

Universidade Federal do Espírito Santo
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

Olga Vitória Pereira Leão

**Avaliação pós-transcricional do gene
FLO1 no processo de floculação de
*Saccharomyces cerevisiae***

VITÓRIA
2016

Olga Vitória Pereira Leão

**Avaliação pós-transcricional do gene
FLO1 no processo de floculação de
*Saccharomyces cerevisiae***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Patricia Machado Bueno Fernandes.

VITÓRIA
2016

Olga Vitória Pereira Leão

**Avaliação pós-transcricional do gene
FLO1 no processo de floculação de
*Saccharomyces cerevisiae***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Comissão Examinadora

Prof^a Dr^a. Patricia Machado Bueno Fernandes
Universidade Federal do Espírito Santo
Orientadora

Prof. Dr. Antonio Alberto Ribeiro Fernandes
Universidade Federal do Espírito Santo
Coorientador

Prof. Dr. Rogélio Lopes Brandão
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Prof. Dr. Alexandre Santos
Universidade Federal do Espírito Santo

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha orientadora Profa. Dra. Patrícia Machado Bueno Fernandes, que me concedeu a oportunidade de fazer parte do laboratório e que durante esses dois anos dedicou o seu tempo para me orientar de forma crítica e com toda a liberdade para pensar e realizar os experimentos.

Ao Prof. Dr. A. Alberto Ribeiro Fernandes pelo seu empenho em manter o crescimento do Laboratório de Biotecnologia Aplicada ao Agronegócio (LBAA), por seus ensinamentos.

À Dra. Fernanda Bravim pela sua dedicação e paciência, que desde o começo nunca hesitou em repassar os seus conhecimentos.

À Universidade Federal do Espírito Santo.

Aos professores Dr. Rogélio Lopes Brandão e Dr. Alexandre Santos por aceitarem participar da banca e pelo tempo dedicado às correções do trabalho.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia pelo apoio e ensinamentos.

À Secretaria do PPGBiotec da UFES pela atenção e carinho com que sempre nos atenderam.

Às agências de fomento, FINEP, CNPq, CAPES, FAPES pelo apoio financeiro e bolsa de estudo que viabilizaram o desenvolvimento deste trabalho.

Ao meu marido Tiago, acima de tudo meu grande amigo e companheiro que tem me apoiado em todos os momentos, mesmo naqueles de puro estresse.

Aos meus pais, José Maria e Roseli, meu porto seguro.

Aos meus irmãos Dani e Lucas, por estarem torcendo por mim em todos os momentos.

À família Paiva Barbosa, pelo carinho e incentivo.

A todos os amigos do LBAA, aos antigos e atuais, pelo apoio e aprendizado.

Muito obrigada.

Resumo

Saccharomyces cerevisiae foi o segundo organismo eucarionte a ter seu genoma completamente sequenciado e vem sendo utilizada há várias décadas como um modelo para estudos celulares e moleculares. Esta levedura é a responsável direta na transformação do açúcar em álcool etílico e dióxido de carbono, sendo um dos microrganismos mais utilizados nas indústrias de fermentação. A floculação é um fenômeno no qual as células de levedura se agrupam e sedimentam rapidamente a partir do meio onde estão suspensas. É um processo muito complexo e depende de numerosos fatores, tais como as características do meio (pH e a presença de cátions), as condições de fermentação (oxigenação, os açúcares, a temperatura de crescimento, a concentração de etanol) e a expressão dos genes da família *FLO*. A floculação ocorre pela interação de proteínas, as floculinas, e carboidratos (receptores) na parede celular das células vizinhas. Estudos anteriores demonstraram que tanto as cepas floculantes quanto as não-floculantes apresentaram expressão diferenciada dos genes da família *FLO* (*FLO1*, *FLO8*, *FLO10* e *FLO11*) nas fases logarítmicas e estacionária de crescimento, demonstrando assim, que mesmo as cepas não floculantes induzem a expressão dos genes relacionados ao processo de floculação. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a tradução de um desses genes, *FLO1*, nível de produção da proteína Flo1 e sua localização subcelular. Os resultados obtidos demonstraram a expressão da proteína Flo1 na parede celular das cepas não floculantes BT0510, BT0601 e floculante BT0510 de *S. cerevisiae*. Os resultados obtidos contrariam dados da literatura que atribuem o fenótipo floculante à presença das proteínas Flo na parede celular e o perfil não floculante à ausência da floculina, demonstrando que outros fatores estão relacionados ao fenótipo de floculação. Desta forma, os resultados apresentados poderão contribuir para o melhor entendimento da floculação e conseqüentemente agregar melhorias aos processos fermentativos.

Palavras-chave: *Saccharomyces cerevisiae*, floculação, fermentação, genes *FLO1*, proteína Flo1, GFP.

ABSTRACT

Saccharomyces cerevisiae was the second eukaryotic organism to have its genome sequenced and has been used for several decades as a model for cellular and molecular studies. This yeast is directly responsible for the transformation of sugar into ethanol and carbon dioxide, being one of the most used microorganisms in the fermentation industry. Flocculation is a phenomenon in which the yeast cells group and sediment rapidly in the medium in which they are suspended. It is a very complex process and depends on numerous factors such as the characteristics of the medium (pH and the presence of cations), conditions of fermentation (oxygenation, sugars, growth temperature, and the ethanol concentration) and the expression of genes of the *FLO* family. The process involves the interaction of specialized cell wall proteins called flocculins, and carbohydrates (receptors) in the cell wall of neighboring cells.

Previous studies have shown that both flocculent and non-flocculent strains present different expression of *FLO* gene family (*FLO1*, *FLO8*, *FLO 10* and *FLO11*) in the logarithmic and stationary phases of growth, thereby demonstrating that even the non-flocculent strains induce expression of genes related to flocculation process.

The objective of this study was to evaluate the translation of one of these genes, *FLO1*, level of production of Flo1 proteins and its subcellular localization. The results showed the expression of Flo1 flocculina in the cell wall of the three strains of *S. cerevisiae*. These results go against literature data that attribute the flocculant phenotype to the presence of Flo proteins in the cell wall and the profile of non-flocculant yeast to the absence of flocculin, demonstrating that other factors are related to the phenotype of flocculation. Thus, the results may contribute to a better understanding of flocculation and to the upgrading of fermentation processes.

Keywords: fermentation, *FLO1*, flocculation, flocculin, *Saccharomyces cerevisiae*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Micrografias representando a morfologia e estrutura de <i>Sacharomyces cerevisiae</i>	12
Figura 2: Microscopia eletrônica de varredura da levedura <i>S. cerevisiae</i> , mostrando algumas características morfológicas comum.....	13
Figura 3: Representação esquemática da composição e estrutura da parede celular de <i>S. cerevisiae</i>	14
Figura 4A: Flocculação em <i>S. cerevisiae</i>	18
Figura 4B: Microscopia eletrônica de varredura de células flocculantes e não flocculantes após centrifugação.....	18
Figura 5: Células flocculantes de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> observadas em microscopia eletrônica de varredura.....	19
Figura 6: Representação esquemática do mecanismo da flocculação em <i>S. cerevisiae</i>	20
Figura 7: Estrutura geral da flocculina.....	21
Figura 8: Representação esquemática dos fatores que afetam a flocculação.....	24
Figura 9: Representação esquemática da Fusão de <i>GFP</i> à extremidade C-terminal do <i>FLO1</i>	32
Figura10: Gel de agarose da confirmação da purificação do plasmídeo pFA6a-GFP (S65T) -kanMX6	35

Figura 11: Gel de agarose da confirmação da construção do cassete de transformação.....	36
Figura 12: Gel de agarose da confirmação da transformação.....	37
Figura 13A: Microscopia de fluorescência da linhagem floculante BT0510 na fase estacionaria de desenvolvimento celular.....	38
Figura 13B: Microscopia de fluorescência da linhagem não floculante BT0505 na fase estacionaria de desenvolvimento celular	38
Figura 13C : Microscopia de fluorescência da linhagem não floculante BT0601 na fase estacionaria de desenvolvimento celular	38
Figura 14: Imagem ampliada de microscopia de fluorescência da levedura <i>S.cerevisiae</i> com destaque para a região de formação do broto celular	39
Figura 15: Expressão da proteína Flo1 fusionada a GFP em células de <i>S. cerevisiae</i> BT0510 floculante.....	41
Figura 16: Expressão da proteína Flo1 fusionada a GFP em células de <i>S. cerevisiae</i> BT0505 não floculante.....	41
Figura 17: Expressão da proteína Flo1 fusionada a GFP em células de <i>S. cerevisiae</i> BT0601 não floculante.....	42
Figura18: Expressão da proteína Flo1-GFP nas cepas de <i>S. cerevisiae</i> no período de 36 horas de crescimento.....	43
Figura19: Expressão da proteína Flo1-GFP nas cepas de <i>S. cerevisiae</i> no período de 48 horas de crescimento.....	44

LISTA DE SIGLAS

G418 =Geneticina

GFP – *Green Fluorescent Protein*)

GPI= Glicosilfosfatidilinositol

LBAA=Laboratório de Biotecnologia Aplicada ao Agronegócio

PCR = Reação em cadeia da polimerase

YEPD = Extrato de levedura, peptona e dextrose

YNB = *Yeast Nitrogen Base*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
1.1. A LEVEDURA <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	12
1.2. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> como modelo e sua aplicação biotecnológica	15
1.3. Fermentação alcóolica	16
1.4 Floculação.....	19
1.4.1 Floculinas	20
1.4.2 Fenótipos da Floculação	22
1.5 Floculinas X Floculação	22
2.0 OBJETIVOS	27
2.1. OBJETIVO GERAL.....	27
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
3.0 Materiais e Métodos	28
3.1 Microrganismo	28
3.2. Plasmídeo.....	28
3.3 Purificação do Plasmídeo	28
3.4 Primers.....	29
3.5 Transformação de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	29
3.6 Confirmação do fusionamento	30
3.7 Microscopia de fluorescência	33
3.8 Citometria de fluxo	33
4.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO	35

4.1 Análise da expressão da proteína Flo1 e sua localização subcelular em cepas floculantes e não floculantes de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	35
4.2 Análise da localização subcelular da proteína Flo1 por microscopia de fluorescência.....	37
4.3 Avaliação da expressão da proteína Flo1-GFP por citometria de fluxo.....	40
5.0 CONCLUSÕES.....	46
6.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47

1. INTRODUÇÃO

1.1 A LEVEDURA *Saccharomyces cerevisiae*

Leveduras são fungos unicelulares, portanto, organismos eucariontes, heterotróficos, imóveis e com parede celular definida. Pertencem majoritariamente ao grupo dos Ascomicetos, e exibem uma grande heterogeneidade com relação ao tamanho celular, forma, cor e divisão sexual, mesmo entre indivíduos da mesma linhagem (FERNANDES et al., 2009). As células de *Saccharomyces cerevisiae* apresentam forma elipsoidal, com tamanho que varia entre 5-10 μm no diâmetro maior e 1-7 μm no diâmetro menor (KREGER-VAN RIJ, 1987) (Figura 1).

De acordo com a classificação taxonômica, a espécie *S. cerevisiae* está incluída no Reino Fungi; Filo Ascomycota; Gênero *Saccharomyces* (KURTZMAN, 1997). O gênero *Saccharomyces* normalmente compreende fungos unicelulares, diploides.

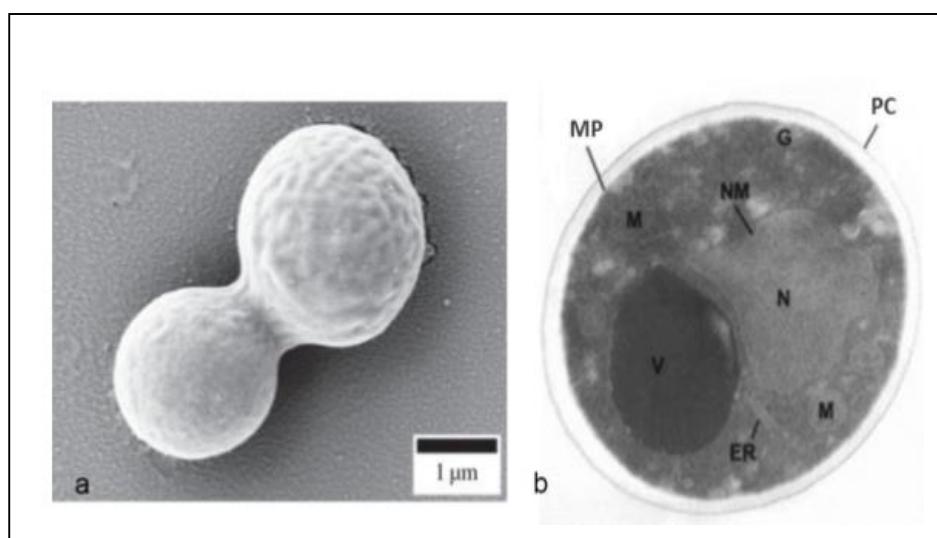


Figura 1: Micrografias representando a morfologia e estrutura de *Saccharomyces cerevisiae*. (a) Imagem por microscopia eletrônica de varredura. (b) Célula à pressão atmosférica por microscopia eletrônica de transmissão de 0,8 μm . PC, parede celular; MP, membrana plasmática; NM, membrana nuclear; N, núcleo; V, vacúolo; M, mitocôndria; G, complexo de golgi; ER, retículo endoplasmático (FERNANDES et al. 2001; NOWLIN et al. 2014).

