

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

Danielle Fernanda Carvalheiro Silva

Análise por técnica de RDA (*Representational Difference Analysis*) da expressão gênica diferencial, para a identificação de fatores genéticos associados à produção de etanol em linhagem de *Saccharomyces cerevisiae*

Araraquara

2012

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

Danielle Fernanda Carvalheiro Silva

Análise por técnica de RDA (*Representational Difference Analysis*) da expressão gênica diferencial, para a identificação de fatores genéticos associados à produção de etanol em linhagem 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

2012

Que eu continue a acreditar no outro, mesmo sabendo de alguns valores tão estranhos que permeiam o mundo!

Que eu continue otimista, mesmo sabendo que o futuro que nos espera nem sempre é tão alegre!

Que eu continue com a vontade de viver, mesmo sabendo que a vida é em muitos momentos, uma lição difícil de ser aprendida!

Que eu permaneça com a vontade de ter grandes amigos, mesmo sabendo que com as voltas do mundo, eles vão indo embora de nossas vidas!

Que eu realmente sempre a vontade de ajudar as pessoas, mesmo sabendo que muitas delas são incapazes de ver, sentir, entender ou utilizar esta ajuda!

Que eu mantenha meu equilíbrio, mesmo sabendo que os desafios são inúmeros ao longo do caminho!

Que eu exteriorize a vontade de amar, entendendo que amar não é sentimento de posse. É sentimento de doação!

Que eu sustente a luz e o brilho no olhar, mesmo sabendo que muitas coisas que vejo no mundo, escurecem meus olhos!

Que eu retroalimente minha garra, mesmo sabendo que a derrota e a perda são ingredientes tão fortes quanto o Sucesso e a Alegria!

Que eu atenda sempre mais a minha intuição, que sinaliza o que de mais autêntico possuo!

Que eu pratique sempre mais o sentimento de justiça, mesmo em meio à turbulência dos interesses!

Que eu não perca o meu forte abraço e o distribua sempre;

Que eu perpetue a beleza e o brilho de ver, mesmo sabendo que as lágrimas também brotam dos meus olhos!

E que eu manifeste o amor por minha família, mesmo sabendo que ela muitas vezes me exige muito para manter sua harmonia!

Que eu acalente a vontade de ser grande, mesmo sabendo que minha parcela de contribuição no mundo é pequena!

E, acima de tudo... Que eu lembre sempre que todos nós fazemos parte desta maravilhosa teia chamada Vida, criada por Alguém bem superior a todos nós!

E que as grandes mudanças não ocorrem por grandes feitos de alguns e, sim, nas pequenas parcelas cotidianas de todos nós!

Crystal - Pequena Parcela, 2006
Chico Xavier

Ao meu doce e eterno pai Carlos...

Que não viu o final deste trabalho que com certeza era seu maior orgulho.

Que jamais mediu esforços para minha realização e que, muitas vezes,
abdicou de seus sonhos para que eu pudesse realizar o meu.

À você, dedico minha vida, meu amor e meu eterno carinho e gratidão.

Você representa todos os meus sonhos, é por você que construo castelos.

Obrigada, te amo muito!

A Deus,

Pai, obrigado pela benção de conquistar mais um ciclo de minha vida. Agradeço pela força diária necessária para enfrentar as provas do dia a dia. Que todos os obstáculos e dores de meu caminho sejam revertidos em força e sabedoria. Guie-me com sua luz.

Aos meus pais Carlos (*in memoriam*) e Cecília, pela minha vida, pelo amor incondicional, pelo aprendizado, pelas broncas e por acreditarem em mim! Devo a minha vida a vocês!

Às minhas amadas irmãs, Daiane e Danúbia, pelo companheirismo, amor, cumplicidade, por completarem a minha vida, ela não teria sentido sem vocês!

A todos da minha família, minha avó, meus tios, meus primos, a quem devo grande parte de quem eu sou e por terem me ensinado o significado de valores humanos inestimáveis, os quais trago sempre em minha vida.

Ao meu namorado Bruno, que está comigo quando penso que nem eu mesma estou. Que me protege, que me cuida e que me defende, que me diz como melhorar, que possui o sorriso mais lindo do mundo e que sabe me fazer sorrir! Com você minha carga ficou mais leve, obrigada pela paciência e por saber entender a minha ausência. Te amo!

Aos meus pais de coração, minha querida Isa e Marco, obrigada por me acolherem como parte da família, pelo amor, carinho e cuidado constante que vocês têm por mim!

Aos meus queridos cunhados João e Alex pela companhia e por cuidarem das minhas irmãs.

“Uma vida sem amor não vale nada. E amar se aprende em casa, com os pais e os irmãos. A família é a primeira escola do amor. O lar é o lugar mais abençoado do mundo. Digo-lhe de coração: ame sua família! O lar é o primeiro espaço para a vida, a primeira escola do amor, o lugar providencial onde se aprende o exercício da fraternidade. Faça de seu lar um lugar de paz e alegria!”

(Jesus Cristo)

Às minhas amigas,

À Aline (*in memoriam*), por ter passado a nossa melhor fase juntas, como as nossas brincadeiras eram gostosas, hoje quando fecho os olhos e me lembro de você, logo as imagens das brincadeiras de barbie no quintal, as risadas, as nossas travessuras e toda a nossa inocência me veem a cabeça e junto com elas uma saudade sem fim!!! Sinto muita a sua falta!

À Tatiane, nossa Ermã, como seria minha estadia em Araraquara sem você? Não sei mesmo, foram tantas conversas, tantas risadas, tantas gordisses, tantos tombos (literalmente também), tantos consolos, tantas caronas, tantos aprendizados, enfim... Você me apoiou em todos os meus momentos difíceis e soube me fazer rir quando ainda existiam lágrimas em meus olhos. Muito obrigada por estar na minha vida e por me ensinar enxergar o sol atrás das nuvens!

À Mariana, te conheci quando achei que tivesse tudo perdido, logo no primeiro dia, já soube tudo da sua vida, e achei tudo isso um máximo, pelo simples fato de achar que você confiaria em mim e não me esconderia nada! Tivemos desafios juntos como cozinhar, limpar e lutar, é lutamos Muay Thai, e modesta parte éramos boas nisso. Mas nossos maiores desafios era nos ajudar sentimentalmente, quantas horas, quantas madrugadas passamos desabafando, ouvindo, dando conselhos e vibrando com as alegrias e também sofrendo com o sofrimento da outra, esse apartamento foi um verdadeiro consultório de Psicologia. Obrigada por tudo querida Mari! Sentirei muito a sua falta! Ah, só tenho uma palavra pra te dizer... Ticaricatica!!!

À Suélen por ter me levado para um lindo caminho de luz, que graças a esta atitude me ajudou a enfrentar uma das maiores dores que passei e confortar o meu coração. Muito obrigada, pela ajuda! Que você continue sendo essa pessoa iluminada.

À Natália pelo apoio, à Jaque pelo carinho, à Karina pelas risadas e pela amizade.

À minha orientadora Ana Marisa,

Pessoa justa e competente 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 grande família Micologia na qual conquistei durante a minha caminhada: Rosângela, Rosemira, Tatiane, Jaqueline, Natália, Aline, Haroldo, Carolina (Panta), Julhiany, Ana Carolina, Patrícia, Suélen, Janaína, Fernanda Gullo, Fernanda Sangalli, Nayla, Kayla, Fernanda Campos, Carolina (MG), Regina, Thaís e o seu Príncipe Lorenzo, Warley, Vanessa, Maysa, Valter e Sr. Torres. Agradeço por fazerem parte do meu amadurecimento tanto profissional, quanto pessoal, vocês com certeza fizeram parte dos meus melhores momentos dessa fase, obrigada pelas risadas, pelas festas, pelas comidas (alias, quantas comidas!!!), pelos conselhos e principalmente pelo apoio de quando mais precisei, vocês estarão sempre em meu coração!!!

Um agradecimento especial, ao meu amigo Haroldo, que foi mais que essencial para a conclusão deste trabalho nesta reta final, por ter tido paciência para me ensinar, me acompanhar e pelo carinho. Torço muito para que alcance todos os seus ideais, você merece!

À querida Eliana pelos conselhos, risadas e por ser uma pessoa tão amável.

Ao Warley, pela sua alegria contagiante e por ter me dado todo o suporte tecnológico para que este trabalho ficasse apresentável, você foi essencial!! Muito obrigada mesmo!

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

À Flávia pelo apoio nos experimentos e por ser uma grande amiga.

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!!!

Sumário

Lista de Siglas, Abreviaturas e Símbolos.....	3
Lista de Figuras.....	6
Lista de Tabelas.....	8
RESUMO.....	9
ABSTRACT.....	10
CAPÍTULO I.....	11
1. INTRODUÇÃO e REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	12
2. JUSTIFICATIVA.....	23
3. OBJETIVOS.....	24
3.1. Objetivos específicos.....	24
4. METODOLOGIA.....	25
4.1. Micro-organismos.....	25
4.2. Isolamento das leveduras.....	25
4.3. Identificação de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	25
4.3.1. Extração de DNA genômico.....	26
4.3.2. Quantificação do DNA.....	26
4.3.3. Identificação por PCR.....	27
4.3.4. Identificação por PCR-RFLP.....	27
4.4. Caracterização dos isolados de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	28
4.4.1. Análise da macromorfologia das colônias isoladas.....	28
4.4.2. Análise da micromorfologia das células.....	28
4.4.3. Ensaio de floculação.....	28
4.4.4. Teste de produção de sulfeto de hidrogênio (H ₂ S).....	28
4.5. Seleção dos isolados de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	29
4.5.1. Teste de sensibilidade à alta concentração de açúcares.....	29
4.5.2. Teste de sensibilidade à temperatura.....	29
4.5.3. Teste de sensibilidade a etanol (10% e 12%).....	29
4.5.4. Teste qualitativo da capacidade fermentativa.....	29
4.5.5. Avaliação da capacidade de produção de biofilmes das cepas de <i>S. cerevisiae</i>	30
4.6. Ensaio fermentativos dos isolados selecionadas.....	30
4.6.1. Determinação do teor de etanol nas amostras utilizando o método ultravioleta (UV)..	31
4.6.2. Determinação de açúcar total.....	32

4.7	Sequenciamento da região ITS1 e ITS2 e do fragmento rRNA 5.8S	32
4.8	Análise de expressão diferencial de genes	33
4.8.1	Extração de RNA total e síntese de cDNA.....	33
4.8.2	Metodologia de RDA (<i>Representational Difference Analysis</i>).....	33
4.8.3	Síntese de cDNA fita simples.....	33
4.8.4	Síntese de cDNA fita dupla.....	34
4.8.5	Digestão com Sau3AI.....	34
4.8.6	Anelamento do primeiro par de adaptadores.....	34
4.8.7	Ligação do primeiro par de adaptadores	34
4.8.8	Teste de ligação do primeiro par de adaptadores	34
4.8.9	Primeira subtração.....	35
4.8.10	Amplificação dos produtos diferenciais da primeira subtração	35
4.8.11	Segunda amplificação	35
4.8.12	Ligação dos fragmentos em vetor de clonagem	36
4.8.13	Preparo de células competentes para transformação por eletroporação.....	36
4.8.14	Transformação de células de <i>E. coli</i> por eletroporação.....	36
4.8.15	Extração de DNA plasmidial em microplaca	37
4.8.16	Sequenciamento	37
4.8.17	Análise das sequências	38
5	RESULTADOS	38
5.1	Isolamento das leveduras	38
5.2	Identificação de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	39
5.2.1	PCR	39
5.2.2	Identificação por PCR-RFLP	39
5.3	Caracterização dos isolados de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	41
5.3.1	Análise da macromorfologia das colônias isoladas.....	41
5.3.2	Análise microscópica das células de leveduras isoladas	41
5.3.3	Ensaio de floculação.....	42
5.3.4	Teste de produção de sulfeto de hidrogênio.....	42
5.3.5	Seleção dos isolados de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	43
5.3.5.1	Teste de sensibilidade a alta concentração de açúcares.....	43
5.3.5.2	Teste de tolerância à temperatura.....	43
5.3.5.3	Teste de tolerância ao etanol	44
5.3.5.4	Teste qualitativo de capacidade fermentativa.....	45

5.3.5.5	Avaliação da capacidade de produção de biofilmes dos isolados selecionadas de <i>S. cerevisiae</i>	45
5.4	Ensaio fermentativo dos isolados selecionados.....	46
5.5	Sequenciamento da região ITS1, ITS2 e do gene rRNA 5.8S.....	47
5.6	Análise de genes diferencialmente expressos por isolados de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> após ensaio fermentativo	50
5.6.1	Extração de RNA total após ensaio fermentativo.....	50
5.6.2	Ensaio de RDA.....	50
5.6.3	Produtos diferencialmente expressos	51
6	DISCUSSÃO	53
7	CONCLUSÕES.....	61
8	BIBLIOGRAFIA.....	62
CAPÍTULO II		72

Lista de Siglas, Abreviaturas e Símbolos

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ = Sulfato de Amônio

°C = Graus Celsius

uL = Microlitro

5.8s = Regiões Ribossomal

Acetil CoA = Acetilcoenzima

ATP = Adenosina Trifosfato

BG-1 = Linhagem de levedura isolada da Usina Barra Grande

bp = Pares de Base

BSA = Bovine Serum Albumin (=Soro Albumina Bovina)

CAP3 = Programa para montagem de *Contigs*

CAT-1 = Linhagem de levedura isolada da Usina Catanduva

cDNA = DNA Complementar

Cfo I = Enzima de Restrição

CL = Linhagem de levedura isolada da Usina Clealco

CO₂ = Gás Carbônico

CR -1 = Linhagem de levedura isolada da Usina Crisciumal

CTAB = Brometo de cetiltrimetilamonio

D1/D2 = Região de Domínio do DNA Ribossomal

ddNTP = Didioxinucleotídeos

DEPEC = Dietil pirocarbonato

DNA = Àcido Desoxirribonucléico

DTT = Ditionotriol

EDTA = Àcido Etilenodiamino Treta-Acético

ELISA = Tipo de Placas de Cultivo

ESTs = *Expressed Sequence Tags* (= Etiqueta de sequencia expressa)

EUA = Estados Unidos da América

x g = Força da Gravidade

GTE = Glicose – Tris-HCL-EDTA

h = Horas

Hae III = Enzima de Restrição

Hinf I = Enzima de Restrição

HO = Gene Homólogo das Espécies de *S. cerevisiae*; *S. bayanaus* e *S. pastorianus*

Hsps = *Heat Shock Protein* (= Proteína de choque térmico)

IPTG = Isopropil – tio- β - D- galactopiranosídeo

ITS = Regiões Intragênicas

ITS 1 = Região Ribossomal

ITS 2 = Região Ribossomal

ITS 4 = Região Ribossomal

JAY270 = Linhagem de levedura mutante

JAY291 = Linhagem de levedura mutante

KH_2SO_4 = Sulfato de Potássio

LA = Extrato de levedura – Peptona – Glicose – Acetato de chumbo – Sulfato de Amônio

LB = Extrato de levedura – Triptona – Cloreto de sódio

M = Molar

Mg^{2+} = Cátion de Magnésio

MgCl^{+2} = Cátion Cloreto de Magnésio

mL = Mililitro

mRNA = RNA Mensageiro

NaCl = Cloreto de Sódio

NAD^+ = Dinucleótido de nicotinamida e adenina

NADH = Forma reduzida de Dinucleótido de nicotinamida e adenina

NaOH = Hidróxido de Sódio

ng = Nanogramas

nm = nanômetros

PCR = *Polimerase Chain Reaction* (= Reação em Cadeia da Polimerase)

PE-2 = Linhagem de levedura isolada da Usina da Pedra

pH = Indicador de Condição Ácida ou Básica

PIB = Produto Interno Bruto

PROÁLCOOL = Programa Nacional do Álcool

Proteinase K = Enzima

RDA = *Representational Difference Analysis* (= Análise de diferença representational)

RFLP = *Restriction Fragment Length Polymorphism* (= Polimorfismos de Fragmentos de Restrição)

RNA = Ácido Ribonucléico

rpm = Rotação por minuto

rRNA = Ácido ribonucleico ribossomal

SA – 1 = Linhagem de levedura isolada da Usina Santa Adélia

SDS = Dodecilsulfato de sódio

SOC = Meio de cultura

TBE = 2-amino-2-hidroximetilpropano – ácido bórico - EDTA

TE = 2-amino-2-hidroximetilpropano - EDTA

TES = 2-amino-2-hidroximetilpropano – EDTA - Dodecilsulfato de sódio

Tris- Hcl = 2-amino-2-hidroximetilpropano – Ácido Clorídrico

UV = Ultravioleta

v/v = Volume sobre Volume

w/v = Massa sobre volume

X-Gal = S-bromo-4-cloro-3-indilil- β -galactopiranosídeo

XTT = *2,3-Bis-(2-Methoxy-4-Nitro-5-Sulfophenyl)-2H-Tetrazolium-5-Carboxanilide*

YEPD = Extrato de levedura – peptona – dextrose

YNB = Extrato de levedura - Meio de Nitrogênio base

Lista de Figuras

- FIGURA 1: PCR DE IDENTIFICAÇÃO UTILIZANDO PAR DE PRIMER SCHO COM AMPLIFICAÇÃO DO FRAGMENTO DE 400BP, LADDER DE 1Kb: PE-2 – LINHAGEM CONTROLE, 1 – ZDC1, 2 – ZDC2, 3 – ZDC3, 4 – ZDC4, 5 – ZDC5, 6 – ZCC1, 7 – ZCC2, 8 – ZCC3, 9 – ZCC4, 10 – ZCC5, 11 – ZFC1, 12 – ZFC2, 13 – ZFC3, 14 – ZFC4, 15 – ZFC5, 16 – ZFC6, 17 – ZFC7, 18 – ZFC8, 19 – ZFC9, 20 – ZFC10, 21 – ZFC11, 22 – ZFC12, 23 – ZFD1, 24 – ZFD2, 25 – ZFD3, 26 – ZFD4, 27 – ZFD5, 28 – ZFD6, 29 – ZFD7, 30 – ZFD8, 31 – ZFD9, 32 – ZFD10, 33 – ZFD11, 34 – ZFD12. 39
- FIGURA 2: PERFIL DE PCR UTILIZANDO PAR DE PRIMER ITS1 E ITS4. FOTOGRAFIA DE GEL DE AGAROSE 0,8% COM PRODUTO AMPLIFICADO DO GENE rRNA DAS LEVEDURAS *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* ISOLADAS. 01: MARCADOR DE PESO MOLECULAR 100PB DNA LADDER (INVITROGEN). PE-2: LINHAGEM CONTROLE E LEVEDURAS ISOLADAS 1 - 28: ZCC4, ZCC5, ZDC1, ZDC4, ZDC5, ZFC1, ZFC2, ZFC3, ZFC4, ZFC5, ZFC6, ZFC7, ZFC8, ZFC9, ZFC10, ZFC11, ZFC12, ZFD1, ZFD2, ZFD3, ZFD4, ZFD5, ZFD7, ZFD8, ZFD9, ZFD10, ZFD11, ZFD12..... 39
- FIGURA 3: PERFIL DE PCR-RFLP UTILIZANDO ENZIMA DE RESTRIÇÃO *CfoI*. FOTOGRAFIA DE GEL DE AGAROSE 2,0% COM PRODUTOS DE PCR-RFLP REALIZADO COM PRODUTO DE AMPLIFICADO DO GENE rRNA DAS LEVEDURAS ISOLADAS *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*; 01: MARCADOR DE PESO MOLECULAR 1 Kb DNA LADDER (INVITROGEN). PE-2: LINHAGEM CONTROLE E LEVEDURAS ISOLADAS 1 - 28: ZCC4, ZCC5, ZDC1, ZDC4, ZDC5, ZFC1, ZFC2, ZFC3, ZFC4, ZFC5, ZFC6, ZFC7, ZFC8, ZFC9, ZFC10, ZFC11, ZFC12, ZFD1, ZFD2, ZFD3, ZFD4, ZFD5, ZFD7, ZFD8, ZFD9, ZFD10, ZFD11, ZFD12. 40
- FIGURA 4: PERFIL DE PCR-RFLP UTILIZANDO ENZIMA DE RESTRIÇÃO *HaeIII*. FOTOGRAFIA DE GEL DE AGAROSE 2,0% COM PRODUTOS DE PCR-RFLP REALIZADO COM PRODUTO DE AMPLIFICADO DO GENE rRNA DAS LEVEDURAS ISOLADAS *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*. 01: MARCADOR DE PESO MOLECULAR 100PB DNA LADDER (INVITROGEN). PE-2: LINHAGEM CONTROLE E LEVEDURAS ISOLADAS 1 - 28: ZCC4, ZCC5, ZDC1, ZDC4, ZDC5, ZFC1, ZFC2, ZFC3, ZFC4, ZFC5, ZFC6, ZFC7, ZFC8, ZFC9, ZFC10, ZFC11, ZFC12, ZFD1, ZFD2, ZFD3, ZFD4, ZFD5, ZFD7, ZFD8, ZFD9, ZFD10, ZFD11, ZFD12. 40
- FIGURA 5: PERFIL DE PCR-RFLP UTILIZANDO ENZIMA DE RESTRIÇÃO *HinfI*. FOTOGRAFIA DE GEL DE AGAROSE 2,0% COM PRODUTOS DE PCR-RFLP REALIZADO COM PRODUTO DE AMPLIFICADO DO GENE rRNA DAS LEVEDURAS ISOLADAS *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*. 01:

MARCADOR DE PESO MOLECULAR 100PB DNA LADDER (INVITROGEN). PE-2: LINHAGEM CONTROLE E LEVEDURAS ISOLADAS 1 - 28: ZCC4, ZCC5, ZDC1, ZDC4, ZDC5, ZFC1, ZFC2, ZFC3, ZFC4, ZFC5, ZFC6, ZFC7, ZFC8, ZFC9, ZFC10, ZFC11, ZFC12, ZFD1, ZFD2, ZFD3, ZFD4, ZFD5, ZFD7, ZFD8, ZFD9, ZFD10, ZFD11, ZFD12.	41
FIGURA 6: MACROMORFOLOGIA DAS COLÔNIAS	41
FIGURA 7: ANÁLISE MICROSCÓPICA DOS ISOLADOS, (A) PE-2 E (B) ZCF7.	42
FIGURA 8: VERIFICAÇÃO DA PRODUÇÃO DE SULFETO DE HIDROGÊNIO APÓS CRESCIMENTO EM MEIO ÁGAR LA DAS LEVEDURAS: A – ZFD12, B – ZFD3, C – ZFC9 E D – ZDC1.	42
FIGURA 9: ISOLADOS DE <i>S. CEREVISIAE</i> SELECIONADAS A 25°C, 40°C, 42°C, 44°C E 46°C.	43
FIGURA 10: ISOLADOS DE <i>S. CEREVISIAE</i> SELECIONADAS A 25°C, 38°C E 39°C E 10% DE ETANOL.	44
FIGURA 11: ISOLADOS SELECIONADOS DE <i>S. CEREVISIAE</i> SELECIONADAS A 25°C, 38°C E 39°C E 12% DE ETANOL.	44
FIGURA 12: GRÁFICO REPRESENTATIVO DO TESTE QUALITATIVO DA CAPACIDADE FERMENTATIVA DOS ISOLADOS SELECIONADOS E LINHAGEM DE REFERÊNCIA, PE-2 AOS AÇÚCARES GLICOSE, SACAROSE E GALACTOSE.	45
FIGURA 13: QUANTIFICAÇÃO DA ATIVIDADE METABÓLICA DO BIOFILME ($p \leq 0,05$) POR ESPECTROFOTÔMETRO (492NM) DOS ISOLADOS SELECIONADOS.	46
FIGURA 14: GRÁFICO REPRESENTATIVO DA CONCENTRAÇÃO DE SACAROSE INICIAL E FINAL DO ENSAIO DA FERMENTAÇÃO E TEOR DE ETANOL PRODUZIDO NO ENSAIO DE FERMENTAÇÃO ($p \leq 0,05$) PELA LINHAGEM DE REFERÊNCIA PE-2 E OS ISOLADOS SELECIONADOS.	46
FIGURA 15: ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS AMPLIFICADAS A PARTIR DAS REGIÕES ITS1, ITS2 E 5.8S, EM COMPARAÇÃO COM O GENE RDN37 (QUADRANTE VERMELHO) PARA VERIFICAÇÃO DE POLIMORFISMOS NESTAS REGIÕES.	49
FIGURA 16: TABELA DE SCORE, COMPARANDO A SEQUENCIA DO GENE DE REFERÊNCIA COM AS SEQUENCIAS DOS ISOLADOS SELECIONADOS E DA LINHAGEM DE REFERÊNCIA PE-2. COMPARAÇÃO DA SEQUENCIA DA LINHAGEM DE REFERÊNCIA COM AS SEQUENCIAS DOS ISOLADOS SELECIONADOS.	50
FIGURA 17: PRODUTOS DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS DE ISOLADOS SELECIONADOS DE <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i> APÓS ENSAIO DE FERMENTAÇÃO. PM: MARCADOR DE TAMANHO MOLECULAR DE 1Kb (FERMENTAS), CN: CONTROLE NEGATIVO. DS1: 1A SUBTRAÇÃO (1:100) E 2A SUBTRAÇÃO (1:1000) E DS2: 1 A SUBTRAÇÃO (1:100) E 2A SUBTRAÇÃO (1:1000).	51

Lista de Tabelas

TABELA 1: SITUAÇÕES SELECIONADAS PELO ENSAIO DE RDA.	50
TABELA 2: ANÁLISE DOS CLONES (<i>CONTIG</i>) SEQUENCIADOS DA SITUAÇÃO DS2.	52

RESUMO

A produção de bioetanol industrial pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* continua em crescimento devido à demanda energética e ambiental. Considerando a importância da produção de bioetanol para a economia nacional é importante conhecer a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, bem como as diversas formas de estresse que estas podem sofrer, suas respostas, os tipos de processos de fermentação, desta forma, foram testados a resistência dos isolados aos principais fatores de estresse (osmótico, térmico e etanólico) e a sua capacidade de produzir etanol. Estas informações serão necessárias para selecionar novas linhagens de leveduras, no intuito de melhorar a produção de etanol. Para tanto, foram selecionadas de uma safra de cana-de-açúcar que utiliza fermento de panificação como inóculo inicial, 34 leveduras da cuba e da dorna de fermentação de uma usina da região de Araraquara. Dessas, 28 isolados foram identificados como *Saccharomyces cerevisiae* a partir das técnicas moleculares de PCR e PCR-RFLP. Três isolados foram caracterizados e selecionados como resistentes a alta temperatura, alta concentração de açúcares e alta concentração de etanol. Porém somente o isolado denominado ZFC4 pode ser considerado como um bom inóculo para iniciar um processo fermentativo para a produção de bioetanol, pois este apresenta um alto rendimento de etanol, resistência a alta temperatura e às altas concentrações de etanol, mostrando-se mais tolerante que a linhagem de referência PE-2. Para uma discriminação genética dos isolados selecionados foi realizado sequenciamento do gene rRNA da região 25S, 18S e 5.8S, porém os resultados não puderam elucidar sobre os seus diferentes comportamentos fenotípicos. Linhagens industriais apresentam uma constituição genética complexa, sendo necessárias ferramentas moleculares que possam compreender a sua capacidade de sobrevivência às situações de estresse durante todo o processo de fermentação. Para tanto, após a caracterização dos genótipos e fenótipos dos isolados de *Saccharomyces cerevisiae* selecionados, os genes diferencialmente expressos durante o ensaio fermentativo, foram identificados por técnica denominada RDA (*Representational Difference Analysis*). Neste contexto, 196 clones foram sequenciados, onde foram obtidos inicialmente quatro *contigs* e uma proteína foi identificada como Homoaconitase, uma participante da via de síntese de lisina a qual responde para inibição do processo de fermentação quando ocorrem altos níveis de etanol no ambiente fermentativo.

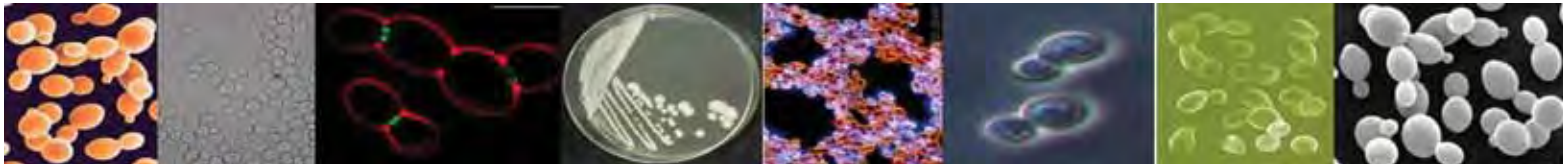
Palavras-chave: *Sacharomyces cerevisiae*, etanol, seleção e RDA (*Representational Difference Analysis*).

ABSTRACT

Bio-ethanol production by yeast *Saccharomyces cerevisiae* continues a growing industry due to energy and environmental demands. Considering the importance of bioethanol to the national economy is important to know the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, as well as various forms of stress they may suffer, their responses, types of processes of fermentation, thus, we tested the resistance of the isolates the main factors of stress (osmotic, thermal and ethanol) and the ability to produce ethanol. To somewhat of a crop of cane sugar were isolated 34 yeasts from the vat and a tank of fermentation of the plant. These, 28 isolates were identified as *Saccharomyces cerevisiae* from PCR and PCR-RFLP. Three isolates were characterized as resistant to high concentration of sugar (20% glucose and sucrose) and 39°C in presence 12% ethanol. However, only the isolated ZFC4 can be considered as a good inoculum to start a fermentative process for the production of ethanol because it has a high ethanol yield and greater resistance to high temperature and high ethanol concentrations and proved to be more tolerant than the reference strain of Pe-2. For a genetic discrimination of selected isolates was performed sequencing gene rRNA of the region 25S, 18S and 5.8S, however the results could not elucidate their different phenotypic behavior. Industrial strains have a complex genetic constitution, molecular tools that are needed to understand the survival capacity of these strains to stress throughout the fermentation process. To that end, after the characterization of genotypes and phenotypes of *Saccharomyces cerevisiae* isolates selected genes differentially expressed during the fermentation test, were identified by technique known as RDA (Representational Difference Analysis). In this context, 196 clones were sequenced, where initially four contigs were obtained and was identified as a protein Homoaconitase a participant route of synthesis of lysine which responds to inhibition of the fermentation process occurs when high levels of ethanol in the fermentation environment.

Keywords: *Sacharomyces cerevisiae*, ethanol, selection and RDA (*Representational Difference Analysis*).

CAPÍTULO I



1. INTRODUÇÃO e REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A produção mundial de etanol combustível está em torno de 75 bilhões de litros por ano, a maior parte deste total (cerca de 95%) é produzido pela fermentação de determinados açúcares pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* (RENEWABLE FUELS ASSOCIATION, 2011). O Brasil é hoje o segundo maior produtor e o maior exportador mundial de etanol, com uma produção de 26 bilhões de litros na safra de 2009/2010. O setor sucro-alcooleiro movimenta cerca de 2% do PIB brasileiro, assegurando milhões de empregos diretos e indiretos, permitindo ao Brasil ser o único país a implantar em larga escala um programa de combustível alternativo ao petróleo, com muitas vantagens ambientais, econômicas e sociais (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, 2011). Apesar de os EUA serem os maiores produtores mundiais de etanol, naquele país este combustível é produzido a partir de amido de milho, principalmente, que resulta na obtenção de 1,3 equivalentes de energia para cada 1 equivalente de energia gasto no processo (balanço de energia líquida) (TILMAN et al., 2008). Por outro lado, a produção de etanol a partir dos açúcares da cana-de-açúcar no Brasil resulta em 9,2 equivalentes de energia por cada equivalente gasto no processo (MACEDO, 1996). Assim, esta forma de produção é muito mais sustentável que a anterior. A grande diferença ambiental do álcool está em sua origem renovável. Além de possuir propriedades desejáveis como combustível, também traz benefícios com respeito à qualidade do ar urbano e do clima global. A vantagem principal do etanol brasileiro é o custo de sua produção, garantido por suas máquinas que são movimentadas por energia que é gerada pela queima do próprio bagaço de cana. Isto proporciona independência quanto aos combustíveis fósseis e aumenta a relação custo benefício, pela regularidade do índice pluviométrico e pelo nível de insolação (ANDRADE, 2009). Com essas vantagens, existe um grande interesse no seu uso, tanto na forma pura como misturado à gasolina.

