



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
INSTITUTO DE QUÍMICA – CAMPUS ARARAQUARA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

GABRIELA DE SÁ AZARIAS

**“ANÁLISE PROTEÔMICA DA LEVEDURA *Saccharomyces cerevisiae* CAT-1
CULTIVADA EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE SACAROSE”**

Orientador: Prof. Dr. Luis Henrique Souza Guimarães

Co-Orientador: Prof. Dr. José Roberto Ernandes

Araraquara

2015

Gabriela de Sá Azarias

**“ANÁLISE PROTEÔMICA DA LEVEDURA *Saccharomyces cerevisiae* CAT-1
CULTIVADA EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE SACAROSE”**

Dissertação apresentada ao Instituto de Química da
Universidade Estadual Paulista como parte dos requisitos
para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Luis Henrique Souza Guimarães

Co-Orientador: Prof. Dr. José Roberto Ernandes

Araraquara

2015

FICHA CATALOGRÁFICA

A992a Azarias, Gabriela de Sá
Análise proteômica da levedura *Saccharomyces cerevisiae*
CAT-1 cultivada em diferentes concentrações de sacarose: /
Gabriela de Sá Azarias. – Araraquara : [s.n], 2015
101 f. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Química

Orientador: Luis Henrique Souza Guimarães

Coorientador: José Roberto Ernandes

1. Proteômica. 2. Leveduras. 3. Etanol. 4. Fermentação .
5. Microbiologia industrial. I. Título.

GABRIELA DE SÁ AZARIAS

Dissertação apresentada ao Instituto de
Química, Universidade Estadual Paulista,
como parte dos requisitos para obtenção do
título de Mestra em Biotecnologia.

Araraquara, 24 de abril de 2015.

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. LUIS HENRIQUE SOUZA GUIMARÃES (Orientador)
Faculdade de Filosofia Ciências e Letras / USP / Ribeirão Preto



Prof. Dr. ARTHUR HENRIQUE CAVALCANTE DE OLIVEIRA
Faculdade de Filosofia Ciências e Letras / USP / Ribeirão Preto



Profª. Drª. SÍLVIA ISABEL PALMA FERREIRA
Universidade Federal de São Carlos / UFSCAR / São Carlos

Dados Curriculares

Gabriela de Sá Azarias graduou-se em Bacharelado em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de São Carlos no ano de 2012. Atualmente é membro do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” no curso de mestrado, onde desenvolveu sua dissertação intitulada “Análise proteômica da levedura *Saccharomyces cerevisiae* CAT-1 cultivada em diferentes concentrações de sacarose” no laboratório de Biologia Celular e Microbiologia da Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto- USP e também no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular de Microrganismos-UNESP, sob orientação do Prof. Dr. Luis Henrique Souza Guimarães. Tem experiência na área de Microbiologia com ênfase em bioquímica, microbiologia industrial e biologia molecular. Durante o curso de mestrado realizou o curso “Entrepreneurship for graduate in chemistry: a glance for brazilian competitiveness, innovation and development (IQ-UNESP)”, participou como monitora das áreas de Microbiologia e Bioquímica na “VII Mostra de Biologia (FFCLRP-USP)” e apresentou trabalho intitulado “Análise proteômica diferencial de *Saccharomyces cerevisiae* CAT-1: fermentação em alta e baixa concentração de sacarose” em formato de pôster no XXII Congresso Latinoamericano de Microbiologia- ALAM 2014 (Colômbia). Além disso, participou como ouvinte em seminários gerais proferidos ao longo do semestre por doutorandos do PPG-Biotecnologia.

“Nunca deixe que lhe digam que não vale a pena
Acreditar no sonho que se tem
Ou que seus planos nunca vão dar certo
Ou que você nunca vai ser alguém
Tem gente que machuca os outros
Tem gente que não sabe amar

Mas eu sei que um dia a gente aprende
Se você quiser alguém em quem confiar
Confie em si mesmo
Quem acredita sempre alcança...”

