



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

ANDERSON DA SILVA BATISTA

**“ANÁLISE DO TRANSPORTE E FERMENTAÇÃO DE SACAROSE
POR *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*”**

FLORIANÓPOLIS
2001

ANDERSON DA SILVA BATISTA

**“ANÁLISE DO TRANSPORTE E FERMENTAÇÃO DE
SACAROSE POR *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*”**

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

ORIENTADOR: Prof. Dr. Boris Stambuk

FLORIANÓPOLIS

MARÇO/2001

Batista, Anderson da Silva.

Análise do transporte e fermentação de sacarose por *Saccharomyces cerevisiae*/ Anderson da Silva Batista. Florianópolis, 2001.52p.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Santa Catarina.
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia.

1. fermentação. 2. sacarose. 3. *Saccharomyces cerevisiae*. 4. AGT1.

Parte desta dissertação foi objeto da publicação:

STAMBUK, B.U.; BATISTA, A.S. & ARAUJO, P.S. Kinetics of active sucrose transport in *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Biosci. Bioeng**, v. 89: p. 212-214, 2000.

tendo sido também apresentada nos seguintes congressos e / ou encontros:

BATISTA, A.S.; ARAUJO, P.S. & STAMBUK, B.U. Transporte ativo de sacarose por *Saccharomyces cerevisiae*. XX Congresso Brasileiro de Microbiologia, Salvador, Brasil, p. 202, 1999.

STAMBUK, B.U.; BATISTA, A.S. & ARAUJO, P.S. Kinetics of active sucrose transport in *Saccharomyces cerevisiae*. Third Conference on Recent Advances in Fermentation Technology (RAFT III), Sarasota, FL, USA, p. 36, 1999.

BATISTA, A.S.; DECKER, P. & STAMBUK, B.U. Sucrose fermentation by a *Saccharomyces cerevisiae* strain lacking hexoses transporters. XXIX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, Caxambu, Brasil, p. 68, 2000.

BATISTA, A.S.; DECKER, P. & STAMBUK, B.U. Sucrose transport and fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* hexose transport null strain. 18th Small Meeting on Yeast Transport and Energetics, Ouro Preto, Brasil, p. 69, 2000.


**"Análise do transporte e fermentação de sacarose
por *Saccharomyces cerevisiae*"**

POR

ANDERSON DA SILVA BATISTA

**Dissertação julgada e aprovada em sua
forma final, pelo Orientador e membros
da Comissão Examinadora.**

Comissão Examinadora:



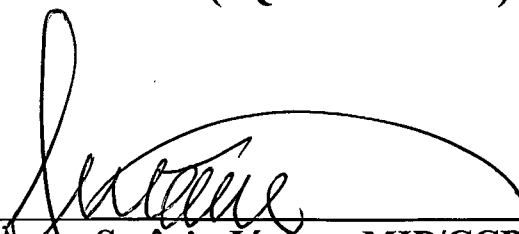
**Prof. Dr. Bóris Juan Carlos Ugarte Stambuk
Orientador (BQA/CCB/UFSC)**



**Prof. Dr. Agénor Fúrigo Júnior
(EQA/CTC/UFSC)**



**Prof. Dr. Hernán Francisco Terenzi
(BQA/CCB/UFSC)**



**Prof. Dr. Artur Smânia Júnior - MIP/CCB/UFSC
Coordenador do Programa de
Pós-Graduação em Biotecnologia da UFSC**

Florianópolis, março de 2001

AGRADECIMENTOS

Ao professor Dr. Boris U. Stambuk, pela orientação, apoio, dedicação e paciência para a realização deste trabalho.

Aos professores e funcionários do Departamento de Bioquímica da UFSC, pelo auxílio prestado. A todos colegas de laboratório que auxiliaram direta ou indiretamente na parte experimental deste trabalho.

Ao professor Jorge Ninow e aos colegas do Laboratório de Engenharia Bioquímica da UFSC, pelo uso do cromatógrafo a gás.

À coordenação do Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia da UFSC e aos colegas de curso que contribuíram para a realização do trabalho.

A minha família e a minha noiva Angela pelo apoio dedicado durante a execução deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), ao FUNPESQUISA-UFSC e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

ÍNDICE

RESUMO.....	VI
SUMMARY.....	VII
INTRODUÇÃO.....	08
OBJETIVOS.....	16
MATERIAIS E MÉTODOS.....	17
MICROORGANISMOS UTILIZADOS.....	17
PLASMÍDEOS UTILIZADOS.....	18
MEIOS DE CULTIVO E CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO.....	18
TÉCNICAS GERAIS DE MANIPULAÇÃO DE ÁCIDOS NUCLÉICOS.....	19
PURIFICAÇÃO DE PLASMÍDEOS.....	20
HIDRÓLISE DE PLASMÍDEOS.....	21
ELETROFORESE DE DNA.....	21
LIGAÇÃO DOS FRAGMENTOS DE DNA.....	21
PCR.....	22
PREPARAÇÃO DE CÉLULAS COMPETENTES.....	23
<i>E. COLI</i>	23
<i>S. CEREVISIAE</i>	23
TRANSFORMAÇÃO DE CÉLULAS.....	24
<i>E. COLI</i>	24
<i>S. CEREVISIAE</i>	24
DETERMINAÇÃO DO TRANSPORTE DE SACAROSE E MALTOSE.....	25
DETERMINAÇÃO DE GLICOSE E ETANOL.....	26
DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE α -GLICOSIDASE.....	26
DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE INVERTASE.....	27
DETERMINAÇÃO DA PRODUÇÃO DE CO ₂	27
RESULTADOS.....	29
DISCUSSÃO.....	44
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	48
ÂNEXO.....	52

RESUMO

Células de *Saccharomyces cerevisiae* podem captar diretamente a sacarose, sem sofrer hidrólise, através de um sistema de transporte ativo (um co-transporte H^+ -sacarose). Nossos resultados mostram que cepas transformadas com plasmídeos contendo a permease codificada pelo gene *AGT1* apresentam uma captação significativa de ^{14}C -sacarose. Esta captação de sacarose é inibida por uma série de compostos (agentes mercuriais e desacopladores) que inibem o transporte ativo de açúcares em leveduras. Células que possuem esta permease são capazes de crescer em sacarose com velocidades específicas de crescimento maiores do que o observado quando a fonte de carbono é glicose, ou misturas equimolares de glicose e frutose. No intuito de analisar a contribuição deste transportador na metabolização da sacarose foram utilizadas cepas deletadas nesta permease, e cepas deletadas nos transportadores de hexoses codificados pelos genes *HXT1-HXT7* e *GAL2*. Foi caracterizado que cepas incapazes de utilizar a glicose e frutose continuam sendo capazes de fermentar a sacarose. Nestas cepas a fermentação da sacarose depende da expressão da permease *AGT1* nas células. Por exemplo, a fermentação e o transporte da sacarose só ocorre após indução pela maltose, ou se a cepa possuir um gene *MAL* regulador constitutivo. Quando o gene *AGT1* foi deletado em uma cepa selvagem, a cepa continuou fermentando a sacarose, provavelmente via hidrólise pela invertase. Entretanto, quando este gene foi deletado na cepa incapaz de transportar a glicose e frutose, a fermentação da sacarose não mais foi observada. Finalmente, foi observada uma correlação inversa entre os níveis da invertase e a fermentação da sacarose por estas cepas.

SUMMARY

Saccharomyces cerevisiae is known to transport sucrose directly into the cells, without hydrolysis, by an active transport system (a H⁺-sucrose symport). Our results indicate that strains transformed with plasmids containing the *AGT1*-encoded permease are able to transport significant amounts of ¹⁴C-sucrose. This uptake of sucrose was inhibited by several compounds (mercury reagents and uncouplers) known to inhibit the active transport of sugar in yeasts. Cells that harbor this permease are able to grow on sucrose with a higher specific growth rate than the observed when glucose, or equal amounts of glucose plus fructose, were used as a carbon source. In order to analyse the contribution of this transporter in the metabolism of sucrose we used yeast strains deleted on this permease, and deleted on the hexose transporters encoded by the *HXT1-HXT17* and *GAL2* genes. Cells that are not able to use glucose or fructose still ferment sucrose. In this strain sucrose fermentation was dependent on the expression of the *AGT1* permease. For example, sucrose transport and fermentation occurred only after induction by maltose, or if the strain had a constitutive *MAL* regulatory gene. When the *AGT1* gene was deleted on a wild-type strain, the cells were still able to ferment sucrose, probably by invertase hydrolysis. However, when this gene was deleted on the strain incapable to transport glucose or fructose, sucrose fermentation was not observed any more. Finally, our results showed an inverse correlation between the rates of sucrose fermentation and the activity of the enzyme invertase.

INTRODUÇÃO

Saccharomyces cerevisiae é um microorganismo amplamente utilizado nas indústrias de fabricação de álcool combustível, bebidas alcoólicas, panificação e em muitas outras aplicações práticas (ROSE & HARRISON, 1993). No caso do Brasil, a utilização desta levedura cresceu significativamente nas últimas décadas com a implantação do Programa Pró-Álcool (PANEK & PANEK, 1990; WHEALS *et al.*, 1999; ZANIN *et al.*, 2000). Como consequência do Pró-Álcool, a produção de álcool combustível subiu de 0,5 bilhões de litros em 1976 para 11400 bilhões de litros em 1996. A fabricação de álcool combustível tem também recebido atenção mundial como uma fonte energética alternativa e renovável, além de diminuir os efeitos da emissão de gases tóxicos, chuva ácida e o efeito estufa, provocados pelo uso de combustíveis fósseis. Este incremento na produção de álcool foi acompanhado de um significativo aumento na produção de cana-de-açúcar, sendo que atualmente o Brasil é um dos maiores produtores mundiais desta matéria prima (LALUCE, 1991; CARVALHO, 1996; MACEDO, 1998; ROSILLO-CALLE & CORTEZ, 1998).

Desde a criação do Pró-Álcool o custo da produção do álcool foi reduzido a aproximadamente 40% do valor de mercado praticado em 1976. Entretanto, um dos maiores problemas enfrentados para uma maior redução dos custos está relacionado com a fermentação dos açúcares contidos na cana-de-açúcar, onde

ainda ocorrem significativas perdas na produção do etanol (WHEALS *et al.*, 1999; ZANIN *et al.*, 2000).

A principal fonte de carbono na cana-de-açúcar é a sacarose, podendo chegar a representar em torno de 90% dos açúcares presentes (LALUCE, 1991). A sacarose, assim como vários outros açúcares, são rapidamente fermentados por cepas de *S. cerevisiae*. A metabolização da sacarose é iniciada pela ação da invertase periplasmática (β -frutosidase) que catalisa a hidrólise do dissacarídeo em glicose e frutose (BARNETT, 1981; vide Figura 1).

Em *S. cerevisiae* a invertase é codificada por um ou vários dos 6 genes denominados *SUC* (*SUC1* até *SUC5*, e *SUC7*), sendo *SUC2* o mais encontrado nas células (GROSSMANN & ZIMMERMANN, 1979; HOHMANN & ZIMMERMANN, 1986). O gene *SUC2* codifica para duas formas de invertase: uma forma secretada, que possui um peptídeo sinal que direciona a proteína ao retículo endoplasmático para ser secretada pelo Complexo de Golgi, e outra forma citoplasmática que não possui a sequência sinal (SAROKIN & CARLSON, 1984). A forma citoplasmática é constitutiva, enquanto que a forma secretada é regulada por repressão catabólica mediada pela presença de glicose ou frutose no meio de cultura (DYNESEN *et al.*, 1998).

A invertase secretada é formada por cadeias polipeptídicas de 60 kDa com oligossacarídeos heterogêneos associados, conferindo um peso molecular total de aproximadamente 270 kDa à enzima. Esta proteína ainda pode ser encontrada no espaço periplasmático na forma de monômeros, dímeros, tetrâmeros ou octâmeros

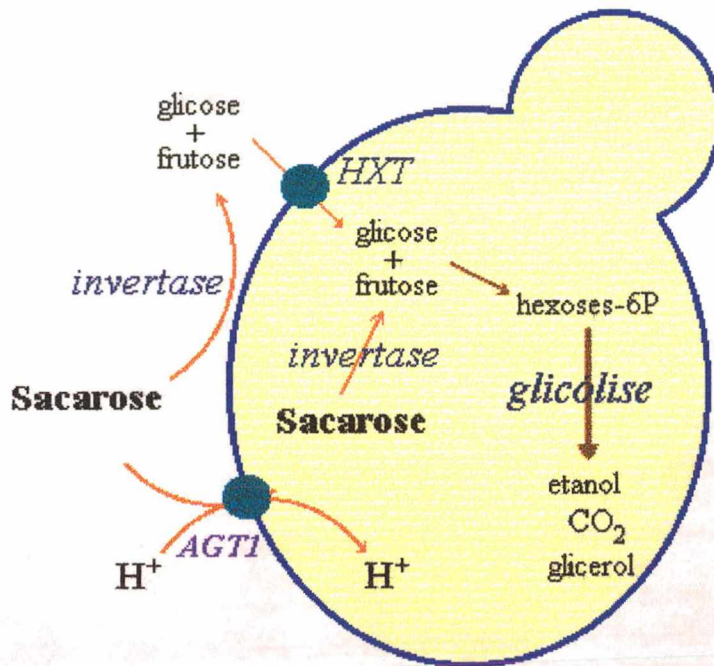


Figura 1. Metabolização da sacarose por *Saccharomyces cerevisiae*. Na via clássica de metabolização da sacarose a célula de levedura secreta a enzima invertase que hidrolisa a sacarose em glicose e frutose. Então estes monossacarídeos são captados e utilizados pela célula. Mas existem evidências experimentais que sugerem haver uma outra via metabólica, onde a sacarose seria diretamente captada pela célula sem ocorrer hidrólise.