Seja pela questão ambiental global (redução de emissões de gases do efeito estufa), ou pela importância em reduzir a dependência externa de energia, o etanol brasileiro, que já apresenta indicadores ambientais positivos quando comparado a outras opções, representa para o Brasil, hoje e nas décadas futuras, uma grande oportunidade (CORTEZ, 2010).

Desta maneira, pode-se afirmar que o etanol é um dos produtos biotecnológicos mais importantes no cenário brasileiro e até mesmo mundial, quando se leva em consideração os quesitos valor, quantidade e sustentabilidade. No entanto, para que o etanol produzido no país continue a ser o mais competitivo, é fundamental que se continue a investir no aprimoramento do processo de produção.

As leveduras constituem indubitavelmente o grupo mais importante de microrganismos comercialmente explorados, especialmente em função de sua capacidade fermentativa, sendo a levedura *Saccharomyces cerevisiae* a mais amplamente utilizada na indústria de fermentação para a produção de bioetanol (BAI et al., 2008).

Saccharomyces cerevisiae é uma espécie de levedura utilizada há milhares de anos na panificação e na fermentação de bebidas alcoólicas, sendo uma levedura fermentativa por excelência. É também muito importante como organismo modelo (OSTERGAARD et al., 2000), quer em estudos fisiológicos ou na área de biologia celular e molecular, sendo o micro-organismo eucariótico mais estudado e aquele cujo genoma foi o primeiro a ser sequenciado (WILLIAMS, 1996).

Esta levedura apresenta como características macro morfológicas colônias que variam entre o branco e o creme, podendo ser convexas ou lisas. Micromorfológicamente, podem formar pseudohifas, que consistem em cadeias simples de células esféricas, elipsoidais ou cilíndricas. A reprodução na maioria das vezes acontece por brotamento multilateral, onde a nova gémula é formada na porção lateral da célula-mãe. E a conjugação de células individuais conduz à formação do asco, cuja composição pode variar entre um a quatro ascósporos lisos, de forma oval ou redonda, em cada célula (PELCZAR et al., 1980).

As espécies selvagens de *Saccharomyces cerevisiae* são encontradas em caules e colmos da cana-de-açúcar. Esta possui a capacidade de se desenvolver em ambientes diversos, pois pode obter seus nutrientes tanto através da respiração aeróbica, quanto por fermentação. Apresentam como características gerais células dispostas em cadeias, colônias opacas e superfície crespa. Podem apresentar fenótipos indesejáveis ao processo de fermentação como floculação, formação de espumas, pseudohifas e capacidade para formar biofilme (FIGUEIREDO, 2008; MADIGAN; MARTINKO, 2006).

Para o início do processo fermentativo utiliza-se a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, devido à facilidade de obtenção em grandes quantidades, como por exemplo, as leveduras comerciais Fleischamnn ou Itaiquara, ou pelo fato da mesma ter sido obtida através de melhoramento genético para melhor adequar às necessidades do processo industrial (AMORIM, 1996), geralmente utilizam diferentes cepas comerciais como populações mistas, sendo várias linhagens de leveduras presentes no processo. As linhagens podem ser selecionadas, sendo aquelas adquiridas de forma pura para serem usadas como inóculo nas partidas e também as leveduras nativas, que são encontradas no processo e apresentam bom desempenho fermentativo. Mas se pode encontrar linhagens selvagens presentes no mosto,

porém, são consideradas contaminações por não apresentarem características boas para fermentação (ANDRIETTA, 2007).

As leveduras *S. cerevisiae* apresentam alta eficiência fermentativa, um crescimento rápido, eficiente metabolização de açúcares, habilidade na produção, tolerância às altas concentrações de etanol e a baixos níveis de oxigênio, osmotolerância, tolerância a grandes variações de temperatura, e atividade celular em ambientes ácidos que são fundamentais na sua utilização industrial (ANDRIETTA et al., 2007).

Além disso, conseguem sobreviver e se adequar aos ambientes inóspitos e estressantes através da sua capacidade de filamentação, formação de pseudohifas, de floculação, de formar espumas e de desenvolver biofilmes. Estes microrganismos não só pode explorar novos ambientes à procura de nutrientes, como também consegue se fixar e persistir naqueles adequados ao seu desenvolvimento (CECCATO-ANTONINI, 2008).

As usinas começaram a propagar a sua própria levedura para o início da safra, equipando-se de modo a serem aptas a realizarem a propagação de sua própria levedura nativa para o início da fermentação.

O fornecimento atual de grandes volumes de leveduras, previamente isoladas de unidades brasileiras durante a safra é feita por unidades produtoras de biomassa, sendo isoladas do próprio processo. Essas são utilizadas como inóculo tanto para as unidades das quais foram isoladas como para outras usinas. A estabilidade microbiológica em relação às leveduras do processo de produção de álcool está relacionada à utilização de inóculo de uma levedura isolada do próprio processo (STROPPIA, 2002). As linhagens isoladas de *Saccharomyces cerevisiae* de processos de fermentação alcoólica são largamente utilizadas como inóculo para início das safras brasileiras. Essas foram nomeadas com as iniciais das unidades de origem, dessa forma, têm-se disponíveis as seguintes linhagens: BG-1 (Usina Barra Grande), CR-1 (Usina Cresciugal), SA-1 (Usina Santa Adélia), CAT-1 (Usina Catanduva), PE-2 (Usina da Pedra), CL (Usina Clealco), entre outras.

Porém a linhagem mais utilizada como inóculo do processo fermentativo pelas usinas brasileiras é a linhagem PE-2. Esta tem chamado atenção de pesquisadores em todo o mundo. Essa linhagem foi selecionada a partir de processos industriais e por um programa bem dirigido de seleção de leveduras (BASSO et al., de 2008). Essa cepa foi monitorada usando uma técnica de cariotipagem molecular, selecionada a partir fermentações industriais, avaliada sob condições de laboratório, e reintroduzida em sua respectiva destilaria durante anos sucessivos, para testar sua fermentação e suas habilidades. Características como a

dominação sobre outras cepas e permanência no processo durante a safra de cana-de-açúcar foram levados em consideração na seleção dessa linhagem.

O processo real de fermentação foi desenvolvido em 1930 por Firmino Boinot nas destilarias francesas da região Melle, e a tecnologia foi patenteada em 1937. Nos últimos 30 anos, este processo foi melhorado para permitir que destilarias brasileiras alcancem rendimentos de fermentação de 92-93% em comparação com 75-80% registrados no início do programa "Proálcool". Este rendimento refere-se à produção de etanol a partir do açúcar, no entanto, as leveduras também podem produzir glicerol, biomassa celular, succinato e malato durante a fermentação alcoólica. Por esta razão, processos industriais de fermentação alcoólica pode atingir 92-93% do rendimento teórico, enquanto que o outro 7-8% é dirigido para o metabolismo celular. O processo brasileiro de produção de bioetanol é caracterizado por fermentação industrial em tanques muito grandes (0,5 a 3 milhões de litros) e densidades elevadas de leveduras (10-15% w/v). Cerca de 85% dessas destilarias são processos de fermentação por batelada, e apenas 15% são de processos de fermentação contínua (GODOY et al., de 2008).

Estas fermentações são realizadas com mosto do suco de cana-de-açúcar, diluídas em água ou uma mistura de ambos dentro de um curto período de 6-12 h. No final da fermentação, a concentração de álcool atinge 7-11% (v/v). Em seguida, o fermentado é centrifugado para a separação da levedura e vinho. O vinho vai para o passo de destilação enquanto as leveduras concentradas (suspensão viscosa) recebem um tratamento com ácido sulfúrico (pH 2,0-2,5), que visa reduzir a contaminação bacteriana. Após 2-3 h, as leveduras voltam aos tanques de fermentação para iniciar um novo ciclo. Por este razão, quantidades muito grandes de biomassa celular são recicladas pelas destilarias todos os dias. Este processo leva 200 a 300 dias, dependendo de vários fatores, incluindo: a região, condições meteorológicas, a variedade de cana e demandas do mercado. A safra de cana-de-açúcar ocorre de abril a novembro ou de setembro a março, dependendo da região do Brasil (AMORIM et al., 2011).

A levedura como entidade viva independente, realiza a fermentação do açúcar com o objetivo de conseguir a energia química necessária à sua sobrevivência, sendo o etanol apenas o subproduto deste. A fermentação alcoólica (glicólise anaeróbica) ocorre no citoplasma enquanto que a oxidação total do açúcar (respiração) acontece na mitocôndria (AMORIM, 2005).

Em condições industriais, a levedura *S. cerevisiae* utiliza anaerobicamente seu substrato por meio da glicólise, através da via Embden-Meyerhof. A glicólise é dividida em

duas partes: na primeira parte a glicose é fosforilada com o gasto energético de uma molécula de ATP para gerar glicose-6-fosfato, que se isomeriza para formar frutose-6-fosfato. A partir da frutose-6-fosfato e com gasto de outra molécula de ATP se forma a frutose-1,6-bifosfato. Esta é uma reação irreversível na qual intervém a glicose e o ATP, além de ser indispensável o cátion Mg^{2+} e consta de cinco reações bioquímicas. Na segunda parte da glicólise, a frutose-1,6-bifosfato se quebra em duas moléculas: gliceraldeído-3-fosfato e di-hidroxiacetona-fosfato, por meio de uma enzima aldolase. A di-hidroxiacetona-fosfato se transforma em gliceraldeído-3-fosfato, duplicando a reação a partir daqui. O gliceraldeído-3-fosfato sofre ainda cinco reações bioquímicas até se converter em piruvato. O piruvato pode ser oxidado a acetil-CoA, isso na presença de oxigênio, e no ciclo do ácido cítrico vai gerar CO_2 e água; o NADH formado vai ser oxidado através da oxidação mitocondrial. E na ausência de oxigênio, através da transferência dos elétrons do NADH para o próprio piruvato, este vai ser transformado em etanol, é o que se denomina fermentação (VAN DEN BRINK et al., 2008).

A transformação do açúcar até resultar etanol e gás carbônico envolve 12 reações em sequência ordenada, cada qual catalisada por uma enzima específica. Tais enzimas sofrem a ação de diversos fatores, alguns que estimulam outros que reprimem a ação enzimática, afetando assim o desempenho do processo fermentativo (VAN DEN BRINK et al., 2008).

As leveduras são submetidas a vários tipos de estresses à medida que as condições do meio mudam, tanto em ambientes naturais como durante os processos industriais. Tanto os danos provocados pelo estresse quanto a resposta da levedura, dependem do tipo e grau do estresse, e da posição da levedura em seu ciclo de divisão celular no momento em que ocorre o estímulo (FOLCH-MALLOL et al., 2004).

Mesmo sendo considerado um processo teoricamente simples, a fermentação alcoólica, pode ser drasticamente afetada em seu rendimento por diversos fatores como estresse térmico, hiperosmóticos, etanólico, elevações de temperaturas e limitações por nutrição.

O desempenho bem sucedido das fermentações alcoólicas depende da capacidade das linhagens de leveduras utilizadas em lidar com um número de fatores de estresse que ocorre durante o processo (HIRASAWA et al., 2007).

As leveduras industriais devem responder às condições de estresse e se adaptar rapidamente a esses fatores ambientais adversos, ajustando seu metabolismo para evitar a perda de viabilidade substancial (ZHAO and BAI, 2009).

A temperatura afeta diretamente a ecologia microbiana e as reações bioquímicas da levedura (TORIJA et al., 2003). A temperatura exerce um efeito em todos os aspectos do crescimento, metabolismo, viabilidade e fermentação. A escolha da temperatura de operação na fermentação alcoólica é influenciada tanto por fatores fisiológicos quanto físicos, tais como a perda do etanol por evaporação e a grande formação de espumas em temperaturas elevadas.

A produção industrial de etanol em destilarias ocorre na faixa de 25-35°C. A temperatura ótima varia dependendo das linhagens de leveduras utilizadas, sendo que as leveduras termofílicas apresentam temperaturas ótimas de crescimento acima de 40°C (WALKER, 1998). Segundo Oliveira (1988), temperaturas elevadas, afeta o metabolismo da levedura *S. cerevisiae*, levando a uma diminuição da tolerância ao etanol e formação de metabólitos secundários como o glicerol.

A produção de etanol através de fermentação não é uma alternativa muito viável economicamente em climas quentes devido à alta energia exigida para manter a temperatura da fermentação (BANAT et al., 1992). O controle da temperatura é essencial para maximizar a produção de etanol e prever inativação irreversível das células, no entanto, este problema poderia ser amenizado pelo uso de leveduras termotolerantes (MORIMURA et al., 1997). A termotolerância pode ser definida como a capacidade transitória das células sobreviverem quando expostas a temperaturas elevadas (LASZLO, 1988).

O estresse a alta temperatura provoca várias alterações na célula, afeta função das estruturas de proteínas e, gera proteínas anormais, leva a inibição do crescimento ou morte celular (GOLDBERG, 2003). Estas proteínas desnaturadas e agregadas são principalmente degradadas através da via de proteassoma como uma estratégia de defesa para assegurar a sobrevivência (HAAS, 2010).

Quando as leveduras são expostas a um aumento de 10 a 15°C acima da temperatura ótima de crescimento é induzido a síntese de um grupo de proteínas. A maioria das proteínas deste grupo são proteases e chaperoninas. As chaperoninas, também conhecidas como chaperonas, são uma família de proteínas conservadas que têm habilidade de reconhecer e se ligar de forma seletiva a proteínas não ativas em condições fisiológicas e situações de estresse (BUCHNER et al., 1996). Quando em situações de estresse por calor as chaperoninas são super-expressas e são denominadas de proteínas de choque térmico (Hsps – Heat Shock Proteins) que impedem a desnaturação ou induzem a renaturação de proteínas, a degradação de proteínas com defeito no seu empacotamento e desintegração de agregados proteicos formados pela desnaturação (MAISNIER-PATIN et al. 2005). As proteínas Hsp 104, Hsp 70

e Hsp 40 formam o complexo chaperonina, o qual reverte à conformação de proteínas alteradas pelo calor (GLOVER e LINDQUIST, 1998).

Apesar do grande número de estudos que têm sido realizados sobre a produção de bioetanol em alta temperatura, o tema continua a ser de interesse através da criação e a introdução de novas leveduras resistentes a temperaturas elevadas e que apresentam melhor desempenho na fermentação (ABDEL-BANAT et al., 2010; EDGARDO et al, 2008;. MARULLO et al, 2009).

Elucidação da função destes genes e/ou proteínas pode dar a percepção dos vários mecanismos de resposta subjacentes da levedura ao estresse pela alta temperatura, proporcionando informações úteis para melhorar a produção de bioetanol com altas temperaturas. Para esse efeito, o isolamento e a caracterização de novas leveduras selvagens, capazes de crescer a alta temperatura, com alta produção de álcool durante a fermentação em condições específicas, continua a ser de grande interesse do ponto de vista prático (SHAHSAVARANI et al., 2011).

O controle da temperatura durante a fermentação apresenta um maior impacto em países com climas mais quentes, por tanto, o custo-benefício nesse sentido é mais desejável nos países tropicais (ABDEL-BANAT et al., 2010).

Durante o processo fermentativo a concentração de etanol se eleva no mosto de fermentação, assim o etanol se difunde livremente através das membranas das levedura, permitindo igualar as concentrações de etanol no meio intracelular e extracelular (MA e LIU, 2010), podendo gerar efeitos sob as células, como: crescimento e viabilidade celular, inibição de crescimento, divisão (STANLEY et al., 1997), diminuição do volume celular (BIRCH e WALKER., 2000), diminuição do metabolismo de RNA mensageiro e níveis de proteínas (CHANDLER et al., 2004; HU et al., 2007); desnaturação de proteínas e redução da atividade da enzima glicolítica (HALLSWORTH et al., 1998), indução das proteínas de heat-shock e proteínas responsáveis pelo estresse (PLESSET et al., 1982), acúmulo de trealose intracelular, modificação da estrutura celular e função da membrana (MEADEN et al., 1999), inibição da endocitose (LUCERO et al., 2000), aumento de ácidos graxos saturados e insaturados na membrana e de ergosterol (SAJBIDOR et al., 1995), além do aumento da fluidez da membrana (MISHRA e PRASAD., 1989).

A levedura *S. cerevisiae* é considerada altamente tolerante ao etanol e estudos para elucidar a tolerância ao etanol por esta levedura, mostram que mais de 400 genes foram identificados envolvendo tolerância ao etanol por ensaios de alto rendimento (ALEXANDRE et al., 2001; WU et al., 2006). A maioria dos genes estão relacionadas com os genes das

proteínas de choque-térmico (Hsp) (ALEXANDRE et al., 2001; WU et al., 2006; ZUZUARREGUI et al., 2006), biossíntese de trealose e as vias de aminoácidos (HIRASAWA et al., 2007; OGAWA et al., 2000; MANSURE et al., 1994; TAKAGI et al., 2005), ácidos graxos, ergosterol (DIHN et al., 2009; CHI and ARNEBORGET 2009; YOU et al., 2003). Desta forma, usar linhagens tolerantes a etanol para a fermentação do etanol de alto rendimento é desejável para aumentar o custo-benefício da produção de etanol (MA e LIU 2010).

A tolerância à alta concentração de etanol é uma propriedade importante dos microrganismos industriais. Assim, compreender o processo de adaptação da levedura para altas concentrações de etanol é importante, pois pode conduzir à construção de linhagens de leveduras capazes de crescer bem em concentrações elevadas de etanol. Melhorar a tolerância de etanol na levedura deve, portanto, reduzir o impacto de toxicidade ao etanol sobre o desempenho de fermentação (FIEDUREK et al., 2011; STANLEY et al, 2010).

Outro fator que pode causar queda da viabilidade celular é a concentração de substrato no mosto de fermentação, pois a levedura apresenta uma osmotolerância limitada, por esta razão, fermentações alcoólicas são conduzidas em concentrações de açúcar usualmente menor que 20% (m/v), assim, quando a concentração de açúcar aumenta, o processo deve ser diminuído a fim de prevenir quedas da viabilidade devido a letalidade induzida pelo aumento de etanol produzidas pelas células (LALUCE et al., 2009). O estresse induzido pelo aumento da osmolaridade externa leva à redução em crescimento e perda da viabilidade das células de leveduras, devido às perturbações no gradiente osmótico através da membrana plasmática. Isto leva, por sua vez, a perdas em volume das células que se contraem por causa de diferenças em pressão osmótica entre o exterior e interior das células (SOUZA, 2009). A alta concentração de açúcares também pode levar a inibição de enzimas respiratórias por altas taxas de fermentação, levando à produção de etanol na presença de oxigênio, processo denominado Efeito Crabtree (CRABTREE, 1929).

Zhao e Bai (2009) mostraram que estudos de tolerância ao mecanismo de estresse e a manipulação da tolerância da levedura são de grande importância para a produção eficiente de etanol combustível.

Quando a levedura está sob condições de estresse, o conteúdo celular de trealose eleva-se durante o crescimento exponencial em resposta às mudanças de temperaturas atingindo um valor máximo em fase estacionária, o qual leva a aquisição da tolerância ou resistência ao calor, ao estresse osmótico e etanólico (ELEUTHERIO et al., 1995).

A trealose é conhecida por seu papel protetor contra muitos estresses ambientais (BANDARA et al. de 2009), este açúcar parece desempenhar um papel duplo: (1) preservar a integridade do membrana plasmática, substituindo a água e se ligam aos grupos de cabeça polares de fosfolípidos e (2) funcionamento como um acompanhante, estabilizando as proteínas em seu estado nativo durante a lesão, bem como através da supressão da agregação de proteínas desnaturadas (CROWE, 2008). Além disso, hidrólise da trealose fornece a energia necessária para renaturação correta de proteínas durante a recuperação do estresse (SINGER E LINDQUIST, 1998).

A trealose é necessária para melhorar a capacidade fermentativa e longevidade de leveduras, bem como a sua capacidade de resistir aos estresses das condições industriais, de acordo com Trevisol e colaboradores (2011). O mecanismo pelo qual a trealose melhora a produção de etanol pode estar envolvido na proteção contra a oxidação de proteínas. O acúmulo de trealose varia dependendo do tipo de estresse (MAHUD et al., 2010).

Floculação de leveduras é um dos piores problemas apresentados para os processos de reciclagem de levedura por centrifugação. Linhagens de leveduras floculantes podem causar vários prejuízos para fermentações industriais com células recicláveis por centrifugação. No processo brasileiro de fermentação alcoólica, grandes quantidades de biomassa de levedura precisam ser centrifugadas no final de cada ciclo de fermentação. Esta biomassa celular (creme de levedura) é suspendida com água e enviado para o tratamento com ácido em pH 1,8 a 2,5 durante 2 a 3h antes de retornar para tanques de fermentação e iniciar um novo ciclo de fermentação. A floculação causada por linhagens de levedura pode reduzir a eficiência de centrifugação, e, conseqüentemente, um creme de levedura menos concentrado vai para o tratamento ácido. Um creme de levedura menos concentrado significa que mais do vinho vai para o tratamento ácido. Este vinho tem a capacidade de tamponamento e as destilarias vão gastar mais com ácido sulfúrico para reduzir o pH. Por conseguinte, quando submetido a um tratamento ácido mais estressante, leveduras podem reduzir suas atividades ou morrerem. Além disso, as células floculantes podem também decantar na parte inferior dos fermentadores deixando açúcares residuais do vinho sem fermentar e aumentando assim o tempo de fermentação (AMORIM et al., 2011).

Para entender o comportamento fenotípico e genético dessas linhagens de leveduras no processo fermentativo de etanol, é de fundamental importância identificar e caracterizar a levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

Os métodos utilizados mais frequentemente para a identificação das leveduras no processo de fermentação alcoólica são baseados nas características morfológicas e fisiológicas

ou técnicas tradicionais. Todas essas técnicas apresentam potencial limitado, no entanto, indicam que a caracterização fenotípica não é suficiente para uma identificação correta das espécies de levedura (LOPANDIC et al., 2006).

Técnicas moleculares têm sido desenvolvidas como alternativas às técnicas tradicionais para a identificação e caracterização de leveduras. Essas novas técnicas tem a vantagem de permitir uma identificação rápida e precisa das espécies (LE JUNE et al., 2006).

Melo Pereira et al. (2010) desenvolveram dois novos pares de primers espécie-específico, homólogos para o gene HO das espécies *S. bayanus*, *S. cerevisiae* e *S. pastorianus*, propondo uma metodologia rápida de amplificação por técnica de PCR, tendo como resultado a identificação correta dessas espécies em menos de três horas.

Aparentemente, todos os procariotos e eucariotos possuem regiões de repetições intragênicas. Estas regiões geralmente são classificadas como microssatélites. A proximidade entre essas regiões no DNA promovem eventos frequentes de recombinação entre eles, gerando novos alelos que diferem entre si de acordo com o número de unidades em cada micro ou minissatélites. Em *S. cerevisiae*, essas repetições são associadas a genes induzidos por estresse. As variações destas repetições podem prover às células uma rápida adaptação das propriedades da superfície celular de acordo com as alterações ambientais em que se encontram (LEGENDRE et al., 2007).

Guillamo'n et al. (1998) e Oliveira et al. (2008), através da técnica de RFLP de DNA ribossomal da região ITS1, ITS2 e 5.8S identificaram diferentes espécies de leveduras isoladas do vinho de fermentação, sendo possível também analisar a diversidade de espécies de leveduras durante a fermentação espontânea.

Alves-Baffi et al (2011), identificaram leveduras presentes nas cascas e no mosto de duas variedades de uvas através da combinação de duas técnicas PCR-RFLP/sequenciamento do espaço interno transcrito e sequenciamento do domínio D1/D2 do DNA ribossomal, mostrando que as técnicas utilizadas são poderosas para a caracterização de isolados.

Devido à natureza heterotática da levedura *S. cerevisiae*, a recombinação cromossomal, esporulação e segregação podem afetar a herança, o equilíbrio e a expressão gênica não só na produção de bioetanol, mas também na sobrevivência às condições de estresse do processo fermentativo. Diante disso, inicialmente, é necessário compreender a constituição genética de linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* selvagens selecionadas a partir do processo industrial de fermentação alcoólica. Linhagens industriais apresentam uma constituição genética complexa, sendo necessárias ferramentas como sequenciamento de DNA, expressão gênica, proteoma e metabolômica para compreender a capacidade de

sobrevivência dessas linhagens a situações de estresse durante todo o processo de fermentação (AMORIM et al., 2011).

Benjaphokee et al. (2012), desenvolveram uma linhagem híbrida de levedura através de hibridização de esporo e célula, que apresenta ótimas características para o processo fermentativo, com uma capacidade superior de produção de bioetanol, com uma eficiência fermentativa de mais de 90%, mesmo a pH 3,5 e a temperatura elevada de 41°C.

Métodos moleculares estão sendo utilizados para caracterizar genes envolvidos nas linhagens industriais durante o processo de fermentação.

Uma característica vital dos microrganismos é a sua capacidade de adaptação às alterações do ambiente em que se encontram o que envolve a regulação da expressão gênica em resposta aos diferentes sinais ambientais (KATO-MAEDA et al., 2001). Embora a função gênica seja governada pelo seu produto final, a proteína, várias observações relatam que a quantidade de proteína produzida depende diretamente da quantidade de RNA mensageiro (RNAm) que a codifica. Isso significa que a compreensão, das funções celulares sob determinadas condições, pode ser obtida por meio da quantificação dos RNAs mensageiros presentes naquele momento (YAMAMOTO et al., 2001).

Ultimamente, muitas técnicas foram desenvolvidas para identificar a expressão diferencial de um gene. Uma destas técnicas é o RDA (*Representational Difference Analysis*), que em sua forma original foi designado para identificar diferenças entre populações de DNA genômico (LISITSYN et al., 1993). Esta metodologia foi subsequentemente modificada para permitir a análise de populações de RNAm (PASTORIAN et al., 2000), sendo uma técnica poderosa e sensível para identificação de genes expressos diferencialmente (HUBANK & SCHATZ, 1994), e permite o isolamento de sequências mais e menos expressas em duas populações diferentes de cDNA (DNA complementar).

Esta técnica permite a detecção de mudanças na expressão de RNAm por enriquecimento seletivo sem qualquer conhecimento prévio do gene em questão. A metodologia de RDA baseia-se em hibridização subtrativa e enriquecimento cinético, purificando transcritos presentes em uma população e ausentes em outra (LYSITIN et al., 1993; PASTORIAN et al., 2000). É uma ferramenta poderosa e sensível para a identificação de genes diferencialmente expressos e permite o isolamento da supressão e super expressão gênica em duas populações diferentes de cDNA (PASTORIAN et al., 2000). Os resultados obtidos por esta abordagem podem fornecer dados importantes para a construção de novas linhagens interessantes para os diversos setores produtivos.

Li et al. (2010) investigaram respostas gerais de transcrição das leveduras industriais de *S. cerevisiae* durante a fermentação em processo contínuo e por batelada por análise de transcriptoma, no qual aproximadamente de 34% de todos os genes detectados mostraram expressão diferencial dos genes durante a fermentação contínua e por batelada, o resultado desse estudo indica que os genes transcritos envolvidos são susceptíveis a reprogramação das suas funções durante a fermentação industrial na produção de bioetanol.

Através do estudo das características do genoma de duas linhagens mutantes JAY270 (derivado diploide) e JAY291 (derivado diploide) foi possível explicar a adaptação das leveduras a ambientes industriais, exibindo fenótipos desejáveis, tais como tolerância ao etanol, alta temperatura e ao estresse oxidativo bem como apresentar uma alta produção de massa celular. Assim, levando em consideração o estudo desses fatores foi evidenciado que a manipulação do genoma de linhagens, poderia permitir a criação de uma nova geração de organismos industriais ideais para a aplicação de tecnologias que abrangem o setor bioenergético (ARGUESO et al.; 2009).

Por isso é necessário aliar o conhecimento da genética, fisiologia e processo de fermentação industrial para melhorar e introduzir novas características de interesse industrial em linhagens de leveduras sem afetar a capacidade dessas novas linhagens para sobreviver em situações de estresse.

2. JUSTIFICATIVA

A produção de bioetanol a partir da cana-de-açúcar representa uma tecnologia em grande escala capaz de produzir biocombustível de forma eficiente e economicamente e fornecer substitutos viáveis à gasolina. A combinação de imobilização de CO₂ pela cana-de-açúcar pela fotossíntese em conjunto com a biomassa da fermentação alcoólica tem permitido a produção de um combustível líquido limpo e de elevada qualidade que contém 93% da energia original encontrado em açúcar (AMORIM et al., 2011).

Nos últimos anos, vários trabalhos de pesquisa vêm sendo realizados com o objetivo de determinar o comportamento populacional das leveduras em unidades de fermentação industriais para a produção de etanol. As destilarias brasileiras operam de forma que permitem a entrada de micro-organismos contaminantes, normalmente habitantes do caldo de cana no processo fermentativo. Desta forma, espera-se que exista uma competição entre estas cepas durante o decorrer da safra. É esperado ainda que a cepa que se encontra em maior concentração no vinho em fermentação é aquela que possui as características que mais se adequam às condições de processo no momento.

Um dos problemas enfrentados na produção do álcool é a contaminação no processo fermentativo por leveduras selvagens e bactérias, esses micro-organismos contaminantes causam prejuízo à fermentação, tais como formação de espuma, floculação e açúcar residual, provocando muitas vezes a perda de rendimento industrial. Por isso é de suma importância o controle e monitoramento da fermentação alcoólica, principalmente no desenvolvimento de levedura selecionada com características de dominância e persistência capaz de produzir álcool com alto rendimento. Adicionalmente a caracterização de alvos que diferencialmente aparecem durante a queda do rendimento do etanol ou na redução da capacidade fermentativa é necessária para a resolução de problemas através de sua interferência. Assim faz-se necessário conhecer as leveduras, as diversas formas de estresse (alcoólico, térmico e osmótico) que as células são submetidas e as suas formas de respostas, as quais podem se constituírem de alvos para o controle da regulação do processo.

3 OBJETIVOS

Analisar os genes diferencialmente expressos durante ensaio fermentativo entre os isolados selecionados de *Saccharomyces cerevisiae* quanto aos perfis de resistência e capacidade fermentativa. Estes foram isolados de amostras de cuba e dorna de usina, no início e no final da safra de cana-de-açúcar.

