

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 04/12/2019.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

*Análise das linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* expostas ao estresse por etanol.*

LAUANA FOGAÇA DE ALMEIDA

BOTUCATU - 2017

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

Análise das linhagens de Saccharomyces cerevisiae expostas ao estresse por etanol.

LAUANA FOGAÇA DE ALMEIDA

Dissertação apresentada ao
programa de pós-graduação em
Biotecnologia para obtenção do
título de Mestre em
Biotecnologia.

Orientador: Dr. Guilherme
Targino Valente

BOTUCATU

2017

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Almeida, Lauana Fogaça de.

Análise das linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*
expostas ao estresse por etanol / Lauana Fogaça de
Almeida. - Botucatu, 2017

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista
"Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de
Botucatu

Orientador: Guilherme Targino Valente
Capes: 90400003

1. *Saccharomyces cerevisiae*. 2. Leveduras (Fungos). 3.
Etanol. 4. Biotecnologia.

Palavras-chave: Estresse ao etanol; *Saccharomyces*
cerevisiae; Tolerância ao etanol.

AGRADECIMENTOS

Dou início aos meus agradecimentos pela pessoa que tornou isso possível, que essencialmente é o membro mais importante em toda minha jornada, pessoa esta que dedicou seu tempo a mim, me aconselhou, me ensinou a ser humano antes mesmo de eu entender o significado desta palavra, me ensinou o sentido da palavra honestidade e de ter esta como um valor essencial na vida. Agradeço por todo o ensinamento, por todo amor, por todo afeto, pela amizade, agradeço por permanecer ao meu lado e tornar meus sonhos possíveis, agradeço por ser essa mulher guerreira que nunca mediu esforços para me dar todo o conforto possível e me manter sempre lutando por um futuro melhor. Eu te amo Mãe, obrigada!

Ao Michael, por ser a pessoa mais doce e amável que já conheci, por permanecer ao meu lado nos momentos em que nem eu me suportava, por me dar forças, por segurar minhas mãos e dizer “ *Hey, you can do this! We can do together!* ”, por simplesmente estar comigo nos piores momentos e nos melhores momentos.... Por ser meu companheiro, por lutar comigo e simplesmente me completar. *Ich liebe dich!*

Ao meu orientador Guilherme, que me aceitou na iniciação científica, em um momento de minha graduação onde eu tinha por mim que seria a última tentativa na ciência. Agradeço por transformar minha vida, minha forma de pensar, por me ensinar a ser crítica, por me ensinar ciência, por me proporcionar conhecimentos e contatos que eu nem se quer havia imaginado um dia ter. Por me fazer sempre ir além, por me ensinar muitas vezes a ser uma pessoa melhor, tanto no conhecimento científico quanto no pensar e agir como ser humano. Agradeço por me apoiar e me ajudar a tornar tudo isso possível, você professor foi essencial para minha formação, a qual sem você, por diversos motivos, esta não seria nem cogitada. Agradeço por além de orientador, ser meu amigo e algumas vezes pai, por aconselhar e me escutar sempre! Espero levar sua amizade para sempre professor. Obrigada por mudar minha vida!

A Tati, que me acolheu em sua casa, em sua vida, em sua família, agradeço pelas conversas, pelos conselhos, por toda ajuda sem se importar com a hora e condição, por todo o apoio e por ser fazer parte de tudo isso que é de grande valor para mim. Obrigada por tudo!

Ao pequeno Aquiles, que embora não entenda o que ele fez por mim, ou ainda que não saiba ler o que está aqui, muitas vezes me ajudou, apenas por estar lá, por simplesmente dizer “tia Auana, vem! ”, tornando meus dias mais iluminados e minha vida mais feliz!

Ao meu amigo Leonardo Nazário que me ajudou incontáveis vezes a planejar experimentos, padronizar e realizar boa parte desse trabalho. Agradeço além disso por ser meu amigo, pelas discussões científicas, pelas risadas, piadas e jogos, “pela ciência divertida”, pelos cafés, pelas palavras, por simplesmente fazer companhia as vezes em silencio na sala de reunião. Obrigada Leo.