(ESMON *et al.*, 1986; TAMMI *et al.*, 1986). Por outro lado, a forma citoplasmática não é glicosilada e é encontrada na forma dimérica atingindo um peso molecular de aproximadamente 135 kDa, podendo ter ainda formatos octaméricos na presença de altas concentrações de proteínas (PERLMAN & HALVORSON, 1981). Estes dois tipos de invertase são diferentes na composição de aminoácidos na extremidade amino terminal (WILLIAMS *et al.*, 1985; KAISER *et al.*, 1987), como pode ser evidenciado na Figura 2.

Fatores como o pH, temperatura, concentração de cloreto de sódio e altas concentrações de etanol interferem na atividade da invertase (ZECH & GÖRICH, 1995). Entretanto, um dos fatores que regula de forma mais decisiva na expressão da atividade invertase periplasmática é a concentração de glicose no meio: altas concentrações de glicose reprimem a expressão dos genes *SUC*, enquanto que baixas concentrações do açúcar induzem a expressão da invertase (SAROKIN & CARLSON, 1984; OZCAN *et al.*, 1997). A repressão por glicose de *SUC2* constitui uma cascata regulatória composta por um grande número de elementos regulatórios. A proteína envolvida neste processo (*MIG1*) é uma proteína *zinc finger*, que direciona o complexo repressor para o promotor do *SUC2*, reprimindo a expressão da invertase periplasmática (OLSSON *et al.*, 1997).

A hidrólise da sacarose pela invertase produz glicose e frutose. A glicose é a principal fonte de carbono e energia utilizada pelas células. As hexoses são captadas por permeases através do mecanismo de difusão facilitada. A análise cinética do transporte de glicose revelou a existência de pelo menos dois sistemas

INVERTASE EXTRACELULAR

DNA: AACGTATATG ATGCTTTTGCAAGCTTTCCTTTTCCTTTTGGCTGGTTTTGCAGCCAAAATATCTGCATCAATGACAAACGAACT

Proteína: ⇒ M L L Q A F L F L L A G F A A K I S A S M T N E T

INVERTASE INTRACELULAR

DNA: AACGTATATGATGCTTTTGCAAGCTTTCCTTTTCCTTTTGGCTGGTTTTGCAGCCAAAATATCTGCATCA ATGACAAACGAACT

Proteína: ⇒ M T N E T

Figura 2. Localização do início da transcrição nos dois tipos de invertase.

Na invertase extracelular o início da transcrição ocorre numa região do gene que codifica para um peptídeo sinal (sublinhado) que direciona a proteína ao retículo endoplasmático para posterior secreção. Na invertase intracelular este peptídeo sinal não é sintetizado por que a transcrição se inicia num outro códon ATG posterior à sequência do peptídeo sinal.

de transporte com características diferentes: um sistema de alta afinidade com um K_m de aproximadamente 1 mM, reprimido pela glicose, e um constitutivo de baixa afinidade, com um K_m de aproximadamente 20 mM (REIFENBERGER *et al.*, 1995; 1997). Estes transportadores são codificados por uma família de 20 genes e denominados de *HXT1-17*, *GAL2*, *SNF3* e *RTG2*. Vários membros desta família têm sido estudados e há evidências que somente 7 genes são importantes para a captação das hexoses pela célula: estes genes são os que codificam para as permeases *HXT1-HXT4*, *HXT6* e *HXT7* (transportadores de glicose, frutose e manose) e a permease codificada pelo gene *GAL2* (transportador de galactose, mas que também transporta glicose). De fato, cepas deletadas nestes 7 genes são incapazes de transportar glicose e outras hexoses, bem como utilizar como fonte de carbono ou fermentar estes açúcares (REIFENBERGER *et al.*, 1995; 1997; KRUCKEBERG *et al.*, 1999).

Apesar de ser inegável a importância que a invertase tem na metabolização da sacarose, uma série de trabalhos tem demonstrado que o crescimento e a produção de etanol em meio contendo sacarose, é mais rápido do que o observado quando quantidades equimolares de glicose e frutose estão presentes no meio de cultura (ORLOWSKI & BARFORD, 1991; BARFORD *et al.*, 1993). Estas observações estariam de acordo com um modelo que propõe que a sacarose também deve entrar diretamente nas células sem sofrer hidrólise (BARFORD *et al.*, 1992). Esse modelo justificaria a função da invertase intracelular presente nas células (GROSSMANN & ZIMMERMANN, 1979; CARLSON & BOTSTEIN, 1982).

Desta forma uma série de trabalhos tem evidenciado que este açúcar pode também ser captado diretamente pelas células, através de um co-transporte (*symport*) com prótons, sem sofrer hidrólise (SANTOS *et al.*, 1982; ORLOWSKI & BARFORD, 1991; BARFORD *et al.*, 1992; 1993; MWESIGYE & BARFORD, 1994; 1996a). Apesar de já terem sido estudados o efeito de uma série de açúcares na expressão deste transportador (BARFORD *et al.*, 1995; MWESIGYE & BARFORD, 1996b), não se conhece ainda qual seria a proteína responsável pela atividade de transporte ativo de sacarose, e conseqüentemente qual seria o gene codificador para esta proteína, nem como este *symport* sacarose-H⁺ é regulado.

É importante salientar neste contexto que embora a invertase periplasmática seja importante para o crescimento e produção de células de levedura para serem usadas como fermento de panificação (o meio de cultura utilizado é o caldo de cana-de-açúcar), a presença desta enzima durante a fermentação da massa de pão nem sempre é desejada, principalmente na fabricação de pão doce contendo altas concentrações de sacarose (ODA & OUCHI, 1990b; MYERS *et al.*, 1997). Cabe ainda salientar já ter sido demonstrado, na produção do álcool combustível, também existir uma relação inversa entre atividade invertase e capacidade fermentativa da cepa. A cepa que apresenta uma alta atividade de invertase, tem sua performance fermentativa consideravelmente diminuída (ECHEGARAY *et al.*, 2000). Nestes casos, a hidrólise da sacarose produz altas concentrações de glicose e frutose que impõem um forte estresse osmótico às células, diminuindo consideravelmente a produção de CO₂ e portanto o crescimento da massa do pão e/ou produção de

álcool (MYERS *et al.*, 1997). Seria portanto de extremo interesse para a indústria panificadora a obtenção de cepas de levedura capazes de crescer em sacarose, mas sem atividade (ou com níveis baixos) da invertase periplasmática.

Para analisar o transporte da sacarose poderia se utilizar uma cepa deletada no gene da invertase, ou então deletada nos transportadores das hexoses que seriam os produtos da hidrólise da sacarose. Optou-se por utilizar uma cepa deletada nos *HXTs*, uma vez que a obtenção de uma cepa deletada no gene da invertase seria deletada em ambas as atividades (invertase intra e extracelular), e portanto provavelmente incapaz de utilizar a sacarose.

OBJETIVOS

No intuito de melhor compreender os mecanismos bioquímicos e genéticos envolvidos na utilização da sacarose por *Saccharomyces cerevisiae*, e assim poder incrementar a eficiência das leveduras utilizadas nos processos industriais, pretende-se:

- 1- Analisar do ponto de vista bioquímico a atividade de transporte de sacarose por *Saccharomyces cerevisiae*. Com este objetivo foram analisados os parâmetros do transporte (cinéticas, mecanismos de transporte, ação de inibidores) e metabolização (velocidade de crescimento, produção de CO₂, produção de etanol) da sacarose por cepas de levedura industriais.
- 2- Analisar geneticamente a atividade de transporte de sacarose por *Saccharomyces cerevisiae*. Com este objetivo foram utilizadas cepas de levedura com transportadores de açúcares definidos. Além disso, alguns transportadores foram especificamente deletados do genoma, ou inseridos em plasmídeos multicópia, e o impacto deste tipo de manipulação na metabolização da sacarose analisado como descrito acima.
- 3- Analisar a utilização de sacarose por uma cepa de levedura deletada nos transportadores de hexoses codificados pelos genes *HXT1-HXT7* e *GAL2*, e pela cepa parental contendo todos estes transportadores.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Microorganismos utilizados:

Os genótipos das cepas de *S. cerevisiae* e *E. coli* utilizadas no presente trabalho encontram-se detalhados na Tabela 1.

Tabela 1. Genótipos das cepas de *S. cerevisiae* e *E. coli* utilizadas.

Cepa	Genótipo
<u><i>Saccharomyces cerevisiae</i>:</u>	
AP774C	<i>MATα MAL1R-1^c mal2R [mal2T mal2S]::TRP1 leu2-3,112</i>
AP775A	<i>MATα MAL1R-1^c mal2R [mal2T mal2S]::TRP1 ura3-52</i>
MC996A	<i>MATα MAL2 AGT1 ura3-52 his3-11,15 leu2-3,112 GAL SUC2</i>
KY73	<i>MATα MAL2 AGT1 ura3-52 his3-11,15 leu2-3,112 GAL SUC2 gal2Δ hxt1Δ::HIS3::Δhxt4 hxt5::LEU2 hxt7::HIS3 hxt2Δ::HIS3 hxt3Δ::LEU2::hxt6</i>
BS08	<i>MATα MAL2 agt1::kan^r ura3-52 his3-11,15 leu2-3,112 GAL SUC2 gal2Δ hxt1Δ::HIS3::Δhxt4 hxt5::LEU2 hxt7::HIS3 hxt2Δ::HIS3 hxt3Δ::LEU2::hxt6</i>
BS09	<i>MATα MAL2 agt1::kan^r ura3-52 his3-11,15 leu2-3,112 GAL SUC2</i>
<u><i>Escherichia coli</i>:</u>	
DH5 α	<i>F⁻, recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17(vK-mk+), supE44, rel1, Δ(argF-lacZya) U169 (ϕ80 lacZΔM15) λ</i>

As cepas AP774C e AP775A foram cedidas pela Dra. Anita D. Panek (Universidade Federal do Rio de Janeiro). As cepas MC996A e KY73 foram gentilmente cedidas pelo Dr. Arhur L. Kruckeberg (University of Amsterdam). A cepa DH5 α foi obtida da Dra. Ana Clara Shenberck (Universidade de São Paulo).

As cepas BS08 e BS09 foram obtidas neste trabalho (vide resultados).

2. Plasmídeos utilizados.

Foram utilizados os plasmídeos YEp-AGT1 (2μ LEU2 AGT1), plasmídeo multicópia contendo o gene *AGT1* (HAN *et al.*, 1995); YCplac33 (*CEN LEU2*), plasmídeo centromérico utilizado para clonagem de genes em *S. cerevisiae* (GIETZ & SUGINO, 1988); o plasmídeo pFA6a-kanMX6, utilizado para deletar genes em leveduras (LONGTINE *et al.*, 1998); e o plasmídeo pJW5 (*CEN URA3 MAL63^c*), plasmídeo centromérico contendo o gene *MAL63* regulador constitutivo (WANG & NEEDLEMAN, 1995).

3. Meios de Cultivo e Condições de Crescimento.

Foram utilizados dois tipos de meios para o crescimento das cepas de *Saccharomyces cerevisiae*: um meio rico contendo 2% de peptona, 1% de extrato de levedura e 2% do carboidrato de interesse, e um meio mínimo contendo 2% de fonte de carbono, 0,7% de base nitrogenada de levedura sem aminoácidos, adicionados de 30 μ g/ml de aminoácidos e bases nitrogenadas necessários para as células. Todos os meios tiveram seu pH ajustado para o pH 5,0 com HCl, e foram esterilizados por autoclave (permanecendo a uma temperatura de 120°C por vinte minutos) com exceção da base nitrogenada de levedura sem aminoácidos que foi esterilizada por filtração utilizando-se filtros de nitrocelulose com poro de 0,22 μ m. Filtro e demais componentes deste processo foram previamente esterilizados por

autoclave. Para confecção dos meios sólidos, foi adicionado 2% de ágar aos meios descritos acima.