3.1 Objetivos específicos

- Coletar amostras da cuba e de dornas de produção de etanol no início e final da safra de uma usina de cana-de-açúcar;
- Isolar e caracterizar colônias de *S. cerevisiae*;
- Identificar as linhagens de *S. cerevisiae*;
- Realizar testes de caracterização dos isolados;
- Realizar teste de sensibilidade a diferentes temperaturas e concentrações de etanol;
- Selecionar as linhagens sensíveis às altas temperaturas e alta concentração de etanol;
- Verificar a capacidade qualitativa de fermentação a diferentes açúcares;
- Verificar a capacidade dos isolados de produzir biofilme;
- Verificar a produção de etanol dos isolados selecionados;
- Realizar sequenciamento da região do gene rDNA;
- Selecionar os isolados de acordo com seu fenótipo de resistência e produção etanol para analisar os genes diferencialmente expressos entre os isolados por técnica de RDA;

- Analisar as sequências gênicas obtidas para identificação dos fatores genéticos associados ao processo de produção de etanol.

4 METODOLOGIA

4.1 Micro-organismos

A linhagem PE-2, isolada de usina de cana-de-açúcar brasileira em 1994 e comercializada pela Fermentec, foi utilizada como linhagem de referência para análises. E para a utilização neste estudo, obteve-se isolados através de amostras coletadas da cuba e da dorna de fermentação no início (05-2010) e no final (11-2010) da safra de uma usina de cana-de-açúcar, localizada na região da cidade de Araraquara, São Paulo.

4.2 Isolamento das leveduras

Amostras foram coletadas em frascos estéreis de 500 mL e transportadas para o laboratório em bolsas com gelo e processadas em até 5 horas. Asépticamente, foram realizadas diluições seriadas (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} e 10^{-5}) e a partir de cada diluição, 100 μ L foram asépticamente transferidos para o centro da placa contendo meio sólido YEPD (Extrato de levedura 1%, Peptona 2%, Glicose 2% e Agar 2%) acrescido do antibiótico cloranfenicol (250mg/L). Procedendo-se à semeadura com auxílio alça de Drigalski, placas contendo de 30 a 300 colônias foram examinadas. As placas foram colocadas em estufa a 32°C durante 24 a 48 horas.

As colônias com características macroscópica e microscópica de leveduras foram isoladas por esgotamento com auxílio de uma alça estéril em placas de petri contendo meio sólido YEPD com cloranfenicol. As placas foram colocadas em estufa a 32°C durante 24 a 48 horas.

Para o armazenamento as colônias isoladas foram inoculadas em meio YEPD ágar inclinado em estufa a 32°C durante 24 a 48 horas, após o crescimento os tubos contendo os meios foram armazenados em câmara fria de 2-8°C.

4.3 Identificação de *Saccharomyces cerevisiae*

A identificação dos isolados foi realizada por técnica de PCR utilizando par de primers espécie-específicos Scho (MELO PEREIRA et al., 2010). Para a realização da PCR foi necessário extrair o DNA genômico de todas as amostras.

4.3.1 Extração de DNA genômico

A extração de DNA genômico foi realizada segundo Moller et al. (1992), com pequenas modificações. Usou-se colônias de um cultivo de 24 horas em meio sólido YEPD a 32°C em placa, passou-se todo crescimento para YEPD líquido em um erlenmeyer por 16 horas à 32°C. Centrifugou-se todo o conteúdo a 2655 x g/4°C por 5 min em tubo falcon de 50 mL e o sobrenadante foi descartado, à biomassa, foram adicionados 2 mL de TE (Tris-HCl 100nM e EDTA 10mM) para ressuspensão, após foi centrifugado a 2655 x g /4°C por 5 minutos (3 vezes) e descartou-se o sobrenadante. Em um eppendorf foi adicionado pérolas de vidro estéreis, 700 µL de TES+SDS e 200 µL de células. A suspensão de células foi vortexado por 30 segundos e colocado no gelo por mais 30 segundos. Esse procedimento foi repetido por três vezes, na suspensão foi acrescentado 5 µL de proteinase K (20 ug/mL) e deixou-se no banho seco à 55°C por 60 minutos. Todo o conteúdo do eppendorf foi transferido para outro eppendorf e acrescentou-se 300 µL de NaCl (5M) e 100 µL de CTAB (10%), foi deixado no banho seco por 10 minutos à 65°C. O conteúdo foi dividido em dois eppendorfs em volumes iguais e acrescentou-se v/v (volume/volume) de clorofórmio puro e deixou-se por 1 hora no gelo. Os eppendorfs foram centrifugados a 15294 x g /4°C por 10 minutos. Retirou-se o sobrenadante e transferiu-se para outro eppendorf, no qual também foi acrescentado 10 µL de RNase (20mg/ mL) e deixou-se por 1 hora no banho seco à 37°C ou pode-se deixar overnight. Colocou-se v/v de clorofórmio:isoamílico e foi centrifugado a 15294 x g por 10 minutos por 2 vezes. O sobrenadante foi retirado com muito cuidado, transferido para outro eppendorf e foi adicionado v/v de isopropanol e foi levado ao freezer por 20 minutos. Após centrifugou-se a 15294 g por 10 minutos, foi descartado o sobrenadante e acrescentou-se v/v de etanol (70%) e centrifugou-se a 15294 g por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e deixou-se secar com os eppendorfs virados no papel higiênico e então ressuspendeu-se em 40 µL de água estéril e foi estocado em freezer. Para a verificação da presença de DNA foi feito um gel de agarose em uma concentração de 1,5%, no qual foi diluído em tampão TBE 1x. Cada amostra foi adicionada em um poço de gel juntamente com tampão de corrida e visualizados em fotodocumentador Ingenius Singene Bio Imaging (Syngene) de luz ultravioleta.

4.3.2 Quantificação do DNA

A quantificação de DNA foi realizada diluindo 1 µL do produto da extração em 19 µL de água estéril, como branco de amostra foi utilizado 20 µL de água estéril, a leitura foi realizada em espectrofotômetro Espectro Genesy 10 UV (Thermo Electron Corporation), no

comprimento de onda de 260 nm. Cálculos foram feitos para se obter a concentração de DNA genômico em ng/uL (SAMBROOK et al., 1989).

4.3.3 Identificação por PCR

As reações de amplificação foram realizadas em volume final de 25 µL contendo 12,5 µL de MasterMix (Fermentas), 25 pmol de iniciadores ScHO-F (5'-GTTAGATCCCAGGCGTAGAACAG – 3') e ScHO-R(5'-GCGAGTACTGGACCAAATCTTATG – 3') e 50 ng de DNA genômico das leveduras. Os iniciadores específicos para a espécie *Saccharomyces cerevisiae*, foram descritos por Melo Pereira et al. (2010).

As amplificações foram feitas em termociclador Veriti Thermal Cycler (Applied Biosystem), programado da seguinte forma: 35 ciclos de 30 segundos a 94°C, seguido de um ciclo de 30 segundos a 61°C e um ciclo de dois minutos a 72°C. Os produtos da reação foram detectados utilizando eletroforese em gel de agarose a 1,5% em tampão TBE 1x. Foi utilizado o marcador de tamanho molecular (1 Kb Plus DNA Ladder) (Fermentas®). O gel foi corado com gel red (Biotuim®) e visualizado em fotodocumentador Ingenius Singene Bio Imaging (Syngene) de luz ultravioleta e fotografado.

4.3.4 Identificação por PCR-RFLP

As reações de amplificação foram realizadas em volume final de 50 µL contendo 25 pmol de cada iniciador ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') de acordo com White et al. (1990), 50 ng de DNA genômico das leveduras e 25 µL de solução de MasterMix Fermentas®.

As amplificações foram feitas em termociclador Veriti Thermal Cycler (Applied Biosystem), programado da seguinte forma: um ciclo de cinco minutos a 95°C, seguido de 35 ciclos de um minuto a 95°C, dois minutos a 52°C, dois minutos a 72°C e um ciclo de dez minutos a 72°C. Os produtos da reação foram detectados utilizando eletroforese em gel de agarose a 1,5% em tampão TBE 1x. Foi utilizado o marcador de tamanho molecular 100 bp Plus DNA Ladder (Fermentas®). O gel foi corado com gel red (Biotuim®) e visualizado em fotodocumentador Ingenius Singene Bio Imaging (Syngene) de luz ultravioleta e fotografado.

Posteriormente, a reação de restrição do produto de PCR dos iniciadores ITS1 e ITS4 (Sigma®) foi realizada em volume final de 20 µL, contendo 2 µL de tampão da enzima (10x), 0,2 µL de BSA, 7 µL do produto de PCR e 0,5 µL de enzima *HaeIII*, *CfoI* e *HinfI* (Promega®), de acordo com Guillamón et al. (1998). As reações foram incubadas a 37°C por quatro horas. Os produtos das restrições foram detectados utilizando eletroforese em gel de

agarose a 2,0% em tampão TBE 1x. Foi utilizado o marcador de tamanho molecular 100 bp Plus DNA Ladder (Fermentas®). O gel foi corado com gel red (Biotuim®) e visualizado em fotodocumentador de luz ultravioleta *Ingenius Singene Bio Imaging* (Syngene) e fotografado.

4.4 Caracterização dos isolados de *Saccharomyces cerevisiae*

4.4.1 Análise da macromorfologia das colônias isoladas

Para a análise da macromorfologia das colônias, os micro-organismos isolados foram crescidos por 24 horas a 32°C em YEPD sólido, posteriormente foi realizado inóculo de 10⁶ células, 10 µL de cada inóculo foram adicionados no meio da placa de petri contendo meio sólido YEPD e por esgotamento, com auxílio de uma alça estéril descartável, as colônias foram isoladas para posterior observação. As placas foram incubadas a 32°C para a análise da macromorfologia das colônias durante 24 e 48 horas. Como referência foi usada a linhagem PE-2.

4.4.2 Análise da micromorfologia das células

Os micro-organismos isolados foram crescidos por 24 horas em meio YEPD sólido a 32°C. Em uma lâmina de vidro contendo o corante azul de algodão, foi acrescentada assepticamente uma pequena porção da colônia do micro-organismo isolado, os aspectos micromorfológicos foram visualizados e fotografados no microscópio óptico Leica.

4.4.3 Ensaio de floculação

Os isolados de *Saccharomyces cerevisiae* foram incubadas em tubos de ensaio contendo aproximadamente 10 mL de meio YEPD líquido e foram incubadas a 28°C por 48 horas. Transcorrido o período de incubação, a cultura depositada no fundo do tubo foi homogeneizada com meio de cultura em agitador tipo Vortex e a avaliação consistiu na visualização dos flocos suspensos no meio de cultura, assim como foi proposto por Suzzi et al. (1984).

4.4.4 Teste de produção de sulfeto de hidrogênio (H₂S)

Os isolados de *S. cerevisiae* foram semeados em placas de petri contendo em meio ágar LA e em meio sólido YEPD, que foi usado como controle e, as placas foram mantidas em estufas a 30°C durante 10 dias. Decorrido o tempo foi observado o aparecimento ou não de colônias enegrecidas, características de produção de sulfeto de hidrogênio (ONO et al., 1991; Oliveira et al., 2008).

4.5 Seleção dos isolados de *Saccharomyces cerevisiae*

4.5.1 Teste de sensibilidade à alta concentração de açúcares

Para verificar o efeito de cada condição de estresse no crescimento dos microorganismos, as leveduras isoladas e a levedura PE-2, usada como referência, foram semeadas no meio sólido YEPD e colocadas em estufa a 30°C durante 72 horas como controle.

Primeiramente as leveduras foram crescidas em meio sólido YEPD a 37°C durante 72 horas. As leveduras crescidas foram semeadas em meio básico sólido (YEP) contendo 20% (p/v) de glicose e colocadas em estufa a 30°C durante 72 horas. As leveduras resistentes a esta concentração de fonte de carbono foram crescidas em meio básico sólido básico (YEP) contendo 20% (p/v) de sacarose a 30°C durante 72 horas.

4.5.2 Teste de sensibilidade à temperatura

Os isolados analisados foram crescidas a 25°C em 4 mL de meio líquido YEPD até aproximadamente $1-2 \times 10^7$ células/mL. Após centrifugação a $3.000 \times g$ por 1 minuto e remoção do meio de cultura, as células foram suspensas em PBS 1x na concentração de $2,5 \times 10^8$ células/mL. Da suspensão, 200 µL foram transferidos para um poço de microplaca de 96 wells. A suspensão foi diluída seriadamente (1:10) em PBS 1x. Utilizando um pipetador multicanal, 2 µL da suspensão original e das diluições foram aplicados no meio de cultura sólido YEPD, no qual as placas foram incubadas à 25°C, 40°C, 42°C, 44°C e 46°C, durante 48 horas. Após o crescimento as placas foram escaneadas para o arquivamento dos resultados.

4.5.3 Teste de sensibilidade a etanol (10% e 12%)

Os isolados que foram selecionados ao teste de temperatura, cresceram a 25°C em 4 mL de meio líquido YEPD até aproximadamente $1-2 \times 10^7$ células/mL. Após centrifugação a $3.000 \times g$ por 1 minuto e remoção do meio de cultura, as células foram suspensas em PBS 1x na concentração de $2,5 \times 10^8$ células/mL. Da suspensão, 200 µL foram transferidos para um poço de microplaca. A suspensão foi diluída seriadamente (1:10) em PBS 1x. Utilizando um pipetador multicanal, 2 µL da suspensão original e das diluições foram aplicados no meio sólido YEPD com 10% e 12% de etanol, nas temperaturas de 25°C, 38°C, 39°C e 40°C, durante 48 horas. Após o crescimento as placas foram escaneadas para o arquivamento dos resultados.

4.5.4 Teste qualitativo da capacidade fermentativa

O teste de capacidade fermentativa foi realizado de acordo com Vaughan-Martins e Martins (1993), como uma análise preliminar para o ensaio de fermentação. O teste foi realizado com os isolados (ZFC2, ZFC3, ZFC4, ZFC5, ZFD3 e ZFD4) que foram

selecionados através dos testes de sensibilidade a temperatura. Para verificar a capacidade fermentativa de cada isolado, um inóculo foi preparado e adicionado em tubos de ensaio de vidro com tampa de rosca, previamente identificados, contendo em seu interior tubos de Durhan e 10 ml de meio líquido base acrescentado de 2% de glicose, 2% de sacarose e 2% de galactose. Os tubos foram incubados em estufa a 30°C por 24 horas e foram observados a turvação dos meios e a formação de gás produzido.

4.5.5 Avaliação da capacidade de produção de biofilmes das cepas de *S. cerevisiae*

A partir de um cultivo recente dos isolados selecionados aos testes de resistência, realizou-se inóculo de 10^7 cels/mL em PBS 1x. Depositou-se 100 µL desse inóculo em placas de 96 poços. A placa foi mantida por 4 horas em estufa a 32°C. A seguir o meio de cultura foi retirado cuidadosamente e adicionou-se YNB 1x estéril e incubou-se a 32°C em repouso. Esse experimento foi realizado em 162, 96 e 72 horas, porém melhores resultados foram observados em 72 horas.

4.5.5.1 Quantificação do biofilme por XTT (2,3-Bis-(2-Methoxy-4-Nitro-5-Sulfophenyl)-2H-Tetrazolium-5-Carboxanilide)

A quantificação da formação de biofilme foi realizada pelo ensaio de redução do XTT. Foi preparada uma solução de 0,5mg/mL de XTT em PBS e foi adicionada menadiona na concentração final de 25 µM/mL. Ao biofilme que foi previamente lavado por duas vezes com PBS, foram adicionados 30 µL solução de XTT-menadiona e as placas foram incubadas por 2 horas a 32°C. A redução do XTT gera uma coloração alaranjada correspondente à atividade metabólica do biofilme, essa atividade foi medida por espectrofotômetro 492 nm.

4.6 Ensaio fermentativos dos isolados selecionadas

O ensaio fermentativo foi realizado de acordo com Basílio et al. (2008), no qual as culturas foram pré-inoculadas em tubo falcon de 50 mL contendo líquido YEPD e incubadas por 16 horas a 33°C sob agitação a 150 rpm. Em seguida foram transferidas para um erlenmeyer de 250 mL, contendo 100 mL de meio definido de crescimento acrescido de 5% de sacarose e incubadas por 24 horas a 33°C sob agitação a 150 rpm. Ao final da incubação as culturas foram levadas à câmara fria por 2 horas para a sedimentação das células. Logo após, foram centrifugadas a 2655 x g durante 15 minutos à 4°C. Em seguida foi realizado um inóculo de células com água estéril de 2×10^7 cells/mL. As fermentações foram realizadas em frascos erlenmeyer de 250 mL, contendo um volume de 100 mL de meio sintético para fermentação com 19°Brix (Extrato de levedura 0,15%; Peptona 0,15%; Sacarose 20%; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,1%; KH_2SO_4 0,1%) em pH 4,5 ajustado com ácido sulfúrico 5M, e inoculado

com 2×10^7 cels/mL. Após a inoculação dos isolados selecionados e da levedura controle PE-2 as fermentações foram conduzidas em temperatura de 33°C, pH do meio 4,5, sem agitação, durante 24 horas. No início e no final do ensaio de fermentação foram realizadas leituras para verificar a atenuação de sólidos totais (ART) em °Brix, utilizando um refratômetro durante o período da fermentação. Ao final da fermentação, foi feita a centrifugação a $2655 \times g/5$ min a 4°C. O sobrenadante foi transferido para falcons e mantido a 4°C para posterior determinação do teor alcoólico (% v/v). O resultado representa a média de três experimentos.

4.6.1 Determinação do teor de etanol nas amostras utilizando o método ultravioleta (UV).

A determinação do etanol foi realizada segundo Gattás et al. (2002). O Tubo R onde ocorreu a reação enzimática completa foi preparado da seguinte forma: 0,1 mL de NAD⁺ 0,015 M; 0,04 mL de amostra diluída 10 vezes; 2,760 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 (0,51 U da enzima álcool desidrogenase em 0,1 mL) para um volume final de 3,0 mL. Uma curva padrão para a dosagem do etanol foi construída utilizando soluções de etanol em diferentes concentrações.

O Tubo P diferenciou 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 iniciou-se no tempo zero com a adição da preparação enzimática e a reação ocorreu por 15 min à temperatura ambiente. As diferenças entre as absorvâncias (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:

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

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

4.6.2 Determinação de açúcar total

Açúcares totais é medido através do °Brix, que é a porcentagem peso/peso dos sólidos contidos em uma solução de açúcares, ou seja, o teor de sólidos na solução (ART - açúcares redutores totais). Por consenso, admite-se o °Brix como a porcentagem aparente de sólidos solúveis, contida em uma solução açucarada.

A determinação do °Brix foi realizada utilizando-se o refratômetro de bancada, no tempo zero e 24 horas do ensaio de fermentação.

4.7 Sequenciamento da região ITS1 e ITS2 e do fragmento rRNA 5.8S

Após obtenção e quantificação do DNA genômico, foi preparada a reação de PCR, para sequenciamento e detecção de possíveis polimorfismos nas sequências das regiões de interesse. Posteriormente, utilizou-se 20 ng do DNA molde, 1 µL do primer ITS1 e ITS4 (3,2 µM), e 1 µL BigDye (Applied Biosystems) diluído 8x, 3,5 µL do tampão de sequenciamento 5x, completando para 20 µL de volume final com água Milli-Q. As amplificações foram feitas em termociclador Veriti Thermal Cycler (Applied Biosystem), programado da seguinte forma: um ciclo de 1 min a 96°C, seguido de um ciclo de 10 min a 96°C, seguido de 25 ciclos de 5 min a 52°C, 4 min a 60°C e um ciclo de 5 min a 60°C.

O produto de PCR foi purificado utilizando o kit Big Dye Xterminator® Purification (Applied Biosystems). Posteriormente, ao produto purificado foram adicionados 45 µL do tampão SAM e 10 µL da resina de precipitação de DNA sobre 10 µL da reação de PCR. Homogeneizou-se em aparelho Vortex por 30 minutos à temperatura ambiente e centrifugou-se por 2 minutos a 1000 g. Durante todo o procedimento as amostras foram protegidas da luz. As amostras purificadas foram aplicadas no aparelho 3130 Genetic Analyser (Applied Biosystems) para o sequenciamento. O sequenciamento foi realizado no laboratório de Biologia Molecular da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Unesp – Araraquara, para a discriminação genética entre os isolados selecionados. Para a montagem e análise do gene rRNA dos isolados selecionados (ZFD4, ZFC2, ZFC3, ZFC4) e a linhagem de referência PE-2, foi utilizada a ferramenta BioEdit Sequence Alignment Editor (versão 7) e ClustalW (www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw).

4.8 Análise de expressão diferencial de genes

4.8.1 Extração de RNA total e síntese de cDNA

As células fúngicas foram maceradas com nitrogênio líquido e rapidamente transferidas para um tubo (tipo *Falcon*) contendo 3,5 mL de Trizol e pérolas de vidro. A amostra foi agitada vigorosamente em vórtex por 15 minutos e após, centrifugadas a 1620 x g por 10 minutos. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo, adicionado de 0,2 mL de clorofórmio para cada 0,75 mL de trizol recuperado, agitado vigorosamente e deixado em repouso por 10 minutos. Após o repouso, a amostra foi centrifugada a 1620 x g por 15 minutos e a fase aquosa, transferida para um novo tubo. Foram acrescentados 0,25 mL de isopropanol e 0,25 mL de solução de citrato de sódio 0,4M e cloreto de sódio 0,8M para cada 0,75 mL de trizol recuperado inicialmente, agitado gentilmente e deixado em repouso por 10 minutos a temperatura ambiente. A amostra foi centrifugada a 1620 x g por 30 minutos, o sobrenadante foi descartado e o precipitado, lavado com etanol a 75%. Nova centrifugação foi realizada em 1620 x g por 5 minutos, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi seco em temperatura ambiente. Finalmente, o precipitado foi ressuspensão em 30 µL de água DEPC (Dietil Pirocarbonato) 0,01% e armazenado a -70 °C.

4.8.2 Metodologia de RDA (*Representational Difference Analysis*)

Foi seguido o protocolo descrito por Pastorian et al. (2000) modificado por Dutra et al. (2004).

4.8.3 Síntese de cDNA fita simples

A síntese da primeira fita de cDNA foi feita em uma reação contendo 1 µg de RNA total, 10 pmol/µL da seqüência iniciadora (5'-31 AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACGCGGG-3') e essa mistura foi aquecida por 2 minutos a 72°C. Em seguida foi acrescentado 10 pmol/µL do oligo dT modificado (5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACT(30)N1N, onde N=A, C, G ou T; N1=A, G ou C), 2 µL de uma mistura de dNTPs (10 mM), 2 µL de RNaseOUT (40U/µL) (Invitrogen), 0,4 µL de DTT (100mM), 1,2 µL de cloreto de magnésio (50mM), 2 µL da enzima transcriptase reversa (200U/µL) (RT Superscript II - Invitrogen) e 4 µL de tampão 5X (Tris-HCl 250mM pH 8,3; KCl 375mM; MgCl₂ 15mM). Esta reação foi incubada a 42°C durante 1 hora e trinta minutos. Após este período foi adicionado 80µL de TE (Tris-HCl 10 M; EDTA 1mM pH 8,0) e aquecida por mais 7 minutos a 72°C.

4.8.4 Síntese de cDNA fita dupla

Para síntese da segunda fita de cDNA foi utilizado 3 µL da primeira fita, 10pmol/µL da seqüência iniciadora (5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT-3'), 10 µL de tampão 10X (Tris-SO₄ 600mM pH 8,9, (NH₄)₂SO₄ 180mM), 2 µL de uma mistura de dNTPs (10mM), 2µL de sulfato de magnésio (50mM), 2 µL de *Taq Hi-Fi* (Invitrogen) e água milli-Q estéril tratada com DEPC 0,01% para volume final de 100 µL. As condições de amplificação foram as seguintes: um ciclo inicial por 1 minuto a 95°C, seguido por 20 ciclos de desnaturação por 15 segundos a 95°C, anelamento por 30 segundos a 55°C, e extensão por 5 minutos a 68°C e um ciclo final de extensão por 7 minutos a 68°C.

4.8.5 Digestão com Sau3AI

Cerca de 1 µg da fita dupla de cDNA de ambos *tester* e *driver* foi digerida com 1 µL da enzima Sau3AI (10U/µL) (Promega), 5 µL de tampão B (Tris-HCl 60mM pH 7,5; NaCl 500mM; MgCl₂ 60mM; DTT 10mM), e água milli-Q estéril para volume final de 50 µL durante 3 horas e trinta minutos a 37°C. Posteriormente, a reação foi purificada através do kit *QIAquik* (Qiagen) e quantificados a 260nm.

4.8.6 Anelamento do primeiro par de adaptadores

Os produtos da digestão das amostras *tester* e *driver* (300 ng) foram ligados ao primeiro par de adaptadores RBam12 (5'-GATCCGTTTCATG-3') e RBam24 (5'-ACCGACGTCGACTATCCATGAACG-3') (500pmol/µL), nas seguintes condições: 55°C/20 minutos; 54°C/10 minutos; 53°C/1 minuto; 52°C/1 minuto; 50°C/1 minuto; 45°C/5 minutos; 40°C /5 minutos; 30°C /5 minutos; 25°C /5 minutos; 20°C /3 minutos; 15°C /5 minutos; 10°C/5 minutos; 4°C /30 minutos.

4.8.7 Ligação do primeiro par de adaptadores

Após anelamento foi adicionado 1 µL de ligase (5U/µL) (Fermentas), 3 µL de tampão ligação 10X (Tris-HCl 400mM; MgCl₂ 100mM; DTT 100mM; ATP 5mM) e 3 µL de ATP (10 mM) (Invitrogen), por 18 horas a 16°C em seguida a reação foi purificada através do kit *QIAquik* (Qiagen).

4.8.8 Teste de ligação do primeiro par de adaptadores

Para confirmar a ligação dos adaptadores, foi feito o teste utilizando-se: 0,5 µL da reação de ligação, 5 µL de uma mistura de dNTPs (1mM), 2,5 µL de tampão 10X (TrisSO₄ 600mM pH 8,9; (NH₄)₂SO₄ 180mM), 2 µL de cloreto de magnésio (50mM), 0,5 µL de *Taq Hi-Fi* (Invitrogen) e água milli-Q estéril para volume final de 25 µL, nas seguintes condições: um ciclo inicial por 1 minuto/95°C, seguido por 25 ciclos de desnaturação por 45

segundos/95°C e extensão por 4 minutos/72°C e um ciclo final por 10 minutos/72°C. A reação foi visualizada em gel de agarose 1% em tampão TBE 1X, corado pelo brometo de etídio (0,5 µg/mL) e observado à luz ultra-violeta.

4.8.9 Primeira subtração

Para primeira subtração, o *tester* (cDNA digerido e ligado aos adaptadores) e o *driver* (cDNA digerido sem os adaptadores) foram misturados na proporção de 1:100, acrescido de 50 µL de acetato de amônio 7,5M e 375 µL de etanol absoluto, a reação foi incubada por 3 horas à -20°C. Posteriormente, esta foi centrifugada a 20800 x g por 30 minutos e lavada com etanol 70%. O pellet foi ressuspendido em 4 µL de tampão EE 3X (EPPS 30 mM (Sigma) pH 8,0; EDTA 3 mM), aquecido por 95°C /2 minutos. Em seguida, esta foi transferida para um tubo contendo 1,5 µL de NaCl 5M, coberta com óleo mineral e incubada nas seguintes condições: 95°C /3 minutos; 67°C /24 horas. Após este período foi adicionado 40 µL de água milli-Q estéril.

4.8.10 Amplificação dos produtos diferenciais da primeira subtração

Os produtos diferenciais da subtração foram enriquecidos através de uma reação contendo 10,4 µL de tampão 10X (Tris-SO₄ 600 mM pH 8,9; (NH₄)₂SO₄ 180 mM), 8,3 µL de cloreto de magnésio (50 mM), 5,2 µL de uma mistura de dNTPs e água milli-Q estéril para volume final de 93,4 µL. Foram retirados 10 µL desta reação e adicionado 0,5 µL de Taq Hi-Fi (Invitrogen) e reservado, ao restante foram adicionados 0,1 µL da sequência iniciadora RBam24 e 6 µL da subtração, esta foi aquecida durante 2 minutos a 72°C, em seguida foi adicionado o restante da reação e aquecido por mais 5 minutos a 72°C, seguido de: 1 ciclo inicial de 1min/95°C, seguido por 7 ciclos de 45seg/95°C; 4min/72°C e um ciclo final de 10min/72°C. Posteriormente uma nova PCR foi feita, em que 6 µL do produto da primeira foram utilizados como molde para uma segunda reação realizada nas mesmas condições da anterior, entretanto esta foi amplificada 30 vezes. Como controle negativo, a mesma mistura foi utilizada, exceto com o produto de ligação. A reação foi aplicada em gel de agarose 2% em tampão TBE 1X, corado pelo brometo de etídio e observado à luz ultravioleta. O produto final foi purificado e digerido com a enzima de restrição Sau3AI para remoção dos adaptadores e uma nova purificação foi realizada.

4.8.11 Segunda amplificação

A segunda amplificação foi realizada usando-se os adaptadores NBam12 (5'-GATCCTCCCTCG-3') e NBam24 (5'-AGGCAACTGTGCTATCCGAGGGAG-3') que foram anelados e ligados aos produtos da primeira amplificação, nas mesmas condições da

primeira reação de anelamento e ligação, esta foi purificada novamente antes da segunda subtração. A segunda subtração foi realizada de acordo com o item 4.8.10, entretanto na proporção de 1:1000 de tester (produtos da segunda ligação) e driver. A amplificação foi feita através da seqüência NBam24, seguindo-se o protocolo descrito anteriormente. Os produtos foram purificados e verificados em gel de agarose 2% em tampão TBE 1X, corado pelo brometo de etídio, observado à luz ultra-violeta em seguida foi feita a clonagem.

4.8.12 Ligação dos fragmentos em vetor de clonagem

Os fragmentos de interesse foram ligados ao vetor de clonagem pGEM-TEasy (Promega), na proporção de 1:5 (vetor/inserto). A reação de ligação foi efetuada em 1 µL de tampão ligase (1X), 1 µL de T4 DNA ligase, 1 µL de ATP num volume final de 10 µL. Após incubação a 16°C/18h, esta foi precipitada e a transformação foi realizada em células de *Escherichia coli* XL1 blue (Stratagene).

4.8.13 Preparo de células competentes para transformação por eletroporação

Uma colônia de *E. coli* XL1 blue (Stratagene) foi inoculada em 10 mL de meio LB líquido por 18 horas a 37°C. Em seguida, foram inoculados 5 mL deste pré-inóculo em 500 mL de meio LB, incubado a 37°C sob agitação até atingir uma D.O de 0,35-0,4 em comprimento de onda de 550 nm. A cultura foi então resfriada em banho de gelo por 30 minutos e centrifugada a 3.000 x g por 15 minutos a 4°C. As células foram ressuspensas em 450 mL de água milli-Q estéril gelada, centrifugadas a 3.000 g por 15 minutos a 4°C. Foi adicionado 200 mL de água gelada e estas foram submetidas a uma nova centrifugação. Em seguida foi adicionado 10 mL de glicerol 10% gelado às células, seguindo-se nova centrifugação. O centrifugado foi ressuspensado em aproximadamente 2 mL de glicerol 10% (3×10^{10} céls/mL), em seguida estas foram alíquotadas, congeladas em nitrogênio líquido e mantidas a -80°C.

4.8.14 Transformação de células de *E. coli* por eletroporação

Uma alíquota de 20 µL de células competentes foi descongelada em banho de gelo e recebeu a adição de 2 µL do sistema de ligação (4.8.12). Esta mistura foi então colocada em uma cubeta de 0,2 cm previamente gelada. A cubeta foi colocada no aparelho Cell Porator *E. coli* Pulser (Gibco) programado com os seguintes parâmetros: 2,5 mV e 125 Ω. Após o pulso as células foram recolhidas com 1 mL de meio SOC (SAMBROOK & RUSSEL, 2001) e incubadas por 1 hora a 37°C. A suspensão foi plaqueada em ágar LB acrescido de 100 µg/mL de ampicilina, IPTG (isopropil-tio-β-D-galactopiranosídeo) e X-gal (5-bromo-4-cloro-3-

indolil-Bgalactopiranosídeo), nas concentrações de 0,1 mM e 30 µg/mL, respectivamente, e incubada por 18 horas a 37°C para a seleção de clones recombinantes.

