

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 04/04/2024.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

LUIZ HENRIQUE CARDOSO

Avaliação do impacto da inativação de genes associados ao estresse celular em
Saccharomyces cerevisiae

Botucatu

2022

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

LUIZ HENRIQUE CARDOSO

**Avaliação do impacto da inativação de genes associados ao
estresse celular em *Saccharomyces cerevisiae***

Dissertação apresentada à Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu, no programa de pós-graduação em Biotecnologia para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Dr. Guilherme Targino Valente

Botucatu

2022

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Cardoso, Luiz Henrique.

Avaliação do impacto da inativação de genes associados ao estresse celular em *Saccharomyces cerevisiae* / Luiz Henrique Cardoso. - Botucatu, 2022

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

Orientador: Guilherme Targino Valente

Capes: 20202008

1. Leveduras. 2. Termotolerância. 3. Biocombustíveis.
4. Etanol. 5. Inativação gênica.

Palavras-chave: Bioetanol; Levedura; Termotolerância;
Tolerância ao etanol.

AGRADECIMENTO

Dou início aos meus agradecimentos pelas pessoas que tornaram esse trabalho possível, que são os membros mais importantes em toda minha jornada, pessoas que dedicaram seu tempo a mim, me aconselharam e me guiaram na minha busca pelo aperfeiçoamento. Agradeço por todo o ensinamento, por todo amor, por todo afeto, pela amizade, agradeço por permanecerem ao meu lado e tornarem meus sonhos possíveis. Agradeço de todo coração ao meu Pai e minha Mãe!

Ao meu orientador Guilherme, que desde o início da minha graduação me acompanhou e deu vários conselhos, críticas e me ajudou nesse caminho. Por me fazer sempre ir além, por me ensinar muitas vezes a sentar e rever o que eu estava fazendo nos meus trabalhos, pelas conversas e por me mostrar o caminho do que espero no meu futuro dentro da ciência. Agradeço por me apoiar e reclamar quando eu precisava melhorar, sei que discordamos de vários pontos nesse caminho, mas de qualquer forma foi a nossa convivência que me ajudou a me tornar não só um pesquisador melhor, como uma pessoa melhor.

A minha amiga Amanda que me ensinou diversas coisas e me ajudou incontáveis vezes a planejar experimentos, padronizar e realiza-los. Agradeço além disso pelas discussões, risadas, piadas e jogos, por sempre falar de tomar um café nas horas mais necessárias, pelas palavras. Obrigado.

Aos outros colegas de trabalho que acompanharam esse período, Ivan, Camila, Farinazzo, Lazari, entre outros que não são menos importantes. Agradeço pela ajuda, pelas palavras, as correções e sugestões. Os encontros onde começávamos a falar de coisas do laboratório em meio a conversas descontraídas, a companhia e tudo mais, muito obrigado por ajudarem a fazer esse momento mais fácil.

Aos professores Ary, Rafael, Paulo e todos os outros que me ajudaram direta ou indiretamente com esse trabalho. Por mais que alguns tenham dito que não era nada, fizeram uma grande diferença em momentos que precisava dessa ajuda.

Por fim agradeço aos amigos e familiares, sejam os que estavam longe e perguntavam vez ou outra sobre meu trabalho, ou aqueles que perdi durante essa jornada. Agradeço de coração todo o apoio, torcida e paciência em momentos que estava totalmente perdido.

Gostaria de agradecer a UNESP, universidade esta que possibilitou dentro de todos os contratempos de pandemia e demais problemas um ambiente seguro e um

local de trabalho que atendia as necessidades dos meus estudos. Também gostaria de agradecer ao programa de pós graduação em Biotecnologia, o qual me auxiliou no meu desenvolvimento profissional e pessoal.

Aos órgãos de fomento CAPES, processo 88882.433359/2019-01 e a FAPESP - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, processo 2015/12093-9 por todo o financiamento e suporte!

RESUMO

A demanda mundial por energia tem se tornado um dos maiores desafios da atualidade. Junto a isso, temos a crescente demanda por sustentabilidade que tem estimulado o desenvolvimento de tecnologias para substituição do uso de combustíveis fósseis. Desta forma, os biocombustíveis, sendo o bioetanol um dos mais evidentes, têm tomado espaço no mercado econômico e, com isso, alavancado pesquisas nessa área. A levedura *Saccharomyces cerevisiae* tem sido exhaustivamente estudada, tornando-se assim um organismo modelo. Dentre as muitas propriedades desta, algumas a tornam ideal para estudos referentes à tolerância ao etanol e à termotolerância, problemas encontrados durante a fermentação em escala industrial. Muitas pesquisas buscam aumentar a tolerância desses organismos a estressores, portanto, diversos métodos são estudados e utilizadas para isso. Nesse contexto, utilizou-se a técnica de edição gênica, do tipo CRISPR-Cas9, para realizar a inativação de genes candidatos à tolerância ao etanol e à temperatura e gerar novas linhagens potencialmente mais tolerantes a esse composto, a fim de melhorar o atendimento às necessidades industriais. Estes estudos permitiram visualizar que a inativação de certos genes leva ao decréscimo da capacidade de suportar o estresse ao etanol, além de alterar a capacidade de tolerância térmica nesses mutantes. Com isso pode-se visualizar a relevância da inativação de determinados genes na busca pela melhoria dos processos fermentativos, podendo-se melhorar o teor alcoólico do processo, minimizar os custos da etapa de recuperação do etanol, auxiliar no aumento de produção através de concentrações maiores de açúcar no início do processo, reduzir o custo com trocadores de calor que são utilizados durante o processo e reduzir a contaminação por leveduras selvagens e bactérias durante o processo.