As células foram inoculadas em erlenmeyers contendo 1/5 do volume de meio líquido, sendo a cultura incubada em um agitador a 28°C e 160 rotações por minuto. O crescimento celular foi medido determinando-se a massa celular (expressa em peso da massa seca) a partir de medidas espectrofotométricas a 570 nm. Para a obtenção dos valores de peso de massa seca, alíquotas da suspensão celular foram filtradas em filtros com poro de 0,45 µm e secas em estufa a 80°C até obtenção de peso constante.

Para o crescimento de células de *Escherichia coli*, foi utilizado o meio LB líquido, contendo 1% de triptona, 0,5% de extrato de levedura e 1% de NaCl, ajustado a pH 7,5 com adição de NaOH 1M; e meio LB sólido, adicionando-se 2% de ágar ao meio descrito acima. Estes meios foram esterilizados como descrito acima. Para alguns experimentos foi adicionado ao meio líquido, 50 µg/ml de ampicilina esterilizada por filtração, também como descrito acima.

4. Técnicas gerais de manipulação de ácidos nucleicos

A manipulação de ácidos nucleicos foi realizada seguindo método padrão de biologia molecular já descritos na literatura (MANIATIS *et al.*, 1982; AUSUBEL *et al.*, 1992).

4.1. Purificação de plasmídeos

Utilizou-se colônias de bactéria DH5 α contendo o plasmídeo de interesse. Uma única colônia de bactéria foi inoculada em 5 ml de meio LB contendo ampicilina e crescida *overnight* a 37°C. Centrifugou-se 1,5 ml deste meio e as células foram ressuspensas em 100 μ l de solução GTE (50 mM glicose, 25 mM Tris-Cl pH 8,0 e 10 mM EDTA). Após incubação por 5 minutos na temperatura ambiente, adicionou-se 200 μ l de solução NaOH/SDS (0,2 M NaOH 1% SDS) sob agitação vigorosa. Depois de 5 minutos no gelo adicionou-se 150 μ l de solução de acetato de potássio 5 M (29,5 ml ácido acético glacial e KOH até pH 4,8) com agitação e incubou-se mais 5 minutos no gelo. Após 3 minutos de centrifugação transferiu-se 400 μ l do sobrenadante para um novo tubo, no qual adicionou-se 800 μ l de etanol 95%. Depois de uma incubação por dois minutos a temperatura ambiente lavou-se o precipitado com 1 ml de etanol 70%, centrifugou-se por 3 minutos, retirou-se o máximo possível do sobrenadante e o DNA precipitado foi colocado para secar na bomba de vácuo por 30 minutos. Após este procedimento, o precipitado foi ressuspenso em tampão TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA pH 8,0) estéril, ao qual foi adicionado RNase livre de DNase na concentração de 1 mg/ml, incubando-se por 1 hora a 37°C. As soluções contendo plasmídeos foram estocadas a -20°C.

4.2. Hidrólise de plasmídeos

A hidrólise dos plasmídeos purificados acima (aproximadamente 2 μ l) foi realizada com as enzimas EcoR I e/ou Hind III em um volume final de 10 μ l nas condições recomendadas pelos fabricantes das enzimas. A seguir a mistura reacional foi incubada durante 1 hora no banho a 37°C.

4.3. Eletroforese de DNA

Às amostras para eletroforese, num volume de 10 μ l, foram adicionadas 2 μ l de tampão de amostra (40% sacarose, 0,25% azul de bromofenol e 0,1 M EDTA) 6 vezes concentrado. Utilizou-se gel de agarose 0,7% em tampão TBE (9 mM Tris base, 9 mM ácido bórico e 2 mM EDTA) contendo 5 μ g/ml de Brometo de etídio, sendo este mesmo tampão utilizado como tampão de corrida. Depois de solidificado o gel, aplicaram-se as amostras e 6 μ l do padrão λ -H3 (fago λ hidrolisado com enzima Hind III, 0,1 mg/ml em tampão TE). A corrida eletroforética foi realizada a 30-60 V por 1-2 horas. A visualização dos fragmentos de DNA no gel foi obtida através de iluminação com luz ultravioleta.

4.4. Ligação dos fragmentos de DNA

Aos fragmentos obtidos após hidrólise com enzimas de restrição adicionou-se 1 μ l de *T4 DNA ligase* e 2,2 μ l de *DNA ligase reaction buffer* (50 mM Tris-HCl pH 7,6, 10 mM MgCl₂, 1 mM ATP, 1 mM DTT e 5% polietileno glicol-8000).

Incubou-se a reação na estufa a 37°C por 10 minutos e depois de 4 a 16 horas a temperatura ambiente.

4.5. Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Os primers utilizados nas reações foram os seguintes (no sentido 5'→3'):
AGT1R (TTGGATCCACATTTATCAGCTGC), AGT1F (AGGAGCTCATGA
AAAATATCATTTTCATAGG), AGT1-pFA6-R1 (AAAGGGATTCCTTATTTCT
TCCAAAAAAAAAAAAAAAAACAACCCTTTTACTTAGAATTCGAGCTCGTTTAAA
C) e AGT1-pFA6-F1 (TAAGCAAGAAGAAGGCTGCCTCAAAAAATGAGGA
TAAAAACATTTCTGAGCGGATCCCCGGGTTAATTAA). Sítios de restrição
estão indicados pelas bases em negrito. As sequências em itálico são homólogas à
série de plasmídeos pFA6a (LONGTINE *et al.*, 1998). Cada tubo de reação continha
1 unidade de *Taq* DNA polimerase; 2 µl dNTP 10 mM; 1,5 µl MgCl₂ 3 mM; e 5 µl
do tampão para *Taq* DNA polimerase (Gibco). Além destes, a cada tubo foi
adicionado 8 µl dos *primers* (10 µM); 2 µl da amostra de DNA e água mili-Q até
um volume final de 50 µl.

Para todos os PCRs foi utilizado o seguinte programa num Termociclador
Perkin-Elmer: 1) 1 minuto à 94°C; 2) 1 minuto à 94°C; 3) 30 segundos à 55°C; 4) 3
minutos à 68°C; 5) Voltar 30 vezes ao passo 2; 6) 5 minutos à 68°C.

§: Preparação de células competentes:

5.1. *E. coli*:

Inoculou-se uma colônia de *E. coli* (DH5 α) em 5 ml de meio LB e deixou-se crescer *overnight* a 37°C com agitação. Em seguida, inoculou-se 200 μ l da cultura em 25 ml de meio LB e pôs-se crescer com agitação até uma A₅₉₀ de 0,3. Então, colocou-se uma alíquota de 14 ml em tubo estéril e deixou-se no gelo por 5 a 10 minutos, sendo em seguida centrifugado por 7 minutos a 1600 g. Descartou-se o sobrenadante em condições estéreis e ressuspendeu-se cada *pellet* em 3,5 ml de tampão CaCl₂ (60 mM CaCl₂, 15% glicerol e 10 mM Pipes pH 7,0) gelado. Centrifugou-se 5 minutos a 1100 g e retirou-se o sobrenadante novamente. Em seguida ressuspendeu-se novamente o *pellet* em 3,5 ml de tampão CaCl₂, mantendo-se no gelo por 30 minutos. Após nova centrifugação durante 5 minutos, ressuspendeu-se completamente o precipitado em 0,7 ml de tampão CaCl₂ gelado. Somente então colocou-se alíquotas de 100 μ l em tubos estéreis e as células congeladas rapidamente a -80°C.

5.2. *S. cerevisiae*

Células de *S. cerevisiae* foram semeadas no dia anterior ao experimento propriamente dito em meio líquido rico. As células foram então centrifugadas e lavadas inicialmente com água destilada e posteriormente com uma solução de LiTe (0,1 M acetato de lítio, 10 mM Tris-Cl pH 7,6 e 1 mM EDTA). A seguir, estas foram ressuspensas em 25 ml de tampão LiTe e mantidas por 1 hora a 30°C e 160 rpm. Logo após adicionou-se 10 μ l de 1% ssDNA (DNA de fita simples),

dividindo-se em alíquotas de 100 μ l em tubos estéreis. Estas células foram mantidas congeladas a -80°C

6. Transformação de células

6.1. *E. coli*

Colocou-se 10 η g (10-25 μ l) do plasmídeo de interesse em tubos estéreis mantidos no gelo. As células competentes foram rapidamente descongeladas e colocou-se 100 μ l destas nos tubos contendo o DNA. Agitou-se bem no vortex e colocou-se no gelo por 10 minutos. Depois disso foi dado um choque térmico, colocando os tubos 2 minutos a 42°C. A seguir adicionou-se 1 ml de meio LB em cada tubo, e incubou-se as células por 1 hora a 37°C com agitação. Por fim inoculou-se as células em placas de meio LB com ampicilina e incubou-se por 12 a 16 horas a 37°C.

6.2. *S. cerevisiae*

Adicionou-se 10 μ l do plasmídeo desejado nos tubos com as células competentes. Incubou-se a solução por 30 minutos à temperatura ambiente, com posterior adição de 700 μ l de 36% PEG-4000 em tampão LiTe, novamente incubando-se a solução por 1 hora a 30°C. Após isso, manteve-se as células por 5 minutos a 42°C. Depois desse choque térmico, as células foram centrifugadas, e posteriormente ressuspendidas em 0,2 ml de sorbitol 1M. As células foram

plaqueadas em meio mínimo sólido, sem leucina ou uracila, a fim de selecionar-se as células transformadas com plasmídeos contendo os genes *LEU2* ou *URA3*, respectivamente.

7. Determinação do transporte de sacarose e maltose

O transporte de sacarose foi determinado através de metodologias já descritas (SANTOS *et al.*, 1982; MWESIGYE & BARFORD, 1994; STAMBUK *et al.* 1998; 1999). Aproximadamente 1-2 mg de células, ressuspensas em 50 µl de água a 4°C, foram incubadas com 50 µl de tampão 100 mM succinato-Tris pH 5,0. Após uma incubação por 5 minutos a temperatura ambiente, foram adicionados 5,5 µl de solução 100 mM sacarose contendo [U-¹⁴C]-sacarose (612 mCi/mmol, Amersham - UK) e 40 mM de glicose e frutose. Para determinar o transporte de maltose utilizou-se uma solução 100 mM maltose contendo [U-¹⁴C]-maltose (460 mCi/mmol, Amersham - UK). Após intervalos de tempo pré-estabelecidos foram removidos 100 µl da mistura reacional, as células rapidamente filtradas em filtros de nitrocelulose com poros 0,45 µm, e lavadas com 2 ml de água a 4°C. Os filtros foram imediatamente embebidos em 5 ml de líquido de cintilação miscível em água e a radioatividade determinada em um contador de cintilação Packard C1600 TR. Foram utilizadas células previamente fervidas para verificar a radioatividade aderida inespecificamente aos filtros e/ou células.

8. Determinação de glicose e etanol

A concentração de glicose nos sobrenadantes das culturas, obtidos após remoção das células por centrifugação a 2.600 g, foi determinada através de kits enzimáticos comerciais (Biobrás). A produção de etanol foi determinada nos mesmos sobrenadantes, através de cromatografia a gás (CG Instrumentos Científicos Ltda., Brasil) com uma coluna Poropak Q-80-100 e um detector de ionização a chama com um sistema integrador computadorizado. Alternativamente, o etanol foi determinado com um kit enzimático comercial (Sigma).

9. Determinação da atividade α -glicosidase.

A atividade α -glicosidase foi determinada *in situ* utilizando-se células permeabilizadas como descrito por STAMBUK (1999). Aproximadamente 1 a 2 mg de células foram ressuspensas em 200 μ l de tampão 100 mM MOPS pH 6,8, contendo 20% glicerol, 1 mM EDTA e 1 mM DTT. Após a adição de 12 μ l de tolueno/etanol/10% Triton X-100 (1/4/1, v/v/v), as células foram vigorosamente agitadas em vortex, centrifugadas e ressuspensas em 1 ml de tampão 100 mM MOPS pH 6,8. A atividade α -glicosidase com maltose foi determinada utilizando-se 100 mM maltose em tampão 100 mM MOPS pH 6,8. Após a adição das células permeabilizadas, as reações foram incubadas por 1 a 2 minutos a 30°C, e imediatamente a 100°C por 3 minutos. As soluções foram centrifugadas e a glicose produzida foi determinada enzimaticamente com um kit de dosagem de glicose. O

controle negativo dos ensaios foi obtido utilizando-se células permeabilizadas previamente incubadas a 100°C por 3 minutos.

