verificamos (Figura 4.2) que de fato a linhagem CAT-1 não transporta este substrato (atividade <0,2 nmoles/min.mg célula), enquanto que a linhagem GMY05 apresentou uma atividade aproximadamente 10 vezes maior de transporte de pNF $\alpha$ G (atividade ~2,5 nmoles/min.mg célula), confirmando a correta sobre-expressão do transportador *AGT1* na linhagem geneticamente modificada.

Como pode ser observado na Figura 4.1, inesperadamente a linhagem GMY08 foi capaz de consumir e fermentar a maltotriose mais eficientemente do que a linhagem GMY05. Esse resultado é bastante intrigante, visto que a única diferença entre a cepa GMY05 (que utiliza lentamente a maltotriose) e GMY08 (que utilizada rapidamente a

maltotriose) é a presença do gene *iSUC2* sobre-expresso nas células de levedura. Como forma de elucidar tal fato resolvemos avaliar se esta enzima é capaz de hidrolisar a maltotriose, o que seria muito curioso, visto que a invertase é conhecida como uma enzima com atividade  $\beta$ -frutosidase, e não uma  $\alpha$ -glicosidase capaz de hidrolisar, por exemplo, a maltotriose (e maltose, sacarose, etc.), como é o caso das enzimas codificadas pelos genes *MALx2*.

Figura 4.1 – Crescimento celular e consumo de maltotriose (painel esquerdo) e produção de etanol (painel direito) pelas linhagens CAT-1, GMY05 e GMY08.

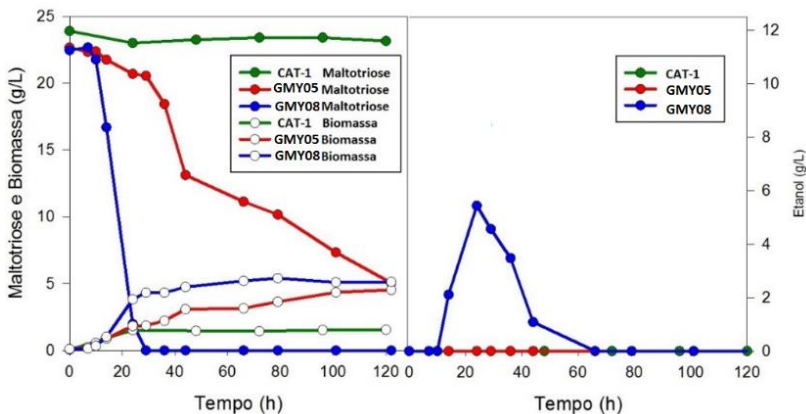
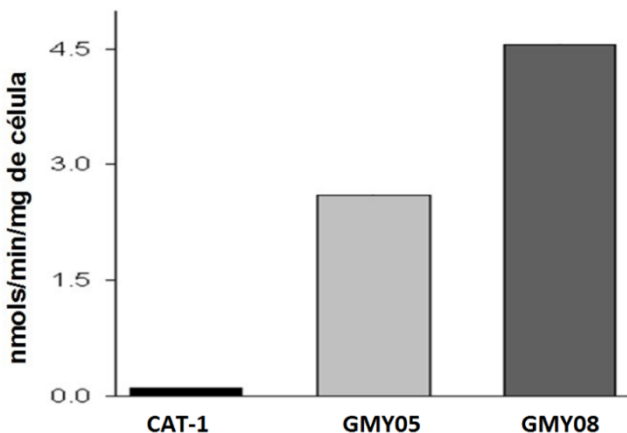


Figura 4.2 – Transporte de pNF $\alpha$ G pelas linhagens CAT-1, GMY05 e GMY08 crescidas em meio rico YP contendo 2% de maltose.

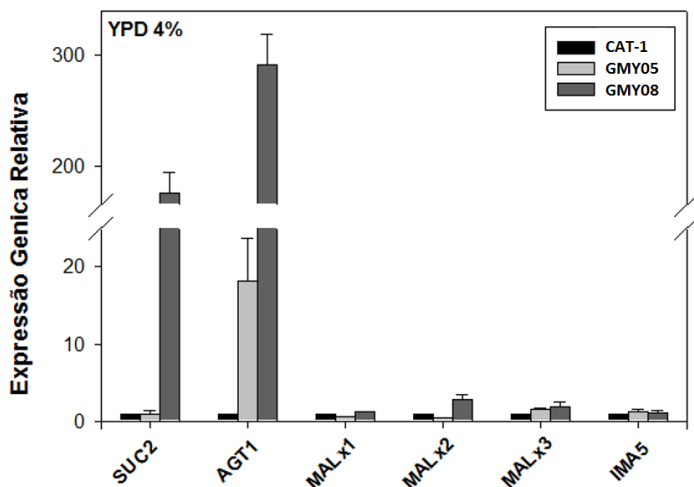


## 4.2 Hidrólise de di- e oligossacarídeos pela linhagem industrial GMY08

A linhagem GMY08 possui tanto o gene *AGT1* quanto o gene *iSUC2* sob controle de promotores constitutivos (GPD e ADH1, respectivamente), que devem expressar os respectivos RNAs mesmo quando as células estão crescendo em glicose (células reprimidas pela glicose). Por outro lado, as  $\alpha$ -glicosidases codificadas pelos genes *MALx2*, que podem hidrolisar a maltotriose e outros  $\alpha$ -glucosídeos (incluindo a sacarose), são enzimas normalmente reprimidas pela glicose (NEEDLEMAN, 1991). Assim, como forma de inibir a expressão desses genes, crescemos as células em meio rico YP suplementado com 4% de glicose, e as células foram coletadas no início da fase exponencial, momento em que a concentração de glicose ainda era alta (~2%). Estas células tiveram seu RNA purificado e utilizado para a determinação da expressão dos genes *AGT1*, *SUC2*, *MALx1*, *MALx2*, *MALx3* e *IMA5* através de qPCR. Como pode ser observado na Figura 4.3, enquanto que o gene *AGT1* é expresso nas linhagens GMY05 e GMY08 mesmo após crescimento em 4% glicose, este gene não é expresso na linhagem CAT-1 nestas condições, confirmando a modificação genética no promotor deste transportador que permite a sobre-expressão da permease *AGT1*. Curiosamente a expressão do gene *AGT1* na linhagem GMY08 é maior do que na linhagem GMY05, o que é também observado ao analisarmos a atividade de transporte de pNF $\alpha$ G (Figura 4.2 acima) por estas duas linhagens. Como seria também esperado para a expressão da invertase, uma enzima reprimida pela glicose, nossos resultados confirmam a ausência da expressão do gene *SUC2* nas linhagens CAT-1 e GMY05 após o crescimento em 4% glicose, enquanto que este gene foi sobre-expresso na linhagem GMY08 graças a modificação genética no seu promotor.

