



THIAGO PEREIRA SOUZA

**ANÁLISE POLIGÊNICA DE LEVEDURAS
ISOLADAS DE DESTILARIA DE CACHAÇA
PARA FERMENTAÇÃO DE ALTA EFICIÊNCIA**

LAVRAS - MG

2014

THIAGO PEREIRA SOUZA

**ANÁLISE POLIGÊNICA DE LEVEDURAS ISOLADAS DE
DESTILARIA DE CACHAÇA PARA FERMENTAÇÃO DE ALTA
EFICIÊNCIA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, área de concentração em Microbiologia Agrícola, para a obtenção do título de Doutor.

Orientador

Dr. Eustáquio Souza Dias

LAVRAS - MG

2014

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Coordenadoria de Produtos e
Serviços da Biblioteca Universitária da UFLA**

Souza, Thiago Pereira.

Análise poligênica de leveduras isoladas de destilaria de cachaça para fermentação de alta eficiência / Thiago Pereira Souza. – Lavras : UFLA, 2014.

62 p. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2014.

Orientador: Eustáquio Souza Dias.

Bibliografia.

1. *Saccharomyces cerevisiae*. 2. Fermentação em alta gravidade. 3. Mapeamento genético. 4. Etanol. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 589.233

THIAGO PEREIRA SOUZA

**ANÁLISE POLIGÊNICA DE LEVEDURAS ISOLADAS DE
DESTILARIA DE CACHAÇA PARA FERMENTAÇÃO DE ALTA
EFICIÊNCIA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, área de concentração em Microbiologia Agrícola, para a obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 27 de Fevereiro de 2014.

Dr. Henrique Lopes Brandão	UFMG
Dr. Rogélio Lopes Brandão	UFOP
Dr. Ulisses de Pádua Pereira	UFMG
PhD. Johan Thevelein	KUL

Dr. Eustáquio Souza Dias
Orientador

LAVRAS - MG

2014

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus que possibilitou a realização desse sonho e que me sustentou por todo esse trajeto.

À Universidade Federal de Lavras, ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, em especial a Rose, e a todos os professores. Obrigado pelos ensinamentos, conselhos e ajuda.

Agradeço ao meu orientador, Eustáquio Souza Dias, pela atenção e boa vontade em ensinar e me mostrar o caminho a trilhar. Ao professor Johan Thevelein por me receber em seu laboratório e me ensinar mais sobre as leveduras.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, a Fundação de Amparo a Pesquisa de Minas Gerais – FAPEMIG e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, pela bolsa de estudos e financiamento deste projeto.

Aos colaboradores da banca pela disponibilidade e por todas as sugestões dadas.

Gostaria de agradecer a minha família, que mesmo de longe sempre esteve comigo durante todo esse tempo. Meu pai Walmir Salvador de Souza, minha mãe Janice Almeida Pereira Souza, meus irmãos Michelle Pereira Souza, Marcelle Pereira Souza e Gabriel Salvador de Souza Neto. Vocês são o que há de mais importante pra mim.

À Carolina Gusmão Souza, que me aceitou como seu marido nesta jornada. Você me faz melhor a cada dia. Agradeço a Deus por ter me permitido fazer parte dos seus dias. Te amo. Também a família

Gusmão, em especial a minha sogra Silene Gusmão, Tia Liu e Nayara. Vocês foram essenciais.

A todos os meus amigos “Conquistences” e “Lavrenses” pelo apoio, cuidado e incentivo durante esta etapa de minha vida. Vocês farão sempre parte das minhas boas lembranças.

Para todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para essa vitória, o meu muito obrigado.

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.

Marthin Luther King

RESUMO GERAL

O etanol é um produto de elevada importância econômica, participando de diferentes setores industriais como fármacos, combustíveis e bebidas. A origem do etanol é a mesma independente de sua aplicação, que é a fermentação do mosto rico em açúcares pela levedura *Saccharomyces cerevisiae*. A produção de etanol a partir da cana-de-açúcar é a mais eficiente disponível, porém novas biotecnologias podem ser aplicadas na melhoria do processo. A fermentação em alta gravidade possibilita o aumento da produção de etanol por batelada, reduzindo a produção de resíduos resultando em queda dos custos gerais. Abordagem como mapeamento genético de QTL (Quantitative Trait Loci) tem larga aplicação e tem revelado regiões envolvidas com uma série de fenótipos complexos de interesse, como resistência e produção de etanol. Tendo em vista a pequena quantidade de informação relacionada a leveduras industriais, sobretudo brasileiras, o presente trabalho foi realizado com o objetivo de testar e selecionar linhagens para fermentação em alta gravidade e mapear as regiões (QTL) no genoma da *Saccharomyces cerevisiae* associadas ao fenótipo de máximo acúmulo de etanol. Dentre quatro linhagens de leveduras originárias de produção de cachaça, a linhagem UFLACA798 foi escolhida como a melhor fermentadora em alta gravidade. Após o cruzamento desta com a linhagem S288c, 196 segregantes F1 foram testados em fermentação líquida e 29 apresentando comportamento similar ao parental foram selecionados para o sequenciamento e mapeamento dos QTL's. Os resultados apontaram genes presentes nos cromossomos II, V e VII possivelmente associado ao fenótipo de interesse. Futuras análises *in vivo* são necessárias para confirmar a relação dos genes putativos com o fenótipo em estudo.

Palavras-chave: *Saccharomyces cerevisiae*. Fermentação em alta. Gravidade. Mapeamento genético. Etanol.

GENERAL ABSTRACT

Ethanol is a product of high economic importance, taking part of different industrial sectors such as pharmaceuticals, fuels and beverages. The origin of ethanol, which is the fermentation of must rich in sugars by *Saccharomyces cerevisiae* yeasts is always the same regardless of application. The ethanol production from sugar cane is the most efficient available, but new (bio) technologies can be applied to improve the process. The high gravity fermentation allows higher ethanol production in batch, reducing waste production and, therefore, resulting in less overall costs. Some approaches like genetic mapping of QTL (Quantitative Trait Loci) have wide application and they have shown regions involved in a series of complex phenotypes of interest, such as resistance and ethanol production. Given the small amount of information related to industrial yeasts, especially in Brazil, this study was conducted in order to test and select strains for fermentation in high-gravity as well as to map regions (QTL) in the *Saccharomyces cerevisiae* genome associated to the phenotype of maximum ethanol accumulation. Among four yeast strains from cachaça production, the UFLACA798 strain was chosen as the best fermenter in high gravity conditions. After crossing this (UFLA798) with the S288c strain, 196 F1 segregants were tested in liquid fermentation and 29 segregants presenting a similar parental behavior were selected for sequencing and mapping of QTL. The results indicated genes present in chromosomes II, V and VII possibly associated with the phenotype of interest. Further *in vivo* analysis are required to confirm the relationship of putative genes with the phenotype under study.

Keywords: *Saccharomyces cerevisiae*. High gravity fermentation. Genetic mapping. Ethanol.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figura 1 Produção de etanol combustível no mundo (bilhões de litros) 15

CAPÍTULO 2

Figura 1 Esquema do cassete utilizado na deleção do gene HO na linhagem D2-7 33

Figura 2 Sistema integrase. A: Expressão do plasmídeo. B: remoção do gene de resistência..... 34

Figura 3 Confirmação de deleção do gene HO com primers externos, gene não deletado apresenta 1659bp e gene deletado 1142bp. Linhagem com duas bandas representa apenas um dos genes deletados 35

Figura 4 Confirmação de integração correta do cassete 35

Figura 5 Perfil fermentativo de todas as linhagens testadas. A fermentação foi realizada a 25°C em 100mL YEP+33% (w/v) de glicose. Fermentação agitada a 200rpm durante todo o período. Os tubos foram pesados pelo menos uma vez ao dia. A quantidade de açúcar residual foi inferida baseada na perda de peso. A fermentação foi considerada terminada quando o peso permaneceu estável por dois dias 37

Figura 6 Produção de etanol a partir de fermentação em 100mL de YEP+33% (w/v) de glicose a 25°C. O etanol foi medido através de espectrometria por infravermelho próximo (Alcolyser Beer of Anton Paar)..... 38

Figura 7	Dissecação de tétrades das linhagens originárias do Brasil, a linhagem GF33a não esporulou	39
Figura 8	PCR mating type, segregantes e parentais. Fragmento de 404bp mating a (Mat a), fragmento de 544bp mating alfa (MAT).....	39
Figura 9	Confirmação da dupla deleção para o gene HO para a linhagem 3 (D2-7HO $\Delta\Delta$).....	40
Figura 10	Confirmação de estabilidade de mating type para a linhagem D2-7HO $\Delta\Delta$. Segregação esperada, dois esporos mating a (MATa) e dois mating α (MAT α) para cada asco	41
Figura 11	Teste de gota em meio sólido YEPG acrescido de etanol. O haploide S120 foi derivado do parental D2-7 (2n), demonstra similar tolerância ao etanol. Placas incubadas a 30°C por até 10 dias	42
Figura 12	Perfil de fermentação das linhagens D2-7, S120 (segregante derivada da D2-7) e S288c. Fermentação agitada a 200rpm durante todo o período a 30°C. Os tubos foram pesados pelo menos uma vez ao dia. A quantidade de açúcar residual foi inferida baseada na perda de peso. A fermentação foi considerada terminada quando o peso permaneceu estável por dois dias	42
Figura 13	Fermentação para produção de etanol realizada em 100ml a 30°C. D2-7 linhagem diploide heterotática com dupla deleção do gene HO, S120 segregante haploide derivada da D2-7 e S288c linhagem de laboratório com fenótipo inferior	43
Figura 14	Mapeamento genético dos QTL's envolvidos no máximo acúmulo de etanol	49
Figura 15	Genes presentes nos QTL's F1(A) e F2(B)	50
Figura 16	Genes presentes no QTL "B".....	53

Figura 17 QTL cromossomo I, linhagem Sake (CBS1585) A, linhagem cachaça (D2-7) B.....	54
Figura 18 QTL cromossomo V, linhagem Sake (CBS1585) A, Pais 2013, linhagem cachaça (UFLA CA789) B. Destaque para o gene <i>URA3</i>	55

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2

Tabela 1	Linhagens Brasileiras oriundas de processos fermentativos para produção de cachaça.....	31
Tabela 2	Linhagens utilizadas em fermentação comparativa com linhagens brasileiras.....	36
Tabela 3	Valores detalhados. Fermentação realizada em 100mL de YEP+33% (w/v) de glicose a 25°C. DP = Desvio padrão.....	38
Tabela 4	QTLs identificados pelo sequenciamento de genoma completo. Há sete QTLs possivelmente associados ao fenótipo em estudo presente no segregante superior S120	45

SUMÁRIO

	CAPÍTULO 1 Introdução geral	13
1	INTRODUÇÃO	13
2	REFERENCIAL TEÓRICO	15
2.1	Produção de etanol - realidade Brasileira	15
2.2	Melhoramento e mapeamento genético	19
2.3	QTL mapping	20
2.4	Produção de etanol em fermentação de alta gravidade (VHG – Very High Gavity)	21
2.5	Análise de segregantes agrupados (BSA – Bulk Segregant Analysis)	22
	REFERÊNCIAS	24
	CAPÍTULO 2 Seleção de linhagens de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> sob condições de alta gravidade e mapeamento de QTLs para máximo acúmulo de etanol	28
1	INTRODUÇÃO	30
2	MATERIAIS E MÉTODOS	31
2.1	Seleção da linhagem superior para alto acúmulo de etanol	31
2.2	Esporulação e dissecação dos ascospores	32
2.3	Mating type	32
2.4	Knockout do gene HO	33
3	RESULTADOS	36
3.1	Seleção de linhagem superior para alto acúmulo de etanol	36
3.2	Mating type e HO knockout	39
3.3	Esporulação da linhagem D2-7 e identificação de segregante com mesmo fenótipo do parental superior	41
3.4	Seleção de segregantes de alta produção de etanol sob condições de alta gravidade	43
3.5	Mapeamento de QTL por sequenciamento completo de segregantes agrupados (BSA)	44
4	DISCUSSÃO	46
4.1	Identificação dos genes putativos do QTL “F”	49
4.2	Identificação dos genes putativos do QTL “B”	52
4.3	Análises dos QTL’s	53
5	CONCLUSÕES	57
	REFERÊNCIAS	58

CAPÍTULO 1 Introdução geral

1 INTRODUÇÃO

O aumento da demanda por combustíveis renováveis e a crescente preocupação com o meio ambiente têm impulsionado expressivamente o aumento da produção de etanol em todo o mundo. Dentre os produtores de etanol, o Brasil se destaca como o segundo maior produtor e exportador mundial, perdendo somente para os Estados Unidos. Posição esta, atingida e mantida, devido à soma de fatores como o aumento crescente da produtividade da matéria-prima, desenvolvimento de tecnologias mais eficientes e relevantes pesquisas científicas.