(Renato Russo e Flávio Venturini)

"A sós ninguém está sozinho,
É caminhando que se faz o caminho..."

(Sérgio Britto)

Dedico este trabalho à minha família,
Ademir (*in memoriam*), Silvana e Izabelle,
por todo apoio, compreensão, amor e união
em todos os passos desta e de muitas outras caminhadas.
Amo vocês.

Agradecimentos

Agradeço a Deus, por ser minha fortaleza e meu norte, por me dar sabedoria nos momentos de adversidade e por todas as bênçãos a mim concedidas.

Ao meu pai Ademir, por um dia ter me falado em uma de nossas longas conversas que o conhecimento é o único bem que ninguém nunca vai poder tirar de mim. Sinto muito sua falta, pai e com certeza este esforço também é por você. Agradeço a minha mãe Silvana, por tudo que tem feito por mim, nunca se deixando abater, meu exemplo de pessoa, mãe e mulher. Agradeço minha irmã Izabelle, pela amizade e compreensão.

Ao meu orientador, Professor Dr. Luis Henrique Souza Guimarães, pela orientação, confiança e oportunidade.

Ao meu co-orientador, Professor Dr. José Roberto Ernandes, pela grande ajuda, pelas discussões de pontos chave do trabalho e pela amizade.

Ao professor Rubens Monti, à professora Maria Teresa Marques Novo Mansur e ao professor Humberto Milagre pelo auxílio e por me abrirem as portas de suas salas e laboratórios, mostrando que ainda existem profissionais voltados à formação de pessoas e cientistas melhores.

Aos professores João Atílio Jorge, Maria de Lourdes Teixeira de Moraes Polizeli e Maria Célia Bertolini pela disponibilização de parte de sua estrutura para o desenvolvimento deste trabalho e pela paciência.

Aos professores José Cesar Rosa e Arthur Henrique Cavalcanti de Oliveira pela colaboração e disponibilização das estruturas de seus laboratórios.

Aos técnicos Maurício, Ricardo e Mariana, de Ribeirão Preto, e ao Tarcísio, de Araraquara, pelo auxílio no desenvolvimento dos experimentos, pelas conversas,

amizade e especialmente pela paciência e carinho com o qual sempre me trataram. Maurício, obrigada por todo seu cuidado para comigo!

Aos amigos de laboratório de Ribeirão Preto: Josana Messias, José Carlos Salgado, Cynthia Rustiguel, Vanessa Sato, Larissa Valera, Thaís Barboni, Taíse Landgraf, Rosimar Coutinho, Luciana Zioti, Paulo Heinen, Paula Zaghetto, Marita Gimenez, Liliane Fraga, Tony Márcio, Maysa Parente e Caio Carvalho, pela amizade, companheirismo, pelas alegrias compartilhadas e pelas inúmeras bandejadas coletivas, além de disponibilizarem sempre suas casas para minha estadia na cidade.

Aos amigos de laboratório de Araraquara: Heloisy Barbosa, Thiago Candido, Stella Virgílio, Kely Imamura, Rodrigo Duarte, Ana Carolina Boni, Fernanda Cupertino, Fernanda Zanolli e Pablo Mateos, pela paciência e acolhida. Thiago e Helô, vocês foram muito importantes para todo o desenrolar deste trabalho!

Aos amigos de longa data: Isabella Lacativa, Leilane, Gabriela Boarini, Melissa, Gabriela Leal, André Sargentini, Isabella Sampaio, André Pereira, Felipe Rocco, Victor, Leonardo, Lucas, Bassam, Melina, Maria Manuela, Marina, Josiane, Luiza, Danilo e Juliana, vocês enchem minha vida de aventuras e alegrias. Obrigada pela amizade em qualquer circunstancia.

À Rosicler, Pedro e Leonardo Lessi, pela acolhida e amabilidade.

À Elaine, Gabriela e Carlos, por abrirem as portas de suas casas e pela acolhida tão familiar.