A Figura 4.3 mostra também que nas condições de crescimento utilizadas a expressão dos genes *MAL* (*MALx1*, *MALx2* e *MALx3*) foi reprimida pela presença de glicose. Em relação ao gene *IMA5* podemos observar a sua baixa expressão, mesmo a glicose não atuando como repressora direta desse genes, pois eles não possuem sítios de ligação para a Mig1p na sua região promotora. Mas, ao mesmo tempo que não são reprimidos diretamente pela presença de glicose, esses genes são ativados pelo regulador Malx3p. Portanto, como essa proteína reguladora é reprimida na presença de glicose, o que podemos ver na Figura 4.3, a expressão dos genes *IMA5* não acontece de forma efetiva (TESTE et al., 2010).

Figura 4.3 – Expressão relativa dos genes *SUC2*, *AGT1*, *MALx1*, *MALx2*, *MALx3* e *IMA5*, através de RT-PCR, nas linhagens indicadas após crescimento em meio rico YP contendo 4% de glicose.

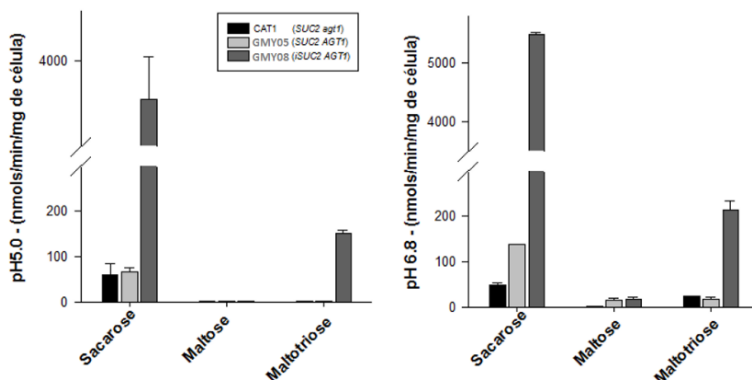


Os resultados de expressão genica mostrados na Figura 4.3 indicam que após crescimento em 4% glicose a única enzima envolvida na hidrólise de di- ou oligossacarídeos que está sendo sobre-expressa nas células é a forma intracelular da invertase (*iSUC2*). Assim, decidimos avaliar a capacidade destas células de hidrolisar a maltotriose, sacarose e maltose (Figura 4.4) utilizando células permeabilizadas e dois pHs diferentes (pH 5 e pH 6,8).

Os resultados mostrados na Figura 4.4 de fato sugerem que a invertase intracelular poderia estar hidrolisando a maltotriose. A levedura CAT-1 e GMY05, que não possuem a invertase intracelular sobre-expressa, apresentaram basicamente o mesmo perfil de atividade sobre a sacarose, e foram incapazes de hidrolisar maltose ou maltotriose. Já a cepa GMY08, que possui a invertase intracelular sobre-expressa (atividade >4000-5000 nmoles/min.mg célula), apresentou uma considerável hidrólise de maltotriose (atividade 150-250 nmoles/min.mg célula), mas não do outro  $\alpha$ -glicosídeo, a maltose, o que provavelmente reflete a ausência de maltase. Portanto, esse resultado nos dá grandes indícios que a maltotriose está sendo hidrolisada pela invertase intracelular (*iSUC2*).



Figura 4.4 – Atividade de hidrólise em pH 5,0 e pH 6,8 de sacarose, maltose ou maltotriose, pelas células permeabilizadas das linhagens CAT-1, GMY05 e GMY08, pré-crescidas em meio rico YP contendo 4% glicose.



Nesse mesmo experimento avaliamos a influência do pH na hidrólise dos açúcares, e observamos que o pH com maior atividade enzimática tanto para sacarose como para maltotriose foi o pH 6,8. Embora GASCÓN et al (1968) já tenha demonstrado que o pH ótimo da atividade enzimática da invertase (tanto extracelular como intracelular) é o pH 4,5, nesse mesmo trabalho eles demonstraram que a invertase intracelular após 15 minutos sob o pH 5,0 perde em torno de 20% da sua atividade, ao passo que mesmo após 120 minutos sob pH entre 6 e 7 não há perda de atividade. Portanto, resolvemos realizar os ensaios subsequentes no pH 6,8 de modo a obter melhores resultados de atividade e manter a enzima estável por mais tempo.

É importante salientar que os resultados acima, obtidos com a linhagem industrial GMY08 que sobre-expressa a invertase intracelular, foram também reproduzidos com uma outra linhagem de laboratório (BSY21-34B) que também sobre-expressa a forma intracelular da invertase (alelo *iSUC2*). Quando esta linhagem de laboratório foi crescida em meio rico YP contendo 4% glicose, as células permeabilizadas apresentaram alta atividade de hidrólise de sacarose e maltotriose, mas não de maltose (dados não mostrados), indicando que o fenótipo observado não é uma particularidade da linhagem industrial, mas provavelmente uma característica da forma intracelular da invertase.

Como obtivemos fortes indícios de atividade de hidrólise da maltotriose pela invertase intracelular, resolvemos purificar parcialmente

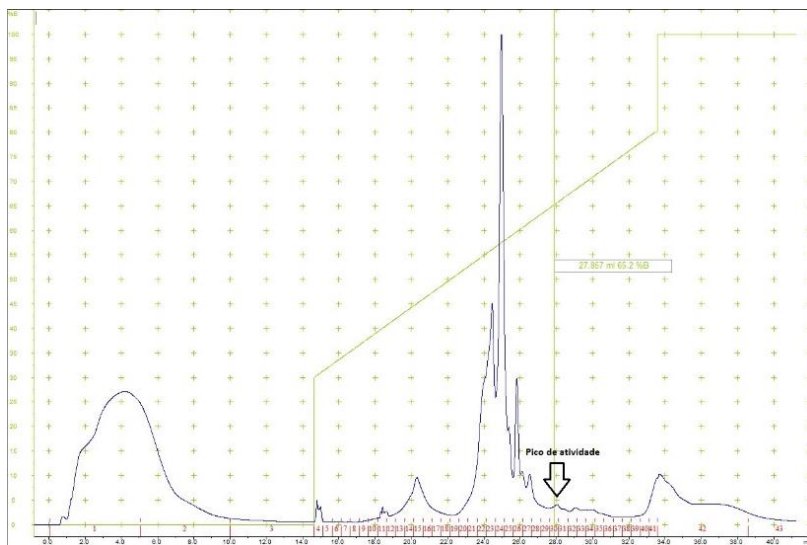
esta enzima, a fim de confirmar se a hidrólise de maltotriose co-purificava com a atividade invertase intracelular. Por outro lado, decidimos ampliar também os substratos a serem testados, e além da maltose e maltotriose, incluir o pNF $\alpha$ G (específico para maltases e  $\alpha$ -glicosidases). Da mesma forma, além da sacarose, incluímos o trissacarídeo rafinose [Gal( $\alpha$ 1-6)Gli( $\alpha$ 1-2 $\beta$ )Fru] que só pode ser hidrolisado por  $\beta$ -frutosidases, produzindo frutose e melibiose [Gal( $\alpha$ 1-6)Gli], ou por  $\alpha$ -galactosidases (ou melibiases), produzindo galactose e sacarose. Para descartar a possível concomitante hidrólise da rafinose por uma  $\alpha$ -galactosidase e uma  $\beta$ -frutosidase, foi determinada a produção de glicose a partir da rafinose, utilizando-se um kit enzimático específico para glicose. A ausência de produção de glicose a partir da rafinose pela linhagem GMY08 confirmou que esta levedura, como típica *S. cerevisiae*, não possui atividade melibiase (YOON et al., 2003), enquanto que esta enzima é facilmente encontrada em outras leveduras *Saccharomyces*, como *S. bayanus*, ou os híbridos *S. pastorianus* (TURAKAINEN et al., 1993).