A levedura *S. cerevisiae* se divide assexuadamente por gemulação ou brotamento, processo no qual a nova célula se forma como uma pequena gêmula ou broto (Figura 2) na célula mãe, crescendo até separar-se dela, e possuem ascósporos ovais que não são liberados do asco durante a reprodução.

Após a divisão celular, a célula filha deixa na célula mãe uma cicatriz de nascimento. O número de cicatrizes de gemas presentes na parede celular representa o número de vezes que a célula se dividiu. (Figura 2). Uma outra característica importante de *S. cerevisiae* é que estas são anaeróbicas facultativas, demonstrando metabolismo tanto respiratório quanto fermentativo. No entanto, o metabolismo fermentativo predomina sobre o respiratório quando as concentrações de açúcares estão elevadas, mesmo sob condições aeróbicas. Esse comportamento metabólico é provocado por um efeito conhecido como repressão catabólica, sendo que as altas concentrações de glicose inibem a expressão de genes envolvidos na via respiratória, fazendo com que o piruvato seja reduzido a etanol pelo processo fermentativo (FERNANDES et al, 2009; TREVISOL et al, 2011).

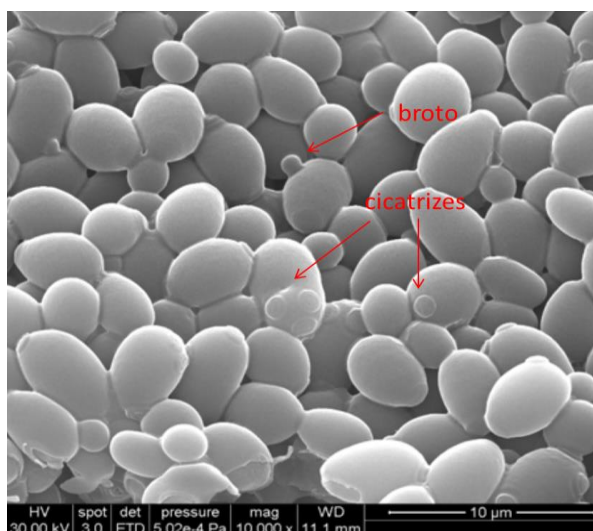


Figura 2: Microscopia eletrônica de varredura da levedura *S. cerevisiae*, mostrando algumas características morfológicas comuns: broto (gêmula) e cicatrizes (aumento de 10000x). Adaptado de MARX et al., 2011

Uma estrutura de grande importância para a *S. cerevisiae* é sua parede celular. Esta é a camada mais externa do envoltório celular, contém mais de 20 tipos de manoproteínas que desempenham papéis diferentes na construção, preservação, modificação da estrutura e interação das células com suas adjacências, como por exemplo, as interações intercelulares durante a aglutinação ou floculação (SMITH et al.,2000). A composição de sua parede celular consiste basicamente de polissacarídeos de glicose, manose ou N-acetilglicosamina, β -1-3 e β -1-6-glucanas. Os polissacarídeos de manose são ligados a proteínas, formando as manoproteínas, e se localizam na parte externa da parede. Já os de N-acetilglicosamina ocorrem em pequenas quantidades, formando a quitina, com função primordial na septação e no brotamento (Figura 3) (FERNANDES et al.,2009).

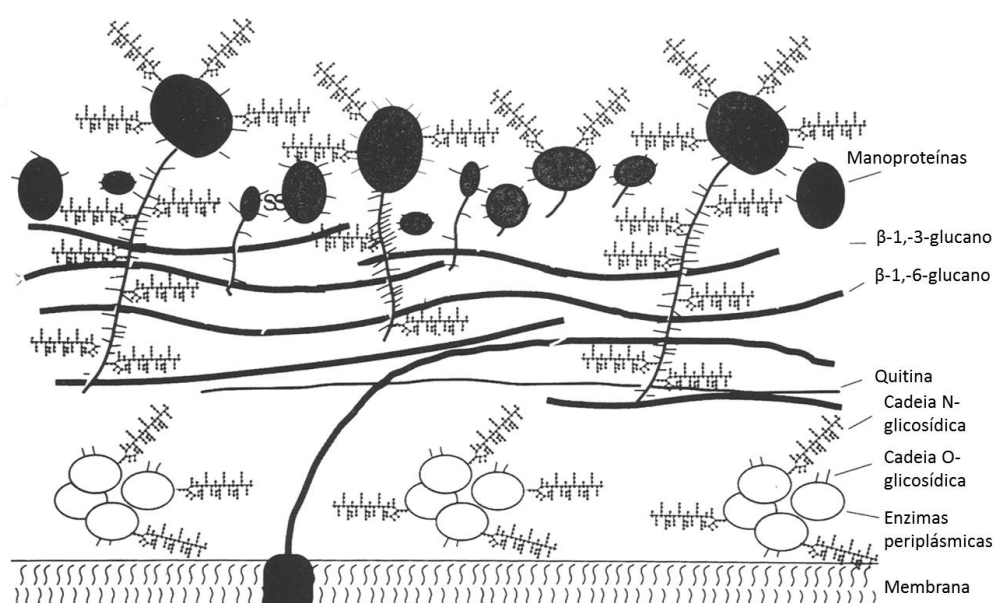


Figura 3. Composição e estrutura da parede celular de *S. cerevisiae*. A parede celular é constituída por duas camadas: a camada interna proporciona a resistência da parede celular, e é composta por β -1,3 e β -1,6-glucanos, complexados com moléculas de quitina. A camada externa é composta de manoproteínas. A maioria das manoproteínas são covalentemente ligadas aos glucanos da camada interior. Enzimas periplásmicas encontram-se ancoradas entre a membrana celular e a camada interna. Adaptado de OSUMI, 1998.

1.2 *Saccharomyces cerevisiae* como modelo e sua aplicação biotecnológica

A *S. cerevisiae* é a espécie de levedura mais utilizada em estudos biotecnológicos. Apresenta uma grande diversidade de cepas. Apesar de serem da mesma espécie, podem ser muito diferentes umas das outras quanto ao seu genótipo e fenótipo. Apresentam ampla dispersão no meio ambiente, podendo ser encontradas em folhas, flores, frutos em decomposição, locais como padarias, cervejarias, destilarias e indústrias produtoras de etanol combustível (NEVOIGT, 2008).

Apesar de simples, a *S. cerevisiae* é um organismo conservado evolutivamente sendo considerado um organismo modelo de grande importância para os estudos dos eucariotos (FERNANDES et al., 2009).

Por serem facilmente cultivados, possuírem ciclo de vida curto e por permitirem fácil manipulação gênica, a *S. cerevisiae* foi utilizada em estudos de extrema importância para a compreensão da fisiologia da célula eucariótica, como por exemplo, o controle do ciclo celular (KATAOKA et al., 1985).

Além disso, em abril de 1996 foi depositada em um banco de dados público, a sequência completa do seu genoma, com 16 cromossomos lineares contendo 12 Mb de bases nitrogenadas e aproximadamente 6000 genes (GOFFEAU et al., 1996). Uma vasta quantidade de processos biotecnológicos realizados atualmente faz uso da levedura *S. cerevisiae*. Isso se dá em decorrência, principalmente, à sua alta adaptabilidade às alterações ambientais, ajustando rapidamente seu metabolismo para lidar com tais variações e também à sua extraordinária capacidade em produzir etanol, a sua tolerância a baixos valores de pH, a alta concentração de açúcar e de etanol (NEVOIGT, 2008). Linhagens de *S. cerevisiae* selvagens são as únicas capazes de sobreviver e dominar as dornas de fermentação alcoólica, sendo estes ambientes extremamente inóspitos (BASSO et al., 2008).

Essa elevada capacidade de decomposição do açúcar em álcool etílico e dióxido de carbono confere um papel de suma importância à *S. cerevisiae* nos processos fermentativos nas indústrias produtoras de bebidas e etanol, sendo de grande interesse os estudos que visam o melhoramento das cepas utilizadas industrialmente a fim de aumentar a produtividade desses processos fermentativos.

1.3 Fermentação Alcoólica

Produtos de fermentação são usados desde a antiguidade. Há registros que comprovam o uso de alimentos fermentados pelos sumérios, egípcios antigos, assírios e babilônios. A produção de bebidas alcoólicas pela fermentação de grãos de cereais já era conhecida antes do ano 6.000 a.C., porém, coube a Pasteur, a partir de 1857, a explicação clara sobre a natureza da fermentação alcoólica, atribuindo-a a seres vivos, as leveduras, como agentes causais. Segundo ele, 100 partes de sacarose proporcionam 105,4 partes de açúcar invertido, que, por sua vez, produzem 51,1 partes de etanol, 49,4 partes de gás carbônico, 3,2 partes de glicerol, 0,7 parte de ácido succínico e uma parte de outras substâncias (VILLEN, 2009). As pesquisas subsequentes no desvendamento das reações intermediárias receberam novo ímpeto com a constatação feita por Büchner, em 1897, que extratos livres de células de levedura possuíam a capacidade de provocar, a fermentação alcoólica. *S. cerevisiae* é um organismo amplamente utilizado nos processos de produção brasileiros, pois quando adicionada glicose ou outra fonte de carbono fermentável utilizará a fermentação alcoólica como processo metabólico principal para a obtenção de energia (HIRA e OLIVEIRA, 2009).

De acordo com o ministério da agricultura o Brasil é um dos principais produtores de bebidas alcoólicas e o primeiro produtor e exportador de etanol de cana-de-açúcar do mundo sendo tais mercadorias de primeira importância na economia do país. Em 2013 foram mais de 28 bilhões de litros de etanol (MAPA, 2013), já a produção de cachaça atingiu a marca de e 551,54 milhões de litros, com o faturamento R\$5,95 bilhões no mesmo ano, de acordo com a Associação Brasileira de bebidas (ABRABE,2013).

Esse mercado movimentava anualmente bilhões de reais em termos de faturamento e geração de empregos diretos e indiretos.

Apesar da grande importância econômica da fermentação alcoólica, diversos fatores físicos (temperatura, pressão osmótica), químicos (pH, oxigenação, nutrientes minerais e orgânicos, inibidores) e microbiológicos (espécie, linhagem e concentração da levedura, contaminação bacteriana), afetam o rendimento da fermentação e a eficiência da conversão de açúcar em etanol (LIMA, BASSO e AMORIM, 2001).

As leveduras presentes nas dornas de fermentação são responsáveis pela transformação dos açúcares em etanol, processo que independe da presença de oxigênio (PIŠKUR, et al., 2006).

Segundo Silva Filho e colaboradores (2005), dois dos principais fatores que influenciam no processo de fermentação alcoólica para a produção de combustíveis são a capacidade fermentativa das leveduras utilizadas no processo, e a resistência destas às condições de estresses submetidas. Dentre os fatores microbiológicos que afetam a fermentação, algumas características fenotípicas de certas cepas de *S. cerevisiae* podem prejudicar o desempenho industrial.

Entre eles a floculação prematura das células, sendo esse o maior problema encontrado nas usinas de produção de álcool combustível e indústrias de bebidas alcoólicas, uma vez que a diminuição do tempo de contato entre as células e o mosto reduz o rendimento da fermentação, provocando sérios prejuízos ao processo fermentativo (AMORIM, 2005).

Após o consumo do açúcar no mosto fermentativo, as células devem ser separadas a partir do caldo de fermentação para utilização posterior. O problema da separação da biomassa é basicamente associado ao seu pequeno tamanho e densidade. Os métodos convencionais de separação sólido-líquido incluem a sedimentação, filtração ou centrifugação (HATTI-KAUL e MATTIASSON, 2001).

O processo de separação por sedimentação celular é um processo espontâneo de separação celular, no qual as leveduras floculam e posteriormente sedimentam no meio em que estão suspensas.

Apesar de mais econômico financeiramente exige grandes tanques de sedimentação e tempos de retenção extensos para obter um sobrenadante isento de células, além disso a floculação prematura da levedura é relatada como o fator limitante do uso dessa técnica de sedimentação. Como alternativa a esse processo, as indústrias utilizam células não floculantes (Figura 4) que são removidas por filtração, porém as despesas associadas com os sistemas de filtragem, bem como o consumo de energia para operação dos filtros aumentam os custos de todo o processo, inviabilizando o seu uso em muitas indústrias, especialmente aquelas que produzem produtos de baixo custo e grande volume.

A separação das células do mosto fermentativo pode também ser obtida por centrifugação, no entanto, o capital necessário para investir em centrífugas e o consumo de energia para a manutenção do processo de centrifugação limita a utilização de centrífugas para a produção do bioetanol (XU et al., 2005).