À Nilza e ao Alceu (vó e vô), por me ensinarem a humildade e a verdadeira sabedoria.

Ao Bruno Lessi, meu namorado, pelo carinho, compreensão e paciência. Obrigada pelos conselhos nos momentos críticos e por toda sua amizade, amor e companheirismo.

Aos funcionários da USP e da UNESP que contribuíram direta ou indiretamente com este trabalho, especialmente à Maria Isabel Uthman (biblioteca).

À CAPES e FAPESP pelo apoio financeiro.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema representativo da rota bioquímica de <i>S. cerevisiae</i> para a obtenção de etanol como produto final.....	29
Figura 2. Representação de fermentação por processo Melle-Boinot..	32
Figura 3. Foto de Microscopia de varredura de levedura <i>S. cerevisiae</i> .	37
Figura 4. Hidrólise da sacarose pela enzima invertase.....	44
Figura 5. Diferentes vias de utilização de sacarose pela levedura <i>S. cerevisiae</i> .	45
Figura 6. Perfil do consumo de açúcar pela levedura CAT-1 para as três condições estudadas.	58
Figura 7. Produção de biomassa em função do tempo de cultivo em mosto com diferentes concentrações de sacarose (14, 21, 30 e 2%).	61
Figura 8. Viabilidade celular em função do tempo de cultivo em mosto contendo 14, 21, 30 e 2% de sacarose.	65
Figura 9. Viabilidade celular em números absolutos para os cultivos de 14% de sacarose no mosto industrial (A), 21% de sacarose no mosto industrial (B), 30% de sacarose no mosto industrial (C) e 2% de sacarose (D).	68
Figura 10. Atividade Invertásica relacionada ao tempo de cultivo para as quatro condições fermentativas (sacarose 14, 21, 30 e 2%).	71
Figura 11. Rendimento alcoólico obtido através de fermentações com CAT-1 para os três diferentes teores de sacarose em função do tempo de cultivo.	74
Figura 12. SDS-PAGE para amostras proteicas intracelulares obtidas após cultivo da levedura CAT-1 em mosto com diferentes concentrações de sacarose..	77
Figura 13. SDS-PAGE para amostras protéicas intracelulares obtidas após cultivo da levedura CAT-1 em meio composto por 2% de sacarose (raias de 2-4) e perfil eletroforético do mosto original estéril, que continha 14% de sacarose (raias 5-6). A raia 1 apresenta o marcador molecular.	78
Figura 14. Triplicatas dos géis obtidos para os cultivos contendo 14% de sacarose (rotulação vermelha) e 30% de sacarose (rotulação verde). Cada um dos géis foi obtido em corrida eletroforética independente.....	79
Figura 15. Gel Master (A) e perfis eletroforéticos bidimensionais dos extratos celulares obtidos a partir dos cultivos em mosto contendo 14% (B) e 30% (C) de sacarose. Os círculos vermelhos indicam os spots diferenciais segundo o teste t de Student, os azuis indicam spots proteicos quantitativamente diferenciais e os verdes indicam spots protéicos qualitativamente diferenciais.	80

Figura 16. Gráfico de dispersão correlacionando spots do grupo 14% e spots do grupo 30% (A) e do grupo 30% e 14% (B). A linha preta agrupa os spots presentes em ambos os grupos. A linhas vermelha e azul consideram os resultados quantitativos (menores ou maiores que duas vezes, respectivamente). A linha verde indica a regressão linear. Esta figura foi gerada pelo software PDQuest, sem quaisquer alterações, baseada no gel master elaborado.87

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Relação entre o rendimento alcoólico obtido neste estudo e o rendimento esperado (teórico).....	76
Tabela 2. Análise e taxas de correlação dos géis correspondentes às condições de cultivo de levedura em 14 e 30% de sacarose.	82
Tabela 3. Identificação dos spots protéicos de <i>S. cerevisiae</i> CAT-1 sob condições de cultivo contendo 14% e 30% de sacarose.	83

LISTA DE ABREVIATURAS

μL – Microlitros

μm – Micrometros

μmol - Micromol

2D – Bidimensional

2D- DIGE - Fluorescence Difference 2-D gel electrophoresis

ADH – Álcool Desidrogenase

atm – Atmosferas

ATP – Adenosina Trifosfato

BSA – Bovine Soroalbumin

Ccrit – Concentração Crítica

CENAL – Comissão Executiva Nacional do Álcool

DNS - ácido 3,5-dinitrosalicílico.