Palavras-chave: Bioetanol; Levedura; Termotolerância; Tolerância ao etanol.

ABSTRACT

The increase of global energy demands is one of the greatest challenges in the world. Along with this, we have the growing demand for sustainability that has stimulated the development of technologies to replace the use of fossil fuels. Therefore, biofuels, bioethanol being one of the most evident, have taken up space in the economic market and, with that, leveraged research in this field. The yeast *Saccharomyces cerevisiae* is a model organism extensively studied. Among its many properties, some make it ideal for studies related to ethanol tolerance and thermotolerance, relevant hurdles to the industrial-scale fermentation. Researchers often seek methods to optimize yeast tolerance, such as using gene editing. In this context, the CRISPR-Cas9 gene editing technique was used to inactivate candidate genes for ethanol tolerance and generate new strains potentially more tolerant to this compound. Possible thermotolerant effects on these mutants were also tested in order to improve the fulfillment of industrial needs. These studies showed that the inactivation of genes such as ALD4, CTA1 and IXR1 reduce the ethanol tolerance and changes the thermal tolerance capacity of these mutants. Therefore, these data show the relevance of these genes for the fermentation processes, which modifications on them could improve the dormancy time also optimizing the production.

Keywords: Bioethanol; Ethanol tolerance; Thermotolerance; Yeast.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	7	
LISTA DE FIGURAS	8	
1	INTRODUÇÃO	10
1.1	Bioetanol	10
1.2	Biologia Celular da <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	13
1.3	Tolerância ao etanol	15
1.4	Tolerância Térmica	16
1.5	O modelo de tamponamento <i>diauxic shift</i>	18
1.6	Genes relacionados à tolerância ao etanol e temperatura	20
1.6.1	CTA1 (YDR256C)	20
1.6.2	IXR1 (YKL032C)	21
1.6.3	ALD4 (YOR374W)	21
2	HIPÓTESE	26
3	OBJETIVOS	27
3.1	Objetivo geral	27
3.2	Objetivos Específicos	27
4	MÉTODOS	28
4.1	Seleção de genes candidatos	28
4.2	Microrganismos e meios de cultura	28
4.3	Montagem dos <i>primers</i>	29
4.4	Reação em cadeia da polimerase (PCR) de modificação do plasmídeo e eletroforese de confirmação da modificação	34

4.5	Digestão da reação de modificação, purificação do plasmídeo e ligação por ligase T4	34
4.6	Competência em <i>Escherichia coli</i> TOP 10	35
4.6.1	Tornando a bactéria TOP 10 competente	35
4.6.2	Transformação do plasmídeo em bactérias TOP 10	36
4.7	Extração do plasmídeo pMEL16 e checagem da inserção do target	36
4.8	Geração de leveduras competentes	37
4.9	Preparo do DNA de reparo e transformação	38
4.10	Confirmação de transformação da levedura	38
4.11	Teste de tolerância ao etanol	39
4.12	Spot Test	40
4.13	Análise de crescimento celular e testes de sobrevivência	41
4.14	Análise estatística das curvas de crescimento	42
5	RESULTADOS	44
5.1	Obtenção e validação das linhagens mutantes	44
5.2	Testes de tolerância ao etanol	46
5.3	Teste de estresse prolongado ao etanol	48
5.4	Teste de crescimento e estresse	49
5.4.1	SEY6210 e mutante	49
5.4.2	BY4742 e mutantes	51
5.4.3	BMA641-A e mutantes	52
5.5	Análise estatística das curvas de crescimento celular	53
6	DISCUSSÃO	56
6.1	BMA64-1A CTA1Δ	56
6.2	BMA64-1A IXR1Δ	57
6.3	SEY6210 ALD4-1, BY4742 ALD4-2 e ALD4-3	58
	CONSIDERAÇÕES FINAIS	60

