

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS - CÂMPUS DE ARARAQUARA
PROGRAMA DE BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA APLICADAS À FARMÁCIA

Natália Manuela Strohmayr Lourencetti

Estudo Genômico e Transcritômico de Isolados Seleccionados de Alto
Rendimento de Dorna de Fermentação Alcoólica de *Saccharomyces cerevisiae*

Araraquara

2014

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS - CÂMPUS DE ARARAQUARA
PROGRAMA DE BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA APLICADAS À FARMÁCIA

Natália Manuela Strohmayr Lourencetti

Estudo Genômico e Transcritômico de Isolados Seleccionados de Alto
Rendimento de Dorna de Fermentação Alcoólica de *Saccharomyces cerevisiae*

Dissertação apresentada ao programa de
Pós-graduação em Biociências e
Biotecnologia Aplicadas a Farmácia da
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de
Araraquara – UNESP como pré-requisito
para obtenção do título de Mestre.

ORIENTADORA: Profa. Dra. Ana Marisa Fusco de Almeida

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. Cleslei Fernando Zanelli

Araraquara

2014

Ficha Catalográfica

Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

L892s

Lourencetti, Natália Manuela Strohmayer

Estudo Genômico e Transcritômico de Isolados Seleccionados de Alto Rendimento de Dorna de Fermentação Alcoólica de *Saccharomyces cerevisiae* / Natália Manuela Strohmayer Lourencetti .
— Araraquara, 2014

147 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho".
Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Biociências e
Biotecnologia aplicada à Farmácia

Orientador: Ana Marisa Fusco Almeida

Coorientador: Cleslei Fernando Zanelli

1. Fermentação. 2. *Saccharomyces cerevisiae*. 3. Transcritoma. 4. Micologia. I. Almeida,
Ana Maria Fusco, orient. II. Zanelli, Cleslei Fernando, coorient. Título.

CAPES: 40300005

*Posso tudo posso Naquele que me fortalece
Nada e ninguém no mundo vai me fazer desistir
Quero tudo quero, sem medo entregar meus projetos
Deixar-me guiar nos caminhos que Deus desejou pra mim e ali estar
Vou perseguir tudo aquilo que Deus já escolheu pra mim
Vou persistir, e mesmo nas marcas daquela dor
Do que ficou, vou me lembrar
E realizar o sonho mais lindo que Deus sonhou
Em meu lugar estar na espera de um novo que vai chegar
Vou persistir, continuar a esperar e crer
E mesmo quando a visão se turva e o coração só chora
Mas na alma, há certeza da vitória!!!*

Pe. Fábio de Mello

“A mulher mais guerreira, mais bonita e mais amável desse mundo, minha MÃE... Que há muitos anos não esta mais entre nós e não pode ver nosso crescimento e o legado que por tão pouco tempo deixou guardado em nossos corações e em nossa mente, nos ensinando principalmente o que é respeito, dignidade, educação, humildade e sabedoria. Sei que de onde a senhora estiver, estará vendo mais esta etapa cumprida na minha vida, assim como a realização de um sonho, sei também que estará comigo sempre e que não importa as situações e dificuldades sua garra sempre estará comigo. Este trabalho e esse sonho são pra senhora, por nunca me deixar desistir mesmo de longe e sempre acreditar que podemos ser melhores. Com muito orgulho dedico este trabalho a minha MÃE (Emília in memoriam)

Te amo muito!”

Agradeço...

A Deus, obrigada Pai por mais esta etapa e mais uma realização de um sonho realizado em minha vida, primeiramente agradeço ao Senhor por tudo, por todas as vezes que orei baixinho pedindo a força e paciência, pelos agradecimentos a cada graça recebida e por não desistir e estar comigo sempre. Que seu Espírito Santo esteja comigo sempre, e que as pedras no caminho, sejam obstáculos de aprendizado e vitória. Guia-me e guardai-me sempre.

“Você diz: “Isso é impossível”, Deus diz: “Tudo é possível” (Lucas 18:27); Você diz: “Não vou conseguir” Deus diz: “Eu suprirei todas as suas necessidades” (Filipenses 4:19); Você diz: “Estou com medo”, Deus diz: “Eu não te dei um espírito de medo” (II. Timóteo 1:7); Você diz: “Eu não posso fazer”, Deus diz: “Você pode fazer tudo” (Filipenses 4:13); Você diz: “Não tenho condições”, Deus diz: “Minha graça é suficiente” (II. Corintos 12:9); Você diz: “Não vale a pena”, Deus diz: “Tudo vale a pena” (Romanos 8:28)”

A minha família, que sem ela hoje não seria nada, a base da minha vida, minha alegria, minha paz. A meu avô o homem mais guerreiro que conheci que é muito mais que um avô é um pai, um super-herói, sempre me mostrando o melhor caminho e o que ser digno, pessoa de muitos valores que com certeza neste trabalho tem um pedacinho de cada um deles, que me ele me ensina todos os dias, com seu jeito único. A minha tia que é mais que uma tia, uma mãe, sem ela não seria capaz de ter tanta força pra passar pelos obstáculos, uma companheira, uma amiga que me escuta reclamar, chorar, gritar a frente dos obstáculos, e rir e comemorar comigo a cada etapa cumprida neste trabalho, sempre me mostrando o lado bom de cada situação e me acalmando. A minha irmã, que por mais longe que esteja este presente em cada pedaço desse trabalho, porque sempre esteja comigo, me ajudando, dando forças e me ensinando muitas coisas mesmo com sua pouca idade. Amo muito vocês, obrigada por tudo que fazem por mim, na minha vida e na minha história.

A minha segunda família meu namorado Hugo, D. Tais, Henrique, S. Iguatemy, meu cunhado Ederson, Salete, Sofia, Helena (Fangoo) e Telmo que sempre estavam com um sorriso no rosto, quando aparecia triste com as dificuldades, sempre me escutando e me mostrando que tudo é uma fase e faz parte as dificuldades, mas que a vitória sempre vem e que eu era capaz. Nunca deixaram de acreditar em mim, sempre me colocando alegria e sorriso no rosto. Companheiros fiéis, família que Deus deu a mim de presente, obrigada por fazerem parte da minha vida e ajudarem a concretizar cada etapa desse trabalho.

“Casa e uma construção de cimento e tijolos, Lar e uma construção de valores e princípios e a maneira mais linda que Deus usa para te fazer feliz e dando-lhe uma Família!”

As minhas amigas mais fieis Mariana Bellotti e Tati Benaducci que sempre que precisei estavam presente para me ajudar sempre, mesmo que com um simples abraço, uma palavra de força, uma verdade. Com quem dividi as dificuldades e as alegrias. Amigas que levo para sempre comigo e que tenho certeza que estarão comigo seja o caminho que for seguir me dando forças e comemorando sempre comigo.

A minha orientadora, Ana Marisa profissional competente e pessoa amiga, que a convivência me ensinou a admirar e respeitar. Agradeço pelo constante estímulo e confiança, por oferecer as melhores condições para o desenvolvimento deste trabalho e pela amizade constituída no decorrer destes anos. Muito obrigada!

À professora Maria José, por acreditar em meu potencial e permitir que eu fizesse parte do seu grupo de pesquisa e por ser um exemplo de profissional, além de ser humano excepcional.

À família Micologia – Proteômica que por mais difícil que o dia estivesse, tinha sempre alguém para te tirar um sorriso, dar uma força e compartilhar os obstáculos. Grandes amigos que conquistei durante a minha caminhada: Rosângela, Rosemira, Fer Gullo, Dani, Jana, Nayla, Cláudia, Laranja, Luana, Fer Sangalli, Lili, Haroldo, Panta, , Carol T., Súelen, Carol MG, Fer Campos, Junya, Jaqueline, Aline, Kayla, , Regina, Mônica, Paulo, Thaís Bernardi, Warley, Vanessa, Maysa, Tomate, Valter, Sr. Torres e Julhiany. Saibam que cada um de vocês me ensinou uma coisa boa, e com certeza não só no meu trabalho, mas na vida vocês será sempre um pedacinho do meu amadurecimento. Contem comigo sempre e que venham muitas risadas e alegrias com vocês.

“Abençoados os que possuem amigo, os que têm sem pedir, porque amigo não se pedi, não se compra, não se vende, amigo a gente ganha!” – Machado de Assis

À professora Edwil e ao professor Cleslei que estiveram sempre dispostos a ajudar e colaborar para a conclusão deste trabalho.

A Capes pelo apoio financiamento.

À todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente para realização deste trabalho. Acredito que ninguém consegue nada sozinho e que sempre existem em nossas vidas pessoas especiais e passantes que não menos importantes, nos ajudam a trilhar nossos caminhos. E cabe a nós agradecermos e quando possível e necessário ajudar, assim como fomos ajudados.

Muito obrigada!!!

“O único Sucesso que vale a pena, é aquele que nos dá o direito de no final do dia deitar a cabeça no travesseiro e você dormir feliz, sabendo que você foi o ser humano que você poderia ter sido” Pe. Fábio de Mello

LISTA DE ABREVIATURAS

%: Porcentagem

‘: Linha

°Brix: Escala Numérica de Índice de Refração Indicativa de Quantidade de Compostos Solúveis em Solução de Sacarose

°C: Graus Celsius

µL: Nomenclatura de Microlitro

A: Nucleotídeo de Adenina

A260/A280: Valor do Comprimento de Onda para Quantificações de DNA e RNA

ABr-e: Valor de Absorbância do Tubo Branco do Ensaio de Teor Alcoólico

ADH: Enzima Álcool Desidrogenase de *Saccharomyces cerevisiae*

AP: Valor de Absorbância do Tubo Padrão

AR: Valor de Absorbância do Tubo de Amostras do Ensaio de Teor Alcoólico

ART: Nomenclatura de Açúcar Redutor Total

c: Nomenclatura da Concentração do Padrão na Cubeta

C: Nomenclatura de Concentração do Etanol em g/L

CAT: Linhagem de Levedura Isolada da Usina Catanduva

cDNA: DNA Complementar

céls/mL: Células por Mililitro

DEPEC: Dietil Pirocarbonato

dil: Nomenclatura da Diluição da Amostra

DNA: Ácido Desoxirribonucléico

DNA-seq: Sequenciamento de DNA

DNS: Solução Oxidante de Ácido Denitro-Salicílico

dNTP: Desoxirribonucleotídeo Fosfatado

dNTPs: Desoxirribonucleotídeos Fosfatados

dsRNAs: RNAs de Fita Dupla ou “ *double-stranded* RNA”

g: Nomenclatura de Gramas

L: Nomenclatura de Litro

Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos

M: Nomenclatura de Molar

Mb: Megabyte

MIX: Combinação de Linhagens de levedura *Saccharomyces cerevisiae*

mL: Nomenclatura de Mililitro

mtDNA: DNA Mitocondrial

NAD⁺: Dinucleotídeo de Nicotinamida e Adenina

NADH: Forma Reduzida de Dinucleotídeo de Nicotinamida e Adenina

NCBI: National Center for Biotechnology Information

ng/μL: Nanogramas por Microlitro

P: Nomenclatura do Tubo de Amostras do Ensaio de Teor Alcoólico

PBS: Tampão Salina Fosfato

PCI: Solução composta por Fenol/Clorofórmio/ Álcool Isoamílico

PCR: Reação de Cadeia de Polimerase ou “*Polimerase Chain Reaction*”

PE-2: Linhagem de Levedura Isolada da Usina da Pedra

pH: Grandeza Físico Química de Potencial Hidrogênico, Indicador de Condição Ácida ou Básica

PM: Nomenclatura de Peso Molecular

pmol:

ProÁlcool: Programa Nacional do Álcool

R: Nomenclatura do Tubo da Solução Padrão do Ensaio de Teor Alcoólico

RNA: Ácido Ribonucléico

RNA-seq: Sequenciamento de RNA

rpm: Rotação por Minuto

SA-I: Linhagem de Levedura Isolada da Usina Santa Adélia

SGD: Saccharomyces Genome Database

SSPO: Meio de Cultura Suplementado

T: Nucleotídeo de Timina

TE: Solução de 2-amino-2-hidroximetil propano- EDTA

U: Nomenclatura de Unidade

v/v: Volume sobre Volume

V: Nomenclatura do Volume da Reação

x: Multiplicação

YEPD: Meio de Cultura

ZFC4 + CAT: Combinação de Linhagens de levedura *Saccharomyces cerevisiae*

ZFC4 + PE-2: Combinação de Linhagens de levedura *Saccharomyces cerevisiae*

ZFC4 + SA-I: Combinação de Linhagens de levedura *Saccharomyces cerevisiae*

ZFC4 + ZFD4: Combinação de Linhagens de levedura *Saccharomyces cerevisiae*

ZFC4: Linhagem de Levedura Isolada de Usina de Araraquara

ZFD4 + CAT: Combinação de Linhagens de levedura *Saccharomyces cerevisiae*

ZFD4 + PE-2: Combinação de Linhagens de levedura *Saccharomyces cerevisiae*

ZFD4 + SA-I: Combinação de Linhagens de levedura *Saccharomyces cerevisiae*

ZFD4: Linhagem de Levedura Isolada de Usina de Araraquara

ZMWs: Guias de Ondas- Modo Zero ou “zero –mode waveguides”

LISTA DE FIGURAS

- Figura 01:** Figuras representativas do crescimento celular de todos os controles e combinações, em meio YEPD sólido, 30°C por 48 horas.....**39**
- Figura 02:** Figuras representativas do crescimento celular de todos os controles e combinações, em meio YEPD sólido acrescido de 20% de glicose, 30°C por 48 horas.....**40**
- Figura 03:** Figuras representativas do crescimento celular de todos os controles e combinações, em meio YEPD sólido acrescido de 20% de sacarose, 30°C por 48 horas.....**40**
- Figura 04:** Figura representativa de todos os crescimentos de controles (ZFC4; ZFD4; PE-2; CAT e SA-I) e dos sinergismos (ZFC4 + ZFD4; ZFC4 + PE-2; ZFC4 + CAT; ZFC4 + SA-I; ZFD4 + PE-2; ZFD4 + CAT; ZFD4 + SA-I e MIX) em meio YEPD sólido, nas condições de temperaturas de 25°C, 38°C, 40°C, 42°C e 44°C.....**41**
- Figura 05:** Figura representativa de todos os crescimentos de controles (ZFC4; ZFD4; PE-2; CAT e SA-I) e combinações (ZFC4 + ZFD4; ZFC4 + PE-2; ZFC4 + CAT; ZFC4 + SA-I; ZFD4 + PE-2; ZFD4 + CAT; ZFD4 + SA-I e MIX) em meio YEPD sólido contendo 10% de etanol, nas condições de temperaturas de 25°C, 38°C, 40°C, 42°C e 44°C.....**42**
- Figura 06:** Figura representativa de todos os crescimentos de controles (ZFC4; ZFD4; PE-2; CAT e SA-I) e combinações (ZFC4 + ZFD4; ZFC4 + PE-2; ZFC4 + CAT; ZFC4 + SA-I; ZFD4 + PE-2; ZFD4 + CAT; ZFD4 + SA-I e MIX) em meio YEPD sólido contendo 12% de etanol, nas condições de temperaturas de 25°C, 38°C, 40°C, 42°C e 44°C.....**43**
- Figura 07:** Fotos representativas da viabilidade celular e resistência dos controles e combinações em meio YEPD líquido, acrescido de 12% de etanol, 44°C, 24 horas marcadas com Calcoflúor, obtidas no aparelho *In Cell Analyser 2000* (GE®) em objetiva de 20x.....**48**

Figura 08: Figura do gel de agarose, com corrida de verificação de bandas de DNA para os isolados ZFC4 e ZFD4.....**50**

Figura 09: Gel de eletroforese, identificando a integridade das amostras ZFC4 e ZFD4.....**51**

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 01: Gráfico representativo da capacidade fermentativa dos isolados selecionados ZFC4 e ZFD4 e padrões PE-2, CAT e SA-I, em processo de fermentação, em biorreator de fermentação sobre condição de 08 horas, com estatística segundo ANOVA, com pós-teste Bonferroni, $p < 0,05$	45
Gráfico 02: Gráfico representativo da capacidade fermentativa das combinações dos isolados selecionados ZFC4 e ZFD4 e controles PE-2, CAT e SA-I, em processo de fermentação, em biorreator de fermentação sobre condição de 08 horas, com estatística ANOVA, pós-teste Bonferroni, $p < 0,05$	45
Gráfico 03: Gráfico representativo da curva de biomassa padrão, com valores de absorbância e valor R.....	47
Gráfico 04: Gráfico representativo da integridade da amostra ZFC4 pelo <i>Bioanalyzer</i> por meio dos picos das concentrações de RNAs, para formação de bibliotecas.....	51
Gráfico 05: Gráfico representativo da integridade da amostra ZFD4 pelo <i>Bioanalyzer</i> por meio dos picos das concentrações de RNAs para formação de bibliotecas.....	52
Gráfico 06: Representação das expressões gênicas dos isolados selecionados ZFC4 e ZFD4, concomitante com seu gene alvo, relacionados com fermentação alcoólica.....	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 01. Representação dos resultados obtidos através dos ensaios de tolerância, capacidade de crescimento e rendimento de etanol, utilizados para as linhagens isoladas e para as combinações de linhagens.....	46
---	-----------

RESUMO

Atualmente o Brasil possui uma estimativa de produção de bioetanol com a safra de 2013/14 de 27,17 bilhões de litros. Esta produção é derivada de um processo de fermentação das usinas sucroalcooleiras brasileiras e caracteriza-se atualmente como um processo semi-contínuo. A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é a mais abrangente nos processos de fermentação, por ser adaptável aos diferentes ambientes, possuindo uma rica diversidade de perfis fenotípicos e genotípicos, evidenciando que as interações entre fatores ambientais e este organismo influenciam na identificação de características essenciais e específicas nos processos fermentativos. A construção de um banco de organismos relacionados com a produção de etanol é indispensável aos interesses de pesquisadores do programa Bioen da UNESP. Assim, é de fundamental importância a existência de uma coleção de linhagens de leveduras, com potencial fermentativo elevado. Em estudo anterior, desenvolvido por nosso grupo, foram selecionadas de uma usina brasileira duas linhagens (ZFC4 e ZFD4) com características potencialmente diferenciais no processo de produção de etanol. Com base nestes dados o objetivo deste estudo foi primeiramente analisar características genotípicas e fenotípicas das linhagens ZFC4 e ZFD4 para identificação de fatores genéticos funcionais por meio de sequenciamento do DNA e RNA global de nova geração Hiseq Illumina e posteriormente, as linhagens selecionadas foram rastreadas por combinações com os padrões industriais (PE-2, CAT e SA-I), visando à seleção de associações sinérgicas promissoras no processo de fermentação para o setor sucroalcooleiro. Para tanto as associações destas linhagens foram avaliadas quanto ao crescimento celular, assimilação de açúcares, tolerância à temperatura e ao etanol e capacidade fermentativa. Todas as combinações realizadas entre os padrões e as linhagens ZFC4 e ZFD4 foram sinérgicas para todos os parâmetros analisados, principalmente em relação à resistência a altas concentrações de etanol e temperatura. É importante ressaltar que nossas linhagens isoladamente foram tão eficientes na fermentação quanto às padrões, no entanto em associação estas potencializaram a tolerância populacional. A análise de expressão gênica global dos isolados selecionados ZFC4 e ZFD4, possibilitou a identificação dos fatores genéticos relacionados à produção de etanol. Nossos dados obtidos a partir do transcrito indicaram características genéticas desejáveis nas duas linhagens selecionadas que podem contribuir para a melhoria do controle e rendimento do processo de produção de etanol.

ABSTRACT

Brazil currently has an estimated production of bioethanol with crop 2013/14 from 27.17 billion liters. This production is derived from a fermentation process of Brazilian sugarcane mills and is characterized today as a semi-continuous process. The yeast *Saccharomyces cerevisiae* is the most comprehensive in fermentation processes, by being adaptable to different environments, having a rich diversity of phenotypic and genotypic profiles, showing that the interactions between environmental factors and influences in this organism identification of essential and specific features in the fermentative process. The construction of a bank of organisms related to ethanol production is vital to the interests of researchers Bioen UNESP program. Thus, it is fundamental to the existence of a collection of yeast strains with high fermentation potential. In a previous study conducted by our group, were selected from a Brazilian plant two strains (ZFC4 and ZFD4) with potentially differential characteristics in the ethanol production process. Based on these data, the aim of this study was first to analyze genotypic and phenotypic characteristics of strains ZFC4 and ZFD4 to identify functional genetic factors through sequencing DNA and RNA global new generation HiSeq Illumina and subsequently selected strains were screened for combinations with industry standards (PE-2, CAT and SA-I), aiming at selecting promising synergistic associations in the fermentation process for the alcohol sector. For both the associations of these strains were evaluated for cell growth, assimilation of sugars, tolerance to temperature and ethanol and fermentative capacity. All combinations made between the patterns and ZFC4 and ZFD4 strains were synergistic for all parameters analyzed, especially in relation to resistance to high ethanol concentrations and temperature. Importantly, our lines alone were as effective as the fermentation patterns, however these in combination potentiated the population tolerance. The analysis of global gene expression of selected isolates ZFC4 and ZFD4 enabled the identification of genetic factors related to ethanol production. Our data obtained from the transcriptome indicated desirable genetic traits in two selected that can contribute to improve the control and efficiency of the ethanol production process lines.

SUMÁRIO

1.0 Introdução.....	18
2.0 Objetivos.....	26
2.1 Objetivos Específicos.....	26
3.0 Material e Métodos.....	27
3.1 Micro-organismos.....	27
3.2 Cinéticas de Combinações.....	27
3.2.1 Controles e Combinações.....	27
3.2.2 Inóculos.....	27
3.2.3 Crescimento Celular.....	27
3.2.4 Teste de Sensibilidade à Alta Concentração de Açúcares.....	28
3.2.5 Teste de Sensibilidade à Temperatura	28
3.2.6 Teste de Sensibilidade a Etanol 10% e 12%.....	28
3.2.7 Capacidade Fermentativa.....;	29
3.2.7.1 Escalonamento Celular.....	29
3.2.7.2 Meio de Fermentação.....	29
3.2.7.3 Determinação de pH e °Brix.....	29
3.2.8 Fermentação.....	30
3.2.9 Viabilidade Celular.....	30
3.2.10 Biomassa.....	30
3.2.11 Determinação de Açúcares Totais.....	31
3.2.12 Determinação de Teor Alcoólico.....	31
3.3 Análise da viabilidade celular por Imagens obtidas no aparelho <i>In Cell Analyzer</i>	
2000 (GE®).....	33
3.3.1 Marcação Celular – Calcoflúor <i>White MR2 (Molecular Probe/Life Dead Yeast</i>	
<i>Kit)</i>	33
3.3.2 Imagens – <i>In Cell Analyzer 2000 (GE®)</i>	33
3.4 Formação de Segregantes.....	33
3.4.1 Esporulação de Leveduras e Dissecção de Tetrádes.....	33
3.4.2 Seleção de Segregantes para Análise Genômica.....	34
3.5 Análises Genômicas: Sequenciamentos DNA e RNA.....	34
3.5.1 Extração de DNA.....	34
3.5.1.1 Quantificação de DNA.....	35
3.5.2 Extração de RNA.....	35
3.5.2.1 Quantificação de RNA.....	36
3.5.3 Sequenciamento de RNA.....	36
3.5.3.1 Formação de Bibliotecas de RNA.....	36
3.5.3.2 Formação de <i>Clusters</i>	37
3.5.3.3 Sequenciamento.....	38
3.6 Bioinformática.....	38
3.6.1 Plataformas de Identificação.....	38
4.0 Resultados.....	39
4.1 Cinéticas de Combinações.....	39
4.1.1 Crescimento Celular.....	39
4.2 Teste de Sensibilidade à Alta Concentração de Açúcares.....	39
4.3 Teste de Sensibilidade à Temperatura.....	41
4.4 Teste de Sensibilidade a Etanol 10% e 12%.....	42
4.5 Capacidade Fermentativa.....	44
4.5.1 Viabilidade Celular.....	47
4.5.2 Biomassa.....	47

4.6 Fluorescência e Microscopia – Tolerância a Temperatura e Etanol:	
Calcoflúor/<i>Incell Analyzer</i>	48
4.7 Formação de Segregantes	49
4.7.1 Seleção de Segregantes para Análise Genômica.....	49
4.8 Extração de DNA	50
4.8.1 Quantificação de DNA.....	50
4.9 Extração de RNA	50
4.9.1 Quantificação de RNA.....	50
4.10 Análise Genômica: Sequenciamentos DNA e RNA	51
4.10.1 Formação de Bibliotecas.....	51
4.10.2 Sequenciamento de RNA.....	52
4.11 Bioinformática	52
5.0 Discussão	56
6.0 Conclusão	61
7.0 Referências Bibliográficas	62
Anexo I	72

1.0 INTRODUÇÃO

No último século, as recorrentes crises no petróleo mundial resultam em graves crises econômicas, levando a busca de combustíveis alternativos. No Brasil as consequências foram severas devido a dependência do país, que importava cerca de 85% de seu consumo (Manual de Recomendações, 1990).

Em 1930, o Brasil apresenta o primeiro Congresso Nacional em Aplicações Industriais de Álcool que visava estabelecer a infraestrutura para a produção e a utilização do etanol (Moreira *et al.* 1996). Como resultado, o Brasil iniciava a sua produção no início do século XX (Amorim *et al.*, 2011).

O bioetanol tinha sua produção marginalizada, com um volume baixo para o consumo comparado com a utilização dos combustíveis convencionais, mantendo a dependência brasileira em relação ao petróleo importado (Macedo, 2008), levando o governo nacional a lançar na década de 1970 o Programa Nacional do Álcool (ProÁlcool) que tinha como objetivo estimular a produção de bioetanol, refletindo na demanda de mercado externo e interno e contribuía para a redução de problemas ambientais provenientes da produção, estabelecendo um novo comportamento para a qualidade de ar e desenvolvimento de tecnologias na área de alternativas energéticas (Zanin, 2000).

O ProÁlcool representou o maior aumento da produção de bioetanol, passando de 500 milhões de litros no início do programa para cerca de 13 bilhões de litros por ano a partir do lançamento (Zanin, 2000). Desde então, o Brasil vem caracterizado como o maior e mais competitivo produtor de bioetanol mundial, com uma política interna de consumo bem desenvolvida (Goldemberg, 2008; Amorim *et al.*, 2011).

Atualmente o Brasil possui uma estimativa de produção com a safra 2013/14 de 27,17 bilhões de litros e acréscimo de produtividade de 6,8% (Conab, 2013). Caracterizando que desde 1986 toda a produção de bioetanol é proveniente da cana de açúcar, representando atualmente uma tecnologia de larga escala e seu aumento a cada ano caracterizado pelo desenvolvimento de

novas variedades de cana, clima favorável, solo fértil e avançadas tecnologias agrícolas (Zanin, 2000; Amorim *et al.*, 2005; Amorim *et al.*, 2011).