DTT – Dithiothreitol

f – fator de conversão de absorbância em massa seca

FAN – Fontes Assimiláveis de Nitrogênio

HGF – *High Gravity Fermentation*

IAA – Instituto do Açúcar e Álcool

IEF – Isoelectric Focusing

IPG – Immobilized pH gradient

kDa – Quilodalton

M – Molar

mA – Milliamperes

MALDI-TOF/TOF – Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization -Time of Flight/

Time of Flight

MM: Massa Molecular

MS/MS - Mass Spectrometry/ Mass Spectrometry

NAD⁺ - Adenina Nucleotídeo

NADH - Dinucleótido de nicotinamida e adenina

ng – Nanogramas

PDC – Piruvato Descarboxilase

pI - Ponto Isoelétrico

rpm – Rotações Por Minuto

SDS - *Sodium Dodecyl Sulfate*

TCA – Ácido Tricloroacético

V – Volts

VHGF – *Very High Gravity Fermentation*

W – Watts

$\times g$ – Aceleração da Gravidade

YPD-ágar – *Yeast Peptone Dextrose* agar

YPGlic – meio *Yeast Peptone* Glicose

YPSac – meio *Yeast Peptone* Sacarose

nm - nanômetros.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	21
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	23
2.1. Etanol: histórico e condições do setor na atualidade.....	24
2.2. Fermentação alcoólica: bioquímica e o processo brasileiro	28
2.2.2. Obtenção de etanol no Brasil.	30
2.3. Tecnologias relacionadas ao mosto fermentativo: Very High Gravity Fermentation (VHGF) e High Gravity Fermentation (HGF).....	34
2.4. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> : generalidades e a linhagem CAT-1	35
2.5. Proteômica	40
2.5.1 Proteômica: técnica e generalidades.....	40
2.5.2. Proteômica de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> : estado da arte	41
2.6. β -D-frutofuranosidase.....	43
3. OBJETIVOS.....	46
4. MATERIAIS E MÉTODOS	48
4.1 Microrganismo	49
4.2 Meios, preparação de inóculo e cultivo.....	49
4.3 Ativação e manutenção da linhagem.....	50
4.4 Obtenção de células pós-cultivo e ruptura celular	50
4.5 Quantificação da proteína total.....	51
4.6 Precipitação de proteínas e solubilização.....	51
4.7 Eletroforese unidimensional	51
4.8 Re-hidratação das tiras de IPG e Focalização Isoelétrica (IEF)	51
4.9 Equilíbrio das tiras e segunda dimensão	52
4.10 Visualização dos géis	52
4.11 Captura e análise de imagens	53
4.12 Excisão dos spots dos géis bidimensionais e digestão trípica.....	53
4.13 Dessalinização dos spots em micro-tips com resina C18.....	54
4.14 Análise por MALDI-TOF/TOF e identificação protéica.....	54
4.15 Determinação do crescimento celular.....	54
4.16 Viabilidade celular.....	55

4.17 Consumo da fonte de carbono	55
4.18 Atividade invertásica.....	55
4.19 Produção de etanol.....	56
 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	 57
5.1 Quantificação de açúcares redutores:	58
5.2 Parâmetros fermentativos.....	59
5.2.1 Biomassa.....	59
5.2.2 Viabilidade celular	63
5.3 Atividade invertásica:.....	70
5.4 Rendimento alcoólico	73
5.5 Eletroforese unidimensional	76
5.6 Análise proteômica	79
 6. CONCLUSÕES.....	 90
 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	 91