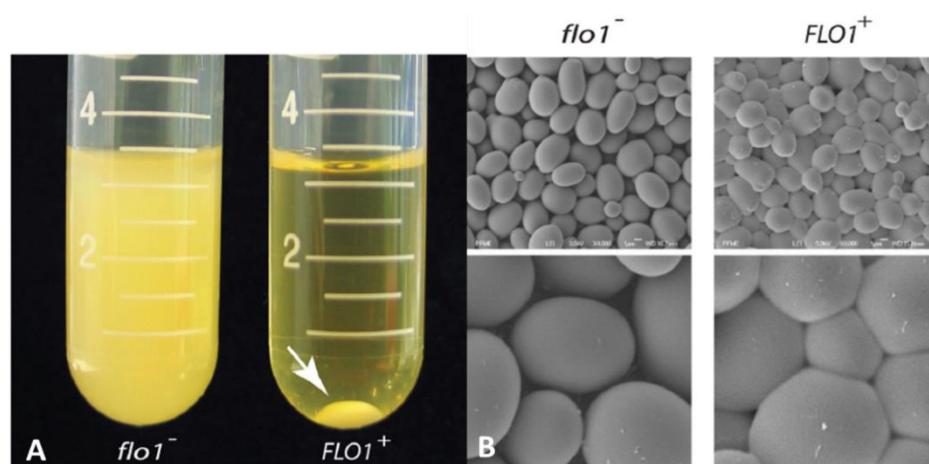


Figura 4. Floculação em *S. cerevisiae*. A) Células não-floculantes ($FLO1^-$) permanecem suspensas no meio, enquanto células floculantes ($FLO1^+$) sedimentam, formando corpo de fundo (seta). B) Microscopia eletrônica de varredura de células floculantes e não-floculantes após centrifugação, mostrando que as células floculantes se juntam de modo a formar uma estrutura densamente tridimensional, com pouco espaço intercelular. Em contraste, as células não-floculantes se comportam como esferas empilhadas independentes com claras lacunas entre as células. Modificado de SMUKALLA et al., 2008.

Diante das possibilidades de separação celular, analisando custos e viabilidade celular, a sedimentação usando células floculantes se destaca como método de separação mais vantajoso.

Além da importância no processo de separação e rendimento final da fermentação, é importante ressaltar que a floculação da levedura pode interferir também no sabor e na pureza de produtos como a cerveja e a cachaça, isso porque, se a floculação ocorre no momento adequado, ou seja, ao final da depleção total do açúcar do mosto fermentativo, o produto final terá um maior grau de pureza, e conseqüentemente uma maior qualidade.

1.4 Floculação

A floculação é definida classicamente como um fenômeno de agregação celular assexuado, cálcio-dependente e reversível (Figura 5). Este fenômeno celular acontece normalmente em condições de estresse que podem afetar a composição e morfologia da parede celular. Alguns fatores de estresse promotores de floculação comuns aos processos fermentativos industriais, incluem a diminuição da quantidade de nutrientes, e condições de temperatura, pH e oxigênio não adequados ao crescimento (VERSTREPEN *et al.*, 2003).

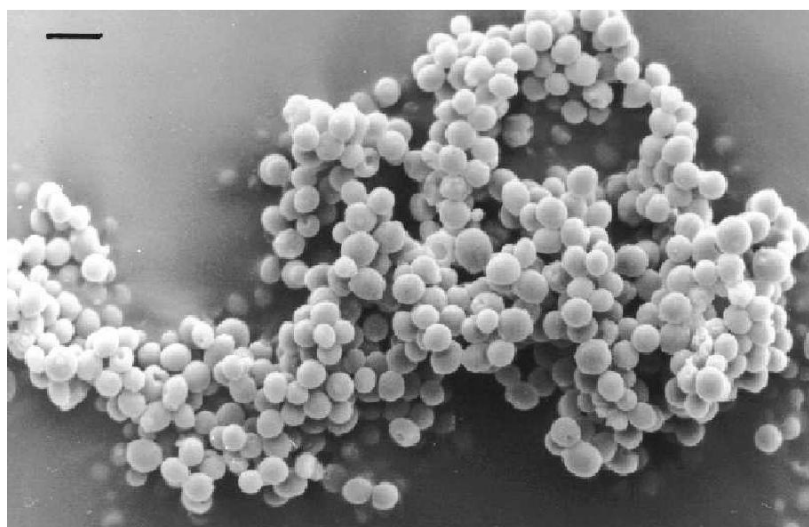


Figura 5: Células floculantes de *Saccharomyces cerevisiae* observadas em microscopia eletrônica de varredura (barra corresponde a 10 μm) (Domingues *et al.*, 2000c)

O mecanismo de floculação em *S. cerevisiae* do ponto de vista molecular envolve interações cálcio dependentes, entre as proteínas floculinas e resíduos de manose presentes na parede celular das células adjacentes (Figura 6) (STRATFORD,1996). Embora as floculinas estejam diretamente envolvidas no processo de floculação ainda não está totalmente claro como esta interação acontece (VERSTREPEN *et al.*, 2003; VERSTREPEN& KLIS, 2006).

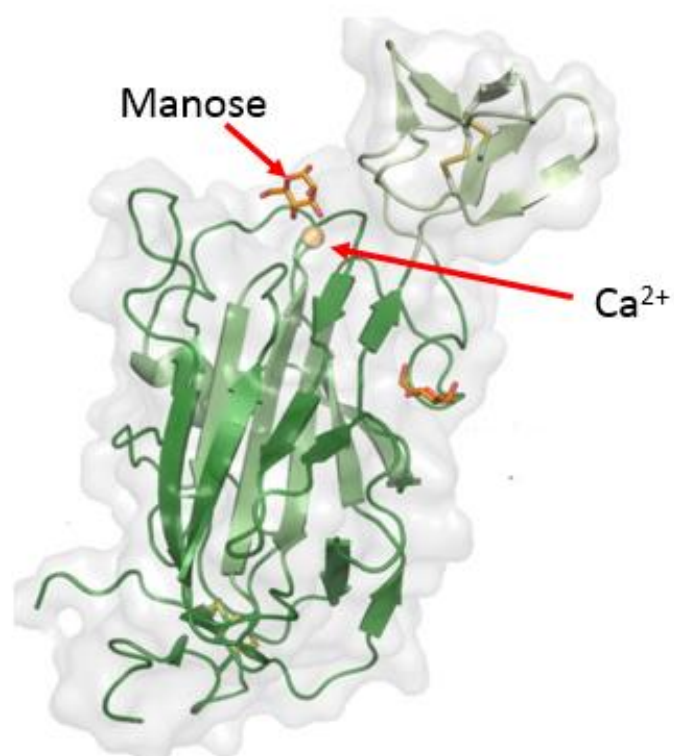


Figura 6. Mecanismo da flocculação em *S. cerevisiae*. Íons cálcio permitem que as flocculinas atinjam sua conformação ativa e flocculinas presentes em células flocculantes, despontam para fora da parede celular e interagem com resíduos de manose (receptores) nas paredes das células vizinhas. Adaptado de Veelders et al, 2010.

1.4.1 Flocculinas

As flocculinas são classificadas geralmente como glicoproteínas que estão localizadas na superfície da parede celular, e medeiam interações entre as células e o ambiente externo. São amplamente distribuídas na natureza e já foram isoladas de plantas, animais, microrganismos e vírus. Essas moléculas são definidas como proteínas de origem não imune que possuem pelo menos um sítio de ligação a carboidratos e que, através deste (s) sítio (s) são capazes de, eventualmente, se ligarem reversivelmente ao glicocálix das células e desencadearem uma grande variedade de efeitos biológicos (PEUMANS et al., 2000).

Em leveduras, as floculinas apresentam uma organização básica que as caracterizam. Além de se localizarem no lado externo das células, há um sinal secretório de 20 a 30 aminoácidos na porção N-terminal (normalmente removido durante a inserção da proteína no lúmen do retículo endoplasmático rugoso), um domínio de ligação proteína-açúcar (“*lectin like*”), também situado na porção N-terminal, uma porção central com sequências repetitivas ricas em resíduos de serina e treonina, contendo também sequências hidrofóbicas, e uma porção C-terminal que media a interação da proteína com a matriz da parede celular através da cauda de GPI (glicosilfosfatidilinositol) inserida na membrana celular (Figura 7) (FIGUEIREDO, 2012).

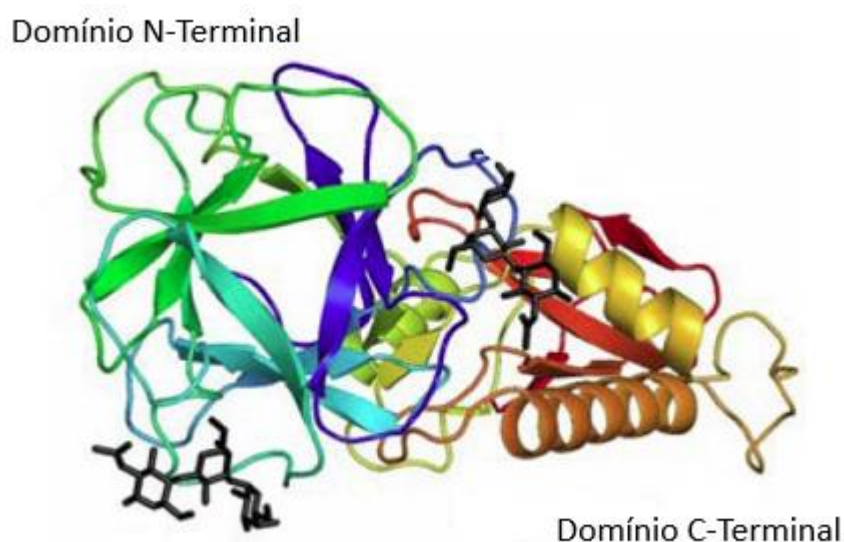


Figura 7: Estrutura geral da floculina: Domínio N-Terminal da proteína contendo o domínio “*lectin-like*” (A) de ligação de açúcares; domínio C-Terminal contendo a cauda GPI (E). Adaptado de GRAHN et al 2009

1.4.2 Fenótipos da floculação

Considerando a inibição reversível da floculação por açúcares, sais e baixo valor de pH, além da sensibilidade a proteases, dois fenótipos de floculação principais foram distinguidos: Flo1 e NewFlo (STRATTFORD & ASSINDER, 1991). O fenótipo Flo1 é constitutivamente floculante e inclui cepas em que a floculação é especificamente inibida por manose e seus derivados, geralmente associado a cepas laboratoriais de *S. cerevisiae*. Por outro lado, o fenótipo NewFlo está presente na maior parte das cepas de cervejaria ale, no qual a floculação é inibida reversivelmente pela manose, maltose, glicose e sacarose, mas não por galactose. Pelo fato de vários açúcares inibirem a floculação, este fenótipo previne as leveduras de uma floculação precoce, sendo por isso, tipicamente associado a cepas industriais (CUNHA, et al., 2006).

1.5 Floculinas x Floculação

Vários estudos têm caracterizado genes envolvidos no processo de floculação da levedura *S. cerevisiae*, incluindo os pertencentes à família *FLO*, que é constituída por diferentes genes com localização telomérica, incluindo *FLO1*, *FLO5*, *FLO9*, *FLO10*, e o gene *FLO11* (GUO et al., 2000; HALME et al., 2004; VERSTREPEN et al., 2005; ZARA et al., 2005). Dentre os citados, o mais estudado é o gene *FLO1*, um gene dominante localizado no braço direito do cromossomo I. Sua fase de leitura é constituída por aproximadamente 4.6 kb, a qual inclui um grande número de sequências repetitivas em sua parte central que é variável de acordo com a linhagem. Este gene codifica uma glicoproteína (Flo1p), composta por 1537 aa, rica em serina e treonina, e possui a estrutura típica de uma floculina (VERSTREPEN., et al. 2003). A proteína Flo1 é considerada a proteína de adesão mais dominante em *S. cerevisiae* (GOOSSENS., et al 2015).

Para que a floculação ocorra, os genes relacionados precisam ser ativados para a formação das floculinas. Na presença das floculinas em sua forma ativa a floculação acontece (STRATTFORD, 1992 a). As adesinas, ou mais especificamente, as floculinas, conferem às células a capacidade de aderência, assim, as células

floculantes possuem em sua parede celular receptores para carboidratos e as floculinas, enquanto as células não floculantes possuem apenas receptores para carboidratos (STRATFORD, 1996). Apesar de parecer um mecanismo simples, a ativação desses genes é um processo complexo (BONY, 1997). Esta complexidade pode ser explicada por três principais fatores: primeiramente, os variados genes da família *FLO* podem ser regulados por meio de diferentes mecanismos, podendo ser induzidos ou reprimidos por diversos fatores (TEUNISSEN, 1995). O segundo fator diz respeito à instabilidade da família dos genes *FLO* que pode causar diferenças no padrão de floculação entre as diferentes cepas de leveduras e ao longo das gerações (SATO, 2002). Por fim, o terceiro fator refere-se ao fato de que a floculação não é apenas um processo bioquímico, mas também um processo físico, pois as células precisam colidir umas contra as outras para que ocorra a ligação entre a floculina e os resíduos de manose, desencadeando a floculação (Figura 8).