A produção do bioetanol brasileiro é derivada de tecnologias de primeira geração, onde uma simples fonte de açúcar, proveniente da extração da cana de açúcar, a sacarose, é fermentada por leveduras com o produto primário o etanol (Brow, *et al.*, 2013).

A cana de açúcar utilizada para a produção de bioetanol é derivada de 637 espécies, conhecidas como gramíneas perenes altas do gênero *Saccharum*, família *Poaceae*, tribo *Andropogoneae* e nativa de clima temperado quente e sua morfologia se caracteriza por ser composta de haste e palha (Paes *et al.*, 2005; Canilha *et al.*, 2012). A haste é o material que deriva o suco de cana que posteriormente é utilizado para a fabricação de açúcar e bioetanol, o bagaço é constituído de todo material pós-moagem e o lixo, caracterizado pelas folhas secas, verdes das plantas que servem como produtos de fermentação em processos de segunda geração para formação de bioetanol (Ensinas *et al.*, 2009; Neto, 2005; Triana *et al.*, 1990).

O processo fermentativo é conhecido desde a antiguidade, sendo caracterizado como um processo bioquímico e biológico complexo, que tem como objetivo a ilação do açúcar a álcool etílico (anidro e hidratado), gás carbônico, ácido succínico, ácidos voláteis e ésteres (Oliveira, 1960).

O processo de fermentação brasileiro é diferenciado e único devido ao fato de ser semi-contínuo na maioria dos estados, sendo estes ciclos curtos de fermentação (6-10 horas) e tratamento celular com ácido sulfúrico (Brow, *et al.*, 2013). Esse processo utiliza o suco da cana como matéria prima, com um produto final de 9-12% (v/v) e uma eficiência de 90-92% (Basílio, *et al.*, 2008). A relação de bioetanol produzido com a quantidade de matéria prima utilizada é dependente da quantidade de açúcares presente no mosto, que consiste em uma mistura de melaço (resíduo de fabricação de açúcar), água e caldo de cana, onde o processo inicia-se com a atuação da exoenzima invertase na qual por hidrólise transforma o açúcar (sacarose, um dissacarídeo) em glicose e frutose (monossacarídeos estruturais), estes por sua vez são absorvidos por

micro-organismos aeróbios facultativos, que em condições de anaerobiose realizam a fermentação onde a partir do ácido pirúvico, as enzimas piruvato descarboxilase e álcool desidrogenase produzem o bioetanol e outros subprodutos. (Amorim, 2005).

A principal chave do processo de fermentação nacional consiste em, a cada fim de ciclo fermentativo, as leveduras serem submetidas a um tratamento de centrifugação e lavagem com ácido sulfúrico, a fim de minimizar os riscos de contaminação (Brow *et al*, 2013). Ao término deste tratamento as células são retornadas aos fermentadores, como um novo inóculo para o ciclo posterior, sendo este manejo repetido por toda a safra durante 6-9 meses, durante o ano (Wheals *et al.*, 1999; Andrieta *et al.*, 2007; Pereira *et al.*, 2012; Babrzadeh *et al.*, 2012).

Os principais micro-organismos utilizados para o processo fermentativo são as leveduras, dentre elas, alguns gêneros são classificados como principais, são eles: *Saccharomyces sp*, *Schizosaccharomyces sp*, *Kluyveromyce sp*, entre outras (Jones *et al.*, 1981; Basílio *et al*, 2008). Atualmente a levedura mais utilizada no setor sucroalcooleiro, para processos fermentativos na produção de bioetanol é a espécie *Saccharomyces cerevisiae* (Christofolletti *et al*, 2013; Brow *et al*, 2013; Lin *et al.*, 2006).

Sacharomyces cerevisiae é caracterizada por ser uma levedura com características de crescimento seja em açúcares simples como a glicose, seja em dissacarídeos como a sacarose, disponibilidade de um sistema amplo e vigoroso, transformações genéticas, além de qualidades únicas como elevada resistência ao etanol e inibidores do meio, e em condições adversas consumo de substrato, oferecimento a ela seu papel de destaque no meio fermentativo (Hector *et al*, 2011).

Algumas cepas de *S. cerevisiae* possuem a capacidade de serem altamente produtoras, dominando todo o processo de fermentação durante o período de safra, permitindo então fermentações eficientes e estáveis, resultando em diminuição de custos de produção e maior desempenho de fermentação (alta

capacidade de produção de etanol e formação de glicerol reduzida) e alta viabilidade durante todo o processo (Basso *et al.*, 2008).

Estudos apontam que *S. cerevisiae* são adaptáveis a diferentes ambientes, revelando ser uma rica fonte de perfis fenotípicos na evolução da espécie *S. cerevisiae* (Lidzbarsky *et al.*, 2009; Liti, *et al.*, 2009). Recentemente foi evidenciado que a interação entre fatores ambientais e organismo, podem influenciar na identificação de diferentes características específicas de *Saccharomyces cerevisiae* (Camarasa *et al.*, 2011; Warringer *et al.*, 2011).

A *S. cerevisiae* é amplamente utilizada e cultivada na fermentação industrial, devido à alta capacidade da levedura as adaptações provenientes das condições variáveis do ambiente, como: concentrações de açúcares, concentrações de etanol, pH, concentrações de oxigênio, resistência a contaminantes, estresse salino, estresse proteico, alterações de temperatura e pressão osmótica (Gibson *et al.*, 2007; Bai *et al.*, 2008).

Para elucidar todos os perfis e as respostas as variações ambientais que a *S. cerevisiae* utiliza durante todo o processo de fermentação para produção de bioetanol, estudos e tecnologias vêm sendo desenvolvidos em níveis do genoma, transcriptoma, proteoma, metaboloma e lipidoma (Cheng *et al.*, 2009; Han *et al.*, 2009; Lin *et al.*, 2009; Xia *et al.*, 2009; Bing-Zhi *et al.*, 2009).

Saccharomyces cerevisiae é caracterizada como um dos primeiros sistemas modelo para estudos de análise funcional, visando investigação de seu comportamento diante a biologia molecular, com o advento de seu genoma sequenciado a pouco mais de uma década (Borneman *et al.* 2013). O genoma da *S. cerevisiae* é pequeno com cerca de 12 Mb e aproximadamente 6000 genes, distribuídos em 16 cromossomos, além de apresentar dois pequenos genomas citoplásticos, o DNA mitocondrial (mtDNA) e RNAs dupla fita (*killer double-stranded*) (dsRNA), resultando em uma grande quantidade de dados genômicos para linhagens de *S. cerevisiae* disponíveis, atualmente cerca de 35 sequências em sites de projetos específicos, sendo 18 com genoma montado (Borneman *et al.* 2011; Borneman *et al.* 2012; Tofalo *et al.* 2013).

Considerada uma levedura diplóide, a *S. cerevisiae* possui uma reprodução clonal e homotática, conferindo a capacidade de se regenerar uma célula diploide de uma haplóide, levando a interpretação de uma renovação genômica (Mortimer *et al.*, 1994; Boreman *et al.*, 2013). Estudos relatam que a renovação genômica das leveduras, podem levar a deleções, duplicações e rearranjos, ocasionando uma aquisição de função e especialização de alguns genes, sobretudo em processos de fermentativos, resultando na atual diversidade genética de linhagens de *S. cerevisiae*, estas podendo ser analisadas através de sequenciamento genômico e análise genômica funcional de perfis de transcrição (Cubillos *et al.*, 2011; Scanell *et al.*, 2011).

Sequenciamento de ácidos nucleicos atualmente é uma das tecnologias mais importante nas pesquisas biológicas com vasta aplicação, sendo quatro gerações de sequenciamentos definidas nessas ultimas décadas, sendo como pioneiro o sequenciamento de Sanger, passando a segunda geração com geração que tinha como objetivo o aumento das leituras e magnitude dos sequenciamentos e a diminuição do custo, atualmente os estudos se encontram na tecnologia de terceira geração que se caracteriza pelos sistemas nanopore, e pesquisadores vêem atualizando para a quarta geração onde se encontra a complementariedade da primeira, segunda e terceira geração visando a obtenção de informações genéticas de alta resolução (Gut, 2013).

O primeiro sequenciador a ser utilizado em escalas de pesquisas e pioneiro para vários estudos foi Sanger na década de 70 (Maxam, *et al.*, 1977). Esta tecnologia se baseia na marcação radio ou fluorescente de um di-desoxitri-fosfato (dNTPs), na terminação da cadeia de DNA, seguida de uma corrida de separação de tamanho das moléculas de nucleotídeos em eletroforese em gel de agarose (Sanger *et al.*, 1977). Esta tecnologia foi considerada *standard* por três décadas e viabilizou a estudos um novo horizonte para uma nova geração de sequenciamentos, visando à melhoria para grande escala, tempo e custo, além de oferecer um genoma de “referência” através da conclusão do Projeto Genoma Humano (Internacional Human Genome Sequencing Consortium, 2001,2004; Frederick, *et al.*, 2012).

A segunda geração de sequenciadores inicia-se pela tecnologia baseada no pirosequenciamento, através do sequenciador 454 (454 *Life Sciences/ Roche*), que consiste na detecção de luz emitida através da iniciação de reações secundárias, geradas a partir da liberação de pirofosfato, no processo de incorporação dos nucleotídeos (Wheeler, *et al.* 2008). Atualmente para pesquisas biológicas, temos a plataforma SOLiD (*Applied Biosystems by Life Technologies*) que tem como tecnologia a utilização de chamadas *beads*, que são octâmeros marcados com fluoróforos para identificação da sequência alvo, tendo como característica, as milhares de amplificações na superfície de uma *bead*, e o resultado do sequenciamento através de pontos luminosos (Valouev *et al.* 2008). A plataforma *Illumina*® é utilizada para sequenciamentos de DNA e RNA (RNA-seq), suas características consistem na preparação de bibliotecas, amplificação por *clusters* e incorporação de uma dNTP marcada com fluoróforo correspondente a cada base e o resultado é a clivagem dessa amplificação em cada incorporação da dNTP marcada, fornecendo um ponto de luz correspondente a cor de cada base incorporada (Bentley, *et al.* 2008; Frederick, *et al.* 2012).

A terceira geração de sequenciadores baseia-se na ausência de amplificação de DNA ou RNA por preparações de bibliotecas, conhecidos como “moléculas únicas de sequenciamento”, a primeira plataforma encontrada em pesquisas é a *Heliscope* (*Helicos/BioSciences*) que introduziu o primeiro sistema de sequenciamento de uma única molécula de DNA, onde os fragmentos do ácido nucléico a analisar são hibridizados com os *primers* e ancorados covalentemente em direções pré-determinadas em placa de vidro, o *primer*, a polimerase e os nucleotídeos marcados são então adicionados a estas placas, onde o resultado é emitido através da técnica de síntese, onde cada base incorporada é refletida em um feixe de luz, emitindo assim sua sequência (Pushkarev, *et al.* 2009; Ansorge, *et al.* 2009). *Pacific Bioscience SMRT* (*Pacific Biosciences*) conhecido como “*Single Molecule Real Time*” é atualmente empregado, sua tecnologia baseia no sequenciamento em tempo real de uma única molécula, devido a um chip que possui milhares de “*zero-mode waveguides*” (ZMWs), o sequenciamento é realizado através da DNA polimerase que esta covalentemente ligada a uma base da ZMWs, onde em

cada reação cada fragmento de DNA é alongado pela DNA polimerase com dNTPs que são marcadas com fluoróforo de cores diferentes em cada fração terminal do fosfato, a sequência então é determinada através da fluorescência dos nucleotídeos, que é imediatamente interrompida através da formação de uma ligação de fosfodiéster que provoca a difusão do fluoróforo para cada zona (Flusberg, *et al.* 2010; Parek, *et al.* 2011). E a terceira plataforma encontrada é o *Ion Torrent (Life Technology's)*, conhecido também como Íon Próton, sua tecnologia baseia em um chip de sílica, concebido na mesma forma que um semicondutor com uma série de poços nanocóspicos, onde uma série de pulsos elétricos são emitidos traduzindo as sequências de DNA a serem sequenciados (Clark, *et al.* 2009; Lieberman, *et al.* 2010; Frederick *et al.*, 2012).

Com a utilização das metodologias de nova geração, é crescente o número de estudos genômicos e transcritômicos. Transcritômica refere-se ao estudo de um conjunto de transcritos em uma célula específica, tecido ou organismo de um determinado estágio de desenvolvimento ou condição fisiológica. Este conjunto completo de transcritos é conhecido como um transcritoma, incluindo mensageiro que codifica a proteína RNA mensageiro (mRNA) e de não codificação de RNA [ncRNA : ribossomal RNA (RNAr), RNA de transferência (RNAt), e outros ncRNAs]. Ao contrário do genoma, que é relativamente estável, o transcriptoma varia com estágio de desenvolvimento, condição fisiológica e ambiente externo. Análise do transcritoma é uma ferramenta que permite revelar a relação entre o genótipo e o fenótipo, levando a uma melhor compreensão dos caminhos e mecanismos que controlam o destino de uma célula (Quian, *et al.* 2014).

Recentemente um novo método tanto para o mapeamento quanto para quantificação de transcritos é conhecido como RNA-seq, onde este método já está a revolucionar o campo da transcritômica, melhorando a compreensão da expressão do genoma e de sua regulação (Chen, *et al.* 2012).

O Programa Bioen – UNESP, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, laboratório de Micologia participa de grupo do Bioen onde desenvolve projetos ligados a pesquisa de fabricação de combustíveis com aplicações em novas abordagens aplicadas à prospecção de leveduras *Saccharomyces* e não- *Saccharomyces* produtoras de etanol, controle microbiológico e biomonitoramento ambiental nos processos de produção de biocombustíveis, onde nosso grupo realizou um estudo com finalidade de selecionar linhagens altamente produtoras de etanol de dornas e cubas de usinas sucroalcoleiras em períodos de alto e baixo rendimento durante uma safra de cana de açúcar. Neste estudo foram selecionados 28 isolados de *Saccharomyces cerevisiae* e em ensaios fenotípicos realizados foram selecionados 06 isolados e destes 02 foram considerados promissores, ZFC4 altamente produtor e ZFD4 altamente tolerante e resistente ao processo fermentativo. Este trabalho visa dar continuidade a estudos fenotípicos de combinações com linhagens padrões industriais e estudos genotípicos através dos sequenciamentos de DNA e RNA com as linhagens ZFC4 e ZFD4, visando linhagens promissoras para o setor sucroalcooleiro.

2.0. OBJETIVOS

Estudar e analisar a capacidade fermentativa e condições de estresse das leveduras selecionadas ZFC4 e ZFD4 em combinações com linhagens padrões PE-2, CAT e SA-I utilizadas em usinas sucroalcooleiras brasileiras, concomitantemente com a análise e estudo genômico e transcriptômico diferencial das linhagens selecionadas.

2.1 Objetivos Específicos

- Realizar e analisar a cinética de combinações das leveduras selecionadas com linhagens padrões através de testes fenotípicos (crescimento celular, assimilação de açúcares, testes de sensibilidade a diferentes temperaturas, teste de sensibilidade a concentrações de etanol e capacidade fermentativa).
- Realizar a formação de segregantes homozigotos através da técnica de formação e dissecação de tétrades.
- Realizar os sequenciamentos de DNA e RNA dos isolados selecionados ZFC4 e ZFD4, utilizando a tecnologia *Hiseq Illumina*®.
- Analisar as sequências gênicas através do DNA-seq, para identificar a origem das linhagens selecionadas.
- Analisar os genes diferencialmente expressos através do RNA-seq entre linhagens selecionadas.
- Comparar os resultados obtidos nos sequenciamentos com os resultados existentes das linhagens padrões industriais.

3.0 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Micro-organismos

As cepas de *Saccharomyces cerevisiae* em estudos ZFC4 (linhagem isolada de cuba de fermentação) e ZFD4 (linhagem isolada de dorna de fermentação) foram doadas através de coleta de uma Usina de Araraquara/SP, selecionadas e nomeadas. As cepas padrões utilizadas nesse estudo PE-2, CAT e SA-I, foram doadas pela professora Eloisa Kronka. Todas as cepas foram mantidas em meio YEPD (extrato de levedura, peptona, dextrose, ágar bacteriológico) a 30°C.

3.2 Cinéticas de Combinações

3.2.1 Controles e Combinações

Para todos os estudos realizados, as cepas isoladas foram utilizadas como controle (ZFC4, ZFD4, PE-2, CAT e SA-I), entretanto para os estudos de combinações, tivemos as seguintes condições: ZFC4 + ZFD4; ZFC4 + PE-2; ZFC4 + CAT; ZFC4 + SA-I; ZFD4 + PE-2; ZFD4 + CAT; ZFD4 + SA-I e MIX (ZFC4 + ZFD4 + PE-2 +CAT +SA-I).

3.2.2 Inóculos

Para todos os estudos de cinética de combinações realizados, foi preparado previamente um inóculo em PBS de 1×10^8 cels/mL, para os controles e as combinações, sendo que para as combinações, posteriormente após a preparação do inóculo isoladamente foram adicionados em novo tubos correspondente, 2mL de cada inóculo nas combinações determinadas, afim de estabelecer um valor exato de células em cada combinação.

3.2.3 Crescimento Celular

O estudo de crescimento celular, foi realizado primeiramente com o crescimento do inóculo em 10mL de meio YEPD (extrato de levedura, peptona, dextrose) líquido, 30°C, 150rpm, 48 horas. Transcorrido esse tempo de crescimento, as amostras foram centrifugadas em 3.000rpm por 15 minutos. O

sobrenadante foi descartado e 20µL de *pellet* foi repicado em placas de YEPD sólido, 30°C por 48 horas.

3.2.4 Teste de Sensibilidade à Alta Concentração de Açúcares

Para o estudo de sensibilidade à alta concentração de açúcares, primeiramente foi realizado um crescimento celular em placas de YEPD sólido, 30°C durante 48 horas. Transcorrido o tempo de crescimento, todos os controles e combinações com positividade de crescimento, foram repicadas em placas de YEPD sólido contendo 20% de glicose, 30°C durante 72 horas. Transcorridos esse crescimento, os controles e sinergismos com positividade de crescimento, foram repicados em placas de YEPD sólido contendo 20% de sacarose, 30°C durante 72 horas.

3.2.5 Teste de Sensibilidade à Temperatura

O estudo de sensibilidade à temperatura, primeiramente foi realizado um crescimento celular em YEPD sólido das cepas ZFC4, ZFD4, PE-2, CAT e SA-I, 30°C durante 48 horas. Após o crescimento foram preparados inóculos 1×10^8 dos controles e combinações. As suspensões (20µL) foram diluídas seriadamente (1:10) em PBS em placas de microdiluição de 96 *wells*. A suspensão original e as diluições (2µL) foram aplicadas em placas de YEPD sólido, e estas foram incubadas nas temperaturas de 25°C, 38°C, 40°C, 42°C e 44°C durante 72 horas.

3.2.6 Teste de Sensibilidade a Etanol (10% e 12%)

O estudo de sensibilidade à temperatura, primeiramente foi realizado um crescimento celular em YEPD sólido das cepas ZFC4, ZFD4, PE-2, CAT e SA-I, 30°C durante 48 horas. Após o crescimento foi preparado inóculos 1×10^8 dos controles e combinações. As suspensões (20µL) foram diluídas seriadamente (1:10) em PBS em placas de microdiluição de 96 *wells*. A suspensão original e as diluições (2µL) foram aplicadas em placas de YEPD sólido contendo 10% e 12% de etanol, e estas foram incubadas nas temperaturas de 25°C, 38°C, 40°C, 42°C e 44°C durante 72 horas.

3.2.7 Capacidade Fermentativa

3.2.7.1 Escalonamento celular

Para este teste foram utilizados como controle as cepas ZFC4, ZFD4, PE-2, CAT e SA-I isoladamente e para estudo as combinações PE-2 + CAT + SA-I + ZFC4; PE-2 + CAT + SA-I + ZFD4; PE + CAT + SA-I e ZFC4 + ZFD4. Primeiramente para este estudo foram realizadas as etapas de escalonamento celular, onde um primeiro repique das leveduras foram crescidas em YEPD sólido, 30°C por 48 horas. Transcorrido este tempo de crescimento, a massa celular das leveduras foram transferidas para um tubo falcon contendo 10 mL de meio YEPD líquido e incubadas a 30°C, 150rpm por 24 horas. Transcorrido o tempo às células foram transferidas para um Erlemeyer de 250mL contendo 100mL de meio YEPD líquido e incubadas a 30°C, 150rpm por 24 horas. Transcorrido o tempo as células foram transferidas para um Erlemeyer de 500mL contendo 250 mL de YEPD líquido e incubadas a 30°C, 150rpm por 24 horas. Transcorrido o tempo as células foram transferidas para um Erlemeyer de 1L, contendo 500mL de YEPD líquido e incubadas a 30°C, 150rpm por 24 horas, com a finalidade de crescimento exponencial para a quantidade de célula necessária para o estudo com valor de 30% (v/v). Ao termino da etapa de crescimento celular as culturas foram incubadas em câmara fria a 4°C por 2 horas, para sedimentação da massa celular. Transcorrido o tempo, as culturas foram centrifugadas a 5.000rpm por 15 minutos, descartado os sobrenadantes e as células ressuspendidas em água estéril.

3.2.7.2 Meio de Fermentação

Para o teste de capacidade fermentativa, o meio utilizado para a fermentação é preparado previamente. Cerca de 2L a 4L de caldo de cana-de-açúcar bruto, foram fervidos, filtrados e esterilizados. Após a esterilização foi acertado o pH 4,0 e °Brix16.

3.2.7.3 Determinação do pH e °Brix

Para a medição de pH foram seguidos as instruções do fabricante Nova Instrumentos® e para o °Brix a determinação foi realizada por um Sacarímetro.

3.2.8 Fermentação

Foram realizados 4 ciclos de fermentação de 8 horas cada, sendo que as fermentações foram realizadas em biorreator com capacidade de 5L, do qual foram adicionados 1,75L de meio de fermentação (caldo de cana-de-açúcar previamente tratado) e 750 mL de creme de levedura (massa celular previamente realizada), totalizando um volume final no biorreator de 2,5L. As fermentações foram realizadas em ciclos de 8 horas, 30°C, 120rpm e condições de aeração adequadas. A cada término de 4 horas de cada ciclo, uma amostra foi coletada e congelada a -20°C para posteriores análises. Os tempos de coleta foram em início da fermentação (tempo zero), meio da fermentação (4 horas) e término da fermentação (8 horas).

3.2.9 Viabilidade Celular

Para a realização da viabilidade celular, as células colhidas na fermentação foram coradas com azul de metileno, afim de se observar as células não viáveis. As células viáveis e as células não viáveis foram contadas em câmara de Neubauer, e visualizadas em microscópio ótico (Olympus BH). O número total de células viáveis se dá através de porcentagem, onde se deriva da equação:

$$\text{Viabilidade Celular (\%)} = \frac{\text{Células vivas}}{\text{Total de Células}} \times 100$$

3.2.10 Biomassa

Para a determinação da biomassa, primeiramente foram coletados 1mL de meio da fermentação e centrifugado a 600rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado transferido para um balão volumétrico de 25mL com água destilada e homogeneizado. Posterior a homogeneização, a biomassa foi determinada por leituras de espectrofotômetro (*Ultrospec 2100 Bioscinces*) a 570nm, com o auxílio de uma curva padrão previamente estabelecida. O resultado se deriva da equação:

$$X \text{ (Concentração de Biomassa mg/mL)} = y \text{ (Abs)} - b/a$$

3.2.11 Determinação de Açúcares Totais

A determinação do teor de açúcares totais consiste na redução do ácido 3,5 – dinitrossalicílico a ácido 3 – amino – 5 – nitrossalicílico (DNs) concomitantemente com o grupo aldeído do açúcar redutor oxidado a ácido carboxílico, desenvolvendo uma coloração avermelhada. A absorbência foi realizada em espectrofotometro com uma leitura à 546nm.

3.2.12 Determinação do Teor Alcoólico

O estudo de determinação do teor Alcoólico foi realizado segundo a metodologia descrita por Gattás et al. (2002) com algumas modificações, esta consiste na utilização da enzima álcool desidrogenase de *Saccharomyces cerevisiae* – ADH (Sigma A7011) comercial. A determinação de etanol nas amostras foi realizada. O método desenvolvido baseia-se na utilização da enzima álcool desidrogenase de levedura de panificação para converter álcool etílico a acetaldeído e NADH, através de reação de óxido-redução, tendo o NAD⁺ como aceptor de elétrons. Neste estudo o método foi adaptado para a utilização da enzima comercial álcool desidrogenase de *Saccharomyces cerevisiae* - ADH (Sigma A7011). A reação ocorreu a pH 8,8 com o equilíbrio deslocado para a formação do acetaldeído pela reação do mesmo com semicarbazida. O Tubo P onde ocorreu a reação enzimática completa foi preparado da seguinte forma: 0,1 mL de NAD⁺ 0,03 M; 0,04 mL da amostra diluída 200 vezes; 3 mL de solução tampão (contendo pirofosfato de sódio 0,13 M, semicarbazida 0,079 M e glicina 0,024 M) pH 8,8; 0,1 mL de volume da preparação enzimática purificada (0,35 U em 0,1mL) para um volume final de 3,24 mL. O Tubo P diferiu do Tubo R por conter solução padrão do etanol (concentração final no Tubo R ao redor de $6,9 \times 10^{-3}$ g. L⁻¹) no lugar da amostra, sendo que o Tubo Br-e foi preparado para conter água no lugar da amostra (controle da preparação enzimática). A reação enzimática foi iniciada no tempo zero com a adição da preparação enzimática e a reação ocorreu por 15 minutos à temperatura ambiente. As diferenças entre as absorbências lidas

a 340 nm, das soluções dos tubos R e Br-e (AR – ABr-e), bem como, a diferença entre o Tubo P e o tubo Br-e (AP - ABr-e) foram obtidas e utilizadas na determinação da concentração do etanol utilizando-se a seguinte equação:

$$C \text{ g/L} = \frac{(AR - ABr-e) \times V \times \text{dil.} \times 1 \times c \times PM \text{ (etanol)}}{(AP - ABr-e) \times v}$$

Onde:

C = concentração do etanol em g/L;

(AR – ABr-e) = Abs. amostra – Abs. branco;

(AP - ABr-e) = Abs. padrão – Abs. branco;

V = volume da reação (mL);

dil. = diluição da amostra;

v = volume da amostra (mL);

c = concentração do padrão na cubeta (M);

PM = massa molecular do etanol

Cálculo da eficiência fermentativa

Para calcular a eficiência fermentativa foi utilizada uma fórmula baseada no cálculo estequiométrico teórico de Gay-Lussac (51,11 g de etanol/100 g de glicose) descrita abaixo:

$$\text{Eficiência fermentativa (\%)} = \text{Etanol} / (\text{ART inicial} - \text{ART final}) \times 100 \times 0,511$$

Foram utilizados os dados de etanol, ART inicial e final em g/100 mL de cada ciclo de fermentação.