Extratos celulares de células crescidas em meio rico YP contendo 4% glicose foram aplicados numa coluna de troca iônica Resource Q que possui partículas porosas de resina polimérica, que consiste em partículas rígidas do copolímero de poliestireno-divinilbenzeno, cuja superfície e poros contém os grupos trocadores de íons, que no caso dessa coluna são provenientes da aminação dessa resina (-NH $^{3+}$ ). O ponto isoelétrico da invertase é 4,36 e quando esta enzima está em pH alcalino, como o dos tampões utilizados na cromatografia (pH 8,0), ela torna-se um ânion, de modo que assim interage com os trocadores de íons da resina. Ao passo que o tampão B (solução salina), ao ser aplicado na coluna com um gradiente crescente de concentração, elui as proteínas no sentido das menos aniônicas para as mais aniônicas. Na figura 4.5 é mostrado o perfil de eluição de proteínas da cromatografia, e as frações contendo a atividade invertase encontram-se mais detalhadas na Figura 4.6.

Na figura 4.6 podemos observar a presença de maior atividade de hidrólise dos substratos sacarose, maltotriose e rafinose na fração 30, correspondente à que aparece na Figura 4.5 acima com a indicação de “pico de atividade”. A hidrólise dos 3 substratos coincide na mesma fração, indicando que provavelmente seja a mesma proteína (enzima) que apresenta a capacidade de hidrolisar tanto a maltotriose, como a sacarose e rafinose. É importante salientar que em nenhuma fração foi observada atividade de hidrólise de maltose e pNF $\alpha$ G (Figura 4.6), confirmando a

ausência de atividade  $\alpha$ -glicosidase nas células da linhagem GMY08 crescidas em condições de repressão pela glicose.

Figura 4.5 – Cromatografia de troca iônica aniônica Resource Q do extrato celular da linhagem GMY08 crescida em meio YP-4% glicose. A linha verde mostra o gradiente de concentração do tampão B, que foi de 30% a 80%.



A seguir utilizamos a fração com maior atividade enzimática para avaliar a pureza da amostra através de SDS-PAGE e coração com nitrato de prata. Podemos observar na Figura 4.7-A que tal fração apresenta uma banda mais intensa com um tamanho de aproximadamente 64 kDa, tamanho próximo ao descrito para a invertase (60 kDa). No entanto, há outras proteínas de tamanhos menores na amostra, indicando que a invertase não está pura na fração analisada. A seguir pegamos amostras da mesma fração e corremos um SDS-PAGE, mas dessa vez ao invés de corarmos com nitrato de prata foi realizamos um ensaio em gel de hidrólise dos substratos sacarose e rafinose. A maltotriose não foi usada por ser um açúcar redutor e o TTC, responsável por emitir a cor vermelha, reage exatamente com substâncias redutoras, de modo que todo o gel ficaria vermelho com esse substrato. A sacarose e a rafinose quando hidrolisadas pela invertase liberam açúcares redutores. Como é possível observar nas Figuras 4.7-B e 4.7-C), para cada substrato ocorre a presença de uma banda vermelha do mesmo tamanho da observada no gel corado

com nitrato de prata, confirmando que aquela banda é provavelmente a nossa proteína de interesse.

Figura 4.6 – Atividade de hidrólise dos açúcares indicados pelas proteínas encontradas nas diferentes frações cromatográficas.

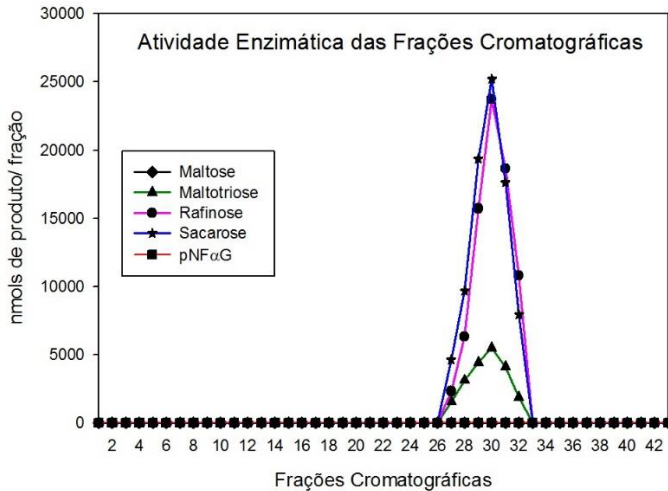
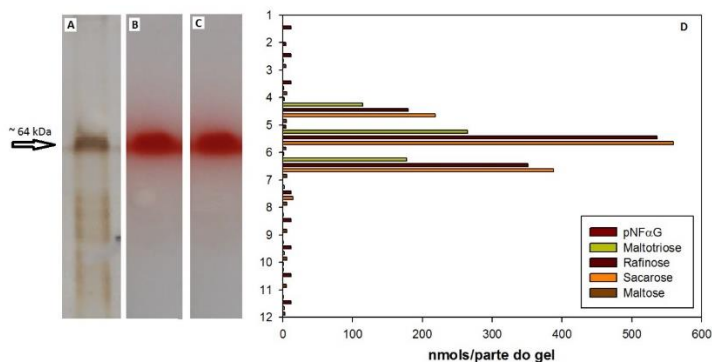


Figura 4.7 – Análise da fração cromatográfica com maior atividade enzimática. Em A temos a fração corada com nitrato de prata após SDS-PAGE. Em B e C as bandas vermelhas, coradas com TTC, correspondem ao produto de hidrólise da sacarose e rafinose, respectivamente. Em D temos o gráfico de atividade de hidrólise das diferentes frações do gel (após SDS-PAGE) sobre os substratos indicados.