REFERÊNCIAS	61
APÊNDICE A	66
APÊNDICE B	67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Nutrientes e concentrações para concepção do meio <i>drop out</i> a 10X.....	29
Tabela 2 - Oligos utilizados para inserção do target no pMEL16	30
Tabela 3 - Oligos utilizados no reparo e genotipagem das mutantes de ALD4.....	31
Tabela 4 – Valores de meio e etanol ou solução fisiológica para os testes de tolerância ao etanol.....	40
Tabela 5 – Estudo estatístico de linhagens mutantes e selvagens de <i>S. cerevisiae</i>	54
Tabela 6 - Estudo estatístico da tolerância térmica em linhagens mutantes e selvagens de <i>S. cerevisiae</i>	55

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Reprodução da <i>Saccharomyces cerevisiae</i> adaptado	13
Figura 2 – Ciclo celular da <i>S. cerevisiae</i> adaptado.....	14
Figura 3 – Modelo de tamponamento do etanol.....	19
Figura 4 – Esquema do funcionamento in vivo do sistema CRISPR.....	24
Figura 5 - Design do gDNA para implementação em plasmídeo pMEL16.....	30
Figura 6 – Modelo dos oligos de reparo, em vermelho as sequencias complementares. Em verde reporta-se o gRNA (porção contida no OliA). Em azul a sequência PAM (NGG).....	32
Figura 7 – Exemplo da montagem dos primers de genotipagem das mutações (pequenas setas verdes). A: Primers para verificação da inserção de <i>stop codon</i> prematuro (sequencia entre as barras verde e azul claro). B: <i>Primers</i> para verificação da deleção (pequenas barras verdes flanqueando o reparo, reportado em vermelho)	33
Figura 8 – Modelo de aplicação de <i>spot test</i> adaptado.....	41
Figura 9 - Representação gráfica do crescimento populacional de acordo com a equação de Verhulst (equação logística)	43
Figura 10 – Placas de levedura em meio seletivo com G418 (200mg/L), nestas foram cultivadas colônias e testadas as mutações.....	44
Figura 11 – Gel de eletroforese de genotipagem das linhagens mutantes. A: <i>ladder</i> . B-C: linhagens mutantes. D-E, G: linhagens com falha na mutação. F: Falha na reação de PCR. H: linhagem BY4742 selvagem.....	45
Figura 12 – Resultados de sequenciamento dos genes das linhagens mutantes ALD4.....	46

Figura 13 – Comparação de tolerância ao etanol em levedura selvagem e sua contraparte com inativação do gene ALD4.....	47
Figura 14 – Comparação entre linhagens com inativação da ALD4 e sua contraparte selvagem (BY4742). A: BY4742 ALD4-2 mutante com redução da tolerância. B: BY4742 ALD4-3 mutante sem influência na tolerância máxima, mas com indícios de melhor resistência ao estresse por esse metabólito.....	47
Figura 15 – Determinação da tolerância máxima ao etanol das linhagens BMA64-1A IXR1 Δ e BMA64-1A CTA1 Δ	48
Figura 16 – Teste de tolerância ao etanol por tempo prolongado realizado com as tolerâncias máximas de cada linhagem (SEY6210 = 24%, SEY6210 ALD4-1 = 28%)	48
Figura 17 – Teste de estresse ao etanol prolongado à cepa BMA64-1A CTA1 Δ	49
Figura 18 – Análise comparativa de crescimento com e sem fatores estressores.....	50
Figura 19 - Ensaio comparativo de crescimento com e sem fatores estressores.....	52
Figura 20 - Experimento comparativo de crescimento com e sem fatores estressores.....	53
Figura 21 – Efeito da deleção de CTA1 adaptado.....	57

1 INTRODUÇÃO

1.1 Bioetanol

O início do século XXI tem sido marcado pelo grande incentivo ao uso de biocombustíveis em substituição àqueles provindos de fontes fósseis (ex. gás natural, o carvão mineral e o petróleo) devido à queda na disponibilidade desse tipo de combustível, o crescimento populacional, o aquecimento global e ao avanço industrial, o qual tem elevado as necessidades energéticas mundiais (MUSSATTO et al., 2010).

Os biocombustíveis compreendem todos os produtos úteis para a geração de energia obtidos de uma biomassa (matéria prima de origem vegetal ou animal, passível de ser utilizada para a produção de bioenergia) (TOLMASQUIM, 2016). A substituição dos combustíveis derivados de petróleo por combustíveis advindos de biomassas, tais como o bioetanol, o biodiesel, o bio-hidrogênio, os derivados de bagaço e palha de cana-de-açúcar e milho, deve-se ao fato dos recursos fósseis serem finitos e carecem de substitutos capazes de atender às necessidades energéticas atualmente cobertas por estes (SARKAR et al., 2012).

O bioetanol é o biocombustível mais utilizado comercialmente no Brasil, sendo obtido a partir da fermentação alcoólica dos açúcares simples e fermentescíveis. Estes açúcares podem ser extraídos diretamente da cana-de-açúcar, beterraba, sorgo e soro (CHAKRABORTY et al., 2012), a qual a glicólise e a fermentação são as vias complementares para a produção desse composto (DELLOMONACO; FAVA; GONZALEZ, 2010).