3.3 Análise da viabilidade celular por Imagens obtidas no aparelho *In Cell Analyzer 2000 (GE®)*

3.3.1 Marcação Celular – Calcoflúor *White M2R (Molecular Probe / Life Dead Yeast Kit)*

A marcação foi realizada segundo protocolo do fabricante. Previamente foram realizados os inóculos dos controles e combinações afim de uma concentração celular de 1×10^8 cels/mL. Os inóculos controles foram marcados com Calcoflúor na concentração final de 25 μ M e encubados em meio líquido YEPD acrescido de 12% de etanol, 44°C, 150rpm e 24 horas.

3.3.2 Imagens – *In Cell Analyzer 2000 (GE®)*

As imagens foram adquiridas no equipamento *In Cell Analyzer 2000 (GE®)* em objetiva de 20x.

3.4 Formação de Segregantes

3.4.1 Esporulação de Leveduras e Dissecção de Tétrade

Para este estudo primeiramente foi realizado um crescimento das cepas selecionadas (ZFC4 e ZFD4) em placas de YEPD sólido, 30°C durante 72 horas. Para a etapa de esporulação, uma colônia diplóide de cada cepa, foram semeadas em 10mL de meio SSPO (extrato de levedura 0,25%, acetato de potássio 1,5%, dextrose 0,05% e *droup-out mix* 0,2%) e incubadas 30°C sob agitação 100rpm por 72 horas. Para a etapa de dissecção, com a formação dos ascus previamente realizadas, foi transferido 1mL de cultura esporulada para um tubo de microcentrífuga, centrifugadas por 10 segundos, removidos os sobrenadantes, ressuspendidas em 100 μ L de sorbitol 20%, adicionado 3 μ L de enzima Zimoliase, misturado por inversão e incubados. Para a cepa ZFC4 o tempo de incubação foi de 15 minutos a 37°C e para a cepa ZFD4 foram de 30 minutos a 37°C. Após incubação foi adicionado 1mL de sorbitol 20%, mantida em banho de gelo por 20 minutos. Com a suspensão realizada, 10 μ L foi transferido para uma placa de YEPD sólido e realizado a dissecção em

microscópio de dissecação, modelo MSM System 400, Singer Instruments Co. Ltd. As células dissecadas foram crescidas em 30°C por 48 horas.

3.4.2 Seleção de Segregantes para Análises Genômicas

Para este estudo foram utilizados os segregantes de ZFC4 identificados como: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 e 11 e os segregantes de ZFD4 identificados como: 1A, 1B, 2A, 2B, 3A, 3B, 4, 5, 6A, 6B, 7A, 7B, 8, 9, 10A e 10B. Com o crescimento celular dos segregantes, todas as colônias passaram então a uma etapa de expansão clonal, em repique em YEPD sólido, 30°C, 48 horas. Os segregantes que tiveram crescimento significativo na primeira expansão clonal, ZFD4 (2B, 2B, 3B, 5A, 7A e 10B) e ZFC4 (1, 2, 4 e 5) foram submetidos a um teste de tolerância de temperatura, onde foram repicadas em YEPD sólido, 44°C por 48 horas.

3.5 Análises Genômicas: Sequenciamentos DNA e RNA

3.5.1 Extração de DNA

Metodologia foi realizada segundo Sambrook et al (1989), com modificações. Para este estudo foram utilizados os segregantes ZFC4/2 e o ZFD4/1B. Primeiramente obteve um crescimento celular de 24 horas em YEPD sólido, o crescimento celular foi transferido para YEPD líquido e incubado a 30°C com agitação de 150 rpm por 48 horas. Os crescimentos celulares foram centrifugados por 15 minutos, 13.400xg, 4°C. Os sobrenadantes descartados e ressuspensão a massa celular em 500µL de água Milli-Q e transferidas para tubo de microcentrifuga. Centrifugadas por 10 minutos, 13.400xg, 4°C e descartado os sobrenadantes novamente. Foram adicionados 200µL de Tampão de Lise e 200µL de PCI (fenol/clorofórmio/álcool isoamílico) em temperatura ambiente e aproximadamente 0,3g de pérolas de vidro. As amostras foram agitadas em vórtex de 3 a 4 minutos, incubadas 1 minuto no gelo, 1 minuto no vórtex. Transcorrido esta etapa foram adicionadas as amostras 200µL de TE pH 8.0 e agitadas em vórtex por 1 minuto. As amostras foram centrifugadas por 10 minutos, 13.400xg, 4°C e as fases aquosas transferidas para novos tubos de microcentrifuga. Foram adicionados 200µL de PCI, agitado em vórtex por 15 segundos e centrifugadas por 15 minutos,

13.400xg, 4°C. As fases aquosas foram transferidas para novos tubos de microcentrifuga e adicionados novamente 200µL de PCI, agitados em vórtex por 15 minutos e centrifugadas por 15 minutos, 13.400xg, 4°C. Após esta etapa foram adicionados 1mL de etanol absoluto gelado e misturado por inversões, centrifugadas por 10 minutos, 13.400xg, 4°C e os sobrenadantes descartados. Os *pellets* então ressuspensos em 400µL de TE pH 8.0 e adicionado 3µL de RNase (10mg/mL), incubados a 37°C por 30 minutos. Transcorrido o tempo da atividade da enzima foram adicionados 200µL de PCI, agitados em vórtex e centrifugadas por 15 minutos, 13.400xg, 4°C. A fase aquosa de cada amostra foi transferida para um novo tubo de microcentrifuga e adicionados 10µL de Acetato de Amônio 4M e 1mL de Etanol Absoluto, realizado inversões e novamente centrifugadas por 15 minutos, 13.400xg, 4°C e descartado os sobrenadantes. Aos *pellets* foram adicionados 400 µL de etanol 75% gelado, realizado inversões e centrifugados por 15 minutos, 13.400xg, 4°C e os sobrenadantes descartados. Os *pellets* de DNA foram secados ao ar e ressuspensado em 30µL de água bidestilada com DEPEC (Sambrook, et al. 1989).

3.5.1.1 Quantificação de DNA

A quantificação das amostras de DNA das cepas ZFC4 e ZFD4 foram realizadas pelo aparelho NanoVue Plus, seguindo a metodologia do fabricante GE®.

3.5.2 Extração de RNA Total

As extrações foram realizadas segundo Sambrook et al (1989), com modificações. As cepas utilizadas foram ZFC4 e ZFD4, primeiramente obteve-se um crescimento celular em YEPD líquido, 30°C, 150rpm, 48 horas. O crescimento celular foi centrifugado por 15 minutos a 13.400xg, 4°C e descartado o sobrenadante. Foram adicionados às massas celulares 3,5mL de trizol e o mesmo volume de pérolas de vidro, as amostras foram agitadas em vórtex por 15 minutos e repousadas em temperatura ambiente por 10 minutos. Transcorrido o tempo às amostras foram centrifugadas por 10 minutos, 13.400xg, 4°C e a fase aquosa transferida para novos tubos de microcentrifuga. Foram adicionados 0,2mL de clorofórmio para cada 0,75mL de

trizol recuperado da fase anterior, agitadas em vórtex e foram repousadas em temperatura ambiente por 10 minutos. Transcorrido o tempo às amostras foram centrifugadas por 20 minutos, 13.400xg, 4°C e a fase aquosa transferida para novos tubos de microcentrifuga. Foram adicionados o volume recuperado da fase anterior de PCI (fenol/clorofórmio/álcool isoamílico), agitadas por inversões e repousadas em temperatura ambiente por 10 minutos. Transcorrido o tempo, as amostras foram centrifugadas por 20 minutos, 13.400xg, 4°C e a fase aquosa transferida para novos tubos de microcentrifuga. Foram adicionados 0,25mL de isopropanol e 0,25mL de solução de citrato de sódio 0,4M e cloreto de sódio 0,8M para cada 0,75mL de volume recuperado na fase anterior, agitadas por inversões e repousadas em temperatura ambiente por 10 minutos. Transcorrido o tempo às amostras foram centrifugadas por 30 minutos, 13.400xg, 4°C e os sobrenadantes foram descartados. Foram adicionados 1,0mL de etanol 75%, centrifugadas por 15 minutos, 13.400xg, 4°C e os sobrenadantes descartados. Os *pellets* foram deixados secar em ar ambiente e ressuspendidas em 10µL de água bidestilada com DEPC (Sambrook, 1989).

3.5.2.1 Quantificação de RNA Total

A quantificação das amostras de RNA total das cepas ZFC4 e ZFD4 foram realizadas pelo aparelho NanoVue Plus, seguindo a metodologia do fabricante GE®.

3.5.3 Sequenciamento de RNA

3.5.3.1 Formação de Bibliotecas RNA

As bibliotecas de RNA das cepas ZFC4 e ZFD4 foram preparadas de acordo com *TruSeq® RNA Sample Preparation v2* (Illumina®) de acordo com as recomendações do fabricante com algumas adaptações. Primeiramente o DNA das cepas ZFC4 e ZFD4 foram fragmentados por ação enzimática e posterior ligação de *random primers*, para que ocorresse a síntese de primeira fita de cDNA, utilizando a enzima transcriptase reversa (*SuperScript/Invireogen*). Ao término da primeira fita, seguiu com a síntese de segunda fita de cDNA para que ao final obtivéssemos um cDNA de fita dupla.

As extremidades 3' e 5' das fitas então foram reparadas, utilizando o reagente *End-Repair Mix* da *Illumina* (o reagente possui a atividade exonuclease, que remove as pontas da extremidade 3' e atividade polimerase que completa a extremidade 5') ao final de um cDNA fragmentado com pontas coesivas. Ao cDNA fragmentado foi adicionado um único nucleotídeo A (adenina), esta etapa preveniu que esse fragmento se ligasse a outro fragmento de cDNA durante a ligação dos adaptadores, ao ver que a extremidade 3' dos adaptadores possuem um único nucleotídeo T (timina), que é complementar ao fragmento que foi adenilado. Com o término desta etapa, os fragmentos com *barcodes* específicos, foram ligados as extremidades dos fragmentos de cDNA, assim preparados para hibridização na lâmina de sequenciamento. Os fragmentos passaram então por uma etapa de enriquecimento dos fragmentos de cDNA através da reação em cadeia pela polimerase (PCR) para enriquecer os fragmentos de cDNA que apresentam adaptadores ligados nas duas extremidades, 3' e 5'. A PCR foi realizada utilizando *primers* que se anelaram as extremidades dos adaptadores, garantindo que apenas os fragmentos de cDNA ligados aos adaptadores sejam amplificados. Evitou-se que ocorresse uma distorção da representação da biblioteca, o número de ciclos utilizados na PCR foram os mínimos possíveis, em média 10 ciclos. Ao final deste processo a biblioteca estava pronta para ser validada e quantificada. A validação das bibliotecas de cDNA das cepas ZFC4 e ZFD4 foram realizadas através de eletroforese capilar no *Agilent Bioanalyzer* com o chip DNA1000, utilizando 1uL da biblioteca e seguindo as recomendações do fabricante. A quantificação das bibliotecas foi realizada através de uma quantificação absoluta qPCR, utilizando o aparelho *7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems)*, seguindo as recomendações do *Illumina Sequencing Library qPCR Quantification Guide*.

3.5.3.2 Formação dos *Clusters*

A formação dos *Clusters* foi realizada no aparelho *Illumina® HiSeq2000* seguindo informações do fabricante.

3.5.3.3 Sequenciamento

O sequenciamento foi realizado no aparelho *Illumina® HiSeq2000*, com uma leitura de 30 milhões de *reads* a 50pb.

3.6 Bioinformática

A expressão diferencial de genes das linhagens isoladas ZFC4 e ZFD4 foram analisadas utilizando *CLC Genomics Workbench v6.0* (CLC Bio, Aarhus, Dinamarca) e como referência utilizado a linhagem ATCC 204508 / S288c. Os valores de RPKM foram normalizados utilizando a normalização quantil e transformados para log2 para análise estatística, assim como agrupamento hierárquico das amostras e análise de componentes foram revisados para examinar a qualidade dos dados e comparabilidade. O t - teste foi realizado em log2 e os dados transformados para identificar os genes com significativa alterações na expressão entre as duas linhagens selecionadas. Os valores de p foram ajustados, utilizando o método de Benjamini e Hochberg.

3.6.1 Plataformas de Identificação

Para a análise de identificação dos genes selecionados foram utilizadas as plataformas: *National Center for Biotechnology Information* (NCBI): <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> e *Saccharomyces Genome Database* (SGD): <http://www.yeastgenome.org/>.

4.0 RESULTADOS

4.1 Cinéticas de Combinações

4.1.1 Crescimento Celular

Todos os controles e combinações foram submetidos a teste de crescimento celular e como resultado, o crescimento de 100% de todos os controles e combinações.

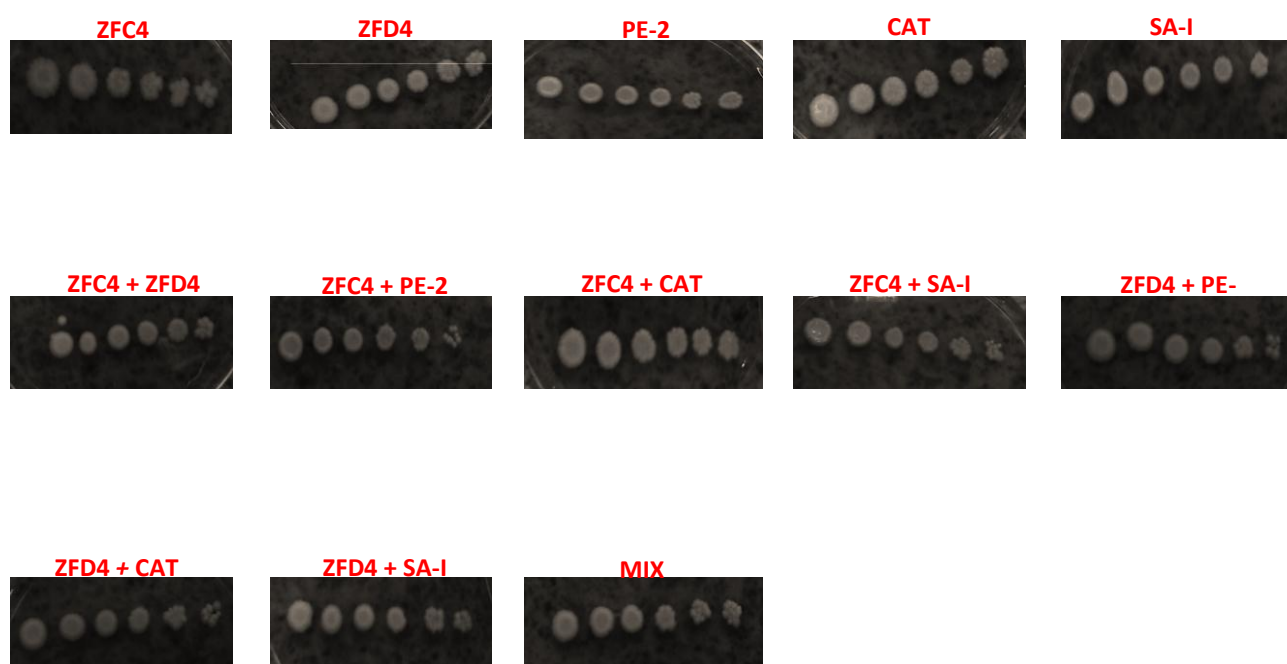


Figura 01: Figuras representativas do crescimento celular de todos os controles e combinações, em meio YEPD sólido, 30°C por 48 horas.

4.2 Teste de Sensibilidade à Alta Concentrações de Açúcares

Todos os controles e combinações foram submetidos ao teste, como resultado para 20% glicose, 100% de crescimento para todos os controles e combinações. Para o teste a 20% sacarose, obtivemos 100% de crescimento para todos os controles e combinações.

- Glicose:



Figura 02: Figuras representativas do crescimento celular de todos os controles e combinações, em meio YEPD sólido acrescido de 20% de glicose, 30°C por 48 horas.

- Sacarose



Figura 03: Figuras representativas do crescimento celular de todos os controles e combinações, em meio YEPD sólido acrescido de 20% de sacarose, 30°C por 48 horas.

4.3 Teste de Sensibilidade à Temperatura

Todos os controles e combinações foram submetidos ao teste de tolerância à temperatura. Para as temperaturas de 25°C, 38°C, 40°C e 42°C obtivemos 100% de crescimento em controles e sinergismos. Com a temperatura de 44°C obtivemos 100% de crescimento nos controles ZFC4 e ZFD4 e sinergismos e ausência de crescimento nos controles PE-2, CAT e SA-I.

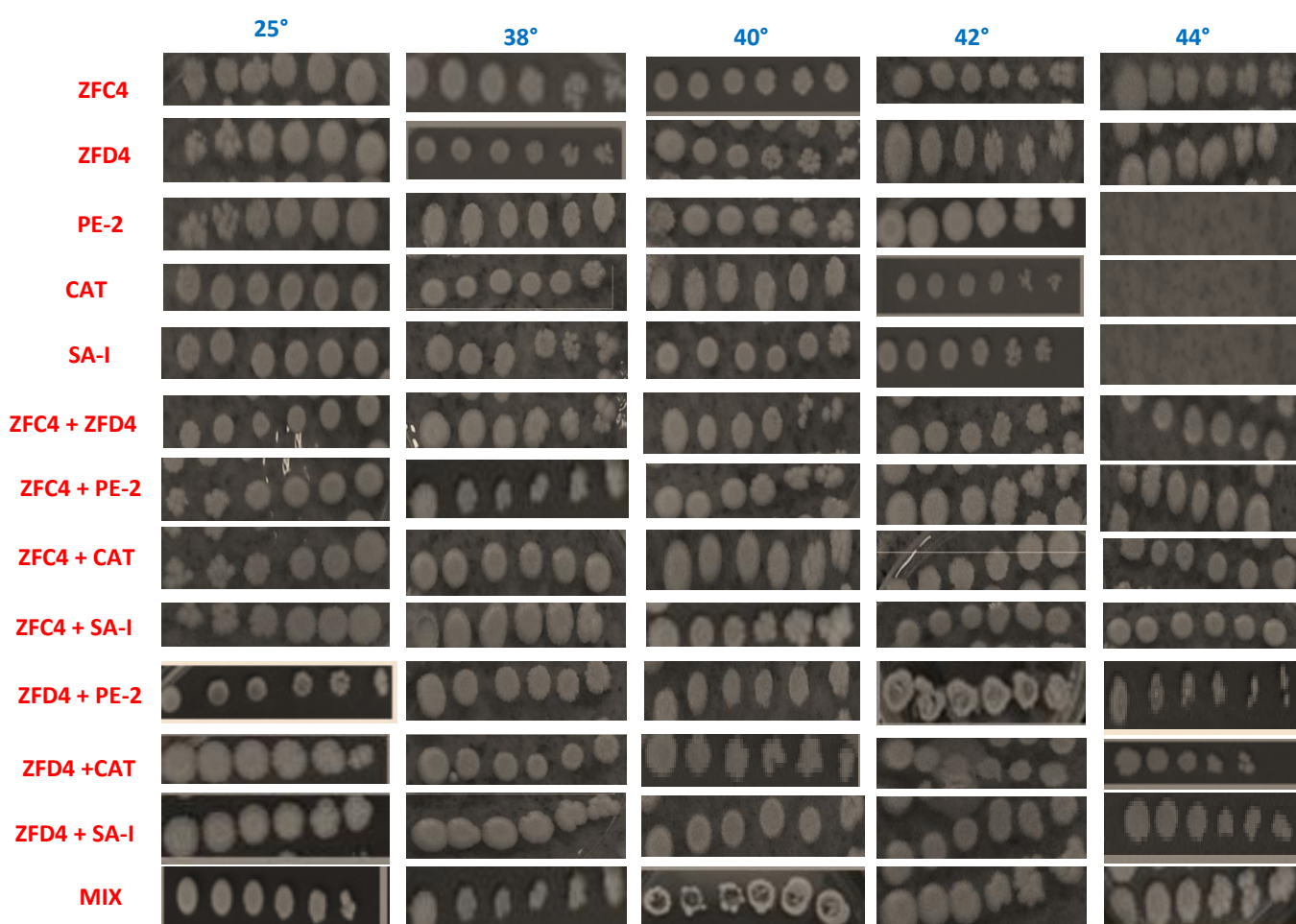


Figura 04: Figura representativa de todos os crescimentos de controles (ZFC4; ZFD4; PE-2; CAT e SA-I) e das combinações (ZFC4 + ZFD4; ZFC4 + PE-2; ZFC4 + CAT; ZFC4 + SA-I; ZFD4 + PE-2; ZFD4 + CAT; ZFD4 + SA-I e MIX) em meio YEPD sólido, nas condições de temperaturas de 25°C, 38°C, 40°C, 42°C e 44°C.

4.4 Teste de Sensibilidade à Etanol 10% e 12%

- Etanol 10%

Todos os controles e combinações foram submetidos ao teste de tolerância a etanol 10%. Para as temperaturas de 25°C, o resultado foi o crescimento de todos os controles e padrões. Nas temperaturas de 38°C, 40°C, 42°C e 44°C obtive o crescimento 100% nas linhagens selecionadas ZFC4 e ZFD4 e em todas as combinações, apresentando ausência de crescimento nos padrões PE-2, CAT e SA-I nessas condições.

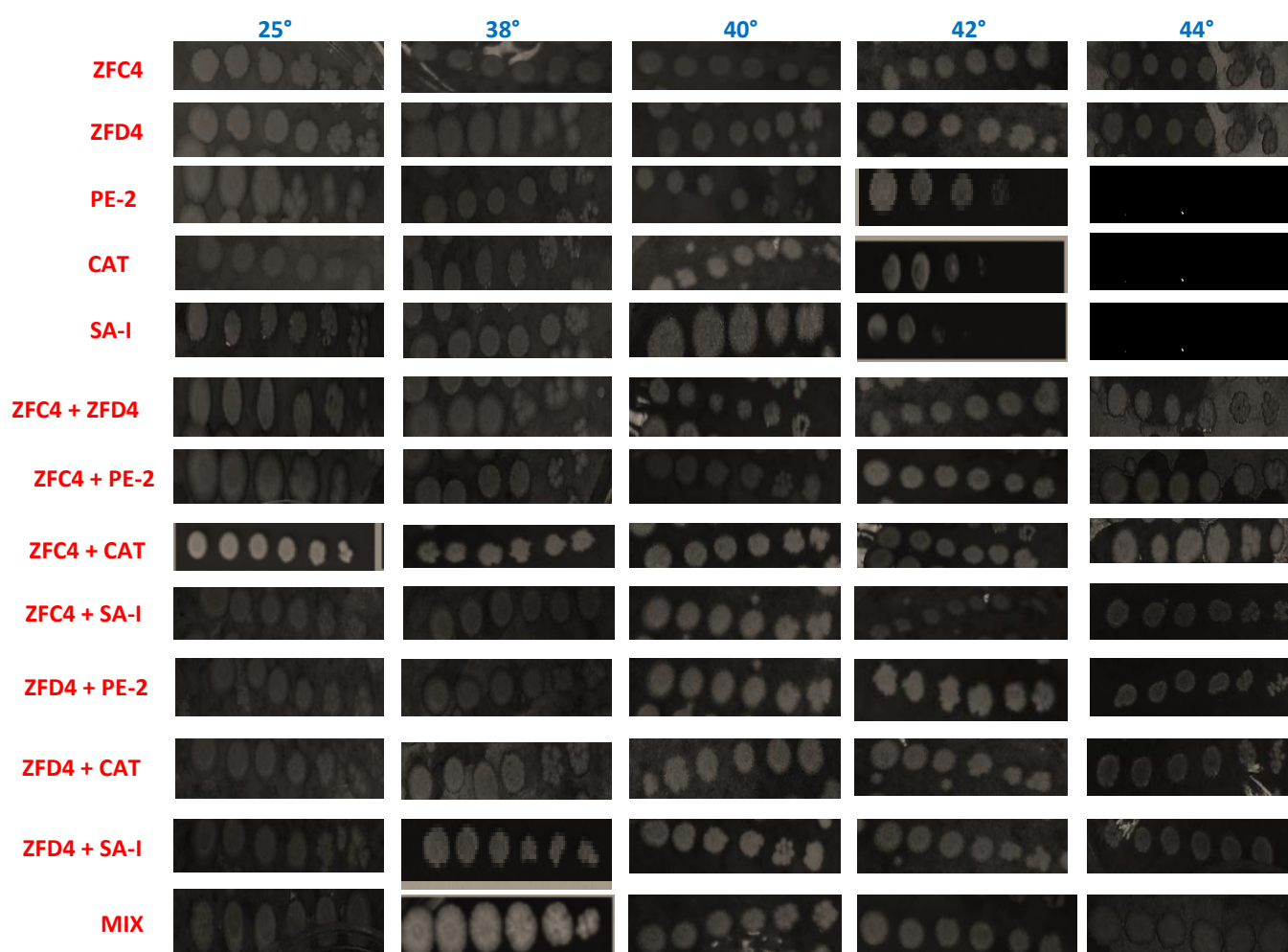


Figura 05: Figura representativa de todos os crescimentos de controles (ZFC4; ZFD4; PE-2; CAT e SA-I) e combinações (ZFC4 + ZFD4; ZFC4 + PE-2; ZFC4 + CAT; ZFC4 + SA-I; ZFD4 + PE-2; ZFD4 + CAT; ZFD4 + SA-I e MIX) em meio YEPD sólido contendo 10% de etanol, nas condições de temperaturas de 25°C, 38°C, 40°C, 42°C e 44°C.

- Etanol 12%

Todos os controles e combinações foram submetidos ao teste de tolerância a etanol 12%. Para as temperaturas de 25°C, 38°C e 40°C, 100% de crescimento nos controles e combinações, em contrapartida a temperatura de 42°C obtivemos crescimento 50% nos controles PE-2, CAT e SA-I e 100% de crescimento nos controles ZFC4 e ZFD4 e em todas as combinações. Com a temperatura de 44°C obtivemos 100% de crescimento nos controles ZFC4 e ZFD4 e em todas as combinações e ausência de crescimento nos controles PE-2, CAT e SA-I.