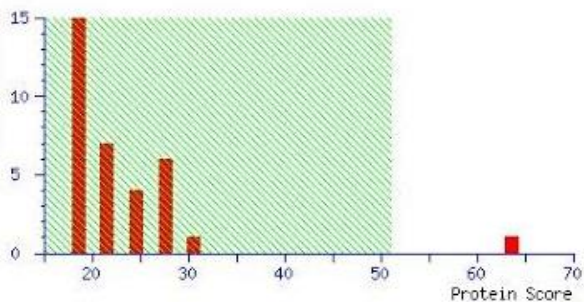


No intuito de avaliar no gel quais proteínas poderiam estar sendo as responsáveis pela hidrólise da maltotriose na fração cromatográfica em análise, a raia do gel após SDS-PAGE foi cortada em 12 pedaços iguais de 0,5 mm, e cada pedaço utilizado para determinar a possível hidrólise de pNF $\alpha$ G, maltotriose, rafinose, sacarose ou maltose. O resultado desses ensaios é visualizado na Figura 4.7-D, onde temos o pico de atividade correspondendo com a banda visualizada tanto no gel corado com nitrato de prata, como com TTC. E, novamente, a atividade observada é apenas sobre a sacarose, rafinose e maltotriose, mas não com pNF $\alpha$ G ou maltose. Inclusive, o padrão de hidrólise segue o mesmo perfil para os 3 substratos. Resultados semelhantes (co-purificação da enzima responsável pela hidrólise de sacarose, rafinose, e maltotriose) foram obtidos quando o extrato celular da linhagem GMY08, pre-crecida em 4% glicose, foi analisado através de cromatografia de troca iônica com DEAE Sepharose Fast Flow, ou de interação hidrofóbica utilizando uma coluna com HiTrap Phenyl FF (ambos da Pharmacia Biotech). Lamentavelmente em nenhum destes procedimentos se obteve uma fração pura de proteína (dados não mostrados).

A seguir resolvemos avaliar a identidade da proteína presente na banda de 64 kDa através de espectrometria de massas. O resultado obtido com essa técnica (Figura 4.8) mostrou que a proteína em questão corresponde de fato à enzima invertase. A pontuação (score) da proteína é representada por  $-10 * \log(P)$ , onde (P) é a probabilidade da combinação (matches) observada ser um evento randômico. Portanto, pontuações acima de 51 são significantes ( $p < 0,05$ ) e, portanto, como a invertase obteve uma pontuação de 64 nós podemos afirmar que a enzima que ali está presente é de fato a invertase. Como forma de corroborar com esse dado, nós pegamos os peptídeos obtidos após as ionizações que apresentaram combinações com a proteína invertase e os excluímos da nossa análise. Após isso nós confrontamos os peptídeos restantes com o banco de dados afim de observar se além da invertase teria alguma outra proteína com significância na nossa amostra. O resultado que obtivemos foi todo para proteínas com pontuações bem abaixo do considerado significativo (dados não mostrados). Portanto, isso nos possibilitou concluir que a enzima presente na fração da cromatografia com atividade de hidrólise de sacarose, rafinose e maltotriose é a invertase, e não há outras enzimas (glicosidases) em quantidades representativas na amostra.

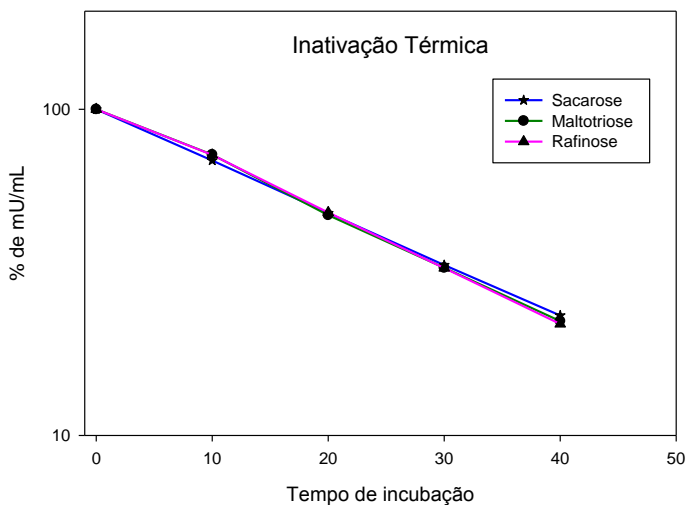
Figura 4.8 – Resultado da espectrometria de massas após confrontação com o banco de dados NCBI através da ferramenta Mascot.

INV2\_YEAST      Mass: 60715      Score: 64      Matches: 9



Com o intuito de fundamentar ainda mais nossos resultados, realizamos ensaios de inativação térmica e determinação do Km para os vários substratos hidrolisados pela enzima presente na fração com maior atividade na cromatografia com Resource Q. O ensaio de inativação térmica tem por objetivo avaliar a perda de atividade da enzima em função da sua exposição à uma determinada temperatura (44°C neste trabalho) ao longo do tempo (40 min). Esta perda de atividade é ocasionada pela desnaturação progressiva da enzima, o que afeta a sua conformação e do sítio ativo, e conseqüentemente vai diminuindo seu poder catalítico sobre o substrato. Quando submetemos a enzima presente na fração cromatográfica a este ensaio nós utilizamos como substratos para medir a sua atividade a sacarose, rafinose e maltotriose (cada um separadamente). Os resultados estão plotados no gráfico abaixo (Figura 4.9) e nos permitem concluir que a perda de atividade ocorre com a mesma cinética para os três substratos analisados. Isso nos permite inferir que a mesma proteína/enzima (invertase intracelular) é a responsável pela hidrólise dos 3 substratos, ao passo que se houvesse outra enzima na fração o perfil de inativação seria diferente para os diferentes substratos analisados.

Figura 4.9 – Inativação térmica da enzima responsável pela hidrólise da sacarose, rafinose e maltotriose, determinada durante a incubação a 44°C durante 40 min.



A determinação do  $K_m$  da enzima presente na fração com maior atividade de hidrólise de sacarose, rafinose e maltotriose através do gráfico duplo-recíproco (Figura 4.10), apresentou valores muito semelhantes de  $K_m$  para sacarose e rafinose aos encontrados na literatura para a invertase (intracelular). Para a sacarose o valor já descrito é de 25 mM e o observado no nosso trabalho foi de 27,7 mM. Já para a rafinose o valor descrito é 150 mM e o que obtivemos foi 153,5 mM (GÁSCON; NEUMANN e LAMPEN, 1968). Para a maltotriose, como ainda não havia sido observada sua hidrólise pela invertase intracelular, nós não temos referência na literatura para comparar o  $K_m$ , no entanto, o valor obtido ( $K_m$  de 851,6 mM) foi bastante alto quando comparado com os outros açúcares analisados neste trabalho. Isso mostra que embora haja hidrólise da maltotriose pela invertase intracelular, a afinidade desta enzima por este substrato é baixa.