Ao meu amigo Rafael Takahiro, que estava lá sempre disposto a me ajudar, sem se importar com dia e hora, nos experimentos de final semana, nos experimentos de 24 horas, obrigada pelas conversas, pelos conselhos, pelos ensinamentos, pela amizade e por estar lá sempre que precisei. Obrigada Taka!

Aos amigos Carol, Fran, Fabi e Lucas por estarem sempre lá, pela ajuda do a dia, por fazer os dias mais engraçados, pelas discussões, pelos seminários, pelos treinamentos das apresentações, pela amizade, por simplesmente se importar, pelos momentos divertidos juntos e outrora tensos, mas que no fim sempre dava tudo certo... teria tantas coisas para agradecer a vocês, mas imprescindivelmente quero que nunca percamos o contato, obrigada por tudo pessoal!

Ao meu amigo Ivan, por sempre estar disposto a me ajudar, por inúmeras vezes trocar os sistemas operacionais das maquinas para mim (risos), por me ensinar inúmeras coisas, pelas diversas discussões, pelas conversas divertidas, pela simples amizade, por me apresentar a Polly, pessoa doce e iluminada que me cativou e que faz os melhores brigadeiros do mundo! Muito obrigada por tudo!

Aos demais colegas do laboratório do hemocentro e do SBGL: Rodrigo, Flavia, Maercio, Regina, Cris, Gabi e aos inúmeros ICs, obrigada pelas conversas e conselhos.

A professora Dra. Rejane Tomasini Grotto, por disponibilizar o espaço e equipamento para a realização de todo este trabalho, por sempre estar disposta a ajudar, pelas orientações e inúmeras dicas! Obrigada.

Ao professor Dr. Rafael plana Simões por sempre ter tempo disponível a me ensinar e ajudar nas análises estatísticas, pelas discussões e conhecimentos passados, obrigada!

Aos órgãos de fomento Pró-Reitoria de Pesquisa (PROPe) pela bolsa cedida na iniciação científica a qual corroborou para a realização dos experimentos e a Fapesp-Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo por todo o financiamento e suporte!

RESUMO

O bioetanol é o biocombustível mais utilizado no mundo, tendo como uma de suas principais vantagens o fato de contribuir para a redução da emissão de gases do efeito estufa. O principal organismo fermentador utilizado para a produção de bioetanol é a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, que quando adicionada num meio com glicose ou outra fonte de carbono fermentável, utilizará a fermentação alcoólica como processo metabólico principal para a obtenção de energia e consequentemente o etanol. No presente trabalho testou-se 14 linhagens de *S. cerevisiae*, analisando o grau máximo de tolerância ao etanol bem como características celulares e moleculares. Para isso foi utilizado técnicas como citometria de fluxo, curvas de crescimento e análises de proteômica. O objetivo do trabalho foi analisar as proteínas mais abundantes, em um contexto comparativo para os experimentos de estresse máximo por etanol nas leveduras, identificando enzimas chaves presentes durante o tratamento e possivelmente responsável pela tolerância. Foram determinadas as concentrações máximas de etanol suportada por cada linhagem seguida por análises de viabilidade celular. Os resultados demonstraram que a capacidade de replicação e viabilidade celular não estão diretamente ligados ao fenômeno de tolerância. Além disso, a presença de proteínas relacionadas às vias fermentativas, vias oxidativas e manutenção da homeostase celular, parecem estar associadas a um perfil de maior tolerância ao etanol uma vez que estão mais abundantes nas linhagens mais tolerantes. Também, evidenciou-se que qualidades como tolerância e resistência ilustram diferentes papéis nas cepas estudadas, pois linhagens que apresentam uma maior tolerância ao etanol nem sempre são as mais resistentes.

Palavras chaves: Tolerância ao etanol, *Saccharomyces cerevisiae*, estresse ao etanol.