O processo de produção de etanol no Brasil utiliza o caldo da cana como substrato fermentescível por leveduras, sendo esse um processo altamente estressante para o microrganismo. Comumente, leveduras de panificação são utilizadas por serem de fácil aquisição no mercado, porém essas leveduras são rapidamente substituídas por linhagens selvagens oriundas ou carreadas pela matéria-prima por não possuírem as melhores características para esse fim.

Para que se obtenha uma produção bem controlada, padronizada e um produto de alta qualidade é necessária a utilização de um inóculo melhor adaptado ao ambiente das dornas de fermentação para álcool combustível. Portanto, a levedura para ser utilizada na indústria do álcool deve ser simultaneamente tolerante e/ou resistente a vários fatores estressantes e também ser dominante e persistente em relação aos microrganismos selvagens que normalmente contaminam a fermentação.

Novas tecnologias têm surgido para produção de etanol e de bebidas alcoólicas, uma das promissoras é a fermentação em alta gravidade (VHG – Very High Gravity). Sem a necessidade de investimentos estruturais, a

fermentação de alta gravidade possibilita a produção de maior concentração de etanol por batelada, reduzindo os custos gerais. Porém sob as condições de VHG as leveduras são expostas a condições ainda mais estressantes, devido à alta pressão osmótica no início da fermentação e às altas concentrações de etanol ao final do processo. O aumento da capacidade de produção de etanol é de importância econômica, afetando diferentes setores industriais, como a produção de etanol combustível.

Como relatado acima, abordagens que visem ao microrganismo são necessárias e viáveis na melhoria da eficiência de todo o processo. Entretanto, praticamente não há dados sobre leveduras industriais, provavelmente devido à natureza poligênica dos fenótipos de interesse, como tolerância osmótica e tolerância ao próprio etanol.

Neste contexto, o melhoramento e mapeamento genético de linhagens das leveduras utilizadas na produção de etanol têm grande empregabilidade, gerando conhecimentos valiosos sobre as linhagens empregadas nos processos fermentativos, ao mesmo tempo em que produz linhagens mais eficientes na produção de etanol.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Produção de etanol - realidade Brasileira

Etanol é um dos mais importantes combustíveis renováveis contribuindo para a redução dos impactos do meio ambiente gerados pela utilização de combustíveis fósseis. Brasil e Estados Unidos são atualmente os maiores produtores de etanol (incluindo utilização na indústria química e fabricação de bebidas), sendo responsáveis por 70% da produção mundial (BRASIL, 2007). Os 30% restantes da produção mundial estão divididos entre a China, Índia, União Europeia e outros países menores, que destinam o etanol, sobretudo, para a indústria química e elaboração de bebidas fermentadas e fermento-destiladas. A produção mundial de etanol combustível vem crescendo rapidamente nos últimos anos e, entre 2000 e 2005, a produção cresceu mais de 90% indo de 16,9 bilhões de litros para cerca de 33,6 bilhões (Figura 1) (BRASIL, 2007).



Figura 1 Produção de etanol combustível no mundo (bilhões de litros)

O Brasil é o segundo produtor mundial de etanol, atingindo produção de 25,57 bilhões de litros/ano na safra 2013/2014, assegurando mais de 1 milhão de empregos diretos e indiretos, sendo um dos principais exportadores de álcool combustível chegando a exportar na última safra 3.5 bilhões de litros (UNIÃO DA INDÚSTRIA DE CANA-DE-AÇUCAR, 2014).

A importância do etanol na matriz energética do país é crescente e impulsionada pelo fato de possuir o processo mais viável para produção de etanol combustível e apresentar uma forma renovável e menos poluente do que o petróleo (BASSO; BASSO; ROCHA, 2011). Devido a isso, entre os anos de 2008 e 2010 presenciamos um aumento na venda de veículos bicombustíveis em 21,7%. Por se tratar de um mercado de grande importância econômica, o sucesso da indústria depende de como os desafios científicos serão enfrentados (AMORIM et al., 2011).

Para assegurar o sucesso da indústria são necessários investimentos estratégicos. As medidas devem ser de três naturezas: (i) aumento da produtividade por área de cana-de-açúcar cultivada; (ii) melhora na eficiência do processo e (iii) emprego de biotecnologia (UNIÃO DA INDÚSTRIA DE CANA-DE-AÇUCAR, 2011).

A produção de etanol combustível tem sido realizada no mundo pela ação de leveduras na fermentação de açúcares extraídos de diferentes substratos contendo sacarose, amido ou resíduos lignocelulósicos, seguidos da separação e destilação do álcool. No Brasil, a produção de etanol é realizada tendo principalmente a cana de açúcar como matéria prima (BASSO et al. 2008; FERREIRA et al. 2010).

A utilização da cana de açúcar para produzir álcool ou açúcar tem variado ao longo do tempo, e a porcentagem destinada a uma produção ou outra depende da demanda do mercado de cada produto e dos preços relativos. Comumente, em média 50% da cana de açúcar são para produção de álcool e

50% para açúcar (BRASIL, 2007). A cana de açúcar é uma cultura plurianual, com colheita anual. A média do rendimento agrícola é de 85 - 100 toneladas/hectare/ano em grandes culturas e condições normais. A cana-de-açúcar pode conter: 74,5% de água, 14% de açúcares (12,5% de sacarose, 0,9% de dextrose e 0,6% de frutose), 10% de fibras e o restante dividido entre matérias minerais, compostos nitrogenados, ceras, pectinas e ácidos. O caldo obtido pela moagem da cana possui pH entre 5,2 e 6,8 e é constituído de 78 - 86% de água, 10-20% de sacarose, 0,1-2% de açúcares redutores, 0,3-0,5% de cinzas e 0,5-1% de compostos nitrogenados (LIMA; BASSO; AMORIM, 2001).

O processo tecnológico e biotecnológico da produção de etanol no Brasil tem avançado principalmente quanto ao aumento crescente de produtividade da cana-de-açúcar, com o desenvolvimento de equipamentos para extração do caldo com maior eficiência e bem como, com o melhoramento genético de linhagens de leveduras (SA, 2009).

Comumente, leveduras de panificação são utilizadas juntamente com leveduras selecionadas no processo fermentativo. O inóculo é preparado misturando de 2 a 12 toneladas de levedura para panificação com 10 a 300 Kg de levedura selecionada liofilizada e ativa. Isso é feito devido ao custo da levedura selecionada. A fermentação se inicia com a adição do mosto que apresenta concentração de açúcares reduzíveis em torno de 18 a 22%, o que resulta em uma produção de etanol entre 8 a 12% após da fermentação que pode durar de 6 a 10h a temperaturas que variam de 32 a 35 °C (BASSO et al, 2008). Após a fermentação as leveduras são coletadas por centrifugação e submetidas a um tratamento com ácido sulfúrico por 1 ou 2h. As leveduras utilizadas nos processos de fermentação alcoólica, quando fermentadas em condições estressantes, mostram queda da viabilidade celular, aumento na formação de glicerol, redução na formação de biomassa e diminuição dos conteúdos celulares de glicogênio e trealose, acarretando decréscimo de produtividade e eficiência

do processo (BASSO; BASSO; ROCHA, 2011). Portanto, a levedura para ser utilizada na indústria do álcool deverá ser simultaneamente tolerante e/ou resistente a vários fatores estressantes e também serem dominantes e persistentes em relação aos microrganismos selvagens que contaminam a fermentação.

A espécie mais utilizada em processos de fermentação alcoólica é a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, sendo naturalmente selecionada, pois suporta níveis elevados de etanol (12 a 15%), utilizando como substratos monossacarídeos, dissacarídeos e trissacarídeos, transformando-os em etanol, tolerando também alta concentração de açúcar e baixos valores de pH (BELIN, 1995). Outra característica associada à *S. cerevisiae* é a capacidade de competição no meio fermentativo, uma vez que algumas espécies desta levedura possuem a capacidade de produzir a toxina *killer*, capaz de eliminar naturalmente os microrganismos sensíveis que competem pelo substrato (SCHMITT; BREINIG, 2006). Culturas selecionadas de *Saccharomyces cerevisiae* têm recebido uma atenção especial por apresentarem qualidades que normalmente estão presentes nos outros processos de fermentação. Algumas características desejáveis envolvem: rápida iniciação da fermentação, eficiente conversão de açúcares fermentescíveis em etanol, manutenção da viabilidade por toda a fermentação, tolerância à alta concentração do etanol, alta viabilidade durante a estocagem, produção do fator *killer*, não formar espuma excessiva, não produzir ácido acético, apresentar baixo requerimento de vitaminas, ácidos graxos e oxigênio, tolerância à alta pressão osmótica, tolerância a altas temperaturas, fermentação completa do caldo, produção mínima de SO₂, relativa resistência a pH baixo, alto rendimento alcoólico e boa produtividade em etanol.

2.2 Melhoramento e mapeamento genético

O melhoramento genético vem sendo utilizado com sucesso, ampliando as qualidades desejáveis das leveduras que já são empregadas em processos fermentativos. Para atingir esses objetivos, algumas abordagens podem ser utilizadas: (i) indução direta de mutantes por radiação ultravioleta e indução química, (ii) melhoramento clássico, cruzando-se linhagens previamente selecionadas e (iii) conhecendo-se as bases genéticas que controlam essas qualidades (QTL's – Quantitative Trait Loci) (MOBINI-DEHKORDI et al., 2008; SRIDHAR; SREE; RAO, 2002).

O uso de agentes mutagênicos de ação física, como a luz UV (RAJOKA; FERHAN; KHALID, 2005) e ação química (BALAKUMAR; ARASARATNAM; BALASUBRAMANIAM, 2001) para o melhoramento de leveduras são abordagens comumente utilizadas, de baixo custo e de execução relativamente fáceis. Têm sido relatados bons resultados na utilização destas técnicas (RAJOKA; FERHAN; KHALID, 2005; UNALDI; ARIKAN; CORAL, 2002). Entretanto estas estratégias apresentam desvantagens, uma vez que necessitam de grande esforço e emprego de muito tempo na geração dos mutantes e posterior seleção daqueles que apresentem os melhores fenótipos (SHI; WANG; WANG, 2009).

Por outro lado o melhoramento genético clássico constitui uma estratégia interessante e viável para microrganismos com capacidade de reprodução sexuada, possuindo a vantagem de contar com processos que a própria natureza vem utilizando ao longo do processo evolutivo. Por isso, essa estratégia traz consigo a vantagem de permitir a obtenção de linhagens estáveis. Além disso, trata-se de uma estratégia relativamente simples e de menor custo de execução quando se busca linhagens com características controladas por

vários genes, como é o caso das vias metabólicas envolvidas nos processos fermentativos, e outros associados a características como produção de toxinas *killer* e mecanismos responsáveis pela maior tolerância a níveis elevados de álcoois, ácidos e açúcares, características extremamente importantes para as leveduras utilizadas nos processos industriais.

2.3 QTL mapping

As diferentes características fenotípicas apresentadas pelos microrganismos podem ser classificadas como qualitativas e quantitativas. Qualitativas são aquelas características controladas por um único locus, normalmente são conhecidas como características Mendelianas, e possuem um pequeno efeito sobre o fenótipo. Contudo a maioria dos fenótipos de interesse em *Saccharomyces cerevisiae* é controlada por múltiplas regiões distribuídas pelo genoma (loci), denominadas quantitative trait loci (QTL) (SWINNEN; THEVELEIN; NEVOIGT, 2012).

O mapeamento de QTL tem larga aplicação e tem revelado regiões envolvidas com tolerância a etanol (SWINNEN et al., 2012), termotolerância, QTL's menores (MARULLO et al., 2009; YANG et al., 2013), produção de glicerol (HUBMANN et al., 2013), produção de ácido acético (MARULLO et al., 2007). Embora linhagens laboratoriais sejam úteis na compreensão de fenótipos complexos, pouco se sabe sobre as bases genéticas de linhagens industriais ou de uso comercial.

2.4 Produção de etanol em fermentação de alta gravidade (VHG – Very High Gravity)

A ideia de fermentação em alta gravidade nasceu em meados dos anos 80, sendo desenvolvida desde então. Nesta abordagem os níveis de açúcar presentes no mosto podem chegar a 30% (w/v) (PULIGUNDLA et al., 2011), submetendo as leveduras a estresse osmótico, tendo como consequência a diminuição do ritmo da fermentação em muitos casos.