10. Determinação da atividade invertase

A atividade da invertase extracelular foi determinada utilizando-se células inteiras como descrito por SILVEIRA *et al.* (1996). Aproximadamente 1-2 mg de células foram lavadas e ressuspensas em 100 µl de água destilada gelada. Após a adição de 50 µl de 100 mM tampão acetato pH 5,0, as células foram incubadas a temperatura ambiente por 30 minutos. A seguir adicionou-se 150 µl de sacarose 200 mM e após 1 minuto à temperatura ambiente, as amostras foram incubadas à 100°C por 3 minutos e em seguida centrifugadas por 5 minutos. Alternativamente, a atividade invertase foi determinada nas células permeabilizadas (obtidas como descrito para a determinação da α -glicosidase) nas mesmas condições reacionais (200 mM sacarose em tampão acetato pH 5,0) descritas acima.

11. Determinação da produção de CO₂

O CO₂ produzido foi determinado volumetricamente como descrito por Burrows & Harrison (1959). Aproximadamente 5 ml de meio YNB 0,7% contendo 2% do açúcar de interesse foi pré-incubado por 5 minutos a temperatura ambiente. A seguir, 1-2 mg de células, ressuspensas em tampão 100 mM succinato-Tris pH 5,0, foram adicionadas ao meio e em tempos pré-determinados, analisada a

quantidade do gás produzido utilizando-se buretas invertidas em um sistema hermeticamente fechado.

RESULTADOS

Embora existissem evidências bioquímicas que *S. cerevisiae* era capaz de transportar ativamente sacarose (SANTOS *et al.*,1982; MWESIGYE & BARFORD, 1994), não se sabia qual era a proteína ou gene responsável por esta atividade de transporte.

Recentemente HAN *et al* (1995) caracterizaram um transportador geral de α -glicosídeos, codificado pelo gene *AGT1*. Neste trabalho foi analisado somente o transporte de maltose, sendo que a especificidade do transporte foi avaliada através do crescimento em diversos açúcares, incluindo turanose, isomaltose, maltotriose, trealose, palatinose e melezitose. Neste trabalho não foi analisada a capacidade de transportar a sacarose, pois a cepa era *SUC2*, e portanto capaz de crescer em sacarose. Em 1999 STAMBUK *et al.* mostraram que a permease codificada pelo gene *AGT1* também era capaz de transportar sacarose ativamente, através de um sistema de cotransporte com prótons.

Como pode ser visto na Figura 3, a cepa AP775A transformada com o plasmídeo YCplac33 contendo o gene *AGT1* foi capaz de transportar significativas quantidades de sacarose, quando comparada com esta mesma cepa transformada somente com o plasmídeo controle YCplac33. Quando em presença do desacoplador FCCP e dos agentes mercuriais NEM, pHMB e pCMPS, a cepa AP775A transformada com o plasmídeo YCplac33-AGT1 sofreu uma significativa diminuição na atividade de transporte da sacarose. O desacoplador FCCP é

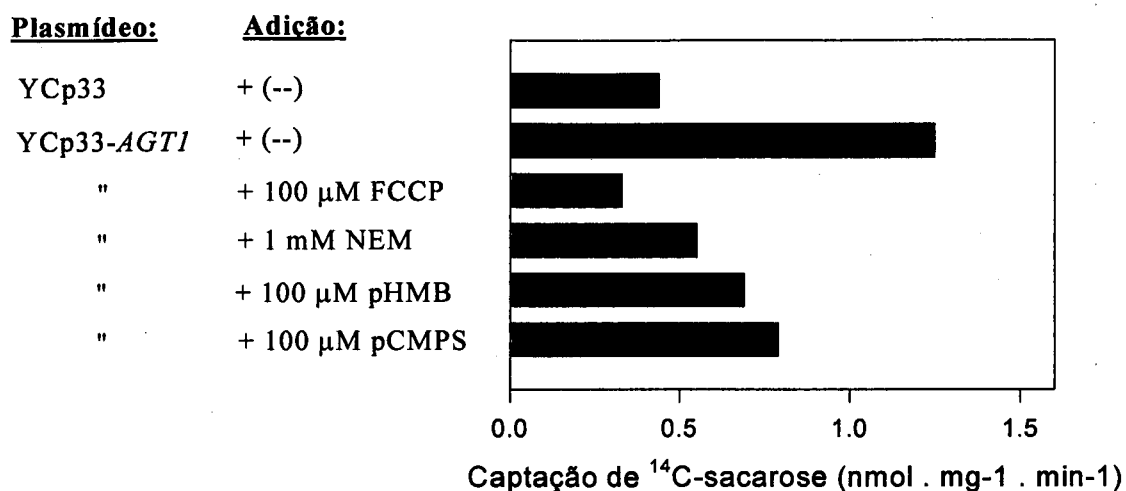


Figura 3. A permease *AGT1* transporta sacarose. Células da cepa AP775A, transformadas com o plasmídeo YCp33-*AGT1*, ou com o vetor sem o gene da permease, foram utilizadas para determinar o transporte de ^{14}C -sacarose como descrito em Material e Métodos. Como indicado, as células foram previamente incubadas na presença do desacoplador FCCP, ou na presença dos agentes mercuriais NEM, pHMB ou pCMPS.

responsável por desfazer o gradiente eletroquímico existente entre o meio extracelular e intracelular. Isto mostra que o transporte de sacarose depende deste gradiente. Os agentes mercuriais NEM, pHMB e pCMPS, interagem com as proteínas, e em geral alteram sua conformação e atividade, mostrando que existe uma proteína envolvida no transporte de sacarose.

A seguir, a cepa AP774C, transformada com o plasmídeo YEp-AGT1, foi crescida tendo como fonte de carbono 2% glicose, 1% glicose e 1% frutose, ou 2% sacarose (Figura 4). Pode-se observar que na curva de crescimento contendo sacarose como fonte de carbono, as células apresentaram uma fase *lag* maior do que nas curvas de crescimento obtidas utilizando-se os outros açúcares. Embora tenha-se observado esta fase *lag* maior, as células utilizando sacarose apresentaram uma velocidade específica de crescimento maior do que as células crescidas em glicose ou quantidades equimolares de glicose e frutose.

Para analisar a contribuição que o transporte ativo de sacarose teria na capacidade fermentativa das células, teria-se duas alternativas. Uma das alternativas seria obter uma cepa deletada nos genes *SUC*, responsáveis pela codificação da invertase intracelular e extracelular. Esta alternativa poderia vir a ser inviável, pois provavelmente a cepa não seria capaz de utilizar a sacarose. Outra alternativa seria obter uma cepa deletada nos transportadores de hexoses, pois mesmo a sacarose sendo hidrolisada em glicose e frutose, estas hexoses não poderiam ser captadas pelas células. Se a sacarose viesse a ser utilizada pela célula, ela teria que ter sido captada diretamente.

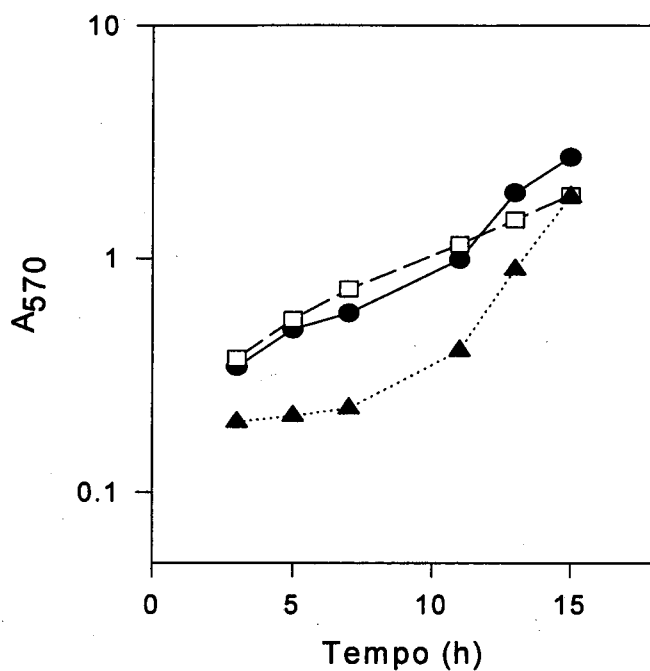


Figura 4. Influência da permease *AGT1* no crescimento de *S. cerevisiae*. Células da cepa AP77-4C transformadas com o plasmídeo YEp-AGT1 foram crescidas em meio mínimo contendo 2% glicose (-●-), 1% glicose e 1% frutose (-□-), ou 2% sacarose (-▲-), como descrito em Material e Métodos.

Desta forma, obteve-se duas cepas: a cepa MC996A, uma cepa selvagem que contém todos os transportadores de hexoses, e a cepa KY73, uma cepa deletada nos 7 principais transportadores de hexoses. Inicialmente foi analisada a capacidade da cepa selvagem (MC996A) de fermentar a glicose, sacarose ou maltose. A cepa MC996A, por possuir todos os transportadores de hexoses em seu genoma, foi capaz de produzir CO₂ (vide Figura 5) a partir dos açúcares acima citados, quando previamente crescida em maltose. Quando previamente crescida em etanol e glicerol houve uma significativa diminuição na produção de CO₂ com maltose como fonte de carbono.

Já a cepa deletada nos 7 principais transportadores de hexoses (KY73), produziu CO₂ a partir da maltose e da sacarose, quando previamente crescida em maltose (Figura 6). Quando previamente crescida em etanol e glicerol a cepa apresentou uma significativa queda na produção de CO₂ a partir da maltose e sacarose como fontes de carbono. Independentemente do açúcar utilizado no crescimento, esta cepa praticamente não produz CO₂ a partir de glicose.

A seguir foi analisada a atividade de transporte de maltose e sacarose nas cepas MC996A e KY73. A cepa MC996A quando previamente crescida em maltose foi capaz de transportar maltose e sacarose. Quando esta cepa foi previamente crescida em etanol e glicerol, a atividade de transporte da maltose e sacarose praticamente foi nula (Figura 7). A cepa KY73 teve um comportamento similar ao da cepa selvagem (Figura 8).

Paralelamente foi analisada a contribuição que o gene *AGT1* teria no transporte e na fermentação da sacarose. Este gene foi então deletado do genoma das cepas analisadas. O gene *AGT1* foi deletado do genoma por recombinação homóloga utilizando-se o gene que confere resistência a kanamicina, seguindo-se os procedimentos descritos por LONGTINE *et al.* (1998) e KNOP *et al.* (1999). Basicamente, o gene *kan'* presente no plasmídeo pFA6a-kanMX6 foi amplificado por PCR utilizando-se os oligonucleotídeos AGT1-pFA6-F1 e AGT1-pFA6-R1. O fragmento de DNA de 1560 pares de bases obtido (contendo extremidades homólogas ao gene *AGT1*) foi purificado em gel de agarose e utilizado para transformar as leveduras. Os transformantes (contendo o gene *AGT1* substituído pelo *kan'*) foram selecionados em placas contendo 200 µg/ml de geneticina. A cepa MC996A deletada no gene *AGT1* foi denominada de BS09, e a cepa KY73 deletada no gene *AGT1* foi denominada BS08.

Quando o gene *AGT1* foi deletado na cepa selvagem, verificou-se que a cepa (BS09) continuou sendo capaz de fermentar os três açúcares (vide Figura 5). Quando se analisou o transporte, observou-se que esta cepa continuava sendo capaz de transportar a maltose, mas não a sacarose (vide Figura 7). Já a cepa deletada nos 7 principais transportadores de hexoses e também no gene *AGT1* (cepa BS08), mostrou-se capaz de continuar fermentando a maltose, mas a capacidade de fermentar a sacarose foi abolida (vide Figura 6). Esta mesma cepa continuou transportando maltose, mas mostrou-se incapaz de transportar a sacarose (vide Figura 8).

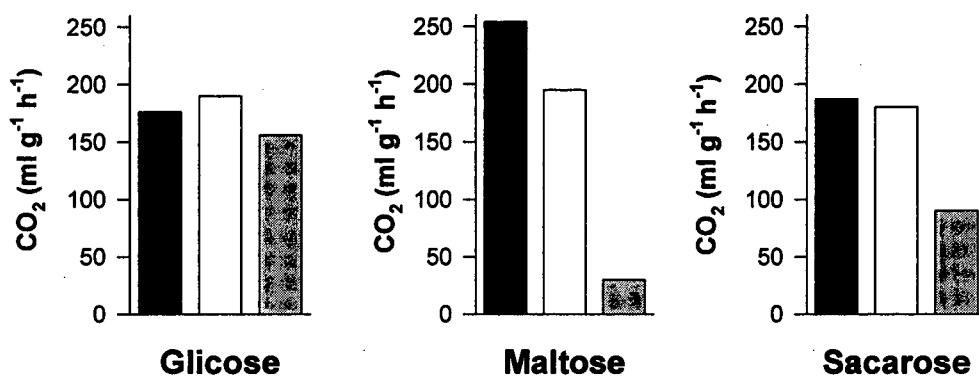


Figura 5. Determinação da produção de CO₂ em cepas contendo todos os transportadores de hexoses. Células da cepa MC996A, previamente crescidas em meio rico contendo 2% maltose (preto), ou 2% etanol e 3% glicerol (cinza), foram utilizadas para a determinação da produção de CO₂ nos açúcares indicados. Foi também utilizada a cepa BS09, previamente crescida em 2% maltose (branco), que teve o gene *AGT1* deletado do seu genoma.