O surgimento do bioetanol remonta ao século XX, tendo inicialmente um uso industrial e residencial. Apenas em 1922, passou a ser vislumbrado como uma alternativa à gasolina, iniciando a utilização do mesmo como combustível no Brasil (BRAY; FERREIRA; RUAS, 2000). Um grande marco dos biocombustíveis se deu com a crise do petróleo de 1973, quando se iniciaram as pesquisas para obtenção de energias renováveis, esses trabalhos acabaram por originar o Proálcool e Proóleo, com o objetivo de substituir a gasolina e o diesel, respectivamente. (MELO, 2018)

Sua produção tem o potencial de apoiar, e até mesmo superar, o esgotamento atual de fontes de combustíveis fósseis. Além disso, no quesito sustentabilidade e no que tange às questões ambientais, tais como o aquecimento global e as mudanças climáticas, o bioetanol supera os combustíveis fósseis (DODO; MAMPHWELI; OKOH, 2017).

Devido às políticas públicas brasileiras que intensificam a busca por combustíveis de fontes renováveis, o Brasil é um país de referência na pesquisa de biocombustíveis e uso destes como substituição ao uso integral dos combustíveis derivados do petróleo. Pode-se citar o Proálcool como uma dessas políticas, sendo que este programa vai desde a busca por espécies com maior rendimento de produção, até o desenvolvimento de motores capazes de aceitar misturas de biocombustíveis e combustíveis derivados do petróleo (MELO, 2018)

Outro importante programa provindo das políticas públicas brasileiras foi o Programa Nacional de Produção e uso de Biodiesel (PNPB), este visou não só um impacto ambiental, como um incentivo aos pequenos produtores, já que a matéria prima para este biocombustível deveria vir destes. Inicialmente foi implementado 2% deste biodiesel em meio ao diesel comum, aumentando gradativamente este valor para 5% e por fim para 20%, o que contribuiria tanto para economia, quanto para o fator sustentabilidade e independência dos combustíveis de origem fóssil (MELO, 2018). Entendendo os impactos sociais, econômicos e ambientais, é possível visualizar o por que os biocombustíveis, em especial o bioetanol, têm atraído amplo interesse regional, nacional e internacional, tornando-os objetos de grande interesse científico e industrial (SARKAR et al., 2012).

Existem alguns tipos de produção de bioetanol no cenário brasileiro, sendo aquele a partir da cana-de-açúcar (1ª geração) o mais utilizado, há também o processo a partir do milho (1ª geração) e os de segunda geração, que usam os resíduos dos de primeira em sua produção. Além das tradicionais usinas de cana, destilarias foram construídas para fermentar o amido de milho, reduzindo o gargalo de 4 meses do entressafra, com isto abriu-se uma nova perspectiva para o aumento da produção de etanol de primeira geração (LOPES et al., 2016).

Além dessas destilarias de milho, o Brasil também conta com duas plantas industriais em operação para a produção de etanol de segunda geração, com

uma outra que utiliza um processo semi-industrial, todas provindas do investimento do governo em etanol de segunda geração desde 2011. Todavia, os custos da produção de segunda geração ainda são elevados em vários aspectos, assim, iniciativas têm se concentrado na seleção de linhagens microbianas e na otimização das condições para produção, sendo ainda uma alternativa em desenvolvimento (LOPES et al., 2016).

Como citado, o processo de produção de bioetanol no Brasil foi bastante modificado, sendo que das opções de mercado brasileiro, atualmente a maior parcela se caracteriza principalmente pelo uso do esmagamento da cana-de-açúcar e fermentação em dornas de alta capacidade (até 3 milhões de litros), com alta concentração de leveduras no meio fermentativo (10-15%) (MUSSATTO et al., 2010). Assim sendo, este biocombustível é produzido por meio da fermentação alcoólica realizada pela levedura *Saccharomyces cerevisiae*, uma excelente produtora de etanol.

Ao longo de sua evolução, os microrganismos enfrentaram mudanças ambientais que os levaram ao desenvolvimento de mecanismos capazes de sentir e responder a diversos tipos de estressores. Alguns exemplos são a depleção de nutrientes, as mudanças na osmolaridade externa, temperaturas elevadas, concentração de etanol, entre outros fatores (MENSONIDES et al., 2005).

Durante o processo produtivo do etanol, as células da levedura encontram-se sujeitas a numerosos estresses físico-químicos, tendo como destaque a toxicidade pela concentração etanólica do meio e as altas temperaturas (WALLACE-SALINAS; GORWA-GRAUSLUND, 2013; YU et al., 2012).