Alguns estudos identificaram sutis diferenças na especificidade de várias lectinas. A mudança do número de repetições internas no gene *FLO1* resulta na modificação do grau de floculação e de sensibilidade a condições de estresse (SMUKALLA et al., 2008).

Além disso, sugere-se que a variação do número de repetições pode ser a força motriz da criação de novas proteínas Flo; isto resulta em uma matriz de novos fenótipos de floculação, o que permite que as células de levedura adaptem as propriedades de floculação rapidamente a um ambiente particular (VERSTREPEN et al., 2005; VERSTREPEN & KLIS, 2006; DRANGINIS et al., 2007).

Foi demonstrado também, que a superexpressão de *FLO1* e *FLO10* resulta em uma forte e fraca floculação, respectivamente. Enquanto a superexpressão do gene *FLO11* resulta em uma forte aderência das células a superfícies abióticas (ágar e plástico), além de ser o responsável pela formação de pseudohifas e biofilmes, e pelo crescimento celular invasivo, não conferindo um aumento na floculação (GUO et al., 2000; BAYLY et al., 2005).

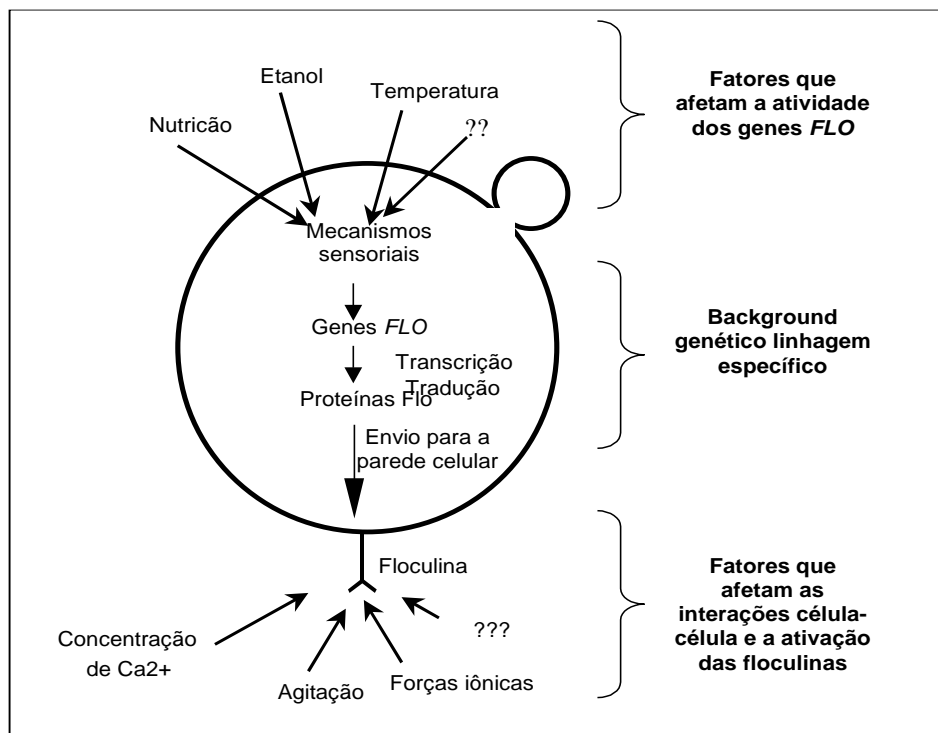


Figura 8- Fatores que afetam a floculação. Três categorias de fatores podem ser separadas de acordo com o seu modo de ação. 1- Fatores que interferem diretamente ativando ou inibindo os genes da floculação; 2- Dependendo do “background” genético de cada linhagem, o nível de floculação pode variar; 3- Fatores como a agitação do meio e a concentração de Cálcio atuam nas interações físicas entre as células regulando a floculação. Adaptado de VERSTREPEN et al., 2003

Em outro estudo, Barney et al, 1980, tentaram controlar a floculação em leveduras através de modificação genética, para isso introduziram um fragmento do DNA cromossomal derivado de uma linhagem floculante que incluía os genes *ADE1* e *FLO1* em uma linhagem não floculante. Como resultado desse experimento obtiveram mutantes floculantes constitutivos, sendo assim indesejáveis aos propósitos da indústria. Um outro experimento foi realizado utilizando um plasmídeo, no qual o gene *FLO1* estava sob o controle do promotor constitutivo do álcool desidrogenase I (*ADH1*), foi o desenvolvido por Ishida Fujii, (1998) obtendo o mesmo resultado do experimento interior. Porém, estes experimentos foram realizados apenas em laboratório, em condições controladas. Nas dornas de fermentação, as condições de estresse variam muito, podendo fazer com que este promotor seja ativado em outras fases da fermentação.

Sofiane El-Kirat-Chatel, et al, 2014 analisaram por microscopia de força atômica (AFM) forças de nanoescalas envolvidas no processo de floculação. Usando pontas de AFM marcadas com manose, detectaram que as proteínas Flo1 estão amplamente expostas na superfície celular, e que quando essas proteínas foram submetidas a uma força mecânica, exibiram uma resposta de força fraca, resultante da ligação floculina-manose. Seguindo com o estudo analisaram também a força de interação célula-célula. Para isso utilizaram uma ponteira de força atômica (AFM) com uma célula de levedura na ponta, como resultado obtiveram uma resposta de força forte resultante de ligações hidrofóbicas originadas dos desdobramentos das proteínas. Os resultados indicam que ambas as forças estão envolvidas no processo de floculação de *S. cerevisiae*.

Alvarez et al, 2014 no intuito de tentar explicar o comportamento de linhagens selvagens de *S. cerevisiae* em dornas de fermentação testaram os parâmetros bioquímicos e moleculares associados com fenótipos de floculação de treze estirpes diferentes. Esse estudo, demonstrou que nenhum dos parâmetros clássicos associados a floculação foram suficientes para classificar as linhagens estudadas quanto ao seu perfil de floculação.

Além dos estudos relatados, outro estudo realizado em nosso grupo de pesquisa pela Dra. Fernanda Bravim demonstrou que tanto as cepas floculantes quanto as não-floculantes apresentaram expressão diferenciada dos genes da família FLO (*FLO1*, *FLO8*, *FLO10* e *FLO11*) na fase estacionária de crescimento. Os resultados demonstram que mesmo as cepas não-floculantes induzem a expressão dos genes relacionados ao processo de floculação. Alguns genes relacionados à floculação apresentaram, inclusive, maior expressão em cepas não-floculantes quando comparados às cepas floculantes. (DADOS NÃO PUBLICADOS)

Foi realizado o sequenciamento do gene *FLO1* de três cepas isoladas de destilarias de cachaça do Espírito Santo pela Dra. Fernanda Bravim, BT0505, BT0601 não floculantes e BT0510 floculante e observou-se que não existe diferença na sequência de nucleotídeos desse gene para as diferentes cepas analisadas (DADOS NÃO PUBLICADOS).

Diante dos resultados de expressão gênica, o presente trabalho surgiu da necessidade de tentar entender o que poderia estar acontecendo acerca da síntese de proteína codificada pelo gene *FLO1*.

Considerando-se a importância da floculação para diversas indústrias biotecnológicas e a sua relevância econômica, todas as ações que visem à melhoria do processo fermentativo, como a utilização de cepas com características desejáveis e mecanismos apropriados de sedimentação celular, podem contribuir em melhorias significativas nas indústrias biotecnológicas e conseqüentemente impactar positivamente na balança comercial.

Desta forma, esse trabalho visa analisar a expressão da proteína Flo1 nas cepas não floculantes BT0505, BT0601 e floculante BT0510 afim de contribuir para um melhor entendimento do processo da floculação.

2.0 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar as diferenças pós-transcricionais do gene *FLO1* relacionado a floculação em cepas não floculantes e floculante de *S. cerevisiae*

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Fusionar o gene *FLO1* com a com a proteína verde fluorescente (**GFP** – *Green Fluorescent Protein*) em cepas de leveduras floculante e não-floculantes de *S. cerevisiae*;
- Analisar a localização subcelular da proteína Flo1-GFP por microscopia de fluorescência;
- Avaliar a expressão de Flo1-GFP por citometria de fluxo

3.0 Materiais e Métodos

3.1 Microrganismos

As cepas das leveduras *S. cerevisiae* utilizadas no presente estudo foram BT0510, floculante, e BT0505 e BT0601, não floculantes, previamente isoladas de alambiques do estado do Espírito Santo. Os perfis não floculante e floculante das cepas isoladas foram determinados pelo protocolo de Soares e Mota (1997) (BRAVIM, et al., 2011).

Também foi utilizada neste estudo a linhagem geneticamente modificada de *Escherichia coli* B2593 que contém o plasmídeo (pFA6a – GFP – S65T – KanMX6).

3.2 Plasmídeo

Foi utilizado o plasmídeo (pFA6a – GFP – S65T – KanMX6). Este plasmídeo apresenta o genótipo Ampr ori GFP (S65T) -T ADH1-PTEF-kanr-TTEF, (PETRACEK e LONGTINE 2002), possui 4882 pb, o gene Kanr que confere resistência a geneticina e o gene GFP que codifica a proteína verde fluorescente, GFP. Este plasmídeo foi gentilmente cedido pelo Prof. J. R. Broach, da Universidade da Pensilvânia, Estados Unidos.

3.3 Purificação do plasmídeo

A linhagem *Escherichia coli* B2593 foi crescida em meio LB (1% de triptona, 1% de NaCl e 0,5% de extrato de levedura) adicionado de ampicilina (100 µg/mL) por 12 horas à 37°C. Após o crescimento celular, o plasmídeo (pFA6a – GFP – S65T – KanMX6) foi isolado utilizando-se do kit de purificação (ChargeSwitch®-Pro Plasmid Miniprep Kit, (Invitrogen Molecular Probes, Eugene, OR, EUA). Para a confirmação do isolamento do plasmídeo foi realizada uma eletroforese em gel de agarose 1% em tampão, TAE 1x contendo brometo de etídio na concentração de 10 ng/mL.

Foi adicionado 10 µL da amostra diluída em 2 µL do tampão Blue/Orange (PROMEGA, Madison, EUA). O gel foi fotografado no sistema ultravioleta digital de captura de imagens L-PIX (Loccus Biotecnologia® Molecular Imaging, Cotia, SP, Brasil).

3.4 Oligonucleotídeos iniciadores (*Primers*)

Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados no presente estudo, para transformação das cepas de *S.cerevisiae* foram construídos com base nas metodologias descritas por PETRACEK e LONGTINE 2002, e estão apresentados na tabela 3.4

<i>Primers</i>	Sequência do <i>primer</i>	Tamanho do <i>amplicon</i> (pb)
FLO1-GFP ^a	F: <u>CTTCTGAATCATCAAATCTCCTACATATTCTTCTTCATCCGGATCCCCGGGTTAATTAA</u>	2500
FLO1-KAN ^a	R: <u>AGCAGTTTCCTGGCTTGTTGTCGCACTGGTAACAAGTGGTGAATTCGAGCTCGTTTAAAAC</u>	
FLO1 ^b	F: CCACAGACTGCGAATGAAGA	2800
Kan ^b	R: TCGATAGATTGTCGCACCTG	

Tabela 3.4: ^a Primers utilizados para a construção do cassete de transformação: As sequências sublinhadas possuem homologia respectivamente com a região C-terminal e *downstream* do gene *FLO1*. As sequências em itálico são homólogas aos plasmídeos pFA6a (PETRACEK e LONGTINE 2002).

^b Primers para confirmação da transformação

3.5 Transformação de *Saccharomyces cerevisiae*

Após o isolamento do plasmídeo foi realizado um PCR para a amplificação do DNA plasmidial pFA6a-GFP (S65T) -kanMX6 utilizando os *primers* FLO1-GFP-F e FLO1-KAN-R (Tabela 3.4). As condições do programa para amplificação do gene foram, 94°C por 2 min, 94°C por 15 seg, 55°C por 30 seg e 68°C por 2.30 min, seguida de incubação a 68°C por 5 min. A enzima usada foi a Platinum Taq DNA polymerase high fidelity (Invitrogen Molecular Probes, Eugene, OR, EUA). Essa reação resultou em um fragmento de DNA com aproximadamente 2,5 Kb, utilizado como cassete para transformação das cepas de *S.cerevisiae*. As cepas BT0505 e BT061 não floculantes e BT0510 floculante, de *S. cerevisiae* foram fusionadas com *GFP* por recombinação homóloga como descrito por PETRACEK e LONGTINE 2002 (Figura 9).

A transformação das cepas de *Saccharomyces cerevisiae* foi realizada de acordo com o protocolo do acetato de lítio.