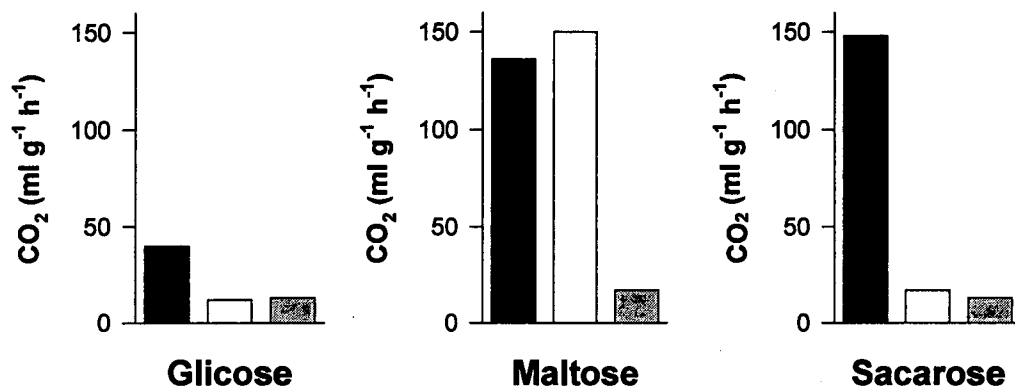


Figura 6. Determinação da produção de CO₂ em cepas deletadas nos 7 principais transportadores de hexoses. Células da cepa KY73, previamente crescidas em meio rico contendo 2% maltose (preto), ou 2% etanol e 3% glicerol (cinza), foram utilizadas para a determinação da produção de CO₂ nos açúcares indicados. Foi também utilizada a cepa BS08, previamente crescida em 2% maltose (branco), que teve o gene *AGT1* deletado do seu genoma.

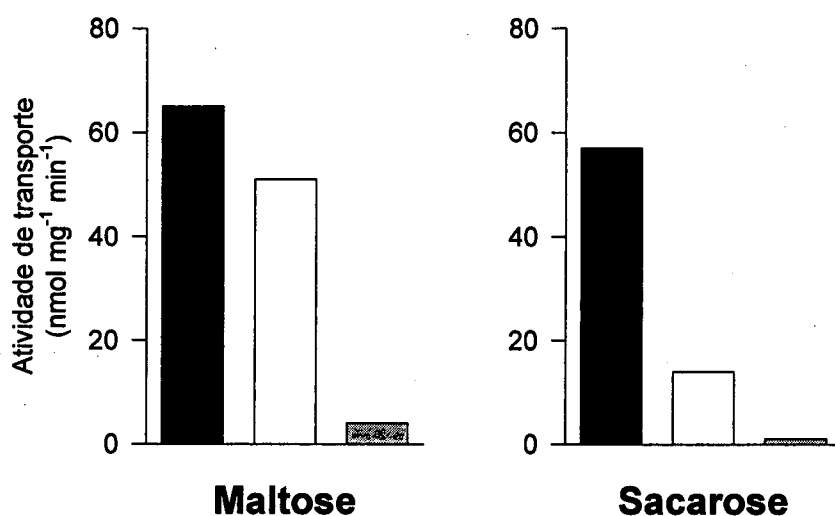


Figura 7. Determinação da atividade de transporte em cepas contendo todos os transportadores de hexoses. Células da cepa MC996A, previamente crescidas em meio rico contendo 2% maltose (preto), ou 2% etanol e 3% glicerol (cinza), foram utilizadas para a determinação da atividade de transporte nos açúcares indicados. Foi também utilizada a cepa BS09, previamente crescida em 2% maltose (branco), que teve o gene *AGT1* deletado do seu genoma.

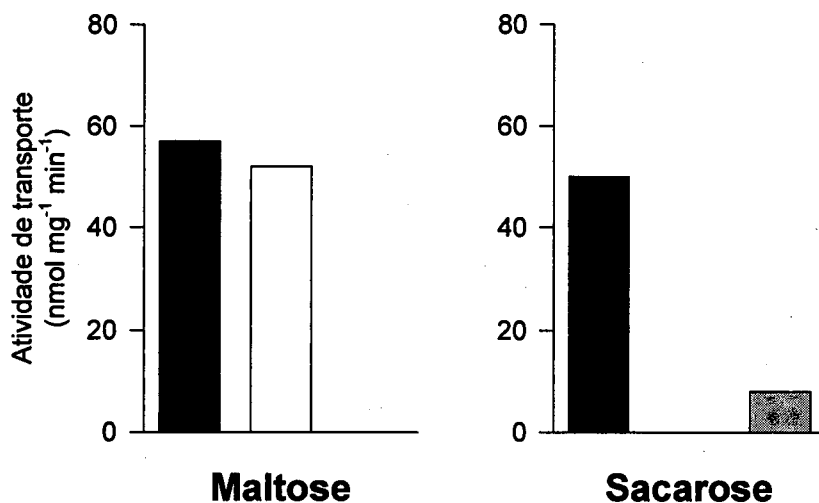


Figura 8. Determinação da atividade de transporte em cepas deletadas nos 7 principais transportadores de hexoses. Células da cepa KY73, previamente crescidas em meio rico contendo 2% maltose (preto), ou 2% etanol e 3% glicerol (cinza), foram utilizadas para a determinação da atividade de transporte nos açúcares indicados. Foi também utilizada a cepa BS08, previamente crescida em 2% maltose (branco), que teve o gene *AGT1* deletado do seu genoma.

A seguir analisou-se a capacidade de crescer e produzir etanol a partir da glicose, maltose e sacarose como fontes de carbono. Como mostrado na Figura 9, a cepa MC996A foi capaz de crescer em todas as fontes de carbono. Esta cepa também foi capaz de produzir etanol a partir das fontes de carbono acima citadas. A cepa KY73 somente foi capaz de crescer e produzir etanol quando a fonte de carbono foi a maltose (Figura 10). Esta cepa foi incapaz de crescer e/ou fermentar glicose ou sacarose.

A cepa KY73 possui em seu genoma o gene *AGT1* e portanto teria a capacidade de crescer e fermentar a sacarose, o que não foi observado. Com base neste dado, o que se postulou é que esta incapacidade da cepa KY73 de utilizar a sacarose como fonte de carbono seria um problema na regulação da permease *AGT1*. Então resolveu-se inserir na cepa KY73 o plasmídeo pJW5, que contém um gene *MAL* regulador constitutivo. Como pode ser visto na Figura 11, a cepa KY73 transformada com o plasmídeo pJW5 foi capaz de crescer e produzir etanol a partir do meio contendo sacarose como fonte de carbono.

A seguir, foi analisada a atividade de hidrólise de maltose e sacarose pelas cepas MC996A e KY73. Como pôde ser visto na Tabela 2, tanto a cepa MC996A quanto a cepa KY73 crescidas em maltose apresentaram uma baixa atividade da invertase, e uma atividade maltase alta. Quando as cepas MC996A e KY73 foram crescidas em etanol e glicerol como fonte de carbono, observou-se uma alta atividade da invertase e praticamente nenhuma atividade maltase.

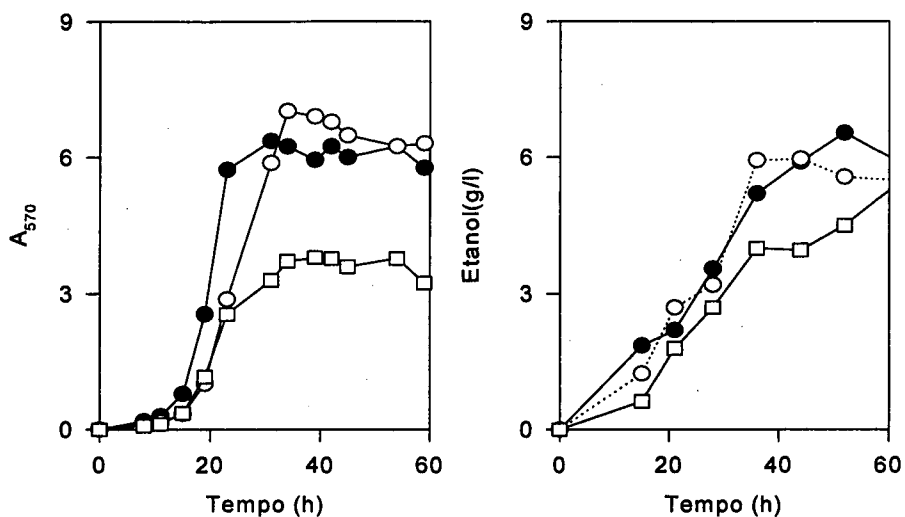


Figura 9. Crescimento e produção de etanol na cepa contendo todos os transportadores de hexoses. Células da cepa MC996A, foram previamente inoculadas em meio mínimo contendo 2% maltose. Deste pré-inóculo, foram novamente inoculadas em meio mínimo contendo 2% glicose (-●-), 2% maltose (-○-) ou 2% sacarose (-□-). Em tempos pré-determinados, foram retiradas amostras para quantificar a biomassa e o etanol produzido.

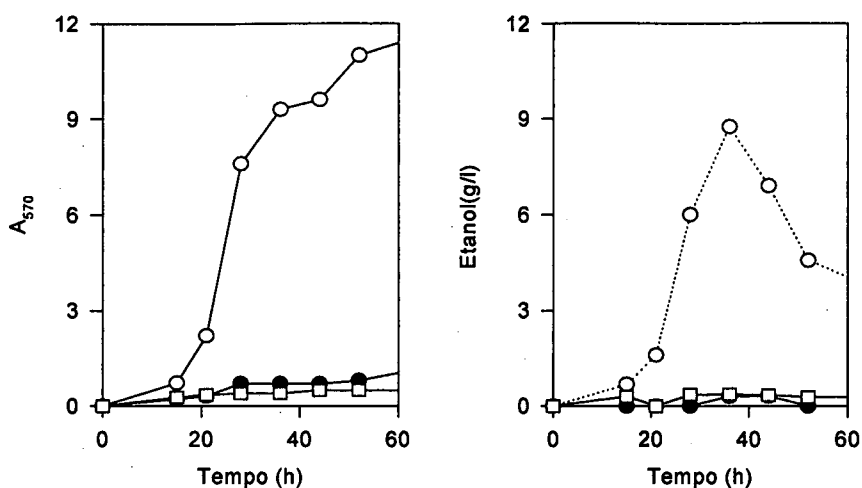


Figura 10. Crescimento e produção de etanol na cepa deletada nos 7 principais transportadores de hexoses. Células da cepa KY73, foram previamente inoculadas em meio mínimo contendo 2% maltose. Deste pré-inóculo foram novamente inoculadas em meio mínimo contendo 2% glicose (-●-), 2% maltose (-○-) ou 2% sacarose (-□-). Em tempos pré-determinados, foram retiradas amostras para quantificar a biomassa e o etanol produzido.

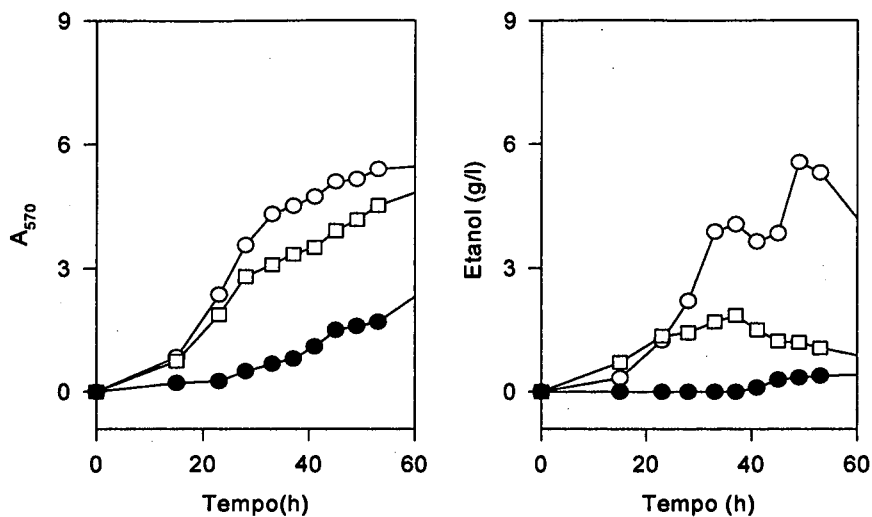


Figura 11. Crescimento e produção de etanol na cepa deletada nos 7 principais transportadores de hexoses (KY73), transformada com o plasmídeo pJW5. Células da cepa KY73 transformadas com o plasmídeo pJW5 contendo o gene *MAL* regulador constitutivo, foram previamente inoculadas em meio mínimo contendo 2% maltose. Deste pré-inóculo foram novamente inoculadas em meio mínimo contendo 2% glicose (-●-), 2% maltose (-○-) ou 2% sacarose (-□-). Em tempos pré-determinados, foram retiradas amostras para quantificar a biomassa e o etanol produzido.