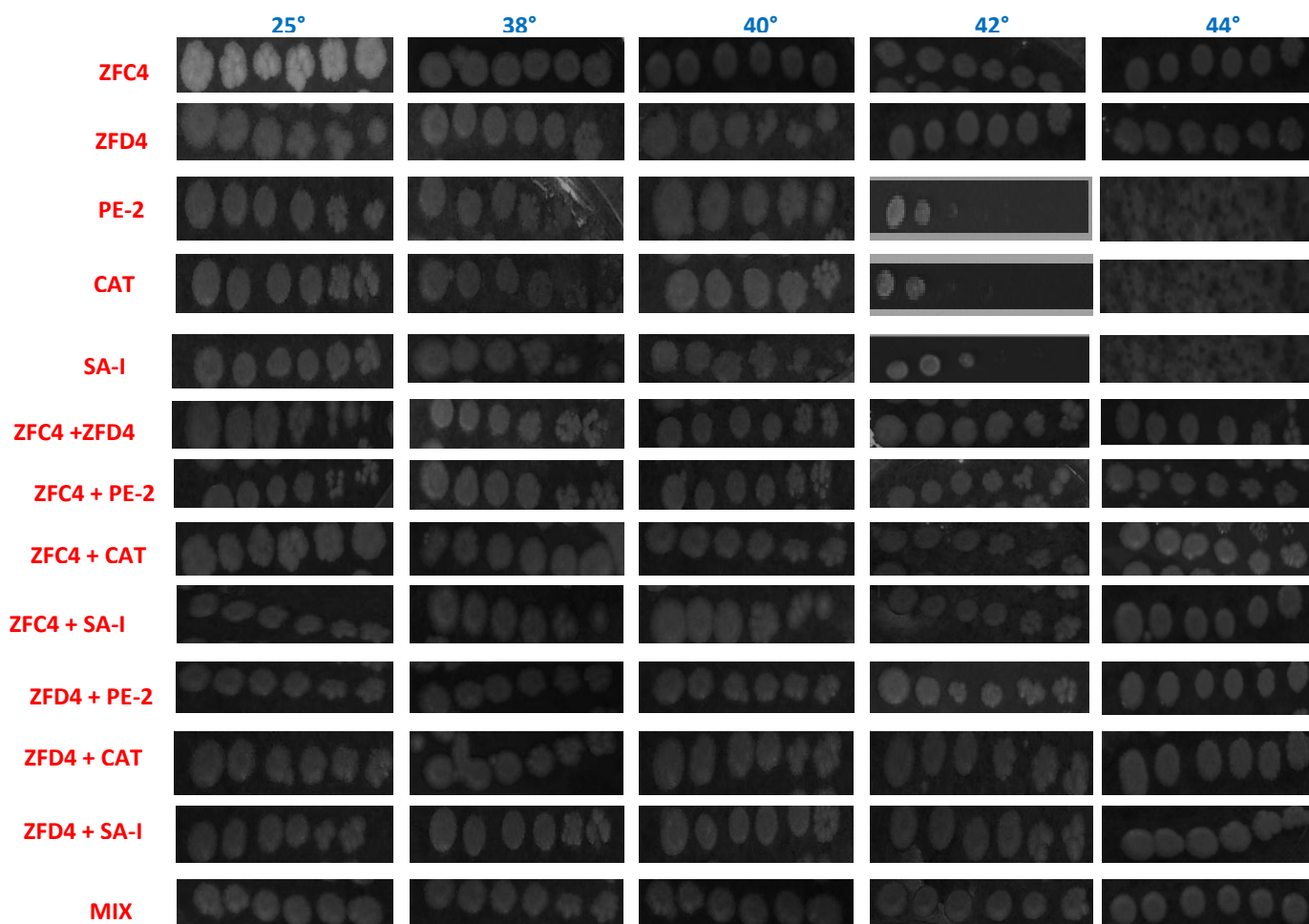


Figura 06: Figura representativa de todos os crescimentos de controles (ZFC4; ZFD4; PE-2; CAT e SA-I) e combinações (ZFC4 + ZFD4; ZFC4 + PE-2; ZFC4 + CAT; ZFC4 + SA-I; ZFD4 + PE-2; ZFD4 + CAT; ZFD4 + SA-I e MIX) em

meio YEPD sólido contendo 12% de etanol, nas condições de temperaturas de 25°C, 38°C, 40°C, 42°C e 44°C.

4.5 Capacidade Fermentativa

Os resultados da capacidade fermentativa foram representados em gráficos. Sendo um somente um com os controles onde obtivemos: para a cepa ZFC4, obtivemos 16% de ART (açúcares redutores) inicial, 4% de ART final e 6% de teor alcoólico. Para a cepa ZFD4, obtivemos 16% de ART inicial, 5% de ART final e 5% de teor alcoólico. Para a cepa PE-2 obtivemos 16% de ART inicial, 7% de ART final e 3% de teor alcoólico. Para a cepa CAT obtivemos 16% de ART inicial, 5% de ART final e 3% de teor alcoólico. Para a cepa SA-I obtivemos, 16% de ART inicial, 5% de ART final e 3% de teor alcoólico.

Para os resultados de combinações obtivemos para ZFC4 + ZFD4: 16% de ART inicial, 7,5% de ART final e 4,6% de teor alcoólico; Para ZFC4 + PE-2: 16% de ART inicial, 5,9% de ART final e 3,1% de teor alcoólico; Para ZFC4 + CAT: 16% de ART inicial, 6,2% de ART final e 3,3% de teor alcoólico; Para ZFC4 + SA-I: 16% de ART inicial, 5,9% de ART final e 3% de teor alcoólico; Para ZFD4 + PE-2: 16% de ART inicial, 6% de ART final e 3,2% de teor alcoólico; Para ZFD4 + CAT: 16% de ART inicial, 6% de ART final e 3,1% de teor alcoólico.; Para ZFD4 + SA-I: 16% de ART inicial, 6% de ART final e 3% de teor alcoólico; MIX: 16% de ART inicial, 7,4% de ART final e 4,4% de teor alcoólico.

A estatística dos gráficos foi realizada segundo ANOVA, com pós-teste Bonferroni, $p < 0,05$.

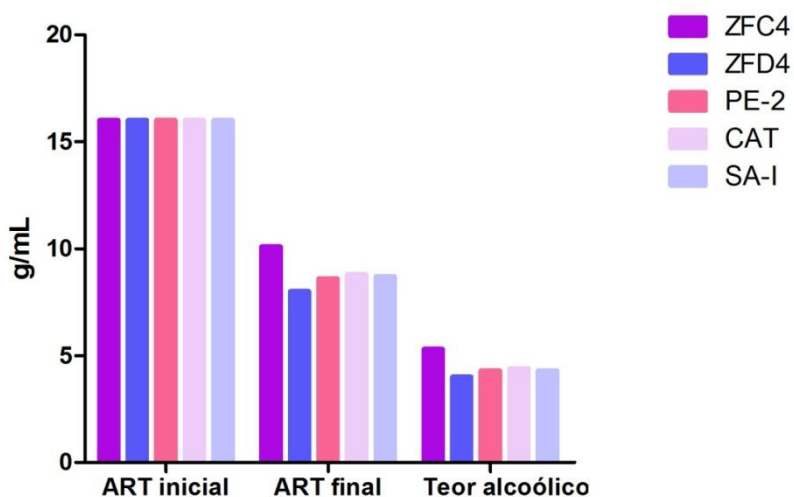


Gráfico 01: Gráfico representativo da capacidade fermentativa dos isolados selecionados ZFC4 e ZFD4 e padrões PE-2, CAT e SA-I, em processo de fermentação, em biorreator de fermentação sobre condição de 08 horas, com estatística segundo ANOVA, com pós -teste Bonferroni, $p < 0,05$.

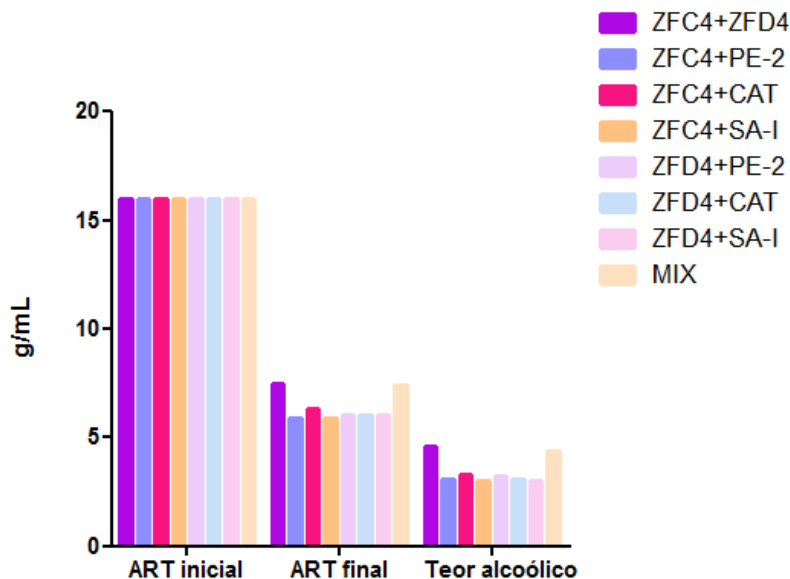


Gráfico 02: Gráfico representativo da capacidade fermentativa das combinações dos isolados selecionados ZFC4 e ZFD4 e controles PE-2, CAT e

SA-I, em processo de fermentação, em biorreator de fermentação sobre condição de 08 horas, com estatística ANOVA, pós-teste Bonferroni, $p < 0,05$.

Tabela 01. Representação dos resultados obtidos através dos ensaios de tolerância, capacidade de crescimento e rendimento de etanol, utilizados para as linhagens isoladas e para as combinações de linhagens.

Linhagens	1	2	3	4	5	6	7	8	9
ZFC4	100%	100%	100%	44°C	12%	13°	16g/mL	8 g/mL	5,3/ mL
ZFD4	100%	100%	100%	44°C	12%	13°	16g/mL	7,1,0g/mL	4,01g/mL
PE-2	100%	100%	100%	42°C	10%	13°	16g/mL	7,4g / mL	4,3g/ mL
CAT	100%	100%	100%	42°C	10%	13°	16g/mL	7,4/ mL	4,4g/mL
SA-I	100%	100%	100%	42°C	10%	13°	16g/mL	7,4/mL	4,3g/mL
ZFC4 + ZFD4	100%	100%	100%	44°C	12%	13°	16g/mL	7,5/mL	4,6g/ mL
ZFC4 + PE-2	100%	100%	100%	44°C	12%	13°	16g/mL	5,9/mL	3,1g/mL
ZFC4 + CAT	100%	100%	100%	44°C	12%	13°	16g/mL	6,2mL	3,3g/ mL
ZFC4 + SA-I	100%	100%	100%	44°C	12%	13°	16g/mL	5,9/mL	3,0g/ mL
ZFD4 + PE-2	100%	100%	100%	44°C	12%	13°	16g/mL	6,0/mL	3,2g/mL
ZFD4 + CAT	100%	100%	100%	44°C	12%	13°	16g/mL	6,0/mL	3,1g/mL
ZFD4 + SA-I	100%	100%	100%	44°C	12%	13°	16g/mL	6,0g/mL	3,0g/mL
MIX	100%	100%	100%	44°C	12%	13°	16g/mL	7,4/mL	4,4g/mL

1: referente ao teste de crescimento celular; número **2:** referente ao teste de assimilação de açúcares – glicose; número **3:** referente ao teste de assimilação de açúcares – sacarose; número **4:** referente ao teste de sensibilidade à temperatura; número **5:** referente ao teste de sensibilidade ao etanol; número **6:** referente ao valor obtido do °Brix após ensaio de fermentação; número **7:** referente ao valor de ART inicial no ensaio de fermentação; número **8:** referente ao valor de ART final no ensaio de fermentação; número **9;** referente ao valor do teor alcoólico obtido com o ensaio de fermentação.

4.5.1 Viabilidade Celular

A viabilidade das células durante o período total de oito horas de fermentação foi de aproximadamente 94% de células viáveis durante o processo de fermentação.

4.5.2 Biomassa

Como resultado obtivemos previamente a curva padrão, como mostra a figura 07. O fator de conversão (F) utilizado foi de 0,90 (mg cel/mL) que foi obtido pelo espectrofotômetro, e representa a correlação entre valores de massa seca e absorbância. Como resultado da fórmula obteve:

$$A = F \times \Delta A \times \text{diluição}$$

Onde o valor F corresponde ao coeficiente angular da curva mostrada na figura 07. A massa seca das suspensões foram de 20,56 mg/mL. A relação linear $Y = A + B \times X$ mostrou os seguintes parâmetros: $A = 1,188$ com desvio padrão de 0,420, $B = 0,6060$ com desvio de 0,3951 e o fator de correlação da reta ($R = 0,9904$). O coeficiente angular ($F = 1/A = 1/1,188$) considerado foi o fator de correlação $F = 0,8417$ com desvio padrão de 0,00146. Ao final obtivemos:

$$X (\text{Concentração de Biomassa mg/mL}) = 0,90 (\text{Abs}) - 0,6060/1,188$$

$$X = 0,90 - 0,510$$

$$X = 0,39 \text{ mg/mL}$$

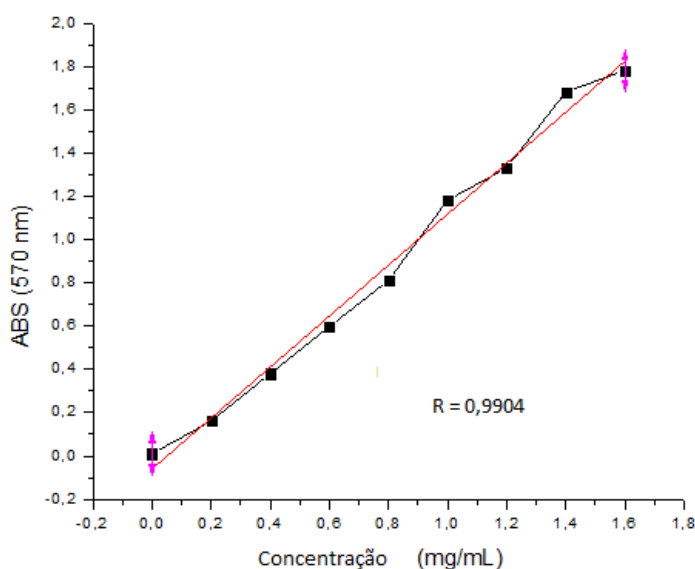
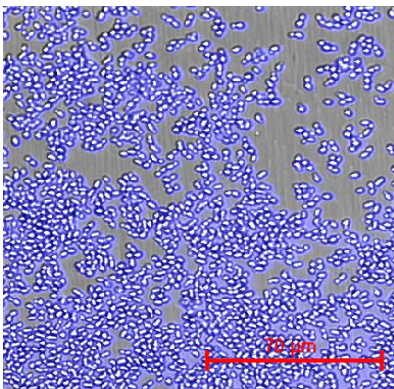
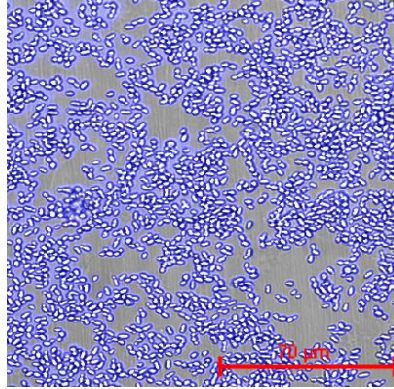
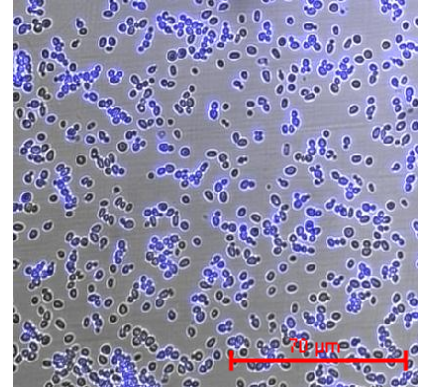
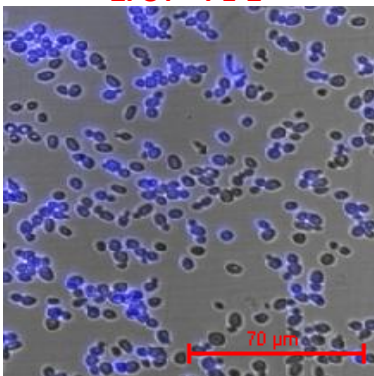
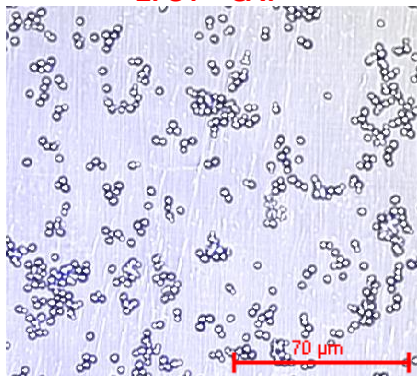
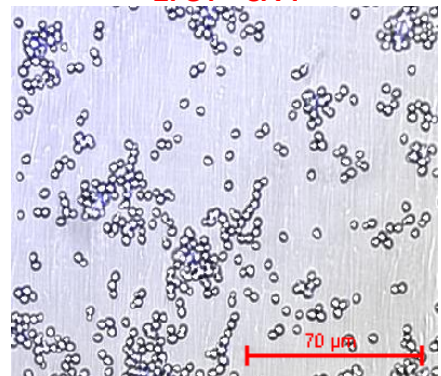
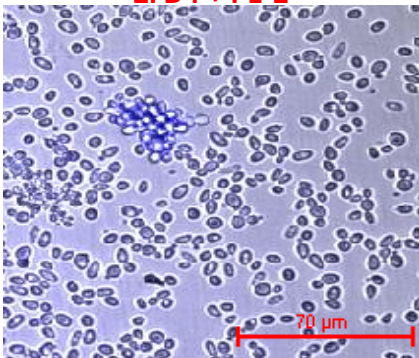
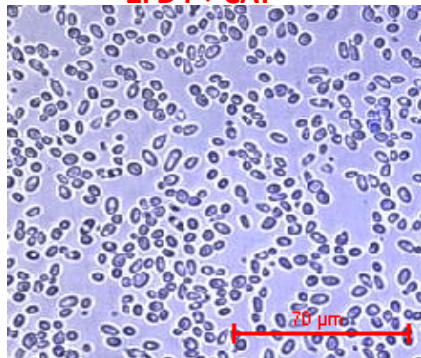
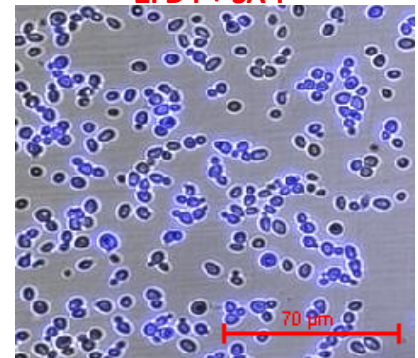


Gráfico 03: Gráfico representativo da curva de biomassa padrão, com valores de absorbância e valor R.

4.6 Análise da Viabilidade Celular obtidas pelo aparelho *In Cell Analyzer* 2000 (GE®)

Como resultado obtive 100% de crescimento das linhagens controles e linhagens em combinação na temperatura de 44°C, meio YEPD líquido acrescido de 12% de etanol, comprovando nas combinações o sinergismo das linhagens para a sua viabilidade e resistência.

ZFC4**ZFD4****ZFC4 + ZFD4****ZFC4 + PE-2****ZFC4 + CAT****ZFC4 + SA-I****ZFD4 + PE-2****ZFD4 + CAT****ZFD4 + SA-I**

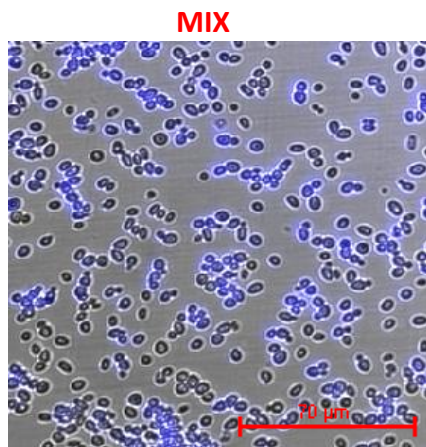


Figura 07: Fotos representativas da viabilidade celular e resistência dos controles e combinações em meio YEPD líquido, acrescido de 12% de etanol, 44°C, 24 horas marcadas com Calcofluor, obtidas no aparelho *In Cell Analyser 2000* (GE®) em objetiva de 20x.

4.7 Formação de Segregantes

Posteriormente após a disseção e transcorrido o tempo de incubação, como resultado do crescimento dos segregantes obtivemos: para ZFC4, 11 segregantes. Para ZFD4, 16 segregantes.

4.7.1 Seleção de Segregantes para Análise Genômica

Posteriormente a disseção e a incubação das tétrades, obtivemos: para cepa ZFC4, 11 segregantes e para a cepa ZFD4, 16 segregantes.

Na etapa de crescimento clonal dos segregantes obtivemos, com cepa ZFC4, 36% de crescimento significativo, identificados como: 1, 2, 4 e 5. Para a cepa ZFD4, 37,5% de crescimento significativo, identificados como: 1B, 2B, 3B, 5A, 7A e 10B.

Na etapa de tolerância a temperatura, obtivemos como resultado, com a cepa ZFC4 100%, mas o segregante 2 foi escolhido por ter um crescimento significativo e robusto. Para a cepa ZFD4, 100%, mas o escolhido foi o segregante 1B por apresentar característica de crescimento significativo e robusto.

4.8 Extração de DNA



Figura 08: Figura do gel de agarose, com corrida de verificação de bandas de DNA para os isolados ZFC4 e ZFD4.

4.8.1 Quantificação de DNA

Como resultados das extrações dos segregantes de DNA, obtivemos as seguintes quantificações com valor de DNA total e pureza nas leituras de A260/A280:

- ZFC4/2: 2619ng/ μ L e pureza de 1.8;
- ZFD4/1B: 1304ng/ μ L e pureza de 1.8;

4.9 Extração de RNA

4.9.1 Quantificação de RNA

Como resultados das extrações das cepas ZFC4 e ZFD4 para RNA, obtivemos as seguintes quantificações com valores de RNA total e pureza nas leituras de A260/A280:

- ZFC4: 1033 ng/ μ L e pureza de 1.8;
- ZFD4: 1509 ng/ μ L e pureza de 1.8;

4.10 Análise Genômica: Sequenciamentos de DNA e RNA

4.10.1 Formação de Bibliotecas de RNA

Para a validação das bibliotecas de RNA das cepas ZFC4 e ZFD4, foram realizadas duas etapas de quantificação. Primeiramente em *BioAnalyser*, com os seguintes resultados:

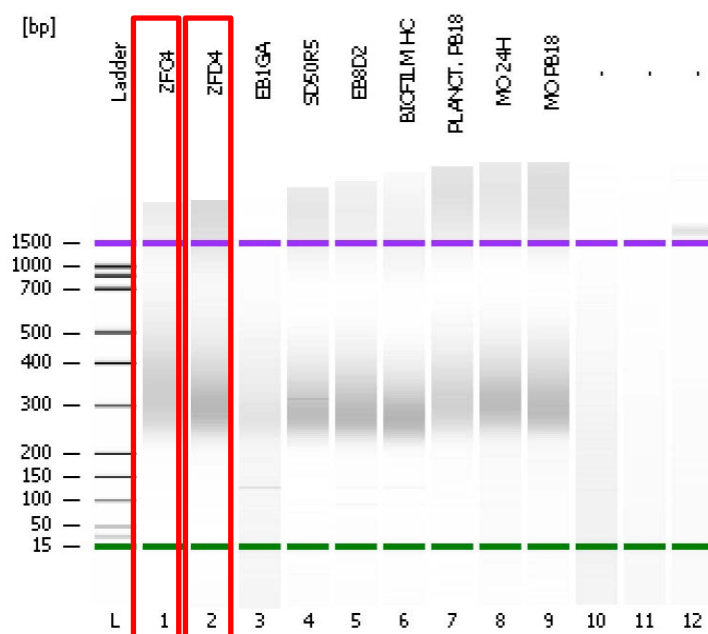


Figura 09: Gel de eletroforese, identificando a integridade das amostras ZFC4 e ZFD4.

ZFC4

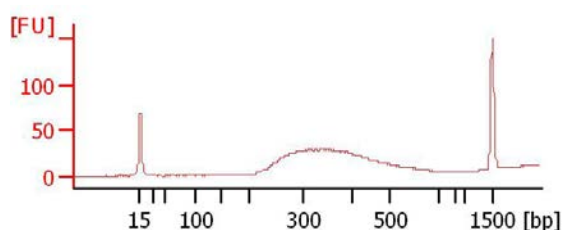


Gráfico 04: Gráfico representativo da integridade da amostra ZFC4 pelo *Bioanalyzer* por meio dos picos das concentrações de RNAs, para formação de bibliotecas.

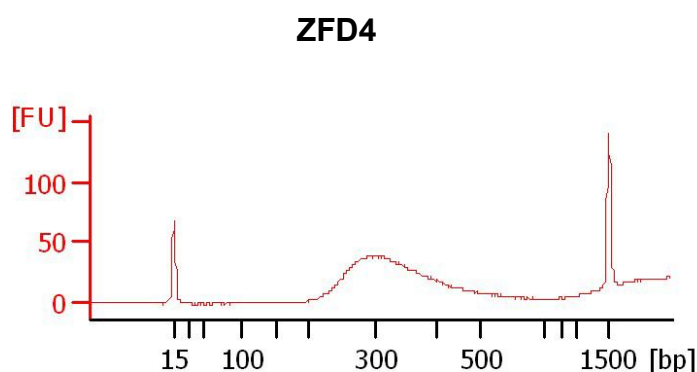


Gráfico 05: Gráfico representativo da integridade da amostra ZFD4 pelo *Bioanalyzer* por meio dos picos das concentrações de RNAs para formação de bibliotecas.

Resultando nas seguintes quantificações:

- ZFC4: 213,66pmol;
- ZFD4: 375,96pmol;

Com a realização da PCR de enriquecimento, obtivemos as seguintes quantificações:

- ZFC4: 1421pmol;
- ZFD4: 1560pmol;

4.10.2 Sequenciamento RNA

Obtivemos com o sequenciamento de RNA cerca de 6000 genes expressos.

4.11 Bioinformática

O sequenciamento de RNA ou transcritoma, obtivemos cerca de 6000 genes expressos para as duas linhagens selecionadas ZFC4 e ZFD4. O resultado obtido pela análise de bioestatística mostrou que entre as linhagens ZFC4 e ZFD4 não houve diferença significativas de expressão na maioria dos genes.