ABSTRACT

Bioethanol is the most used biofuel in the world since its main advantage is the reduction of greenhouse gas emissions. The most used organism for bioethanol production is the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, which uses glucose, or other fermentable carbon sources, for energy obtaining and ethanol production from the alcoholic fermentation pathway. In this work, 14 *S. cerevisiae* strains were evaluated concerning their highest ethanol tolerance degree and cellular/molecular characteristics as well. For this purpose, it was used techniques such as flow cytometry, growth curve analysis and proteomics. The objective of this work was to analyze the most abundant proteins, in a comparative context of maximum ethanol stress for yeasts, to identify key-enzymes present during cell treatments as well as their possible influence for the ethanol tolerance. Before that, it was determined the highest ethanol concentration each strain could support followed by cellular viabilities. The results demonstrated that replication capacity and cell viability are not closely related to the ethanol tolerance. Moreover, the presence of proteins related to fermentative pathways, oxidative pathways, and maintenance of cellular homeostasis, looks like to be linked to the highest ethanol tolerance profile, since those proteins are more present in higher ethanol tolerant strains. Furthermore, it was possible to understand that both tolerance and resistance features play different roles in the studied strains, since the higher ethanol tolerant strains always are not the most resistant ones.

Key words: Ethanol tolerance, *Saccharomyces cerevisiae*, ethanol stress.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACN - Acetonitrila

D.O - Densidade óptica

DTT - Ditionitrito

ESI - Ionização por electrospray

FACS - Fluorescence Activated Cell Sorter

GRAS – Generally regarded as safe

HT- High tolerance

IAA- Iodacetoamida

LT- Low tolerance

NCBI - National Center for Biotechnology Information

ORfs - Open read frame

RNA - ácido ribonucleico

SGD - Saccharomyces genome database

SNPs - Polimorfismo de único nucleotídeo

TFA - ácido trifluoracético

TOF - time of flight

YPD - Yeast extract, Peptone, Dextrose.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.	8
1.1. BIOETANOL	8
1.2. BIOLOGIA CELULAR DA <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	10
1.3. ASPECTOS DA TOLERÂNCIA AO ETANOL E CRIAÇÃO DE LINHAGENS MAIS TOLERANTES	11
1.4. CITOMETRIA DE FLUXO EM <i>S. cerevisiae</i>	13
1.5. ESPECTROMETRIA DE MASSAS NA PROTEÔMICA	15
1.5.1. Aplicação das técnicas de espectrometria de massas e tolerância ao etanol	17
2. HIPOTESES	19
2. OBJETIVOS	20
2.1. O OBJETIVO GERAL	20
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
3. MATERIAL E MÉTODOS	21
3.1. MICRORGANISMOS	21
3.2. CULTIVO E REATIVAÇÃO	22
3.3. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO MÁXIMA DE ETANOL COMO FATOR DE ESTRESSE	22
3.4. MACHINE LEARNING PARA A DETERMINAÇÃO DOS CLUSTERS	23
3.5. ESCALONAMENTO EXPERIMENTAL PARA OBTENÇÃO DO VOLUME AMOSTRAL ADEQUADO	24
3.5.1. Extração de proteínas	24
3.5.2. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-page)	25
3.5.3. Digestão e dessalinização das proteínas para análises de shotgun	27
3.5.4. Espectrometria de massas	27
3.5.5. Obtenção e conversão dos espectros para dados m/z.	28
3.6. CITOMETRIA DE FLUXO PARA AVALIAR VIABILIDADE CELULAR	28
3.7. CURVA DE CRESCIMENTO CELULAR	29
3.7.1. Crescimento celular	29
3.7.2. Crescimento celular após tratamento	30
3.7.3. Teste de tolerância ao etanol após 24 horas	30
3.7.4. Análise estatística das curvas de crescimento	31
4. RESULTADOS	32
5. DISCUSSÃO	47
6. CONCLUSÃO	51
7. REFERÊNCIAS	52

1. INTRODUÇÃO.

1.1. BIOETANOL

Define-se por biocombustível todo produto útil para a geração de energia, obtido total ou parcialmente de biomassa (TOLMASQUIM, 2003). O bioetanol é o biocombustível mais utilizado no mundo, tendo como uma de suas principais vantagens o fato de contribuir para a redução da emissão de gases do efeito estufa, em comparação aos derivados de petróleo (TESFAW; ASSEFA, 2014).