As cepas (BT0505, BT0601 e BT0510) foram crescidas em meio YEPD (Extrato de levedura peptona e dextrose) até a fase exponencial de crescimento. O pellet foi lavado e ressuspensão em 100 mM de acetato de lítio (pH 7,2), foi e os seguintes reagentes foram adicionados nesta ordem: 240 μ L de PEG 50%; 36 μ L de LiOAc 1,0 M; 25 μ L de esperma de salmão e 47 μ L do produto de PCR. As células foram incubadas a 30°C por 45 min, depois incubadas a 42°C por 25 min. As células foram centrifugadas a 12000 rcf por 1 min e ressuspensas em 50 μ L de YEPD (Extrato de levedura peptona e dextrose). Para isolar os transformantes, as células foram selecionadas através da técnica da réplica *plating* em meio contendo geneticina (G418 a 100 μ g/mL).

Nesta técnica as leveduras recém transformadas foram plaqueadas em meio YEPD (Extrato de levedura peptona e dextrose) e crescidas por 24 horas a 28°C.

Após esse período a placa com as colônias foi prensada em uma membrana aveludada para adesão das colônias no tecido. Em seguida, as colônias que ficaram aderidas foram transferidas para uma placa contendo YEPD (Extrato de levedura peptona e dextrose) e geneticina (G418 a 100 μ g/mL). Dessa forma as transformantes foram selecionadas.

3.6 Confirmação do fusão

As células transformadas foram analisadas por PCR para confirmação da correta inserção do GFP. As células foram crescidas em 50 mL de YEPD (Extrato de levedura peptona e dextrose) durante 16 hs a 28°C com agitação de 140 rcf, separadas por centrifugação a 3500 rcf durante 5 min, e lavadas com água ultrapura estéril. As células foram ressuspensas em 200 μ L de tampão de extração, transferidas para tubos estéreis de 1,5 mL de capacidade, adicionado de 0,3g de pérolas de vidros estéreis e 250 μ L de solução fenol-clorofórmio (1:1). Os tubos foram agitados vigorosamente em vórtex durante 2 min alternando em banho de gelo e foram acrescentados 200 μ L de tampão de extração, seguido da centrifugação por 5 minutos a 12.000 rcf, na temperatura de -4 °C.

A fase aquosa foi separada, recolhida em novo tubo estéril de 1,5 mL de capacidade, no qual foi acrescido por imersão de 1 mL de etanol absoluto e colocado no freezer a -80 °C por 30 minutos e em seguida centrifugado a 12.000 rcf durante 5 minutos. O sobrenadante foi removido e o sedimento formado lavado com 1 mL de etanol 70% (v/v) e centrifugado a 12.000 rcf durante 2 minutos. O sobrenadante foi separado e o tubo com o sedimento foi deixado a temperatura ambiente até secagem completa do material. Após secagem, o DNA foi ressuspenso em 400 µL de solução tampão Tris EDTA pH 8,0 contendo uma concentração final de 2 µg/ mL RNase e incubado a 37 °C por 30 min. Em seguida centrifugado e ressuspenso em 50 µL de solução tampão Tris EDTA pH 8,0 e mantido a 4 °C. Após a extração dosado usando o espectrofotômetro Nanodrop® 2000 Spectrophotometer (Thermo Scientific, Carlsbad, EUA). Uma alíquota de 1 µL de DNA foi submetida às leituras nos comprimentos de onda de 260 nm e varredura de 220 nm. Os resultados foram avaliados no programa Nanodrop® 2000. Após essa dosagem foi realizado o PCR com os primers FLO1-F e Kan-R (Figura 9 B). As condições do programa para confirmação do PCR foram: 94°C por 3 min, 94°C por 45 seg, 55°C por 30 seg e 78°C por 2.30 min, seguida de incubação a 72°C por 10 min. A enzima usada foi a Platinum Taq DNA polymerase (Invitrogen, Molecular Probes, Eugene, OR, EUA). Para a confirmação do produto de PCR foi realizado uma eletroforese em gel de agarose 1% em tampão, TAE 1x contendo brometo de etídio na concentração de 10 ng/mL. Foi adicionado 10 µL da amostra diluída em 2 µL do tampão Blue/Orange (Promega). O gel foi fotografado no sistema ultravioleta digital de captura de imagens L-PIX (Loccus Biotecnologia® Molecular Imaging, Cotia, SP, Brasil).

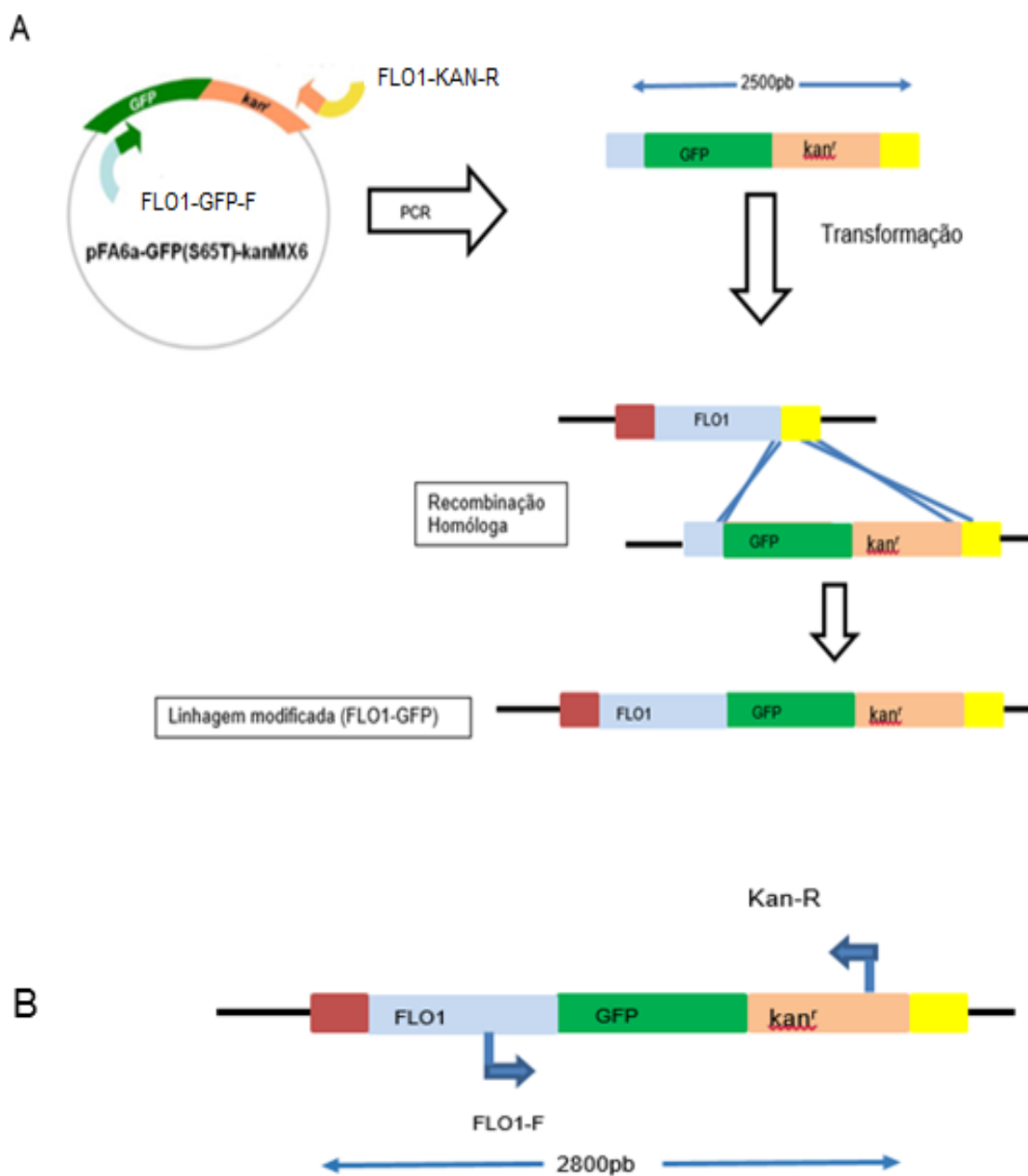


Figura 9: Fusão de *GFP* à extremidade C-terminal do *FLO1*. (A) Primers contendo homologia à região C-terminal (em azul claro) e *downstream* (em amarelo) do gene *FLO1* juntamente com o plasmídeo pFA6a-GFP (S65T) -kanMX6 produziram, através de PCR, um fragmento linear de DNA que, por recombinação homóloga, substituiu o códon de terminação do *FLO1* por *GFP* (em verde) e pelo marcador *kan^r* (em laranja) no genoma das células. (B) após a seleção dos transformantes, os primers FLO1-F e Kan- R foram utilizados para a verificação da presença da fusão em *FLO1* (Adaptado de Alves, S. L,2010).

3.7 Microscopia de fluorescência

Células da levedura foram crescidas em meio sintético YNB (*Yeast Nitrogen Base*) por 48 hs, até a completa depleção de açúcar no meio, e uma alíquota de 10 μ L do inóculo de cada linhagem foi retirada e analisada por microscopia de fluorescência. As células foram analisadas no microscópio de fluorescência Nikon Eclipse E200 com filtros disponíveis para análise da fluorescência (485 nm para excitação e 510 nm para emissão).

3.8 Citometria de Fluxo

Para análise da expressão da floculina Flo1-GFP, as cepas BT0505, BT0601 não floculantes e BT0510 floculante transformadas com o plasmídeo *pFA6a – GFP – S65T – KanMX6* foram cultivadas em YEPD.

Uma alíquota de 1 mL de cada amostra foi coletada em um microtubo. A alíquota foi lavada em tampão fosfato salino (PBS), centrifugada a 12.000 rcf por 2 min e ressuspenso para uma concentração final de células de 1×10^6 células/mL. As leituras foram realizadas após 24, 36 e 48 horas de crescimento celular. As análises de citometria de fluxo foram realizadas em um Attune® Acoustic Focusing Cytometer (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, EUA) equipado com dois lasers de excitação, um na faixa do azul de 20 mW (488 nm) e um na faixa do violeta de 50 mW (405 nm), ambos com três canais de detecção.

Primeiramente, a amostra contendo as células de levedura foi levada ao citômetro sendo aspirada no equipamento, e então esta suspensão de células foi conduzida por um fluxo contínuo de solução salina que conduziu as células uma a uma até a interceptação do feixe luminoso do laser.

A população de leveduras de interesse foi selecionada dentre todos eventos detectados pelo equipamento através do gráfico do tipo *dot plot* gerado pela leitura no citômetro, este que corresponde a um gráfico de dois eixos onde cada evento lido é representado por um ponto. As células foram distribuídas conforme o forward scatter (FSC) e o side scatter (SSC). Esses parâmetros são determinados pelo ângulo de espalhamento do laser. O FSC corresponde a espalhamentos da luz em pequenos ângulos, a luz ao ser refratada para a frente é proporcional ao tamanho relativo da célula.

Já o SSC, corresponde a espalhamentos da luz em ângulos maiores, fornecendo dados proporcionais à granulidade e complexidade das células de leveduras analisadas. As voltagens FSC e SSC foram ajustadas até a detecção da população de levedura analisada. A leitura foi conduzida no equipamento configurado para emitir o laser azul (488nm) e coletar a fluorescência através do detector BL1 (530 nm). Após realizar a leitura, selecionou-se manualmente a população formada através da ferramenta “*gate*” do software gerando histogramas da intensidade de fluorescência a partir do *gate* delimitado. Dessa forma, as análises da expressão da proteína Flo1-GFP foram realizadas partir do gate da população de interesse.

4.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Análise da expressão da proteína Flo1 e sua localização subcelular em cepas floculantes e não floculantes de *Saccharomyces cerevisiae*

A avaliação da expressão da proteína Flo1 através de citometria de fluxo e sua localização subcelular por microscopia de fluorescência, exigiu inicialmente o fusionamento da proteína verde fluorescente (*GFP*) à *FLO1*, conforme detalhado na seção 3.5. Dessa forma, o primeiro passo para a modificação genética, foi a purificação do plasmídeo. Este plasmídeo possui 4882 pares de base, o gene *Kan^r* que confere resistência a Geneticina e o gene *GFP* que codifica a proteína verde fluorescente, *GFP*. (Figura 10).

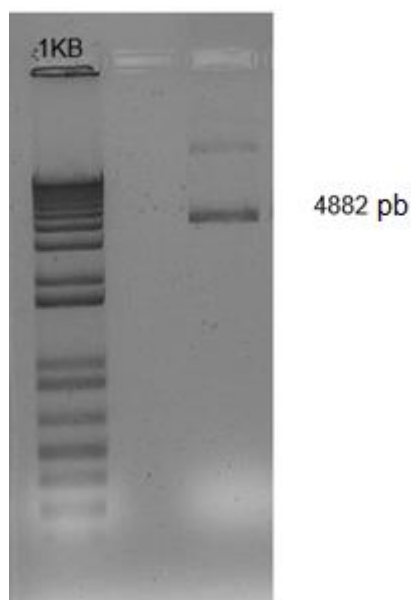


Figura 10: Gel de agarose 1%, da confirmação da purificação do plasmídeo, pFA6a-GFP (S65T) - kanMX6, marcador 1Kb Plus DNA Ladder Invitrogen.