O sistema de fermentação em alta gravidade é uma alternativa emergente frente ao modelo tradicional de produção de etanol, apresentando vantagens como: menor contaminação por bactérias, diminuição dos gastos com destilação uma vez que se produz mais etanol por batelada, redução de uso de água com redução consequente de resíduo gerado (vinhoto). No processo tradicional para cada litro de etanol produzido, produz-se entre 10 - 15 litros de resíduo (BASSO; BASSO; ROCHA 2011). A tecnologia VHG pode dobrar a produção de álcool sem a necessidade de maiores investimentos em infraestrutura por parte das usinas (PRADEEP; REDDY, 2010; PULIGUNDLA et al., 2011).

Porém, elevadas quantidades de sacarídeos no mosto elevam a pressão osmótica, o que por sua vez tem efeito negativo sobre as leveduras, provocando redução na vitalidade e viabilidade ao longo do processo. Outros fatores são igualmente importantes, como: raramente o açúcar é completamente consumido, e as elevadas concentrações de etanol no final das bateladas são mais um fator estressante para a levedura. Todavia os processos tradicionais e industriais, como produção de etanol e cachaça são excelentes fontes de linhagens com elevada tolerância a estresses como nas condições necessárias para VHG (PEREIRA et al., 2010; PEREIRA et al., 2011).

Estudos têm mostrado que é possível amenizar os efeitos deletérios da fermentação de alta gravidade, protegendo as leveduras, adicionando ao mosto elementos como nitrogênio, ou até mesmo leveduras lisadas provenientes de processos fermentativos anteriores. (KAWA-RYGIELSKA; PIETRZAK, 2014). Outra pesquisa, brasileira, mostrou que se pode aumentar a eficiência no consumo dos açúcares fermentescíveis presentes no caldo de cana adicionando-se peptona ao mosto (BETITE et al., 2012).

A indústria de fermentação alcoólica se beneficiaria grandemente com o uso de linhagens que sejam aptas a lidar com as condições adversas impostas pela fermentação de alta gravidade. Pesquisas têm sido realizadas com o objetivo de conhecer os mecanismos relacionados à habilidade destas linhagens de enfrentarem tais condições adversas (KAWA-RYGIELSKA; PIETRZAK, 2014; LAOPAIBOON et al., 2009; LIU et al., 2012; PULIGUNDLA et al., 2011).

2.5 Análise de segregantes agrupados (BSA – Bulk Segregant Analysis)

O comportamento e habilidades herdáveis das leveduras são controlados por múltiplos loci, tornando complexos os estudos das bases genéticas envolvidas. Entretanto, cruzamentos controlados em organismos modelo podem aumentar nosso conhecimento sobre estas habilidades, elucidando os princípios básicos que regem a variação dos fenótipos. O uso de grandes populações para mapeamentos são necessários para destrinchar de forma abrangente essas bases. A análise de grupos de indivíduos foi viabilizada através de sequenciadores de alta performance, associados a métodos como o BSA (bulk segregant analysis), que é capaz de acessar cromossomos, genes e até mutações de base única (SNP's) relacionados com as características de interesse (EHRENREICH et al. 2010).

A técnica de BSA consiste no cruzamento da linhagem teste com uma linhagem de referência (fenótipo inferior) com posterior seleção de segregantes que possuam os bons fenótipos da linhagem teste. Ao cruzarmos a linhagem que queremos conhecer melhor com a linhagem de referência, esperamos entre seus segregantes leveduras que apresentem o bom fenótipo e o fenótipo inferior em proporções iguais (50%). Quando selecionados os segregantes que apresentam o bom fenótipo e comparando-se seus genomas com a linhagem referência (s288c, linhagem de laboratório) e o genoma consenso (levedura selecionada + S288c), conseguimos encontrar as regiões (QTL's – Quantitative Trait Loci) nas quais a frequência dos nucleotídeos localizados em regiões comuns a estes apresentam proporção maior que 50%, indicando os pontos do genoma onde se encontram as características de interesse. Somando estes dados à localização cromossomal, nós temos as regiões nos cromossomos associadas aos fenótipos de interesse. O teste de genes candidatos de cada QTL é realizado por RHA (reciprocal hemizyosity analysis), que consiste na construção de cepas com genes putativos deletados na linhagem teste (teste del x lab-gene x) ou deletados na linhagem referência (teste x lab del-gene x). Ao testar os fenótipos destes diploides, caso os genes putativos estejam envolvidos perceberemos uma diminuição da performance do diploide em que o alelo teste foi deletado (TEIXEIRA et al., 2009).

REFERÊNCIAS

- AMORIM, H. V et al. Scientific challenges of bioethanol production in Brazil. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 91, n. 5, p. 1267–75, Sept. 2011.
- BALAKUMAR, S.; ARASARATNAM, V.; BALASUBRAMANIAM, K. Isolation and improvement of a thermotolerant *Saccharomyces cerevisiae* strain. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 17, n. 7, p. 739–746, Oct. 2001.
- BASSO, L. C. et al. Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil. **FEMS Yeast Research**, Amsterdam, v. 8, n. 7, p. 1155–1163, Nov. 2008.
- BASSO, L. C.; BASSO, T.; ROCHA, S. Ethanol production in Brazil: the industrial process and its impact on yeast fermentation. In: BERNARDES, M. A. dos S. (Ed.). **Biofuel production: recent developments and prospects**. Rijeka: Intech, 2011. p. 85-101.
- BELIN, J. L. Las leveduras. In: BOURGEOIS, C. M.; LARPENT, J. P. **Microbiología alimentaria**. Zaragoza: Acribia, 1995. Cap. 2, p. 19-30.
- BETITE, V. C. et al. Very high gravity sucrose fermentation by Brazilian industrial yeast strains: effect of nitrogen supplementation. **Journal of the Institute of Brewing**, London, v. 118, n. 2, p. 174–178, 2012.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. BUAINAIN, A. M.; BATALHA, M. O. (Coord.). **Cadeia produtiva da agroenergia: volume 3**. Brasília: MAPA/SPA, 2007.
- EHRENREICH, I. M. et al. Dissection of genetically complex traits with extremely large pools of yeast segregants. **Nature**, London, n. 464, p. 1039-1042, Apr. 2010.
- FERREIRA, V. et al. Simultaneous saccharification and fermentation process of different cellulosic substrates using a recombinant *Saccharomyces cerevisiae* harbouring the β -glucosidase gene. **Electronic Journal of Biotechnology**, Oxford, v. 13, n. 2, p. 1–7, 2010.

HUBMANN, G. et al. Quantitative trait analysis of yeast biodiversity yields novel gene tools for metabolic engineering. **Metabolic Engineering**, Brugge, n. 17, p. 68–81, May 2013.

KAWA-RYGIELSKA, J.; PIETRZAK, W. Ethanol fermentation of very high gravity (VHG) maize mashes by *Saccharomyces cerevisiae* with spent brewer's yeast supplementation. **Biomass and Bioenergy**, Oxford, v. 60, p. 50–57, Jan. 2014.

LAOPAIBOON, L. et al. Ethanol production from sweet sorghum juice using very high gravity technology: effects of carbon and nitrogen supplementations. **Bioresource Technology**, Barking, v. 100, n. 18, p. 4176–4182, Sept. 2009.

LIU, C.-G. et al. Very high gravity ethanol fermentation by flocculating yeast under redox potential-controlled conditions. **Biotechnology for Biofuels**, London, v. 5, n. 1, p. 61, 2012.

MARULLO, P. et al. Genetic improvement of thermo-tolerance in wine *Saccharomyces cerevisiae* strains by a backcross approach. **FEMS Yeast Research**, Amsterdam, v. 9, n. 8, p. 1148–1160, Dec. 2009.

MARULLO, P. et al. Single QTL mapping and nucleotide-level resolution of a physiologic trait in wine *Saccharomyces cerevisiae* strains. **FEMS Yeast Research**, Amsterdam, v. 7, n. 6, p. 941–952, Sept. 2007.

MOBINI-DEHKORDI, M. et al. Isolation of a novel mutant strain of *Saccharomyces cerevisiae* by an ethyl methane sulfonate-induced mutagenesis approach as a high producer of bioethanol. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, Osaka, v. 105, n. 4, p. 403–408, Apr. 2008.

PEREIRA, F. B. et al. Robust industrial *Saccharomyces cerevisiae* strains for very high gravity bio-ethanol fermentations. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, Osaka, v. 112, n. 2, p. 130–136, Aug. 2011.

PEREIRA, F. B. et al. Selection of *Saccharomyces cerevisiae* strains for efficient very high gravity bio-ethanol fermentation processes. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 32, n. 11, p. 1655–1661, Nov. 2010.

PRADEEP, P.; REDDY, O. V. S. High gravity fermentation of sugarcane molasses to produce ethanol: effect of nutrients. **Indian Journal of Microbiology**, Essex, v. 50, suppl. 1, p. 82–87, Oct. 2010.

PULIGUNDLA, P. et al. Very high gravity (VHG) ethanolic brewing and fermentation: a research update. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, Houndmills, v. 38, n. 9, p. 1133–1144, Sept. 2011.

RAJOKA, M. I.; FERHAN, M.; KHALID, A. M. Kinetics and thermodynamics of ethanol production by a thermotolerant mutant of *Saccharomyces cerevisiae* in a microprocessor-controlled bioreactor. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 40, n. 5, p. 316–321, 2005.

SA, A. QTL mapping□: a few key points. **International Journal of Applied Research in Natural Products**, New York, v. 1, n. 2, p. 1–3, June/July 2009.
SCHMITT, M. J.; BREINIG, F. Yeast viral killer toxins: lethality and self-protection. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 4, n. 3, p. 212–221, Mar. 2006.

SHI, D.; WANG, C.; WANG, K. Genome shuffling to improve thermotolerance, ethanol tolerance and ethanol productivity of *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, Houndmills, v. 36, n. 1, p. 139–147, Jan. 2009.

SRIDHAR, M.; SREE, N. K.; RAO, L. V. Effect of UV radiation on thermotolerance, ethanol tolerance and osmotolerance of *Saccharomyces cerevisiae* VS1 and VS3 strains. **Bioresource Technology**, Barking, v. 83, n. 3, p. 199–202, July 2002.

SWINNEN, S. et al. Identification of novel causative genes determining the complex trait of high ethanol tolerance in yeast using pooled-segregant whole-genome sequence analysis. **Genome Research**, New York, v. 22, n. 5, p. 975–84, May 2012.

SWINNEN, S.; THEVELEIN, J. M.; NEVOIGT, E. Genetic mapping of quantitative phenotypic traits in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Yeast Research**, Amsterdam, v. 12, n. 2, p. 215–227, Mar. 2012a.

TEIXEIRA, M. C. et al. Genome-wide identification of *Saccharomyces cerevisiae* genes required for maximal tolerance to ethanol. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 75, n. 18, p. 5761–5772, Sept. 2009.

UNALDI, M. N.; ARIKAN, B.; CORAL, G. Isolation of alcohol tolerant, osmotolerant and thermotolerant yeast strains and improvement of their alcohol tolerance by UV mutagenesis. **Acta Microbiologica Polonica**, Warszawa, v. 51, n. 2, p. 115–120, 2002.

UNIÃO DA INDÚSTRIA DE CANA-DE-AÇÚCAR. Disponível em: <<http://www.unica.com.br>>. Acesso em: 28 abr. 2014.

YANG, Y. et al. QTL analysis of high thermotolerance with superior and downgraded parental yeast strains reveals new minor QTLs and converges on novel causative alleles involved in RNA processing. **PLoS Genetics**, San Francisco, v. 9, n. 8, p. 1003693, 2013.

CAPÍTULO 2 Seleção de linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* sob condições de alta gravidade e mapeamento de QTLs para máximo acúmulo de etanol

RESUMO

O sistema de fermentação em alta gravidade é uma alternativa de produção de etanol, apresentando vantagens como: menor contaminação por bactérias, diminuição dos gastos com destilação, redução de uso de água com redução consequente de resíduo gerado. O mapeamento de QTL tem larga aplicação e tem revelado regiões envolvidas com tolerância a etanol, termotolerância, produção de glicerol, produção de ácido acético e outros. Embora linhagens laboratoriais sejam úteis na compreensão de fenótipos complexos, pouco se sabe sobre as bases genéticas de linhagens industriais ou de uso comercial. Neste trabalho foi realizada a seleção da linhagem de melhor desempenho em condições de fermentação em alta gravidade. Foram testadas quatro linhagens Brasileiras. Foi realizado o seqüenciamento de genoma completo para os segregantes. Os resultados apontaram genes presentes nos cromossomos II, V e VII possivelmente associado ao fenótipo de interesse. Diferenças apresentadas entre a linhagem testada (UFLA789) e a outras presentes na literatura apontam implicações geográficas nestas diferenças. Futuras análises *in vivo* são necessárias para confirmar a relação dos genes putativos com o fenótipo em estudo.

Palavras-chave: QTL mapping. Leveduras. Etanol. Cachaça.