O bioetanol teve sua origem no século XX, quando era apenas utilizado para fins domésticos e industriais. Foi em 1922 que o etanol passou a ser visto e utilizado como combustível no Brasil (BRAY; FERREIRA; RUAS, 2000).

No período da segunda guerra mundial, a redução da exportação de açúcar para a Europa, teve como consequência a diminuição da importação do petróleo, resultando na racionalização de gasolina e óleo diesel até 1945. Nesse período iniciou-se uma valorização do setor alcooleiro no Brasil (BRAY; FERREIRA; RUAS, 2000). Três décadas depois, em 1973, duas crises impulsionaram a produção de etanol no Brasil: a crise na indústria canavieira e a crise do petróleo. Nesse cenário, criou-se em 1975 o Proálcool - Programa Nacional do Alcool - com o objetivo de reduzir a importação de petróleo e aumentar a produção de etanol no país. Com a criação do programa, um aumento na mistura de etanol anidro à gasolina ocorreu (BRAY; FERREIRA; RUAS, 2000; SHIKIDA; BACHA, 1999), proporcionando o surgimento da modernização e criação de novas usinas para a produção de etanol. A produção de etanol anidro era predominante até 1978, mas em 1979, com a segunda crise do petróleo, o Proálcool iniciou sua segunda fase, no qual o seu objetivo era utilizar o etanol hidratado em automóveis, gerando um aumento da produção. (SHIKIDA; BACHA, 1999). Anos depois, em um período de estagnação na produção do etanol, o governo tornou obrigatória a mistura de 20-25% de álcool anidro na gasolina em todo o território nacional. Nesse mesmo período também surgiu o carro *flex*, consolidando o etanol como um combustível importante no Brasil (GORDINHO, 2010).

Com as condições ambientais atuais e a preocupação com a diminuição na utilização de combustíveis fósseis, há um interesse crescente no desenvolvimento de

fontes alternativas de energia com menores impactos ambientais. Pensando nisso, vários países se envolveram no desenvolvimento de tecnologias para geração de biocombustíveis, pois, além de produzirem uma menor concentração de poluentes, são fontes renováveis de energia (CHENG e TIMILSINA, 2011).

O processo utilizado na produção do etanol no Brasil sofreu diversas modificações nos últimos 30 anos. Atualmente essa produção é caracterizada pelo uso do esmagamento da cana-de-açúcar em tanques de grande capacidade (até 3 milhões de litros) a uma densidade celular da levedura elevada (10-15%). As destilarias preferem os processos com os microrganismos, ou seja, os processos que utilizam da fermentação da cana-de-açúcar. Esta preferência representa cerca de 20-30% das formas de produção disponíveis (MUSSATTO et al., 2010). Em 2014, no Brasil, existiam cerca de 330 usinas produzindo etanol e atualmente o Brasil é o segundo maior produtor de etanol do mundo, ficando atrás somente dos Estados Unidos da América (TESFAW; ASSEFA, 2014). O produto gerado do processo de fermentação alcoólica também pode ser obtido através da fermentação de outros diferentes tipos de matérias primas, tais como beterraba, trigo, entre outros (AQUINO et al., 2014).

Diversas são as espécies de leveduras do gênero *Saccharomyces* utilizadas no processo de produção do bioetanol. Suas características fisiológicas, as quais permitem adaptarem-se as condições variáveis de ambiente tais como concentrações de açúcares, pH, concentrações de oxigênio, concentrações de etanol, estresse salino, estresse proteico, resistência a contaminantes, alterações de temperatura e pressão osmótica, as tornam os microrganismos mais utilizados para a produção de etanol. Das *Saccharomyces*, a espécie *S. cerevisiae* é o principal organismo fermentador utilizado para a produção de bioetanol, que quando adicionada num meio com glicose ou outra fonte de carbono fermentável, utilizará a fermentação alcoólica como processo metabólico principal para a obtenção de energia e consequentemente o etanol (GIBSON et al., 2007; BAI et al., 2008, MUSSATTO et al., 2010). Diversos substratos foram testados a fim de aumentar a produção do bioetanol nos últimos anos, como lignocelulose, amido e outros, contudo não houve resultados de melhoria (TESFAW; ASSEFA, 2014).