O plasmídeo purificado foi utilizado com molde para construção do cassete de transformação juntamente com os oligonucleotídeos FLO1-GFP-F e FLO1-KAN-R. O produto desse PCR foi um fragmento de DNA com aproximadamente 2,5Kb, que possui em suas extremidades regiões homólogas à extremidade C-terminal da floculina e aos 40 nucleotídeos localizado após ao códon de terminação desse gene. Localizados entre essas extremidades, se encontram o gene GFP (que codifica a proteína verde fluorescente) e o gene *kan^r* (que confere resistência à Geneticina) (Figura 11).

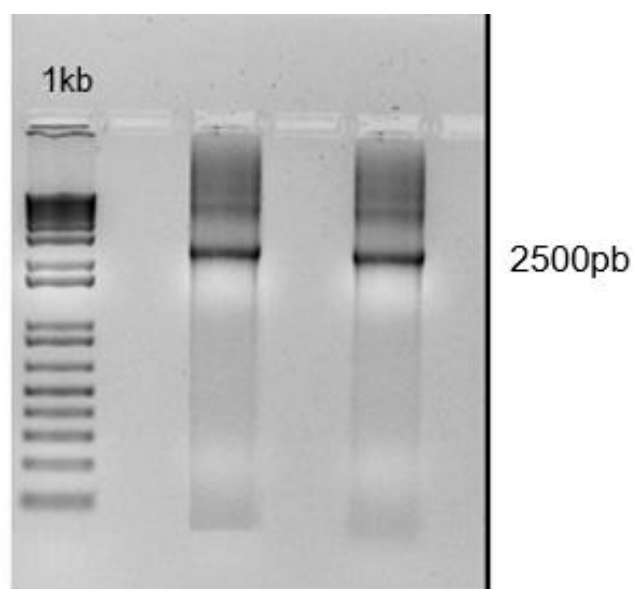


Figura 11: Gel de agarose 1%, do produto de PCR do cassete de transformação, marcador 1Kb Plus DNA Ladder Invitrogen.

O fragmento de DNA obtido foi utilizado para a transformação das cepas de *S.cerevisiae* BT0505, BT0601 e BT0510, que por recombinação homóloga, substituiu o códon de terminação do *FLO1* por *GFP* (em verde) e pelo marcador *kan^r* (em laranja) no genoma das células (Figura 9 A).

Para a confirmação do correto fusionamento de *FLO1* com *GFP* foi realizado um PCR com os primers Flo1--F e Kan-R (Tabela 3.3). O produto desse PCR foi um fragmento de DNA com aproximadamente 2,8 kb (Figura12).

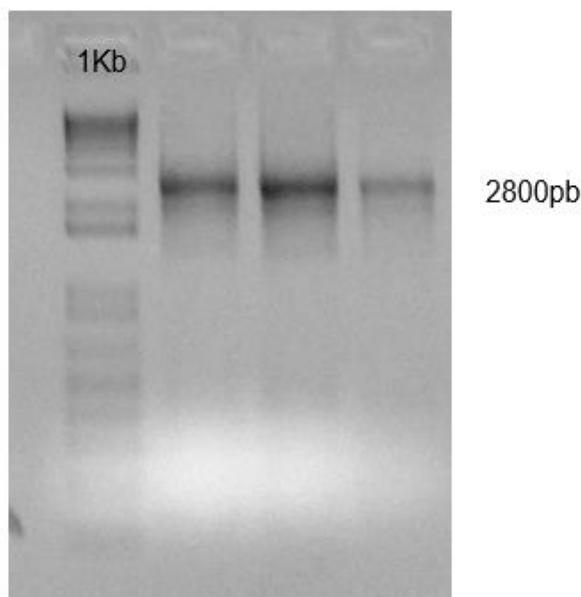


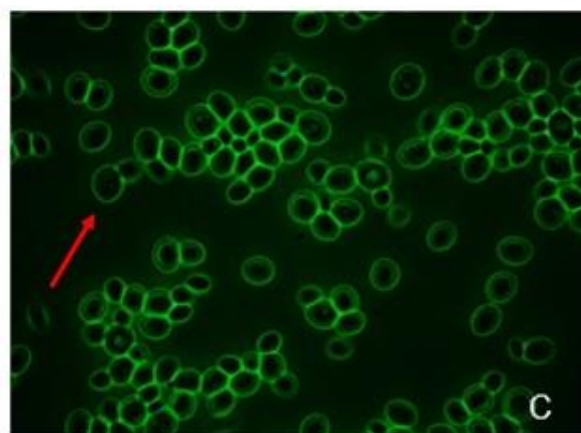
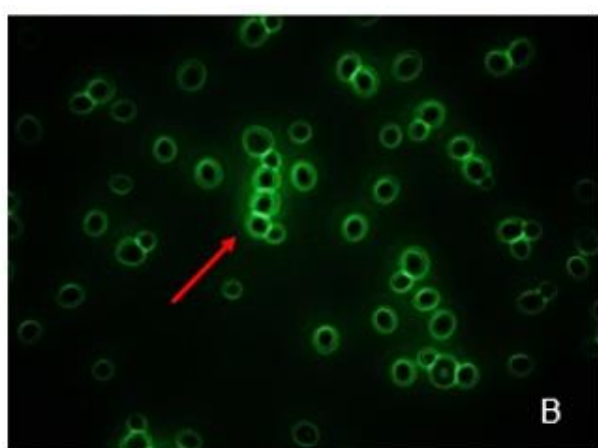
Figura 12: Gel de agarose 1%, da confirmação da transformação das linhagens de *S.cerevisiae*, marcador 1Kb Plus DNA Ladder Invitrogen.

4.2 Análise da localização subcelular da proteína Flo1 por microscopia de fluorescência

Estudos realizados em nosso laboratório pela Dra. Fernanda Bravim mostraram que os genes relacionados a formação de floculina foram expressos mesmo que de forma diferenciada, em cepas floculantes e não floculantes de *S.cerevisiae*. Mais ainda, observou-se não haver diferença na sequência de nucleotídeos do gene *FLO1* nas cepas floculante e não floculante, respectivamente (DADOS NÃO PUBLICADOS).

Desta forma, em continuidade aos estudos, as cepas modificadas foram analisadas por microscopia de fluorescência afim de avaliar se a proteína Flo1 estava sendo sintetizada, e identificar sua localização subcelular. Para isso, as cepas modificadas BT0505, BT0601 não floculantes e BT0510 floculante foram crescidas até a fase estacionária de crescimento em meio YNB (*Yeast Nitrogen Base*).

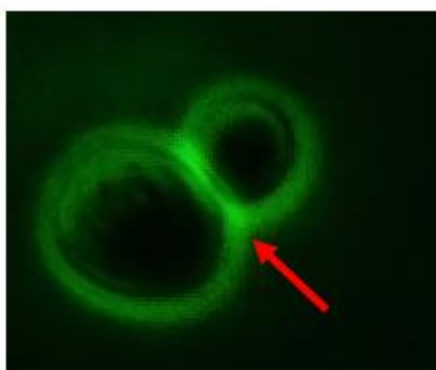
Nesta fase, os nutrientes se exaurem e o meio torna-se estressante para as células. Como um mecanismo de defesa, as células tendem a flocular, e para que isso ocorra, os genes relacionados a floculação precisam ser ativados para a formação das proteínas Flo (STRATFORD,1992 a). Proteínas essas sabidamente localizadas na parede celular das cepas de *S.cerevisiae* floculantes. Dessa forma, se houver tradução gênica e a síntese de Flo1p, em cepas não floculantes, essas poderão ser visualizadas por microscopia através da fluorescência emitida pelo GFP fusionado a mesma (Figura 13 A,13B e 13C).



Figuras 13 A, B e C: Imagens de microscopia de fluorescência: Localização da proteína Flo1 fusionada ao GFP, nas cepas BT0510 floculante (A) e BT05005 (B) e BT0601(C) não floculantes.

Observa-se por microscopia de fluorescência que ocorreu expressão de Flo1 na parede celular, tanto nas cepas floculantes quanto nas não floculantes. Dessa forma, sabendo que a proteína Flo1 é uma proteína de parede celular, e que a mesma foi fusionada a GFP, e que o PCR de confirmação da fusão, comprovou que o fusionamento ocorreu corretamente, podemos afirmar que tanto as cepas não floculantes, quanto a floculante possuem proteína Flo1 e que não há diferença no local de expressão de Flo1.

Além disso, ao se analisar mais detalhadamente as imagens, podemos verificar que a intensidade de fluorescência na região de formação do broto celular é mais intensa do que nas demais regiões em todas as cepas analisadas (Figura14). Este fato pode ser explicado uma vez que as floculinas estão associadas à formação do broto celular, como descrito por DRANGINIS, et *al.*, 2007. Essa associação da floculina com a formação do broto celular corrobora com os nossos resultados uma vez que, justifica a presença da floculina Flo1 nas células não floculantes.



Figuras 14: Imagem ampliada de microscopia de fluorescência da levedura *S.cerevisiae* com destaque para a região de formação do broto celular.

Os resultados observados contrariam estudos que atribuem a capacidade de floculação das *S. cerevisiae* a presença de proteínas Flo na parede celular. Com por exemplo, Stratford, 1996, que afirmou que as células floculantes possuem em sua parede celular receptores para carboidratos e as floculinas, enquanto as células não floculantes possuem apenas receptores para carboidratos. Andrietta, 2006 também atribuiu a propriedade de floculação a cepas que apresentem, em sua composição genômica, genes que expressam proteínas conhecidas como floculinas.

Porém, com base nos resultados obtidos neste presente estudo, pode-se inferir que a presença da floculina Flo1 na parede celular não é um fator determinante para a presença do fenômeno da floculação, uma vez que as cepas não floculantes também apresentam essa proteína em sua parede celular.

Este resultado, demonstra o quão complexo é o mecanismo da floculação, e que muito ainda precisa ser estabelecido a respeito deste fenômeno.

4.3 Avaliação da expressão de Flo1-GFP por citometria de fluxo

A fim de melhor compreender o resultado obtido por microscopia de fluorescência, as cepas transformadas foram analisadas, por citometria de fluxo, no intuito de avaliar a expressão da proteína Flo1-GFP, e identificar em que fase do crescimento celular essa floculina começa a ser expressa. As cepas modificadas de *S. cerevisiae* foram crescidas por 24, 36 e 48 horas e analisadas por citometria de fluxo. Em geral, a floculação das leveduras está associada com o início da fase estacionária, porém, o tempo e o grau de floculação não estão precisamente estabelecidos.

Sabendo disso, para garantir que as análises seriam feitas no momento em que estivesse ocorrendo expressão de Flo1, as análises foram realizadas nestes três tempos. Assim, a expressão da proteína Flo1-GFP pode ser monitorada pela detecção do aumento da fluorescência por citometria de fluxo. Dessa forma, quanto maior a área do gráfico no eixo X maior a intensidade de fluorescência, e maior a expressão da proteína Flo1. Como controle negativo do experimento, as cepas parentais foram crescidas e analisadas nos mesmos intervalos de tempo e com os mesmos parâmetros definidos para as cepas modificadas.

As análises por citometria de fluxo demonstraram que a intensidade de fluorescência emitida pela expressão da proteína Flo1 fusionada a GFP, diferem uma das outras e do controle, como pode ser observado nos histogramas gerados nas análises feitas por citometria de fluxo (Figura 15 ,16,17).

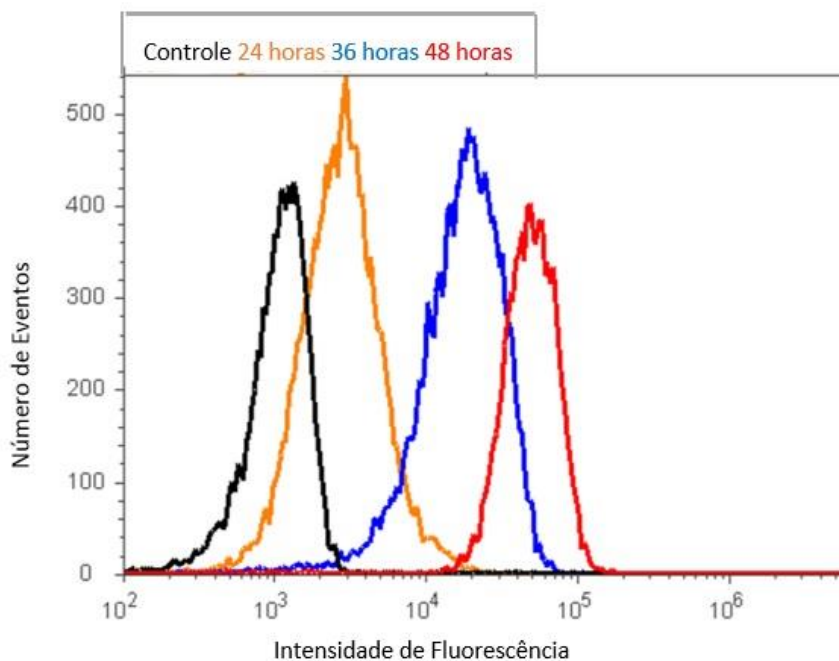


Figura 15: Expressão da proteína Flo1 fusionada a GFP em células de *S. cerevisiae* BT0510 floculante. Controle negativo (preto), 24 horas (laranja), 36 horas (azul) e 48 horas (vermelho). Os experimentos foram realizados em duplicata, mas somente uma está representada.