Foram selecionados e analisados 606 genes descritos na tabela 02 (Anexo I), com os seguintes resultados:

- Genes relacionados à viabilidade celular: 04 genes foram analisados e destes, dois genes (ACC3 e ARN1) apresentaram maior expressão para a linhagem ZFC4 e dois genes (ACC1 e ARN2) apresentaram expressão maior para a linhagem ZFD4.
- Genes relacionados ao crescimento celular: 108 genes analisados, destes 46% (50) apresentaram maior expressão para a linhagem ZFC4 e 54% (58) apresentaram maior expressão para a linhagem ZFD4.
- Genes relacionados à Membrana Plasmática: 72 genes analisados, destes 47% (35) apresentaram maior expressão para a linhagem ZFC4 e 53% (37) apresentaram maior expressão para a linhagem ZFD4.
- Genes relacionados à Parede Celular: 02 genes analisados, destes um gene (ACK1) apresentou maior expressão para a linhagem ZFC4 e um gene (EMW1) apresentou maior expressão para a linhagem ZFD4.
- Genes relacionados à Vesículas: 76 genes analisados, destes 58% (44) apresentaram maior expressão para a linhagem ZFC4 e 42% (32) apresentaram maior expressão para a linhagem ZFD4.
- Genes relacionados à Esporulação: 04 genes analisados, destes três (ACF2, ACF4 e ROM1) apresentaram maior expressão para a linhagem ZFC4 e um (ROM2) apresentou maior expressão para a linhagem ZFD4.
- Genes relacionados a Metabolismo de Aminoácidos: 63 genes analisados, destes 19% (12) apresentaram maior expressão para a linhagem ZFC4 e 81% (51) apresentaram maior para a linhagem ZFD4.
- Genes a Biossíntese de Pirimidinas/Purinas: 20 genes analisados, destes 55% (11) apresentaram maior expressão para a linhagem ZFC4 e 45% (9) apresentaram maior expressão para a linhagem ZFC4.

- Genes relacionados à Assimilação de Açúcares : 19 genes analisados, destes 47% (9) apresentaram maior expressão para a linhagem ZFC4 e 53% (10) apresentaram maior expressão para a linhagem ZFD4.
- Genes relacionados a Gliconeogênese/Glicólise : 08 genes analisados, destes 50% (4) apresentaram maior expressão para a linhagem ZFC4 e 50% (4) apresentaram maior expressão para a linhagem ZFC4.
- Genes relacionados a Metais: 13 genes analisados, destes 30% (4) apresentaram maior expressão para a linhagem ZFC4 e 70% (9) apresentaram maior expressão para a linhagem ZFD4.
- Genes relacionados a Resistência : 51 genes analisados, destes 39% (20) apresentaram maior expressão para a linhagem ZFC4 e 61% (31) apresentaram maior expressão para a linhagem ZFD4.
- Genes relacionados a Floculação: 54 genes analisados, destes 46% (25) apresentaram maior expressão para a linhagem ZFC4 e 54% (29) apresentaram maior expressão para a linhagem ZFD4.
- Genes relacionados à Biomassa: 05 genes analisados, destes três (HAP1, HAP2 e HAP4) apresentaram maior expressão maior para a linhagem ZFC4 e dois (HAP3 e HAP5) apresentaram maior expressão para a linhagem ZFD4.
- Genes relacionados à Respiração Celular: 37 genes analisados, destes 16% (06) apresentaram maior expressão para a linhagem ZFC4 e 84% (31) apresentaram maior expressão para a linhagem ZFD4.
- Genes relacionados à Capacidade Fermentativa: 52 genes analisados, destes 42% (22) apresentaram maior expressão para a linhagem ZFC4 e 58% (32) apresentaram maior expressão para a linhagem ZFD4.
- Genes relacionados a Estresse Oxidativo: 18 genes analisados, destes 55% (10) apresentaram maior expressão para a linhagem ZFC4 e 45% (8) apresentaram maior expressão para a linhagem ZFD4.

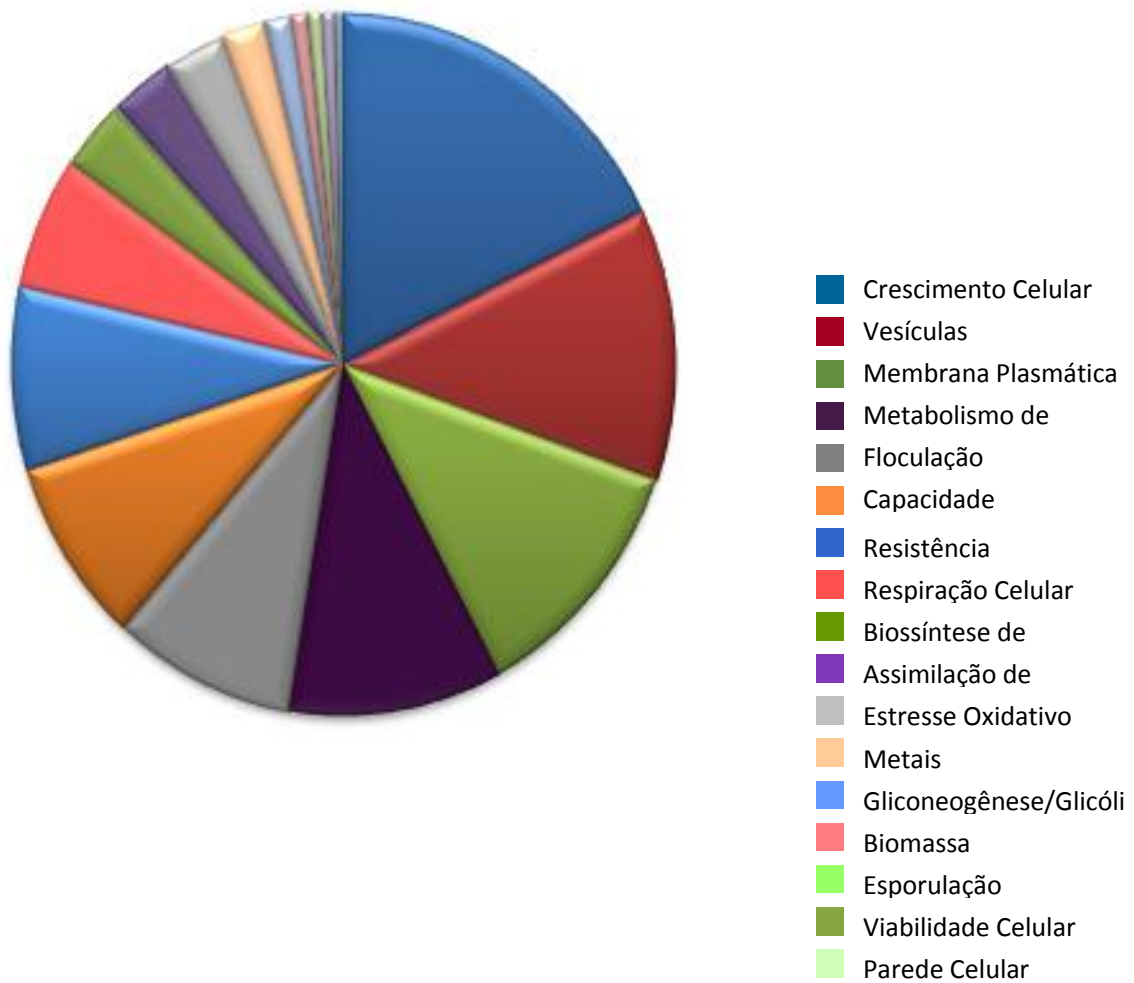


Gráfico 06: Representação das expressões gênicas dos isolados selecionados ZFC4 e ZFD4, concomitante com seu gene alvo, relacionados com fermentação alcoólica

5.0 Discussão

A levedura ideal é um fator determinante para o sucesso na produtividade. Condições estressantes impostas pelo meio fermentativos afetam o metabolismo das células, levando a perda de viabilidade celular e a capacidade de fermentação (Basso et al., 2008). A estratégia de selecionar linhagens adequadas para começar como um novo inóculo de produção de bioetanol, levou a busca de características importantes da fermentação como, a resistência ao estresse osmótico, temperatura e etanol. Considerando que o caldo da fermentação começa com uma concentração elevada de sacarose (± 20 % peso/vol.), prossegue com temperaturas elevadas (± 40 ° C) até que cada ciclo de fermentação com elevada concentração de etanol (6-8 % vol/vol) (Oliveira et al., 2008), e cepas que são resistentes a estas condições naturais são mais adequadas, mostrando características de tolerar estas desfavoráveis condições impostas pelo processo industrial .

Os testes de exclusão ao estresse foram realizados para selecionar as leveduras que foram capazes de apresentar resistência a osmolaridade. Um dos primeiros parâmetros foi às altas concentrações de glicose e sacarose testadas, visto que, o início da fermentação encontra-se com um volume inicial de açúcares elevados. Neste parâmetro todos os isolados e combinações apresentaram resistência ao fator de estresse osmótico 20 % de glicose e 20% sacarose, sendo um fator importante na seleção de leveduras para a fermentação.

A fim de atingir uma seleção minuciosa, outros parâmetros essenciais de osmolaridade foram realizados, teste de resistência a temperaturas e concentrações de etanol. A capacidade de se adaptar às mudanças naturais na osmolaridade do meio circundante fermentativo é essencial a sobrevivência da levedura, e a acumulação de solutos compatíveis para diminuir potencial ação hidrofóbica é uma estratégia de adaptação empregue por todos os tipos de células, levando assim a uma maior resistência (Rep et al., 2000).

Os isolados testados de início e final da safra de cana de açúcar resultaram como sendo mais resistentes as temperaturas e concentração de etanol.

Estudos sugerem que por ser final de safra estes isolados, adquiriram certa resistência devido à pressão ambiental sofrido durante o processo de fermentação, como fator chave para tolerar tensões encontradas durante a fermentação alcoólica, entretanto o isolado do início da fermentação, estudos apontam como tendo essa resistência nata (Ramos et al., 2013). Esse fenótipo de resistência é repetido quando essas leveduras são submetidas a estes testes em combinações, onde todos apresentam uma resistência elevada a temperatura e etanol. Assim, as linhagens ZFC4 e ZFD4 são provavelmente capazes de sobreviver até ao final do processo fermentativo em elevadas concentrações de etanol e diferentes temperaturas. Os mecanismos pelos quais as leveduras se protegerem destes fatores podem ser o acúmulo de síntese de trealose, de chaperonas e a síntese de enzimas antioxidantes (Tanghe et al., 2006).

Para avaliar qualitativamente e quanticamente a capacidade fermentativa dos isolados, foi elaborado num meio sólido YEPD contendo duas fontes principais de carbono, glicose e sacarose. Diferenças na assimilação e fermentação de compostos de carbono são importantes critérios na taxonomia e identificação de leveduras, uma vez que estes microrganismos têm uma variação diversa na sua capacidade para fermentar os açúcares. Quanticamente os isolados em combinação foram fermentados durante oito horas sem reciclagem celular. A produtividade média de todas as linhagens, é semelhante a cada variabilidade semelhante dentro de cada fenótipo particular. Valores isoladamente das linhagens mostram uma variação de 3,5-5,0g/mL, nas cinéticas de combinações que apresentou semelhante variabilidade cinética entre as linhagens combinadas, onde essa variação se manteve nessa mesma faixa como mostra os gráficos 2 e 3, ressaltando os resultados para a linhagem ZFC4 e suas combinações por apresentarem uma superioridade em geral na produtividade do bioetanol (Andrietta et al. , 2007). A conversão de substrato em biomassa, no processo fermentativo representa a capacidade de crescimento de uma linhagem utilizar o meio de fermentação concomitante com sua oxigenação. No resultado as linhagens em combinação foram capazes de utilizar carboidratos para converter parte em etanol e em parte biomassa, onde

estudos semelhantes apontam um bom equilíbrio entre esses parâmetros (Marini et al., 2009).

A resposta a essas adaptações sofridas pela levedura em todo processo de fermentação, pode estar relacionadas à maquinaria genômica dessa célula, onde estudos revelam que uma ideia interessante seria fornecer o local ou grupo de genes importantes para a adaptação a um ambiente fermentativo (Stambuk et al., 2009). Com o resultado de 606 genes relacionados ao processo de fermentação obtidos através do transcriptoma comparativo de nossas leveduras, podemos ressaltar a ideia de genes específicos a este processo, concomitante com as características fenotípicas das linhagens. Barrio, 2006 e colaboradores ainda afirmam em estudos que muitos destes genes podem não ser essenciais à levedura *Saccharomyces cerevisiae*, mas podem ter um fator importante na adaptação a novas condições ambientais dessa levedura.

Em relação aos parâmetros essenciais no processo fermentativo como viabilidade celular e glicólise foi observado um equilíbrio de expressão e número de genes estudados nas duas linhagens (ZFC4 e ZFD4). Em contrapartida parâmetros importantes no processo fermentativo como crescimento celular, assimilação de açúcares, capacidade fermentativa, resistência, estresse oxidativo entre outros, obtiveram níveis de expressão diferentes nas duas linhagens.

Níveis superiores de expressão de genes relacionados ao crescimento celular foram encontrados na linhagem ZFD4. Estudos mostraram que a versatilidade da levedura de renovar sempre, ou seja, aumentar o número de células para sua sobrevivência nas fases de adaptações a uma nova condição é essencial, visto que o aumento de crescimento está envolvido na homeostase celular e na relação célula-célula (Ibanez et al. 2013). Essa relação é comprovada quando parâmetros como assimilação de açúcares, metabolismo de aminoácidos, assimilação de metais, respiração celular e principalmente resistência, importantes no processo fermentativo também são mais expressos, isso foi evidenciado na levedura ZFD4.

Uma levedura tolerante pode ser um fator crucial para a produção de bioetanol, visto que alterações de temperatura e concentrações de etanol são encontradas a todo o momento no meio fermentativo. O etanol em elevadas concentrações pode ser um interferente no crescimento celular, atuando como inibidor de divisão celular, inibidor de viabilidade e aumentando o nível de morte celular (Birch et al. 2000). Metabolismo de biossíntese de macromoléculas, como proteínas *heat shock*, perda de RNA e acúmulo de proteínas, mutações, alterações de metabolismos celulares e redução de atividade enzimática também são afetadas com elevadas concentrações de etanol (Hu et al. 2007). Estudos apontam que em leveduras os principais sítios que o etanol pode atuar são nas membranas celulares, hidrofília e hidrofobia de proteínas e retículo endoplasmático (Walker et al. 1998). Essa resistência pode ser compreendida com a expressão de genes encontrados de resistência, que podem estar associados com a melhora de transporte de mecanismos, células de superfície, metabolismo de lipídeos, conteúdo energético da célula semelhante ao estudo de Fujita et al. 2004.

Estudos sugerem que o estresse etanólico em *S. cerevisiae* é compreendida por restrições sobre a produção de energia, o que leva ao aumento da expressão dos genes associados com a glicólise e a função mitocondrial (Stanley et al. 2010), comprovados pelos superiores níveis de expressão dos genes relacionados a respiração celular e capacidade fermentativa apresentado na levedura ZFD4.

Essas características também são encontradas quando elucidamos a alterações de temperatura, visto que em muitos casos de estresse por temperatura, a termotolerância é adquirida logo nas primeiras alterações de temperatura e visto nas expressões de genes específicos de termotolerância como os HSps (Stanley et al. 2010).

Estudos sugerem que a manutenção da função vacúolo é importante para a tolerância ao etanol e temperatura, possivelmente porque uma das funções desta organela está relacionada com volume de proteína e manutenção homeostática de íons (Holmes-Hampton et al., 2013). Essa relação pode ser vista na levedura ZFC4 que apresenta um nível superior de expressão para

genes relacionados a vesículas e estresse oxidativo, adicionando as características fenotípicas da levedura, sugerindo uma resistência relativa.

Genes relacionados a metabolismo de aminoácidos, biossíntese de pirimidinas, biomassa foram analisados. O estudo de Clemet e colaboradores (2013) sugere que determinadas alterações metabólicas podem ser acionados de acordo com a natureza do aminoácido fornecido, semelhante ao resultado de genes expressos relacionados a aminoácidos, como os ARGs, PROPs, LYS, entre outros, envolvidos na produção de bioetanol. Biossíntese de pirimidinas podem estar acopladas a vários metabolismos essenciais para a célula em estado de fermentação, esse modelo é visto no estudo de Xu e colaboradores (2012), que sugerem uma nova estratégia para melhorar a produção de piruvato e reduzir subprodutos metabólicos através de regulação da síntese de pirimidinas, ligados a fermentação. Estudos também mostram que desde que os compostos de geração de sulfito têm sido utilizados como agentes antimicrobianos em fermentação alcoólica, a tolerância de sulfito em levedura é outra característica desejada para a produção de bioetanol a partir do açúcar caldo de cana conforme visto nas leveduras ZFC4 e principalmente na linhagem ZFD4 (Walker et al. 1998).

As linhagens ZFC4 e ZFD4 expressaram os mesmos genes, porém os níveis de expressão são diferentes entre elas. Em nosso estudo foi mostrado que estas diferenças estavam presentes na determinação das características fenotípicas e na identidade de cada linhagem. Através da expressão comparativa dos genes, podemos sugerir que a ZFD4 é uma linhagem completa para o processo de obtenção de etanol. Assim sugerimos que o histórico de evolução destas linhagens ocorreu pela adaptação da ZFC4 por possuir todos os genes essenciais para uma linhagem padrão e posteriormente com a pressão seletiva favorável no processo foi adaptada ao estresse e tornou-se ideal. Dados fornecidos pelo sequenciamento do genoma comparativo entre as duas linhagens e em comparação com padrões serão necessários para concluir esta hipótese. Nosso estudo contribuiu para a melhoria do processo de produção de etanol, pois mais uma nova linhagem poderá ser utilizada em combinação para o aumento do rendimento trazendo maior viabilidade do processo semi-contínuo.

6.0 CONCLUSÃO

- Todas as linhagens testadas isoladamente ou em combinação foram capazes de crescer e assimilar glicose e sacarose 100% e em todos os testes de tolerância e rendimento principalmente nas combinações das novas linhagens com os padrões houve sinergismo.
- As linhagens ZFC4 e ZFD4 potencializaram a tolerância à temperatura dos padrões PE-2, CAT e SA-I quando combinadas.
- As linhagens ZFC4 e ZFD4 potencializaram a tolerância ao etanol dos padrões PE-2, CAT e SA-I quando combinadas.
- O rendimento de etanol da linhagem ZFD4 foi semelhante ao dos padrões, entretanto a linhagem ZFC4 foi superior aos dos padrões das usinas sucroalcooleiras brasileiras.
- Para a combinação de todas (MIX) o rendimento de etanol foi melhor, sugerindo novas combinações sinérgicas encontradas para a melhoria do processo em geral.
- Foram isoladas duas novas linhagens para melhorar o processo de fermentação para produção de etanol, sugerindo que estas poderiam se tornar padrões.
- Foi possível realizar a esporulação e dissecção de tétrades das duas linhagens para a formação de segregantes homozigotos, onde posteriormente será sequenciado genoma completo.
- O sequenciamento global do RNA (transcritoma) das duas linhagens mostrou que genes relacionados ao processo de produção de etanol estavam expressos diferencialmente.
- As duas linhagens selecionadas podem contribuir para a melhoria do controle e rendimento do processo de produção de etanol.

7.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMORIM, H.V.; LEÃO, R.M.; Alcoholic fermentation and Science and technologies. **Fermentec J.** v.1. p. 1-44, 2005.

AMORIM, H.V.; LOPES, M.L. Ethanol production in a petroleum dependent world: the Brazilian experience. **Sugar J.** v. 67. p. 11-14, 2005.

AMORIM, H.V.; LOPES, M.L.; OLIVEIRA, J.V.C.; BUCKERIDGE, M.S.; GOLDMAN, G.H. Scientific challenges of bioethanol production in Brazil. **Appl Microbiol Biotechnol.** v. 91. p. 1267-75, 2011.

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

ANSORGE, W.J. Next-generation DNA sequencing techniques. **N Biotechnol.** v. 25. p. 195-203, 2009.

BAI, F.W.; ANDERSON, W.A.; MOO-YOUNG, M. Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks. **Biotechnol.** v. 26. p. 89-105, 2008.

BARBRZADEH, F.; JALILI, R.; WANG, C.; SHOKRALLA, S.; PIERCE, S.; ROBINSON-MOSHER, A.; NYREN, P.; SHAFER, R.W.; BASSO, L.C.; AMORIM, H.V.; OLIVEIRA A.J.; DAVIS, R.W.; RONAGHI, M.; GHARIZADEH, B.; STAMBUK, B.U. Whole-genome sequencing of the efficient industrial fuel-ethanol fermentative *Saccharomyces cerevisiae* strain CAT-1. **Mol Genet Genomics.** v. 287. p. 485-94, 2012.

BARRIO, E.; GONZÁLEZ, S.S.; ARIAS, A.; BELLOCH, C.; QUEROL, A. Molecular mechanisms involved in the adaptive evolution of industrial yeasts. **Spring-Verlag.** p. 153-74, 2006.

BASÍLIO, A.C.M.; ARAÚJO, P.R.L.; MORAIS, J.O. F.; SILVA FILHO, E.A.; MORAIS, M.A.; SIMÕES, D.A. Detection and identification of wild yeast

contaminants of the industrial fuel ethanol fermentation process. **Curr Microbiol.** v. 56. p. 322-26, 2008.

BASSO, L.C.; AMORIM, H.V.; OLIVEIRA, A.J.; LOPES, M.L. Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil. **FEMS Yeast Res.** v. 8. p. 1155-63, 2008.

BENTLEY, D.R.; BALASUBRAMANIAN, S.; SWERDLOW, H.P.; SMITH, G.P.; MILTON, J.; BROW, C.G.; HALL, K.P.; EVERS, D.J.; BARNES, C.L.; BIGNELL, H.R.; BOUTELL, J.M.; BRYANT, J.; KEIRA, R.C.; COX, A.J.; ELLIS, D.J.; FLATBUSH, M.R.; GORMLEY, N.A.; HUMPHRAY, S.J.; IRVING, L.J.; SMITH, A.J. Accurate whole human genome sequencing using reversible terminator chemistry. **Nature.** v. 456. p. 53-9, 2008.

BING-ZHI, L.; JING-SHENG, C.; QIAO, B.; YING-JIN, Y. Genome-wide transcriptional analysis of *Saccharomyces cerevisiae* during industrial bioethanol fermentation. **J In Microbiol Biotechnol.** v. 37. p. 43-55, 2010.

BIRCH, R.M.; WALKER, G.M. Influence of magnesium ions on heat shock and ethanol stress responses of *Saccharomyces cerevisiae*. **Enzyme Microb Technol.** v. 26. p. 678-87, 2000.

BORNEMAN, A.R.; DESANY, B.A.; RICHES, D.; AFFOURTIT, J.P.; FORGAN, A.H.; PRETORIUS, I.S. The genome sequence of the wine yeast VIN7 reveals an allotetraploid hybrid genome with *Saccharomyces kudriavzevii* and *Saccharomyces cerevisiae* origins. **FEMS Yeast Res.** v. 12. p. 88-96, 2012.

BORNEMAN, A.R.; DESANY, B.A.; RICHES, D.; AFFOURTIT, J.P.; MORGAN, A.H.; PRETORIUS, I.S. Whole-genome comparison reveals novel genetic elements that characterize the genome of industrial strains of *Saccharomyces cerevisiae*. **Plos Genet.** v. 7. p. 1-10, 2011.

BORNEMAN, A.R.; PRETORIUS, I.S.; CHAMBERS, P.J. Comparative genomics: a revolutionary tool for wine yeast strain development. **Curr. Opin. Biotechnol.** v. 24. p. 192-99, 2013.

BROW, N.A.; CASTRO, P.A.; FIGUEIREDO, B.C.P.; SAVOLDI, M.; BUCKERIDGE, M.S.; LOPES, M.L.; PAULLILO, S.C.L.; BORGES, E.P.; AMORIM, H.V.; GOLDMAN, M.H.S.; BONATTO, D.; MALAVAZI, I.; GOLDMAN,

G.H. Transcriptional profiling of Brazilian *Saccharomyces cerevisiae* strains selected for semi-continuous fermentation of sugarcane must. **FEMS Yeast Res.** v. 13. p. 277-90, 2013.

CAMARASA, C.; SANCHEZ, I.; BRIAL, P.; BIGELY, F.; DEQUIN, S. Phenotypic landscape of *Saccharomyces cerevisiae* during wine fermentation: evidence for origin-dependent metabolic traits. **Plos One.** v. 6. p. 1-12, 2011.

CANILHA, L.; CHANDEL, A.K.; MILESSI, T.S.S.; ANTUNES, F.A.F.; FREITAS, W.L.C.; FELIPE, M.G.A.; SILVA, S.S. Bioconversion of sugarcane biomass into ethanol: an overview about composition, pretreatment methods, detoxification of hydrolysates, enzymatic saccharification and ethanol fermentation. **J Biomedicine and Biotechnology.** v. 2. p. 1-15, 2012.

CHEN, R.; MIAS, G.I.; LI-POOK-THAN, J. Personal omics profiling reveals dynamic molecular and medical phenotypes. **Cell.** v. 148. p.1293- 1307, 2012.

CHENG, J.S.; QIAO, B.; YING-JIN, Y. Comparative proteome analysis of robust *Saccharomyces cerevisiae* insights into industrial continuous and batch fermentation. **Appl Microbiol Biotechnol.** v. 81. p. 327-38, 2008.

CHENG, J.S.; ZHOU, X.; DING, M.Z.; YING-JIN, Y. Proteomic insights into adaptive responses of *Saccharomyces cerevisiae* to the repeated vacuum fermentation. **App Microbiol Biotechnol.** v. 83. p. 909-23, 2009.

CHRISTOFOLETTI, C.A.; ESCHER, J.P.; CORREIA, J.E.; MARINHO, J.F.; FONTANETTI, C.S. Sugarcane vinasse: environmental implications of its use. **Wast Manag.** v. 33. p. 2752-61, 2013.

CLARKE, J.; WU, H.C.; JAYASINGHE, L.; PATEL, A.; REID, S.; BAYLEY, H. Continuous base identification for single-molecule nanopore DNA sequencing. **Nat Nanotechnol.** v. 4. p. 265-70, 2009.

CLEMENT, T.; PERES, M.; MOURET J.R.; SANCHEZ, I.; SABLAYOLLES, J.M.; CAMARASA, C. Metabolic responses of *Saccharomyces cerevisiae* to wine ammonium pulses during four-stage continuous wine fermentations. **Appl Environ Microbiol.** v. 79. p. 2749-58, 2013.

CONAB. Levantamento da safra 2013/2014 – Dez 2013. Disponível em: www.conab.gov.br. Acessado em 06 de Dezembro, 2013, 10:25.