Ao passo que a afinidade da invertase intracelular é aparentemente baixa com a maltotriose, quando avaliamos os resultados de crescimento das nossas cepas modificadas geneticamente vemos que a sobre-expressão do gene *iSUC2*, associada à sobre-expressão do gene *AGT1*, é crucial para que as leveduras consumam e fermentem a maltotriose eficientemente. Embora não tenhamos purificado a invertase extracelular e analisado se essa é capaz de hidrolisar a maltotriose, quando avaliamos

o perfil de crescimento da levedura CAT-1 com esse substrato não observamos o seu consumo. Essa levedura possui a invertase extracelular que, se fosse capaz de hidrolisar a maltotriose, faria a sua hidrólise no meio extracelular e seus produtos seriam internalizados pelos seus respectivos transportadores, de modo que a célula poderia crescer e fermentar nesses açúcares. No entanto, seria necessário verificar se a invertase extracelular é expressa quando as células são incubadas na presença de maltotriose.

SAINZ e colaboradores (2013) mostraram, utilizando a invertase intracelular expressa em *Escherichia coli*, que os monômeros dessa enzima se associam em dois tipos diferentes de dímeros que estão por sua vez unidos em um octâmero, melhor descrito como um tetrâmero de dímeros (Figura 4.11). Esses dois tipos diferentes de dímeros diferem no espaço conformacional existente para a ligação do substrato ao sítio ativo da enzima e, portanto, a dimerização desempenha um papel determinante na especificidade ao substrato, ao passo que os dímeros “maiores” permitem o acesso do dissacarídeo (sacarose), diferentemente os dímeros “menores” permitem o acesso de oligossacarídeos curtos de até quatro unidades (p.ex. inulina) ao sítio ativo da enzima.



Figura 4.10 – Gráficos duplo-recíprocos da hidrólise de sacarose (A), rafinose (B) e maltotriose (C), pela enzima presente na linhagem GMY08 crescida em meio YP-4% glicose.

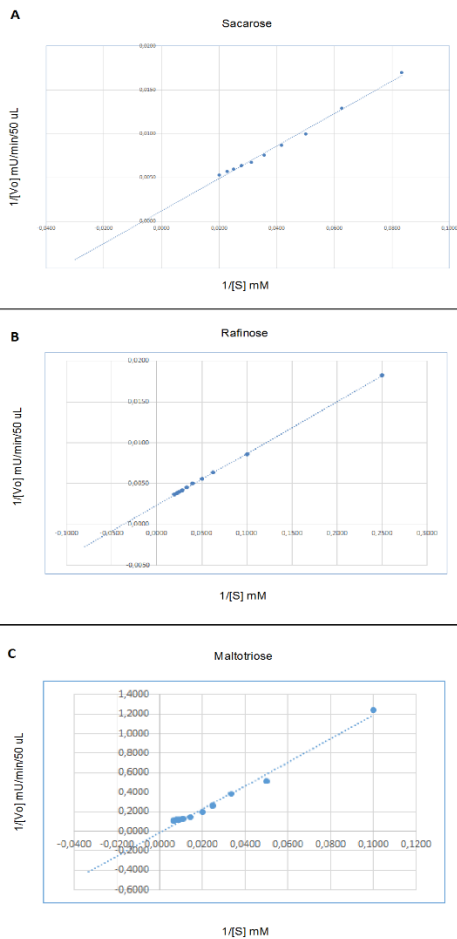
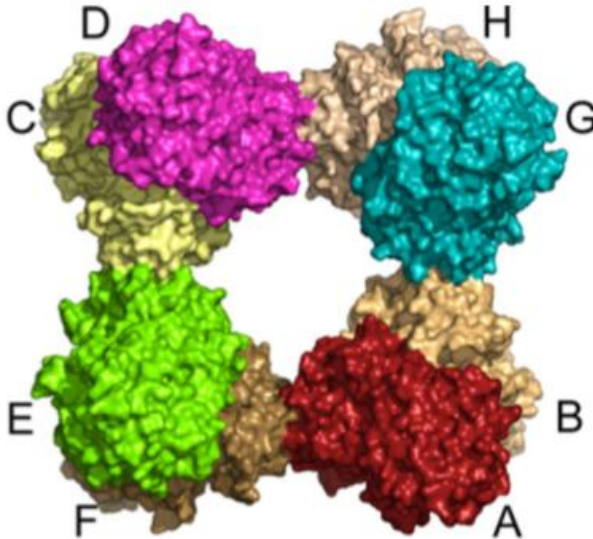
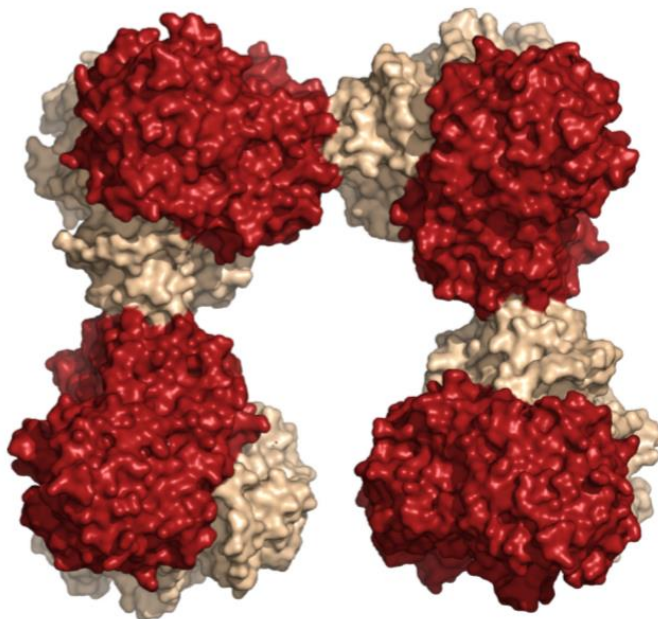


Figura 4.11 – Representação do tetrâmero de dímeros formado pela invertase intracelular. Os dímeros A-B e C-D são os que possuem sítio ativo menor, e os dímeros E-F e H-G apresentam sítios maiores. Fonte: SAINZ et al., (2013).



Eles também mostraram que ao contrário dos oligômeros formados pela invertase intracelular, a invertase extracelular também forma oligômeros, no entanto, eles são formados apenas por um tipo de dímero, o tipo que apresenta o sítio ativo com um espaço menor para a ligação do substrato (Figura 4.12). Esta diferença de dímeros pode ser a responsável pela capacidade da invertase intracelular de hidrolisar a maltotriose, permitindo que este açúcar tenha acesso ao sítio catalítico nos dímeros onde esse é maior (E-F e H-G). Além disso, esse pode ser um dos motivos pelo qual a invertase extracelular não consegue hidrolisar a maltotriose, visto que ela possui apenas os dímeros A-B, cujos sítios de ligação são menores e impediriam o acesso a substratos maiores, como a maltotriose.

Figura 4.12 - Representação do oligômero formado pela invertase extracelular. Este é formado por dímeros A-B, que possuem o sítio catalítico menor. Fonte: SAINZ et al., (2013).