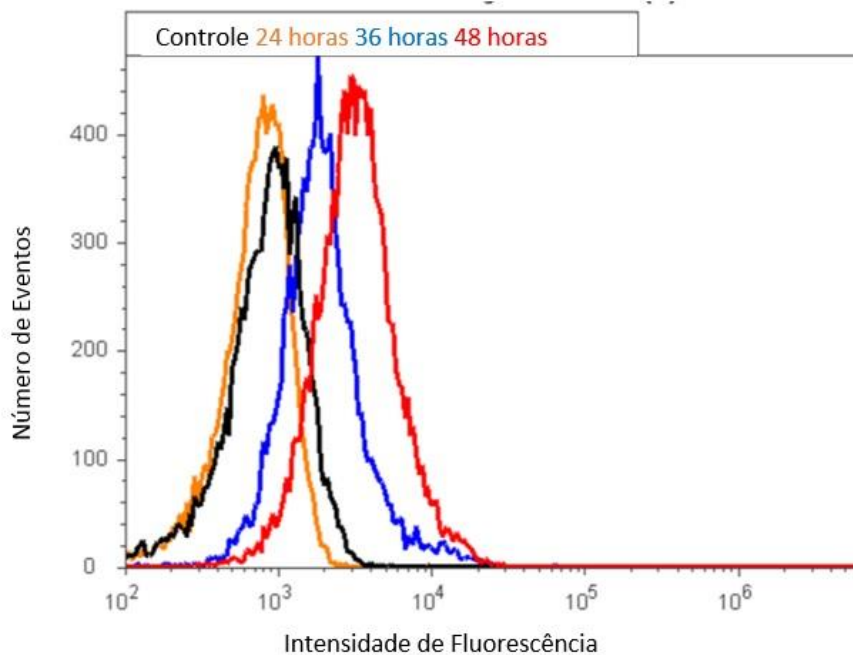


Figura 16: Expressão da proteína Flo1 fusionada a GFP em células de *S. cerevisiae* BT0505 não floculante. Controle negativo (preto), 24 horas (laranja), 36 horas (azul) e 48 horas (vermelho). Os experimentos foram realizados em duplicata, mas somente uma está representada.

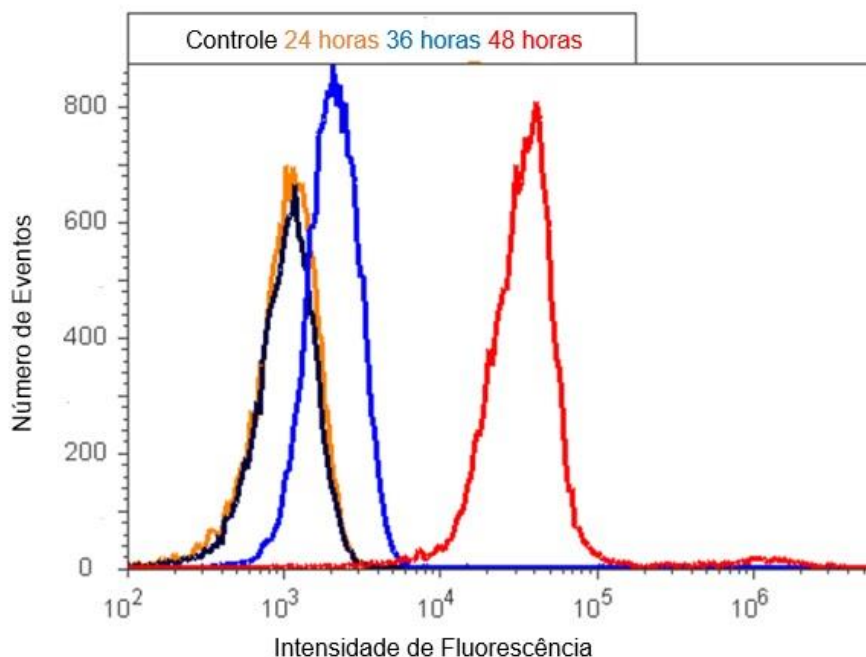


Figura 17: Expressão da proteína Flo1 fusionada a GFP em células de *S. cerevisiae* BT00601 não floculante. Controle negativo (preto), 24 horas (laranja), 36 horas (azul) e 48 horas (vermelho). Os experimentos foram realizados em duplicata, mas somente uma está representada.

Pela análise dos histogramas pode-se afirmar que todas as cepas apresentaram expressão de proteína Flo1. A linhagem floculante BT0510, diferentemente das outras duas leveduras não floculantes analisadas, apresentou já nas primeiras 24 horas de crescimento um pico intensidade de fluorescência maior que o do controle. Indicando que a produção da proteína Flo1, para essa cepa inicia-se ainda com 24 horas crescimento celular. No período de 36 horas de crescimento as cepas BT0601 não floculante e BT0510, floculante apresentaram uma maior intensidade de fluorescência quando comparadas com o controle negativo, já a BT0505 não floculante não apresentou diferença significativa na intensidade de fluorescência ($p < 0,05$) (Figura 14).

Quando comparamos a intensidade de fluorescência entre as cepas, a levedura floculante BT0510, apresenta uma intensidade de fluorescência superior as demais. Dessa forma, pode-se inferir que expressão da proteína Flo1 na linhagem floculante é superior a expressão nas cepas não floculantes. Resultado esse que pode ser explicado pela ampla distribuição da proteína Flo1 na parede celular das cepas floculantes, como demonstrado por Sofiane El-Kirat-Chatel, *et al*, 2014. Já quando comparamos as cepas não floculantes BT0505 e BT0601, a diferença de intensidade de fluorescência entre elas não foi significativa, ou seja, não houve diferença relevante na expressão da proteína Flo1 entre as cepas não floculantes no período de 36 horas de crescimento celular (Figura 18).

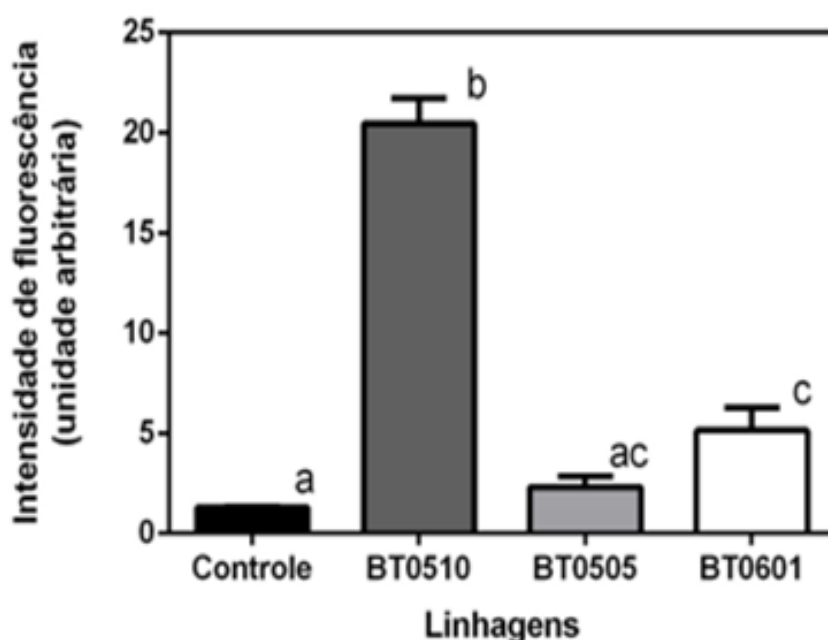


Figura18: Expressão da proteína Flo1-Gfp nas cepas de *S. cerevisiae* no período de 36 horas de crescimento. Controle negativo, que correspondem as células parentais (preto), BT0510 (cinza escuro), BT0505 não floculante (cinza claro) e BT0601 não floculante (branco), O experimento foi realizado em duplicata (letras diferentes significa que existe diferença significativa entre os tratamentos $p < 0,05$)

Os resultados de citometria de fluxo, para 48 h de crescimento celular, revelaram que tanto a linhagem BT0510 floculante quanto a BT0601 não floculante apresentaram diferenças significativas de intensidade de fluorescência quando comparadas ao controle, diferentemente da linhagem não floculante BT0505 que não apresentou diferença quando comparada ao controle (Figura 19). Ao comparar a intensidade de fluorescência entre as cepas, foi observado que a linhagem modificada BT0510, apresentou intensidade de fluorescência muito superior as demais cepas não floculantes. Entre as cepas não floculantes, observou-se uma intensidade de fluorescência aumentada na BT0601 quando comparada a BT0505. Dessa forma pode-se inferir que ocorreu uma maior produção de proteína Flo1 na linhagem floculante e que a expressão da proteína Flo1 difere de uma cepa para outra entre as cepas não floculantes em 48 h de crescimento (Figura 19).

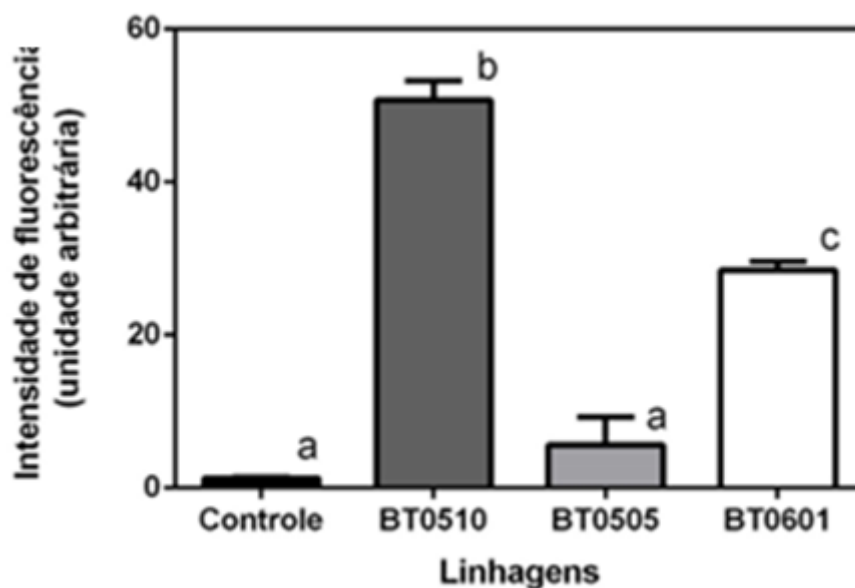


Figura19: Expressão da proteína Flo1-Gfp nas cepas de *S. cerevisiae* no período de 48 horas de crescimento. Controle negativo, que correspondem as células parentais (preto), BT0510 (cinza escuro), BT0505 não floculante (cinza claro) e BT0601 não floculante (branco), O experimento foi realizado em duplicata (letras diferentes significa que existe diferença significativa entre os tratamentos – $p < 0,05$).

Além disso, a expressão de proteína Flo1 na cepa floculante foi detectada ainda nas primeiras 24 horas de crescimento celular, o que poderia ajudar a explicar floculação prematura das células, ou seja, antes da depleção completa de nutrientes no meio.

Os resultados deste presente trabalho demonstram que a quantidade de floculina nas cepas não floculantes foi inferior à quantidade de floculina das cepas floculantes. Sofiane El-Kirat-Chatel, *et al*, 2014 demonstraram que a ligação floculina-manose é uma ligação fraca, e que quanto maior a quantidade de floculina na célula mais forte será a interação floculina-manose. Diante desses resultados pode-se inferir que a quantidade de floculina pode ser mais um parâmetro envolvido com a capacidade de floculação das células. Dessa forma, os resultados apresentados no presente estudo demonstram que muitos aspectos ainda precisam ser compreendidos sobre o mecanismo da floculação, e que diversas variáveis influenciam nesse processo, como foi demonstrado também por Alvarez *et al*, 2014, evidenciando assim, a importância de estudos pertinentes à floculação no intuito de melhor compreender esse fenômeno e posteriormente agregar melhorias aos processos fermentativos.