ABSTRACT

The fermentation system for high gravity is an alternative to ethanol production with advantages such as lower bacterial contamination, decrease spending on distillation and reduced water consumption with consequent reduction of the waste generated. QTL mapping has wide applications and has proved regions involved in ethanol tolerance, thermotolerance, glycerol, acetic acid production and others. Even though laboratory strains are useful in understanding complex phenotypes, few things are known about the genetic basis of industrial strains or with commercial use. This work was performed to select the best performance strain under conditions of high gravity fermentation. Four Brazilian strains were tested. Complete genome sequencing was performed for their segregation. The results indicated genes present in chromosomes II, V and VII possibly associated with the phenotype of interest. Differences observed between the tested strain (UFLA789) and others in the literature indicate geographical implications on these differences. Further *in vivo* analysis are needed to confirm the relationship of putative genes with the phenotype under study.

Keywords: QTL mapping. Yeast. Ethanol. Cachaça.

1 INTRODUÇÃO

Saccharomyces cerevisiae possui uma habilidade raramente encontrada na natureza, que é a capacidade de produzir e tolerar altas concentrações de etanol no meio de cultivo (PAIS et al., 2013). Essa habilidade confere à levedura uma vantagem competitiva, eliminando praticamente qualquer outro microrganismo competidor, desde que o meio forneça açúcar suficiente para manter os altos níveis de álcool (D'AMORE; STEWART, 1987). Essa capacidade de acúmulo de elevadas concentrações de etanol é a base para a produção de bebidas e combustível.

O desempenho fermentativo das leveduras depende da composição genética da mesma, tornando algumas mais desejáveis que outras. Pesquisas têm apontado que linhagens industriais apresentam composição gênica perturbada, com hibridizações entre espécies diferentes, poliploidia, perda de cromossomos. Essas alterações dificultam mais o estudo deste tipo de linhagens, mas devido ao grande interesse econômico muito esforço tem sido empregado na elucidação das bases genéticas de interesse biológico ou industriais, como: termotolerância (MARULLO et al., 2009), eficiência esporulativa (BEM-ARI et al., 2006), regulação de transcrição (BREM et al., 2006), tolerância a etanol (MA; LIU, 2010). Apesar disso, os mecanismos envolvidos continuam pouco conhecidos, sobretudo para linhagens industriais (SWINNEN et al., 2012).

Este presente estudo teve como objetivo selecionar, sob fermentação de alta gravidade (VHG), segregantes com elevada capacidade de produção de etanol oriundas de linhagens de fermentação de cachaça, bem como identificar múltiplos *loci* (QTL's) putativos associados ao controle do fenótipo de máximo acúmulo de etanol.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

A pesquisa foi desenvolvida no VIB (Vlaams Instituut voor Biotechnologie) da Katholieke Universiteit Leuven, Kasteelpark Arenberg 31 - Box 2438 B-3001 Leuven-Heverlee Flanders, Belgium. Quatro linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* com alta eficiência fermentativa foram previamente selecionadas de produtores de cachaça de São Paulo e Minas Gerais, estas foram denominadas: GF33a, CCA083, SAC76 e D2-7 (Tabela 1).

Tabela 1 Linhagens Brasileiras oriundas de processos fermentativos para produção de cachaça

Código seleção	Código utilizado	Origem
UFLA FW221	GF 33a	Fermentado de frutas
UFLA CA798	D2-7	Destilaria / Toninho
UFLA CA759	SAC-76	Destilaria
CCA-083	CCA-083	São Carlos

2.1 Seleção da linhagem superior para alto acúmulo de etanol

A seleção foi realizada em fermentações de pequena escala utilizando tubos com 100mL de meio de cultura YEPG. As células foram pré-cultivadas em 4mL de YEP+2% (w/v) de glicose e incubadas por 48h (200 rpm, 30°C). Utilizando-se células da primeira pré-cultura, erlenmeyers contendo 50mL de YEP+10% (w/v) de glicose foram inoculados para OD₆₀₀ 0,5. Os frascos foram incubados por dois dias até as células alcançarem a fase estacionária. Baseado em contagem celular, aproximadamente 5×10^9 células, por linhagem testada, foram coletadas por centrifugação (3000 rpm, 5min, 4°C), as células sedimentadas (pellet) foram então ressuspendidas em 3mL de YEP e depois inoculadas em 100mL de YEPG 33% (w/v) de glicose. As fermentações ocorreram a 25°C. Os tubos foram agitados nas primeiras 4 horas utilizando-se

barras magnéticas (30x6 mm) a 200 rpm. A fermentação foi avaliada segundo a perda de peso dos tubos (CO₂), calculando-se o açúcar residual. Amostras foram coletadas ao final das fermentações para análise em HPLC. Os metabólitos quantificados foram glicose, glicerol, ácido láctico, ácido acético e etanol. O sistema de HPLC utilizado foi o Wasters (Wasters Breeze), utilizando coluna de exclusão de íons (WAT010290) a 75°C e a detecção por índice refrativo (modelo 2414). O eluente utilizado foi H₂SO₄ (5mM). O etanol foi quantificado por espectroscopia por infravermelho (Alcolyser, Anton Paar).

2.2 Esporulação e dissecação dos ascos

As células foram cultivadas em meio YEPG 2% por aproximadamente 8 h (200rpm, 30°C). A esporulação foi induzida em meio contendo 0,5% (w/v) de acetato de potássio e 1,5% (w/v) Agar bacto (pH 6.0). As placas foram incubadas a 23°C por pelo menos 6 dias. A esporulação foi avaliada por microscopia óptica. Para a dissecação das tétrades uma pequena quantidade de células esporuladas foram incubadas em Liticase (500U/mL) por 75 minutos, agitada (vortex) a cada 15 minutos à temperatura ambiente. A dissecação foi realizada em micromanipulador (Singer Instruments).

2.3 Mating type

Uma quantidade aproximada de 1.5 mg de células foi suspensa em 10µl de NaOH (0.02M) por 1h, sendo esta solução utilizada como DNA para PCR. A determinação de mating type foi definida por PCR com os *primers* MAT locus (AGTCACATCAAGATCGTTTATGG), *MATα* (ACTCCACTTCAAGTAAGAGTTTG) e *MATα* (alfa)

(GCACGGAATATGGGACTACTTCG). Os três *primers* foram utilizados juntos (Huxley *et al.*, 1990).

2.4 Knockout do gene HO

As leveduras tiveram o gene para HO excluído do genoma através de recombinação homóloga utilizando-se cassete montado com promotor constitutivo (TEF2) mais gene para resistência à fleomicina, para seleção, e terminador (Figura 1). O cassete também possuía regiões homologas flanqueando o gene HO, tornando possível a recombinação. Posteriormente o gene integrado de resistência à fleomicina foi removido das linhagens utilizando-se o sistema ϕ C31 integrase desenvolvido no VIB (Figura 2).

As células foram transformadas através do método LiAc/SS-DNA/PEG descrito por Gietz *et al.*, (1995).

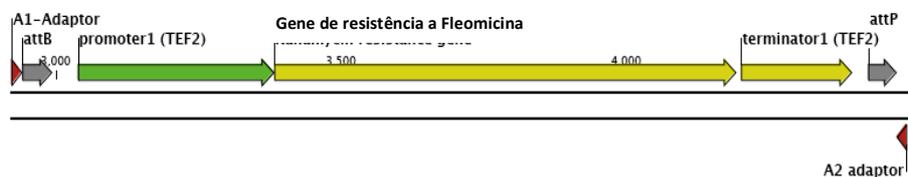


Figura 1 Esquema do cassete utilizado na deleção do gene HO na linhagem D2-7

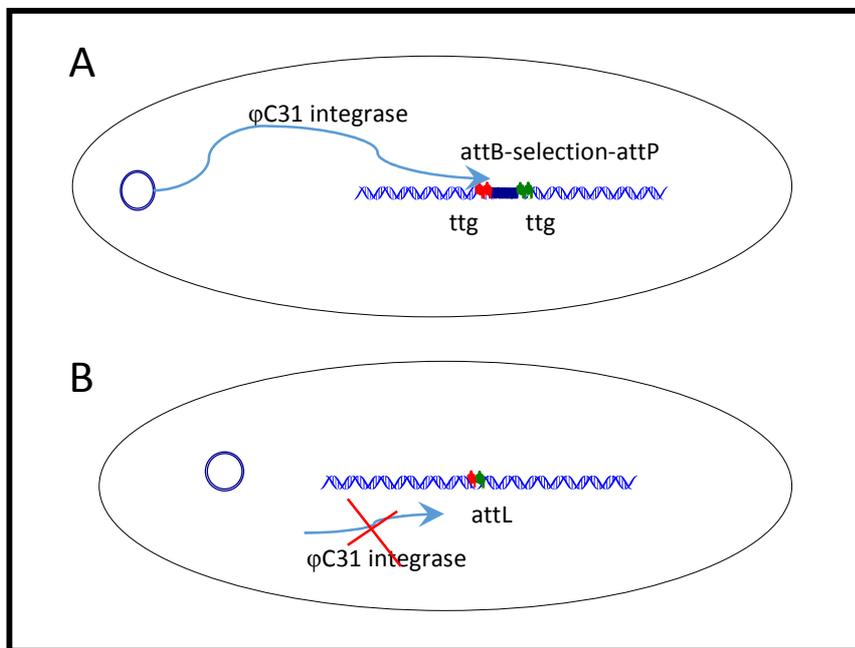


Figura 2 Sistema integrase. A: Expressão do plasmídeo. B: remoção do gene de resistência

Para a obtenção de segregantes haploides estáveis, o gene HO responsável pela iniciação do processo de mudança de mating type (mating type switching) foi removido apenas para a linhagem selecionada D2-7. A metodologia utilizada foi a transformação da linhagem utilizando-se um cassete com regiões flaqueadoras homologas ao gene HO, o qual substituiu o gene HO original por um gene de resistência à fleomicina para seleção. Foram obtidas 20 colônias transformadas, porém somente três delas apresentaram uma possível dupla deleção do gene HO nos dois genomas das células diploides (Figura 3). A correta integração foi confirmada por PCR (Figura 4).

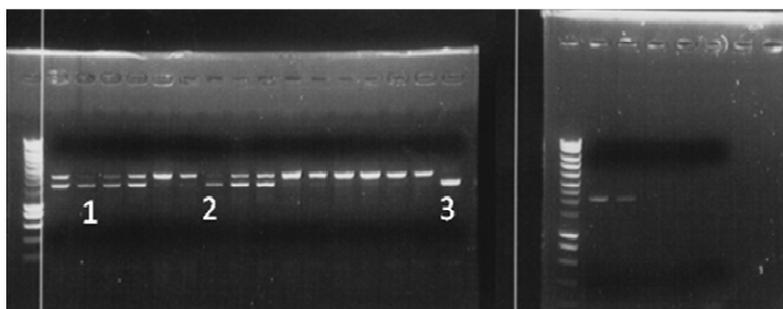


Figura 3 Confirmação de deleção do gene HO com primers externos, gene não deletado apresenta 1659bp e gene deletado 1142bp. Linhagem com duas bandas representa apenas um dos genes deletados

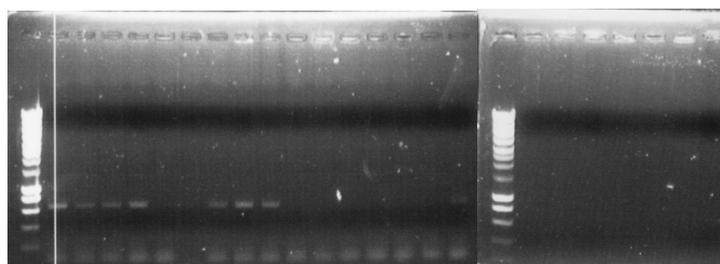


Figura 4 Correta integração do cassete confirmada pela presença da banda

3 RESULTADOS

3.1 Seleção de linhagem superior para alto acúmulo de etanol

As quatro diferentes linhagens produtoras de cachaça para máximo acúmulo de etanol foram testadas em condições de alta gravidade (VHG – Very High Gravity). Com o objetivo de se conhecer o desempenho das quatro linhagens testadas frente a outras linhagens industriais, foram adicionadas às fermentações as seguintes leveduras: PE-2, CAT-1, Ethanol red I, Benvinda, CBS1585 e linhagem de laboratório S288c (Tabela 2). Os resultados da fermentação são apresentados na Figura 5 e Tabela 3. Os resultados da produção de etanol entre as linhagens testadas podem ser vistos na Figura 6. A linhagem D2-7 obteve o melhor desempenho entre as linhagens testadas, tanto em velocidade fermentativa, quanto em produção de etanol em alta gravidade, sendo esta selecionada.