4.8.15 Extração de DNA plasmidial em microplaca

As colônias positivas foram crescidas em 1 mL de meio Circle Grow (Bio 101 Systems) contendo 50 µg/mL de ampicilina em microplacas com 96 poços, por 22 horas a 37°C. Após este período 100 µL dos clones cultivados foram transferidos para microplacas de múltiplos poços (tipo para ELISA), adicionado v/v de glicerol 50% e estocadas a -80°C. O restante do crescimento foi centrifugado a 2.000 x g por 6 minutos, o sobrenadante foi descartado e 240 µL de solução GTE (glicose 50 mM; Tris-HCl 25 mM pH 8,0; EDTA 10 mM pH 8,0) foram adicionados a cada poço. A microplaca foi submetida à agitação em vortex e novamente centrifugada 2.000 x g por 9 minutos. O sobrenadante foi descartado e 80 µL de solução GTE foram adicionados a cada poço. Após agitação em vortex as suspensões foram transferidas para uma placa de 96 poços (fundo redondo) contendo 2 µL de RNase (10 mg/mL). Em seguida, 80 µL de NaOH 0,2 N; SDS 1% foram adicionados a cada poço, a placa foi homogeneizada por inversão e mantida à temperatura ambiente por 10 minutos, seguindo-se adição de 80 µL de acetato de potássio 3 M. Após homogeneização por inversão, a reação foi mantida à temperatura ambiente por 10 minutos. Após esse período, as placas foram incubadas a 90°C por 30 minutos e em seguida resfriadas em banho de gelo e centrifugada a 2.000 x g por 9 minutos. A reação foi transferida para um sistema contendo uma placa Millipore (MAGV N22) sobreposta a uma placa de 96 poços (fundo cônico), o qual foi centrifugado a 2.000 x g por 6 minutos. O sistema foi desmontado, e a etapa seguinte consistiu na precipitação do DNA. Para tanto, 100 µL de isopropanol foram adicionados ao filtrado, em seguida a placa foi centrifugada a 2.000 x g por 45 minutos. O precipitado foi lavado com etanol 70% e ressuspensionado em água milli-Q estéril.

4.8.16 Sequenciamento

O sequenciamento foi realizado pelo método de Sanger et al. (1977) utilizando o sequenciador automático MegaBACE 1000 (Amersham Biosciences), as reações foram realizadas no Laboratório de Biologia Molecular da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Unesp, Araraquara. Foram utilizados os kits DYEnamic ET e Dye Terminator Cycle Sequencing (Amersham Biosciences), seguindo os protocolos recomendados pelo fabricante, utilizando o oligonucleotídeo T7 *forward promoter* em que se utilizou um ciclo inicial por 2seg/95°C seguido de 34 ciclos a 10seg/ 95°C, 15seg/50°C, 1min/60°C. A sequência nucleotídica foi determinada através da incorporação de dideoxinucleotídeos (ddNTP)

terminadores e foram analisadas e avaliadas automaticamente através dos cromatogramas gerados e interpretados pelo software MegaBACE 1000 *sequencer* convertidos em sequência de DNA.

4.8.17 Análise das sequências

Inicialmente, as ESTs foram processadas utilizando o programa Phred (EWING et al., 1998). Somente as sequências com mais de 100 nucleotídeos e com qualidade Phred maior ou igual a 20 foram selecionadas. A retirada de sequências contaminantes de vetor foi realizada, utilizando-se o programa Crossmatch (GREEN, 1996) e para a montagem dos contigs foi utilizado o programa CAP3 (HUANG & MADAN, 1999).

Finalmente, as ESTs resultantes foram comparadas com os banco de dados não redundante genBank (www.ncbi.nlm.nih.gov) utilizando-se o programa BLASTx (ALTSCHUL, et al., 1997). A classificação das proteínas encontradas referente à sua função biológica foi feita através do programa Gene Ontology (www.geneontology.org).

5 RESULTADOS

5.1 Isolamento das leveduras

As amostras coletadas da cuba e dorna de fermentação do início e final de uma safra de cana-de-açúcar foram submetidas a diluições seriadas e a melhor diluição possível para isolar leveduras foi a de 1:10.000.

As colônias isoladas no início da fermentação foram denominadas da seguinte forma: Z (Usina que doou as amostras), C (amostra da cuba de fermentação), D (amostra da dorna de fermentação) e C1 (número da colônia isolada). Desta forma, obteve-se 10 isolados assim denominados de: ZCC1, ZCC2, ZCC3, ZCC4, ZCC5, ZDC1, ZDC2, ZDC3, ZDC4 e ZDC5.

E as colônias isoladas no final da safra foram denominadas da seguinte forma: Z (Usina que doou as amostras), F (final da safra), C (amostra da cuba de fermentação) e D (amostra da dorna de fermentação) e número da colônia isolada, desta forma foi possível obter 24 isolados assim denominados: ZFC1, ZFC2, ZFC3, ZFC4, ZFC5, ZFC6, ZFC7, ZFC8, ZFC9, ZFC10, ZFC11, ZFC12, ZFD1, ZFD2, ZFD3, ZFD4, ZFD5, ZFD6, ZFD7, ZFD8, ZFD9, ZFD10, ZFD11 e ZFD12.

5.2 Identificação de *Saccharomyces cerevisiae*

5.2.1 PCR

A PCR foi realizada com o DNA genômico quantificado dos isolados através do par de primers homólogos ao gene HO (ScHO-F e ScHO-R). Os isolados que amplificaram em um tamanho de banda de 400bp foram identificados como levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Portanto, foram identificados como *S. cerevisiae* 50% dos isolados do início e 95,8% dos isolados do final da safra de cana-de-açúcar. A Figura 1 demonstra a amplificação do fragmento de 400bp para a identificação de *S. cerevisiae*.



Figura 1: PCR de identificação utilizando par de primer ScHO com amplificação do fragmento de 400bp, ladder de 1Kb: PE-2 – Linhagem controle, 1 – ZDC1, 2 – ZDC2, 3 – ZDC3, 4 – ZDC4, 5 – ZDC5, 6 – ZCC1, 7 – ZCC2, 8 – ZCC3, 9 – ZCC4, 10 – ZCC5, 11 – ZFC1, 12 – ZFC2, 13 – ZFC3, 14 – ZFC4, 15 – ZFC5, 16 – ZFC6, 17 – ZFC7, 18 – ZFC8, 19 – ZFC9, 20 – ZFC10, 21 – ZFC11, 22 – ZFC12, 23 – ZFD1, 24 – ZFD2, 25 – ZFD3, 26 – ZFD4, 27 – ZFD5, 28 – ZFD6, 29 – ZFD7, 30 – ZFD8, 31 – ZFD9, 32 – ZFD10, 33 – ZFD11, 34 – ZFD12.

5.2.2 Identificação por PCR-RFLP

Essa técnica foi realizada a fim de caracterizar e tipar as leveduras selecionadas. Para realizar a técnica de RFLP, foi realizada uma PCR, utilizando os primers ITS1 e ITS4, que para *Saccharomyces cerevisiae*, amplificou um fragmento de 880pb (Figura 2).



Figura 2: Perfil de PCR utilizando par de primer ITS1 e ITS4. Fotografia de gel de agarose 0,8% com produto amplificado do gene rRNA das leveduras *Saccharomyces cerevisiae* isoladas. 01: marcador de peso molecular 100pb DNA ladder (Invitrogen). PE-2: linhagem controle e leveduras isoladas 1 - 28: ZCC4, ZCC5, ZDC1, ZDC4, ZDC5, ZFC1, ZFC2, ZFC3, ZFC4, ZFC5, ZFC6, ZFC7, ZFC8, ZFC9, ZFC10, ZFC11, ZFC12, ZFD1, ZFD2, ZFD3, ZFD4, ZFD5, ZFD7, ZFD8, ZFD9, ZFD10, ZFD11, ZFD12.

Foram utilizadas três enzimas de restrição: *CfoI*, *HaeIII* e *HinfI*, cada enzima gerou tamanhos de fragmentos diferentes para *S. cerevisiae*, pois realizam a restrição do gene rRNA em diferentes sítios. A enzima *CfoI* gerou fragmentos de 385pb e 365pb (Figura 3), a enzima *HaeIII* cortou quatro fragmentos de 320pb, 220pb, 180pb e 145pb (Figura 4) e a enzima *HinfI* gerou fragmentos de 365 e 165pb (Figura 5).

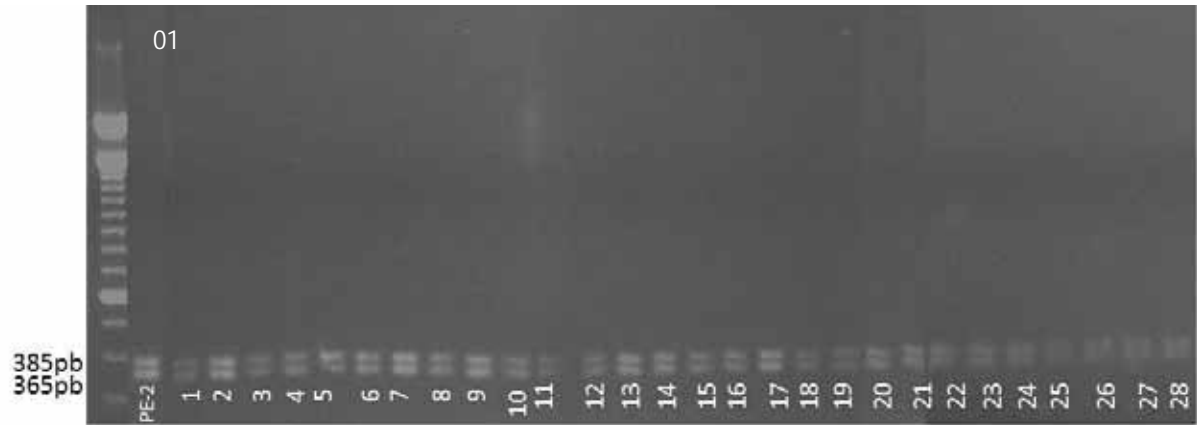


Figura 3: Perfil de PCR-RFLP utilizando enzima de restrição *CfoI*. Fotografia de gel de agarose 2,0% com produtos de PCR-RFLP realizado com produto de amplificado do gene rRNA das leveduras isoladas *Saccharomyces cerevisiae*; 01: marcador de peso molecular 1 Kb DNA ladder (Invitrogen). PE-2: linhagem controle e leveduras isoladas 1 - 28: ZCC4, ZCC5, ZDC1, ZDC4, ZDC5, ZFC1, ZFC2, ZFC3, ZFC4, ZFC5, ZFC6, ZFC7, ZFC8, ZFC9, ZFC10, ZFC11, ZFC12, ZFD1, ZFD2, ZFD3, ZFD4, ZFD5, ZFD7, ZFD8, ZFD9, ZFD10, ZFD11, ZFD12.

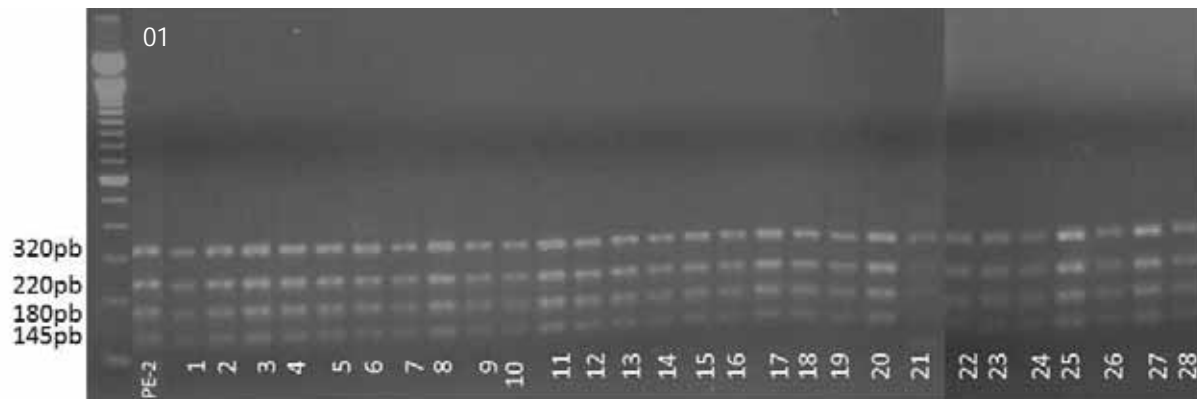


Figura 4: Perfil de PCR-RFLP utilizando enzima de restrição *HaeIII*. Fotografia de gel de agarose 2,0% com produtos de PCR-RFLP realizado com produto de amplificado do gene rRNA das leveduras isoladas *Saccharomyces cerevisiae*. 01: marcador de peso molecular 100pb DNA ladder (Invitrogen). PE-2: linhagem controle e leveduras isoladas 1 - 28: ZCC4, ZCC5, ZDC1, ZDC4, ZDC5, ZFC1, ZFC2, ZFC3, ZFC4, ZFC5, ZFC6, ZFC7, ZFC8, ZFC9, ZFC10, ZFC11, ZFC12, ZFD1, ZFD2, ZFD3, ZFD4, ZFD5, ZFD7, ZFD8, ZFD9, ZFD10, ZFD11, ZFD12.



Figura 5: Perfil de PCR-RFLP utilizando enzima de restrição *Hinfl*. Fotografia de gel de agarose 2,0% com produtos de PCR-RFLP realizado com produto de amplificado do gene rRNA das leveduras isoladas *Saccharomyces cerevisiae*. 01: marcador de peso molecular 100pb DNA ladder (Invitrogen). PE-2: linhagem controle e leveduras isoladas 1 - 28: ZCC4, ZCC5, ZDC1, ZDC4, ZDC5, ZFC1, ZFC2, ZFC3, ZFC4, ZFC5, ZFC6, ZFC7, ZFC8, ZFC9, ZFC10, ZFC11, ZFC12, ZFD1, ZFD2, ZFD3, ZFD4, ZFD5, ZFD7, ZFD8, ZFD9, ZFD10, ZFD11, ZFD12.

5.3 Caracterização dos isolados de *Saccharomyces cerevisiae*

5.3.1 Análise da macromorfologia das colônias isoladas

O aspecto da macromorfologia das colônias isoladas atribui-se quanto à cor, borda, textura e aspecto. A cepa de referência PE-2 e 7,14% dos isolados de *Saccharomyces cerevisiae* apresentaram as seguintes características: cor creme, borda lisa, textura brilhante e aspecto liso e 92,85% dos isolados apresentaram cor creme, borda ondulada, textura opaca e aspecto rugoso, conforme pode ser visualizado na figura 6.

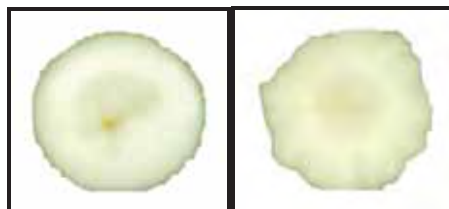


Figura 6: Macromorfologia das colônias

5.3.2 Análise microscópica das células de leveduras isoladas

A análise microscópica nos permitiu diferenciar as células de leveduras isoladas quanto a sua conformação espacial. A cepa de referência PE-2 não apresentou comportamento agregativo, porém 88% das células das leveduras isoladas durante o processo fermentativo apresentaram comportamento agregativo, conforme pode ser visto na figura 7.

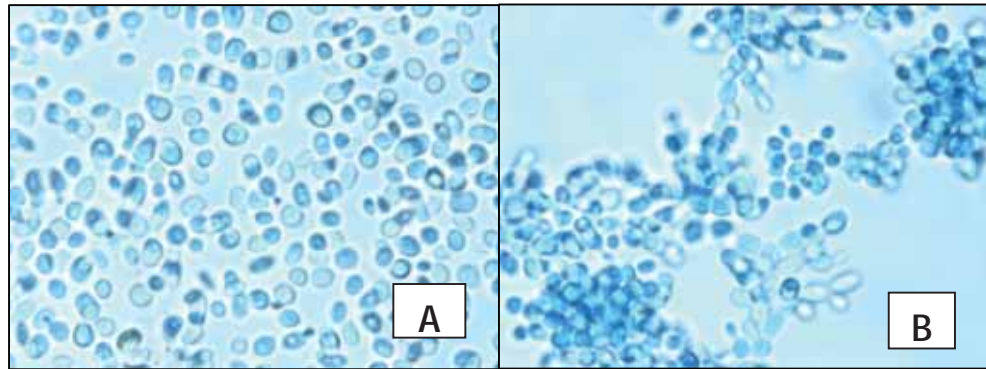


Figura 7: Análise microscópica dos isolados, (A) PE-2 e (B) ZCF7.

5.3.3 Ensaio de floculação

O ensaio de floculação foi realizado com os isolados identificados de *Saccharomyces cerevisiae*, com o objetivo de caracterizar as leveduras que possuem capacidade de floculação espontânea. No ensaio, as leveduras crescidas em meio YEPD por 48 horas e que não apresentaram formação de flocos após a agitação do tubo em vórtex foram caracterizadas como leveduras não floculantes e a levedura que apresentou formação de flocos após a agitação foi caracterizada como floculante. A levedura de referencia PE-2 é não-floculante, já 96, 43% (27) dos isolados obtidos são não-floculantes e apenas 3,47% (ZCC4).

5.3.4 Teste de produção de sulfeto de hidrogênio

Todos os isolados foram submetidos ao teste de produção de sulfeto de hidrogênio, nesse teste todos os isolados foram crescidos em placas de petri com meio ágar LA. Durante o crescimento das leveduras a produção de sulfeto de hidrogênio foi observada pela variação de cor do perfil de pigmentação. A linhagem PE-2 produziu média quantidade de sulfeto de hidrogênio. Em relação aos isolados testados, 14,28% (4) não produziram sulfeto de hidrogênio e 85, 71% (24) dos isolados produzem sulfeto de hidrogênio. O isolado ZDC1 apresentou colônias enegrecidas, característica de leveduras super produtoras de sulfeto de hidrogênio, no entanto a levedura ZCF9 e a ZFD3 produziram pouco sulfeto de hidrogênio e a levedura ZFD12 não produziu sulfeto de hidrogênio, como visualizado na Figura 8.

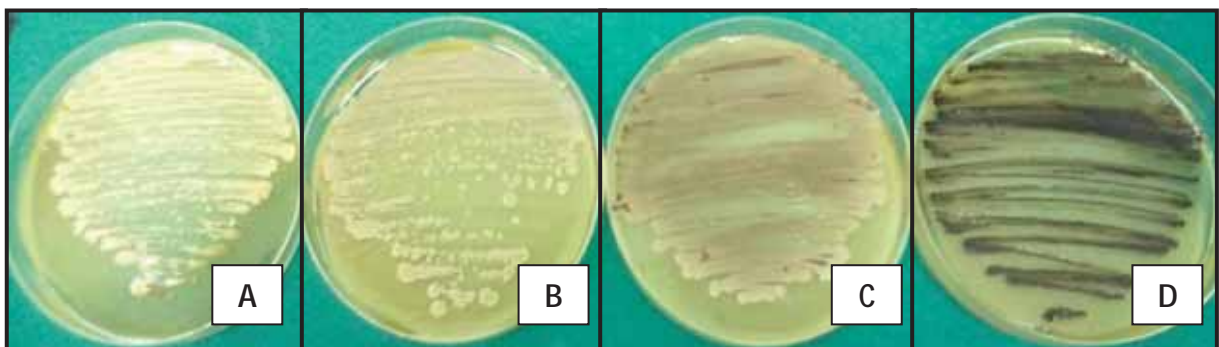


Figura 8: Verificação da produção de sulfeto de hidrogênio após crescimento em meio ágar LA das leveduras: A – ZFD12, B – ZFD3, C – ZCF9 e D – ZDC1.

5.3.5 Seleção dos isolados de *Saccharomyces cerevisiae*

5.3.5.1 Teste de sensibilidade a alta concentração de açúcares

O teste foi realizado em meio de ágar YEP com 2% glicose durante 72 horas/37°C, a levedura PE-2 e todos os 28 isolados tiveram crescimento intensivo nesta condição. Os isolados que cresceram na situação anterior foram transferidos para meio de ágar YEP contendo 20% glicose por 72 horas/30°C, a levedura PE-2 e todos os 28 isolados apresentaram crescimento intensivo nesta condição. Os isolados que cresceram na situação anterior foram repicados em ágar YEP contendo 20% sacarose durante 72 horas/30°C, nesta condição a levedura Pe-2 e 75% (21) dos isolados mostraram um crescimento intensivo e 25% (7) dos isolados apresentaram crescimento moderado, mostrando assim o perfil de resistência dos isolados à alta concentração de açúcares.

5.3.5.2 Teste de tolerância à temperatura

A fim de selecionar as leveduras *S. cerevisiae* resistentes às altas temperaturas foi realizado um teste que permite observar o crescimento das leveduras em diferentes temperaturas (25°C, 40°C, 42°C, 44°C e 46°C). Através dessa técnica foi possível selecionar de um total de 28 *S. cerevisiae*, 6 leveduras resistentes a 42°C. As leveduras selecionadas foram: ZFC2, ZFC3, ZFC4, ZFC5, ZFD3, ZFD4, como se observa na Figura 9.

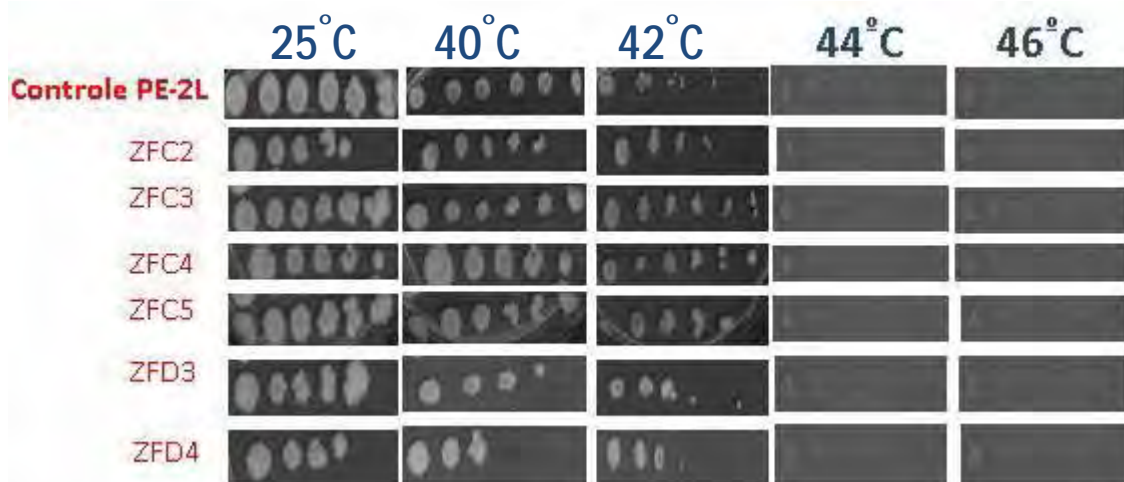


Figura 9: Isolados de *S. cerevisiae* selecionadas a 25°C, 40°C, 42°C, 44°C e 46°C.

5.3.5.3 Teste de tolerância ao etanol

As leveduras de *S. cerevisiae* selecionadas no teste de sensibilidade a temperatura foram submetidas ao teste de sensibilidade ao etanol. As concentrações de etanol empregadas ao meio de cultura para análise de crescimento das leveduras foram de 10% e 12%. A concentração de etanol escolhida se deve a condição encontrada durante uma fermentação alcoólica, a partir de 7% de etanol o rendimento da produção de etanol diminui devido ao estresse etanólico que a levedura sofre. Em teste preliminar foram testadas temperaturas de 25°C, 38°C, 39°C, 40°C e 41°C, porém observou-se crescimento somente até a temperatura de 39°C, por isso os testes foram realizados com 10% e 12% de etanol a 25°C, 38°C, 39°C. Dos 6 isolados testados, 5 foram tolerantes a 39°C com 10% de etanol, as leveduras resistentes são: ZFC2, ZFC3, ZFC4, ZFD3 e ZFD4, como mostra a Figura 10. Outro parâmetro testado foi 12% de etanol a 25°C, 38°C, 39°C, esse parâmetro foi mais eficaz para selecionar leveduras resistentes ao estresse etanólico, de um total de 6 leveduras selecionadas, 3 leveduras foram capazes de crescer a 39°C, são essas: ZFC2, ZFC3 e ZFD4, como demonstra a Figura 11.



Figura 10: Isolados de *S. cerevisiae* selecionadas a 25°C, 38°C e 39°C e 10% de etanol.

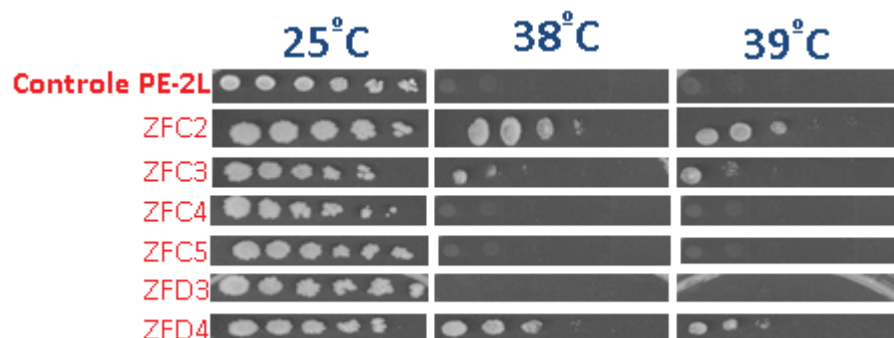


Figura 11: Isolados selecionados de *S. cerevisiae* selecionadas a 25°C, 38°C e 39°C e 12% de etanol.

5.3.5.4 Teste qualitativo de capacidade fermentativa

A capacidade fermentativa das leveduras isoladas foi testada em meio líquido contendo três principais fontes de carbono (glicose, sacarose e galactose). Foi considerado resultado positivo os tubos de ensaio onde a produção de gás pôde ser evidenciada, indicativa de fermentação do substrato. Os resultados demonstraram que entre os isolados selecionados (ZFC2, ZFC3, ZFC4, ZFC5, ZFD3 e ZFD4) 83,3%, 83,3% e 16,7% apresentam uma fermentação forte (+++) frente às fontes de carbono testadas de glicose, sacarose e galactose, respectivamente. Das linhagens selecionadas 16,7% apresentaram uma fermentação média (++) de glicose e sacarose e 33,3% da fonte de galactose. A porcentagem das linhagens selecionadas que apresentaram pouca fermentação (+) foi de 50% da fonte de galactose. A única levedura que fez uma fermentação forte dos três açúcares foi a ZFC4. A levedura de referência PE-2 foi capaz fazer uma fermentação forte para os três açúcares, como demonstrado na Figura 12.

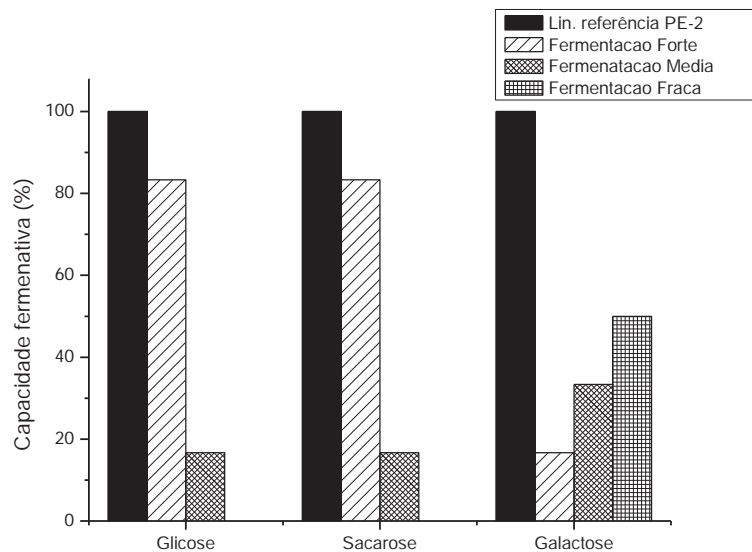


Figura 12: Gráfico representativo do teste qualitativo da capacidade fermentativa dos isolados selecionados e linhagem de referência, PE-2 aos açúcares glicose, sacarose e galactose.

5.3.5.5 Avaliação da capacidade de produção de biofilmes dos isolados selecionadas de *S. cerevisiae*

Nesse experimento testou-se a habilidade dos isolados selecionados resistentes a 39°C e 12% de etanol (ZFC2, ZFC3 e ZFD4), isolado que teve a melhor capacidade fermentativa dos três açúcares (ZFC4) e linhagem de referência PE-2 em formar biofilme em superfície sólida de poliestireno. A quantificação do biofilme foi realizada através do teste de XTT e foi

lida em espectrofotômetro em 492nm. A atividade metabólica do biofilme é medida através da absorbância, como demonstrada na Figura 13.

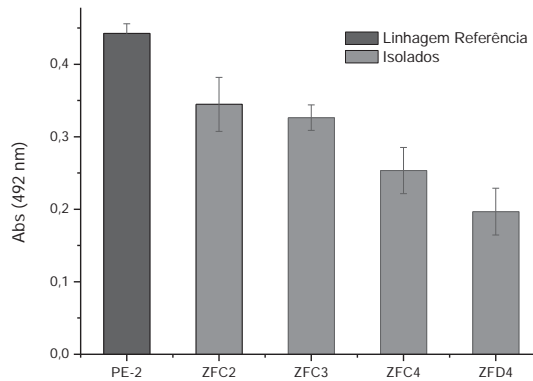


Figura 13: Quantificação da atividade metabólica do biofilme ($p \leq 0,05$) por espectrofotômetro (492nm) dos isolados selecionados.

5.4 Ensaio fermentativo dos isolados selecionados

No intuito de buscar o isolado que apresenta a melhor capacidade de produzir etanol, foi realizada uma fermentação de bancada usando um meio sintético para a fermentação, os isolados que foram testados são: isolados selecionados resistentes a 39°C e 12% de etanol (ZFC2, ZFC3 e ZFD4), o isolado que teve a melhor capacidade fermentativa dos três açúcares testados (ZFC4) e a linhagem de referência PE-2. O período de fermentação foi de 24 horas, após o término da fermentação o sobrenadante foi separado para posterior análise de teor de etanol e determinação do Brix°. O teor de etanol produzido pelos isolados foi medido de acordo com Gáttas et al. (2002) e o consumo de açúcares foram medidos no tempo 0 e 24 horas do ensaio de fermentação, como visualizado na Figura 14.

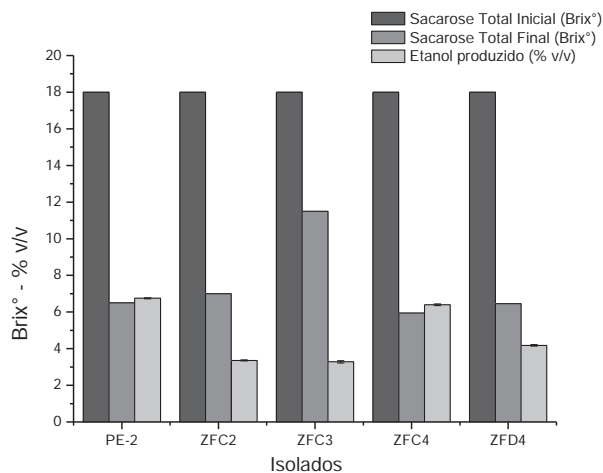


Figura 14: Gráfico representativo da concentração de sacarose inicial e final do ensaio da fermentação e teor de etanol produzido no ensaio de fermentação ($p \leq 0,05$) pela linhagem de referência PE-2 e os isolados selecionados.