## 5. CONCLUSÕES

Neste trabalho observamos um perfil de hidrólise de açúcares pela invertase intracelular de *Saccharomyces cerevisiae* até então não descrito na literatura. Esse perfil foi o responsável por conferir à uma cepa industrial produtora de etanol combustível modificada a capacidade de utilizar eficientemente e fermentar o  $\alpha$ -glicosídeo maltotriose, o segundo mais abundante açúcar presente em hidrolisados de amido. Portanto, este trabalho foi de suma importância por mostrar um perfil catalítico da invertase intracelular que em décadas de estudo nunca havia sido observado. Além disso, demos início à uma nova fase de pesquisas nas quais a atividade da invertase sobre a maltotriose poderá ser melhor estudada e, com isso, ser possível a otimização de processos fermentativos onde o amido é a fonte principal de carboidrato, como na panificação, produção de cervejas e uísques e bioetanol.



## 6. REFERÊNCIAS.

- ABIP. Indicadores 2014. Disponível em: <http://www.abip.org.br/>  
Acessado em: 20/06/2015.
- 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. *Biochemistry*, v. 29, n. 10, p. 2471–2482, 1990.
- ALVES JR. Expression of *Saccharomyces cerevisiae*  $\alpha$ -glucoside transporters under different growth conditions. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, v. 31, p. 01-08, 2014.
- 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.14941450, 2008.
- AMORIM NETO, H. B.; YOHANNAN, B. K.; BRINGHURST, T. A.; BROSNAN, J. M.; PEARSON, S. Y.; WALKER, J. W.; WALKER, G. M. Evaluation of a Brazilian Fuel Alcohol Yeast Strain for Scotch Whisky Fermentations. *Journal of the Institute of Brewing*, v. 115(3), p. 198–207, 2009.
- AUSUBEL, F. M.; BRENT, R.; KINGSTON, R. E.; MOORE, D. D.; SEIDMAN, J. G.; SMITH, J. A.; STRUHL, K. Short protocols in molecular biology. 2. ed. New York: Greene Publishing Associates, John Wiley & Sons, 1992.
- BADOTTI, F.; BATISTA A.S.; STAMBUK, B.U. Sucrose active transport and fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Braz. Arch. Biol. Technol.*, 49: 115123, 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.; 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.; DE OLIVEIRA, A. J.; LOPES, M. L. Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil. *FEMS Yeast Res.*, v. 8, p. 1155–1163, 2008.
- BATISTA, A. S.; MILETTI, L. C.; STAMBUK, B. U. Sucrose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* lacking hexose transport. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.*, p.26-33, 2004.
- BELL, P. J. L.; HIGGINS, V. J.; ATTFIELD, P. V. Comparison of fermentative capacities of industrial baking and wild-type yeasts of the species *Saccharomyces cerevisiae* in different sugar media. *Lett. Appl. Microbiol.*, v. 32, p. 224-229, 2001.
- BIDENNE, C.; BLONDIN, B.; DEQUIN, S.; VEZINHET, F. Analysis of the chromosomal dna polymorphism of wine strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Current Genetics*, v. 22, p. 1–7, 1992.
- BLUM, H., BEIER, H., GROSS, H.J. Improved silver staining of plant proteins, RNA, and DNA in polyacrilamide gels. *Electro-phoresis* 8, 93–99, 1987.
- BRADFORD M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, v. 72, p. 248–254, 1976.
- BROWN, C. A.; MURRAY, A. W.; VERSTREPEN, K.J. Rapid expansion and functional divergence of subtelomeric gene families in yeast. *Current Biology*, v. 20 p. 895–903, 2010.
- CARLSON, M.; BOTSTEIN, D. Organization of the suc gene family in *Saccharomyces*. *Molecular and Cellular Biology*, v. 3, n. 3, p. 351–359, 1983.
- CARLSON, M.; BOTSTEIN, D. Two differentially regulated mRNAs with different 5' ends encode secreted and intracellular forms of yeast invertase. *Cell*, v. 28, p. 145–154, 1982.
- CARLSON, M.; CELENZA, J. L.; ENG, F. J. Evolution of the dispersed SUC gene family of *Saccharomyces* by rearrangements of chromosome telomeres. *Molecular and Cellular Biology*, v. 5, n. 11, p. 2894–2902, 1985.
- CERVBRASIL. Anuário 2014. Disponível em: <http://cervbrasil.org.br>  
Acessado em: 20/06/2015.
- 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.



- CHARRON, M. J.; MICHELS, C. A. The constitutive glucose-repression-insensitive mutation of the yeast MAL4 locus is an alteration of the MAL3 gene. *Genetics*, v. 116, p. 23-31, 1987.
- D'AMORE, T.; RUSSELL, I.; STEWART, G. G. The effect of carbohydrate adjuncts on brewer's wort fermentation by *Saccharomyces uvarum* (carlsbergensis). *J. Inst. Brew.*, v. 95, p. 333336, 1989.
- DA SILVA, C. L. Indústria cervejeira: um mercado em constante transformação. *Revista FAE Business*, v. 6, p. 50-53, 2003
- DEMARINI, D. J.; CARLIN, E. M.; LIVI, G. P. Constitutive promoter modules for pcr-based gene modification in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, v. 18, p. 723 – 728, 2001.
- DENAYROLLES, M. et al. Incidence of suc-rtm telomeric repeated genes in brewing and wild wine strains of *Saccharomyces*. *Current Genetics*, v. 31, p. 457–461, 1997.
- DIETVORST, J.; LONDESBOROUGH, J.; STEENSMA, H. Y. Maltotriose utilization in lager yeast strains: MTT1 encodes a maltotriose transporter. *Yeast*, v. 22, p. 775-788, 2005.
- 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.
- ERNANDES, J. R.; WILLIAMS, J. W.; RUSSELL, I.; STEWART, G. G. Effect of yeast adaptation to maltose utilisation on sugar uptake during the fermentation of brewer's wort. *J. Inst. Brew.*, v. 99, p. 67-71, 1993.
- ERNST & YOUNG. The contribution made by beer to the European economy. Disponível em: [www.brewersofeurope.org](http://www.brewersofeurope.org). Acessado em: 20/06/2015.
- GABRIEL, O. Locating enzymes on gels. In: Jakoby, W.B. (Ed.) *Enzyme Purification and Related Techniques*, vol. 1. Academic Press, New York, pp. 578–604 (Methods in Enzymology, 22), 1971.
- GANCEDO, J. M. Yeast carbon catabolite repression. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, v. 62, p. 334361, 1998.
- GASCÓN, S.; NEUMANN, N.P.; LAMPEN, J.O. Comparative study of the properties of the purified internal and external invertases from yeast. *J. Biol. Chemistry*, v.243, p.1573-1577, 1968.
- GIBSON, A. W.; WOJCIECHOWICZ, L. A.; DANZI, S. E.; ZHANG, B.; KIM, J. H.; HU, Z.; MICHELS, C. A. Constitutive mutations of the