Tabela 2 Linhagens utilizadas em fermentação comparativa com linhagens brasileiras

Código	Descrição	Origem
CBS1585	Linhagem de Sake - alta produção de etanol	Centraalbureau voor Schimmelcultures - Holanda
Ethanol Red I	Fermentação etanol-milho	VIB – Bélgica
Benvinda	Produção de cachaça	UFOP – Brasil
CAT 1	Produção de etanol -Brasil	Fermentec – Brasil
PE 2	Produção de etanol -Brasil	Fermentec – Brasil
S288c	Linhagem laboratorial	Brachman et al., 1998.

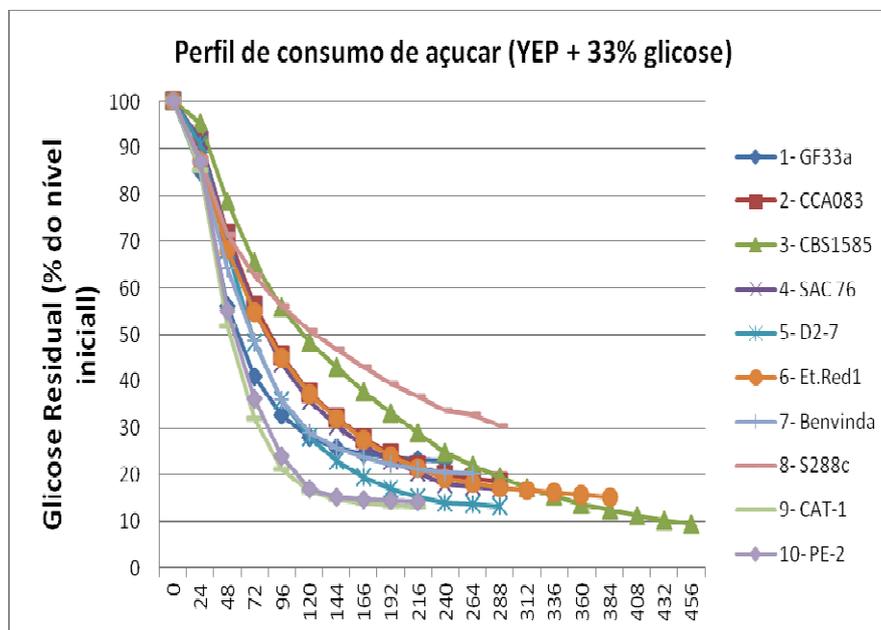


Figura 5 Perfil fermentativo de todas as linhagens testadas. A fermentação foi realizada a 25°C em 100mL YEP+33% (w/v) de glicose. Fermentação agitada a 200rpm durante todo o período. Os tubos foram pesados pelo menos uma vez ao dia. A quantidade de açúcar residual foi inferida baseada na perda de peso. A fermentação foi considerada terminada quando o peso permaneceu estável por dois dias

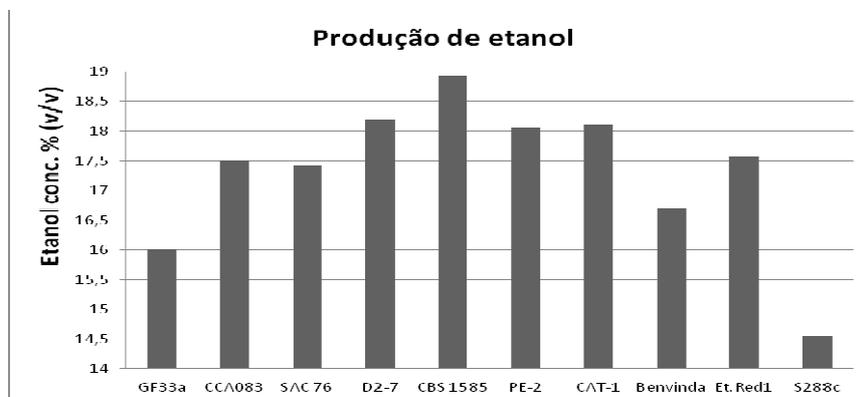


Figura 6 Produção de etanol a partir de fermentação em 100mL de YEP+33% (w/v) de glicose a 25°C. O etanol foi medido através de espectrometria por infravermelho próximo (Alcolyser Beer of Anton Paar)

Tabela 3 Valores detalhados. Fermentação realizada em 100mL de YEP+33% (w/v) de glicose a 25°C. DP = Desvio padrão

Linhagens	Glicose (%)	Glicerol (g/L)	Produção de Etanol (v/v)	DP
1- GF33a	7,4876	10,4095	16,0125	1,19
2- CCA083	4,8587	13,02125	17,4975	0,60
3- CBS1585	3,080175	13,44725	18,9225	0,03
4- SAC 76	5,022275	12,64825	17,4225	0,54
5- D2-7	4,079075	12,31	18,195	0,12
6- Et.Red1	4,99785	12,14525	17,58	0,21
7- Benvinda	6,060175	13,4725	16,7025	0,13
8- S288c	9,8375	8,296	14,5575	0,45
9- CAT-1	4,302275	11,13125	18,105	0,06
10- PE-2	4,256775	12,1575	18,06	0,14

3.2 Mating type e HO knockout

Todas as linhagens diploides (GF33a, D2-7, CCA083 e Sac76) foram induzidas à esporulação e submetidas à dissecação de tétrades (Figura 7), exceto pela linhagem GF33a que não apresentou habilidade de esporular nas condições descritas. Todos os segregantes apresentaram mating type **a** (MATa) e **α** (MAT α) conjuntamente, configurando a condição de homotalismo (Figura 8).

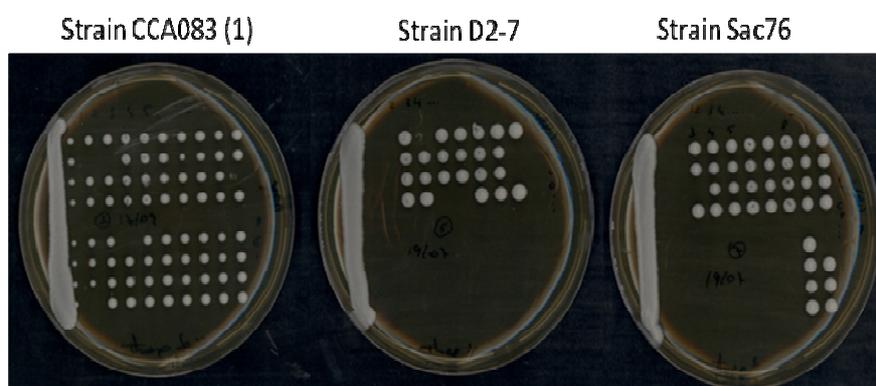


Figura 7 Dissecação de tétrades das linhagens originárias do Brasil, a linhagem GF33a não esporulou

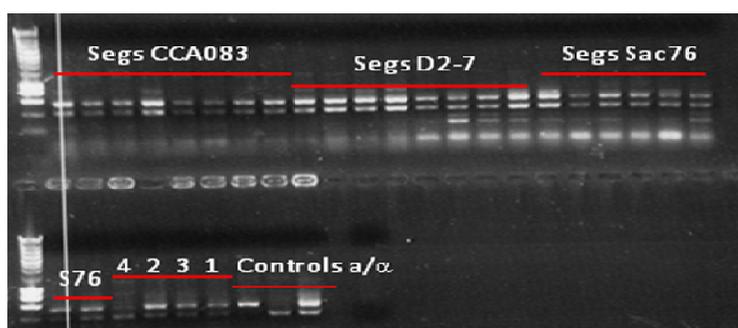


Figura 8 PCR mating type, segregantes e parentais. Fragmento de 404bp mating **a** (Mat a), fragmento de 544bp mating alfa (MAT)

Para confirmação da deleção do gene HO, outra PCR foi realizada utilizando-se primers internos e externos à região do gene HO, o que confirmou a dupla deleção para a linhagem 3 (Figura 9).

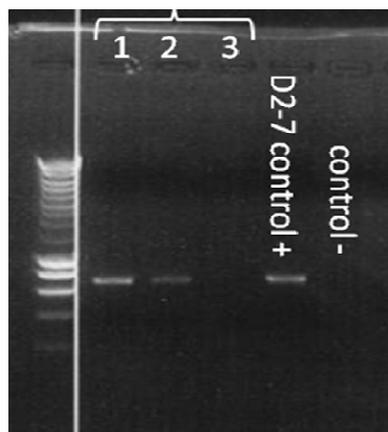


Figura 9 Confirmação da dupla deleção para o gene HO para a linhagem 3 (D2-7HO $\Delta\Delta$)

A estabilidade dos segregantes haploides foi verificada pela esporulação, dissecação das tétrades oriundas de quatro ascos, com posterior verificação de mating type dos segregantes. Foi observada a segregação esperada para cada asco, dois ascósporos mating **a** (MAT α) e dois mating **α** (MAT α) (Figura 10).

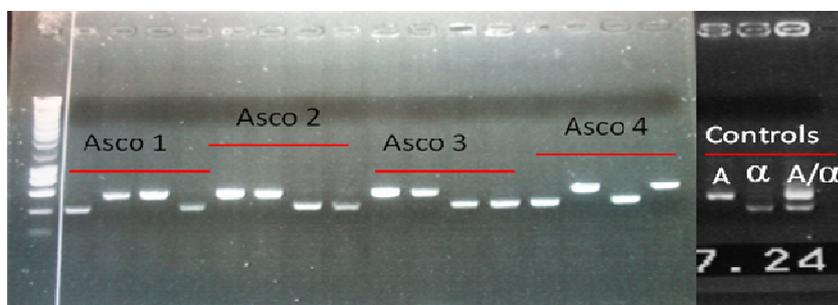


Figura 10 Confirmação de estabilidade de mating type para a linhagem D2-7HO $\Delta\Delta$. Segregação esperada, dois esporos mating **a** (MATa) e dois mating α (MAT α) para cada asco

3.3 Esporulação da linhagem D2-7 e identificação de segregante com mesmo fenótipo do parental superior

A linhagem diploide D2-7 foi submetida à esporulação para determinação de mating type e capacidade de produção de etanol. Como confirmado anteriormente, a linhagem D2-7 é agora heterotática devido à dupla deleção do gene HO. Em um primeiro momento foi realizada uma pré-seleção entre 117 segregantes utilizando-se meio de cultura sólido (YEPG) adicionado de etanol nas proporções de 16, 18 e 20%. Os testes mostraram que a linhagem parental D2-7 e o segregante S120 apresentaram tolerância similares ao etanol (Figura 11). Outros 44 segregantes também apresentaram tolerância similar e foram também selecionados para confirmação do fenótipo em fermentação em tubos de 100ml de YEPG + 33% (w/v) de glicose (dados não apresentados).

Os testes mostraram que o segregante S120 pode produzir quantidades equivalentes de etanol quando comparado com a parental superior D2-7 (Figura 12 e 13).