5.5 Sequenciamento da região ITS1, ITS2 e do gene rRNA 5.8S.

Os resultados foram obtidos a partir da análise do alinhamento das sequências confrontando com a sequência do gene RDN37 (<http://www.yeastgenome.org>) que representa as regiões que codificam a transcrição primária e que é processado no gene rRNA estão representados na Figura 15. De acordo com o alinhamento das leveduras isoladas e com a sequência do gene de referência, podemos dizer que não houve um polimorfismo significativo entre as leveduras isoladas que pudessem elucidar sobre os seus diferentes comportamentos fenotípicos, pois a análise mostrou uma homologia de 99,0% entre os isolados testados (Figura 16).

```

PE-2          -----TTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTAAAGAAATTTAATAATTTTGA 51
ZFD4          -----GTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTAAAGAAATTTAATAATTTTGA 53
RDN37         TAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTAAAGAAATTTAATAATTTTGA 2520
ZFC3          -----TTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTAAAGAAATTTAATAATTTTGA 51
ZFC4          -----CGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTAAAGAAATTTAATAATTTTGA 48
ZFC2          -----TCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTAAAGAAATTTAATAATTTTGA 50
                *****

PE-2          AAATGGATTTTTTTGTTTTGGCAAGAGCATGAGAGCTTTTACTGGGCAAGAAGACAAGAG 111
ZFD4          AAATGGATTTTTTTGTTTTGGCAAGAGCATGAGAGCTTTTACTGGGCAAGAAGACAAGAG 113
RDN37         AAATGGATTTTTTTGTTTTGGCAAGAGCATGAGAGCTTTTACTGGGCAAGAAGACAAGAG 2580
ZFC3          AAATGGATTTTTTTGTTTTGGCAAGAGCATGAGAGCTTTTACTGGGCAAGAAGACAAGAG 111
ZFC4          AAATGGATTTTTTTGTTTTGGCAAGAGCATGAGAGCTTTTACTGGGCAAGAAGACAAGAG 108
ZFC2          AAATGGATTTTTTTGTTTTGGCAAGAGCATGAGAGCTTTTACTGGGCAAGAAGACAAGAG 110
                *****

PE-2          ATGGAGAGTCCAGCCGGGCCTGCGCTTAAAGTGC GCGGTCTTGCTAGGCTTGTAAGTTTCT 171
ZFD4          ATGGAGAGTCCAGCCGGGCCTGCGCTTAAAGTGC GCGGTCTTGCTAGGCTTGTAAGTTTCT 173
RDN37         ATGGAGAGTCCAGCCGGGCCTGCGCTTAAAGTGC GCGGTCTTGCTAGGCTTGTAAGTTTCT 2640
ZFC3          ATGGAGAGTCCAGCCGGGCCTGCGCTTAAAGTGC GCGGTCTTGCTAGGCTTGTAAGTTTCT 171
ZFC4          ATGGAGAGTCCAGCCGGGCCTGCGCTTAAAGTGC GCGGTCTTGCTAGGCTTGTAAGTTTCT 168
ZFC2          ATGGAGAGTCCAGCCGGGCCTGCGCTTAAAGTGC GCGGTCTTGCTAGGCTTGTAAGTTTCT 170
                *****

```

```

PE-2      TTCTTGCTATTCCAAACGGTGAGAGATTTCTGTGCTTTTGTATAGGACAATTTAAACCG 231
ZFD4      TTCTTGCTATTCCAAACGGTGAGAGATTTCTGTGCTTTTGTATAGGACAATTTAAACCG 233
RDN37     TTCTTGCTATTCCAAACGGTGAGAGATTTCTGTGCTTTTGTATAGGACAATTTAAACCG 2700
ZFC3      TTCTTGCTATTCCAAACGGTGAGAGATTTCTGTGCTTTTGTATAGGACAATTTAAACCG 231
ZFC4      TTCTTGCTATTCCAAACGGTGAGAGATTTCTGTGCTTTTGTATAGGACAATTTAAACCG 228
ZFC2      TTCTTGCTATTCCAAACGGTGAGAGATTTCTGTGCTTTTGTATAGGACAATTTAAACCG 230
*****

PE-2      TTTCAATACAACACACTGTGGAGTTTTTCATATCTTTGCAACTTTTTCTTTGGGCATTTCGA 291
ZFD4      TTTCAATACAACACACTGTGGAGTTTTTCATATCTTTGCAACTTTTTCTTTGGGCATTTCGA 293
RDN37     TTTCAATACAACACACTGTGGAGTTTTTCATATCTTTGCAACTTTTTCTTTGGGCATTTCGA 2760
ZFC3      TTTCAATACAACACACTGTGGAGTTTTTCATATCTTTGCAACTTTTTCTTTGGGCATTTCGA 291
ZFC4      TTTCAATACAACACACTGTGGAGTTTTTCATATCTTTGCAACTTTTTCTTTGGGCATTTCGA 288
ZFC2      TTTCAATACAACACACTGTGGAGTTTTTCATATCTTTGCAACTTTTTCTTTGGGCATTTCGA 290
*****

PE-2      GCAATCGGGGCCAGAGGTAACAAACACAAACAATTTTATTTATTTCATTAATTTTTTGTG 351
ZFD4      GCAATCGGGGCCAGAGGTAACAAACACAAACAATTTTATTTATTTCATTAATTTTTTGTG 353
RDN37     GCAATCGGGGCCAGAGGTAACAAACACAAACAATTTTATCTATTTCATTAATTTTTTGTG 2820
ZFC3      GCAATCGGGGCCAGAGGTAACAAACACAAACAATTTTATTTATTTCATTAATTTTTTGTG 351
ZFC4      GCAATCGGGGCCAGAGGTAACAAACACAAACAATTTTATTTATTTCATTAATTTTTTGTG 348
ZFC2      GCAATCGGGGCCAGAGGTAACAAACACAAACAATTTTATTTATTTCATTAATTTTTTGTG 350
*****

PE-2      AAAACAAGAATTTTCGTAACCTGGAAATTTTAAATATTAAAACTTTCAACAACGGGATC 411
ZFD4      AAAACAAGAATTTTCGTAACCTGGAAATTTTAAATATTAAAACTTTCAACAACGGGATC 413
RDN37     AAAACAAGAATTTTCGTAACCTGGAAATTTTAAATATTAAAACTTTCAACAACGGGATC 2880
ZFC3      AAAACAAGAATTTTCGTAACCTGGAAATTTTAAATATTAAAACTTTCAACAACGGGATC 411
ZFC4      AAAACAAGAATTTTCGTAACCTGGAAATTTTAAATATTAAAACTTTCAACAACGGGATC 408
ZFC2      AAAACAAGAATTTTCGTAACCTGGAAATTTTAAATATTAAAACTTTCAACAACGGGATC 410
*****

PE-2      TCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGCAGA 471
ZFD4      TCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGCAGA 473
RDN37     TCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGCAGA 2940
ZFC3      TCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGCAGA 471
ZFC4      TCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGCAGA 468
ZFC2      TCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGCAGA 470
*****

PE-2      ATTCCGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCTTGGTATTCCAGGGGGCAT 531
ZFD4      ATTCCGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCTTGGTATTCCAGGGGGCAT 533
RDN37     ATTCCGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCTTGGTATTCCAGGGGGCAT 3000
ZFC3      ATTCCGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCTTGGTATTCCAGGGGGCAT 531
ZFC4      ATTCCGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCTTGGTATTCCAGGGGGCAT 528
ZFC2      ATTCCGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCTTGGTATTCCAGGGGGCAT 530
*****

PE-2      GCCTGTTGAGCGTCATTTCTTCTCAAACATTCTGTTTGGTAGTGAGTGATACTCTTTG 591
ZFD4      GCCTGTTGAGCGTCATTTCTTCTCAAACATTCTGTTTGGTAGTGAGTGATACTCTTTG 593
RDN37     GCCTGTTGAGCGTCATTTCTTCTCAAACATTCTGTTTGGTAGTGAGTGATACTCTTTG 3060
ZFC3      GCCTGTTGAGCGTCATTTCTTCTCAAACATTCTGTTTGGTAGTGAGTGATACTCTTTG 591
ZFC4      GCCTGTTGAGCGTCATTTCTTCTCAAACATTCTGTTTGGTAGTGAGTGATACTCTTTG 588
ZFC2      GCCTGTTGAGCGTCATTTCTTCTCAAACATTCTGTTTGGTAGTGAGTGATACTCTTTG 590
*****

```

```

PE-2          GAGTTAACTTGAAATTGCTGGCCTTTTCATTGGATGTTTTTTTTCCAAAGAGAGGTTTCT 651
ZFD4          GAGTTAACTTGAAATTGCTGGCCTTTTCATTGGATGTTTTTTTTCCAAAGAGAGGTTTCT 653
RDN37        GAGTTAACTTGAAATTGCTGGCCTTTTCATTGGATGTTTTTTTTCCAAAGAGAGGTTTCT 3120
ZFC3          GAGTTAACTTGAAATTGCTGGCCTTTTCATTGGATGTTTTTTTTCCAAAGAGAGGTTTCT 651
ZFC4          GAGTTAACTTGAAATTGCTGGCCTTTTCATTGGATGTTTTTTTTCCAAAGAGAGGTTTCT 648
ZFC2          GAGTTAACTTGAAATTGCTGGCCTTTTCATTGGATGTTTTTTTTCCAAAGAGAGGTTTCT 650
*****

PE-2          CTGCGTGCTTGAGGTATAATGCAAGTACGGTCGTTTTAGGTTTTACCAACTGCGGCTAAT 711
ZFD4          CTGCGTGCTTGAGGTATAATGCAAGTACGGTCGTTTTAGGTTTTACCAACTGCGGCTAAT 713
RDN37        CTGCGTGCTTGAGGTATAATGCAAGTACGGTCGTTTTAGGTTTTACCAACTGCGGCTAAT 3180
ZFC3          CTGCGTGCTTGAGGTATAATGCAAGTACGGTCGTTTTAGGTTTTACCAACTGCGGCTAAT 711
ZFC4          CTGCGTGCTTGAGGTATAATGCAAGTACGGTCGTTTTAGGTTTTACCAACTGCGGCTAAT 708
ZFC2          CTGCGTGCTTGAGGTATAATGCAAGTACGGTCGTTTTAGGTTTTACCAACTGCGGCTAAT 710
*****

PE-2          CTTTTTTTATACTGAGCGTATTGGAACGTTATCGATAAGAAGAGAGCGTCTAGGCGAACA 771
ZFD4          CTTTTTTTATACTGAGCGTATTGGAACGTTATCGATAAGAAGAGAGCGTCTAGGCGAACA 773
RDN37        CTTTTTTTATACTGAGCGTATTGGAACGTTATCGATAAGAAGAGAGCGTCTAGGCGAACA 3240
ZFC3          CTTTTTTTATACTGAGCGTATTGGAACGTTATCGATAAGAAGAGAGCGTCTAGGCGAACA 771
ZFC4          CTTTTTTTATACTGAGCGTATTGGAACGTTATCGATAAGAAGAGAGCGTCTAGGCGAACA 768
ZFC2          CTTTTTTTATACTGAGCGTATTGGAACGTTATCGATAAGAAGAGAGCGTCTAGGCGAACA 770
*****

PE-2          ATGTTCTTAAAGTTTGACCTCAAATCAGGTAGGAGTACCCGCTGAACTTAAGCATAT--- 828
ZFD4          ATGTTCTTAAAGTTTGACCTCAAATCAGGTAGGAGTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAA 833
RDN37        ATGTTCTTAAAGTTTGACCTCAAATCAGGTAGGAGTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAA 3300
ZFC3          ATGTTCTTAAAGTTTGACCTCAAATCAGGTAGGAGTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAA 831
ZFC4          ATGTTCTTAAAGTTTGACCTCAAATCAGGTAGGAGTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAA 828
ZFC2          ATGTTCTTAAAGTTTGACCTCAAATCAGGTAGGAGTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAA 830
*****

PE-2          -----
ZFD4          TAAGCGGAGG----- 843
RDN37        TAAGCGGAGGAAAAGAAACCAACCGGGATTGCCTTAGTAACGGCGAGTGAAGCGGCAAAA 3360
ZFC3          TAAGCGGAGGAAAAGAAA----- 849
ZFC4          TAAGCGGAGGAAAA----- 842
ZFC2          TAAGCGGAGGAA----- 842

```

Figura 15: Alinhamento das sequências amplificadas a partir das regiões ITS1, ITS2 e 5.8S, em comparação com o gene RDN37 (quadrante vermelho) para verificação de polimorfismos nestas regiões.

SeqA	Name	Length	SeqB	Name	Length	Score
1	RDN37	6858	2	PE-2	828	99.8792
1	RDN37	6858	3	ZFC2	842	99.8812
1	RDN37	6858	4	ZFC3	849	99.8822
1	RDN37	6858	5	ZFC4	842	99.8812
1	RDN37	6858	6	ZFD4	843	99.8814
2	PE-2	828	3	ZFC2	842	99.8792
2	PE-2	828	4	ZFC3	849	100.0
2	PE-2	828	5	ZFC4	842	99.6377
2	PE-2	828	6	ZFD4	843	100.0

Figura 16: Tabela de score, comparando a sequência do gene de referência com as sequências dos isolados selecionados e da linhagem de referência PE-2. Comparação da sequência da linhagem de referência com as sequências dos isolados selecionados.

5.6 Análise de genes diferencialmente expressos por isolados de *Saccharomyces cerevisiae* após ensaio fermentativo

5.6.1 Extração de RNA total após ensaio fermentativo

A extração de RNA foi realizada após ensaio de fermentação de dois isolados de *Saccharomyces cerevisiae* selecionados conforme os resultados das suas características de resistência e rendimento de etanol (ZFC4 e ZFD4), conforme descrito na Tabela 1, assim a partir destas extrações passou-se ao ensaio de RDA, a fim de buscar genes diferencialmente expressos no isolado ZFD4, pois este agrega as melhores características como linhagem industrial na produção de etanol, visando um melhor rendimento fermentativo.

Tabela 1: Situações selecionadas pelo ensaio de RDA.

	<i>Tester</i>	<i>Driver</i>
DS1	ZFC4	ZFD4
DS2	ZFD4	ZFC4

5.6.2 Ensaio de RDA

Para cada situação foram realizadas duas hibridizações subtrativas nas proporções de 1:100 e 1:1000 de tester e driver respectivamente (Figura 17), com excesso de driver para remoção das sequências idênticas nas duas condições. Os produtos diferencialmente expressos das duas situações foram amplificados, resultando em padrões distintos.

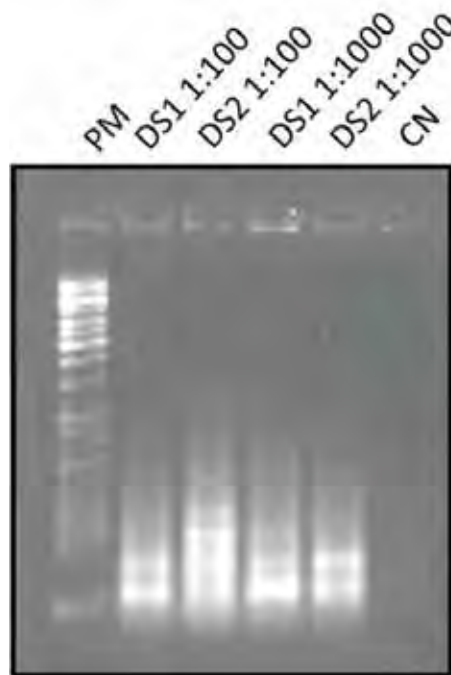


Figura 17: Produtos diferencialmente expressos de isolados selecionados de *Saccharomyces cerevisiae* após ensaio de fermentação. PM: Marcador de tamanho molecular de 1Kb (Fermentas), CN: Controle Negativo. DS1: 1a Subtração (1:100) e 2a Subtração (1:1000) e DS2: 1 a Subtração (1:100) e 2a Subtração (1:1000).

A situação DS2 foi primeiramente selecionada, o produto diferencialmente expresso foi então clonado e sequenciado para as análises das ESTs resultantes. Foram feitas empregando-se o banco de dados GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov) utilizando-se o programa BLAST x (ALTSCHUL et al., 1997).

5.6.3 Produtos diferencialmente expressos

Um total de 196 clones foi obtido e inicialmente foram sequenciados os da situação DS2. A placa obtida da situação DS1 encontra-se em fase de sequenciamento. Os da situação DS2 foram analisados e agrupados em quatro *contigs*. As sequencias apresentaram homologia com uma única proteína e suas funções estão representadas na tabela 2.

Tabela 2: Análise dos clones (*contigs*) sequenciados da situação DS2.

Seq description	length	E-value	Function
homoaconitase	240	1,70E-11	P:metabolic process; F:4 iron, 4 sulfur cluster binding; P:lysine biosynthetic process; F:homoaconitase hydratase activity; P:oxidation reduction; F:oxidoreductase activity; F:lyase activity; C:mitochondrion; F:iron-sulfur cluster binding; F:metal ion binding; P:cellular amino acid biosynthetic process
homoaconitase	430	7,80E-13	P:metabolic process; F:4 iron, 4 sulfur cluster binding; P:lysine biosynthetic process; F:homoaconitase hydratase activity; C:mitochondrion; F:lyase activity; F:iron-sulfur cluster binding; F:metal ion binding; P:cellular amino acid biosynthetic process; P:oxidation reduction; F:oxidoreductase activity
homoaconitase	256	2,60E-17	P:metabolic process; F:4 iron, 4 sulfur cluster binding; P:lysine biosynthetic process; F:homoaconitase hydratase activity; P:oxidation reduction; F:oxidoreductase activity; F:lyase activity; C:mitochondrion; F:iron-sulfur cluster binding; F:metal ion binding; P:cellular amino acid biosynthetic process
homoaconitase	281	1,20E-10	P:metabolic process; F:4 iron, 4 sulfur cluster binding; P:lysine biosynthetic process; F:homoaconitase hydratase activity; P:oxidation reduction; F:oxidoreductase activity; F:lyase activity; C:mitochondrion; F:iron-sulfur cluster binding; F:metal ion binding; P:cellular amino acid biosynthetic process

6 DISCUSSÃO

O etanol está se tornando um importante biocombustível e sua produção vem se espalhando através dos cinco continentes e a compreensão da fisiologia de leveduras por trás do processo de fermentação pode ajudar a garantir altas produtividades.

Devido às condições especiais do processo fermentativo relacionada com a produção de etanol, a levedura *Saccharomyces cerevisiae* é a espécie predominante na produção. Custo-benefício da produção de etanol depende, sobretudo, entre outros fatores, da conversão rápida e de alto rendimento de carboidratos para o etanol, que por si só depende de melhorias na sobrevivência e desempenho das células de leveduras sob condições industriais (SNOWDEN et al., 2009).

Amostras da cuba (inóculo fermentativo) e da dorna de fermentação foram coletadas no início e no final de uma safra de uma usina de cana-de-açúcar localizada no interior do estado de São Paulo. Foram isoladas 34 colônias a fim de caracterizá-las como *Saccharomyces cerevisiae*, das quais 10 isolados são do início e 24 isolados são do final da safra. Foi obtido um número maior de isolados do final da safra para obter um maior número de amostras a serem estudadas.

Esses isolados foram submetidos a testes moleculares para a identificação. Aos isolados foi aplicado a técnica de PCR, utilizando par de *primers* homólogos ao gene HO (ScHO-F e ScHO-R), nos quais, os que amplificaram em um tamanho de banda de 400bp foram identificados como *Saccharomyces cerevisiae*.

Foram identificados como *S. cerevisiae* 50% (5) dos isolados do início e 95,8% (23) dos isolados do final da safra de cana-de-açúcar. Esta técnica se mostrou eficaz e rápida para a identificação, apresentando uma grande utilidade para usinas de cana-de-açúcar que necessitam do monitoramento de micro-organismos durante o processo de fermentação. Melo Pereira et al. (2010) desenvolveram um novo par de primer espécie-específico para diferenciar as principais espécies de *Saccharomyces* (*S. bayanus*, *S. cerevisiae* e *S. pastorianus*), propondo uma metodologia rápida de identificação (algumas horas), comparado a metodologias clássicas de identificação, nas quais são complexos e consomem tempo (DEAK, 1995), além de não distinguirem grupos próximos filogeneticamente (RANIERI et al., 2003).

A restrição padrão do gene de rRNA tem sido usado para diferenciar espécies entre *Saccharomyces* (HUFFMAN et al, 1992) bem como o estudo da variação da região de rRNA (VALENTE et al, 1996). Os primers ITS1 e ITS4 foram usados para amplificar a região da unidade repetida do gene, no qual inclui duas regiões não codificantes designadas espaço interno transcrito (ITS1 e ITS2) e o gene rRNA 5.8S.

Outra técnica aplicada para a identificação foi PCR-RFLP, nessa técnica primeiramente foi realizada uma PCR para amplificar o DNA necessário para o RFLP com enzimas de endonucleases de restrição. Esse teste foi realizado para identificar através do perfil de restrição, gerado pelas endonucleases, os isolados testados. A linhagem de referência PE-2 apresentou o mesmo perfil de restrição que os isolados para todas as enzimas de restrição testadas. De acordo com Korabecna, et al. (2003) a partir do PCR-RFLP é possível identificar a variação interespecies e intraespecies do gene rDNA ITS na região ITS-5.8S em leveduras.

Testes com propósitos de caracterizar aspectos fenotípicos dos isolados foram realizados para selecionar os isolados que possuem características favoráveis para a utilização no setor industrial de bebidas e de etanol.

Uma técnica realizada para analisar a macromorfologia das colônias foi útil para distinguir as características das colônias de cada isolado obtido tanto do início, quanto do final da safra de cana-de-açúcar.

A característica mais frequente entre os isolados foi: cor creme, borda ondulada, textura opaca e aspecto elevado. Podendo nos indicar uma prevalência de uma única linhagem em todo o processo, por apresentar um mesmo fenótipo frente às diferentes condições encontradas durante toda a fermentação de uma safra de cana-de-açúcar.

O ensaio de floculação foi realizado com a linhagem de referência PE-2 e os 28 isolados, com o objetivo de caracterizar os isolados que possuem capacidade de floculação espontânea. No ensaio a maioria dos isolados testados e a linhagem de referência PE-2 não são floculantes. A característica não-floculante dos isolados pode ser entendida pelo fato do fermento utilizado como inóculo para iniciar o processo fermentativo, seja o fermento de panificação da marca comercial Fleishman Ltda, sendo uma linhagem considerada não floculante (LUDWIG et al., 2001). A floculação do fermento usado nas indústrias produtoras de etanol leva ao assentamento das leveduras nos fundo das dornas, e dificulta a conversão do açúcar em etanol porque para uma máxima conversão de açúcar em etanol e CO₂, é essencial que as leveduras permaneçam suspensas no líquido de fermentação e não floculadas, este fenômeno pode causar perda de células na centrífuga e o consequente gasto de substrato para a reposição celular, determinando assim, queda no rendimento alcoólico. A floculação dificulta o contato entre o antibacteriano usado no processo e a bactéria causando o aumento desses contaminantes, que provocam um aumento de acidez, afetando a qualidade do etanol produzido, seja como combustível ou para a indústria de bebidas alcoólicas (Rose, 1980).

A seleção de isolados, neste estudo, foi focada para busca de leveduras que apresentam alta capacidade de produzir etanol combustível, porém esse teste de produção de sulfeto de hidrogênio foi realizado a fim de excluir leveduras que não fossem interessantes para a indústria alimentícia, buscando assim também selecionar isolados que são de interesse para produção de bebidas como cachaça e cerveja, pois as leveduras super-produtoras de sulfeto de hidrogênio são indesejáveis para o processo fermentativo, pois agregam odor e sabor desagradáveis às bebidas (RIBEIRO e HORII, 1999). Para caracterizar os isolados foi realizado teste para avaliar a produção de sulfeto de hidrogênio, nesse os isolados foram crescidos em placas de petri com meio ágar LA. Durante o crescimento das leveduras a caracterização da produção de sulfeto de hidrogênio foi observada pela variação de cor do perfil de pigmentação da colônia dos isolados (a produção de H₂S pelas leveduras envolve a incorporação do sulfato (SO₄) na célula e a sua redução, levando ao escurecimento da colônia). A linhagem PE-2 produziu média quantidade de sulfeto de hidrogênio, em relação aos isolados testados, 14,28% (4) não produziram sulfeto de hidrogênio (linhagens sem ou com baixa atividade de sulfito redutase não produziram quantidades detectáveis de sulfeto de hidrogênio de acordo com Giudici e Kunkee, 1994) e 85, 71% (24) dos isolados produzem sulfeto de hidrogênio. A maioria dos isolados testados não seria interessante para a utilização na indústria de produção de bebidas como cachaça e cerveja, pois a habilidade das leveduras produzirem H₂S tem grande importância comercial, no entanto, Martins (1997) mostrou que a maioria das linhagens utilizadas comercialmente pode produzir sulfeto de hidrogênio, através da enzima sulfito redutase.

A estratégia, para selecionar isolados adequados para serem usados como inóculo da produção de etanol, foi levar em consideração importantes características que a levedura produtora de etanol precisa possuir, tais como: resistência ao estresse osmótico, térmico e etanólico para combater as condições de estresses fermentativos. Levando em consideração que a fermentação do caldo de cana-de-açúcar inicia com alta concentração de sacarose (\pm 20% peso/vol), procede com elevadas temperaturas (\pm 37°C) e termina cada ciclo fermentativo com alta concentração de etanol (de 6 a 8% vol/vol) (OLIVEIRA et al., 2008), assim linhagens que possuem resistência natural a estas condições são mais apropriadas, desta forma, buscou-se selecionar isolados resistentes a esses fatores de estresse.

O teste de sensibilidade à alta concentração de açúcares (glicose, sacarose) foi realizado para selecionar leveduras que são resistentes ao estresse osmótico. Nesse teste os isolados apresentaram resistência à condição testada. Os isolados foram resistentes a 20% de

glicose e sacarose, sendo um fator importante na seleção de leveduras para o processo fermentativo.

A temperatura ótima para o crescimento da levedura *Saccharomyces cerevisiae* para produzir etanol é de cerca de 30°C. No entanto, em destilarias situadas em zonas de alta temperatura, a eficiência do processo de produção de álcool cai devido a temperaturas acima de 40°C (MUKHTAR et al. 2010). Visto isso, se torna importante a busca de leveduras que toleram temperaturas acima de 30°C.

Para selecionar os isolados resistentes à temperatura, foi realizado um teste, no qual, os isolados foram expostos em temperaturas diferentes (25°C, 40°C, 42°C, 44°C e 46°C). O resultado mostrou que a linhagem de referência PE-2, cresceu a 42°C e que dos 28 isolados, apenas ZFC2, ZFC3, ZFC4, ZFC5, ZDF3, ZFD4 cresceram sob essa temperatura. Aquisição de termotolerância é largamente controlada através da ativação e regulação de determinados genes relacionados ao estresse envolvido na síntese de compostos específicos que protegem o organismo do estresse da alta temperatura (EDGARDO et al., 2008). Leveduras termotolerantes é um pré-requisito para a fermentação de etanol sob condições de alta temperatura para facilitar a hidrólise da sacarose, bem como para salvar o investimento do capital investido e dos custos de operação do sistema de arrefecimento (SHAHSAVARANI et al., 2011).

A fim de realizar uma seleção mais criteriosa foi realizado um teste de resistência a diversas temperaturas na presença de concentrações de etanol. Testes preliminares foram feitos nas concentrações de etanol de 10% e 12%, nas temperaturas de 25°C, 38°C, 39°C, 40°C e 41°C, porém observou-se que não houve crescimento nas temperaturas de 40°C e 41°C, assim os testes foram prosseguidos somente nas temperaturas de 25°C, 38°C, 39°C. Dos seis isolados testados, cinco isolados foram tolerantes a 39°C com 10% de etanol (ZFC2, ZFC3, ZFC4, ZFD3 e ZFD4). Quando colocadas em meio com 12% de etanol, obteve-se uma maior eficácia para selecionar isolados resistentes ao estresse etanólico, de um total de cinco isolados selecionados, três foram capazes de crescer a 39°C (ZFC2, ZFC3 e ZFD4). Nos dois testes realizados com concentrações de 10% e 12% etanol, a linhagem PE-2 não apresentou crescimento nas temperaturas de 38°C e 39°C.

Os isolados selecionadas à 25°C, 38°C e 39°C com 12% de etanol eram linhagens de *S. cerevisiae* isoladas do final da safra de cana-de-açúcar, pode-se dizer que esses adquiriram resistência devido a pressão ambiental sofrida durante o processo fermentativo. Através dos testes realizados para a seleção de leveduras, foi possível selecionar três isolados (ZFC2, ZFC3 e ZFD4) que apresentam um perfil adequado para a utilização no setor industrial para a

produção de etanol. Os mecanismos pelos quais as leveduras se protegem desses fatores pode ser pelo acúmulo de trealose, síntese molecular das chaperonas e a síntese de enzimas antioxidantes (TANGHE et., 2006). As leveduras evoluíram para se tornarem mais resistentes a estresses ambientais. Sobrevivência e crescimento de levedura em condições de estresses são conseguidos através de uma série de respostas de estresse que dependem de uma rede complexa de detecção e vias de transdução de sinal levando às adaptações em ciclo celular, e ajustamentos nos perfis de expressão de genes e atividades metabólicas celulares (HOHMANN e MAGER, 2003; STANLEY et al., 2010). Rosoouw et al. (2009) analisaram a tolerância ao etanol de cepas de leveduras da indústria vínica e o resultado mostrou que todas as linhagens testadas foram tolerantes a 25% de etanol e que a expressão gênica pode ser influenciada quando linhagens de leveduras resistem ao estresse gerado durante o processo fermentativo.

Linhagens desenvolvidas sob condições de laboratório estão destinadas a falhar quando introduzida em fermentação industrial com reciclo celular. Estas cepas carregam genes e características diferentes, mas não são capazes de sobreviver, ou adaptar-se, às condições adversas do processo de fermentação alcoólica industrial. Além disso, estas cepas não têm a capacidade de competir com a *Saccharomyces* selvagens e são rapidamente substituídas por linhagens mais tolerantes e adaptadas (BASSO et al. 2008, STAMBUK et al. 2009; LOPES 2010).

Tolerância à alta temperatura e alta concentração de etanol são fenótipos desejáveis para leveduras produtoras de bioetanol, pois leveduras com essas características de tolerância múltipla podem minimizar os custos de manter uma temperatura ideal, de recuperação do etanol e do risco de contaminação. Portanto, uma linhagem que exibe esses fenótipos seria inestimável para proporcionar uma oportunidade economicamente viável para a produção de bioetanol (BENJAPHOKEE et al., 2012).