Cepa:	Fonte de Carbono:	Hidrólise ($\mu\text{mol min}^{-1} [\text{g dry weight}]^{-1}$) de:		
		Células Permeabilizadas		Células Inteiras:
		Maltose (pH 6.8)	Sacarose (pH 5.0)	Sacarose (pH 5.0)
MC996A	Maltose	1350	208	36
	Etanol-Glicerol	0	49	100
KY73	Maltose	1480	857	419
	Etanol-Glicerol	0	1260	4295

Tabela 2. Atividade da invertase e maltase nas cepas MC996A e KY73. Células da cepa MC996A e KY73, previamente crescidas em meio rico contendo 2% maltose ou 2% etanol e 3% glicerol, foram utilizadas para a determinação da atividade invertase e maltase. Foram utilizadas células inteiras e/ou permeabilizadas nos ensaios, como descrito em Material e Métodos.

DISCUSSÃO

Nossos resultados indicam que o gene *AGT1* codifica para um transportador ativo de sacarose. Cepas transformadas com este gene apresentaram uma captação significativa deste açúcar, que foi inibida por uma série de compostos que inibem o transporte ativo de açúcares em leveduras. Células que possuem esta permease são capazes de crescer em sacarose com velocidades específicas de crescimento maiores, do que o observado quando a fonte de carbono é glicose ou misturas equimolares de glicose e frutose.

No intuito de analisar a contribuição deste transportador na metabolização da sacarose foram utilizadas cepas deletadas nesta permease, e nos transportadores de glicose codificados pelos genes *HXT1-HXT7* e *GAL2*. Nossos resultados permitiram demonstrar que cepas incapazes de utilizar a glicose e frutose continuam sendo capazes de fermentar a sacarose. Nestas cepas a fermentação da sacarose depende da expressão da permease *AGT1* nas células: a fermentação e transporte de sacarose só ocorre após o crescimento em maltose, ou se a cepa possui um gene *MAL* regulador constitutivo. Por outro lado, quando o gene *AGT1* foi deletado, a fermentação da sacarose não mais foi observada na cepa incapaz de transportar a glicose e frutose, enquanto que a cepa selvagem continuou fermentando a sacarose. Finalmente, foi observada uma correlação direta entre a atividade α -glicosidase, e uma correlação inversa no caso da invertase, com o transporte e fermentação da sacarose.

Trabalhos anteriores realizados por SANTOS *et al.*, (1982) e BARFORD *et al.*, (1993) demonstram que cepas de *S. cerevisiae*, além de captarem a glicose e frutose originadas pela hidrólise da sacarose fora da célula, também seriam capazes de transportar ativamente sacarose. Nossos resultados não só confirmam a existência de um transporte ativo de sacarose em *S. cerevisiae*, como também identificamos a permease *AGT1* como a responsável por esta atividade.

O gene *AGT1* é um alelo dos genes codificadores do transportador de maltose presentes nos loci *MAL*. Por exemplo, esta permease apresenta 57% de identidade com a permease codificada pelo gene *MAL61*. Assim como a Mal61p, a permease *AGT1* é induzida pela maltose, e esta indução é mediada por um gene *MAL* regulador codificado pelos genes *MALx3* (HAN *et al.*, 1995; STAMBUK *et al.*, 1999).

Na verdade, recentemente foi demonstrado haver dois sistemas de transporte de sacarose, um sistema de transporte de alta afinidade (K_m : ~7 mM), e outro com baixa afinidade (K_m : ~100 mM), pelo substrato. O sistema de alta afinidade é mediado pela permease *AGT1*, enquanto que o sistema de baixa afinidade é mediado pela permease *MAL2T* (STAMBUK *et al.*, 2000). MWESIGYE & BARFORD (1996b) já tinham observado que o transporte de sacarose poderia também ser mediado por um transportador de maltose. Nossos resultados de transporte de sacarose confirmaram que esta atividade (mediada pelo *AGT1*) está intimamente ligada ao metabolismo da maltose.

Apesar de existir uma atividade de transporte de sacarose nas células de *S. cerevisiae*, restava verificar se esta atividade permitiria a fermentação da sacarose,

uma vez que nem todo o açúcar transportado ativamente pela célula é fermentado (MALLUTA *et al.*, 2000; ZASTROW *et al.*, 2000). Na verdade a quantidade do açúcar captado é o fator determinante para que o mesmo seja fermentado ou respirado pela célula (POSTMA *et al.*, 1989). Entretanto, nossos dados indicaram que a sacarose está sendo captada em concentrações suficientes para que possa ser eficientemente fermentada pelas células.

- Dados anteriores têm mostrado que tanto na produção de álcool, quanto na panificação, a atividade da invertase está correlacionada de maneira direta e inversa a fermentação da sacarose (ODA & OUCHI, 1990b; ECHEGARAY *et al.*, 2000). Os nossos resultados com a cepa deletada nos transportadores de hexoses também indicam que cepas que possuem alta atividade invertase não são capazes de fermentar a sacarose, a não ser que expressem a permease *AGT1*.

Finalmente, cabe salientar que o fato da cepa precisar ser *MAL* constitutiva para transportar e fermentar a sacarose não é uma característica necessariamente indesejada nas leveduras industriais. Pelo contrário, diversos trabalhos têm demonstrado que todas as boas cepas de panificação são *MAL* constitutivas (ODA & OUCHI, 1990a; HIGGINS *et al.*, 1999).

Como perspectivas futuras deste trabalho, seria interessante a obtenção de uma cepa contendo o gene *AGT1*, mas deletada na invertase extracelular. Neste caso seria esperado que a sacarose fosse captada diretamente e fermentada pelas células. Isto evitaria que a hidrólise da sacarose, produzindo glicose e frutose, trouxesse à célula um estresse osmótico prejudicial à sua performance fermentativa.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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 & Sons. NY. 1992.
- BURROWS, S. & HARRISON, J.S. Routine method for determination of the activity of baker's yeast **J. Inst. Brew.** v.65, p.30-45, 1959.
- BARFORD, J.P.; PHILLIPS, P.J. & ORLOWSKI, J.H. A new model of uptake of multiple sugars by *Saccharomyces cerevisiae*. **Bioproc. Eng.** v. 7, p. 303-307, 1992.
- BARFORD, J.P.; MWESIGYE, P.K.; PHILLIPS, P.J.; JAYASURIYA, D. & BLOM, I. Further evidence of uptake of sucrose by *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Gen. Appl. Microbiol.** v. 39, p. 389-394, 1993.
- BARFORD, J.P., JOHNSTON, J.H. & MWESIGYE, P.K. Continuous culture study of transient behavior of *Saccharomyces cerevisiae* growing on sucrose and fructose. **J. Ferment. Bioeng.** v. 79, p. 158-162, 1995.
- BARNETT, J.A. The utilization of disaccharides and some other sugars by yeasts. **Adv. Carbohidr. Chem. Biochem.** v. 39, p. 347-404, 1981.
- CARLSON, M. & BOTSTEIN, D. Two differentially regulated mRNAs with different 5' ends encode secreted and intracellular forms of yeast invertase. **Cell** v. 28, p. 145-154, 1982.
- CARVALHO, L.C.C. The prospects for ethanol production in Brazil. **Int. Sugar J.** v. 98, p. 289-294, 1996.
- DYNESEN, J.; SMITS, H.P.; OLSSON, L. & NIELSEN, J. Carbon catabolite repression of invertase during batch cultivations of *Saccharomyces cerevisiae*: the role of glucose, fructose and mannose. **Appl. Microbiol. Biotechnol** v. 50, p. 579-582, 1998.
- ECHEGARAY, O.F.; CARVALHO, J.C.M.; FERNANDES, A.N.R.; SATO, S.; AQUARONE, E. & VITOLO, M. Fed-batch culture of *Saccharomyces cerevisiae* in sugar-cane blackstrap molasses: invertase activity of intact cells in ethanol fermentation. **Biomass Bioen.** v. 19, p. 39-50, 2000.
- ESMON, P.C.; ESMON, B.E.; SCHAUER, I.E.; TAYLOR, A. & SCHEKMAN, R. Structure, assembly, and secretion of octameric invertase. **J. Biol. Chem.** v. 262, p. 4387-4394, 1986.

- GIETZ, D.R. & SUGINO, A. New yeast – *Escherichia coli* shuttle vectors constructed with in vitro mutagenized yeast genes lacking six-base pair restriction sites **Gene** v. 74, p. 527-534, 1988.
- GROSSMANN, M.K. & ZIMMERMANN, F.K. The structural genes of internal invertases in *Saccharomyces cerevisiae*. **Mol. Gen. Genet.** v. 175, p. 223-229, 1979.
- HAN, E.; COTTY, F.; SOTTAS, JIANG, H & MICHELS, A. Characterization of *AGT1* encoding a general α -glucoside transporter from *Saccharomyces cerevisiae* **Molec. Microbiol.** v. 17, p. 1093-1107, 1995.
- HIGGINS, V.J.; BRAIDWOOD, M.; BELL, P.; BISSINGER; DAWES, I.W. & ATTFIELD, P.V. Genetic evidence that high noninduced maltase and maltose permease activities, governed by *MALx3* encoded transcriptional regulators, determine efficiency of gas production by baker's yeast in unsugared dough. **Appl. Environ. Microbiol.** v.65, p. 680-685, 1999.
- HOHMANN, S. & ZIMMERMANN, F.K. Cloning and expression on a multicopy vector of five invertase genes of *Saccharomyces cerevisiae*. **Curr. Genet.** v. 11, p. 217-225, 1986.
- KAISER, C.A.; PREUSS, D.; GRISAFI, P. & BOTSTEIN, D. Many random sequences functionally replace the secretion signal of yeast invertase. **Science** v. 235, p. 312-317, 1987.
- KNOP, M.; SIEGERS, K.; PEREIRA, G.; ZACHARIAE, W. WINSOR, B.; NASMYTH, K. & SCHIEBEL, E. Epitope tagging of yeast genes using a PCR-based strategy: more tags and improved practical routines. **Yeast** v. 15, p. 963-972, 1999.
- KRUCKEBERG, A.L.; YE, L.; BERDEN, J.A. & DAM, K.V. Functional expression, quantification and cellular localization of the Hxt2 hexose transporter of *Saccharomyces cerevisiae* tagged with the green fluorescent protein. **Biochem. J.** v. 339, p. 299-307, 1999.
- LALUCE, C. Current aspects of fuel ethanol production in Brazil. **Crit. Rev. Biotechnol.** v. 11, p. 149-161, 1991.
- LONGTINE, M.S.; MCKENZIE III, A.; DEMARINI, D.J.; SHAH, N.G.; WACH, A.; BRACHAT, A.; PHILIPPSSEN, P. & PRINGLE, J.R. Additional modules for versatile and economical PCR-based gene deletion and modification in *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast** v. 14, p. 953-961, 1998.
- MACEDO, I. C. Greenhouse gases and bio-ethanol in Brazil. **Int. Sugar J.** v. 100, p. 2-8, 1998.
- MALLUTA, E.F.; DECKER, P. & STAMBUK, B.U. The Kluiver effect for trehalose in *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Basic Microbiol.** v. 40, p. 199-205, 2000.
- MANIATIS, T., FRITSCH, E.F. & SAMBROOK, J. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY. 1982.
- MWESIGYE, P.K. & BARFORD. J.P. Transport of sucrose by *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Ferment. Bioeng.** v. 77, p. 687-690, 1994.