O problema das elevadas concentrações de etanol (DIVATE et al., 2016) e das altas temperaturas (WALLACE-SALINAS; GORWA-GRAUSLUND, 2013) levam a efeitos de inibição do crescimento e viabilidade celular da levedura, além de limitar a hidrólise enzimática. Isso torna esses estressores, fatores limitantes da produção.

As respostas a esses estressores têm sido estudadas para o entendimento desses mecanismos, aumento da sobrevivência do microrganismo, aumento do seu desempenho sob condições estressantes, além

da eliminação de concorrentes indesejados durante seu uso industrial (MENSONIDES et al., 2005).

A compreensão dos eventos moleculares que ocorrem na levedura durante a resposta ao estresse por etanol e temperatura é algo muito importante. Uma melhor compreensão desses mecanismos pode culminar a uma melhor adaptação aos ataques ocorridos por esses estressores, consequentemente, pode levar a uma maior tolerância a estes (STANLEY et al., 2010a).

1.2 Biologia Celular da *Saccharomyces cerevisiae*

Segundo a classificação taxonômica, a *S. cerevisiae* se enquadra no Reino Fungi, Sub-reino Dikarya, Divisão Ascomycota, Subdivisão Saccharomycotina, Classe Saccharomycetes, Subclasse Saccharomycetidae, Ordem Sacaromicetal, Família Saccharomycetaceae, Gênero *Saccharomyces* Meyen e Espécie *Saccharomyces cerevisiae* (https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=194157#null. Acessado 13/08/2021). Estas leveduras são unicelulares, haplóides ou diplóides e com reprodução mitótica ou meiótica (Figura 1) (TAYLOR; BOWMAN; BERBEE, 1993).

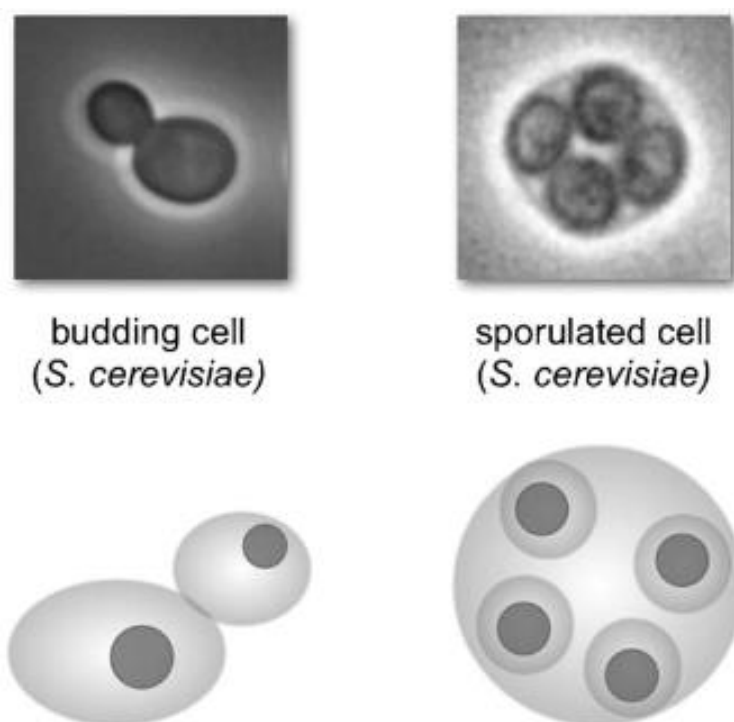


Figura 1 – Reprodução da *Saccharomyces cerevisiae* adaptado (KNOP, 2011)

As células de *S. cerevisiae* possuem aproximadamente entre 5 e 10µm de diâmetro (NGUYEN et al., 2017), sendo capazes de dividir-se a cada 90 minutos em condições nutricionais adequadas (SILVA, 2009). Esta levedura em um estado haplóide se divide pela formação de um broto, o qual surge durante a fase G1, crescendo até a mitose e separando-se, dando origem a um novo indivíduo (Figura 2).

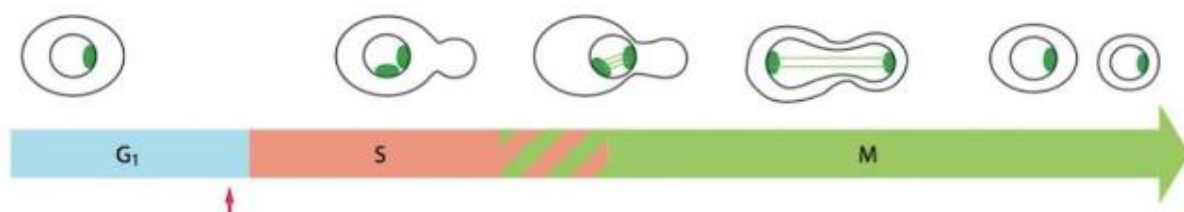


Figura 2 – Ciclo celular da *S. cerevisiae* adaptado de (ALMEIDA, 2017)