Para avaliar qualitativamente a capacidade fermentativa foram utilizados os seis isolados selecionados no teste de resistência a temperatura, aumentando as possibilidades de se obter isolados com boa utilização de substratos. O teste foi realizado em meio líquido contendo três principais fontes de carbono, glicose, sacarose e galactose. Foi considerado resultado positivo os tubos de ensaio onde a produção de gás pôde ser evidenciada, indicativa de fermentação do substrato. Diferenças na assimilação e na fermentação de compostos de carbono são critérios importantes na taxonomia e identificação de leveduras, pois estes micro-organismos apresentam uma variação diversificada na habilidade de fermentar açúcares. Através dos resultados pode se observar que as fontes de carbono glicose e sacarose foram as

mais utilizadas como substrato para a fermentação, pois foram as que mais geraram fortes fermentações pelos isolados testados. A fonte de carbono galactose foi a que menos gerou forte fermentação, evidenciando que este não seria uma fonte de carbono utilizável em um processo fermentativo para a produção de etanol.

Biofilmes são formas naturais de imobilização de células, na qual atacam suportes sólidos. A formação de biofilme parece ser um mecanismo de adaptação, o que assegura o acesso ao oxigênio durante o processo fermentativo permitindo o crescimento contínuo na presença de oxigênio (ZARA et al., 2010). Devido à imobilização celular causada na formação do biofilme, as células não estarão mais em contato com o mosto fermentativo, não podendo assim utilizar a sacarose, levando a queda do rendimento de etanol. Para verificar a formação de biofilme em superfície de poliestireno foi realizado um teste com os três isolados selecionados mais resistentes (ZFC2, ZFC3 e ZFD4) e com o isolado que apresentou melhor capacidade fermentativa (ZFC4). A quantificação do biofilme foi realizada pelo ensaio de redução do XTT, no qual, a absorbância gerada através da coloração laranja devido à redução do XTT, mede a atividade metabólica do biofilme. Através dos resultados obtidos foi possível observar que os quatro isolados testados formaram biofilme em superfície de poliestireno, o isolado ZFC2 formou biofilme de maior viabilidade e o isolado ZFD4 com menor viabilidade. O método de avaliação de viabilidade por sal de XTT é considerado atualmente um dos padrões para comprovação de formação de biofilmes (Hawser et al. 1998; Nett et al. 2011; Zhou et al. 2012). A linhagem de referência PE-2 foi a que formou biofilme de maior viabilidade em superfície de poliestireno. Mais uma vez uma das características desejável para uma linhagem ideal, que neste caso seria a menor capacidade de desenvolver biofilmes, foi observada no isolado ZFD4. Estudos genéticos comparativos mostraram que células de biofilme crescem mais rapidamente que as células de não biofilmes, (ZARA et al., 2010). Esse resultado é interessante, pois nos canos das dornas de fermentação pode haver a aderência das linhagens produtoras de biofilme, havendo o entupimento desses canos, prejudicando assim o processo de fermentação.

O sequenciamento utilizando o par de *primer* ITS1 e ITS4 para análise de sequência da região do gene rRNA ITS1, 5.8S e ITS2 foi utilizada para confirmação da identificação das linhagem selecionadas, bem como para verificar a relação genética entre as linhagens. O sequenciamento foi realizado somente com os isolados selecionados quanto aos seus perfis de resistência. De acordo com Chen et al., 2001, o tamanho do produto originado da PCR da região ITS1 pode demonstrar a variação intraespécie de leveduras de aproximadamente 2bp e o mesmo pode ser observado quando estudado o tamanho do fragmento dos alelos da região

ITS2, porém quando estudado as duas regiões é possível verificar uma maior diferenciação interespecie e intraespecie. Esta abordagem mostrou-se útil e viável para uma adequada identificação de isolados ideais que atualmente estão em fase sequenciamento dos seus genomas.

A transformação do mosto é um processo fermentativo conduzido por leveduras. A primeira função destas leveduras é a conversão da sacarose através da enzima invertase quebrando em glicose e ácido pirúvico, produzindo etanol e gás carbônico. Assim, após a seleção dos isolados (ZFC2, ZFC3, ZFC4, ZFD4 e a linhagem PE-2) pela verificação da resistência à alta concentração de sacarose, alta temperatura, alto teor de etanol e capacidade fermentativa, eles foram submetidas a um ensaio de fermentação para verificar sua capacidade de biotransformação, ou seja, se estes isolados selecionados além de serem resistentes ao meio fermentativo fossem também bons produtores de etanol. Ao comparar com a linhagem de referência PE-2, o isolado ZFC4 apresentou teor de etanol muito próximo da linhagem de referência. Este produziu 6,4% de etanol, diferenciando em 0,3% de rendimento em relação à linhagem PE-2, que produziu 6,75% de etanol. O isolado ZFD4 apresentou teor de etanol de 4,18% e os isolados ZFC2 e ZFC3, apresentaram os menores valores, que foi de 3,36% e 3,28%, respectivamente. Outro parâmetro a ser estudado no ensaio fermentativo foi o consumo de açúcar pelos isolados selecionados. Os valores foram medidos no início e no final (24 horas) do ensaio fermentativo, observando que o isolado ZFC3 não apresentou boa capacidade de transformação de substrato, pois o valor final do °Brix foi igual a 11. O isolado ZFC2, apresentou um valor final de °Brix = 7.0, sendo considerada boa capacidade de transformação de substrato, porém esse isolado não produziu um alto teor de etanol, podendo considerar então que este isolado deslocou a sua transformação do substrato para outros metabólitos secundários, como glicerol, por exemplo. Os isolados ZFC4 e ZFD4 foram os isolados que mais consumiram sacarose durante todo o ensaio fermentativo, demonstrando que para ser uma levedura ideal, além das resistências dos principais fatores de estresse, deve apresentar um bom rendimento de etanol e também uma boa transformação de substrato.

A levedura que apresenta as melhores características para ser uma iniciadora de processo fermentativo foi o isolado ZFC4, pois não é uma levedura floculante, não produz alta quantidade de sulfeto de hidrogênio, é resistente à alta concentração de sacarose (20%), à alta temperatura, 42°C e quando em contato com 10% de etanol, a resistência vai para 39°C e apresenta boa capacidade de transformação de substrato além de apresentar excelente capacidade fermentativa (rendimentos comparáveis à PE-2).

Neste sentido a estratégia para abrir possibilidades de respostas quanto às causas da redução ou aumento da capacidade fermentativa destes isolados, selecionou-se uma linhagem que não fermenta satisfatoriamente, mas resiste às altas temperaturas e concentrações de etanol. Neste caso inicialmente o isolado ZFD4 (perfil de resistência a 39°C a 12% de etanol e baixo rendimento etanólico com 4,18% v/v) foi utilizado como *tester* e o isolado ZFC4 caracterizado com perfil de resistência a 39°C à 10% de etanol e com bom rendimento etanólico (6,4% v/v) como *driver*. A técnica de RDA foi proposta para buscar o entendimento das diferentes características fenotípicas apresentadas pelos isolados selecionados frente a situações de estresse durante o processo de fermentação através da expressão diferencial de genes relacionados. Para tanto o RDA foi realizado a partir de um ensaio de fermentação. Através do seqüenciamento do produto diferencialmente expresso obtido no ensaio de RDA, foram gerados quatro contigs que resultaram em uma única proteína denominada Homoaconitase que codificada pelo gene *Lys4*. A prevalência da expressão dessa proteína na maioria dos clones sequenciados sugere a relação desta com os fenótipos apresentados pelo isolado testado (ZFD4), pois a homoaconitase é uma enzima catalítica que atua na conversão de homocitrato a homoisocitrato da via biossintética do aminoácido lisina. Estudos mostraram que a presença do aminoácido lisina pode interferir no rendimento total de etanol em um processo fermentativo e essa presença pode também estar relacionada com a resistência a altas concentrações de etanol (GASENT-RAMÍREZ et al., 1997; TANNER et al., 1977; BHATTACHARJEE & SINHA, 1972). Sendo assim, a proteína homoaconitase confirma a diferença do fenótipo encontrado nos isolados selecionados. Pois o isolado usado como *tester* (ZFD4), foi obtido através da coleta de amostra oriunda da dorna de fermentação no final da safra de cana-de-açúcar, apesar desse isolado apresentar ótimas características de resistência frente à alta temperatura e alta concentração de etanol, este apresenta perfil de baixo rendimento de etanol, podendo ter sido adquirido devido às condições adversas do ambiente fermentativo, o que diferencia do isolado usado com *driver* que além de apresentar resistência aos principais fatores, apresenta bom rendimento de etanol, mas foi isolado da amostra da cuba de inóculo, não tendo passado pelos fatores de estresse durante o processo fermentativo. Desta forma a proteína homoaconitase pode estar relacionada com o perfil de baixo rendimento etanólico, pois a super expressão desta, leva conseqüentemente à maior produção do aminoácido lisina, no qual está relacionado com a diminuição da produção de etanol quando presente no meio fermentativo. Portanto a super expressão desta pode a causa da inibição da capacidade fermentativa da linhagem ZFD4. A situação DS1 que inclui o inverso da DS2 está em fase de seqüenciamento.

Assim, o RDA até o momento, foi capaz de mostrar um único produto da expressão diferencial relacionado diretamente com o fenótipo de um isolado, respondendo de forma pontual o motivo da redução do rendimento de etanol do isolado ZFD4, importante para entender como a expressão do gene é controlada pelas leveduras durante as condições de fermentação. Estes dados podem ser úteis para iniciar estudos buscando medidas para o controle do processo, bem como para a construção de novas linhagens industriais ideais.

7 CONCLUSÕES

- Através das coletas realizadas no início e no final da safra de cana-de-açúcar foi possível identificar vinte e oito leveduras *Saccharomyces cerevisiae* de trinta e quatro isolados obtidos.
- As características fenotípicas das leveduras *S. cerevisiae* são favoráveis para a utilização dessas leveduras no setor industrial.
- A técnica de RFLP e sequenciamento da região ITS1, ITS2 e 5.8S utilizada foram úteis para a identificação dos isolados não possibilitou a diferenciação das leveduras *S. cerevisiae*.
- A linhagem ZFC4 foi a mais adequada para utilização no setor alcooleiro.
- A estratégia DS2 foi adequada para elucidar de forma precisa o gene diferencialmente expresso o qual se relacionou diretamente com seu fenótipo e, portanto a metodologia do RDA foi adequada.
- Para a diferenciação genética entre os isolados ZFC4 e ZFD4 estudos comparando seus genomas e RNA totais estão sendo realizados através do sequenciamento realizado no aparelho HiSeqTM (Illumina).

8 BIBLIOGRAFIA

- ABDEL-BANAT, B. M. A.; HOSHIDA, H; ANO, A.; NONKLANG, S.; AKADA, R. High-temperature fermentation: how can processes for ethanol production at high temperatures become superior to the traditional process using mesophilic yeast? **ApplMicrobiolBiotechnol.** v 85. p. 861–867, 2010.
- ALEXANDRE, H., ANSANAY-GALEOTE, V., DEQUIN, S. AND BLONDIN, B. (2001) Global gene expression during short-term ethanol stress in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEBS Lett** 498, 98–103.
- ALVES-BAFFI, M ; SANTOS BEZERRA, CAROLINA ; ARÉVALO-VILLENA, M. ; BRIONES-PÉREZ, A. ; GOMES, E. ; DA-SILVA, R .Isolation and molecular identification of wine yeasts from a Brazilian vineyard.**Annals of Microbiology**, v. 61, p. 75-78, 2011.
- AMORIM, H. V.; LOPES, M. L.; OLIVEIRA, J. V. C.; BUCKERIDGE, M. S.; GOLDMAN, G. H. Scientific challenges of bioethanol production in Brazil. **ApplMicrobiolBiotechnol.** v. 91. p. 1267-1275, 2011.
- AMORIM, H. V.; BASSO, L. C.; ALVES, D. M. G. **Processo de produção de álcool: controle e monitoramento.** Piracicaba: FERMENTEC/FEALQ/ESALQ-USP, 1996.
- AMORIM, H. V.; LEÃO, R. M. **Fermentação alcoólica: ciência e tecnologia.** Piracicaba: Fermentec, p. 448, 2005.
- ANDRADE, E. T.; CARVALHO, S. R. G.; SOUZA, L. F. Programa do proálcool e o etanol no Brasil. **Engevista**, v.11, n.2, p.127-136, dezembro, 2009.
- ANDRIETTA, M. G. S.; ANDRIETTA, S. R.; STECKELBERG, C.; STUPIELLO, E. N. A. Bioethanol – 30 years of Proalcohol. **International Sugar Journal.** Campinas, v.109, n.1299, p.195-200, 2007.
- ARGUESO, J. L.; CARAZZOLLE, M. F.; MIECZKOWSKI, P. A.; DUARTE, F. M.; NETTO, O. V.; MISSAWA, S. K.; GALZERANI, F.; COSTA, G. G.; VIDAL, R. O.; NORONHA, M. F. ; DOMINSKA, M.; ANDRIETTA, M. G.; ANDRIETTA, S. R.; CUNHA, A. F.; GOMES, L. H.; TAVARES, F. C.; ALCARDE, A. R.; DIETRICH, F. S.; MCCUSKER, J. H.; PETES, T. D.; PEREIRA, G. A. Genome structure of a *Saccharomyces cerevisiae* strain widely used in bioethanol production. **Genome Res.** v.19, n. 12, p.2258-70, 2009.
- BAI, F. W., W. A. Andersson and M. Moo-Young, 2008. Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks. **Biotechnol. Adv.**, 26: 89-105.
- BANAT, I. M.; MARCHANT, R. Characterization and potential industrial applications of five novel, thermotolerant, fermentative, yeast strains. **World J. Microbiol.Biotechnol**, v. 11, n.3, p. 304-306, 1992.

BANDARA, A., FRASER, S., CHAMBERS, P., AND STANLEY, G., (2009) “Trehalose promotes the survival of *Saccharomyces cerevisiae* during lethal ethanol stress, but does not influence growth under sublethal ethanol stress.” **FEMS yeast research** 9(8): 1208-16.

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. 1155-1163, 2008.

BHATTACHARJEE J.K., SINHA A.K. Relationship among the genes, enzymes, and intermediates of the biosynthetic pathway of lysine in *Saccharomyces*. **Molecular And General Genetics Mgg.** Volume 115, Number 1 (1972).

BENJAPHOKEE S., HASEGAWA D., YOKOTA D., ASVARAK T., AUESUKAREE C., SUGIYAMA M., KANEKO Y., BOONCHIRD C., HARASHIMA S. Highly efficient bioethanol production by a *Saccharomyces cerevisiae* strain with multiple stress tolerance to high temperature, acid and ethanol. **N Biotechnol**; v. 3, p.379-86, 2012.

BIRCH, R. M. and WALKER, G. M. (2000) Influence of magnesium ions on heat shock and ethanol stress responses of *Saccharomyces cerevisiae*. **Enzyme Microb Technol** 26, 678–687.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. AGE - Assessoria de Gestão Estratégica. Projeções do agronegócio: mundial e Brasil. Brasília, 2005. Disponível em: <http://www.fasul.edu.br/caaf/artigos/3-Comercializacao_E_MercadosMapa_Resumo_Executivo_Cenarios_Do_Agronegocio.pdf>. Acesso em: 3 de outubro de 2010.

BUCHNER, J. (1996) Supervising the fold: functional principles of molecular chaperones. **FASEB J.** 10: 10–19.

CECCATO-ANTONINNI, R. S. Biotechnological implications of filamentation in *Saccharomyces cerevisiae*. **BiotechnolLett.** v. 30, p. 1151-1161, 2008.

CHANDLER, M.; STANLEY, G. A.; ROGERS, P. and CHAMBERS, P. (2004) A genomic approach to defining the ethanol stress response in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Ann Microbiol** 54, 427–454.

CHI, Z., ARNEBORG, N.: Relationship between lipid composition, frequency of ethanol-induced respiratory deficient mutants, and ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. **J Appl Microbiol** 1999,86:1047-1052.

CORTEZ, L. A. B., Coordenador. Bioetanol de cana-de-açúcar: Pesquisa e desenvolvimento para produtividade e sustentabilidade: Engenharia agrícola. São Paulo: Blucher, 2010.

CRABTREE, H. G. **Observations on the carbohydrate metabolism of tumors.** 1929.

Crowe J. H., (2008) Trehalose and anhydrobiosis. **J Exp Biol** 211:2899-2900.

- DEAK, T. Methods for the rapid detection and identification of yeasts in foods. **Trends in Food Science & Technology**. v. 6, n. 9, p. 287-292, SEP 1995 1995. ISSN 0924-2244.
- DINH, T. N., NAGAHISA, K., YOSHIKAWA, K., HIRASAWA, T., FURUSAWA, C., SHIMIZU, H.: Analysis of adaptation to high ethanol concentration in *Saccharomyces cerevisiae* using DNA microarray. **Bioprocess BiosystEng** 2009,32:681-688.
- EDGARDO, A., CAROLINA, P., MANUEL, R., JUANITA, F., JAIME, B. (2008). Selection of thermo tolerant yeast strains *Saccharomyces cerevisiae* for bioethanol production. **Enzyme Microbiol. Technol.** 43: 120-123.
- ELEUTHERIO, E. C. A.; RIBEIRO, M. J. S.; PEREIRA, M. D.; MAIA, F. M.; PANEK, A. D. Effect of trehalose during stress in a heat-shock resistant mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochem.Mol. Biol. Int.** v. 36, n. 6, p. 1217-1223, 1995.
- EWING, B., L. HILLIER, M. WENDL, AND P. GREEN. 1998. Base-calling of automated sequencer traces using Phred. I. **Accuracy assessment. Genome Res.**
- FIEDUREK J, ET AL. (2011) Selection and adaptation of *Saccharomyces cerevisiae* to increased ethanol tolerance and production. **Pol J Microbiol** 60(1):51-8.
- FIGUEIREDO, C. M. Análise molecular da floculação e formação de espuma por leveduras utilizadas na produção industrial de álcool combustível no Brasil. 2008. 71 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2008.
- FOLCH-MALLOL, J. L.; GARAY-ARROYO, A.; LLEDÍAS, F.; ROBLES, A. A. C. La respuesta a estrés em La levadura *Saccharomyces cerevisiae*. **Rev. Latinoam. Microbiol.** v. 46, p. 24-46, 2004.
- GASENT-RAMÍREZ J.M., BENÍTEZ T. Lysine-overproducing mutants of *Saccharomyces cerevisiae* baker's yeast isolated in continuous culture. **Appl Environ Microbiol.** 1997.
- GATTÁS, E. A. L., TININIS, C. R. C. S. & LALUCE C (2002) Kit econômico de aplicação na rotina industrial para os ensaios de glicerol, malato e etanol. Vol. BR n. PI 0205552 (Fapesp).
- GIUDICI, P. & KUNKEE, R. (1994) The Effect Of Nitrogen Deficiency And Sulfur-Containing Amino-Acids On The Reduction Of Sulfate To Hydrogen-Sulfide By Wine Yeasts. **American Journal of Enology and Viticulture** 45: 107-112.
- GLOVER, J. R.; LINDQUIST, S. Hsp104, Hsp70, and Hsp40: A novel chaperone system that rescues previously aggregated proteins. **Cell.** v. 94, n. 1, p, 73-82, 1998.
- GODOY, A.; AMORIM H. V.; LOPES, M. L.; OLIVEIRA, A. J. (2008) Continuous and batch fermentation processes: advantages and disadvantages of these processes in the Brazilian ethanol production. **Int Sugar J** 110:175–181.

- GOLDBERG, A., 2003. Protein degradation and protection against misfolded or damaged proteins. **Nature** 426, 890–899.
- GUILLAMÓN, J. M.; SABATÉ, J.; BARRIO, E.; CANO, J.; QUEROL, A. Rapid identification of wine yeast species based on RFLP analysis of the ribosomal internal transcriber spacer (ITS) region. **Arch. Microbiol.** v. 169, n. 5, p. 387–392, 1998.
- HAAS, A. L. Regulating the regulator: Rsp5 ubiquitinates the proteasome. **Mol Cell** 2010;38(5):623–4.
- HALLSWORTH, J. E., NOMURA, Y. AND IWAHARA, M. (1998) Ethanol-induced water stress and fungal growth. *J Ferment Bioeng* 86, 451–456.
- HAWSER, S.P., H. NORRIS, C.J. JESSUP and M.A. GHANNOUM. 1998. Comparison of a 2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-5-[(phenylamino)carbonyl]-2h-tetrazolium hydroxide (xtt) colorimetric method with the standardized national committee for clinical laboratory standards method of testing clinical yeast isolates for susceptibility to antifungal agents. **J Clin Microbiol** 36, no. 5: 1450-2.
- HIRASAWA, T. et al. (2007) Identification of target genes conferring ethanol stress tolerance to *Saccharomyces cerevisiae* based on DNA microarray data analysis. **J Biotechnol** 131(1):34-44.
- HOHMANN, S. & MAGER, W. H. (2003) *Yeast Stress Responses*. Berlin:Springer-Verlag.
- HU, X. H.; WANG, M. H.; TAN, T.; LI, J. R.; YANG, H.; LEACH, L.; ZHANG, R. M. and LUO, Z. W. (2007) Genetic dissection of ethanol tolerance in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Genetics** 175, 1479–1487.
- HUBANK, M.; SCHATZ, D. G. Identifying differences in mRNA expression by representational difference analysis of cDNA. **Nucleic Acids Res**, v. 22, p. 5.640-5.648, 1994.
- KATO-MAEDA, M.; GAO, Q.; SMALL, P. M. Microarray analysis of pathogens and their interaction with hosts. **Cell. Microbiol.**, v. 3, p. 713-719, 2001.
- KORABECNÁ, M.; LISKA, V. & FAJFRLÍK, K. (2003) Primers ITS1, ITS2 and ITS4 detect the intraspecies variability in the internal transcribed spacers and 5.8S rRNA gene region in clinical isolates of fungi. **Folia Microbiol (Praha)** 48: 233-238.
- LALUCE, C.; TOGNOLLI, J. O.; OLIVEIRA, K. F.; SOUZA, C. S.; MORAIS, M. R. Optimization of temperature, sugar concentration, and inoculum size to maximize ethanol production without significant decrease in yeast cell viability. **Appl Microbiol Biotechnol** (2009) 83:627–637.

- LASZLO, A. Evidence for two states of thermotolerance in mammalian cells. **Int. J. Hyperther.**, v. 4, n. 5, p. 513-526, 1988.
- LEGENDRE, M., N. Pochet, T. PAK and K. J. VERSTREPEN, 2007 Sequence-based estimation of minisatellite and microsatellite repeat variability. **Genome Res.** 17: 1787–1796.
- LI, B. Z., et al. (2010) Genome-wide transcriptional analysis of *Saccharomyces cerevisiae* during industrial bioethanol fermentation. **J Ind Microbiol Biotechnol** 37(1):43-55.
- LINDQUIST, S. Heat shock proteins and stress tolerance in microorganism. **Curr, Opin. Genet. Dev.** v. 2, n. 5, p. 748-755, 1992.
- LISITSYN, N.; LISITSYN, N.; WIGLER, M. Cloning the differences between two complex genomes. **Science.** v. 259, p. 946-951, 1993.
- LOPANDIC K, ZELGER S, BÁNSZKY L K, ELISKASES-LECHNER F & PRILLINGER H (2006) Identification of yeasts associated with milk products using traditional and molecular techniques. **Food Microbiol** 23: 341–350.
- LOPES, ML (2010) 30 years of fuel ethanol production in Brazil. Identification and selection of dominant industrial yeast strains. In: 12th International Conference on Culture Collections. Biological resources centers: gateway to biodiversity and services for innovation in biotechnology Florianópolis, SC. Available from: <http://www.iccc12.info/presentations/mlopes.pdf>.
- LUCERO, P., PEÑALVER, E., MORENO, E. and LAGUNAS, R. (2000) Internal trehalose protects endocytosis from inhibition by ethanol in *Saccharomyces cerevisiae*. **Appl Environ Microbiol** 66, 4456–4461.
- LUDWIG KM, OLIVA-NETO P & ANGELIS DF (2001) Quantificação da floculação de *Saccharomyces cerevisiae* por bactérias contaminantes da fermentação alcoólica. **Ciênc. Tecnol. Alim.**, 21:63-68.
- MA, M.; LIU, Z. L. 2010. Mechanisms of ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. **Appl Microbiol Biotechnol** 87:829–845.
- MACEDO, I. D. Greenhouse gas emissions and energy balances in bio-ethanol production and utilization in Brazil (1996). **Biomass & Bioenergy.** 1998;14:77-81.
- MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M. *Biology of Microorganisms*. 11th ed. Upper Saddle River, NJ: Pearson Education, 2006.
- MAHUD, S. A., HIRASAWA, T.; SHIMIZU, H. Differential importance of trehalose accumulation in *Saccharomyces cerevisiae* in response to various environmental stresses. **J. Biosci. Bioeng.** v.109, p. 262-266, 2010.
- MAISNIER-PATIN S, et al. Genomic buffering mitigates the effects of deleterious mutations in bacteria. **Nat Genet.** 2005; 37:1376-1379.

- MANSURE JJC, PANEK AD, CROWE LM, CROWE JH: Trehalose inhibits ethanol effects on intact yeast cells and liposomes. **Biochim Biophys Acta** 1994,1191:309-316.
- MARTINS C. V. B. 1997. Biologia e fusão e protoplastos de leveduras flocculantes e H₂S. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" - Universidade de São Paulo. Piracicaba, Brasil. 95 p.
- MARULLO, P.; MANSOUR, C.; DUFOUR, M.; ALBERTIN, W.; SICARD, D.; BELY, M.; et al. Genetic improvement of thermo-tolerance in wine *Saccharomyces cerevisiae* strains by a backcross approach. **FEMS Yeast Res** 2009;9(8):1148–60.
- MEADEN, P. G.; ARNEBORG, N.; GULDFELDT, L. U.; SIEGUMFELDT, H. and JAKOBSEN, M. (1999) Endocytosis and vacuolar morphology in *Saccharomyces cerevisiae* are altered in response to ethanol stress or heat shock. **Yeast** 15, 1211–1222.
- MELO, G. V. P. Use of specific PCR primers to identify three important industrial species of *Saccharomyces* genus: *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces bayanus* and *Saccharomyces pastorianus*. **Lett Appl. Microbiol.** v. 51, n. 2, p. 131-137, 2010.
- MISHRA, P. AND PRASAD, R. (1989) Relationship between ethanol tolerance and fatty acyl composition of *Saccharomyces cerevisiae*. **Appl Microbiol Biotechnol** 30, 294–298.
- MOLLER, E. M.; BAHNWEIG, G.; SAMPERMANN, H.; GEIBER, H. H. A simple and efficient protocol for isolation of high molecular weight DNA from filamentous fungi, fruit bodies and infected plant tissues. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 20, n. 22, p. 6115-6116, 1992.
- MORIMURA, S.; LING, Z. Y.; KIDA, K. Ethanol production by repeat-batch fermentation at high temperature in a molasses medium containing a high concentration of total sugar by a thermotolerant flocculating yeast with improved salt-tolerant. **J. Ferment. Bioeng.** v. 83, n. 3, p. 271-274, 1997.
- MUKHTAR K, ASGHER M, AFGHAN S, HUSSAIN K, ZIA-UL-HUSSAIN S. (2010) Comparative study on two commercial strains of *Saccharomyces cerevisiae* for optimum ethanol production on industrial scale. **J Biomed Biotechnol** 2010:419586.
- NETT, J.E., M.T. CAIN, K. CRAWFORD AND D.R. ANDES. 2011. Optimizing a candida biofilm microtiter plate model for measurement of antifungal susceptibility by tetrazolium salt assay. **J Clin Microbiol** 49, no. 4: 1426-33.
- OGAWA Y, NITTA A, UCHIYAMA H, IMAMURA T, SHIOMOI H, ITO K. 2000. Tolerance mechanism of the ethanol-tolerant mutant of sake yeast. **J Biosci Bioeng** 90:313–320.
- OLIVEIRA, M. C. F. L. DE; PAGNOCCA, F. C. Aplicabilidade de meios seletivos empregados na indústria cervejeira para detecção de leveduras selvagens em unidades sucro-

alcooleiras. In: SIMPOSIO NACIONAL DE FERMENTAÇÃO, 8., 1988. São Lourenço. Anais, São Lourenço: SBM, 1988.p.78-81.

OLIVEIRA, V. A.; VICENTE, M. A.; FIETTO, L. G.; CASTRO, I. M.; COUTRIM, M. X.; SCHÜLLER, D; ALVES, H. ; CASAL, M. SANTOS, J. O.; ARAUJO, L. D.; SILVA, P. H. A.; BRANDÃO, R. L. Biochemical and molecular characterization of *Saccharomyces cerevisiae* Strains Obtained from sugar-cane juice fermentations and their impact in cachaça production. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 74, n° 3, p. 693-701, 2008.

OSTERGAARD, S.; OLSSON, L.; NIELSEN, J. Metabolic Engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiol.Mol. Biol.** v. 64, n. 1, p. 34-50, 2000.

PASTORIAN, K.; HAWEL, L.; BYUS, C. V.; Optimazation of cDNA representational diffrence analysis for identification of differentially expressed mRNAs.; **Anal Biochem**, 2000.

PELCZAR, M.; REID, R.; CHAN, E. C. S. (1980) **Microbiologia**. vol. 1, 1.ed. São Paulo, McGraw-Hill do Brasil.

PLESSET, J., PALM, C. AND MCLAUGHLIN, C. S. (1982) Induction of heat shock proteins and thermotolerance by ethanol in *Saccharomyces cerevisiae*. **BiochemBiophys Res Commun** 108, 1340–1345.

PORTO S. I., SILVA A. C. P., BESTETTI C. R., BRESSAN FILHO A., OLIVEIRA C. C., OLIVIERA J. B., NEGREIROS J. C., ALMEIDA M. B. A., ANDRADE R. A. (2009) Braziliancropassessment: sugarcane 2009/2010. Third estimate. 17p. CONAB, Brasilia, DF. Available from: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/fcff266126165d8ec2e9915c5d77d322..pdf>.

RAINIERI S., ZAMBONELLI C. AND KANEKO Y. 2003. *Saccharomyces sensu stricto*: systematics, genetic diversity and evolution. **J BiosciBioeng** 1, 1–9.

RENEWABLE FUELS ASSOCIATION. Ethanol industry statistics 2010. Available from: <http://www.ethanolrfa.org/pages/statistics>. (2011 Apr 04).

ROSE, A. H. (1980) Industrial importance the *Saccharomyces cerevisiae*.(SKINNER FA).

ROSSOUW D., OLIVARES-HERNANDES R., NIELSEN J. & BAUER F. F. (2009) Comparative transcriptomic approach to investigate differences in wine yeast physiology and metabolism during fermentation. **Appl Environ Microbiol** 75: 6600-6612.

SAJBIDOR, J., CIESAROVÁ, Z. AND SMOGROVICOVÁ, D. (1995) Influence of ethanol on the lipid content and fatty acid composition of *Saccharomyces cerevisiae*. **Folia Microbiol (Praha)** 40, 508–510.

SANGER F., S. NICKLEN AND A. R. CHASE. 1977. DNA Sequencing with Chain Terminating Inhibitors. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**. 74(12): 5463 – 5468.

SHAHSAVARANI, V.; SUGIYAMA, M.; KANEKO, Y.; CHUENCHIT, B.; HARASHIMA, S. Superior thermotolerance of *Saccharomyces cerevisiae* for efficient bioethanol fermentation can be achieved by overexpression of RSP5 ubiquitin ligase. **Biotechnology Advances**. 2011.

SINGER, M. A., LINDQUIST, S., 1998. Thermotolerance in *Saccharomyces cerevisiae*: the yin and yang of trehalose. **Ophthalmic Genet**. 16 (1),460–468.