- Saccharomyces cerevisiae* MAL-activator genes MAL23, MAL43, MAL63, and mal64. *Genetics*, v. 146, p. 1287-1298, 1997.
- GIBSON, B. R.; LAWRENCE, S. J.; LESCLAIRE, J. P.; POWDEL, C. D.; SMART, K. A. Yeast responses to stresses associated with industrial brewery handling. *FEMS Microbiol. Rev.*, v. 31, p. 535-569, 2007.
- GIETZ, R.; WOODS, R. Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier dna/polyethylene glycol method. *Methods in Enzymology*, v. 350, p. 87–96, 2002.
- GODOY, V. R. Avaliação da funcionalidade do gene AGT1 de leveduras industriais *Saccharomyces cerevisiae* produtoras de álcool combustível. Trabalho de conclusão de curso. Curso de Ciências Biológicas. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2013.
- 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.
- Güldener, U.; Heck, S.; Fielder, T.; Beinhauer, J e Hegemann, J. H. A new efficient gene disruption cassette for repeated use in budding yeast. *Nucleic Acids Research*, v. 24, n. 13, p. 2519–2524, 1996
- GÜLDENER, U.; HEINISCH, J.; KOEHLER, G. J.; VOSS, D.; HEGEMANN, J. H. A second set of loxP marker cassettes for cre-mediated multiple gene knockouts in budding yeast. *Nucleic Acids Research*, v. 30, n. 6, p. e23, 2002.
- HAN, E. K.; COTTY, F.; SOTTAS, C.; JIANG, H.; MICHELS, C. A. Characterization of AGT1 encoding a general  $\alpha$ -glucoside transporter from *Saccharomyces*. *Mol. Microbiol.*, v. 17, p. 1093-1107, 1995.
- HENRISSAT, B.; CALLEBAUT, I.; FABREGA, S.; LEHN, P.; MORNON, J. P. E DAVIES, G. Conserved catalytic machinery and the prediction of a common fold for several families of glycosyl hydrolases. *PNAS*, v. 92, n. 15, p. 7090–7094, 1995.
- HIGGINS, V. J.; BELL, P. J.; DAWES, I. W.; ATTFIELD, P. V. Generation of a novel *Saccharomyces cerevisiae* strain that exhibits strong maltose utilization and hyperosmotic resistance using nonrecombinant techniques. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 67, p. 4346-4348, 2001.
- HIGGINS, V. J.; BRAIDWOOD, M.; BELL, P. J.; BISSINGER, P.; DAWES, I. W.; ATTFIELD, P. V. Genetic evidence that noninduced maltase and maltose permease activities, governed by MALx3-encoded transcriptional regulators, determine efficiency of gas production by baker's yeast in unsugared dough. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 65, p. 680-685, 1999a.

- HIGGINS, V. J.; BRAIDWOOD, M.; BISSINGER, P.; DAWES, I. W.; ATTFIELD, P. V. Leu343Phe substitution in the Malx3 protein of *Saccharomyces cerevisiae* increases the constitutivity and glucose insensitivity of MAL gene expression. *Curr. Genet.*, v. 35, p. 491-498, 1999b.
- HOLLATZ, C.; STAMBUK, B. U. Colorimetric determination of active  $\square$ -glucoside transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Microbiol. Methods*, v. 46, p. 253-259, 2001.
- 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.
- JAMES, T. C.; CAMPBELL, S.; DONNELLY, D.; BOND, U. Transcriptional profile of brewery yeast under fermentation conditions. *J. Appl. Microbiol.*, v. 94, p. 432-448, 2003.
- JESPERSEN, L.; CESAR, L. B.; MEADEN, P. G.; JAKOBSEN, M. Multiple  $\square$ -glucoside transporter genes in brewer's yeast. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 65, p. 450-456, 1999.
- JULES, M.; GUILLOU, V.; FRANÇOIS, J.; PARROU, J. L. Two distinct pathways for trehalose assimilation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 70, p. 27712778, 2004.
- Kellis, M; Patterson, N; Endrizzi, M. Sequencing and comparison of yeast species to identify genes and regulatory elements. *Nature*, v. 423 p. 241–254, 2003.
- KIM, J.; MICHELS, C. A. The MAL63 gene of *Saccharomyces* encodes a cysteine-zinc finger protein. *Curr. Genet.*, v. 14, p. 319-323, 1988.
- Kirin Beer University Report. Global Beer Consumption by Country in 2012. Disponível em: [http://www.kirinholdings.co.jp/english/news/2014/0108\\_01.html](http://www.kirinholdings.co.jp/english/news/2014/0108_01.html)  
Acessado em: 20/06/2015
- KODAMA, Y.; FUKUI, N.; ASHIKARI, T.; SHIBANO, Y.; MORIOKA-FUJIMOTO, K.; HIRAKI, Y.; NAKATANI, K. Improvement of maltose fermentation efficiency: constitutive expression of MAL genes in brewing yeasts. *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, v. 53, p. 24-29, 1995.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* 227, 680–685, 1970.
- LEITE, R. C. C.; LEAL, M. R. L. V. CORTEZ, L. A. B.; GRIFFIN, W. M.; SCANDIFFIO, M. I. G. Can brazil replace 5% of the 2025 gasoline world demand with ethanol. *Energy*, v. 34, p. 655 – 661, 2009.

- 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.
- MANIATIS, T.; FRITSCH, E. F.; SAMBROOK, J. *Molecular cloning: a laboratory manual*. [S.l.]: New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1982.
- MENESES, F. J.; JIRANEK, V. Expression patterns of genes and enzymes involved in sugar catabolism in industrial *Saccharomyces cerevisiae* strains displaying novel fermentation characteristics. *J. Inst. Brew.*, v. 108, p. 322-335, 2002.
- MICHELS, C. A.; NEEDLEMAN, R. B. The dispersed, repeated family of MAL loci in *Saccharomyces* spp. *J. Bacteriol.*, v. 157, p. 949-952, 1984.
- MICHELS, C. A.; READ, E.; NAT, K.; CHARRON, M. J. The telomere-associated MAL3 locus of *Saccharomyces* is a tandem array of repeated genes. *Yeast*, v. 8, p. 655-665, 1992.
- MILLER, G.L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry*, v. 31(3), p. 426-428, 1959.
- MULLER, G. Engenharia genômica de linhagem industrial de *Saccharomyces cerevisiae* visando melhorar a fermentação de sacarose para a produção de álcool combustível no Brasil. Tese de doutorado. Programa de pós-graduação em Bioquímica. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2013.
- MWESIGYE, P. K.; BARFORD, J. P. Mechanism of sucrose utilization by *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, v.42, p. 209-306, 1996.
- Nakao, Y; Kanamori, T; Itoh, T. Genome sequence of the lager brewing yeast, an interspecies hybrid. *DNA resource*, v. 16, p. 115-129, 2009.
- NAUMOV, G. I.; NAUMOVA, E. S. Comparative genetics of yeasts: A novel  $\beta$ -fructosidase gene SUC8 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Russian Journal of Genetics*, v. 46, p. 323-330, 2010a.
- NAUMOV, G. I.; NAUMOVA, E. S. Polygenic control for fermentation of  $\beta$ -fructosides in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: New genes suc9 and suc10. *Microbiology*, v. 79, p. 160-166, 2010b.
- NAUMOV, G. I.; NAUMOVA, E. S.; MICHELS, C. A. Genetic variation of the repeated MAL loci in natural population of *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces paradoxus*. *Genetics*, v. 136, p. 803-812, 1994.