7. CONCLUSÃO

A hipótese geral do trabalho buscava encontrar dados proteômicos divergentes entre as linhagens de *S. cerevisiae* com diferentes níveis de tolerância ao etanol. No entanto, os conjuntos encontrados eram similares, destacando que a diferença entre os grupos de maior e menor tolerância é a abundância de proteínas atuantes no momento de estresse máximo.

Do ponto de vista da análise de proteínas expressas nesse contexto, esse é o primeiro relato das proteínas mais abundantes comparando perfis de expressão em grupos de linhagens mais e menos tolerantes ao etanol. Ainda, as ancoragens de informações “ômicas” com análises de viabilidade celular e curvas de crescimento não foram ainda publicadas, sendo uma inovação desse trabalho.

Além disso, construiu-se informações importantes de que o crescimento e viabilidade celular não estão diretamente ligadas ao fenótipo estudado, pois o rápido crescimento e multiplicação eram também parte das hipóteses iniciais por trás de uma maior tolerância ao etanol.

8. REFERÊNCIAS

- ALBERTS, B.; BRAY, D.; HOPKIN, K.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K. & WALTER, P. Fundamentos de Biologia Celular. 5a ed. Ed. Artes Médicas, Porto Alegre. 2010.
- AMORIM, H. V., LOPES, M. L., DE CASTRO OLIVEIRA, J. V., BUCKERIDGE, M.S., GOLDMAN, G.H. Scientific challenges of bioethanol production in Brazil. *Appl Microbiol Biotechnol.* 91(5), 1267-75, 2011.
- ANDORRA, I. et al. Analysis and direct quantification of *Saccharomyces cerevisiae* and *Hanseniaspora guilliermondii* populations during alcoholic fermentation by fluorescence in situ hybridization, flow cytometry and quantitative PCR. *Food Microbiology*, v. 28, n. 8, p. 1483–1491, 2011.
- AQUINO, A.F.; BIDÔ, E.S.; GALVÃO, M.L.M.; OLIVEIRA, V.N. O etanol da cana de açúcar: possibilidades energéticas da região de Ceará-Mirim-RN. *Holos*, 01:105-125. 2014.
- BAI, F.W.; ANDERSON, W.A.; MOO-YOUNG, M. Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks. *Biotechnol.* 26:89-105, 2008.
- BASSO, L. C., AMORIM, H. V., OLIVEIRA, A. J., LOPES, M. L. Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil. *FEMS Yeast Research*, 8(7), 1155-63, 2008.
- BRAY, M; FERREIRA, I; RUAS, P. A Evolução da Produção de Etanol no Brasil. Documentos técnicos científicos. 2000.
- BENJAPHOKEE, S. et al. CDC19 encoding pyruvate kinase is important for high-temperature tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *New BIOTECHNOLOGY*, v. 29, n. 2, p. 166–176, 2012.
- BROWN, C. R.; MCCANN, J. A.; CHIANG, H. The Heat Shock Protein Ssa2p is required for Import of Fructose-1,6-Bisphosphatase into Vid Vesicles. v. 150, n. 1, p. 65–76, 2000.
- BIRCH, R.M.; WALKER, G.M. Influence of magnesium ions on heat shock and ethanol stress responses of *Saccharomyces cerevisiae*. *Enzyme Microb Technol*, 26:678–687, 2000.
- BRADFORD MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976.
- BROW, N.A., et al. Transcriptional profiling of Brazilian *Saccharomyces cerevisiae* strains selected for semi-continuous fermentation of sugarcane must. *FEMS Yeast Res.*, 13:277-90, 2013.
- CANTÚ, M.; CARRILHO, E. Sequenciamento de peptídeos usando espectrometria de massas: Um guia prático. *Quim. Nova*. v. 31, n. 3, p. 669–675, 2008.
- CHANDLER, M.; STANLEY, G.A.; ROGERS, P.; CHAMBERS, P. A genomic approach to defining the ethanol stress response in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Ann Microbiol*, 54:427–454, 2004.
- CHENG, J.J.; TIMILSINA G.R. Status and barriers of advanced biofuel technologies: A review. *Renewable Energy*, 36:3541-3549, 2011.
- CHRISTOFOLETTI, C.A.; ESCHER, J.P.; CORREIA, J.E.; MARINHO, J.F.; FONTANETTI, C.S. Sugarcane vinasse: environmental implications of its use. *Wast Manag.* 33:2752-61, 2013.
- CHEN, S.; XU, Y. Adaptive Evolution of *Saccharomyces cerevisiae* with Enhanced Ethanol Tolerance for Chinese Rice Wine Fermentation. *Appl Biochem Biotechnol*, v. 173, p. 1940–1954, 2014.
- CROSLAND, T. A device for counting small particles suspended in a Fluid through a tube. 1953.