SNOWDEN C, SCHIERHOLTZ R, POLISZCZUK P, HUGHES S & VAN DER Merwe G (2009) ETP1 / YHL010c is a novel gene needed for the adaptation of *Saccharomyces cerevisiae* to ethanol. **FEMS Yeast Res** 9: 372–380.

SOUZA, A. P. A cana-de-açúcar e as mudanças climáticas: efeitos de uma atmosfera enriquecida em CO₂ sobre o crescimento, desenvolvimento e metabolismo de carboidratos de *saccharum*ssp. Dissertação de mestrado, USP, SP, 2007.

SOUZA, C. S. Avaliação da produção de etanol em temperaturas elevadas por uma linhagem de *S. cerevisiae*. Tese de Doutorado. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia (USP), Instituto Butantan (IPT), São Paulo, SP, Brasil, 2009.

STAMBUK B. U., DUNN B., ALVES JUNIOR S. L., DUVAL E. H., SHERLOCK G. (2009) Industrial fuel ethanol yeasts contain adaptive copy number changes in genes involved in vitamin B1 and B6 biosynthesis. **Genome Res** 19:2271–2278.

STANLEY, D.; CHAMBERS P. J.; STANLEY A. G.; BOMEMAN A.; FRASER S.; Transcriptional changes associated with ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. **Appl Microbiol Biotechnol**. v. 88, n. 1, p.231-9, 2010.

STANLEY, G. A., HOBLEY, T. J. and PAMMENT, N. B. (1997) Effect of acetaldehyde on *Saccharomyces cerevisiae* and *Zymomonas mobilis* subjected to environmental shocks. **Biotechnol Bioeng**, 53, 71–78.

STROPPIA, C. T. Dinâmica populacional de leveduras caracterizadas por eletrocariótipos e desempenho fermentativo em processos de fermentação alcoólica. 2002. Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2002.

SUZZI G., ROMANO P. & ZAMBONELLI C. (1984) Flocculation Of Wine Yeasts - Frequency, Differences, And Stability Of The Character. **Canadian Journal of Microbiology** 30: 36-39.

TAKAGI H., TAKAOKA M., KAWAGUCHI A., KUBO Y.: Effect of L-proline on sake brewing and ethanol stress in *Saccharomyces cerevisiae*. **Appl Environ Microbiol** 2005, 71:8656-8662.

TANNER R.D., SOUKI N.T., RUSSELL R.M. A fermentation process for producing both ethanol and lysine-enriched yeast. **Biotechnol Bioeng**. 1977.

TANGHE, A., PRIOR, B., THEVELEIN, J.M., 2006. Yeast responses to stresses. In: Rosa, C. A., Péter, G. (Eds.), **Biodiversity and ecophysiology of yeasts**. Springer-Verlag, Heidelberg, p. 175–195.

TILMAN D., HILL J., NELSON E., POLASKY S., TIFFANY D. Environmental, economic, and energetic costs and benefits of biodiesel and ethanol biofuels. **ProcNatlAcadSci USA**. 2006; 103:11206-10.

TORIJA, M. J.; ROZES, N.; POBLET, M.; GUILLON, J. M.; MAS, A. Effects of fermentation temperature on the strain population of *Saccharomyces cerevisiae*, **Int. J. Food Microbiol.** v. 8. p. 47-53, 2003.

TREVISOL, E. T.; PANEK A. D.; MANNARIANO S. C.; ELEUTHERIO E. C. A. The effect of trehalose on the fermentation performance of aged cells of *Saccharomyces cerevisiae*. **ApplMicrobiolBiotechnol.** v. 90, n.2, p.697-704, 2011.

UNIÃO DA INDÚSTRIA DE CANA-DE-ACUCAR. - UNICA .Estatísticas da produção de álcool no Brasil 1990/91-2006/2007. Disponível em: < www.unica.com.br. Acesso em: 4 de outubro de 2010.

VAN DEN BRINK, J.; CANELAS, A. B.; VAN GULIK, W. M.; PRONK, J. T.; HEIJNEN, J. J. ; DE WINDE J. H.; DARAN-LAPUJADE, P. Dynamics of glycolytic regulation during adaptation of *Saccharomyces cerevisiae* to fermentative metabolism. **App Environ. Microbiol.** v.74, n. 18, p. 5710-5723, 2008.

WALKER, M. W. Yeast Growth. In: WALKER, M. W. (Ed.). **Yeast physiology and biotechnology**. Chichester: John Wiley & Sons, 1998. p. 101-202.

WHITE, T. J; BRUNS, T.; LEE, S; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungi ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis M. A., Gelfand D. H., Sninsky J. J., White T. J. (eds) PCR protocols. a guide to methods and applications. San Diego: Academic Press, 1990. p. 315–322.

WILLIAMS N. GENOME PROJECTS: Yeast Genome Sequence Ferments New Research. **Science**, 1996;272: 481.

WU H., ZHENG X., ARAKI Y., SAHARA H., TAKAGI H., SHIMOI H.: Global geneexpression analysis of yeast cells during sake brewing. **Appl EnvironMicrobiol** 2006, 72:7353-7358.

YAMAMATO, M.; WAKATSUKI, T.; HADA, A.; RYO, A. Use of serial analyses of geneexpression (SAGE). **J. Immunol. Methods**, v. 250, p. 45-66, 2001.

YOU KM, ROSENFELD CL, KNIPPLE DC: Ethanol tolerance in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* is dependent on cellular oleic acid content. **Appl Environ Microbiol** 2003, 69:1499-1503.

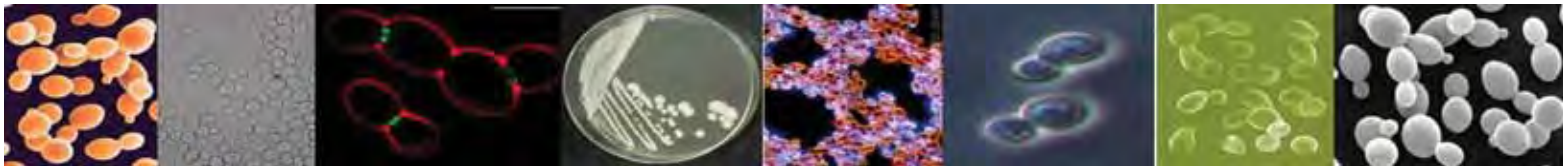
ZARA S., GROSS M. K., ZARA G., BUDRONI M. & BAKALINSKY A. T. (2010) Ethanol-independent biofilm formation by a flor wine yeast strain of *Saccharomyces cerevisiae*. **Appl Environ Microbiol** 76: 4089-4091.

ZHAO X. Q., BAI F. W. 2009. Mechanisms of yeast stress tolerance and its manipulation for efficient fuel ethanol production. **J Biotechnol** 144:23–30.

ZHOU, Y., G. WANG, Y. LI, Y. LIU, Y. SONG, W. ZHENG, N. ZHANG, X. HU, S. YAN and J. JIA. 2012. In vitro interactions between aspirin and amphotericin b against planktonic cells and biofilm cells of *C. Albicans* and *C. Parapsilosis*. **Antimicrob Agents Chemother**.

ZUZUARREGUI A., MONTEOLIVA L., GIL C., DEL OLMO M.: Transcriptomic and proteomic approach for understanding the molecular basis of adaptation of *Saccharomyces cerevisiae* to wine fermentation. **Appl Environ Microbiol** 2006, 72:836-847.

CAPÍTULO II



17-May-2012

Dear Dr. Ana Marisa Fusco-Almeida,

Thank you for submitting the manuscript Study of the main factors for the characterization of yeast *Saccharomyces cerevisiae* for proper performance of ethanol production, by Silva, Danielle; Danieli, Flavia; Oliveira, Haroldo; Strohmayer, Natalia; Silva, Warley; Gattas, Edwil; Valentini, Sandro; Mendes-Giannini, Maria José; Zanelli, Cleslei; Fusco-Almeida, Ana Marisa, to our journal. The manuscript has now been uploaded to Manuscript Central.

As the submitting author, you will receive future communications via e-mail. Your manuscript number is FEMSLE-12-05-0434.

Please save the word processing and graphics files from your manuscript. You may need them later again for production purposes if your manuscript is accepted.

You can keep track of your manuscript by logging on periodically to our site (<http://mc.manuscriptcentral.com/femsle>), where the status will be displayed in your Submitting Author Center.

Again, thank you for the submission of your manuscript.

Best wishes

Dr. Luaine Bandounas
FEMS Editorial Administrator

On behalf of Chief Editor,
Dr Jeff Cole
FEMS Microbiology Letters

Note: It is the responsibility of the corresponding author (or submitting author if different) that all authors of this submitted manuscript are informed about its submission and its subsequent progress.

Study of the main factors for the characterization of yeast *Saccharomyces cerevisiae* for proper performance of ethanol production

Carvalho, DFS^a, Danieli, F^a, Oliveira, HC^a, Lourencetti, NMS^a, Xavier, WS^a, Gattas, EAL^c, Valentini, SR^b, Mendes-Giannini, MJS^a, Zanelli, CF^b, Ana Fusco-Almeida, M^{a1}

^aDepartamento de Análises Clínicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, UNESP, Araraquara, São Paulo, Brazil, CEP 14801-902

^bDepartamento de Ciências Biológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, UNESP, Araraquara, São Paulo, Brazil, CEP 14801-902

^cDepartamento de Alimentos e Nutrição, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, UNESP, Araraquara, São Paulo, Brazil, CEP 14801-902

Abstract

Bio-ethanol production by yeast is a growing industry due to energy and environmental demands. Considering the importance of bioethanol to the national economy is important to know the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, as well as various forms of stress they may suffer, their responses, types of processes of fermentation, thus, we tested the resistance of the isolates the main factors of stress (osmotic, thermal and ethanol) and the ability to produce ethanol. To somewhat of a crop of cane sugar were isolated 34 yeasts from the vat and a tank of fermentation of the plant. These, 28 isolates were identified as *Saccharomyces cerevisiae* from PCR and PCR-RFLP. Three isolates were characterized as resistant to high concentration of sugar, temperature and ethanolic. However, only the isolated ZFC4 can be considered as a good inoculum to start a fermentative process for the production of ethanol because it has a high ethanol yield and greater resistance to high temperature and high ethanol concentrations and proved to be more tolerant than the reference strain of Pe-2.

^{1 1} Corresponding author: Ana Marisa Fusco Almeida

Tel: +55 (16) 3301-5715

Address: R. Expedicionários do Brasil, 1621

Araraquara – São Paulo – Brazil

CEP – 14801-902

E-mail: ana.marisa@uol.com.br¹

1. Introduction

Energy crises and environmental concerns are making bioethanol an attractive renewable fuel source (Amorim & Leão, 2005). Alcohol fermentation has been widely studied owing to its economic relevance in beverage, chemical and biofuel industries. The fermentation process for industrial fuel alcohol production is a complex environment involving a frequent succession of different yeast strains and species (Basílio, *et al.*, 2008) and *Saccharomyces cerevisiae* is widely applied in industrial fermentation for bioethanol production (Bai, *et al.*, 2008).

The methods most frequently used for the identification of yeasts are based on morphological and physiological characteristics. All of these techniques are of limited potential, however, indicating that phenotypic characterization is not sufficient for an unambiguous identification of yeast species. Information about the biochemical activity is of value in the physiological characterization of yeast of importance for biotechnology, especially in the differentiation of species involved in fermentative processes (Lopandic, *et al.*, 2006).

The methodology used to identify yeasts based on morphology, biochemical characteristics and sexual reproduction requires the evaluation of 70–90 tests to obtain the correct species identification. This process is complex, laborious and time consuming (T, Deak, 1995).

Molecular techniques have been developed as an alternative to traditional techniques for the identification and characterization of yeasts (Bernardi, *et al.*, 2008). Different approaches, such as genetic analysis, PCR with species-specific primers, restriction analysis of PCR products (PCR-RFLP) of ribosomal DNA regions, which includes the internal transcribed spacer and the 5.8S rDNA (ITS-5.8S region) and sequence analysis of the ITS-5.8S region (Guillamon, *et al.*, 1998; Martorell, *et al.*, 2006; de Melo Pereira, *et al.*, 2010).

Successful performance of alcoholic fermentation, however, depends on the ability of the yeast strains used to cope with a number of stress factors occurring during the process (Hirasawa, *et al.*, 2007).

In recent years, several research works have been carried out to determine the behavior of the yeast population in units of industrial fermentation to produce ethanol.

Yeast cells used for industrial fermentations are subject to wide variations in diverse environmental factors, such as sugar concentrations, ethanol concentration, nitrogen resource, pH, and osmotic pressure. Among these, the stress induced by increasing amounts of ethanol, accumulating to toxic concentrations during ethanol fermentation, is the major factor responsible for decrease in the yields of ethanol production and, ultimately, for stuck fermentations (Gibson, *et al.*, 2007). Thus, yeast strains that can endure stress imposed by high ethanol concentrations are highly desirable.

Therefore, the development of yeast strains should take into account the characteristics of dominance and persistence through the fermentation process and high yields of ethanol production. The present study was conducted to select the best ethanol-producing yeast strains from our collection, to improve yeast fermentation performance by adaptation.

2. Material and methods

2.1. Yeast strains

The Pe-2 strain, isolated from sugarcane in Brazil in 1994 and commercialized by Fermentec, was used as a control strain. The microbiological samples used in this study were isolated from the vat and the tank of fermentation at the beginning (05-2010) and at the end (11-2010), a sugarcane plant in the region of Araraquara, Sao Paulo state.

2.2. Isolation of strains from the fermentation process

Samples were collected in sterile 500 ml flasks, transported to the laboratory in the ice bath and processed within 5 h. Single colonies demonstrating macroscopic and microscopic characteristics of yeasts were isolated after consecutive isolation procedures onto YEPD agar (Yeast extract 1%, Peptone 2%, glucose 2%, agar 2%) added of chloramphenicol (0.025%) and incubated at 32°C for 24-48 hours. For short term storage, the isolated colonies were cultivated on YEPD agar slant, grown at 33°C for 24-48 hours and stored at 2-8°C.

2.3. Identification of *Saccharomyces cerevisiae*

2.3.1 Amplification of genomic DNA by the Polymerase Chain Reaction (PCR)

The amplification reactions were performed in a final volume of 25 µL MasterMix containing 12.5 µl (2.0 x) (Fermentas®), 25 pmol primer Scho-F (5'-GTTAGATCCCAGGCGTAGAACAG - 3') and Scho-R (5'-GCGAGTACTGGACCAAATCTTATG - 3') (IDT) and 50 ng of genomic DNA from yeast (de Melo Pereira, *et al.*, 2010).

2.3.2. RFLP - PCR (Polymerase Chain Reaction - Analysis of the polymorphism of restriction fragments of genomic DNA)

The amplification reactions were performed in a final volume of 50 µL containing 25 pmol of each primer ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') and ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') according to (WHITE, *et al.*, 1990), 50 ng Yeast genomic DNA and 25 µL of a solution Fermentas MasterMix® (2.0X).

According (Guillamon, *et al.*, 1998), the reaction of restriction of the PCR product of primers ITS1 and ITS4 (Sigma®) was performed in final volume of 20 µL, 2 µL of buffer containing enzyme (10X), 0.2 µL BSA, 7 µL

of the PCR product and 0.5 μL of enzyme *HaeIII*, *HinfI* e *CfoI* (Promega®). The reactions were incubated at 37°C for four hours.

2.5. Characterization of strains of *Saccharomyces cerevisiae*

2.5.1. Test of flocculation

The isolates of *S. cerevisiae* were incubated in test tubes containing approximately 10 ml of liquid YEPD medium and incubated at 28°C for 48 hours. Beyond the period of incubation, the culture deposited in the bottom of the tube was homogenized with culture medium in a vortex mixer and the evaluation was the visualization of flakes suspended in culture medium, as proposed by Suzzi *et al.* (1984).

2.5.2. Test of production of hydrogen sulfide (H_2S)

The isolates of *S. cerevisiae* were spread on Petri plates containing content LA agar (Glucose 4%, Yeast extract 0,5%, peptone 0,3%, ammonium sulfate 0,02%, neutral lead acetate 0,1%, agar 2%) were incubated at 30°C for 10 days. The YEPD solid medium was used as control (Ono, *et al.*, 1991).

2.6. Screening of *S. cerevisiae* strains

2.6.1. Test of sensitivity to high concentration of sugars

To verify the effect of stress condition in the growth of micro-organisms, strain reference Pe-2 and the yeasts isolated, were spread in solid YEPD medium at 37°C for 72 hours. The yeast isolates grown at 37°C were transferred in on solid basic medium containing 20% (w/v) glucose and incubated at 30°C for 72 hours and the isolates who be able to grow under this condition were spread in solid medium containing 20% (w/v) sucrose at 30°C in 72 hours.

2.6.2. Test of temperature sensitivity

The yeasts isolated were grown at 25°C in 4 ml of YEPD broth to about $1-2 \times 10^7$ cells/ml. After centrifugation at 3,000 X g for 1 minute and remove the culture medium, cells were suspended in 1X PBS at a concentration of 2.5×10^8 cells/ml. Of the suspension, 200 μL were transferred to a 96 wells microplate. The suspension was serially diluted (1:10) in PBS 1X. Using a multichannel pipettor, 2 μL of the original suspension and dilutions were applied in YEPD solid medium in which the plates were incubated at 25°C, 40 °C, 42 °C, 44 °C and 46 °C for 48 hours. After growing the plates were scanned for archiving the results.

2.6.3. Test sensitivity to ethanol (10% and 12%)

The yeasts isolated were grown at 25 °C in 4 ml of YEPD broth to about $1-2 \times 10^7$ cells/ml. After centrifugation at 3,000 X g in 1 minute and remove the culture medium, cells were suspended in 1X PBS at a concentration of 2.5×10^8 cells/ml. Of the suspension, 200 μl were transferred to a 96 wells microplate. The suspension was serially

diluted (1:10) in 1x PBS. Using a multichannel pipettor, 2 μL of the original suspension and dilutions were applied in YEPD solid medium with 10% and 12% ethanol, at temperatures of 25 °C, 38 °C, 39°C and 40°C for 48 hours. After growing the plates were scanned for archiving the results.

2.6.4. *Qualitative test of the fermentative capacity*

The test was performed fermentative capacity according to VAUGHAN-MARTINI & MARTINI, (1993), as a preliminary analysis of fermentation. The test was performed with the yeasts isolates of *S. cerevisiae* (ZFC2, ZFC3, ZFC4, ZFC5, ZFD3 and ZFD4) that were selected by means of sensitivity tests. To verify the ability of each isolate fermentation, an inoculum was prepared and added to glass test tubes with screw cap, identified previously, containing within it Durham tubes and 10 ml of liquid medium basic with added 2% glucose, 2% sucrose and 2% galactose. The tubes were incubated at 30°C for 24 hours and were observed for growth of yeasts, turbidity of the medium and the formation of gas produced.

2.6.5. *Evaluation of the capacity of biofilms strains of Saccharomyces cerevisiae*

From a new culture was done inoculum of 10^7 cells/ml in 1X PBS and have been deposited 100 μL of inoculum in 96 well plates. The plate was maintained for 4 hours in an oven at 32°C. Then the medium was carefully removed and added to sterile medium YNB (Yeast Nitrogen Base) 1X and maintained at rest at 32°C. This experiment was performed in 162, 96 and 72 hours, but better results were observed in 72 hours. The quantification of the biofilm was made by reduction of the XTT assay. A solution was prepared of 0.5 mg/ml XTT in PBS, was added the final concentration of menadione 25 $\mu\text{M}/\text{ml}$. In biofilm which has been previously washed twice with PBS, were added 30 μL solution of XTT-menadione and the plates were incubated for 2 hours at 32°C. The reduction of XTT produces an orange color corresponding to the metabolic activity of biofilms; this activity was measured by spectrophotometer 492 nm.

2.6.6. *Fermentation testing of isolates selected*

The fermentation test was performed according to Basilio *et al.* (2008), in which the pre-cultures were inoculated into falcon tube 50 ml containing liquid YEPD and incubated for 16 hours at 33°C under agitation at 150 rpm. They were then transferred to a 250 ml Erlenmeyer flask containing 100 ml of growth medium set with 5% sucrose and incubated for 24 hours at 33°C under agitation at 150 rpm. At the end of incubation, the cultures were placed in a cold chamber for 2 hours to sedimentation of the cells. Soon after, were centrifuged at 2655 X g for 15 minutes at 4°C. Was then performed with an inoculum of cells sterile water 2×10^7 cells/ml. Fermentations were performed in 250 ml Erlenmeyer flasks, containing a volume of 100 ml synthetic medium (Yeast extract 0.15%, Peptone 0.15%, sucrose 20%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.1%; KH_2SO_4 0.1%) for fermentation with 19°Brix, adjusted

to pH 5 with sulfuric acid 5M, and inoculated with 2×10^7 cells/ml. After inoculation of the selected isolates and control PE-2 yeast fermentations were conducted at a temperature of 33°C, without stirring for 24 h. Throughout the fermentation were carried out to determine the attenuation readings of total solids for °Brix, using a refractometer (measures °Brix) the begin and finish the fermentation. At the end of the fermentation, centrifugation was performed to 2655 X g 5 min at 4 ° C. The supernatant was transferred to tubes falcon and kept at 4°C for subsequent determination of the alcohol content (% v/v). The result represents the average of three experiments.

2.6.6.1. Determination of ethanol content using the ultraviolet (UV) method

The determination of ethanol is tested second Gattas *et al.* (2002). The method is based on enzymatic conversion of acetaldehyde to ethanol and NADH, by redox reaction, and the NAD^+ as electron acceptor. The reaction occurs at pH 8.8 to equilibrium shifts to the formation of acetaldehyde by the reaction there of with semicarbazide.

The tube where R occur complete the enzymatic reaction should be prepared as follows: 0.1 ml of NAD^+ 0.015 M, 0.04 ml of sample (alcohol) diluted 2000 X or 10 X (in the case of the must), 2.760 ml buffer (containing 0.13 M sodium pyrophosphate, 0.079 M glycine semicarbazide 0.024 M) pH 8.8, 0.1 ml volume of the enzyme preparation (0.51U, 0.1 ml) to a final volume of 3.0 ml. A standard curve for the determination of ethanol should be constructed using solutions of ethanol at various concentrations.

The tube P differs from R by standard solution containing ethanol (final concentration in the tube around R 6.9 x 10⁻³ g/L-1) in place of the sample and the tube Br-e, is will prepared for hold water in place of the sample (control of the enzyme preparation). The enzymatic reaction is initiated at time zero with the addition of the enzyme preparation and reaction occurs for 15 min at room temperature. The differences between the absorbencies (340 nm) of the solutions of the tubes and R and Br-e (AR - ABr-e), as well as the difference between the tube and the tube P and Br-e (AP - ABr-e) are obtained and used in determining the concentration of the ethanol using the following equation:

$$C \text{ g / l} = (\text{AR} - \text{ABr-e}) / (\text{AP} - \text{ABr-e}) \times V \times \text{dil.} \times v \times c \times \text{PM (ethanol)}$$

Where:

C = concentration of ethanol in g/L;

(AR - ABr-e) = Abs sample - Abs blank;

(AP - ABr-e) = Abs standard - Abs blank;

V = reaction volume (ml);

dil. = Dilution of the sample;

v = sample volume (ml);

c = concentration of the standard in the bucket (M);

PM = molecular weight of ethanol

2.6.6.2. Determination of total sugar

Total sugar is measured by the ° Brix, which is the percentage w/w of solids contained in a sugar solution, i.e., the solids content in the solution (ART - total reducing sugars). By consensus, it is permissible to °Brix apparent as the percentage of soluble solids, contained in a sugar solution. The determination of ° Brix was performed using the refractometer bench, at zero time 24 hours of fermentation.

2.7. Sequencing of the ITS1 and ITS2 and 5.8S rRNA fragment

After obtaining and quantification of genomic DNA was prepared PCR, and sequencing to detect possible polymorphisms in the regions of interest. Subsequently, we used 20 ng of template DNA, 1 µL of the primer ITS1 and ITS4 (3.2 mM) and 1 µL BigDye (Applied Biosystems) diluted 8X, 3.5 µL of sequencing buffer 5X, completing the volume to 20 ml with Milli-Q water. The amplifications were performed in a thermocycler Veriti Thermal Cycler (Applied Biosystem) programmed as follows: one cycle of 1 min at 96°C, followed by a cycle of 10 min at 96°C, followed by 25 cycles of 5 min at 52°C, 4 min 60°C and a cycle of 5 min at 60°C.

The PCR product was purified using the kit Big Dye® Xterminator Purification (Applied Biosystems).

Subsequently, the purified product was added 45 µL buffer and 10 µL of SAM resin precipitation of DNA about 10 µL of PCR reaction. Was homogenized in vortex apparatus for 30 minutes at room temperature and centrifuged for 2 minutes at 1000 X g. The samples were protected from light throughout the procedure,. The purified samples were applied to the device 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) for sequencing.

3. Results

3.1. Isolation of the yeast

The samples collected from the tank and from vat fermentation at the beginning and in the end of a crop of sugar cane, were diluted to serial dilutions. The dilution that could better isolate yeast was 1:10,000. Through these dilutions and morphologic characteristics of the colonies was possible to isolate 10 yeast (ZCC1, ZCC2, ZCC3, ZCC4, ZCC5, ZDC1, ZDC2, ZDC3, ZDC4, ZDC5) from the beginning of the crop of sugar cane and 24 yeast (ZFC1, ZFC2, ZFC3, ZFC4, ZFC5, ZFC6, ZFC7, ZFC8, ZFC9, ZFC10, ZFC11, ZFC12, ZFD1, ZFD2, ZFD3, ZFD4, ZFD5, ZFD6, ZFD7, ZFD8, ZFD9, ZFD10, ZFD11, ZFD12) from the end crop of sugar cane.

3.2. Identification of *Saccharomyces cerevisiae*

3.2.1. Polymerase Chain Reaction (PCR) identification

For the identification of isolates was necessary to extract genomic DNA from all isolates. The PCR was performed with the genomic DNA of the yeasts isolated and the pair of primers homologous to the gene HO (SchO-F and SchO-R). The isolates amplified in 400 bp band size were identified as *Saccharomyces cerevisiae*. Therefore, were identified as *S. cerevisiae*, 50% (ZCC4, ZCC5, ZDC1, ZDC4, ZDC5) of the isolates from the beginning and 95.80% (ZFC1, ZFC2, ZFC3, ZFC4, ZFC5, ZFC6, ZFC7, ZFC8, ZFC9, ZFC10, ZFC11, ZFC12, ZFD1, ZFD2, ZFD3, ZFD4, ZFD5, ZFD7, ZFD8, ZFD9, ZFD10, ZFD11, ZFD12) of the isolates from the end of the crop of sugar cane.

3.2.2. Restriction fragment length polymorphism (RFLP) identification

This technique was performed to characterize and determine his type of the selected yeasts isolated. To perform the RFLP technique has been performed a PCR using the primer ITS1 and ITS4, and this amplified fragment 880 pb for *Saccharomyces cerevisiae* (Fig. 1). Were used three restriction enzymes: *CfoI*, *HaeIII* and *HinfI*, each enzyme generated fragments of different sizes for *S. cerevisiae*, because performed the restriction of rRNA genes in different sites. The enzyme *HinfI* generated fragments of 365pb and 155pb (Fig. 2A), the enzyme *HaeIII* cut four strips of 320 pb, 220 pb, 180 pb and 145 bp (Fig. 2B) and *CfoI* generated fragments 385 pb and 365 pb (Fig. 2C). The strain reference Pe-2 presented the same fragments profile of the yeasts isolated to all restriction enzymes.

3.3. Characterization of strains of *Saccharomyces cerevisiae*

3.3.1. Test flocculation

The flocculation assay was performed with the isolates identified from *Saccharomyces cerevisiae*, in order to characterize the yeasts that are capable of spontaneous flocculation. In the test, the yeast grown in YEPD medium for 48 hours and showed no flakes formation after agitation in a vortex were characterized as non-flocculent yeast and the yeast that had flakes formation after stirring was characterized as a flocculent. Reference yeast PE-2 is non-flocculating, and 96.43% (27) of the isolates obtained are non-flocculent and only 3.47% (1) showed character flocculent.

3.3.2. Test for the production of hydrogen sulfide

All isolates were tested for production of hydrogen sulfide in this test all isolates were grown in Petri dishes with agar medium LA. During the growth of yeast production of hydrogen sulfide was observed by color variation of the profile of pigment. The reference yeast PE-2 produced average amount of hydrogen sulfide. In the yeasts

isolated, 3.57% (1) do not produce hydrogen sulfide, 10.71% (3) produce small amounts of hydrogen sulfide, 82.14% (23) produced average amount of hydrogen sulfide and 3.57% (1) produce high amount of hydrogen sulfide.

3.4. Selection of the *Saccharomyces cerevisiae*

3.4.1. Test sensitivity to high concentration of sugars

The test was performed on YEP agar medium with 2% glucose for 72 hours /37 ° C, the yeast PE-2 and all 28 isolates were intensive growth in this condition. Isolates grown in the previous situation were transferred to YEP agar medium containing 20% glucose for 72 hours/30 ° C, the yeast two PE-2 and all 28 isolates were intensive growth in this condition. The isolates were grown in the previous situation peaked in YEP agar medium containing 20% sucrose for 72 hours /30°C, this condition yeast Pe-2 showed heavy growth and 75% (21) of the isolates showed heavy growth and 25% (7) of the isolates showed moderate growth.

3.4.2. Tolerance Test Temperature

In order to select the yeast *S. cerevisiae* resistant to high temperatures was carried out a test that allows us to observe the growth of yeast at different temperatures (25°C, 40°C, 42°C, 44°C and 46°C). By this technique it was possible to select 6 resistant yeast strains at 42°C from 28 *S. cerevisiae* yeast strains tested. Same yeasts were grown at 42°C: ZFC2, ZFC3, ZFC4, ZFC5, ZDF3, ZFD4. The reference yeast PE-2, grown at 42°C.

3.4.3. Test of tolerance to ethanol

The six yeast *S. cerevisiae* selected from test of sensitivity to temperature and yeast PE-2 were submitted to testing for sensitivity to ethanol. The concentrations of ethanol to the culture medium employed for the analysis of growth of the yeasts were 10% and 12%. In preliminary tests were tested temperature of 25°C, 38°C, 39°C, 40°C and 41°C, but there was growth only until the temperature of 39°C, so tests were performed with 10% and 12% ethanol at 25°C, 38°C, and 39°C. Of the six yeasts tested, five were tolerant to 39°C in 10% ethanol; the yeast organisms are: ZFC2, ZFC3, ZFC4, ZFD3 and ZFD4. The PE-2 strain showed no growth at temperatures of 38°C and 39°C.

Another parameter tested was 12% ethanol at 25°C, 38°C, 39°C, this parameter is most effective to select yeast resistant to stress ethanol, a total of six selected yeasts, three yeasts were able to grow at 39°C, these are: ZFC2, ZFC3 and ZFD4. Yeast PE-2 showed no growth under the tested conditions of 38°C and 39°C.

3.4.4. Fermentation capacity test

The ability of fermenting yeasts was tested in three main liquid medium containing carbon sources (glucose, sucrose and galactose). It was considered positive test tubes where the gas production can be detected, indicative of the fermentation substrate, as shown in Fig. 3.

3.4.5. Evaluation of the capacity of selected strains of biofilms of *Saccharomyces cerevisiae*

In this experiment we tested the ability of the selected isolates resistant to 39°C and 12% ethanol (ZFC2, ZFC3 and ZFD4), the isolate that had the best fermentative capacity of the three sugars tested (ZFC4) and reference strain Pe-2 to make biofilm on polystyrene solid surface. Biofilm quantification was performed using the XTT test and was read in spectrophotometer at 492 nm. The quantification of biofilm strains selected is show in the Fig. 4.