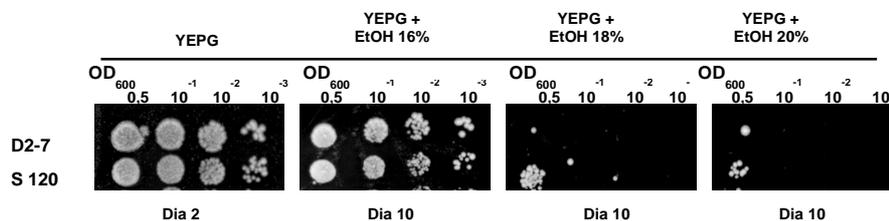


Figura 11 Teste de gota em meio sólido YEPG acrescido de etanol. O haploide S120 foi derivado do parental D2-7 (2n), demonstra similar tolerância ao etanol. Placas incubadas a 30°C por até 10 dias

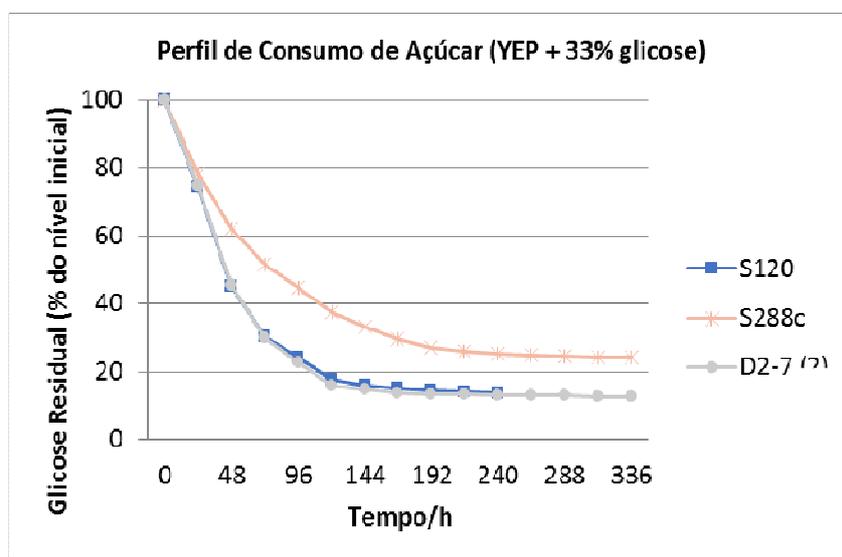


Figura 12 Perfil de fermentação das linhagens D2-7, S120 (segregante derivada da D2-7) e S288c. Fermentação agitada a 200rpm durante todo o período a 30°C. Os tubos foram pesados pelo menos uma vez ao dia. A quantidade de açúcar residual foi inferida baseada na perda de peso. A fermentação foi considerada terminada quando o peso permaneceu estável por dois dias

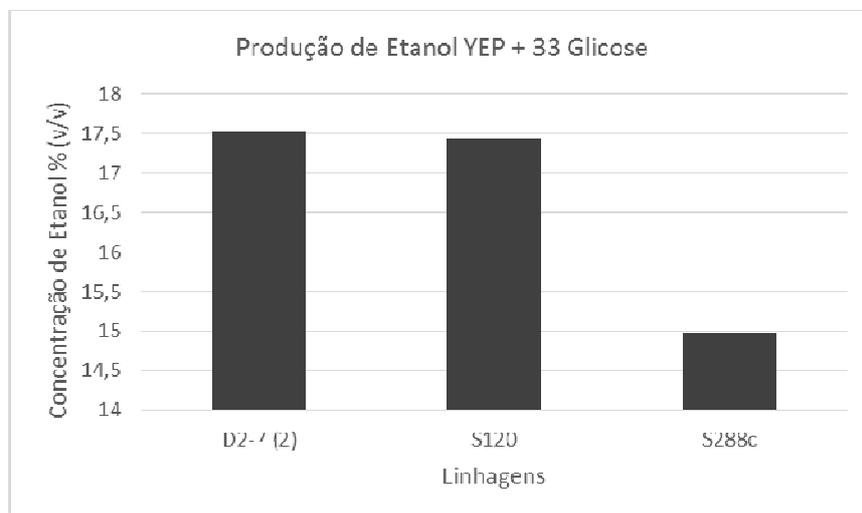


Figura 13 Fermentação para produção de etanol realizada em 100ml a 30°C. D2-7 linhagem diploide heterotática com dupla deleção do gene HO, S120 segregante haploide derivada da D2-7 e S288c linhagem de laboratório com fenótipo inferior

3.4 Seleção de segregantes de alta produção de etanol sob condições de alta gravidade

O segregante haploide S120 foi cruzado com a linhagem de laboratório S288c, que possui fenótipo inferior para que através da comparação entre as regiões de alta frequência de SNP's se possa conhecer os QTL's associados à máxima produção de etanol.

Um total de 196 segregantes oriundos do híbrido diploide (S120+S288c) foram testados em fermentação em tubos de 100ml com constante agitação a 200rpm em meio YEP + 33% de glicose a 30°C. Dentre os quais 29 segregantes (grupo 1) apresentaram produção de etanol similar a S120 e ao híbrido, sendo selecionados para o BSA (Bulk Segregant Analysis). Foram também selecionados ao acaso 30 segregantes, sendo esse grupo chamado de não selecionados (grupo 2).

3.5 Mapeamento de QTL por sequenciamento completo de segregantes agrupados (BSA)

Todos os 29 segregantes selecionados (grupo 1) foram agrupados para o sequenciamento de genoma completo. O DNA foi extraído agrupando-se os segregantes em quantidades equivalentes de células, com base na densidade óptica (DO). O grupo não selecionado (grupo 2) também teve o DNA extraído para sequenciamento, com o objetivo de se conhecer a correta segregação de todos os cromossomos das linhagens S120 e S288c. O segregante S120 também teve o DNA extraído para sequenciamento. Os grupos de segregantes selecionados e não selecionados foram enviados para o sequenciamento de genoma completo, usando a plataforma Illumina, na empresa BGI-Hong Kong (China).

O sequenciamento realizado em plataforma Illumina produz “reads” que são sequências curtas de 75 a 100 bases de comprimento. Estes fragmentos são reunidos em “contigs”, fragmentos maiores, que por sua vez são mapeados “sobre” o genoma da linhagem de laboratório (S288c) e “sobre” o segregante superior S120. Após o sequenciamento, os SNP's são determinados e alinhados “sobre” suas posições cromossomais. As regiões que apresentam altas frequências de SNP em relação ao genoma da linhagem de laboratório (S288c) identificam os QTLs oriundos do segregante S120 relacionados com o fenótipo investigado (produção máxima de etanol). As regiões que apresentam baixa frequência de SNP indicam relação com genoma da linhagem de laboratório (S288c).

O mapeamento apontou alguns possíveis QTLs ligados ao fenótipo em estudo. Os detalhes da localização podem ser encontrados na Tabela 4. Valores do *p-value* abaixo de 0,05 são considerados positivamente ligados ao fenótipo de máxima produção de etanol.

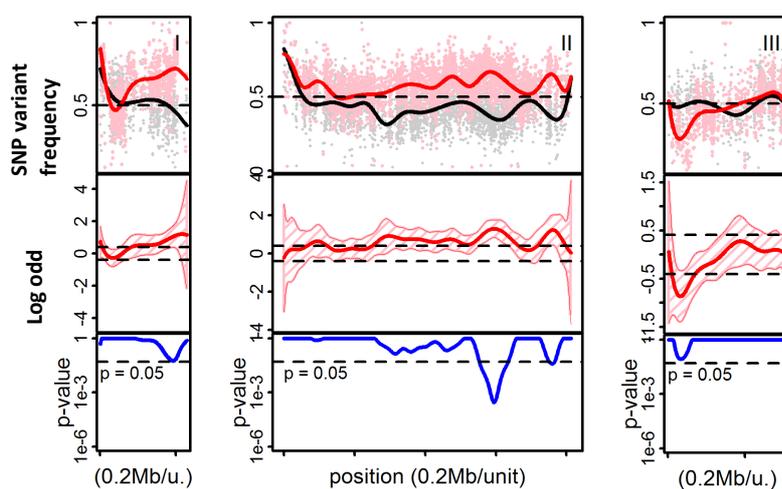
Tabela 4 QTLs identificados pelo sequenciamento de genoma completo. Há sete QTLs possivelmente associados ao fenótipo em estudo presente no segregante superior S120

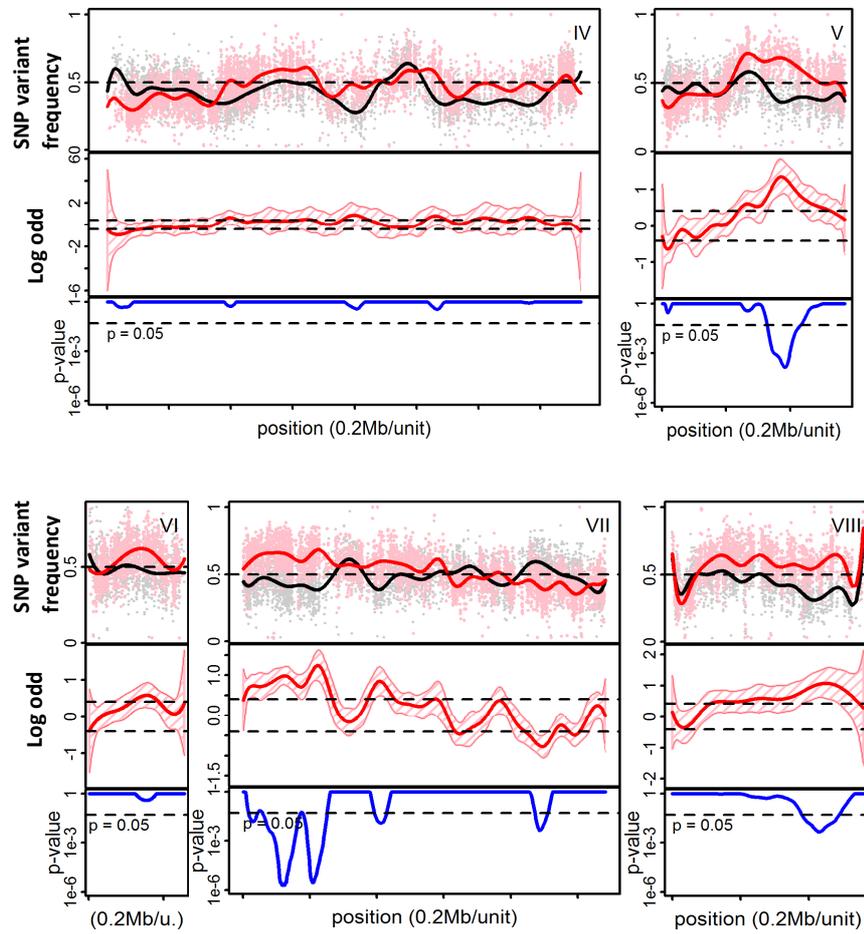
QTL	Cromossomo	Posição no genoma (pb)	SNPs suportando a ligação	P-value	Associação com o QTL
A	I	189536- 195921	15	5.7E-02	Seg120
B	II	554278- 633868	50	3.42E-04	Seg120
C	II	749193- 767060	12	3.9E-02	Seg120
D	V	329095- 434102	82	1.60E-04	Seg120
E	VII	16277- 42234	13	1.51E-02	S288c
F	VII	57376- 249891	88	9.99E-07	Seg120
G	VII	394818- 427264	16	1.24E-02	S288c
H	VII	872861- 872861	18	4.34E-03	Seg120
I	VIII	381573- 489273	105	4.61E-03	Seg120
J	XI	254816- 320872	50	2.38E-04	S288c
K	XIII	471888- 482958	07	5.1E-02	S288c
L	XV	875988- 934771	28	1.22E-02	Seg120
M	XVI	94934- 137868	24	8.46E-03	Seg120
N	XVI	318936- 365603	26	8.05E-03	S288c

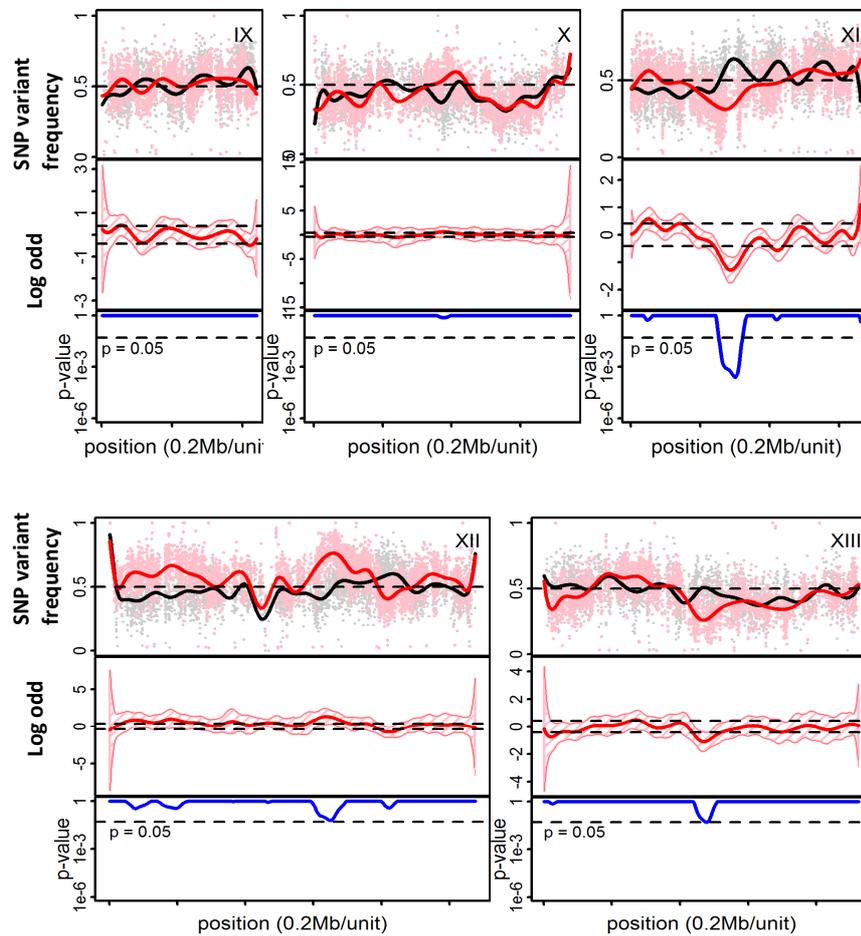
4 DISCUSSÃO

A levedura *Sacharromyces cerevisiae* se tornou um dos microrganismos eucariotos de grande importância, tanto como organismo modelo para pesquisas de base como na indústria biotecnológica devido à sua capacidade de produzir e tolerar elevadas concentrações de etanol (SWINNEN; THEVELEIN; NEVOIGT, 2012). E sobre essa habilidade peculiar está a base para produção de bebidas alcoólicas e de etanol combustível (PAIS et al., 2013). O uso de *S. cerevisiae* metabolicamente construídas para produção industrial de ácido succínico, etanol de segunda geração, utilização de fontes de carbono anteriormente não utilizáveis e outros já foram estabelecidos ou estão em desenvolvimento (NEVOIGT, 2008; OTERO et al., 2013).