- MWESIGYE, P.K. & BARFORD, J.P. Mechanism of sucrose utilization by *Saccharomyces cerevisiae* **J. Gen. Appl. Microbiol.** v. 42, p. 297-306, 1996a.
- MWESIGYE, P.K. & BARFORD, J.P. Batch growth and transport kinetics of utilization of mixtures of sucrose and maltose by *Saccharomyces cerevisiae* **J. Ferment. Bioeng.** v. 82, p. 101-108, 1996b.
- MYERS, D.K.; LAWLOR, D.T.M. & ATTIFIELD, P.V. Influence of invertase activity and glycerol synthesis and retention of fermentation of media with a high sugar concentration by *Saccharomyces cerevisiae*. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 63, p. 145-150, 1997.
- ODA, Y. & OUCHI, K. Role of the yeast maltose fermentation genes in CO₂ production rate from sponge dough. **Food Microbiol.** v. 7, p. 43-47, 1990a.
- ODA, Y. & OUCHI, K. Effect of invertase activity on the leavening ability of yeast in sweet dough. **Food Microbiol.** v. 7, p. 241-248, 1990b.
- OLSSON, L.; LARSEN, M. E. & RONNOW, B. Silencing *MIG1* in *Saccharomyces cerevisiae* : Effects of antisense *MIG1* expression and *MIG1* gene disruption. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 63, p. 2366-2371, 1997.
- ORLOWSKI, J.H. & BARFORD, J.P. Direct uptake of sucrose by *Saccharomyces cerevisiae* in batch and continuous culture. **J. Gen. Appl. Microbiol.** v. 37, p. 215-218, 1991.
- OZCAN, S.; VALLIER, L.G.; FLICK, J.S.; CARLSON, M. & JOHNSTON, M. Expression of the *SUC2* gene of *Saccharomyces cerevisiae* is induced by low levels of glucose. **Yeast** v. 13, p. 127-137, 1997.
- PANEK, A.D. & PANEK, A.C. Industrial utilization of yeast in Brazil In: **Yeast Technology**. Spencer, J.F.T. & Spencer, D.M. eds. p.266-275 Springer - Verlag, Berlin. Alemanha. 1990.
- PERLMAN, D. & HALVORSON, H.O. Distinct repressible mRNAs for cytoplasmic and secreted yeast invertase are encoded by a single gene. **Cell.** v. 25, p. 525-536, 1981.
- POSTMA, E.; VERDUYN, C.; SCHEFFERS, W.A. & VAN DIJKEN, J. Enzymic analysis of the Crabtree effect in glucose-limited chemostat cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 55, p. 468-477, 1989.
- REIFENBERGER, E.; FREIDEL, K. & CIRIACY, M. Identification of novel *HXT* genes in *Saccharomyces cerevisiae* reveals the impact of individual hexose transporters on glycolytic flux. **Molec. Microbiol.** v. 16, p. 157-167, 1995.
- REIFENBERGER, E.; BOLES, E. & CIRIACY, M. Kinetics characterization of individual hexose transporters of *Saccharomyces cerevisiae* and their relation to the triggering mechanisms of glucose repression. **Eur. J. Biochem.** v. 245, p. 324-333, 1997.
- ROSE, A.H. & HARRISON, J.S. *The Yeasts*, vol. 5. Academic Press, San Diego, USA. 1993.

- ROSILLO-CALLE, F. & CORTEZ, L.A.B. Towards Proalcohol II - A review of the Brazilian Bioethanol Programme. **Biomass Bioeng.** v. 14, p. 115-124, 1998.
- SANTOS, E.L.; RODRIGUEZ, L.; ELORZA, M.V. & SANTANDREU, R. Uptake of sucrose by *Saccharomyces cerevisiae*. **Arch. Biochem. Biophys.** v. 216, p. 652-660, 1982.
- SAROKIN, L. & CARLSON, M. Upstream region required for regulated expression of the glucose-repressible *SUC2* gene of *Saccharomyces cerevisiae*. **Mol. Cell. Biol.** v. 4, p. 2750-2757, 1984.
- SILVEIRA, M.C.F.; CARVAJAL, E. & BON, E.P.S. Assay for *in vivo* yeast invertase activity using NaF. **Anal. Biochem.** v. 238, p. 26-28, 1996.
- STAMBUK, B.U.; PANEK, A.D.; CROWE, J.H.; CROWE, L.M. & ARAUJO, P.S. Expression of high-affinity trehalose-H⁺ symport in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochem. Biophys. Acta** v. 1379, p. 118-128, 1998.
- STAMBUK, B.U.; SILVA, M.A.; PANEK, A.D. & ARAUJO, P.S. Active α -glycoside transport in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Lett.** v. 170, p. 105-110, 1999.
- STAMBUK, B.U.; BATISTA, A.S. & ARAUJO, P.S. Kinetics of sucrose transport in *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Biosci. Bioeng.** v.89, p. 212-214, 2000.
- TAMMI, M.; BALLOU, L.; TAYLOR, A. & BALLOU, C.E. Effect of glycosylation on yeast invertase oligomer stability. **J. Biol. Chem.** v. 262, p. 4395-4401, 1986.
- WANG, J. & NEEDLEMAN, R. Removal of a Mig1p binding site converts a *MAL63* constitutive mutant derived by interchromosomal gene conversion to glucose insensitivity. **Genetics** v. 142, p. 51-63, 1995.
- WHEALS, A.E.; BASSO, L.C.; ALVES, D.M.G. & AMORIM, H.V. Fuel ethanol after 25 years. **Focus** v. 17, p. 482-487, 1999.
- WILLIAMS, R.S.; TRUMBLY, R.J.; MACCOLL, R.; TRIMBLE, R.B. & MALEY F. Comparative properties of amplified external and internal invertase from the yeast *SUC2* gene. **J. Biol. Chem.** v. 260, p. 13334-13341, 1985.
- ZANIN, G.M.; SANTANA, C.C.; BON, E.P.S., GIORDANO, R.C.L.; MORAES, F.F.; ANDRIETTA, S.R.; NETO, C.C.C.; MACEDO, I.C.; FO, D.L.; RAMOS, L.P. & FONTANA, J.D. Brazilian Bioethanol Program. **Appl. Biochem. and Biotechnol.** v. 84-86, p. 1147-1161, 2000.
- ZASTROW, C.R.; MATTOS, M.A.; HOLLATZ, C. & STAMBUK, B.U. Maltotriose metabolism by *Saccharomyces cerevisiae* **Biotechnol. Lett.** v. 22, p. 455-450, 2000.
- ZĚCH, M. & GÖRICH, H. Invertase from *Saccharomyces cerevisiae*: reversible inactivation by components of industrial molasses media. **Enz. Microb. Technol.** v. 17, p. 41-46, 1995.

ANEXO

Artigo: “Kinetics of active sucrose transport in *Saccharomyces cerevisiae*.”

(Publicado na revista Journal of Bioscience and Bioengineering, em 2000).

Kinetics of Active Sucrose Transport in *Saccharomyces cerevisiae*

BORIS U. STAMBUK,^{1*} ANDERSON S. BATISTA,¹ AND PEDRO S. DE ARAUJO²

Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC 88040-900¹ and Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP,² Brazil

Received 19 August 1999/Accepted 8 December 1999

The kinetic analysis of active sucrose-H⁺ uptake by *Saccharomyces cerevisiae* revealed the presence of two transport systems with high and low affinity for sucrose. The *MAL2T* permease has a low affinity ($K_m = 120 \pm 20$ mM) for sucrose, while the α -glucoside transporter encoded by the *AGT1* gene is a high affinity sucrose-H⁺ symporter ($K_m = 7.9 \pm 0.8$ mM) that increases the specific growth rate of cells growing on sucrose.

[Key words: sucrose permease, symport, kinetics, *Saccharomyces*]

Sucrose is probably the most important sugar in the industrial utilization of yeast. Sucrose-containing molasses are the major raw material used for the production of baker's yeast, for the production of distilled alcoholic beverages and fuel ethanol by the fermentation industries. It is generally accepted that the first step in the utilization of sucrose by *Saccharomyces cerevisiae* is its complete hydrolysis, by the extracellular enzyme invertase, in glucose and fructose which are then transported into the cells and metabolized (1). However, conflicting evidence has been reported in the literature. For example, in an early report Friss and Ottolenghi (2) showed that protoplasts, lacking extracellular invertase activity, fermented sucrose. Other sucrose non-fermenting strains were also reported to intracellularly accumulate the ¹⁴C-labeled disaccharide (3). The analysis of direct sucrose uptake in several Suc⁺ and Suc⁻ strains revealed the presence of an active sucrose-H⁺ symport activity in *S. cerevisiae* (4). Although this transport activity would justify the existence of a constitutive intracellular invertase, which arises from a shorter transcript of the same gene (e.g. *SUC2*) that encodes the secreted invertase (5), studies dealing with the characterization and physiological significance of this interesting transport activity were delayed for many years.

Recently, Barford and co-workers have made significant contributions to this subject. These authors demonstrated that the observed fermentation and growth rates on sucrose (6, 7) can only fit a model in which its utilization is composed by the contributions from both the direct uptake of sucrose and the uptake of its hydrolysis products into the cell (8). They also characterized a sucrose transport activity in yeast cells using ¹⁴C-labeled sucrose (9) and revealed the importance of adaptation on sucrose medium for the expression of this transporter. The involvement of other sugars in the regulation of expression, like glucose, fructose or maltose, was also reported (10–12). However, the main problem concerning the characterization of the sucrose transport activity is that, to the present, there are no indications of how many permeases are involved with the sucrose transport activity, neither the identity of the transporter(s) have been elucidated at the molecular level. This situation may be explained at least in part, by the complex kinetics obtained for ¹⁴C-sucrose uptake, as revealed by

Eadie-Hofstee plots (4, 9), with unusual characteristics not shared by any sugar transport activity present in yeast cells.

In *S. cerevisiae* two* different sugar transport mechanisms were already described: carrier mediated facilitated diffusion, responsible for the uptake of hexoses, and active H⁺-symporters responsible for the uptake of α -glucosides (13). It is well established that sugar transport rates in yeast cells yield non-linear kinetic plots, indicating the existence of (at least) two kinetically distinct transport systems, one with high ($K_m = 10^{-2}$ – 10^{-3} M) and other with low ($K_m = 10^{-1}$ – 10^{-2} M) affinity for the substrate. In the case of hexoses both the genetic and kinetic evidence support this view, with at least 7 different permeases (*HXT1*–*7*) involved in the uptake of hexoses (14). Indeed, it was recently shown (15) that a yeast strain lacking all these *HXT* permeases, and thus unable to transport and ferment glucose or fructose, is still able to ferment sucrose. The rate of sucrose fermentation obtained with this strain indicates that sucrose transport across the plasma membrane contributes to the utilization of this sugar to a larger extent than expected before (15).

For α -glucosides two different permeases were characterized at the molecular level: a maltose-H⁺ symporter encoded by *MALxT* (where *x* represents one of the 5 unlinked *MAL* loci), and a general α -glucoside-H⁺ symporter encoded by *AGT1* (16, 17). We have recently shown (18) that the *AGT1* permease is responsible for the active uptake of a series of α -glucosides, including sucrose. This result prompted us to perform a more detailed kinetic analysis of the sucrose-H⁺ symport activity in *S. cerevisiae*.

Three *S. cerevisiae* strains were used and have been described elsewhere (18–20): strain S-14 (wt.), strain MAL1-1^c (*MAT α MAL1R-1^c agt1 mal1S mal2R MAL2T MAL2S trp1 lys ura3-52*) containing the *MAL2T* maltose permease on chromosome III, and strain AP77-4C (*MAT α MAL1R-1^c agt1 mal1S mal2R [mal2T mal2S]::TRP1 leu2-3, 112*) which lacked known α -glucoside transporter genes. This last strain was transformed with a multicopy plasmid containing the *AGT1* gene (18) yielding strain AP77-4C-YEpAGT1. All strains are *MAL* constitutive, a condition required for expression of the maltose and α -glucoside symporters. Since glucose represses the expression of these permeases, glucose derepressed cells were used for the sucrose-H⁺ symport

* Corresponding author.

determinations (13, 19). Glucose derepressed cells refer to cells grown to the second aerobic phase of growth after glucose was exhausted from the medium. Glucose in the growth medium was assayed with a commercial enzymatic kit.

Strain S-14 was grown in YPD medium [1% yeast extract, 2% peptone (Difco), 2% glucose; pH 5.0], and strains with defined permeases were grown in minimal medium [0.67% yeast nitrogen base without amino acids (Difco) containing 30 $\mu\text{g ml}^{-1}$ uracil, L-tryptophan, L-lysine-HCl, or L-leucine as required; pH 5.0] with 2% glucose, 2% sucrose or 1% glucose plus 1% fructose as the carbon source. Yeast cells were grown at 28°C on a rotary shaker at 160 rpm, and growth was followed by turbidity measurements at 570 nm. The amount of yeast is expressed as dry weight and was determined with cells filtered, washed with distilled water, and dried at 80°C for 48 h. Harvested cells were washed twice with cold distilled water before use.