- DALAWAI, N.; NADKARNI, S.; BHARANI, S. Screening of Efficient Ethanol Tolerant Yeast Strain for Production of Ethanol. v. 5, n. 1, p. 744–752, 2017.
- DELAHUNTE, C.; YATES, JR III. Protein identification using 2D-LC-MS/MS. *Methods*, 35:248–255, 2005.
- DING, J. et al. Tolerance and stress response to ethanol in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 85, n. 2, p. 253–263, 2009.
- DUNN, B.; WOBBE, C. R. Preparation of Protein Extracts from Yeast. *Protocols in Molecular Biology*, v. 926, n. 1992, p. 1–9, 2000.
- GIBBS, S.; STRIMMER, K. Differential protein expression and peak selection in mass spectrometry data by binary discriminant analysis. *Bioinformatics* 31:3156–62, 2015.
- GIBSON, B.R.; LAWRENCE, S.J.; LECLAIRE, J.P.; POWELL, C.D.; SMART, K.A. Yeast responses to stress associated with industrial brewery handling. *FEMS Microbiol Rev.* 31: 535–69, 2007.
- GRAVES, P. R.; HAYSTEAD, T. A J. Molecular Biologist ' s Guide to Proteomics. *Microbiology and molecular biology reviews*, v. 66, n. 1, p. 39–63, 2002.
- GIROLAMO, F. DI et al. The Role of Mass Spectrometry in the “Omics” Era. p. 2891–2905, 2013.
- GORDINHO M. C.; Do álcool ao etanol: Trajetória única. 2010.
- GOFFEAU, A., BARRELL, B. G., BUSSEY, H., DAVIS, R. W., DUJON, B., FELDMANN, H., GALIBERT, F., HOHEISEL, J. D., JACQ, C., JOHNSTON, M., LOUIS, E. J., MEWES, H. W., MURAKAMI, Y., PHILIPPSEN, P., TETTELIN, H., AND OLIVER, S. G. Life with 6000 genes. *Science* 274, 546–567. 1996.
- HALLSWORTH, J. E. et al. Compatible Solutes Protect against Water Stress Compatible Solutes Protect against Chaotrope (Ethanol) -Induced , Nonosmotic Water Stress. v. 69, n. 12, p. 7032–7034, 2003.
- HERNANDEZ, L.G. Análise proteômica aplicada à ontogenia, comportamento e aprendizagem em abelhas. 81. Tese (Doutorado em Biologia Molecular). Universidade de Brasília, Brasília, 2009.
- HULLET, R. H. et al. A Development and application of a rapid cell sorter., 1974.
- HU, X.H.; WANG, M.H.; TAN, T.; et al. Genetic dissection of ethanol tolerance in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 175:1479–1487, 2007.
- JIA, K.; ZHANG, L.; LI, Y. Systematic engineering of microorganisms to improve alcohol tolerance. *Eng. Life Sci.*, 10:422–429, 2010.
- KUSHNIROV, V. V. Rapid and reliable protein extraction from yeast. *Yeast Functional Analysis Report*, v. 16, p. 857–860, 2000.
- LAUFER, H. et al. Electronic separation of biological cell by volume. *Science*, v. 150, p. 910–911, 1965.
- LIU, Z.; VENKATESH, S. S.; MALEY, C. C. Sequence space coverage, entropy of genomes and the potential to detect non-human DNA in human samples. *BMC genomics*, v. 9, p. 509, 2008.
- LEWIS, J.A.; ELKON, I.M.; MCGEE, M.A.; et al. Exploiting Natural Variation in *Saccharomyces cerevisiae* to Identify Genes for Increased Ethanol Resistance. *Genetics*, 186:1197–1205, 2010.
- LIN, Y.; TANAKA, S. Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospects. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 69:627– 42, 2006.