- NEEDLEMAN, R. B. Control of maltase synthesis in yeast. *Mol. Microbiol.*, v. 5, p. 2079-2084, 1991.
- NEEDLEMAN, R. B.; KABACK, D. B.; DUBIN, R. A.; PERKINS, E. L.; ROSENBERG, N. G.; SUTHERLAND, K. A.; FORREST, D. B.; MICHELS, C. A. MAL6 of *Saccharomyces*: a complex genetic locus containing three genes required for maltose fermentation. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v. 81, p. 2811-2815, 1984.
- NEEDLEMAN, R. B.; MICHELS, C. A. Repeated family of genes controlling maltose fermentation in *Saccharomyces carlsbergensis*. *Mol. Cell. Biol.*, v. 3, p. 796-802, 1983.
- NOVAK, S.; ZECHNER-KRPAN, V.; MARIÉ, V. Regulation of maltose transport and metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Technol. Biotechnol.*, v. 42, p. 213-218, 2004.
- ODA, Y.; OUCHI, K. Role of the yeast maltose fermentation genes in CO<sub>2</sub> production rate from sponge dough. *Food Microbiol.*, v. 7, p. 43-47, 1990.
- 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.215218, 1991.
- PETRACEK, M. E.; LONGTINE, M. S. Pcr-based engineering of yeast genome. In: . [S.l.]: Elsevier Inc., v. 350, cap. 25, p. 445-469, 2002.
- QUEROL, A.; BOND, U. The complex and dynamic genomes of industrial yeasts. *FEMS Microbiol. Lett.*, v. 293, p. 1-10, 2009.
- REDDY, V. 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. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 263, p. 6978-6985, 1988.
- SAINZ-POLO, M.; RAMÍREZ, E. M.; LAFRAYA, A, GONZÁLEZ, B.; MARÍN, N. J.; POLAINA, J.; SANZ, A. J. The three-dimensional structure of *Saccharomyces* invertase: role of a non-catalytic domain in oligomerization and substrate specificity. *J Biol Chem*, Não impresso, 2013.
- SALEMA-OOM, M.; PINTO, V. V.; GONÇALVES, P.; SPENCER-MARTINS, I. Maltotriose utilization by industrial *Saccharomyces* strains: characterization of a new member of the aglucoside transporter family. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 71, p. 5044-5049, 2005.
- SAMUEL, D. Investigation of ancient Egyptian baking and brewing methods by correlative microscopy. *Science*, v. 273, p. 488-490, 1996.
- SANTANGELO, G. M. Glucose signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, v. 70, p. 253-282, 2006.

- SCHMITTGEN, T.; LIVAK, K. Analyzing real-time pcr data by the comparative ct method. *Nature Protocols*, v. 3, n. 6, p. 1101–1108, 2008
- SINDICERV. Dados de mercado. Disponível em: <http://www.sindicerv.com.br> Acessado em: 20/06/2015.
- 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  $\alpha$ -glucoside transporters and their ability to transport maltotriose in *Saccharomyces* yeasts. *Ann. Microbiol.*, v. 57, p. 77-84, 2007.
- STAMBUK, B. U. A simple experiment illustrating metabolic regulation: induction versus repression of yeast  $\alpha$ -glucosidase. *Biochem. Educ.*, v. 27, p. 177-180, 1999.
- STAMBUK, B. U.; BATISTA, A. S.; DE ARAÚJO, P. S. Kinetics of active sucrose transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biosci. Bioeng.*, v. 89, p. 212-214, 2000.
- STAMBUK, B. U.; DE ARAÚJO, P. S. Kinetics of active  $\alpha$ -glucoside transport by *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res.*, v. 1, p. 73-78, 2001.
- STEWART, G. G.; ERRATT, J.; GARRISON, I.; GORING, T.; HANCOCK, I. Studies on the utilization of wort carbohydrates by brewer's yeast strains. *Tech. Q. Master Brew. Assoc. Am.*, v. 16, p. 1-7, 1979
- TAUSSIG, R.; CARLSON, M. Nucleotide sequence of the yeast SUC2 gene for invertase. *Nucleic Acids Research*, v. 11, n. 6, p. 1943–1954, 1983.
- TESTE, M. A.; FRANÇOIS, J. M.; PARROU, J. L. Characterization of a New Multigene Family Encoding Isomaltases in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*, the IMA Family. *Journal Biological Chemistry*, v. 285(35), p. 26815-24, 2010.
- TRIMBLE, R. B.; MALEY, F. Subunit structure of external invertase from *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 252, n. 12, p. 4409–4412, 1977.
- Turakainen, H.; Naumov, G.; Naumova, E.; Korhola, M.; Physical mapping of the MEL gene family in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet* v.24(6) p.461-4, 1993.
- 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.
- VENTURINI FILHO, W. G.; CEREDA, M. P. Cerveja. In: AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A. (Eds.). *Biotecnologia industrial: biotecnologia na produção de alimentos*. São Paulo: Edgard Blücher, v. 4. Cap. 4, p. 91-144, 2001.
- 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.
- VITTOLO, M. Aplicações de enzimas na tecnologia de alimentos. In: AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A. (Eds.). *Biotecnologia industrial: biotecnologia na produção de alimentos*. São Paulo: Edgard Blücher, 2001. v. 4. Cap. 14, p. 387-420.
- VITTI, P. Pão. In: AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A. (Eds.). *Biotecnologia industrial: biotecnologia na produção de alimentos*. São Paulo: Edgard Blücher, v. 4. Cap. 13, p. 365-386, 2001.
- 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.
- WILLAERT, R. Sugar consumption kinetics by brewer's yeast during the primary beer fermentation. *Cerevisia.*, v. 26, p. 43-49, 2001.
- Yoon, S.H., Mukerjea, R. and Robyt, J.F. Specificity of yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) in removing carbohydrates by fermentation. *Carbohydr Res* v.338, p.1127-1132, 2003.
- ZASTROW, C. R.; HOLLATZ, C.; DE ARAÚJO, P. S.; STAMBUK, B.U. Maltotriose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, v. 27, p. 34-38, 2001.
- ZASTROW, C. R.; MATTOS, M. A.; HOLLATZ, C.; STAMBUK, B. U. Maltotriose metabolism by *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Lett.*, v. 22, p. 455-459, 2000.
- ZHENG, X.; D'AMORE, T.; RUSSELL, I.; STEWART, G. G. Factors influencing maltotriose utilization during brewery wort fermentations. *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, v. 52, p. 41-47, 1994.