Proton cotransport during sucrose uptake was assayed as previously described (18–20). Yeast cells were suspended to a cellular density of 15–20 mg ml^{-1} in water, placed in a conical water-jacketed vessel in a total volume of 2 ml, and the suspension was mixed with a magnetic stirrer at 30°C. The pH was adjusted to pH 5.0 with HCl, and changes of pH triggered by the addition of sucrose were monitored with a PHM84 research pH-meter attached to a TT1 Servograph (Radiometer, Copenhagen). To calculate the rate of H^+ uptake, a calibration curve was obtained by the addition of 100 to 200 nmol of HCl to the cell suspension. Initial rates of sucrose-induced proton uptake were calculated from the slope of the first 5–10 s curve obtained in the recorder after sucrose addition, subtracting the basal rate of proton uptake observed before addition of the sugar. All assays were done at least in duplicate, and the maximum deviation was less than 10%.

In previous reports (4, 9) the sucrose transport activity were kinetically analyzed using ^{14}C -labeled sucrose. The results obtained, when plotted by the Eadie-Hofstee transformation (V versus $V/[S]$), did not show the normal biphasic curves obtained with all the sugar transport activities described in yeast cells. These results were probably consequence of the complex transport assays used. The rates of ^{14}C -sucrose uptake were assayed in the presence of 2 mM each of unlabelled glucose and fructose in order to dilute any radioactive glucose and fructose that could have arisen from sucrose hydrolysis. Under the conditions required for the kinetic studies (increasing ^{14}C -sucrose concentrations) the amount of labeled glucose and fructose produced with high sucrose concentrations can be significant, and thus a considerable amount of radioactivity could be entering the cell through the hexose transporters. Another problem also observed with radioactive substrates are the effects of nonspecific binding of the sugar to the cell wall and/or plasma membrane (21), or even the subsequent metabolism of the sugar that may release significant amounts of $^{14}\text{CO}_2$ into the medium.

However, in the case of H^+ -symport activities it is possible to use the proton uptake rate as a measure of the corresponding sugar transport activity due to the 1:1 stoichiometry of H^+ cotransported per sugar molecule taken up by the cell (4, 19–21). Figure 1 shows that the addition of increasing quantities of sucrose to the cell suspension increased the proton uptake rate, indicating a

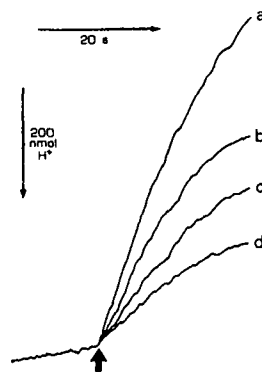


FIG. 1. Dose dependence of sucrose- H^+ cotransport in *S. cerevisiae* wild type strain S-14. Approximately 38 mg yeast cells were used to record pH changes associated with sucrose uptake. At the point indicated by the arrow 100 (a), 20 (b), 10 (c), or 5 (d) μmol sucrose were added. Time and amount of protons scales are indicated by the length of the arrows.

dose dependence between sucrose and H^+ symport. This result allows the kinetic analysis of the H^+ -sucrose symport activity by measuring the rates of H^+ uptake at different amounts of sucrose added to the cells. Determinations of the H^+ -sucrose symport were performed at sugar concentrations in the range 0.5–150 mM, and the results obtained were plotted according to the Eadie-Hofstee transformation. As shown in Fig. 2, in wild-type cells biphasic kinetics for H^+ -sucrose cotransport were observed, indicating the presence of two kinetically distinct transport systems. One displayed a high affinity ($K_m=7$ mM) while the other a low affinity ($K_m=100$ mM) for sucrose. Although the low affinity component has not been described before, the K_m of the high-affinity transport system is close to the K_m (approximately 6.5 mM) previously described for sucrose uptake in *S. cerevisiae* (4, 9, 11).

In order to characterize which permeases contribute to the above-described sucrose- H^+ symport activities, we analyzed the kinetics of active sucrose uptake in yeast strains with defined α -glucoside permeases (Fig. 2). The results obtained with strains harboring either the *AGT1* or the *MAL2T* permease pointed to the presence of a single active sucrose transport component in these cells. From the data shown in Fig. 2 it is evident that the *AGT1* gene encodes for a high affinity sucrose- H^+ symport activity ($K_m=7.9\pm 0.8$ mM), while the maltose permease encoded by the *MAL2T* gene contributes to a low affinity transport activity with a K_m of 120 ± 20 mM for sucrose.

Mwesigye and Barford (11) reported fermentation and radiometric analysis that showed that sucrose could be transported by a maltose-induced transporter. It was also suggested that sucrose and maltose molecules could be transported by the same transport system. The results presented in this paper and previous biochemical and genetical analysis of the *AGT1* permease confirm these findings: the *AGT1* permease actively transports maltose, sucrose and several other α -glucosides, and its expression is induced by maltose through *MAL* regulatory genes (17–19). Although the maltose permease encoded by the highly homologous *MALxT* genes was described as a permease specific for maltose and turanose (17), the data shown in Fig. 2 indicate that this permease can also transport sucrose, albeit with a lower affinity when com-

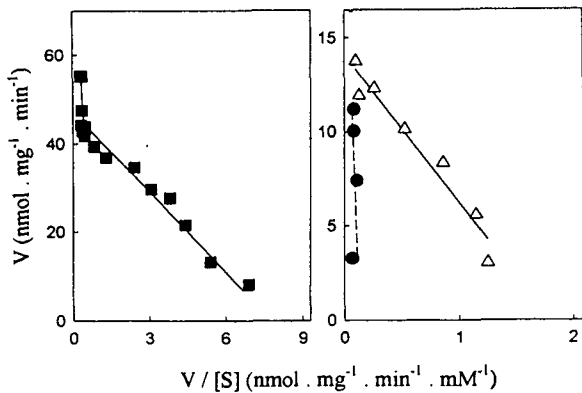


FIG. 2. Eadie-Hofstee plots of active sucrose- H^+ symport activity present in a wild-type strain, and in strains with defined permeases. Symbols: ■, strain S-14; ●, strain MAL1-1 c harboring the *MAL2T* maltose permease; △, strain AP77-4C-YEpAGT1 harboring the *AGT1* permease.

pared with the *AGT1* permease.

It was reported that the specific growth rate of yeast cells growing on sucrose is higher than the growth rates obtained with cells grown on equimolar amounts of glucose, fructose, or glucose plus fructose (6–11). To verify the contribution of the high affinity sucrose- H^+ symporter to the growth rate on sucrose we determined the growth rates on minimal medium of yeast cells lacking a sucrose- H^+ symporter (strain AP77-4C), or the same cells harboring the *AGT1* permease (strain AP77-4C-YEpAGT1). The strain harboring the *AGT1* permease grew on 2% sucrose with a specific growth rate ($\mu = 0.27 \pm 0.02 \text{ h}^{-1}$) significantly higher than the ones obtained when this strain was grown on 2% glucose, or 1% glucose plus 1% fructose ($\mu = 0.21 \pm 0.01 \text{ h}^{-1}$). However, same specific growth rates ($\mu = 0.20 \pm 0.02 \text{ h}^{-1}$) were obtained when strain AP77-4C was grown on 2% glucose, 1% glucose plus 1% fructose, or 2% sucrose. Therefore, our results indicate that active sucrose uptake mediated by the *AGT1* permease is responsible for the increase in the specific growth rate obtained when yeast cells are growing on sucrose.

Although sucrose- H^+ symport activities was described in other yeasts (22–24), yeast sucrose permeases were not extensively studied as the plant cells active sucrose- H^+ symporters. For example, a recent report (25) identified an amino acid residue in the structure of the sucrose- H^+ symporter from *Arabidopsis thaliana* that, when mutated, increases the transport activity. Due to the importance that sucrose utilization has for the production of yeast cells, production of distilled beverages or even fuel ethanol, the genetical manipulation of yeast strains containing the high affinity sucrose- H^+ symporter encoded by the *AGT1* gene would be of major interest.

This work was supported by grants from FAPESP 96/1406-7, FUNPESQUISA-UFSC and CNPq (523429/95 and 420024/98). We are very grateful to Dr. Anita D. Panek and Dr. Corinne A. Michels for providing yeast strains and the *AGT1* gene, respectively.

REFERENCES

- Barnett, J. A.: The utilization of disaccharides and some other sugars by yeasts. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, 39, 347–404 (1981).
- Friss, J. and Ottolenghi, P.: Localization of invertase in a

- strain of yeast. *Comptes Rendus Trav. Lab. Carlsberg*, 31, 259–271 (1959).
- Avigad, G.: Accumulation of trehalose and sucrose in relation to the metabolism of α -glucosides in yeasts of defined genotype. *Biochim. Biophys. Acta*, 40, 124–134 (1960).
- Santos, E., Rodriguez, L., Elorza, M. V., and Sentandreu, R.: Uptake of sucrose by *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch. Biochem. Biophys.*, 216, 652–660 (1982).
- Perlman, D. and Halvorson, H. O.: Distinct repressible mRNAs for cytoplasmic and secreted yeast invertase are encoded by a single gene. *Cell*, 25, 525–536 (1981).
- Orlowski, J. H. and Barford, J. P.: Direct uptake of sucrose by *Saccharomyces cerevisiae* in batch and continuous culture. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 37, 215–218 (1991).
- Barford, J. P., Phillips, P. J., and Orlowski, J. H.: A new model of uptake of multiple sugars by *S. cerevisiae*. *II. Bioprocess Eng.*, 7, 303–307 (1992).
- Barford, J. P., Mwesigye, P. K., Phillips, P. J., Jayasuriya, D., and Blom, I.: Further evidence of direct uptake of sucrose by *Saccharomyces cerevisiae* in batch culture. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 39, 389–394 (1993).
- Mwesigye, P. K. and Barford, J. P.: Transport of sucrose by *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Ferment. Bioeng.*, 77, 687–690 (1994).
- Barford, J. P., Johnston, J. H., and Mwesigye, P. K.: Continuous culture study of transient behavior of *Saccharomyces cerevisiae* growing on sucrose and fructose. *J. Ferment. Bioeng.*, 79, 158–162 (1995).
- Mwesigye, P. K. and Barford, J. P.: Batch growth and transport kinetics of utilization of mixtures of sucrose and maltose by *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Ferment. Bioeng.*, 82, 101–108 (1996).
- Mwesigye, P. K. and Barford, J. P.: Mechanism of sucrose utilization by *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 42, 209–306 (1996).
- Lagunas, R.: Sugar transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Rev.*, 104, 229–242 (1993).
- Reifenberger, E., Boles, E., and Ciriacy, M.: Kinetic characterization of individual hexose transporters of *Saccharomyces cerevisiae* and their relation to the triggering mechanisms of glucose repression. *Eur. J. Biochem.*, 245, 324–333 (1997).
- Klaassen, P. and Raamsdonk, L.: Contribution of the individual *HXT* gene products to CO_2 production. *Folia Microbiol.*, 43, 197–200 (1998).
- Cheng, Q. and Michels, C. A.: *MAL11* and *MAL61* encode the inducible high-affinity maltose transporters of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.*, 173, 1817–1820 (1991).
- Han, E.-K., Cotty, F., Sottas, C., Jiang, H., and Michels, C. A.: Characterization of *AGT1* encoding a general α -glucoside transporter from *Saccharomyces*. *Mol. Microbiol.*, 17, 1093–1107 (1995).
- Stambuk, B. U., da Silva, M. A., Panek, A. D., and de Araujo, P. S.: Active α -glucoside transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 170, 105–110 (1999).
- Stambuk, B. U., Panek, A. D., Crowe, J. H., Crowe, L. M., and de Araujo, P. S.: Expression of high-affinity trehalose- H^+ symporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta*, 1379, 118–128 (1998).
- Stambuk, B. U., de Araujo, P. S., Panek, A. D., and Serrano, R.: Kinetics and energetics of trehalose transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.*, 237, 876–881 (1996).
- Benito, B. and Lagunas, R.: The low-affinity component of *Saccharomyces cerevisiae* maltose transport is an artifact. *J. Bacteriol.*, 174, 3065–3069 (1992).
- Williamson, P. R., Huber, M. A., and Bennett, J. E.: Role of maltase in the utilization of sucrose by *Candida albicans*. *Biochem. J.*, 291, 765–771 (1993).
- Kaliterna, J., Weusthuis, R. A., Castrillo, J. I., van Dijken, J. P., and Pronk, J. T.: Coordination of sucrose uptake and respiration in the yeast *Debaryomyces hansenii*. *Microbiology*, 141, 1567–1574 (1995).
- Kilian, S. G., Van Deemter, A., Koch, J. L. F., and Du Preez, J. C.: Occurrence and taxonomic aspects of proton movements coupled to sugar transport in the yeast genus *Kluyveromyces*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 59, 199–206 (1991).
- Lu, J. M.-Y. and Bush, D. R.: His-65 in the proton-sucrose symporter is an essential amino acid whose modification with site-directed mutagenesis increases transport activity. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 95, 9025–9030 (1998).