- LIU, S. Proteomic analyses of ethanol tolerance in *Lactobacillus buchneri* NRRL B-30929. *Proteomics*. 14(21-22):2540-4. 2014.
- LUCERO, P.; PEÑALVER, E.; MORENO, E.; LAGUNAS, R. Internal trehalose protects endocytosis from inhibition by ethanol in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol*, 66:4456–4461, 2000.
- MA, M.; LIU, Z.L. Mechanisms of ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 87:829–845, 2010.
- MEADEN, P.G.; ARNEBORG, N.; GULDFELDT, L.U.; SIEGUMFELDT, H.; JAKOBSEN, M. Endocytosis and vacuolar morphology in *Saccharomyces cerevisiae* are altered in response to ethanol stress or heat shock. *Yeast*, 15:1211–1222, 1999.
- MISHRA, P.; PRASAD, R. Relationship between ethanol tolerance and fatty acyl composition of *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 30:294–298, 1989.
- MUSSATTO, S. I.; DRAGONE, G.; GUIMARÃES, P. M. R.; et al. Technological trends, global market, and challenges of bio-ethanol production. *Biotechnology Advances*, 28:817–830. 2010.
- MATTHIESEN, R.; BUNKENBORG, J. *Mass Spectrometry Data Analysis in Proteomics*. 2013.
- MOLDOVAN, A. Photoelectric Technique For The Counting of Microscopical Cells. *Science*, p. 188–189, 1934.
- NURSE, P. © 1975 Nature Publishing Group. *Nature*, v. 256, p. 548–550, 1975.
- PETROV, V.V.; OKOROKOV, L.A. Increase of the anion and proton permeability of *Saccharomyces carlsbergensis* plasmalemma by n-alcohols as a possible cause of its de-energization. *Yeast*, 6:311–318, 1990.
- RIEGER, AJA M. et al. Modified Annexin V/Propidium Iodide Apoptosis Assay For Accurate Assessment of Cell Death. *Journal of Visualized Experiments*. 2011.
- SICKMANN, A. et al. The proteome of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 100, n. 23, p. 13207–13212, 2003.
- STANLEY, G.A.; HOBLEY, T.J.; PAMMENT, N.B. Effect of acetaldehyde on *Saccharomyces cerevisiae* and *Zymomonas mobilis* subjected to environmental shocks. *Biotechnol Bioeng*, 53:71–78, 1997.
- STANLEY D, BANDARA A, FRASER S, et al. The ethanol stress response and ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Applied Microbiology*. 109:13–24. 2010.
- SUI, S. GOH, L. T. GRIFFIN, T.J. HU, W. S. Transcriptoma e proteoma Profiling de Etanol-Tolerant *Clostridium thermocellum*. *Reunião anual*. 2011.
- SWINNEM, S.; SCHAERLAEKENS, K.; CLAESSEN, T.P.J.; et al. Identification of novel causative genes determining the complex trait of high ethanol tolerance in yeast using pooled segregant whole-genome sequence analysis. *Genome Res.*, 22:975-984, 2012.
- QIU, Z.; JIANG, R. Improving *Saccharomyces cerevisiae* ethanol production and tolerance via RNA polymerase II subunit Rpb7. *Biotechnology for Biofuels*, p. 1–13, 2017.
- SILVA, A. F. Caracterização genética de linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* isoladas de fermentações espontâneas de cachaças de alambique da BAHIA. 2009.
- SNOEK, T. et al. Large-scale robot-assisted genome shuffling yields industrial *Saccharomyces cerevisiae* yeasts with increased ethanol tolerance. *Biotechnology for Biofuels*, v. 8, n. 1, p. 32, 2015.