CUBILLOS, F.A.; BILLI, E.; ZORGO, E.; PARTS, L.; FARGIER, P.; OMHOLT, S. Assessing the complex architecture of polygenic traits in diverged yeast populations. **Mol Ecol**. v. 20. p. 1401-13; 2011.

ENSINAS, A.V.; MODESTO, M.; NEBRA, S.A.; SERRA, L. Reduction of irreversibility generation in sugar and ethanol production from sugarcane. **Energy**. v. 34. p. 680-88, 2009.

FLUSBERG, B.A.; WEBSTER, D.R.; LEE, J.H.; TRAVERS, K.J.; OLIVARES, E.C.; CLARK, T.A.; KORLACH, J.; TURNER, S.W. Direct detection of DNA methylation during single-molecule, real-time sequencing. **Nat Methods**. v. 7. p. 461-65, 2010.

FREDERICK, D.; STEPHEN, P.; MATTHEW, T. W.; STEPHEN, R. Q.; EUAN, A.A. DNA sequencing: Clinical applications of new DNA sequencing technologies. **Circulation**. n. 125, v. 7.p. 931-944, 2012.

FUJITA, K.; MATSUYAMA, A.; KOBAYASHI, Y.; IWAHASHI, H. Comprehensive gene expression analysis of the response to straight-chain alcohols in *Saccharomyces cerevisiae* using cDNA microarray. **J Appl Microbiol**. v. 97. p. 57-67, 2004.

GATTAS, E.A.L.; TINNIS, C.R.C.S. ; LALUCE, C. Kit econômico de aplicação na rotina industrial para ensaios de glicerol, malato e etanol. **BR**. 2002.

GIBSON, B.R.; LAWRENCE, S.J.; LECLAIRE, J.P.; POWELL, C.D.; SMART, K.A. Yeast responses to stress associated with industrial brewery handling. **FEMS Microbiol**. v. 31. p. 535-69, 2007.

GIBSON, B.R.; LAWRENCE, S.J.; LECLAIRE, J.P.; POWELL, C.D.; SMART, K.A. Yeast responses to stress associated with industrial brewery handling. **FEMS Microbiol Rev**. v. 31. p. 535-69, 2007.

GOLDEMBERG, J. The Brazilian biofuels industry. **Biotechnol Biofuels**. v. 1. p. 6-15, 2008.

GUT, I. G. New sequencing technologies. **Clin Trans Oncol**. v. 15. p. 879-81, 2013.

HAN, P.P.; YING-JIN, Y. Lipidomic analysis reveals activation of phospholipid signaling in mechanotransduction of *Taxus cuspidate* cells in response to shear stress. **FABES J**. v. 23. p. 623-30, 2009.

HECTOR, R.E.; MERTENS, J.A.; BOWMAN, M.J.; NICHOLS, N.N.; COTTA, M.A.; HUGHES, S.R. *Saccharomyces cerevisiae* engineered for xylose requires gluconeogenesis and the oxidative branch of the pentose phosphate pathway for aerobic xylose assimilation. **Yeast**. v. 28. p. 645-60, 2011.

HOLMES-HAMPTON, G.P.; JHURRY, N.D.; Mc CORMICK, S.P.; LINDAHL, P.A. Iron content of *Saccharomyces cerevisiae* cells grown under iron-deficient and iron-overload conditions. **Biochemistry**. v. 52. p. 105-14, 2013.

HU, X.H.; WANG, M.H.; TAN, T.; LI, J.R.; YANG, H.; LEACH, L.; ZHANG, R.M.; LUO, Z.W. Genetic dissection of ethanol tolerance in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Genetics**. v. 175. p. 1479-87, 2007.

IBÁÑEZ, C.; PÉREZ-TORRADO, R.; CHIVA, R.; GUILLAMÓN, J.M.; BARRIO, E.; QUEROL, A. Comparative genomic analysis of *Saccharomyces cerevisiae* yeasts isolated from fermentations of traditional beverages unveils different adaptive strategies. **Int J Food Microbiol**. v. 3. p. 129-35, 2014.

International Human Genome Sequencing Consortium. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. **Nature**. v. 431. p. 931-45, 2004.

International Human Genome Sequencing Consortium. Initial sequencing and analysis of the human genome. **Nature**. v. 409. P. 860-21, 2001.

JONES, R.P.; PAMMEN, N.; GREENFIELD, P.F. Alcohol fermentation by yeast: the effect of environmental and other variables. **Process in Biochemistry**. v. 16. p. 42-49, 1981.

LIDZBARRSKY, G.A.; SHKOLNIK, T.; NEVO, E. Adaptive response to DNA-damaging agents in natural *Saccharomyces cerevisiae* populations from "Evolution Canyon", Mt. Carmel, Israel. **Plos One**. v. 4. p. 1-8, 2009.

LIEBERMAN, K.R.; CHERF, G.M.; DOODY, M. J.; OLASAGASTI, F.; KOLODJI, Y.; AKESON, M. Processive replication of single DNA molecules in a nanopore catalyzed by phi29 DNA polymerase. **J Am Chem Soc.** v. 132. p. 1761-72, 2010.

LIN, F.M.; QIAO, B.; YING-JIN, Y. Comparative proteomic analysis of tolerance and adaptation of ethanologenic *Saccharomyces cerevisiae* to furfural, a lignocellulosic inhibitory compound. **Appl Environ Microbiol.** v. 75. p. 3765-76, 2009.

LIN, Y.; TANAKA, S. Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospects. **Applied Microbiology and Biotechnology.** v. 69. p. 627-42, 2006.

LITI, G.; CARTER, D.M.; MOSES, A.M.; WARRINGER, J.; JAMES, S.A. Populations genomics of domestic and wild yeasts. **Nature.** v. 458. p. 337-41, 2009.

MACEDO, I.C.; SEABRA, J.E.A.; SILVA, J.E. Green house gases emissions in the productions and use of ethanol from sugarcane in Brazil: the 2005/2006 averages and a prediction for 2020. **Biomass and Bioenergy.** v. 32. p. 582-95, 2008.

MANUAL DE RECOMENDAÇÕES. Conservação de Energia na Indústria do Açúcar e do Alcool. **Instituto de Pesquisa Tecnologia.** v. 1817. p. 796, 1990.

MARINI, M.M.; GOMES, F.C.O.; SILVA, C.L.C.; CADETE, R.M.; BADOTTI, F.; OLIVEIRA, E.S.; CARDOSO, C.R.; ROSA, C.A. The use of selected starter *Saccharomyces cerevisiae* strains to produce traditional and industrial cachaça: a comparative study. **World Journal of Microbiology and Biotechnology.** v. 25. p. 235-42, 2009.

MAXAM, A.A.M.; GILBERT, W. A new method for sequencing DNA. **Proc Natl Acad Sci USA.** v. 74. p. 560-64, 1977.

MONTIMER, R.; ROMANO, P.; SUZZI, G.; POLSINELLI, M. Genome renewal: a new phenomenon revealed from a genetic study of 43 strains of

Saccharomyces cerevisiae from natural fermentation of grape musts. **Yeast**. v. 10. p. 1543-52, 1994.

MOREIRA, J.R.; GOLDEMBERG, J. The Alcohol Program, 1996. Disponível em: www.mct.gov.br. Acesso em 12 de Novembro, 2013, 14:20.

NETO, M.A.T. Characterization of sugarcane trash and bagasse. **PNUD and CTC**. p. 24, 2005.

OLIVEIRA, A.J. Microbiological control methods for the production of sugar and ethanol. **Fermentec J**. v. 2. p. 21-30, 2008.

OLIVEIRA, E.S. History of alcoholic fermentation. **Fermentec J**. v.3. p. 196-205, 1960.

PAES, L.A.; OLIVEIRA, M.A. Potential trash biomass of the sugar cane plant. **PNUD and CTC**. p. 19, 2005.

PAREK, C.S.; SMOZYNSKI, R.; TRETYN, A. Sequencing technologies and genome sequencing. **J. Appl Genetics**. v. 52. p. 413-35, 2011.

PEREIRA, F.B.; GOMES, D.G.; GUIMARÃES, P.M.R.; TEIXEIRA, J.A.; DOMINGUES, L. Cell recycling during repeated very high gravity bio-ethanol fermentations using the industrial *Saccharomyces cerevisiae* strain PE-2. **Biotechnol Lett**. v. 34. p. 45-53, 2012.

PURSHKAREV, D.; NEFF, N.F.; QUAKE, S.R. Single-molecule sequencing of an individual human genome. **Nat Biotechnol**. v. 27. p. 847-50, 2009.

QUIAN, X.; BA, Y.; ZHUANG, Q.; ZHONG, G. RNA-Seq Technology and Its Application in Fish Transcriptomics. **OMICS A Journal of Integrative Biology**. v. 18. p. 98-110, 2014.

RAMOS, C.L.; DUARTE, W.F.; FREIRE, A.L.; DIAS, D.R.; ELEUTHERIO, E.C.; SCHWAN, R.F. Evolution of stress tolerance and fermentative behavior of indigenous *Saccharomyces cerevisiae*. **Braz J Microbiol**. v. 44. p. 935-44, 2013.

REP, M.; KRANTZ, M.; THEVELEIN, J.M.; HOHMANN, S. The response of *Saccharomyces cerevisiae* to osmotic shock. **J Biol Chem.** v. 275. p .290-300, 2000.

SAMBROOK, J.; FRISTSCH, E.F.; MANIATS, T. Molecular cloning a laboratory manual. **Cold Spring Harbor**, v. 2. p. 35-47, 1989.

SANGER F.; NICKLEN, S.; COULSON, A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proc Natl Acad Sci USA.** v. 74. p. 5463-67, 1977.

SCANELL, D.R.; ZIL, O.A.; ROKAS, A.; PAYEN, C.; DUHAM, M.J.; EISEN, M.B.; RINE, J.; JOHNSTON, M.; HITTINGER, C.T. The awesome power of yeast evolutionary genetics: new genome sequences and strains resources for the *Saccharomyces sensu strictu* genus. **G3** . v. 1. p. 11-25, 2011.

SCANNELL, D.R.; ZILL, O.A.; ROKAS, A.; PAYEN, C.; DUNHAM, M. J.; ELISEN, M.B. The awesome power of yeast evolutionary genetics: new genome sequences and strain resources for the *Saccharomyces sensu stricto* genus. **Investigation.** v. 1. p. 11-15, 2011.

STAMBUK, B.U.; DUNN, B.; ALVES, S.L Jr.; DUVAL, E.H.; SHERLOCK, G. Industrial fuel ethanol yeasts contain adaptive copy number changes in genes involved in vitamin B1 and B6 biosynthesis. **Genome Res.** v. 19. p.2271-8, 2009.

STANLEY, D.; BANDARA, A.; FRASER, S.; CHAMBERS, P.J.; STANLEY, G.A. The ethanol stress response and ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. **J Appl Microbiology.** v. 109. p. 13-24, 2010.

TANGHE, A.; PRIOR, B.; THEVELEIN, J.M. Yeast responses to stresses. **Biodiversity and ecophysiology of yeasts** . p. 175–195, 2006.

TOFALO, R.; PERPETUINI, G.; SCHIRONE, M.; FASOLI, G.; AGUZZI, I.; CORSETTI, A.; SUZZI, G. Biogeographical characterization of *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast by molecular methods. **Frontiers in Microbiology.** v. 4. p. 1-13, 2013.

TRIANA, O.; LEONARD, M.; SAAVEDRA, F.; ACAN, I.C.; GARCIA, O.L.; ABRIL, A. Atlas of sugarcane bagasse. **Geplacea and ICIDCA**. v. 5. p. 23, 1990.

VALOEV, A.; ICHIKAWA, J.; TONTHAT, T.; STUART, J.; RENADE, S.; PECKMAN, H.; ZENG, K.; MALEK, J.A.; COSTA, G.; McKERNAN, K.; SIDOW, A.; FIRE, A.; JOHSON, S.M. A high-resolution nucleosome position map of *C.elegans* reveals a lack of universal sequence-dictated positioning. **Genome Res**. v. 18. p. 1051-63, 2008.

WALKER, G.M. Yeast physiology and biotechnology. **England**. 1998.

WARRINGER, J.; CUBILLOS, F.A.; ZIA, A.; GJUVSLAND, A.; SIMPSON, J.D. Trait variation in yeast is defined by population history. **Plos Genet**. v. 6. p. 1-15, 2011.

WHEALS, A.E.; BASSO, L.C.; ALVES, D.M.G.; AMORIM, H.V. Fuel ethanol after 25 years. **Trends Bioethanol**. v. 17. p. 482-87, 1999.

WHEELER, D.A.; SRINIVASAN, M.; ERGHOLM, M.; SHEN, Y.; CHEN, L.; McGUIRE, A.; HE, W.; CHEN, Y.J.; MAKHIJANI, V.; ROTH, G.T.; GOMES, X.; TARTARO, K.; NIAZI, F.; TURCOTTE, C.L.; IRZYK, G.P.; LUPSKI, J.R.; CHINAULT, C.; SONG, X. Z.; LIU, Y.; YUAN, Y.; NAZARETH, L.; QIN, X.; MUZNY, D.D.; MARGULIES, M. WEINSTOCK, G.M.; GIBBS, R.A.; ROTHBERG, J.M. The complete genome of an individual by massively parallel DNA sequencing. **Nature**. v. 452. p. 872-76, 2008.

XIA, J.M.; YING-JIN, Y. Comparative lipidomics of fours strains of *Saccharomyces cerevisiae* reveals different responses to furfural, phenol, and acetic acid. **J. Agric Food Chem**. v. 57. p. 99-108, 2009.

XU, G.; HUA, Q.; DUAN, N.; LIU, L.; CHEN, J. Regulation of thiamine synthesis in *Saccharomyces cerevisiae* for improved pyruvate production. **Yeast**. v. 29. p. 209-12, 2012.

ZANIN, G.M.; SANTANA, C.C.; BON, E.P.; GIORDANO, R.C.; MORAES, F.F.; ANDRIETTA, S.R.; CARVALHO, C.C.; MACEDO, I.C.; FO, D.L.; RAMOS, L.P.;

FONTANA, J.D. Brazilian bioethanol program. **Appl Biochem Biotechnol.** v. 86. p. 1147-61, 2000.

CDC45	1,51 2836	0,4629 337	0,8839 81	7,717608 747	7,9	2,9818526 53	7,71 7608	5,20937 3135	5,1	2,3504972 47	5,2093 7314	NC_001144	343949	345981
CDC48	- 1,01 7414	0,7919 109	0,9964 02	464,0668 228	476,6	8,8966351 41	464, 0668 228	469,604 0964	457,5	8,8376279 33	469,60 4096	NC_001136	236117	238704
CDC5	- 1,66 6034	0,2322 821	0,6383 27	14,14048 65	14,5	3,8579809 95	14,1 4048 65	8,74699 3578	8,5	3,0874628 41	8,7469 9358	NC_001145	268979	271176
CDC50	- 1,88 4745	0,0773 992	0,3164 06	21,45817 766	22	4,4594316 19	21,4 5817 766	11,7493 7404	11,4	3,5109619 19	11,749 374	NC_001135	286722	287977
CDC53	1,08 2242 4	0,6964 141	0,9817 35	46,10312 871	47,4	5,5668151 54	46,1 0312 871	51,4727 1134	50,1	5,6467386 98	51,472 7113	NC_001136	224264	226791
CDC55	1,03 5789 5	0,7997 169	0,9990 95	100,7431 585	103,5	6,6934869 57	100, 7431 585	107,440 2152	104,7	6,7101176 32	107,44 0215	NC_001139	145769	147429
CDC6	- 1,95 3282	0,5972 624	0,9505 83	1,758484 085	1,8	0,8479969 07	1,75 8484 085	0,93618 3354	0,9	0,1520030 93	0,9361 8335	NC_001142	69298	70919
CDC60	1,68 4744 4	0,0004 767	0,0048 42	68,63613 097	70,5	6,1395513 52	68,6 3613 097	119,023 6327	116	6,8579809 95	119,02 3633	NC_001148	246950	250302
	-					-				-				

RIM21	1,15 1582	0,3622 093	0,8046 92	76,56451 69	78,6	6,2964574 07	76,5 6451	90,7556 881	88,4	6,4659744 65	90,755 6881	NC_001146	78619	80300
RIM4	- 1,37 214	0,3983 021	0,8365 27	16,54808 652	17	4,0874628 41	16,5 4808 652	12,4680 2173	12,1	3,5969351 42	12,468 0217	NC_001140	56609	58830
RIM8	- 1,60 6526	0,0365 295	0,1865 85	49,17226	50,5	5,6582114 83	49,1 7226	31,5439 5225	30,7	4,9401667 5	31,543 9522	NC_001139	414062	415770
RIM9	1,17 3759 6	0,8123 978	1	3,969659 005	4,1	2,0356239 1	3,96 9659 005	4,86926 7946	4,7	2,2326607 57	4,8692 6795	NC_001145	397037	397836
RUB1	1,20 9114 4	0,0376 468	0,1900 97	214,7426 318	220,6	7,7852889 81	214, 7426 318	267,332 3578	260,5	8,0251395 62	267,33 2358	NC_001136	733578	733964
SNZ1	2,94 3764 1	8,565E -06	0,0001 22	20,22059 999	20,8	4,3785116 23	20,2 2059 999	61,3608 4992	59,8	5,9020735 79	61,360 8499	NC_001145	458368	459341
SNZ2	8,65 6760 8	0,0002 621	0,0028 3	2,178699 737	2,2	1,1375035 24	2,17 8699 737	19,1207 1379	18,6	4,2172307 16	19,120 7138	NC_001146	13227	14203
SNZ3	3,29 4977 7	7,279E -13	2,25E- 11	41,12295 753	42,2	5,3991710 94	41,1 2295 753	139,362 7977	135,8	7,0853396 69	139,36 2798	NC_001138	11323	12299
SWE1	- 2,00	0,1518	0,4959	12,21433	12,5	3,6438561	12,2	6,27346	6,1	2,6088092	6,2734	NC_001142	76763	79302

[illegible]

SEN15	1,06 7581	0,7489 42	0,9869 78	45,70118 258	46,9	5,5515160 18	45,7 0118	50,1803 2631	48,9	5,6117625 6	50,180 3263	NC_001145	391059	391525
SEN2	- 1,09 1811	0,7688 119	0,9905 84	23,09306 446	23,7	4,5668151 54	23,0 9306 446	21,7624 3004	21,2	4,4059923 6	21,762 43	NC_001144	347007	348220
SEN34	1,13 9833 2	0,7046 429	0,9833 58	15,45969 021	15,9	3,9909548 6	15,4 5969 021	18,1819 2123	17,7	4,1456774 55	18,181 9212	NC_001133	158926	159833
SEN54	- 1,00 835	0,9814 448	1	15,46801 164	15,9	3,9909548 6	15,4 6801 164	15,7657 5444	15,4	3,9448584 46	15,765 7544	NC_001148	396662	398145
SRN2	1,32 1785	0,2705 495	0,6929 04	26,74977 503	27,5	4,7813597 14	26,7 4977 503	36,4592 7951	35,5	5,1497471 2	36,459 2795	NC_001144	385494	386215
USO1	1,18 2664 9	0,6587 319	0,9717 21	12,59397 322	12,9	3,6892991 61	12,5 9397 322	15,2569 4361	14,9	3,8972404 26	15,256 9436	NC_001136	345625	351077
Esporulação														
ACF2	- 1,138 1903 5453 941	0,6240 616902 61841	0,9622 837740 45492	30,139133 5863952	31	4,95419631 038688	30,13 9133 5863 952	27,26202 5063774	26,6	4,73335434 061383	27,262 025063 774	NC_001144	429637	432056
ACF4	- 1,566 6945	0,1775 162813	0,5447 321752	22,458616 7008581	23,1	4,52982094 65287	22,45 8616	14,74639 7803719	14,4	3,84799690 655495	14,746 397803	NC_001142	582568	583577

ARG3	4,25 6517 1	0	0	76,26453 273	78,3	6,2909404 02	76,2 6453 273	334,080 9554	325,5	8,3465137 33	334,08 0955	NC_001142	268759	269855
ARG4	5,28 4115 7	0	0	165,4375 572	169,9	7,4085420 42	165, 4375 572	899,925 6571	876,8	9,7761039 88	899,92 5657	NC_001140	139971	141442
ARG5, 6	5,24 3650 9	0	0	60,27058 247	61,9	5,9518675 04	60,2 7058 247	325,333 9319	317	8,3083390 3	325,33 3932	NC_001137	295370	298041
ARG7	5,36 6901 8	0	0	43,10941 905	44,3	5,4692347 94	43,1 0941 905	238,292 1492	232,2	7,8592241 62	238,29 2149	NC_001145	395014	396419
ARG8	5,84 4512 4	0	0	35,37548 082	36,3	5,1818976 43	35,3 7548 082	212,685 949	207,2	7,6948801 93	212,68 5949	NC_001147	58719	60070
ARG80	1,64 6674	0,0405 017	0,1987 21	26,07554 748	26,8	4,7441610 96	26,0 7554 748	44,2836 2653	43,1	5,4296159 64	44,283 6265	NC_001145	352563	353176
ARG81	- 1,03 388	0,9006 458	1	28,15351 163	28,9	4,8529975 88	28,1 5351 163	28,0250 3151	27,3	4,7708290 46	28,025 0315	NC_001145	74358	77080
ARG82	- 1,02 1178	0,9065 349	1	62,46694 752	64,2	6,0045013 92	62,4 6694 752	63,0462 3865	61,4	5,9401667 5	63,046 2386	NC_001136	810525	811672

CAR1	- 1,00 0905	0,9958 787	1	64,24106 542	66	6,0443941 19	64,2 4106 542	66,1356 0127	64,4	6,0089887 83	66,135 6013	NC_001148	339904	340985
CAR2	- 1,21 8476	0,6327 729	0,9646 33	12,76038 804	13,1	3,7114949 07	12,7 6038 804	10,8101 1181	10,5	3,3923174 23	10,810 1118	NC_001144	1012461	101381
LEU1	2,82 2337 9	6,586E -12	1,91E- 10	53,20021 64	54,6	5,7708290 46	53,2 0021 64	154,465 2239	150,5	7,2336196 77	154,46 5224	NC_001139	476273	478692
LEU2	1,87 0256	3,975E -06	6,07E- 05	79,17566 453	81,3	6,3451834 47	79,1 7566 453	152,457 9173	148,5	7,2143191 21	152,45 7917	NC_001135	91284	92458
LEU3	1,11 7473 9	0,7216 068	0,9846 32	19,13166 101	19,7	4,3001237 25	19,1 3166 101	22,0617 0078	21,5	4,4262647 55	22,061 7008	NC_001144	1036053	103879
LEU4	2,10 4110 2	6,958E -08	1,39E- 06	72,66872 878	74,6	6,2211037 25	72,6 6872 878	157,350 3475	153,3	7,2602138 87	157,35 0347	NC_001146	424855	426794
LEU5	1,25 6973 9	0,3783 901	0,8205 66	26,11183 806	26,8	4,7441610 96	26,1 1183 806	33,7632 4472	32,9	5,0400156 79	33,763 2447	NC_001140	108772	109925
LEU9	1,46	0,0397	0,1971	46,98649	48,3	5,5939512	46,9	71,0529	69,2	6,1127001	71,052	NC_001147	522987	524881

	6979	449	41	573		84	8649	6387		33	9639			
LYS1	3,74 8860 9	3,7E- 10	9,21E- 09	24,14562 916	24,8	4,6322682 15	24,1 4562 916	93,2191 4037	90,8	6,5046203 92	93,219 1404	NC_001141	419575	420776
LYS12	1,53 3208 9	1,174E -05	0,0001 64	168,1112 829	172,7	7,4321242 73	168, 1112 829	265,392 0423	258,6	8,0145784 65	265,39 2042	NC_001141	186477	187672
LYS14	1,79 9719 3	0,0099 901	0,0657 27	28,48467 429	29,3	4,8728287 6	28,4 8467 429	52,8243 3316	51,5	5,6865005 27	52,824 3332	NC_001136	509697	512149
LYS2	2,20 7555 7	5,698E -05	0,0007	34,93902 019	35,9	5,1659119 39	34,9 3902 019	79,4265 7921	77,4	6,2742616 61	79,426 5792	NC_001134	469708	473966
LYS20	1,94 1877 2	2,132E -14	7,24E- 13	190,0577 162	195,2	7,6088092 43	190, 0577 162	379,953 7917	370,2	8,5321610 85	379,95 3792	NC_001136	133397	134763
LYS21	1,18 2448 1	0,1980 458	0,5812 88	106,9100 559	109,8	6,7787342 44	106, 9100 559	130,132 9233	126,8	6,9864109 35	130,13 2923	NC_001136	227353	228755
LYS4	1,87 8495 6	0,0085 54	0,0577 76	25,34386 596	26	4,7004397 18	25,3 4386 596	48,9155 4815	47,7	5,5759173 61	48,915 5481	NC_001136	931089	933250
LYS5	1,30	0,2453	0,6574	33,10845	34	5,0874628	33,1	44,4015	43,3	5,4362951	44,401 5125	NC_001139	215238	216136

	3989	256	81	493		41	0845	125		2				
LYS9	- 1,15 5584	0,4732 847	0,8920 12	52,22744 159	53,6	5,7441610 96	52,2 2744 159	46,5204 4386	45,3	5,5014391 45	46,520 4439	NC_001146	714008	715428
MET1	2,28 6418 7	0,0013 314	0,0120 07	20,08305 428	20,6	4,3645724 32	20,0 8305 428	47,2557 1982	46	5,5235619 56	47,255 7198	NC_001143	571572	573433
MEH1	2,00 1057 9	9,646E -06	0,0001 36	57,52841 934	59,1	5,8850862 25	57,5 2841 934	118,596 4784	115,5	6,8517490 41	118,59 6478	NC_001143	451394	452028
MET10	1,89 5337 5	0,0230 781	0,1303 58	18,28220 343	18,8	4,2326607 57	18,2 8220 343	35,7094 3947	34,8	5,1210154 01	35,709 4395	NC_001138	213272	216459
MET12	- 1,12 9298	0,5161 604	0,9165 98	59,73515 397	61,4	5,9401667 5	59,7 3515 397	54,4647 6001	53,1	5,7306399 56	54,464 76	NC_001148	504299	506352
MET13	1,52 1249 5	0,2897 233	0,7170 02	10,27006 792	10,5	3,3923174 23	10,2 7006 792	15,9751 2592	15,6	3,9634741 24	15,975 1259	NC_001139	272480	274362
MET14	2,03 7596 7	0,0011 618	0,0105 67	29,20208 923	30	4,9068905 96	29,2 0208 923	61,2926 6867	59,7	5,8996590 26	61,292 6687	NC_001143	438737	439425
MET16	4,36	8,641E	2,44E-	21,56933	22,2	4,4724877	21,5	97,0792	94,6	6,5637682	97,079	NC_001148	876807	877672