O resultado do mapeamento de QTL's por agrupamento dos segregantes selecionados (BSA) apontou a possível existência de quatorze QTL's (Figura 14). Os QTL's que apresentaram os valores estatísticos de p mais baixos foram: QTL "F" e cromossomo VII; QTL "B", cromossomo II.







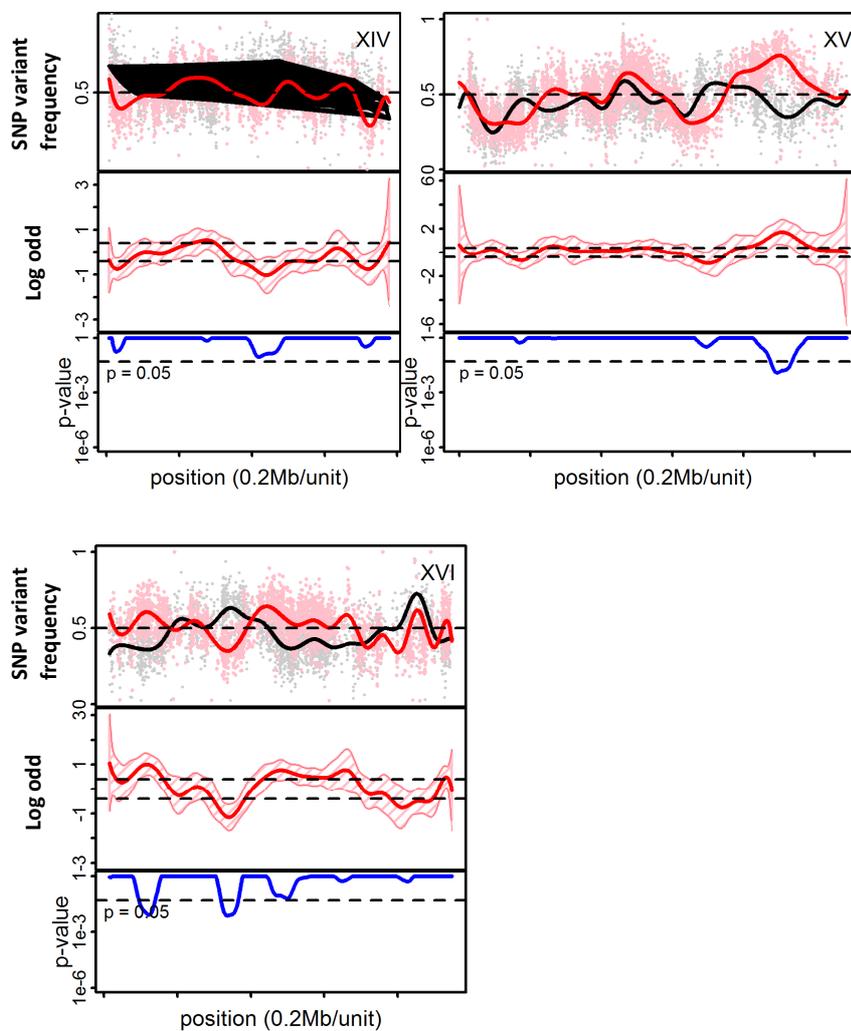


Figura 14 Mapeamento genético dos QTL's envolvidos no máximo acúmulo de etanol

4.1 Identificação dos genes putativos do QTL "F"

Nós olhamos mais detalhadamente para os QTL's que apresentaram ligação mais significativa com o fenótipo de máximo acúmulo de etanol. O QTL

“F” está localizado no cromossomo VII. As regiões com os menores *P-value* foram escolhidas para reduzirmos o tamanho do QTL. O QTL que originalmente possuía 192,515 pb foi dividido em duas regiões menores de comprimento de 36,772 pb (QTL E1) e 32,446 pb (QTL E2) cada uma contendo 13 e 16 genes respectivamente.

Todos os genes presentes no centro do QTL F1 e F2 (Figura 15) apresentaram mutações sinônimas e não sinônimas, o significa que sejam bons genes candidatos e que devam ser analisados por hemiziosidade recíproca (RHA – Reciprocal Hemizyosity Analysis). Alguns genes encontrados nestes QTL’s, segundo descrito no SGD (*Saccharomyces* Genome Database), têm potencial de envolvimento com o fenótipo estudado.

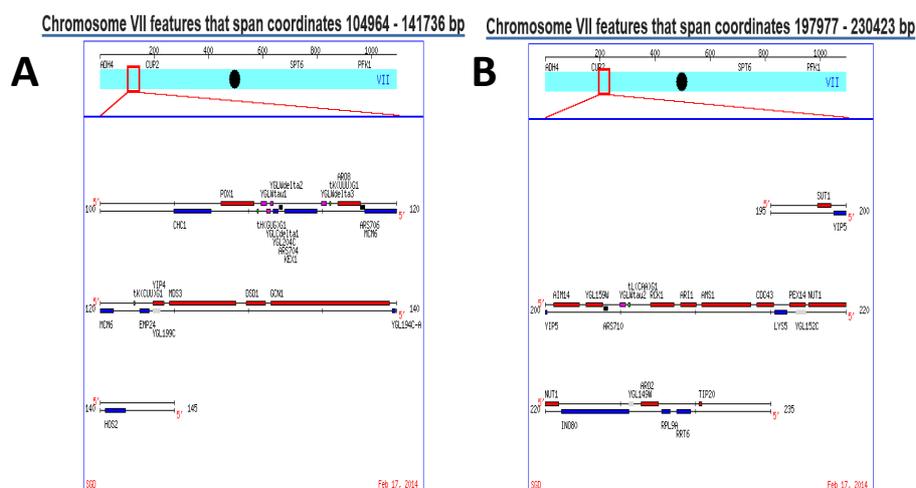


Figura 15 Genes presentes nos QTL’s F1(A) e F2(B)

O gene *RCK1* está relacionado com osmotolerância e resistência ao estresse oxidativo (BILSLAND et al., 2004) e apresenta sete mutações não sinônimas em seu ORF. No início da fermentação o oxigênio é utilizado para produção de biomassa, síntese lipídica que compõe membranas plasmáticas,

síntese de esteróis, por fim células saudáveis e em ótimas condições fisiológicas para fermentar. Embora o oxigênio em sua forma molecular O_2 seja importante, formas derivadas chamadas de espécies reativas de oxigênio (ROS - reactive oxygen species) são produzidas internamente pelas células em condições aeróbicas. Estas ROS podem causar danos a componentes celulares, DNA, inativação de proteínas, diminuição da viabilidade e envelhecimento celular (GIBSON et al., 2007). Estresse oxidativo tem papel importante na deterioração progressiva das células de leveduras, sobretudo para as técnicas que reutilizam as células ao fim do processo fermentativo, como ocorre com a produção de etanol no Brasil (AMORIM et al., 2011).

Nas últimas horas da fermentação a levedura passa a enfrentar estresses relacionados com a concentração crescente de etanol e a decrescente disponibilidade de nutrientes no meio, como o nitrogênio O gene *ATG1* está associado com resposta à falta de nitrogênio e autofagia (KABEYA; KAMADA, 2005). Durante a autofagia elementos citoplasmáticos são envolvidos em estruturas de membrana dupla chamadas de autofagossomos, que ao se fundir como o vacúolo libera seu conteúdo para ser degradado. A atividade de autofagia contribui para a proteção das mitocôndrias, e previne o acúmulo de ROS, diminuindo também o estresse oxidativo. Para as leveduras essa estratégia é essencial para a sobrevivência durante a escassez de nitrogênio (SUZUKI; ONODERA; OHSUMI, 2011)

O gene *HOS2* relacionado com resposta aos danos ao DNA (TKACH et al., 2013), porém diferentemente do gene *KIN3* também responsável por proteger o DNA (PAIS et al., 2013), o gene *HOS2* foi vinculado ao gene *APJ1* que apresentou melhora na tolerância ao etanol quando deletado do genoma da *S. cerevisiae* (SWINNEN et al., 2012)

Não foi encontrado QTL no cromossomo VII nos trabalhos de Pais et al. (2013) e Swinnen et al. (2012) que também estudaram as bases genéticas para

máximo acúmulo de etanol em linhagens industriais para produção de sake (CBS1585) e etanol combustível (VR1).

A cadeia de genes apontados pelo mapeamento de QTL's presente no cromossomo VII parece atuar sinergicamente protegendo a célula da variação do ambiente. O gene *RCK1* auxilia na tolerância ao estresse oxidativo do início do processo, enquanto o gene *ATG1* atua mais ao final da fermentação, preservando a viabilidade celular no momento que a disponibilidade de nitrogênio é quase inexistente. Juntamente com os anteriores, o gene *HOS2* oferece resposta contra os danos inferidos sobre o DNA. E durante todo o processo os genes *NUT*, *INO80*, e *ARO2* garantem e controlam a transcrição dos genes necessários às respostas da célula às condições adversas do ambiente.

4.2 Identificação dos genes putativos do QTL “B”

O QTL “B” está localizado no cromossomo II e corresponde a 79,590 pb, abrigando 49 genes. Analisando o centro do QTL, reduzimos a região para 29,237 pb com 19 genes (Figura 16). Segundo o sequenciamento todos os genes apresentam ao menos uma mutação não sinônima em suas ORF's

Neste QTL encontramos gene como *SMP1* associado com osmotolerância. Quando a levedura é submetida à pressão osmótica é ativada a via de transdução de sinal de resposta (MAPK - mitogen-activated protein kinase), uma série de genes é induzida e o gene *HOG1* desempenha um papel central no controle de expressão. Como alvo do gene *HOG1*, o gene *SMP1* participa da resistência contra o shock osmótico, sua deleção provoca perda da viabilidade celular (NADAL; CASADOME; POSAS, 2003).

Os genes presentes neste QTL possuem potencial de participarem do fenótipo de máximo acúmulo de etanol, portanto todos devem ser testados por

clonagem e inserção em linhagem para teste em fermentação para se conhecer a real natureza da colaboração para expressão do fenótipo.

Chromosome II features that span coordinates 575394 - 604631 bp

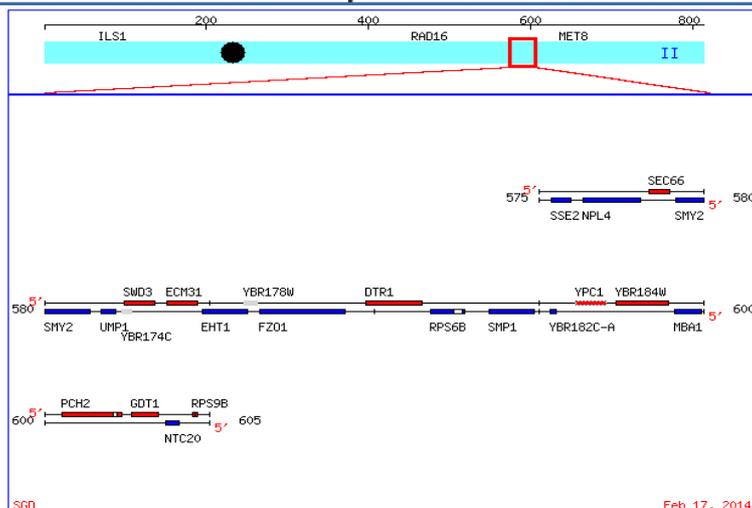


Figura 16 Genes presentes no QTL “B”

4.3 Análises dos QTL's

Neste estudo a análise de QTL foi realizada, e o resultado comparado com outras análises encontradas na literatura. No estudo realizado por Pais et al. (2013), o mapeamento de QTL para linhagem de Sake (CBS1585), revelou um QTL para o fenótipo de máximo acúmulo de etanol na posição genômica 168455–179051 pb do cromossomo I. Esta região abriga 15 genes, entre eles o *ADE1* e *KIN3* que foram testados e comprovadamente influenciam o fenótipo, principalmente o gene *KIN3* que codifica uma proteína quinase envolvida no reparo do DNA. No presente estudo o mapeamento também apontou um pequeno QTL no cromossomo I na posição genômica 189536- 195921 pb (Figura 17), o mapeamento sugere genes diferentes como *SWH1* e *YAT1*, que

estão descritos como associados ao complexo de golgi e utilização de etanol como fonte de carbono respectivamente (SCHMALIX; BANDLOW, 1993). O gene *YAT1* da linhagem estudada neste trabalho (Seg120) apresenta três mutações não sinônimas em seu ORF comparado com a linhagem referência S288c, o que por sua vez altera a proteína codificada, possivelmente, impossibilitando ou reduzindo a eficiência na utilização do etanol como fonte de carbono ao final da fermentação.