Este fungo é um organismo modelo (espécie não humana amplamente estudada para compreender uma gama de fenômenos biológicos, onde dados, modelos e teorias são aplicados à outros organismos (LEONELLI; ANKENY, 2013) e está entre os principais microrganismos escolhidos para o processo de produção de etanol (MUSSATTO et al., 2010). Ela tem sido amplamente utilizada para estudos de variabilidade genética, expressão gênica, interações entre proteínas, função de proteínas, identificação de novas estruturas proteicas etc. Seu uso para a produção de bioetanol advém da sua grande capacidade fermentativa e taxa de crescimento em condições anaeróbias, além da relativa alta tolerância ao etanol, temperatura e outros inibidores (BROWN et al., 2013; CHRISTOFOLETTI et al., 2013; MUSSATTO et al., 2010).

A *S. cerevisiae* é uma ótima escolha para testes laboratoriais devido a algumas características, tais como: ausência de patogenicidade para o operador (GRAS – Geralmente Seguro (*generally regarded as safe*)), grande facilidade de teste de biologia molecular (PCR, Enzimas de restrição etc), é um organismo de fácil cultivo, fácil capacidade de isolamento de OGMs (Organismos geneticamente modificados), ser passível de técnicas de transformação (tornar a célula apta a receber um plasmídeo exógeno), ter alta tolerância contra inibidores tóxicos e produtos finais, entre outras características (GOFFEAU et al., 1996; LIAN; HAMEDIRAD; ZHAO, 2018).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em uma visão geral, o trabalho trata sob a hipótese de que alguns genes têm um importante papel na tolerância da levedura a certos estressores presentes no processo fermentativo. Para melhor compreensão dos mecanismos de tolerância, foi analisada a inativação de certos genes e observado que a ausência destes afetavam a levedura durante os estresses etanólico e térmico.

Apesar dos estressores estudados ocorrerem de forma simultânea durante o processo fermentativo, o entendimento individual destes processos é essencial na busca pela melhoria do processo industrial. Diante disso, foi investigado como os genes selecionados afetavam na maquinaria celular durante o estresse etanólico e visualizou-se a importância destes como reguladores chave na capacidade de crescimento, mesmo em condições desfavoráveis a qual, com exceção de SEY6210 ALD4-1, os demais mutantes apresentaram quedas na capacidade de sobrevivência.

Outro importante ponto é a tolerância térmica, que é um fator limitante não só da produção do etanol de primeira geração, mas também no de segunda geração. Os resultados deste trabalho colaboram para um estudo de genes ligados a este estressor a fim de obter cepas com maior interesse comercial.

Os resultados obtidos salientam que esses estressores não trabalham de forma isolada, sendo assim, estudos de dupla deleção ou o aprofundamento no âmbito de testes duplos de estresse, são opções para um melhor entendimento do papel destes genes nessas tolerâncias.

Conclui-se que os genes CTA1, IXR1 e ALD4 estão diretamente relacionados à tolerância ao etanol, sendo possíveis reguladores-chave dentro das cepas estudadas. Foi constatado que estes possuem algum papel na regulação da tolerância térmica, porém com menor relevância do que os do estresse etanólico.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, L. FOGAÇA DE. **Análise das linhagens de Saccharomyces cerevisiae expostas ao estresse por etanol.** [s.l.] UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA, 2017.
- BACAËR, N. Verhulst e a equação logística na dinâmica populacional. **European Communications in Mathematical and Theoretical Biology**, v. 10, p. 24 – 26, 2008.
- BALAKUMAR, S.; ARASARATNAM, V. Osmo-, thermo- and ethanol- tolerances of. **Brazilian Journal of Microbiology**, p. 157–166, 2012.
- BARREIRO-ALONSO, A. et al. The HMGB protein Ixr1 interacts with Ssn8 and Tdh3 involved in transcriptional regulation. **FEMS yeast research**, v. 18, n. 2, p. 1–10, 2018.
- BIRCH, R. M.; WALKER, G. M. Influence of magnesium ions on heat shock and ethanol stress responses of Saccharomyces cerevisiae. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 26, n. 9–10, p. 678–687, 2000.
- BRAY, M.; FERREIRA, I.; RUAS, P. **A Evolução da Produção de Etanol no Brasil** Documentos técnicos científicos., , 2000.
- BROWN, N. A. et al. Transcriptional profiling of Brazilian Saccharomyces cerevisiae strains selected for semi-continuous fermentation of sugarcane must. **FEMS Yeast Research**, v. 13, n. 3, p. 277–290, 2013.
- CHA, S. et al. Differential activation mechanisms of two isoforms of Gcr1 transcription factor generated from spliced and un-spliced transcripts in Saccharomyces cerevisiae. **Nucleic Acids Research**, v. 49, n. 2, p. 745–759, 2021.
- CHAKRABORTY, S. et al. Biomass to biofuel: a review on production technology. **ASIA-PACIFIC JOURNAL OF CHEMICAL ENGINEERING**, v. 7, n. 17, p. 743–753, 2012.
- CHENG, Y. et al. Protective Effects of Arginine on Saccharomyces cerevisiae Against Ethanol Stress. **Scientific Reports**, v. 6, n. February, p. 1–12, 2016.
- CHERRY, J. M. et al. Saccharomyces Genome Database: The genomics resource of budding yeast. **Nucleic Acids Research**, v. 40, n. D1, p. 700–705, 2012.