5.0 CONCLUSÕES

Com base na análise dos dados obtidos por citometria de fluxo e microscopia de fluorescência, pode-se inferir que tanto as cepas não flocculantes BT0601 e BT0505, quanto a linhagem flocculante BT0510 expressam a proteína Flo1, e que a mesma se encontra na parede celular dessas células, não havendo assim diferença na localização da proteína para as três cepas analisadas. Portanto, a presença de flocculinas na parede celular não é característica exclusiva das cepas que apresentam fenótipo flocculante, e que a presença dessas proteínas na parede celular não é garantia de que a flocculação ocorra. Quando comparada a expressão da flocculina Flo1 entre as cepas, observa-se resultados muito superiores da expressão dessa proteína nas cepas flocculantes, quando comparada ao controle e à cepa não flocculante. Sugerimos, portanto, que o mecanismo da flocculação possa estar associado não somente com a presença da flocculina, mas também com a quantidade de flocculina das cepas e a capacidade dessas proteínas atingirem uma conformação adequada que possibilite a ligação com os resíduos de manose das células vizinhas e, conseqüentemente permitindo que a flocculação aconteça. Considerando a importância da flocculação de *S. cerevisiae* nos processos fermentativos e a importância econômica desses produtos de fermentação para a economia brasileira e mundial, o presente trabalho é relevante, uma vez que apresenta uma contribuição ao fornecer subsídios que podem futuramente contribuir para a elucidação do complexo mecanismo da flocculação.

5.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVAREZ F, CORREA LF, ARAÚJO TM, MOTA BE, DA CONCEIÇÃO LE, CASTRO IM, BRANDÃO RL. Variable flocculation profiles of yeast strains isolated from cachaça distilleries. **Int J Food Microbiol.** 190, 97-104

AMORIM, H. V., LOPES, M. L. Ethanol production in a petroleum dependent world: the Brazilian experience. **Sugar J.** 67, 11–14. (2005).

AMORIM, H. V. **Fermentação Alcoólica: Ciência e Tecnologia.** Piracicaba. São Paulo, 2005. Fermentec, 448p

ANDRIETTA, S. R.; STECKELBERG, C.; ANDRIETTA, M. G. S. Bioetanol – Brasil, 30 anos na vanguarda. **MultiCiência**, Universidade de Campinas, 2006.

AUSUBEL, F. M.; BRENT, R.; KINGSTON, R. E.; MOORE, D.D.; SEIDMAN, J. G.; SMITH, J. G.; STRUHL, J. A. **Short protocols in molecular biology.** Greene Publishing Associates, John Wiley e Sons. NY, 1992.

BAYLY, J.C., DOUGLAS, L.M., PRETORIUS, I.S., BAUER, F.F. & DRANGINIS, A.M. Characteristics of *FLO11*-dependent flocculation in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiol. Lett.** v. 5, p. 1151–1156, 2005.

BASSO, L. C.; DE 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.

BONY, M., THINES-SEMPOUX, D., BARRE, P. & BLONDIN, B. Localization and cell surface anchoring of the *Saccharomyces cerevisiae* flocculation protein *FLO1p*. **J. Bacteriol.** v. 179, p. 4929–4936, 1997.

BRAVIM, F. **Resposta de *Saccharomyces cerevisiae* ao estresse de alta pressão hidrostática.** f. 162. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – RENORBIO, Programa de Pós-graduação de Biotecnologia, Universidade Federal do Espírito, Vitória, 2011.

CUNHA, A.F., MISSAWA, S.K., GOMES, L.H., REIS, S.F. & PEREIRA, G.A.G. Control by sugar of *Saccharomyces cerevisiae* flocculation for industrial ethanol production. **FEMS Yeast Res.**, v. 6, p. 280–287, 2006

DOMINGUES L, VICENTE AA, LIMA N, TEIXEIRA JA (2000c) Applications of yeast flocculation in biotechnological.

DRANGINIS, A.M., RAUCEO, J.M., CORONADO, J.E. and Lipke, P.N. A biochemical guide to yeast adhesins: glycoproteins for social and antisocial occasions. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 71, p. 282–294, 2007.

FERNANDES, P. M. B et al. **Levedura: do pão à biotecnologia**. Vitória, ES: Edufes, 2009.

FIGUEIRÊDO, C. M. **Análise da flocculação e formação de espuma por leveduras utilizadas na produção industrial de álcool combustível no Brasil**. 2008. 82 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2008.

FIGUEIRÊDO, C. M. **Estudo da influência do gene *FLO8* em fenótipos de linhagem de *Saccharomyces cerevisiae* isoladas em processos de produção de etanol combustível no Brasil**. 2012. Dissertação (Doutorado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 2012.

GANCEDO, J. M. Yeast carbon catabolite repression. **Microbiology and Molecular Biology Reviews** 62 (2): 334-361, (1998).

GOFFEAU, A., BARRELL, B.G., BUSSEY, H., DAVIS, R.W., DUJON, B., FELDMANN, H., GALIBERT, F., HOHEISEL, J.D., JACQ.C., JOHNSTON, M., LOUIS, E. J., MEWES, H.W., MURAKAMI, Y., PHILIPPSSEN, P., TETTELIN, H. e OLIVER, S. G. Life with 6000 genes. **Science**, v. 274, p. 546–549, 1996.

GOOSSENS KATTY V. Y., IELASI FRANCESCO S., NOOKAEW INTAWAT; et al. Molecular Mechanism of Flocculation Self-Recognition in Yeast and Its Role in Mating and Survival. **Mbio** 2015

GUO, B., STYLES, C.A., FENG, Q. & FINK, G. A *Saccharomyces* gene family involved in invasive growth, cell–cell adhesion, and mating. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 97, p. 12158– 12163, 2000.

HALME, A.; BUMGARNER, S., STYLES, C.; FINK, G. R. Genetic and epigenetic regulation of the *FLO* gene family generates cell-surface variation in yeast. **Cell**, v. 116, p. 405-415, 2004.

HATTI-KAUL, R. AND MATTIASSON, B. (2001) Downstream processing in biotechnology. In **Basic Biotechnology** ed. Ratledge, C. and Kristiansen, B. pp. 187–211. Cambridge: Cambridge University Press.

HIRA, A.; OLIVEIRA, L. G. No substitute for oil? How Brazil developed its ethanol industry. **Energy Policy**, v. 37, p. 2450–2456, 2009.

ISHIDA-FUJII, K., et al., *Breeding of flocculent industrial alcohol yeast strains by self-cloning of the flocculation gene FLO1 and repeated-batch fermentation by transformants*. **J Gen Appl Microbiol**, 1998. (5): p. 347-353.

KATAOKA, A T., POWERS, S., CAMERON, S., FASANO, O., GOLDFARB, M., BROACH, J.R., and WIGLER, M. Functional Homology of Mammalian and **Yeast RAS** genes. **Cell**, v.:40, p.:19-26, 1985

KREGER-VAN RIJ, N. J. W. Classification of yeast. In: ROSE A. H., HARRISON, J. S. (Ed.). *The yeasts*. 2. ed. London: Academic Press, p. 5-61, 1987.

KOIZUMI, H. & OGAWA, T. Rapid and sensitive method to measure premature yeast flocculation activity in malt. **J. Am. Soc. of Brew. Chem.**, v. 63, n.4, p. 147-150, 2005.

KURTZMAN, C. P. Discussion of teleomorphic and anamorphic ascomycetous yeasts and a key to genera. In: Kurtzman, C.P.; Fell, J.W. *The yeasts, a taxonomic study*. 4 ed., p. 111–121, Amsterdam, The Netherlands: Elsevier Science, B. V., 1997.

Lewin, B., **Genes VII**, ed. O.U. Press. 2000

LIMA, U. A.; BASSO, L. C.; AMORIM, H. V. In: LIMA, U. A. (Coord.). **Bioteecnologia Industrial: Processos Fermentativos e Enzimáticos**. São Paulo: Edgard Blücher, 2001.p.1-43. (Bioteecnologia Industrial; v.3)

MARX, G., MOODY, A. e BERMÚDEZ-AGUIRRE, D. A comparative study on the structure of *Saccharomyces cerevisiae* under nonthermal technologies: High hydrostatic pressure, pulsed electric fields and thermo-sonication. **Int. J. Food Microbiol.** v.151, p. 327–337, 2011.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. <http://www.agricultura.gov.br/comunicacao/noticias/2014/08/>. ACESSO EM:26 de setembro de 2015

NEVOIGT, E. Progress in Metabolic Engineering of *Saccharomyces cerevisiae*, **Microbiol. Molec. Biol. Rev.**, Washington, v. 72, n. 3, p. 379–412, 2008

OSUMI, M. The ultrastructure of yeast: cell wall structure and formation. **Micron**, v. 29, p. 207–233, 1998.

PETRACEK, M. E.; LONGTINE, M. S. PCR-based engineering of yeast genome. **Methods Enzymol.**, v. 350, p. 445-469, 2002.

PEUMANS, W. J., BARRE, A., QIANG, H., ROUGÉ, P. & VAN DAMME, E.J.M. Higher plants developed structurally different motifs to recognize foreign glycans. **T. Glycosci. Glycotechnol.**, v. 12, n. 64, p. 83-101, 2000.

PIŠKUR, J.; ROZPEDOWSKA, E.; POLAKOVA, S.; MERICO, A. & COMPAGNO, C. How did *Saccharomyces* evolve to become a good brewer? **Trends in Genetics**, v.22, n.4, p.183-186, 2006.

SATO, M., MAEBA, H., WATARI, J. & TAKASHIO, M. Analysis of an inactivated Lg-*FLO1* gene present in bottom-fermenting yeast. **J. Biosci. Bioeng.**, v. 93, p. 395–398, 2002

Shuler, M.L. and Kargi, F. (2002) Recovery and purification of products. In **Bioprocess Engineering ed.** Amundson, N.R. pp. 329–384. New Jersey: Prentice Hall PTR.

SCHULLER, H. J. Transcriptional control of nonfermentative metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Curr. Genet.** v. 43, p. 139-60, 2003.

SMITH, A. E. et al. The mechanical properties of *Saccharomyces cerevisiae*. **Proc Natl AcadSci U S A**, v. 97, n. 18, p. 9871-4, ago 2000.

SMUKALLA, S., CALDARA, M., POCHET, N., BEAUVAIS, A., GUADAGNINI, S., YAN, C., VINCES, M. D., JANSEN, A., PREVOST, M. C., LATGÉ, J.-P., FINK, G. R., FOSTER, K. R. & VERSTREPEN, K. J. *FLO1* is a variable green beard gene that drives biofilm-like cooperation in budding yeast. **Cell**, v. 135 (4), p. 726-737, 2008.

SOARES, E. V. Flocculation in *Saccharomyces cerevisiae*: a review. **J. Appl. Microbiol.**, v. 110, n. 1, p. 1-18, 2010.

STRATFORD, M. & ASSINDER, S. Yeast flocculation: *FLO1* and NewFlo phenotypes and receptor structure. **Yeast**, v. 7, p. 559–574, 1991.

STRATFORD, M. Lectin-mediated aggregation of yeasts-yeast flocculation. **Biotechnol. Genet. Eng. Rev.**, v. 10, p. 283-341, 1992a.

STRATFORD, M. Yeast Flocculation: restructuring the theories in line with recent research. **Cerevisia**, 21, p. 38-45, 1996.

TEUNISSEN, A.W.R.H. & STEENSMA, H.Y. Review: the dominant flocculation genes of *Saccharomyces cerevisiae* constitute a new subtelomeric gene family. **Yeast**, v. 11, p. 1001– 1013, 1995.

TREVISOL, E. T. V.; PANEK, A. D.; MANNARINO, S. C.; ELEUTHERIO, E. C. A.

The effect of trehalose on the fermentation performance of aged cells of *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Microbial and Cell Physiology**, p. 697-704, 2011.

Veelders, M., Brueckner, S., Ott, D., Unverzagt, C., Moesch, H.-U., Essen, L.-O. Structural Basis of Flocculin-Mediated Social Behavior in Yeast (2010) *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **107**: 22511-22516

VERSTREPEN, K. J. Yeast flocculation: what brewers should know. **Appl.**

Microbiol. Biotechnol., v. 61, n. 3, p. 197-205, 2003.

VERSTREPEN, K.J., ET AL., *Late fermentation expression of FLO1 in Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, 2001. **59**(2): p. 69-76.

VERSTREPEN, K.J., JANSEN A., LEWITTER, F. & FINK, G.R. Intragenic tandem repeats generate functional variability. **Nat. Genet.**, v. 37, p. 986–990, 2005.

VERSTREPEN, K. J. & KLIS, F. M. Flocculation, adhesion and biofilm formation in yeasts. **Molec. Microbiol.** v. 60, n. 1, p. 5-15, 2006.

VILLEN, R. A. Mauá: Biotecnologia – Histórico e Tendências. **Escola de Engenharia de Mauá**. Apostila, 2009

WARD, W. W. Biochemical and Physical Properts of *Green Fluorescent Protein*. In: **CHALFIE, M., KAIN, S.**, eds. **Green fluorescent protein: properties, applications and protocols**. New York: Wiley-Liss, 1998. P.45–75.

XU, T.J., ZHAO, X.Q. AND BAI, F.W. (2005) Continuous ethanol production using self-flocculating yeast in a cascade of fermentors. **Enzyme Microb Technol** **37**, 634–640.

ZARA, G.; ZARA, S.; PINNA, C.; MARCEDDU, S.; BUDRONI, M. *FLO11* gene lenght and transcriptional level affect biofilm-forming ability of wild flor strains on *Sccharomyces cerevisiae*. **Microbiology**, v. 155, p. 3838-3846, 2009.