- SZAPPANOS B¹, KOVÁCS K, SZAMECZ B, HONTI F, COSTANZO M, BARYSHNIKOVA A, GELIUS-DIETRICH G, LERCHER MJ, JELASITY M, MYERS CL, ANDREWS BJ, BOONE C, OLIVER SG, PÁL C, PAPP B. An integrated approach to characterize genetic interaction networks in yeast metabolism. *Nature Genetics*. 2011.
- TESFAW, A.; ASSEFA, F. Current Trends in Bioethanol Production by *Saccharomyces cerevisiae*: Substrate, Inhibitor Reduction, Growth Variables, Coculture, and Immobilization. *International Scholarly Research Notices*. 2014.
- TEIXEIRA, M.C.; RAPOSO, L.R.; MIRA, N.P.; et al. Genome-wide identification of *Saccharomyces cerevisiae* genes required for maximal tolerance to ethanol. *Appl Environ Microbiol*. 75:5761–5772, 2009.
- TOLMASQUIM, M. T. (Org.) Fontes renováveis de energia no Brasil. Rio de Janeiro: Interciência. 2003.
- TYERS, M.; MANN, M. From genomics to proteomics. *Nature*, 422:193-197, 2003.
- VALLI, M. et al. Intracellular pH Distribution in. v. 71, n. 3, p. 1515–1521, 2005.
- VOGEL, C.; MARCOTTE E.M. Insights into the regulation of protein abundance from proteomic and transcriptomic analyses. *Nature Reviews*, 13:227-232, 2012.
- WANG, J.; CHEN, L.; HUANG, S; et al. RNA-seq based identification and mutant validation of gene targets related to ethanol resistance in cyanobacterial *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Biotechnology for Biofuels*, 5:89, 2012.
- WIEDERHOLD, E. et al. Proteomics of *Saccharomyces cerevisiae* Organelles. *Molecular & cellular proteomics : MCP*, v. 9, n. 3, p. 431–445, 2010.
- WILLIAMS, T. I. et al. Proteomic profile changes in membranes of ethanol-tolerant *Clostridium thermocellum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 74, n. 2, p. 422–432, 2007.
- YANG, S. et al. *Clostridium thermocellum* ATCC27405 transcriptomic, metabolomic and proteomic profiles after ethanol stress. *BMC Genomics*, v. 13, n. 1, p. 1, 2012.
- YANG, S.; PAN, C.; TSCHAPLINSKI, T. J.; et al. Systems Biology Analysis of *Zymomonas mobilis* ZM4 Ethanol Stress Responses. *Plos one*, 7. 2013.
- YU, K. O.; JUNG, J.; RAMZI, A.B.; CHOE, S.H.; KIM, S.W.; PARK, C.; HAN, S.O. Increased ethanol production from glycerol by *Saccharomyces cerevisiae* strains with enhanced stress tolerance from the overexpression of SAGA complex components. *Enzyme and Microbial Technology*, 51:237–243, 2012.
- ZHANG, M. et al. Enhanced thermotolerance and ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae* mutated by high-energy pulse electron beam and protoplast fusion. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, v. 35, n. 9, p. 1455–1465, 2012.
- ZHANG, Y. et al. The importance of engineering physiological functionality into microbes. *Trends in Biotechnology*, v. 27, n. 12, p. 664–672, 2009.
- ZHANG, T. et al. An improved method for whole protein extraction from yeast *Saccharomyces cerevisiae*. 795–798, 2011.
- ZHANG, Y. et al. Interaction of the cotranslational Hsp70 Ssb with ribosomal proteins and rRNA depends on its lid domain. 2016.
- CHEN, Z.; ZHENG, Z.; CHENFENG, Y.; FENGLIAN, W.; YUANPU, N.; LI, H.; Intracellular metabolic changes in *Saccharomyces cerevisiae* and promotion of ethanol tolerance during the bioethanol fermentation process. *Royal Society of Chemistry Adv.*, 2016.