CHRISTOFOLETTI, C. A. et al. Sugarcane vinasse: Environmental implications of its use. **Waste Management**, v. 33, n. 12, p. 2752–2761, 2013.

DELLOMONACO, C.; FAVA, F.; GONZALEZ, R. The path to next generation biofuels: Successes and challenges in the era of synthetic biology. **Microbial Cell Factories**, v. 9, p. 1–15, 2010.

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.

DIVATE, N. R. et al. Engineering *Saccharomyces cerevisiae* for improvement in ethanol tolerance by accumulation of trehalose. **Bioengineered**, v. 7, n. 6, p. 445–458, 2016.

DODO, C. M.; MAMPHWELI, S.; OKOH, O. Bioethanol production from lignocellulosic sugarcane leaves and tops. **Journal of Energy in Southern Africa**, v. 28, n. 3, p. 1, 2017.

DU, X.; TAKAGI, H. N-Acetyltransferase Mpr1 confers ethanol tolerance on *Saccharomyces cerevisiae* by reducing reactive oxygen species. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 75, n. 6, p. 1343–1351, 2007.

FOX, J. The R Commander. **Journal of Statistical Software**, v. 14, n. 9, p. 1–42, 2005.

FRACZEK, M. G.; NASEEB, S.; DELNERI, D. History of genome editing in yeast. **Yeast**, v. 35, n. 5, p. 361–368, 2018.

FRED, S. Getting started with yeast. **Methods in Enzymology**, v. 350, p. 3–41, 2002.

GOFFEAU, A. et al. Life with 6000 Genes. **Science**, v. 274, n. 5287, p. 546–567, 25 out. 1996.

HALL, M. A. et al. The WEKA data mining software: an update. **SIGKDD Explorations**, v. 11, n. 1, p. 10–18, 2009.

INGRAM, L. O. Ethanol tolerance in bacteria. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 9, n. 4, p. 305–319, 1989.

JIA, K.; ZHANG, Y.; LI, Y. Systematic engineering of microorganisms to improve alcohol tolerance. **Engineering in Life Sciences**, v. 10, n. 5, p. 422–429, 2010.

KANEHISA, M.; GOTO, S. KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. **Nucleic acids research**, v. 28, n. 1, p. 27–30, 1 jan. 2000.

KLEIN, M. et al. Glycerol metabolism and transport in yeast and fungi: established knowledge and ambiguities. **Environmental Microbiology**, v. 19, n. 3, p. 878–893, 2017.

KNOP, M. Yeast cell morphology and sexual reproduction - A short overview and some considerations. **Comptes Rendus - Biologies**, v. 334, n. 8–9, p. 599–606, 2011.

KONG, Q. X. et al. Overexpressing GLT1 in *gpd1Δ* mutant to improve the production of ethanol of *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 73, n. 6, p. 1382–1386, 2007.

LEON, X. **Increasing stress tolerance in *Saccharomyces cerevisiae* using lipocalin genes**. [s.l.] University of Tennessee at Chattanooga, 2021.

LEONELLI, S.; ANKENY, R. A. What makes a model organism? **Endeavour**, v. 37, n. 4, p. 209–212, 2013.

LIAN, J.; HAMEDIRAD, M.; ZHAO, H. Advancing Metabolic Engineering of *Saccharomyces cerevisiae* Using the CRISPR/Cas System. **Biotechnology Journal**, v. 13, n. 9, p. 1–11, 2018.

LOPES, M. L. et al. Ethanol production in Brazil: a bridge between science and industry. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, p. 64–76, 2016.

MA, M.; LIU, Z. L. Mechanisms of ethanol tolerance in *saccharomyces cerevisiae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 87, n. 3, p. 829–845, 2010.

MAGER, W. H.; FERREIRA, P. M. Stress response of yeast. **Biochemical Journal**, v. 290, n. 1, p. 1–13, 2015.

MANI, R. S.; CHINNAIYAN, A. M. Triggers for genomic rearrangements: Insights into genomic, cellular and environmental influences. **Nature Reviews Genetics**, v. 11, n. 12, p. 819–829, 2010.

MELO, M. C. DE R. E. **Políticas Públicas Brasileiras de Biocombustíveis: Estudo comparativo entre os programas de incentivos à produção, com ênfase em etanol e biodiesel**. [s.l.] Universidade Federal de Uberlândia, 2018.