	3181	-12	10	528		71	6933	5318		78	2532			
MET17	7,34 2954 4	0	0	30,70510 082	31,5	4,9772799 23	30,7 0510 082	231,896 8745	225,9	7,8195404 61	231,89 6875	NC_001144	732502	733916
MET18	- 1,03 1508	0,9471 136	1	9,191297 241	9,4	3,2326607 57	9,19 1297 241	9,18342 6592	8,9	3,1538053 36	9,1834 2659	NC_001141	113766	116944
MET2	1,56 2131 2	0,1673 846	0,5279 32	15,18222 661	15,6	3,9634741 24	15,1 8222 661	24,4433 8397	23,8	4,5728896 68	24,443 384	NC_001146	117309	118849
MET22	1,56 4965 5	0,0107 259	0,0697 74	51,40483 799	52,8	5,7224660 24	51,4 0483 799	82,8559 6263	80,7	6,3344967 68	82,855 9626	NC_001147	206063	207216
MET28	3,15 8753 4	3,646E -05	0,0004 66	14,85644 341	15,3	3,9354597 48	14,8 5644 341	48,4489 1136	47,2	5,5607149 54	48,448 9114	NC_001141	383516	384159
MET3	1,16 7379	0,4951 153	0,9056 46	35,46610 409	36,4	5,1858665 45	35,4 6610 409	42,6060 9453	41,5	5,3750394 31	42,606 0945	NC_001142	456199	457814
MET30	- 1,08 9755	0,7102 652	0,9835 28	38,46594 653	39,5	5,3037807 48	38,4 6594 653	36,3374 2034	35,4	5,1456774 55	36,337 4203	NC_001141	268611	270613
MET31	1,52	0,1323	0,4542	20,17423	20,7	4,3715588	20,1	31,7323	30,9	4,9495349	31,732	NC_001148	480495	481108

	8457	317	58	937		63	7423	0797		33	308			
MET32	1,67 4885 7	0,0239 677	0,1338 35	29,43315 544	30,2	4,9164766 44	29,4 3315 544	50,7215 4111	49,4	5,6264391 37	50,721 5411	NC_001136	963950	964605
MET4	1,30 4930 1	0,2605 735	0,6774 7	30,88974 569	31,7	4,9864109 35	30,8 8974 569	41,5043 2743	40,4	5,3362833 88	41,504 3274	NC_001146	427695	429793
MET5	1,97 8023 3	0,0940 272	0,3629 05	8,599975 582	8,8	3,1375035 24	8,59 9975 582	17,4595 7395	17	4,0874628 41	17,459 574	NC_001142	678917	683325
MET6	2,38 5263 4	0,0016 466	0,0144 19	17,10219 01	17,6	4,1375035 24	17,1 0219 01	42,0690 4292	41	5,3575520 05	42,069 0429	NC_001137	339824	342207
MET7	1,11 3182 6	0,7324 324	0,9867 45	19,01490 951	19,5	4,2854022 19	19,0 1490 951	21,7664 0509	21,2	4,4059923 6	21,766 4051	NC_001147	786955	788681
MET8	1,36 5223 9	0,6046 827	0,9544 05	4,678460 589	4,8	2,2630344 06	4,67 8460 589	6,54096 3145	6,4	2,6780719 05	6,5409 6315	NC_001134	650328	651232
MPC2	1,00 6305 5	0,8394 101	1	2037,664 333	2092,9	11,031287 67	2037 ,664 333	2111,19 1197	2056,9	11,006255 94	2111,1 912	NC_001140	423032	423501
PRO1	1,24	0,2251	0,6259	56,29793	57,8	5,8529975	56,2	71,8138	70	6,1292830	71,813	NC_001136	1061465	106283

	0039	685	17	13		88	9793	5717		17	8572			
PRO2	- 1,02 9105	0,8863 096	1	49,65915 792	51	5,6724253 42	49,6 5915 792	49,6641 5138	48,4	5,5969351 42	49,664 1514	NC_001147	921495	922945
PRO3	- 1,77 9045	0,0001 757	0,0019 64	113,2911 527	116,4	6,8629472 48	113, 2911 527	65,5889 095	63,9	5,9977440 26	65,588 9095	NC_001137	201036	201976
PUT1	2,69 3480 2	0	0	115,9294 922	119,1	6,8960296 03	115, 9294 922	321,567 44	313,3	8,2914009 59	321,56 744	NC_001144	425146	426656
PUT2	1,11 4806 6	0,5050 207	0,9101 34	70,17588 069	72,1	6,1719273 54	70,1 7588 069	80,6174 1416	78,5	6,2946207 49	80,617 4142	NC_001140	181937	183744
PUT3	2,04 7835 9	0,0868 925	0,3421 54	7,976708 832	8,2	3,0356239 1	7,97 6708 832	16,8816 8767	16,4	4,0356239 1	16,881 6877	NC_001143	408504	411523
PUT4	5,52 9156 9	0,0768 479	0,3149 58	1,011378 09	1	0	1,01 1378 09	5,56435 6402	5,4	2,4329594 07	5,5643 564	NC_001147	986859	988822
STP1	1,14 0272 3	0,4708 084	0,8890 08	55,71616 07	57,2	5,8379432 42	55,7 1616 07	65,3715 7465	63,7	5,9932214 67	65,371 5746	NC_001136	1386776	138841
STP2	1,41	0,0673	0,2877	46,70894	48	5,5849625	46,7	67,8970	66,2	6,0487593	67,897	NC_001140	117774	119479

	2153	161	35	066		01	0894	6379		12	0638			
STP22	- 1,69 3668	0,2328 196	0,6383 27	13,33240 064	13,7	3,7761039 88	13,3 3240 064	8,13276 0849	7,9	2,9818526 53	8,1327 6085	NC_001135	105656	106893
STP3	1,28 2762 9	0,0538 864	0,2459 56	104,4136 307	107,2	6,7441610 96	104, 4136 307	137,851 5734	134,3	7,0693154 95	137,85 1573	NC_001144	871657	872768
STP4	- 2,15 7415	0,0012 4	0,0112 14	52,47271 854	53,9	5,7522133 68	52,4 7271 854	25,0609 5016	24,4	4,6088092 43	25,060 9502	NC_001136	366699	368251
Biossíntese de Pirimidinas/Purinas														
ADE1	2,95 6056 9	3,706E -05	0,0004 72	17,26717 122	17,7	4,1456774 55	17,2 6717 122	52,4339 6409	51,1	5,6752513 86	52,433 9641	NC_001133	169335	170335
ADE12	1,58 7899 3	0,0001 891	0,0020 99	102,5178 627	105,3	6,7183616 26	102, 5178 627	167,606 3009	163,3	7,3513809 81	167,60 6301	NC_001146	234373	235754
ADE13	2,15 9798 7	9,846E -07	1,66E- 05	55,23003 832	56,7	5,8252768 3	55,2 3003 832	122,707 2127	119,6	6,9020735 79	122,70 7213	NC_001144	844242	845770
ADE16	- 1,09	0,2074	0,5983	401,1061	412	8,6865005	401,	377,329	367,6	8,5219929	377,32	NC_001144	199500	201355

URA1	1,22 0501 8	0,1463 209	0,4843 54	94,79358 287	97,4	6,6058498 67	94,7 9358 287	119,153 8509	116,1	6,8592241 62	119,15 3851	NC_001143	25175	26199
URA10	- 1,10 0168	0,1274 317	0,4429 51	527,1807 158	541,5	9,0808175 28	527, 1807 158	493,409 1018	480,7	8,9089929 93	493,40 9102	NC_001145	806825	807588
URA2	- 1,06 4925	0,6690 279	0,9758 19	93,90608 982	96,5	6,5924570 37	93,9 0608 982	90,8343 7993	88,5	6,4676055 5	90,834 3799	NC_001142	165683	172407
URA3	- 1,19 1577	0,3490 592	0,7914 69	61,52743 578	63,2	5,9818526 53	61,5 2743 578	53,1814 6906	51,8	5,6948801 93	53,181 4691	NC_001137	116127	117010
URA4	1,03 7441 4	0,8494 221	1	51,62369 336	53	5,7279204 55	51,6 2369 336	55,1510 3163	53,7	5,7468501 83	55,151 0316	NC_001144	963745	964919
URA5	- 1,10 7639	0,3352 575	0,7776 94	184,4167 351	189,4	7,5652925 21	184, 4167 351	171,402 2695	167	7,3837042 92	171,40 2269	NC_001145	56733	57493
URA6	- 1,08 6544	0,5941 516	0,9495 42	84,68605 876	87	6,4429434 96	84,6 8605 876	80,2555 9565	78,2	6,2890967 02	80,255 5957	NC_001143	392486	393180
URA7	- 1,03 91	0,9090 657	1	17,77396 393	18,3	4,1937717 43	17,7 7396 393	17,6992 4576	17,2	4,1043366 6	17,699 2458	NC_001134	143949	145768

URA8	- 1,79 8721	7,558E -06	0,0001 11	156,4025 607	160,6	7,3273280 83	156, 4025 607	89,4999 4482	87,2	6,4462562 3	89,499 9448	NC_001142	620714	622530
Assimilação de Açúcares														
ADR1	1,26 1017 3	0,1873 367	0,5623 64	56,77267 375	58,3	5,8654239 78	56,7 7267 375	73,6836 9747	71,8	6,1659119 39	73,683 6975	NC_001136	894995	899046
CAT2	- 1,85 4592	9,261E -06	0,0001 31	140,9047 673	144,7	7,1769211 12	140, 9047 673	78,1678 2207	76,2	6,2517190 93	78,167 8221	NC_001145	192748	194840
CAT5	1,02 6903 1	0,8763 468	1	66,74386 124	68,6	6,1001366 71	66,7 4386 124	70,6521 2314	68,8	6,1043366 6	70,652 1231	NC_001147	558990	559771
CAT8	1,47 2938 8	0,0271 308	0,1465 98	53,05371 252	54,5	5,7681843 25	53,0 5371 252	80,4314 0605	78,4	6,2927817 49	80,431 406	NC_001145	826988	831369
GLK1	- 1,55 5074	0	0	1098,818 841	1128,6	10,140318 54	1098 ,818 841	727,514 4825	708,8	9,4692347 94	727,51 4482	NC_001135	50798	52380
HXK1	- 2,93	0	0	3948,095	4055,1	11,985521	3948	1382,93	1347,4	10,395962	1382,9	NC_001138	253552	255089

	9273			425		78	,095	8105		49	381			
HXK2	- 1,14 4461	0,3828 336	0,8247 74	88,30103 387	90,7	6,5030306 46	88,3 0103 387	79,4233 5348	77,4	6,2742616 61	79,423 3535	NC_001139	23895	25435
MAL11	1,16 1809 5	0,5179	0,9167 31	33,97050 169	34,9	5,1251551 31	33,9 7050 169	40,6290 7147	39,6	5,3074285 25	40,629 0715	NC_001139	1073923	107585
MAL12	- 1,69 8506	0,3596 881	0,8032 63	7,794903 502	8	3	7,79 4903 502	4,71993 3937	4,6	2,2016338 61	4,7199 3394	NC_001139	1076559	107839
MAL13	1,06 3724 7	0,7640 937	0,9900 09	45,11229 924	46,3	5,5329402 88	45,1 1229 924	49,3332 136	48,1	5,5879649 89	49,333 2136	NC_001139	1070253	107175
MAL31	- 1,24 4016	0,0267 35	0,1450 77	226,9946 516	233,1	7,8648051 94	226, 9946 516	187,803 3101	183	7,5156998 38	187,80 331	NC_001134	802591	804515
MAL32	- 1,00 8838	0,9786 531	1	18,34586 217	18,8	4,2326607 57	18,3 4586 217	18,6838 8787	18,2	4,1858665 45	18,683 8879	NC_001134	805311	807145
MAL33	1,19 4141 1	0,4114 399	0,8484 03	38,63098 26	39,7	5,3110671 02	38,6 3098 26	47,5628 4807	46,3	5,5329402 88	47,562 8481	NC_001134	800483	801969
MPH1	1,32	0,3442	0,7863	18,96457	19,5	4,2854022	18,9	25,9686	25,3	4,6610654	25,968	NC_001141	357375	360436

	8467	937	43	844		19	6457	6063		8	6606			
MPH2	2,55 9794 9	0,7125 141	0,9835 32	0,146839 005	0,2	- 2,3219280 9	0,14 6839 005	0,50711 7587	0,5	-1	0,5071 1759	NC_001136	5945	7854
MPH3	- 1,13 0847	0,9011 258	1	2,147130 269	2,2	1,1375035 24	2,14 7130 269	1,93801 7093	1,9	0,9259994 19	1,9380 1709	NC_001142	737968	739856
SOR1	1,79 1856 4	0,7653 566	0,9900 09	0,409419 064	0,4	- 1,3219280 9	0,40 9419 064	0,73607 0738	0,7	- 0,5145731 73	0,7360 7074	NC_001142	736004	737157
SOR2	1,36 5223 9	0,8970 259	1	0,295691 546	0,3	- 1,7369655 9	0,29 5691 546	0,44804 3058	0,4	- 1,3219280 95	0,4480 4306	NC_001136	8643	9796
XYL2	- 1,54 5883	0,1504 843	0,4929 95	26,98330 304	27,7	4,7918140 71	26,9 8330 304	17,9719 2322	17,5	4,1292830 17	17,971 9232	NC_001144	274101	275251
Gliconeogênese/ Glicólise														
APP1	- 1,09 7183	0,6706 793	0,9759 02	43,44259 654	44,6	5,4789718 05	43,4 4259 654	40,7623 3911	39,7	5,3110671 02	40,762 3391	NC_001146	447571	449414
FBP1	2,23	0,0005	0,0053	24,89531	25,6	4,6780719	24,8	57,3839	55,9	5,8047763	57,383	NC_001144	873706	874832

	5820	336	52	207		05	9531	9036		78	9904			
ICL1	1,35 5185 5	0,3957 578	0,8344	13,25043 792	13,6	3,7655347 46	13,2 5043 792	18,4381 3036	18	4,1699250 01	18,438 1304	NC_001137	285201	286954
ICL2	1,41 8681 5	0,2750 618	0,6966 47	16,17268 483	16,6	4,0531113 36	16,1 7268 483	23,6501 6172	23	4,5235619 56	23,650 1617	NC_001148	567229	569036
MDH1	- 1,36 2426	8,485E -06	0,0001 22	479,3367 046	492,3	8,9433939 29	479, 3367 046	362,181 1944	352,9	8,4631156 2	362,18 1194	NC_001143	279083	280167
MDH2	- 2,06 9548	0,0120 123	0,0764 67	34,61805 465	35,6	5,1538053 36	34,6 1805 465	17,2765 8095	16,8	4,0703893 28	17,276 5809	NC_001147	81747	82960
MLS1	2,01 2528 4	0,0478 103	0,2246 84	11,32668 7	11,6	3,5360529	11,3 2668 7	23,4096 4431	22,8	4,5109619 19	23,409 6443	NC_001146	406318	408062
PGK1	- 1,24 9417	0	0	10132,05 971	10406,6	13,345211 17	1013 2,05 971	8349,23 1884	8134,6	12,989855 69	8349,2 3188	NC_001135	137706	139036
Metais														
CUP1-	1,68	0	0	3224,190	3311,6	11,693312	3224	5579,79	5436,4	12,408435	5579,7	NC_001140	212495	212760

1	0887			534		71	,190	3004		9	93			
CUP1-2	1,69 3782 1	0	0	3214,077 59	3301,2	11,688774 83	3214 ,077 59	5604,92 4709	5460,9	12,414923 02	5604,9 2471	NC_001140	214493	214758
CUP2	1,11 7228 6	0,3744 315	0,8183 36	119,6572 503	122,9	6,9413411 05	119, 6572 503	137,637 298	134,1	7,0671654 27	137,63 7298	NC_001139	191089	191846
CUP9	- 1,28 5245	0,0884 043	0,3458 57	103,4173 588	106,2	6,7306399 56	103, 4173 588	82,8493 9522	80,7	6,3344967 68	82,849 3952	NC_001148	213002	214002
ENB1	1	1	1	0	0	- 1,798E+30 8	0	0	0	- 1,7977E+3 08	0	NC_001147	19451	21351
FET3	1,10 3291 4	0,7992 139	0,9990 57	12,59143 942	12,9	3,6892991 61	12,5 9143 942	14,2809 0775	13,9	3,7970129 78	14,280 9077	NC_001145	388782	390772
FET4	- 1,25 8438	0,3845 661	0,8273 67	31,77641 445	32,6	5,0268000 59	31,7 7641 445	25,9597 6061	25,3	4,6610654 8	25,959 7606	NC_001145	912840	914578
FET5	1,16 8197 3	0,5941 387	0,9495 42	21,42246 733	22	4,4594316 19	21,4 2246 733	25,8014 6513	25,1	4,6496154 59	25,801 4651	NC_001138	49099	51047
FIT1	1,58 2418	0,7051 558	0,9833 58	1,077509 109	1,1	0,1375035 24	1,07 7509	1,73264 2881	1,7	0,7655347 46	1,7326 4288	NC_001136	1503274	150494

	6						109							
FIT2	1,55 6773 2	0,1249 272	0,4380 86	19,08820 38	19,6	4,2927817 49	19,0 8820 38	30,5770 6839	29,8	4,8972404 26	30,577 0684	NC_001147	1059491	106003
FIT3	1,70 3150 6	0,0009 172	0,0086 27	58,98630 266	60,6	5,9212458 89	58,9 8630 266	103,505 1275	100,8	6,6553518 29	103,50 5128	NC_001147	1060401	106109
SSU1	3,15 8369 3	0	0	64,45124 256	66,2	6,0487593 12	64,4 5124 256	209,622 5155	204,2	7,6738390 56	209,62 2516	NC_001148	373753	375209
SSU72	- 1,04 2166	0,8681 307	1	32,49288 579	33,4	5,0617761 98	32,4 9288 579	32,1020 2227	31,3	4,9680907 52	32,102 0223	NC_001146	229054	229754
Resistência														
AHA1	-- 1,278 5668 1324 852	8,1749 002900 3665E- 08	1,6068 867474 1309E- 06	1064,5379 0776963	1093,4	10,0946055 653122	1064, 5379 0776 963	857,2261 7603548	835,2	9,70597790 168252	857,22 617603 548	NC_001136	892835	893967
CTT1	1,33 6197 9	0,2012 675	0,5862 96	33,19348 696	34,1	5,0916998 34	33,1 9348 696	45,6249 033	44,5	5,4757334 31	45,624 9033	NC_001139	654594	656362
CSF1	1,23 7871	0,6822 417	0,9762 06	6,535777 081	6,7	2,7441610 96	6,53 5777	8,28984 5674	8,1	3,0179219 08	8,2898 4567	NC_001144	306815	315771

HSP32	1,496 4954	0,7214 096869	0,9846 320435	1,2316976 8726511	1,3	0,37851162 325373	1,231 6976	1,925563 20176613	1,9	0,92599941 8556223	1,9255 632017	NC_001148	11847	12640
HSP33	3,238 4381 66	3,6432 2E-08	7,5099 9E-07	25,147161 11	25,8	4,68929916 1	25,14 7161 11	83,71386 02	81,6	6,35049724 7	83,713 8602	NC_001147	1078505	1079298
HSP42	- 1,314 5177 48	0	0	6985,6036 43	7174,9	12,8087430 1	6985, 6036 43	5471,375 172	5330,7	12,3801092 8	5471,3 75172	NC_001136	806581	807788
HSP60	- 1,412 7926 64	2,7478 E-13	8,9009 2E-12	1053,4029 39	1081,9	10,0793514 4	1053, 4029 39	767,6257 704	747,9	9,54670157 3	767,62 57704	NC_001144	663244	665042
HSP78	- 1,210 8900 7	7,6916 3E-12	2,2096 9E-10	2774,6096 33	2849,8	11,4766449 6	2774, 6096 33	2359,090 477	2298,5	11,1664769 5	2359,0 90477	NC_001136	971768	974283
HSP82	- 1,852 5706 95	0	0	5464,2463 72	5612,3	12,4543764 1	5464, 2463 72	3036,777 249	2958,7	11,5307477 1	3036,7 77249	NC_001148	96456	98665
SNF1	- 1,148 6372 14	0,4099 79013	0,8477 12412	74,814409 78	76,8	6,26303440 6	74,81 4409 78	67,04391 94	65,3	6,02901108 7	67,043 9194	NC_001136	1412333	1414314
SNF11	1,178 8634 11	0,3345 98869	0,7767 34267	62,412858 92	64,1	6,00225245 2	62,41 2858 92	75,75165 636	73,8	6,20554891 1	75,751 65636	NC_001136	592399	592988
SNF12	1,041 6943 03	0,8762 7916	1	28,076455 85	28,8	4,84799690 7	28,07 6455 85	30,04710 628	29,3	4,87282876	30,047 10628	NC_001146	670378	672158
SNF2	- 1,274 8516 74	0,5073 41987	0,9119 31441	16,658518 47	17,1	4,09592442	16,65 8518 47	13,40023 615	13,1	3,71149490 7	13,400 23615	NC_001147	855107	860298
SNF3	1,443	0,0953	0,3658	34,02532	34,9	5,12515513	34,02	50,48891	49,2	5,62058641	50,488	NC_001136	111540	114274

	4602 61	44703	43773			1	532	988			91988			
SNF4	1,104 6802 9	0,4511 01878	0,8769 23195	107,37018 47	110,3	6,78528898 1	107,3 7018 47	122,1263 124	119	6,89481776 3	122,12 63124	NC_001139	291993	293041
SNF5	- 1,087 0941 75	0,8037 50235	0,9996 10233	18,245107 33	18,7	4,22496636 5	18,24 5107 33	17,19829 738	16,8	4,07038932 8	17,198 29738	NC_001134	779627	782424
SNF6	1,546 3250 66	0,0047 64163	0,0355 01963	66,757028 31	68,6	6,10013667 1	66,75 7028 31	106,3480 461	103,6	6,69488019 3	106,34 80461	NC_001140	54811	55889
SNF8	1,493 0437 03	0,0276 67417	0,1493 71117	48,857341 59	50,2	5,64961545 9	48,85 7341 59	75,10766 244	73,2	6,19377174 3	75,107 66244	NC_001148	553587	554368
SSA1	- 1,374 7536 13	0	0	4462,4938 24	4583,4	12,1622024 8	4462, 4938 24	3341,963 322	3256,1	11,6689292 9	3341,9 63322	NC_001133	139463	141471
SSA2	- 1,420 5091 31	0	0	1485,6830 52	1525,9	10,5754447	1485, 6830 52	1076,806 383	1049,1	10,0349364 9	1076,8 06383	NC_001144	95526	97525
SSA3	1,534 6813 17	9,9989 5E-07	1,6794 5E-05	208,45799 08	214,1	7,74214098 5	208,4 5799 08	329,3475 894	320,9	8,32597997 9	329,34 75894	NC_001134	84459	86488
SSA4	- 1,350 0539 48	0	0	2803,7376 88	2879,7	11,4917028 1	2803, 7376 88	2138,165 893	2083,2	11,0245856 4	2138,1 65893	NC_001137	364549	366557
RCN1	- 1,164 4562 86	0,6853 04845	0,9762 06368	15,095074 88	15,5	3,95419631	15,09 5074 88	13,29456 065	13	3,70043971 8	13,294 56065	NC_001143	153776	154491
ERG1	- 1,643	0,0003	0,0033	134,89017	138,5	7,11374216	134,8	84,48747	82,3	6,36282052	84,487	NC_001139	846893	848463

	5570 44	09797	05713	21		6	9017 21	555		6	47555			
ERG10	2,412 3956 96	3,6282 1E-13	1,1693 1E-11	88,633013 6	91	6,50779464	88,63 3013 6	220,0107 976	214,4	7,74416109 6	220,01 07976	NC_001148	498056	499332
ERG11	1,002 3398 01	0,9840 93356	1	143,24432 76	147,1	7,20065343 6	143,2 4432 76	147,7987 612	144	7,16992500 1	147,79 87612	NC_001140	120051	121723
ERG12	1,838 3446 4	0,0010 81874	0,0099 71731	42,383377 04	43,5	5,44294349 6	42,38 3377 04	80,14809 879	78,1	6,28725064 3	80,148 09879	NC_001145	684427	685838
ERG13	- 1,026 7248 97	0,9335 50096	1	19,943460 92	20,5	4,35755200 5	19,94 3460 92	19,98006 647	19,5	4,28540221 9	19,980 06647	NC_001145	19020	20575
ERG2	- 1,178 4684 43	0,3582 7039	0,8015 00602	67,078427 88	68,9	6,10643207 8	67,07 8427 88	58,62131 076	57,1	5,83541884	58,621 31076	NC_001145	667497	668245
ERG20	1,128 6180 94	0,3285 4751	0,7702 91042	120,89769 94	124,2	6,95652136 3	120,8 9769 94	140,5361 12	136,9	7,09697863 6	140,53 6112	NC_001142	104974	106112
ERG24	- 1,378 0964 51	0,1120 07313	0,4084 86552	57,111524 21	58,7	5,87528859 8	57,11 1524 21	42,72272 077	41,6	5,37851162 3	42,722 72077	NC_001146	109055	110451
ERG25	- 1,795 9597 95	0,0001 53529	0,0017 46876	112,26681 61	115,3	6,84924870 3	112,2 6681 61	64,30759 944	62,7	5,97039353 8	64,307 59944	NC_001139	610524	611533
ERG26	1,334 0469 44	0,0150 8278	0,0917 24684	121,46865 74	124,8	6,96347412 4	121,4 6865 74	166,8481 259	162,6	7,34518344 7	166,84 81259	NC_001139	495413	496542
ERG27	1,131	0,3523	0,7954	104,28983	107,1	6,74281467	104,2	121,4847	118,4	6,88752527	121,48	NC_001144	341770	342893