3.4.6. Fermentation test of selected isolates

With the aim of get the selected isolates featuring the best ability to produce ethanol, a fermentation was carried out using a benchtop synthetic medium for the fermentation, the isolates that were tested are selected isolates resistant to 39°C and 12% ethanol (ZFC2, ZFC3 and ZFD4), the isolate that had the best fermentative capacity of the three sugars tested (ZFC4) and reference strain Pe-2. The fermentation period was 24 hours after the fermentation supernatant was removed for later analysis and determining ethanol content of total sugars, which is measured in Brix°. The amount of ethanol produced and consumption of total sugars (the values were measured at time zero and after 24 hours of fermentation) by the selected isolates is shown in Fig. 5.

3.5. Sequencing of the *ITS1*, *ITS2* and *5.8S rRNA gene*

The sequencing was performed in the laboratory of Molecular Biology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, UNESP - Araraquara, to identify possible genetic discrimination among the selected isolates resistant to 39°C and 12% ethanol (ZFC2, ZFC3 and ZFD4), the isolate that had the best fermentative capacity of the three sugars tested (ZFC4) and reference strain Pe-2. For the assembly and analysis of rRNA genes was used tool BioEdit Sequence Alignment Editor (version 7) and ClustalW ([www.ebi.ac.uk / Tools / ClustalW](http://www.ebi.ac.uk/Tools/ClustalW)). This alignment was performed by comparing the sequences obtained in this work with the gene sequence RDN37 available at the *Saccharomyces* genome database (<http://www.yeastgenome.org>), which harbors the regions of the primary pre-rRNA transcript that is processed into 25S , 18S and 5.8S rRNAs. According to the alignment of the yeasts isolated and the gene sequence of reference, we can say that there isn't a significant polymorphism among yeasts could elucidate that in its different phenotypic behavior, as analysis showed a score 99.0 % of the yeasts.

4. Discussion

Ethanol is becoming an important biofuel and its production has spread across five continents. Thus, understanding of the physiology behind the yeast fermentation process can help to ensure high yields of ethanol. Due to the special conditions of the fermentation process relating to the production of ethanol yeast *Saccharomyces cerevisiae* is the predominant species in production. Cost-effectiveness of ethanol production depends over it, among other factors, the rapid conversion of carbohydrates and high yield of ethanol, which itself depends on improvements in survival and growth of yeast cells under industrial conditions (Snowden, *et al.*, 2009).

Samples of the vat (fermentation inoculum) and fermentation vat were collected at the beginning and end of a crop of a plant sugar cane located in the state of Sao Paulo. 34 colonies were isolated to characterize them as *Saccharomyces cerevisiae*, of which 10 are isolated from the beginning and 24 are isolated from the end of harvest. We obtained a larger number of isolated at the end of harvest to provide a greater number of samples to be studied.

These isolates were tested for molecular identification. Was applied to isolated by PCR, using primers homologous to the pair of gene HO (Scho-F and Scho-R), in which the size, which amplified a 400bp band, was identified as *Saccharomyces cerevisiae*. Were identified as *S. cerevisiae* 50% (5) of the isolates from the beginning and 95.8% (23) isolates of the end of the harvest of sugar cane. This technique was effective and faster to identify *S. cerevisiae*, with a great use for sugarcane plants that require monitoring of microorganisms during the fermentation process. Melo Pereira *et al.* (2010), developed two new pair of species-specific primers to differentiate the main species of *Saccharomyces* (*S. bayanus*, *S. cerevisiae* and *S. pastorianus*), proposing a methodology for rapid identification (within hours), compared the classical identification methods, in which are complex and time consuming (DEAK, 1995) and do not distinguish phylogenetic groups (Ranieri *et al.*, 2003). Another technique has been applied to identify PCR-RFLP, in this technique first PCR was performed to amplify the DNA required for RFLP with restriction endonuclease enzymes. PCR was possible to identify all isolated by the amplification of a band of 880 bp for *Saccharomyces cerevisiae*. The RFLP with restriction endonucleases *CfoI*, *HaeIII* and *HinfI* was performed to differentiate through the restriction profile generated by endonucleases, the isolates tested, but this technique has not allowed the visualization of intra-species. The strain Pe-2 showed similar restriction profiles to isolates that all restriction enzymes tested.

According to Korabecná, *et al.* (2003), starting the PCR-RFLP is possible to identify the inter-species and intra-species gene ITS rDNA ITS-5.8S region in yeast.

Tests for purposes of characterizing phenotypic aspects of the isolates were performed to select the strains that have favorable characteristics for use in beverage and industrial ethanol.

The flocculation assay was performed with the Pe-2 strain and 28 isolates, in order to characterize the isolates that are capable of spontaneous flocculation. The characteristic of non-flocculants isolated can be understood because the yeast used as inoculum to start the fermentation process, either from fermentation trademark Fleishman Ltd, being considered a non-flocculent strain (Ludwig, *et al.*, 2001). The flocculation of yeast used in the industry leading to ethanol production in yeasts of the seat bottom of vats, and makes the conversion of sugar to ethanol as maximum conversion of sugar into ethanol and CO₂ is essential that the yeast will remain suspended in the liquid fermentation and does not flocculate, this phenomenon can cause loss of cells in the centrifuge and the consequent expense of substrate for cell replacement, thereby determining the yield drop of alcohol. The flocculation hinders the contact between the antibacterial used in the process and the bacteria causing the increase of these contaminants, which cause an increase in acidity, affecting the quality of ethanol, either as fuel or for the alcohol industry (Rose, 1980). Another test to characterize the isolates was performed to evaluate the production of hydrogen sulfide in this test isolates were grown in Petri dishes with agar medium LA. The selection of yeast in this study was focused to search for yeasts that have a high capacity to produce ethanol fuel, but this test production of hydrogen sulfide was performed to exclude yeast that were not interesting for the food industry, trying to also select yeasts that are of interest for production of beverages such as rum and beer, because the super yeast producing hydrogen sulfide are undesirable for the fermentation process, because aggregate unpleasant odor and flavor to beverages (RIBEIRO & HORII, 1999). During the growth of yeasts, characterized in production of hydrogen sulfide was observed by color variation of the profile of the pigmentation of the colony isolates (H₂S production by the yeast involves the incorporation of sulfate (SO₄) and its reduction in the cell, leading dimming the colony). The PE-2 strain produced hydrogen sulfide, for the isolates tested, 14.28% (4) did not produce hydrogen sulfide (strain without or low activity of sulfite reductase did not produce detectable amounts of hydrogen sulfide according (GIUDICI & KUNKEE, 1994), and 85, 71% (24) of the isolates produce hydrogen sulfide. Most isolates would not be desirable for use in the industrial production of beverages such as beer liquor and therefore the ability of yeast to produce H₂S has great commercial importance, however, Martins, (1997), showed that most of the commercially used strains may produce hydrogen sulfide, sulfite reductase enzyme through.

The strategy to select strains suitable for use as an inoculum of ethanol production were taken into account important characteristics that yeast ethanol producer must possess, such as resistance to osmotic stress, heat and ethanol to combat the stress conditions of fermentation. Whereas the fermentation broth of cane sugar starts with a high concentration of sucrose ($\pm 20\%$ w/v), proceeds with high temperatures ($\pm 37^\circ\text{C}$) until each fermentation cycle with high concentrations of ethanol (from 6-8% v/v) (Oliveira, *et al.*, 2008), and strains that are resistant to these natural conditions are more appropriate, given this, we sought to select strains resistant to these stress factors. The yeast stress response is a transient reprogramming of cellular activities to ensure survival in challenging conditions, protect essential cell components and enable resumption of 'normal' cellular activities during recovery (Stanley, *et al.*, 2009).

The sensibility test was carried out to determine the resist to isolates to osmotic stress conditions. The osmotic stress factor to isolates tested were resistant to 20% glucose and sucrose, being an important factor in the selection of yeasts for the fermentation process.

To select the strains resistant to temperature, a test was performed in which the isolates were exposed to different temperatures (25°C, 40°C, 42°C, 44°C and 46°C). The result showed that the strain Pe-2, increased 42 ° C and that of the 28 isolates, only ZFC2, ZFC3, ZFC4, ZFC5, ZDF3, ZFD4 also grown at 42 ° C. Acquisition of thermotolerance is largely controlled through the activation and regulation of specific stress-related genes involved in the synthesis of specific compounds that protect the organism from high temperature stress (Edgardo, *et al.*, 2008). Thermo-tolerant yeast is a prerequisite for ethanol fermentation under high temperature conditions to facilitate the hydrolysis for the sucrose as well as to save the capital investment and operation cost of the cooling system (Shahsavarani, *et al.*, 2011).

In order to achieve a more careful selection was performed a test of resistance to various temperatures and concentrations of ethanol. Five out of six isolates were tolerant to 39°C in the presence of 10% ethanol: ZFC2, ZFC3, ZFC4, ZFD3 and ZFD4. When placed in medium with 12% ethanol, gave greater efficacy to select yeast resistant to stress ethanol, a total of five isolates selected, three of these were able to grow at 39°C these are: ZFC2, and ZFC3 ZFD4. In the two tests with concentrations of 10% and 12% ethanol, Pe-2 strain showed no growth at 38°C and 39°C. The isolates selected at 25°C, 38°C and 39°C with 12% ethanol *S. cerevisiae* are isolated from the final harvest of cane sugar, we can say that these isolates have acquired resistance due to pressure suffered environmental during the fermentation process, as key factors to tolerate stresses encountered during alcoholic fermentation. In order to obtain optimum yield of ethanol production are sought yeasts that tolerate the osmotic stress, heat and ethanol. The tests conducted for the selection of yeasts, it was possible to

select the three strains that have a great profile of yeast usable in the industrial sector. The mechanisms by which yeast cells protect themselves factor these may be the accumulation of trehalose, synthesis of molecular chaperones and the synthesis of antioxidant enzymes (Tanghe, *et al.*, 2006). Rossouw *et al.* (2009), analyzed the ethanol tolerance of yeast strains of the wine industry and the result showed that all strains tested were tolerant to 25% ethanol and that gene expression can be affected when yeast strains resistant to the stress generated during the fermentation process. Yeasts have developed to become more resistant to environmental stresses. Survival and growth of yeast under stress conditions is achieved through a series of stress responses that depend on a complex network of detection and signal transduction pathways leading to changes in cell cycle, and adjustments in gene expression profiles and activities cellular metabolic (Hohmann & Mager, 2003; Stanley, *et al.*, 2009). The response of yeast to environmental stress is complex, involving various aspects of cell sensing, signal transduction, transcriptional and posttranscriptional control, protein-targeting, accumulation of protectants, and increased activity of repair functions (Mager & Ferreira, 1993). The efficiency of these processes in a given yeast strain determines its robustness and, to a large extent, ability of a given strain to perform well in industrial processes. A better understanding of the cellular consequences of microbial ethanol stress and of the underlying ethanol stress defense mechanisms is crucial for improving the performance of yeast strains during stress (Stanley, *et al.*, 2009).

To evaluate qualitatively the fermentative capacity of six isolates of selected test temperature resistance test was performed in a liquid medium containing three main carbon sources, glucose, sucrose and galactose. It was considered positive test tubes where the gas production can be detected, indicative of the fermentation substrate. Differences in assimilation and fermentation of carbon compounds are important criteria in the taxonomy and identification of yeasts, as these microorganisms have a diverse variation in the ability to ferment sugars. The yeast reference Pe-2 was able to make a strong fermentation three sugar and carbon sources glucose and sucrose as the most used substrate for fermentation, as were the most strong generated by fermentation isolates tested. The carbon source galactose was the least generated strong fermentation and half of the isolates showed little fermentation front of this substrate, suggesting that this would not be a carbon source usable in a fermentation process for ethanol production.

Biofilms are natural forms of immobilizing cells, which attack solid supports. Biofilm formation appears to be an adaptive mechanism, it ensures access to oxygen during the fermentation process allowing the continued growth in the presence of oxygen (Zara, *et al.*, 2010). Because of the cell immobilization caused the formation of biofilm, the cells are no longer in contact with the wort fermentation and therefore cannot use sucrose, leading

to falling ethanol yield. To verify the formation of biofilm on polystyrene surface was performed a test with three selected isolates more resistant (ZFC2, and ZFC3, ZFC4) and an isolate that had the best fermentative capacity (ZFD4). Quantitation was performed by the biofilm reduce XTT assay, in which the absorbance generated by the orange color due to reduction of XTT, measures the metabolic activity of the biofilm. From the results it was observed that the four isolates produced biofilm on polystyrene surface, the single largest ZFC2 formed biofilm compared to other isolates and the isolate-formed biofilm ZFD4 lower compared to other isolates. The reference strain of Pe-2 was yeast tested that formed greater biofilm on polystyrene surface. Comparative genetic studies have shown that biofilm cells grow more rapidly than the cells not biofilms (Zara, *et al.*, 2010). This result is interesting since, for the production of ethanol is desirable that the strains not producing ethanol to form biofilm thus in the pipes of the fermentation vats there can be the adhesion of biofilm-producing strains and there is the clogging of pipes, damaging thus the process of fermentation.

The sequencing using the primer pair ITS1 and ITS4 was performed for a possible identification of a genetic differentiation among the isolates in the region of the rRNA gene ITS1, 5.8S and ITS2. But there was no difference found between the sequences of the isolates, because the results showed a 99% homology among the isolates tested. Sequencing was performed only with isolates selected for their resistance profiles to try to find a relationship between phenotypes and genotypes found. According to Chen *et al.* (2001), the size of the PCR product originating from ITS1 demonstrated the variation intraspecies yeast approximately 2pb, the same behavior is observed when the fragment size study of alleles of the ITS2 region, but when studied the two regions (ITS1 and ITS2) is possible to see greater differentiation interspecies and intraspecies.

The transformation of fermentation wort is carried out by yeast. The first function of these strains is the conversion of sucrose by enzyme invertase breaking into glucose, pyruvic acid, ethanol and carbon dioxide. Thus, after the selection of isolates for verification of resistance to high concentration of sucrose, high temperature, high content of ethanol and fermentative capacity of isolates ZFC2, ZFC3, ZFC4, ZFD4 and Pe-2 strain, were subjected to fermentation to check biotransformation capacity, and, if these isolates selected, and are resistant to fermentation media, also to be good producers of ethanol. When compared to the reference strain Pe-2, only one isolate had produced ethanol content of approximately the ZFC4 isolated 6.4% of ethanol produced, which is slightly below the strain Pe-2, 6.75% of that produced ethanol. The isolate showed ZFD4 ethanol content of 4.18% and the isolated and ZFC2 ZFC3, had the lowest, which was 3.36% and 3.28% respectively. Another parameter to be studied in test fermentation was sugar consumption by the selected

isolates, the values were measured at the beginning and end (24 hours) and fermentation test showed that the isolate ZFC3 did not show a good ability to transform substrate because the final value of = 11°Brix. The isolated ZFC2, presented a final value of = 7.0 °Brix, is considered a good substrate processing capacity, but this isolate did not produce a high ethanol content, which may then consider that this alone shifted their processing of the substrate to other secondary metabolites such as glycerol, for example. The isolates ZFD4, ZFC4 consumed more sucrose fermentation throughout the test, demonstrating that being a yeast of industrial interest to get beyond the resistance of the main stress factors, should provide a good yield of ethanol and also a good processing the substrate.

The yeast isolate that presents the best characteristics to be a starter for fermentation is ZFC4, since it is not a flocculating yeast, does not produce high amounts of hydrogen sulfide, is resistant to high concentrations of sucrose (20%), high temperature (42°C in the absence of ethanol and 39°C in the presence of 10% ethanol) and shows good processing ability of substrate and fermentative capacity.

Our results showed that some methods based on DNA polymorphism are insufficient to assess the diversity of the *Saccharomyces cerevisiae* during the harvest of sugar cane. The use of specific biochemical tests are needed to enable a more accurate characterization of the strains selected during the fermentation process. Only by combining biochemical and molecular methods could select strains that show a profile suitable for use as an inoculum of alcoholic fermentation.

5. Acknowledgments

This study at the Universidade Estadual Paulista was supported by grants from the Coordenação de Aperfeiçoamento de Ensino Superior (CAPES). Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP) and FAPESP.

6. References

- Amorim HV & Leão RM (2005) Fermentação alcoólica: ciência e tecnologia. p. 448.
- Bai FW, Anderson WA & Moo-Young M (2008) Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks. *Biotechnol Adv* **26**: 89-105.
- Basílio AC, de Araújo PR, de Moraes JO, da Silva Filho EA, de Moraes MA & Simões DA (2008) Detection and identification of wild yeast contaminants of the industrial fuel ethanol fermentation process. *Curr Microbiol* **56**: 322-326.
- Bernardi T, Pereira G, Cardoso P, Dias E & Schwan R (2008) *Saccharomyces cerevisiae* strains associated with the production of cachaca: identification and characterization by traditional and

molecular methods (PCR, PFGE and mtDNA-RFLP). *World Journal of Microbiology & Biotechnology* **24**: 2705-2712.

Chen YC, Eisner JD, Kattar MM, *et al.* (2001) Polymorphic internal transcribed spacer region 1 DNA sequences identify medically important yeasts. *J Clin Microbiol* **39**: 4042-4051.

da Silva-Filho EA, Brito dos Santos SK, Resende AoM, de Moraes JO, de Moraes MA & Ardaillon Simões D (2005) Yeast population dynamics of industrial fuel-ethanol fermentation process assessed by PCR-fingerprinting. *Antonie Van Leeuwenhoek* **88**: 13-23.

de Melo Pereira GV, Ramos CL, Galvão C, Souza Dias E & Schwan RF (2010) Use of specific PCR primers to identify three important industrial species of *Saccharomyces* genus: *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces bayanus* and *Saccharomyces pastorianus*. *Lett Appl Microbiol* **51**: 131-137.

Deak T (1995) Methods For The Rapid Detection And Identification Of Yeasts In Foods. *Trends in Food Science & Technology* **6**: 287-292.

Edgardo A, P C, R M, F J & . BJ (2008) Selection of thermotolerant yeast strains *Saccharomyces cerevisiae* for bioethanol production *Enzyme Microb Technol* **43**: 120–123.

Gattás EAL, Tininis CRCS & Laluece C (2002) Kit econômico de aplicação na rotina industrial para os ensaios de glicerol, malato e etanol. Vol. BR n. PI 0205552 (Fapesp).

Gibson BR, Lawrence SJ, Leclaire JP, Powell CD & Smart KA (2007) Yeast responses to stresses associated with industrial brewery handling. *FEMS Microbiol Rev* **31**: 535-569.

Giudici P & Kunkee R (1994) The Effect Of Nitrogen Deficiency And Sulfur-Containing Amino-Acids On The Reduction Of Sulfate To Hydrogen-Sulfide By Wine Yeasts. *American Journal of Enology and Viticulture* **45**: 107-112.

Guillamon J, Sabate J, Barrio E, Cano J & Querol A (1998) Rapid identification of wine yeast species based on RFLP analysis of the ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region. *Archives of Microbiology* **169**: 387-392.

- Hirasawa T, Yoshikawa K, Nakakura Y, *et al.* (2007) Identification of target genes conferring ethanol stress tolerance to *Saccharomyces cerevisiae* based on DNA microarray data analysis. *J Biotechnol* **131**: 34-44.
- Hohmann S & Mager WH (2003) Yeast Stress Responses. Berlin:Springer-Verlag.
- Korabecná M, Liska V & Fajfrlík K (2003) Primers ITS1, ITS2 and ITS4 detect the intraspecies variability in the internal transcribed spacers and 5.8S rRNA gene region in clinical isolates of fungi. *Folia Microbiol (Praha)* **48**: 233-238.
- Lopandic K, Zelger S, Bánszky LK, Eliskases-Lechner F & Prillinger H (2006) Identification of yeasts associated with milk products using traditional and molecular techniques. *Food Microbiol* **23**: 341-350.
- Ludwig KM, Oliva-Neto P & ANGELIS DF (2001) Quantificação da floculação de *Saccharomyces cerevisiae* por bactérias contaminantes da fermentação alcoólica. *Ciênc. Tecnol. Alim.*, **21**:63-68.
- Mager WH & Ferreira PM (1993) Stress response of yeast. *Biochem J* **290 (Pt 1)**: 1-13.
- Martins CVB (1997) Biologia e fusão de protoplastos de leveduras floculantes e H2S. Thesis, Universidade de São Paulo.
- Martorell P, Barata A, Malfeito-Ferreira M, Fernández-Espinar MT, Loureiro V & Querol A (2006) Molecular typing of the yeast species *Dekkera bruxellensis* and *Pichia guilliermondii* recovered from wine related sources. *Int J Food Microbiol* **106**: 79-84.
- Möller EM, Bahnweg G, Sandermann H & Geiger HH (1992) A simple and efficient protocol for isolation of high molecular weight DNA from filamentous fungi, fruit bodies, and infected plant tissues. *Nucleic Acids Res* **20**: 6115-6116.
- Oliveira VA, Vicente MA, Fietto LG, *et al.* (2008) Biochemical and molecular characterization of *Saccharomyces cerevisiae* strains obtained from sugar-cane juice fermentations and their impact in cachaça production. *Appl Environ Microbiol* **74**: 693-701.
- Ono B, Ishii N, Fujino S & Aoyama I (1991) Role of hydrosulfide ions (HS⁻) in methylmercury resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol* **57**: 3183-3186.

- Ribeiro CAF & Horii J (1999) Potencialidades de linhagens de levedura *Saccharomyces cerevisiae* para a fermentação do caldo de cana. *Scientia Agricola* **56**: 255-263.
- ROSE AH (1980) Industrial importance the *Saccharomyces cerevisiae*. (SKINNER FA).
- Rossouw D, Olivares-Hernandes R, Nielsen J & Bauer FF (2009) Comparative transcriptomic approach to investigate differences in wine yeast physiology and metabolism during fermentation. *Appl Environ Microbiol* **75**: 6600-6612.
- SAMBROOK J, FRITSCH EF & MANIATIS T (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*. N.Y: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Shahsavarani H, Sugiyama M, Kaneko Y, Chuenchit B & Harashima S (2011) Superior thermotolerance of *Saccharomyces cerevisiae* for efficient bioethanol fermentation can be achieved by overexpression of RSP5 ubiquitin ligase. *Biotechnol Adv.*
- Snowden C, Schierholtz R, Poliszczuk P, Hughes S & van der Merwe G (2009) ETP1/YHL010c is a novel gene needed for the adaptation of *Saccharomyces cerevisiae* to ethanol. *FEMS Yeast Res* **9**: 372–380.
- Stanley D, Bandara A, Fraser S, Chambers PJ & Stanley GA (2009) The ethanol stress response and ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* *Journal of Applied Microbiology* **109**: 13-24.
- Suzzi G, Romano P & Zambonelli C (1984) Flocculation Of Wine Yeasts - Frequency, Differences, And Stability Of The Character. *Canadian Journal of Microbiology* **30**: 36-39.
- Tanghe A, Prior B & Thevelein JM (2006) Yeast responses to stresses. (Rosa CA & Péter G). 175–195. Springer-Verlag, Heidelberg.
- VAUGHAN-MARTINI A & MARTINI A (1993) A taxonomic key the genus *Saccharomyces*. *System Appl. Microbiol.*
- White TJ, Bruns T, Lee S & Taylor J (1990) Amplification and direct sequencing of fungi ribosomal RNA genes for phylogenetics. San Diego: Academic Press, *PCR protocols. a guide to methods and applications*.

Zara S, Gross MK, Zara G, Budroni M & Bakalinsky AT (2010) Ethanol-independent biofilm formation by a flor wine yeast strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol* **76**: 4089-4091.

Figure legends

Fig. 1. Profile of PCR using primer pair ITS1 and ITS4. Photograph of agarose gel 0.8% with product amplified rRNA gene of *Saccharomyces cerevisiae*. 01: molecular weight marker of 100bp DNA ladder (Invitrogen). Pe-2: reference strain and yeasts isolated; 1 – 28: ZCC4, ZCC5, ZDC1, ZDC4, ZDC5, ZFC1, ZFC2, ZFC3, ZFC4, ZFC5, ZFC6, ZFC7, ZFC8, ZFC9, ZFC10, ZFC11, ZFC12, ZFD1, ZFD2, ZFD3, ZFD4, ZFD5, ZFD7, ZFD8, ZFD9, ZFD10, ZFD11, ZFD12.

Fig. 2. Profile PCR-RFLP using restriction enzyme HinfI (2A), HaeIII (2B) and CfoI (2C). Photograph of agarose gel 2.0% with PCR-RFLP products made with product amplified rRNA gene of *Saccharomyces cerevisiae* isolated. 01: molecular weight marker 100bp DNA ladder (Invitrogen) and 02: molecular weight marker 1kb DNA ladder (Invitrogen). Pe-2: yeast reference, isolated yeast, 1 – 28: ZCC4, ZCC5, ZDC1, ZDC4, ZDC5, ZFC1, ZFC2, ZFC3, ZFC4, ZFC5, ZFC6, ZFC7, ZFC8, ZFC9, ZFC10, ZFC11, ZFC12, ZFD1, ZFD2, ZFD3, ZFD4, ZFD5, ZFD7, ZFD8, ZFD9, ZFD10, ZFD11, ZFD12.

Fig. 3. Graphic represents qualitative test of the fermentative capacity of the isolates (ZFC2, ZFC3, ZFC4, ZFC5, ZFD3 e ZFD4) in consumed of the sugars: glucose, sucrose, galactose.

Fig. 4. Quantification of the metabolic activity of the biofilm ($p \leq 0,05$) by spectofotometer (492nm) from selected isolates.

Fig. 5. Graph representing the sucrose concentration of the start and end of the assay fermentation and the level of ethanol produced in fermentation test ($p \leq 0.05$) for the reference strain Pe-2 and the isolates selected.

Figure 1.

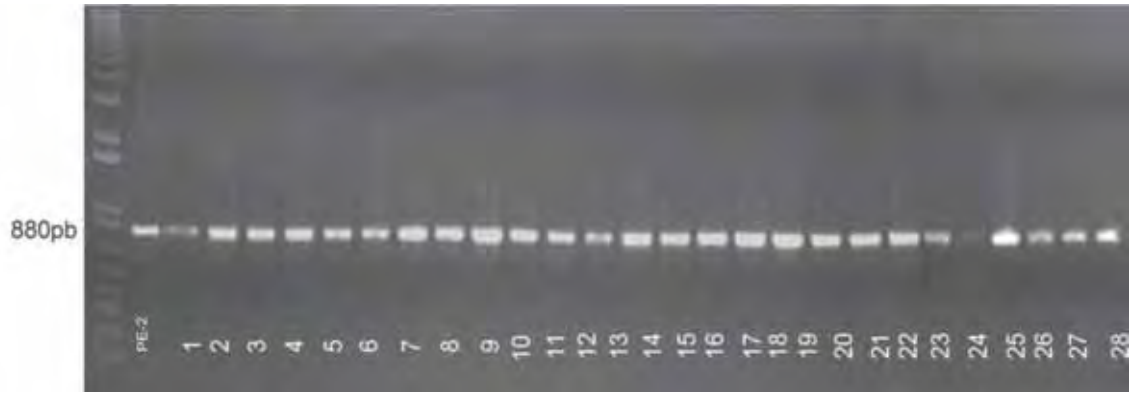


Figure 2.

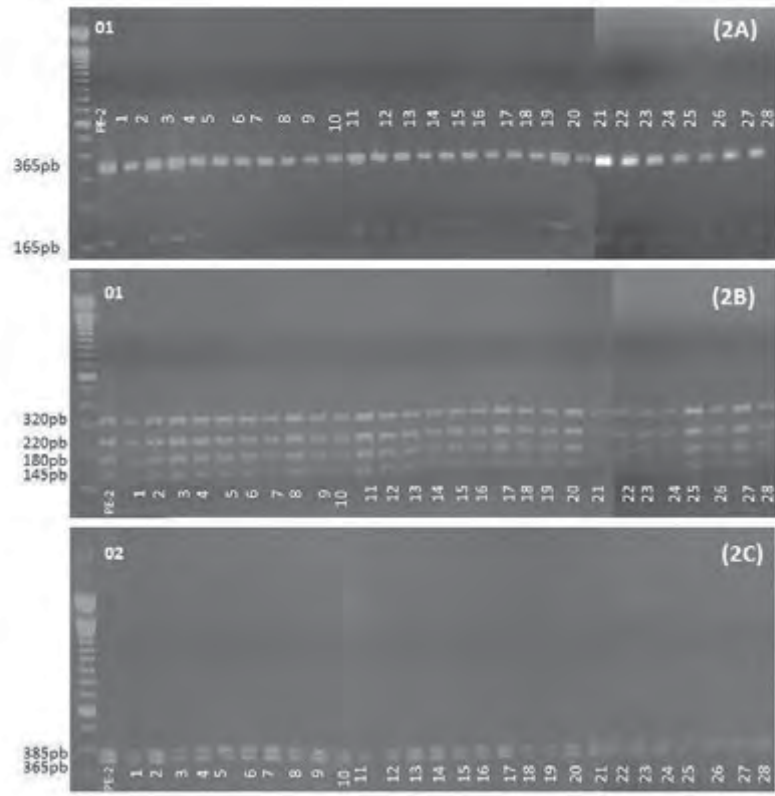


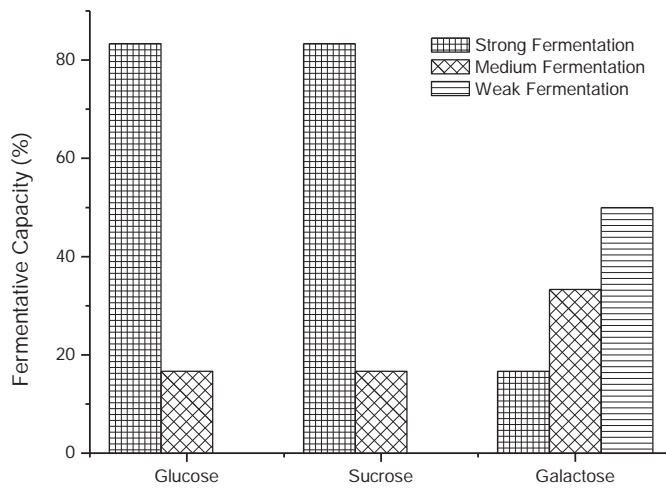
Figure 3.

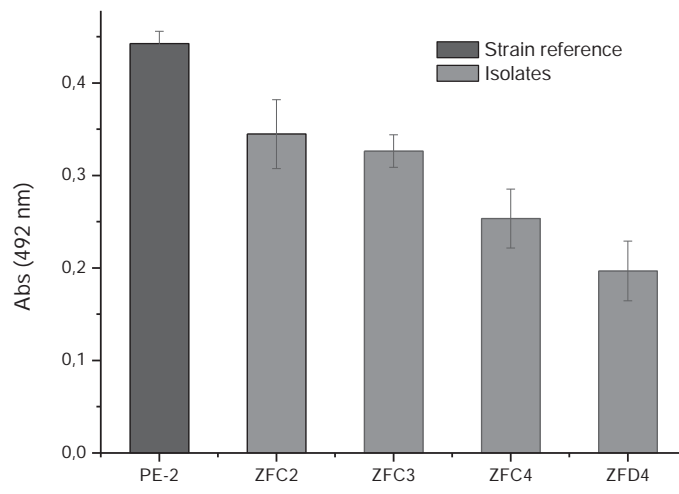
Figure 4.

Figure 5.