MENSONIDES, F. I. C. et al. Activation of the protein kinase C1 pathway upon continuous heat stress in *Saccharomyces cerevisiae* is triggered by an intracellular increase in osmolarity due to trehalose accumulation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 8, p. 4531–4538, 2005.

MOJICA, F. J. M.; RODRIGUEZ-VALERA, F. The discovery of CRISPR in

archaea and bacteria. **FEBS Journal**, n. July, p. 3162–3169, 2016.

MOTA, M. N.; MARTINS, L. C.; SÁ-CORREIA, I. The identification of genetic determinants of methanol tolerance in yeast suggests differences in methanol and ethanol toxicity mechanisms and candidates for improved methanol tolerance engineering. **Journal of Fungi**, v. 7, n. 2, p. 1–28, 2021.

MUSSATTO, S. I. et al. Technological trends, global market, and challenges of bio-ethanol production. **Biotechnology Advances**, v. 28, n. 6, p. 817–830, 2010.

NAITO, Y. et al. CRISPRdirect: Software for designing CRISPR/Cas guide RNA with reduced off-target sites. **Bioinformatics**, v. 31, n. 7, p. 1120–1123, 2015.

NAVARRO-TAPIA, E. et al. Ethanol cellular defense induce unfolded protein response in yeast. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. FEB, p. 1–12, 2016.

NGUYEN, K. et al. Morphology, cell division, and viability of *Saccharomyces cerevisiae* at high hydrostatic pressure. p. 1–19, 2017.

RAN, F. A. et al. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. **Nature Protocols**, v. 8, n. 11, p. 2281–2308, 2013.

SAINT-PRIX, F.; BÖNQUIST, L.; DEQUIN, S. Functional analysis of the ALD gene family of *Saccharomyces cerevisiae* during anaerobic growth on glucose: The NADP⁺-dependent Ald6p and Ald5p isoforms play a major role in acetate formation. **Microbiology**, v. 150, n. 7, p. 2209–2220, 2004.

SARKAR, N. et al. Bioethanol production from agricultural wastes: An overview. **Renewable Energy**, v. 37, n. 1, p. 19–27, 2012.

SILVA, A. F. CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE LINHAGENS DE *Saccharomyces cerevisiae* ISOLADAS DE FERMENTAÇÕES ESPONTÂNEAS DE CACHAÇAS DE ALAMBIQUE DA BAHIA. Dissertação de mestrado. p. 115, 2009.

SINGER, M. A.; LINDQUIST, S. Thermotolerance in *Saccharomyces cerevisiae*: the Yin and Yang of trehalose. v. 16, n. November, p. 460–468, 1998.

STANLEY, D. et al. Transcriptional changes associated with ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 88, n. 1, p. 231–239, 2010a.

STANLEY, D. et al. The ethanol stress response and ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 109, n. 1, p.

13–24, 2010b.

STOVICEK, V.; HOLKENBRINK, C.; BORODINA, I. CRISPR/Cas system for yeast genome engineering: advances and applications. **FEMS yeast research**, v. 17, n. 5, p. 1–16, 2017.

TAYLOR, J. W.; BOWMAN, B. H.; BERBEE, M. L. Fungal model organisms: Phylogenetics of *saccharomyces*, *aspergillus*, and *neurospora*. **Systematic Biology**, v. 42, n. 4, p. 440–457, 1993.

TOLMASQUIM, M. T. **Energia Renovável: Hidráulica, Biomassa, Eólica, Solar, Oceânica**. Rio de Janeiro: EPE, 2016.

WALLACE-SALINAS, V.; GORWA-GRAUSLUND, M. F. Adaptive evolution of an industrial strain of *Saccharomyces cerevisiae* for combined tolerance to inhibitors and temperature. **Biotechnology for Biofuels**, v. 6, n. 1, p. 1–9, 2013.

WEINBERGER, M. et al. Growth signaling promotes chronological aging in budding yeast by inducing superoxide anions that inhibit quiescence. **Aging**, v. 2, n. 10, p. 709–726, 27 out. 2010.

WOLF, I. R. et al. The ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae* under a phenomics perspective. p. 1–41, 2021.

YU, K. O. et al. Increased ethanol production from glycerol by *Saccharomyces cerevisiae* strains with enhanced stress tolerance from the overexpression of SAGA complex components. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 51, n. 4, p. 237–243, 2012.

ZHANG, F.; WEN, Y.; GUO, X. CRISPR/Cas9 for genome editing: Progress, implications and challenges. **Human Molecular Genetics**, v. 23, n. R1, p. 40–46, 2014.

ZHANG, M.; SHI, J.; JIANG, L. Modulation of mitochondrial membrane integrity and ROS formation by high temperature in *Saccharomyces cerevisiae*. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 18, n. 3, p. 202–209, 2015.