	9503 75	33327	34203	31			8983 31	784		1	47784			
ERG28	1,290 6965 71	0,0022 31262	0,0188 38141	249,25988 26	256	8	249,2 5988 26	331,2563 176	322,7	8,33404976 8	331,25 63176	NC_001137	237530	238056
ERG3	1,142 6213 71	0,2752 02949	0,6966 76047	123,50050 24	126,8	6,98641093 5	123,5 0050 24	145,2797 977	141,5	7,14465824 3	145,27 97977	NC_001144	253821	254998
ERG4	1,218 7071 21	0,0384 7892	0,1925 15888	195,46372 46	200,8	7,64961545 9	195,4 6372 46	245,2641 442	239	7,90086680 8	245,26 41442	NC_001139	472815	474316
ERG5	1,383 2980 18	0,0259 96621	0,1422 86676	79,026825 57	81,2	6,34340782 2	79,02 6825 57	112,5516 699	109,7	6,77741971 6	112,55 16699	NC_001145	300829	302525
ERG6	- 1,394 8882 54	0,0867 98922	0,3420 77192	62,047127 39	63,7	5,99322146 7	62,04 7127 39	45,73889 56	44,6	5,47897180 5	45,738 8956	NC_001145	251799	253030
ERG7	1,120 0870 39	0,6216 9304	0,9617 70747	35,252485 32	36,2	5,17791779 2	35,25 2485 32	40,61636 233	39,6	5,30742852 5	40,616 36233	NC_001140	239058	241333
ERG8	1,677 0646 51	0,0078 04586	0,0533 38341	40,624375 11	41,7	5,38197547 9	40,62 4375 11	70,11137 501	68,3	6,09381367 3	70,111 37501	NC_001145	712276	713711
ERG9	1,048 6412 53	0,6166 34382	0,9597 66563	213,69139 89	219,5	7,77807713	213,6 9139 89	230,7640 376	224,8	7,81249822 5	230,76 40376	NC_001140	484805	486219
RSA1	1,462 0121 96	0,1889 3116	0,5639 51074	19,568516 4	20,1	4,32912359 6	19,56 8516 4	29,48254 014	28,7	4,84297883 2	29,482 54014	NC_001148	181363	182588
RSA3	1,666	0,0014	0,0132	59,358353	61	5,93073733	59,35	101,8696	99,3	6,63372181	101,86	NC_001144	578322	579064

YOR37 8W	1,46 9099	0,5239 881	0,9177 38	4,481745 805	4,6	2,2016338 61	4,48 1745	6,77212 3683	6,6	2,7224660 24	6,7721 2368	NC_001147	1049471	105109
YOR38 1W-A	1,02 8043	0,9692 018	1	3,926036 378	4	2	3,92 6036 378	3,88723 0714	3,8	1,9259994 19	3,8872 3071	NC_001147	1058383	105863
YOR38 5W	1,14 9838	0,6433 924	0,9711 05	23,22542 584	23,9	4,5789387 13	23,2 2542 584	20,8668 8507	20,3	4,3434078 22	20,866 8851	NC_001147	1065003	106595
YOR38 7C	1,10 4050 7	0,6752 408	0,9762 06	33,63367 718	34,5	5,1085244 57	33,6 3367 718	38,1349 8852	37,2	5,2172307 16	38,134 9885	NC_001147	1069581	107028
YOR38 9W	1,09 9452 9	0,8115 791	1	11,89513 41	12,2	3,6088092 43	11,8 9513 41	13,4552 1947	13,1	3,7114949 07	13,455 2195	NC_001147	1074173	107612
YOR39 0W	1,82 1776 1	0,1764 448	0,5430 88	7,449878 328	7,7	2,9448584 46	7,44 9878 328	14,0166 6618	13,7	3,7761039 88	14,016 6662	NC_001147	1076744	107795
YOR39 4C-A	1,63 8268 7	0,6956 589	0,9816 01	1,017861 283	1	0	1,01 7861 283	1,63672 8722	1,6	0,6780719 05	1,6367 2872	NC_001147	1084162	108440
Biomassa														
HAP1	1,053 4911	0,7693 51863	0,9905 83881	64,048735 01	65,8	6,04001567 9	64,04 8735	62,65959 457	61	5,93073733 8	62,659 59457	NC_001144	646375	650963

CYC8	1,641 7151 36	0,1093 48487	0,4022 32645	26,710701 06	27,4	4,77610398 8	26,71 0701 06	16,70580 401	16,3	4,02680005 9	16,705 80401	NC_001134	462830	465810
COX1	5,028 1685 01	0,0001 067	0,0012 49887	5,4336669 62	5,6	2,48542682 7	5,433 6669 62	28,22515 735	27,5	4,78135971 4	28,225 15735	NC_001224	13778	26741
COX10	1,462 7399 28	0,4874 16729	0,8993 3415	5,4168686 87	5,6	2,48542682 7	5,416 8686 87	8,240204 427	8	3	8,2402 04427	NC_001148	224313	225781
COX11	1,410 3967 83	0,0929 22569	0,3597 34994	39,740550 83	40,8	5,35049724 7	39,74 0550 83	57,66613 984	56,2	5,81249822 5	57,666 13984	NC_001148	301676	302658
COX12	2,084 1564 1	0	0	559,92064 49	575,1	9,16766902 8	559,9 2064 49	1201,495 276	1170,6	10,1930324 7	1201,4 95276	NC_001144	224881	225212
COX13	1,773 7186 92	0	0	1227,0709 25	1260,3	10,2995514 8	1227, 0709 25	2240,832 702	2183,2	11,0922285 8	2240,8 32702	NC_001139	144768	145237
COX14	1,096 5730 5	0,3515 28842	0,7942 55025	192,10339 71	197,3	7,62424714 6	192,1 0339 71	216,8780 819	211,3	7,72314895 7	216,87 80819	NC_001145	14501	14793
COX15	1,382 6375 03	0,0027 82743	0,0227 67572	143,12759 89	147	7,19967234 5	143,1 2759 89	203,7105 503	198,5	7,63299519 7	203,71 05503	NC_001137	453419	454959
COX16	1,689 3655 92	0,0026 18766	0,0217 0567	50,294322 23	51,7	5,69209237 5	50,29 4322 23	87,51684 752	85,3	6,41447383 6	87,516 84752	NC_001142	432604	433040
COX17	1,283	0,0092	0,0614	189,03138	194,2	7,60139939	189,0	249,9284	243,5	7,92777796	249,92	NC_001144	131165	131454

	8518 06	10533	14548	12		1	3138 12	758		2	84758			
COX18	1,041 7252 18	0,8645 97437	1	33,624742 45	34,5	5,10852445 7	33,62 4742 45	36,06999 006	35,1	5,13339912 5	36,069 99006	NC_001139	616288	617318
COX19	1,624 8536 47	0,1928 1582	0,5720 503	18,259814 54	18,8	4,23266075 7	18,25 9814 54	11,57282 934	11,3	3,49825086 8	11,572 82934	NC_001144	108636	109012
COX2	7,760 2202 48	0,0016 66259	0,0145 51687	1,8418442 27	1,9	0,92599941 9	1,841 8442 27	14,73055 849	14,4	3,84799690 7	14,730 55849	NC_001224	73718	74553
COX20	1,174 3448 32	0,0798 00243	0,3222 36807	216,06329 22	221,9	7,79376585 7	216,0 6329 22	261,2330 274	254,5	7,99152184 6	261,23 30274	NC_001136	926253	926950
COX23	1,308 0674 28	0,3563 84729	0,7992 53495	20,303654 02	20,9	4,38543103 7	20,30 3654 02	27,43674 199	26,7	4,73876783 7	27,436 74199	NC_001140	341625	342160
COX26	1,352 4481 87	0	0	1287,5489 47	1322,4	10,3689429 1	1287, 5489 47	1792,779 812	1746,7	10,7704161 3	1792,7 79812	NC_001136	690974	691254
COX3	3,975 2108 62	0,0141 41653	0,0870 85698	3,2873149 59	3,4	1,76553474 6	3,287 3149 59	13,57878 643	13,2	3,72246602 4	13,578 78643	NC_001224	79173	80062
COX4	1,614 6699 38	0	0	637,02456 93	654,3	9,35380846	637,0 2456 93	1058,973 975	1031,8	10,0109476 4	1058,9 73975	NC_001139	149664	150211
COX5A	3,142 9968 97	0	0	372,24641 22	382,3	8,57856139	372,2 4641 22	1204,483 546	1173,5	10,1966021 3	1204,4 83546	NC_001146	531685	532226

COX5B	- 1,312 9611 7	2,3945 3E-05	0,0003 16726	545,84150 6	560,6	9,13082793 4	545,8 4150 6	427,9830 248	417	8,70390357 3	427,98 30248	NC_001141	155182	155805
COX6	2,189 9280 18	0	0	466,60400 73	479,2	8,90448409 8	466,6 0400 73	1051,900 284	1024,9	10,0012674 4	1051,9 00284	NC_001140	209665	210191
COX7	1,442 6295 08	0	0	1105,4307 26	1135,4	10,1489849 3	1105, 4307 26	1641,934 055	1599,7	10,6435856 6	1641,9 34055	NC_001145	778905	779167
COX8	2,372 8033 3	0	0	313,24358 88	321,7	8,32957212 6	313,2 4358 88	765,1603 183	745,5	9,54206454 2	765,16 03183	NC_001144	909689	910005
COX9	1,617 8082 04	0	0	670,43129 86	688,6	9,42752237 1	670,4 3129 86	1116,685 449	1088	10,0874628 4	1116,6 85449	NC_001136	334177	334436
CRC1	- 1,25 9882	0,1674 499	0,5279 32	79,21939 89	81,4	6,3469568 89	79,2 1939 89	64,7954 9527	63,1	5,9795681	64,795 4953	NC_001147	513255	514318
MPC2	1,00 6305 5	0,8394 101	1	2037,664 333	2092,9	11,031287 67	2037 ,664 333	2111,19 1197	2056,9	11,006255 94	2111,1 912	NC_001140	423032	423501
MPC5 4	1,53 5876 9	0,5891 49	0,9484 04	2,486646 06	2,6	1,3785116 23	2,48 6646 06	3,99150 6172	3,9	1,9634741 24	3,9915 0617	NC_001147	665745	667219
QCR10	1,399 6216 98	0	0	1890,6120 86	1941,8	10,9231789	1890, 6120 86	2724,292 99	2654,3	11,3741157 2	2724,2 9299	NC_001140	107786	108162

QCR2	1,399 3950 71	0,0671 94731	0,2874 79343	69,600747 69	71,5	6,15987133 7	69,60 0747 69	51,19989 06	49,9	5,64096791	51,199 8906	NC_001148	919341	920527
QCR6	1,363 4772 28	1,9853 3E-07	3,6964 4E-06	475,58880 71	488,5	8,93221475 2	475,5 8880 71	667,6857 876	650,5	9,34540524 7	667,68 57876	NC_001138	224286	224809
QCR7	1,392 2956 6	0	0	1610,5110 15	1654,1	10,6918307 4	1610, 5110 15	2308,516 353	2249,2	11,1351962 4	2308,5 16353	NC_001136	1496125	1496588
QCR8	1,336 0133 96	0	0	2230,8090 74	2291,3	11,1619506 5	2230, 8090 74	3068,573 465	2989,7	11,5457850 1	3068,5 73465	NC_001142	106394	106758
QCR9	1,738 4783 74	0	0	826,92873 68	849,3	9,73013044	826,9 2873 68	1480,018 054	1442	10,4938554 5	1480,0 18054	NC_001139	859023	859516
Capacidade Fermentativa														
ACH1	1,00 5795 5	0,9811 036	1	33,01965 18	33,9	5,0832133 68	33,0 1965 18	34,1973 8131	33,3	5,0574502 72	34,197 3813	NC_001134	194082	195742
ACS1	- 1,10 3242	0,8140 051	1	11,84938 794	12,2	3,6088092 43	11,8 4938 794	11,0880 3477	10,8	3,4329594 07	11,088 0348	NC_001133	42841	45062
ACS2	- 1,13 0756	0,4987 503	0,9060 77	63,59549 678	65,3	6,0290110 87	63,5 9549 678	57,9052 6072	56,4	5,8176232 58	57,905 2607	NC_001144	445484	447615
ADH1	- 1,639 1594 79	0	0	8106,5622 42	8326,2	13,0234425	8106, 5622 42	5091,745 808	4960,9	12,2763861 6	5091,7 45808	NC_001147	159508	160634

ADH2	- 1,645 2136 22	2,5538 5E-09	5,9611 8E-08	366,59338 64	376,5	8,55650605 5	366,5 9338 64	229,4046 48	223,5	7,80413102 1	229,40 4648	NC_001145	873251	874377
ADH3	- 1,156 1183	0,0323 71222	0,1690 1718	461,63257 69	474,1	8,88904758 3	461,6 3257 69	411,0235 002	400,5	8,64565843 2	411,02 35002	NC_001145	434748	435955
ADH4	- 2,114 5337 24	9,9920 1E-16	3,7987 6E-14	338,34453 18	347,5	8,44086916 8	338,3 4453 18	164,7668 736	160,5	7,32642948 7	164,76 68736	NC_001139	15119	16347
ADH5	1,034 3300 76	0,5642 47519	0,9364 01936	564,93614 54	580,2	9,18040648 5	564,9 3614 54	601,5303 537	586,1	9,19500302 7	601,53 03537	NC_001134	533722	534857
ADH6	- 1,581 6666 33	0,0402 88063	0,1982 8598	50,165617 59	51,5	5,68650052 7	50,16 5617 59	32,65749 856	31,8	4,99095486	32,657 49856	NC_001145	911021	912183
ADH7	1,291 0269 8	0,6816 26519	0,9762 06368	4,4538460 57	4,6	2,20163386 1	4,453 8460 57	5,918447 228	5,8	2,5360529	5,9184 47228	NC_001135	309030	310195
ALD2	- 1,185 8032 79	0,3305 43627	0,7724 03934	70,089887 81	72	6,16992500 1	70,08 9887 81	60,83336 495	59,3	5,8899602	60,833 36495	NC_001145	601522	603122
ALD4	- 1,145 6567 26	0,1486 79953	0,4893 56672	238,28915 61	244,7	7,93487029 1	238,2 8915 61	214,0715 266	208,6	7,70459534 8	214,07 15266	NC_001147	1039800	1041439
ALD5	1,822 4948 83	0,0130 98363	0,0818 51877	25,225767 54	25,9	4,69488019 3	25,22 5767 54	47,32376 48	46,1	5,52669484 6	47,323 7648	NC_001137	303990	305632
ALD6	1,144 3788 85	0,7176 58275	0,9846 32044	13,246418 3	13,6	3,76553474 6	13,24 6418 3	15,57342 478	15,2	3,92599941 9	15,573 42478	NC_001148	432548	434130
ADY2	3,39	0,0020	0,0177	7,110692	7,3	2,8678964	7,11	24,8506	24,2	4,5969351	24,850	NC_001135	132233	133164

	4358 1	86	77	908		64	0692 908	1355		42	6135			
ADY3	- 1,20 8593	0,6898 089	0,9788 38	9,676759 608	9,9	3,3074285 25	9,67 6759 608	8,18364 3608	8	3	8,1836 4361	NC_001136	26363	28815
ADY4	1,29 0774 8	0,2561 459	0,6730 33	34,36827 167	35,3	5,1415962 78	34,3 6827 167	45,6660 5662	44,5	5,4757334 31	45,666 0566	NC_001144	590522	592083
CIT1	1,12 0584 2	0,0199 961	0,1152 04	776,5433 373	797,6	9,6395216	776, 5433 373	895,945 3021	872,9	9,7696725 77	895,94 5302	NC_001146	629582	631101
CIT2	- 1,30 241	0,0006 14	0,0060 67	379,5187 424	389,8	8,6065902 8	379, 5187 424	300,021 9607	292,3	8,1913060 19	300,02 1961	NC_001135	120906	122368
CIT3	1,27 9897 4	0,5597 95	0,9334 13	9,764780 113	10	3,3219280 95	9,76 4780 113	12,8451 2767	12,5	3,6438561 9	12,845 1277	NC_001148	556337	557877
DLD1	1,21 2118 8	0,0767 913	0,3149 58	151,4882 255	155,6	7,2816982 5	151, 4882 255	189,100 6219	184,2	7,5251292 51	189,10 0622	NC_001136	145786	147629
DLD2	1,27 6621 6	0,1773 715	0,5445 51	53,27382 445	54,7	5,7734689 28	53,2 7382 445	69,9940 4107	68,2	6,0916998 34	69,994 0411	NC_001136	139482	141154
DLD3	1,05	0,6668	0,9749	137,2658	141	7,1395513	137,	148,711	144,9	7,1789137	148,71	NC_001137	16315	17885

	2239 1	098	61	645		52	2658 645	7885		85	1788			
JEN1	6,74 9376 3	0	0	32,90149 989	33,8	5,0789513 41	32,9 0149 989	228,659 2258	222,8	7,7996054 22	228,65 9226	NC_001143	22194	24124
MSN1	1,02 8674 8	0,8526 611	1	83,81011 339	86,1	6,4279413 33	83,8 1011 339	88,7551 4051	86,5	6,4346282 28	88,755 1405	NC_001147	99769	100997
MSN2	- 1,02 6091	0,9586 725	1	8,073589 072	8,3	3,0531113 36	8,07 3589 072	8,12560 3582	7,9	2,9818526 53	8,1256 0358	NC_001145	344363	346557
MSN4	- 1,44 1006	0,1442 674	0,4808 6	38,09478 933	39,1	5,2890967 02	38,0 9478 933	27,1992 6684	26,5	4,7279204 55	27,199 2668	NC_001143	323188	325160
MSN5	1,13 1393	0,4523 54	0,8769 23	68,60634 321	70,5	6,1395513 52	68,6 0634 321	79,9752 417	77,9	6,2835514 23	79,975 2417	NC_001136	1141128	114488
PAU1	- 1,171 9689 07	0,9338 85238	1	0,5383729 1	0,6	- 0,73696559 4	0,538 3729 1	0,473433 928	0,5	-1	0,4734 33928	NC_001142	8736	9178
PAU10	4,095 6717 98	0,6652 68572	0,9741 38622	0,1345932 28	0,1	- 3,32192809 5	0,134 5932 28	0,378747 142	0,4	- 1,32192809 5	0,3787 47142	NC_001136	1523209	1523651
PAU11	1	1	1	0	0	- 1,7977E+30	0	0	0	- 1,7977E+30	0	NC_001139	6250	6692

						8				8				
PAU12	1,313 2860	0,6602 89119	0,9727 17133	4,5088731 22	4,6	2,20163386 1	4,508 8731	6,059954 275	5,9	2,56071495 4	6,0599 54275	NC_001139	1080266	1080708
PAU13	1,797 7E+3 08	0,6508 87049	0,9711 04896	0	0	- 1,7977E+30 8	0	0,189373 571	0,2	- 2,32192809 5	0,1893 73571	NC_001140	11883	12325
PAU14	2,047 8358 99	0,7053 41105	0,9833 57637	0,4037796 83	0,4	- 1,32192809 5	0,403 7796 83	0,852181 07	0,8	- 0,32192809 5	0,8521 8107	NC_001141	8753	9195
PAU15	1,919 8461 55	0,6315 6702	0,9645 84266	0,7817174 66	0,8	- 0,32192809 5	0,781 7174 66	1,558165 743	1,5	0,58496250 1	1,5581 65743	NC_001141	433889	434343
PAU16	3,413 0598 31	0,5303 58528	0,9208 60086	0,2626738 8	0,3	- 1,73696559 4	0,262 6738 8	1,016355 738	1	0	1,0163 55738	NC_001143	1770	2221
PAU17	- 1,450 8069 2	0,2824 29946	0,7084 74013	19,933795 37	20,5	4,35755200 5	19,93 3795 37	14,20680 53	13,8	3,78659636 2	14,206 8053	NC_001144	94707	95161
PAU18	1,365 2239 33	0,8547 7721	1	0,6056695 24	0,6	- 0,73696559 4	0,605 6695 24	0,852181 07	0,8	- 0,32192809 5	0,8521 8107	NC_001144	13043	13485
PAU19	1,251 4552 71	0,8743 42423	1	0,9120037 1	0,9	- 0,15200309 3	0,912 0037 1	1,099881 701	1,1	0,13750352 4	1,0998 81701	NC_001145	922601	923055
PAU2	1,564 3190 89	0,3465 92513	0,7886 79586	6,9988478 32	7,2	2,84799690 7	6,998 8478 32	11,26772 748	11	3,45943161 9	11,267 72748	NC_001137	63688	64130
PAU20	1,663 8666	0,6085 07352	0,9559 93561	1,5478221 17	1,6	0,67807190 5	1,547 8221	2,651229 995	2,6	1,37851162 3	2,6512 29995	NC_001147	11509	11951

	68						17							
PAU21	1,279 8974	0,9071 5435	1	0,3454559 51	0,4	- 1,32192809 5	0,345 4559	0,555495 809	0,5	-1	0,5554 95809	NC_001147	1082678	1083252
PAU22	1,279 8974 37	0,9071 5435	1	0,3948068 01	0,4	- 1,32192809 5	0,394 8068 01	0,486058 832	0,5	-1	0,4860 58832	NC_001148	7893	8467
PAU23	- 1,056 6932 77	0,8649 46194	1	19,282364 15	19,8	4,30742852 5	19,28 2364 15	18,78964 572	18,3	4,19377174 3	18,789 64572	NC_001144	222645	223099
PAU24	- 2,050 9455 87	0,3930 07238	0,8328 44778	4,1050934 4	4,2	2,07038932 8	4,105 0934 4	2,083109 282	2	1	2,0831 09282	NC_001134	809017	809459
PYC1	1,39 7648	0,0222 732	0,1264 87	77,93415 925	80	6,3219280 95	77,9 3415 925	112,063 8586	109,2	6,7708290 46	112,06 3859	NC_001139	385156	388772
PYC2	1,80 2625 8	0,0001 746	0,0019 55	60,14431 142	61,8	5,9495349 33	60,1 4431 142	111,641 2522	108,8	6,7655347 46	111,64 1252	NC_001134	658667	662289
TDH1	- 1,65 7512	0	0	12905,62 521	13255,3	13,694281 7	1290 5,62 521	8016,32 373	7810,3	12,931162 25	8016,3 2373	NC_001142	338231	339309
TDH2	- 1,95 4917	0	0	5469,332 415	5617,5	12,455712 5	5469 ,332 415	2880,41 154	2806,4	11,454504 94	2880,4 1154	NC_001142	453643	454721
TDH3	- 2,57	0	0	11989,02	12313,9	13,588000	1198	4787,72	4664,7	12,187568	4787,7	NC_001139	882772	883850

	8141			431		14	9,02 431	6416		58	2642			
STR2	3,18 8623 5	4,441E -16	1,71E- 14	57,11474 126	58,7	5,8752885 98	57,1 1474 126	187,627 9314	182,8	7,5141222 6	187,62 7931	NC_001142	665178	667177
STR3	9,82 1253 8	0	0	9,523337 328	9,8	3,2927817 49	9,52 3337 328	96,5002 6099	94	6,5545888 52	96,500 261	NC_001139	154575	156052
Estresse Oxidativo														
CTA1	1,45 7355 6	0,0973 568	0,3712 42	31,71939 813	32,6	5,0268000 59	31,7 1939 813	47,6269 0262	46,4	5,5360529	47,626 9026	NC_001136	968093	969720
DAK1	- 1,48 0053	0,0035 521	0,0277 74	133,6965 145	137,3	7,1011878 15	133, 6965 145	92,9494 0442	90,6	6,5014391 45	92,949 4044	NC_001145	133435	135269
DAK2	- 1,67 4241	0,2732 328	0,6961 3	11,63663 035	12	3,5849625 01	11,6 3663 035	7,21874 779	7	2,8073549 22	7,2187 4779	NC_001138	23383	25238
DDR2	1,14 7746	3,205E -06	4,96E- 05	2096,400 233	2153,2	11,072266 62	2096 ,400	2477,32 0914	2413,6	11,236970 89	2477,3 2091	NC_001147	231530	231795

	8						233							
DDR48	1,19 3848	0,0046 571	0,0347 88	459,9693 884	472,4	8,8838651 55	459, 9693	565,332 1764	550,8	9,1053847 49	565,33 2176	NC_001145	608649	610021
GPD1	- 2,40 7377	0	0	383,5467 497	393,9	8,6216856 07	383, 5467 497	163,994 3724	159,8	7,3201235 98	163,99 4372	NC_001136	411785	413040
GPD2	- 1,46 9925	0,0001 635	0,0018 44	230,6044 366	236,9	7,8881343 88	230, 6044 366	161,516 547	157,4	7,2982917 31	161,51 6547	NC_001147	217086	218488
HOR2	- 1,24 3182	0,2581 189	0,6746 92	59,46580 82	61,1	5,9331004 75	59,4 6580 82	49,2518 4077	48	5,5849625 01	49,251 8408	NC_001137	279890	280722
HOR7	- 1,13 2565	0	0	16085,19 4	16521	14,012013 39	1608 5,19 4	14622,3 1617	14246,5	13,798319 91	14622, 3162	NC_001145	774712	774971
NAR1	1,68 4127 6	0,0343 654	0,1769 55	25,25620 03	25,9	4,6948801 93	25,2 5620 03	43,7325 9303	42,6	5,4127815 25	43,732 593	NC_001146	198462	200017
RFA1	1,06 2772	0,7711 578	0,9907 5	43,60766 475	44,8	5,4854268 27	43,6 0766 475	47,6888 0164	46,5	5,5391588 11	47,688 8016	NC_001133	156714	158659
RFA2	1,06 7294	0,6593 913	0,9724 68	87,31318 103	89,7	6,4870360 8	87,3 1318	95,9218 6062	93,5	6,5468944 6	95,921 8606	NC_001146	48247	49256

	6						103							
RFA3	- 1,03 5172	0,8496 953	1	60,31034 985	61,9	5,9518675 04	60,3 1034	59,9867 7298	58,4	5,8678964 64	59,986 773	NC_001142	96121	96569
SFA1	1,11 7972 5	0,0066 776	0,0468 46	1101,289 087	1131,1	10,143510 77	1101 ,289 087	1267,59 3529	1235	10,270295 33	1267,5 9353	NC_001136	159564	160804
SLP1	1,43 2001 2	0,3058 121	0,7407 86	13,44684 77	13,8	3,7865963 62	13,4 4684 77	19,8161 0845	19,3	4,2705289 42	19,816 1084	NC_001147	624689	626532
TRR1	1,05 8467 3	0,5404 576	0,9245 42	222,2245 647	228,2	7,8341549 81	222, 2245 647	242,138 67	235,9	7,8820316 08	242,13 867	NC_001136	1183259	118429
TRR2	- 1,02 8043	0,8515 246	1	91,54222 993	94	6,5545888 52	91,5 4222 993	91,6902 1103	89,3	6,4805882 7	91,690 211	NC_001140	325558	326666
TRR4	1	1	1	0	0	- 1,798E+30 8	0	0	0	- 1,7977E+3 08	0	NC_001144	818569	818720

Representação dos dados analisados do sequenciamento de RNA, com representação dos dados: Feature ID; D4 vs C4 fold change; D4 vs C4 s - P-value; D4 vs C4 s - FDR C4 -Expression values; C4 - Normalized expression values; C4 - Transformed values; C4 - RPKM; D4 - Expression values; D4 - Normalized expression values; D4 - Transformed values; D4 - RPKM; D4 - Chromosome; D4 - region start; D4 - region end.