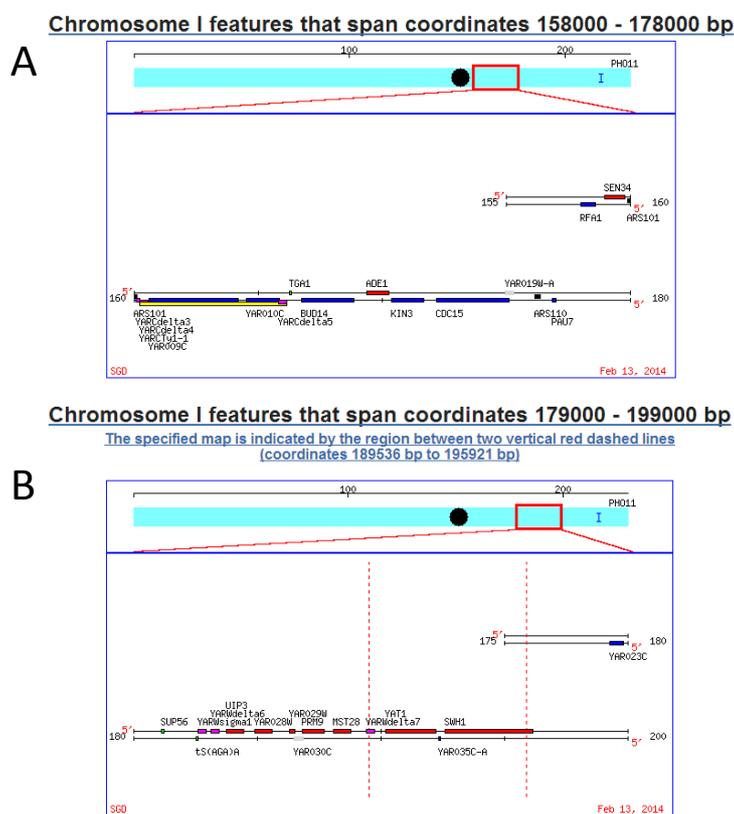


Figura 17 QTL cromossomo I, linhagem Sake (CBS1585) A, linhagem cachaça (D2-7) B

Os trabalhos de Swinnen et al. (2012) e Pais et al. (2013) também encontraram QTL no cromossomo V, ambos encontraram regiões que abrigam o gene *URA3*. O QTL descrito por Pais está na posição genômica 69,939 – 166080 pb com 48 genes (Figura 18) enquanto que o Swinnen só descreve o achado, não relatando o tamanho do QTL. Neste trabalho o QTL no cromossomo V está em uma posição diferente, entre 329,095 – 434,102 pb, que por sua vez, abriga 48 diferentes genes, o *URA3* não está ente eles.

Porém neste QTL encontramos genes como *SHO1* que está envolvido na resposta a estresse osmótico (HOG – high osmolarity glycerol) induzindo a produção de glicerol pela célula (TATEBAYASHI et al., 2006). Outro gene interessante é o *RAD51*, parte de um grupo de genes diretamente associados com o reparo de DNA (DSB – double strand breaks), muito importante na manutenção da integridade do DNA (SYMINGTON; SYMINGTON, 2002; TKACH et al., 2013).

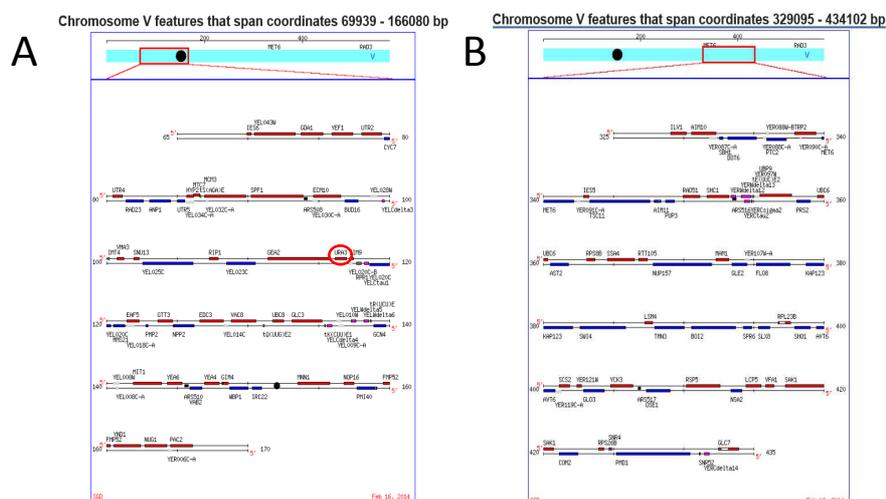


Figura 18 QTL cromossomo V, linhagem Sake (CBS1585) A, Pais 2013, linhagem cachaça (UFLA CA789) B. Destaque para o gene *URA3*

A associação entre o homem e a levedura *Saccharomyces cerevisiae* é muito antiga e a domesticação de linhagens selvagens, seguida de inúmeras gerações de seleções artificiais, moldaram o genoma desta levedura. Domesticação essa que impôs pressões dependentes ao uso pretendido, como panificação e produção de bebidas (BORNEMAN et al., 2011). Isso significa que o uso selecionou um arcabouço genético que abriga genes envolvidos com tolerâncias, resistências, aromas, viabilidade dentre outros. Conhecer essas bases genéticas é importante para a construção racional de linhagens dirigidas. O que nos dá a possibilidade de transferir genes diferentes com funções parecidas, como por exemplo, genes associados com osmotolerância presentes em levedura capaz de crescer em néctar, pode ser inserido em outra linhagem a ser utilizada em fermentação de alta gravidade, transferindo a habilidade da primeira levedura para a segunda (CANTO; HERRERA, 2012; HERRERA et al., 2009).

5 CONCLUSÕES

Os resultados apontam que a metodologia de sequenciamento de genoma completo é uma metodologia viável para a identificação de regiões no genoma em linhagens oriundas de fermentação de cachaça, uma vez que pode ser difícil estudar a associação de genótipo e fenótipo em linhagens utilizadas comercialmente, como também os prováveis genes envolvidos com fenótipos de interesse, como máximo acúmulo de etanol.

As diferenças encontradas entre os genes putativos das diferentes linhagens analisadas neste estudo e encontradas na literatura possivelmente se deve às diferenças genéticas e geográficas.

Os resultados ainda mostram que o agrupamento de segregantes juntamente com o mapeamento de QTL revelou um grande número de genes possivelmente associados ao fenótipo de máximo acúmulo de etanol.

REFERÊNCIAS

- AMORIM, H. V et al. Scientific challenges of bioethanol production in Brazil. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 91, n. 5, p. 1267–75, Sept. 2011.
- BEN-ARI, G. et al. Four linked genes participate in controlling sporulation efficiency in budding yeast. **PLoS Genetics**, San Francisco, v. 2, n. 2, p. 195. Nov. 2006.
- BILSLAND, E. et al. Rck1 and Rck2 MAPKAP kinases and the HOG pathway are required for oxidative stress resistance. **Molecular Microbiology**, Salem, v. 53, n. 6, p. 1743–1756, Sept. 2004.
- BORNEMAN, A. R. et al. Whole-genome comparison reveals novel genetic elements that characterize the genome of industrial strains of *Saccharomyces cerevisiae*. **PLoS Genetics**, San Francisco, v. 7, n. 2, p. 1001287, Feb. 2011.
- BREM, R. B. et al. Genetic dissection of transcriptional regulation in budding yeast. **Science**, New York, v. 296, n. 5568, p. 752–755, Apr. 2002.
- CANTO, A.; HERRERA, C. M. Micro-organisms behind the pollination scenes: microbial imprint on floral nectar sugar variation in a tropical plant community. **Annals of Botany**, Oxford, v. 110, n. 6, p. 1173–1783, Nov. 2012.
- D'AMORE, T.; STEWART, G. G. Ethanol tolerance of yeast. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 9, n. 6, p. 322–330, 1987.
- GIBSON, B. R. et al. Yeast responses to stresses associated with industrial brewery handling. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 31, n. 5, p. 535–69, Sept. 2007.
- GIETZ, R. D. et al. Studies on the transformation of intact yeast cells by the LiAc/SS-DNA/PEG procedure. **Yeast**, Chichester, v. 11, n. 4, p. 355-360, Apr. 1995.
- HERRERA, C. M. et al. Yeasts in floral nectar: a quantitative survey. **Annals of Botany**, Oxford, v. 103, n. 9, p. 1415–23, June 2009.
- HUXLEY, C.; GREEN, E. D.; DUNHAM, I. Rapid assesment of *S. cerevisiae* mating type by PCR. **Trends Genet**, Amsterdam, v. 6, n. 8, p. 236, Aug. 1990.

KABEYA, Y.; KAMADA, Y. Atg17 functions in cooperation with Atg1 and Atg13 in yeast autophagy. **Molecular Biology of the Cell**, Bethesda, v. 16, n. 5, p. 2544–2553, May 2005.

MA, M.; LIU, Z. L. Mechanisms of ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 87, n. 3, p. 829–845, July 2010.

MARULLO, P. et al. Genetic improvement of thermo-tolerance in wine *Saccharomyces cerevisiae* strains by a backcross approach. **FEMS Yeast Research**, Amsterdam, v. 9, n. 8, p. 1148–1160, Dec. 2009.

NADAL, E. de; CASADOME, L.; POSAS, F. Targeting the MEF2-Like transcription factor *smp1* by the stress-activated *hog1* mitogen-activated protein kinase targeting the MEF2-like transcription factor *Smp1* by the stress-activated *hog1* mitogen-activated protein kinase. **Molecular and Cellular Biology**, Washington, v. 23, n. 1, p. 229-237, Jan. 2003.

NEVOIGT, E. Progress in metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v. 72, n. 3, p. 379–412, Sept. 2008.

OTERO, J. M. et al. Industrial systems biology of *Saccharomyces cerevisiae* enables novel succinic acid cell factory. **PloSOne**, California, v. 8, n. 1, p. 54144, Jan. 2013.

PAIS, T. M. et al. Comparative polygenic analysis of maximal ethanol accumulation capacity and tolerance to high ethanol levels of cell proliferation in yeast. **PLoS Genetics**, San Francisco, v. 9, n. 6, p. 1003548, June 2013.

SCHMALIX, W.; BANDLOW, W. The ethanol-inducible *YAT1* gene from yeast encodes a presumptive mitochondrial outer carnitine acetyltransferase. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 268, n. 36, p. 27428–27439, Dec. 1993.

SUZUKI, S. W.; ONODERA, J.; OHSUMI, Y. Starvation induced cell death in autophagy-defective yeast mutants is caused by mitochondria dysfunction. **PloSOne**, California, v. 6, n. 2, p. 17412, 2011.

SWINNEN, S. et al. Identification of novel causative genes determining the complex trait of high ethanol tolerance in yeast using pooled-segregant whole-genome sequence analysis. **Genome Research**, New York, v. 22, n. 5, p. 975–84, May 2012.

SWINNEN, S.; THEVELEIN, J. M.; NEVOIGT, E. Genetic mapping of quantitative phenotypic traits in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Yeast Research**, Amsterdam, v. 12, n. 2, p. 215–227, Mar. 2012a.

SWINNEN, S.; THEVELEIN, J. M.; NEVOIGT, E. Genetic mapping of quantitative phenotypic traits in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Yeast Research**, Amsterdam, v. 12, n. 2, p. 215–227, Mar. 2012b.

SYMINGTON, L. S.; SYMINGTON, L. S. Role of RAD52 epistasis group genes in homologous recombination and double-strand break repair role of RAD52 epistasis group genes in homologous recombination and double-strand break repair. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v. 66, n. 4, p. 630-670, Dec. 2002.

TATEBAYASHI, K. et al. Adaptor functions of Cdc42, Ste50, and Sho1 in the yeast osmoregulatory HOG MAPK pathway. **The EMBO Journal**, Oxford, v. 25, n. 13, p. 3033–3044, July 2006.

TKACH, J. M. et al. Dissecting DNA damage response pathways by analyzing protein localization and abundance changes during DNA replication stress. **Nature Cell Biology**, London, v. 14, n. 9, p. 966–976, Sept. 2013.