RESUMO

Com a crescente demanda nacional e internacional de bioetanol combustível a indústria alcooleira carece de mais estudos que possam beneficiar a produtividade sem que haja aumento exacerbado de investimentos. Para tanto, faz-se necessário conhecimento bioquímico e fisiológico dos microrganismos, bem como otimização do meio de cultivo e das condições fermentativas. A análise proteômica, proposta neste trabalho, é uma ferramenta chave na elucidação das alterações sofridas pelo microrganismo quando exposto a adversidades como, por exemplo, dificuldade de aeração, baixa manutenção do pH e variações de teor de sacarose no mosto e no melaço de acordo com cada safra, casos recorrentes nos processos fermentativos industriais. Sendo assim, foi objetivo deste trabalho investigar as alterações bioquímicas sofridas por *Saccharomyces cerevisiae* linhagem CAT-1 cultivada em 30% (*very high gravity fermentation*) e 14% (*high gravity fermentation*) de concentração de sacarose. As análises foram realizadas por eletroforese bidimensional, seguida por espectrometria de massa (MALDI-TOF/TOF). Os resultados demonstram a presença de 22 spots protéicos diferenciais entre as duas condições no que diz respeito às análises quantitativas, qualitativas e estatísticas, dentre os quais quatro foram seqüenciados e correspondem às proteínas GRX1p, Rtc3p, ENO2p e ADH1p. Adicionalmente, a atividade invertásica foi analisada para a compreensão da repressão catabólica, sendo que a atividade enzimática atingiu seu pico de produção no tempo de 10h em cultivos contendo 30% de sacarose ($13,68 \pm 2,26 \text{ U} \cdot \text{ml}^{-1}$). As análises de rendimento etanólico e viabilidade celular demonstram que cultivos contendo 30% de sacarose apresentam resultados vantajosos frente aos cultivos contendo 14% de sacarose, uma vez que proporcionaram um rendimento alcoólico de 15,99% e 99,2% de células viáveis ao final de cada fermentação, valores muito próximos aos rendimentos teóricos esperados para um processo industrial. A biomassa e açúcares redutores também foram quantificados.

ABSTRACT

Because of the national and international increasing demand for fuel ethanol, the alcohol industry needs more studies to benefit productivity without exacerbated increased investment. Therefore, it is necessary biochemical and physiological knowledge of the microorganisms and optimization of the medium and fermentation conditions. The proteomic analysis proposed in this work is a key tool in the elucidation of the changes suffered by the microorganism when exposed to adversity as, for example, aeration difficulty, low pH maintenance and sugar content of the mash and variations in molasses according to the harvest, recurrent situations in industrial fermentation processes. So, the aim of this study was to investigate the biochemical changes suffered by *Saccharomyces cerevisiae* CAT-1 grown by 30% (very high gravity fermentation) and 14% (high gravity fermentation) sucrose concentration. The analysis were performed by two-dimensional electrophoresis followed by mass spectrometry (MALDI-TOF/TOF). The results showed the presence of 22 differential protein spots between the two conditions with regard to quantitative analysis, qualitative and statistics analysis. Four of these spots were sequenced and correspond to GRX1p, Rtc3p, ENO2p and ADH1p. Additionally, the invertase activity was analyzed for understanding the catabolite repression and the enzyme activity reached its peak in 10 h in cultures containing 30% sucrose ($13.68 \pm 2,26 \text{U.ml}^{-1}$). The ethanol yield and cell viability analysis showed that cultures containing 30% sucrose show advantageous results when compared to cultures containing 14% sucrose, once these cultures provided an ethanol yield of 15.99% and 99.2% viable cells at the end of each fermentation, very close to the theoretical values expected for an industrial process. Biomass and reducing sugars were also quantified.

Introdução

1. INTRODUÇÃO

Apesar de muito importantes para diversos processos industriais, as leveduras ainda são pouco valorizadas no ambiente científico, especialmente aquelas que contribuem para a indústria de alimentos e sucroalcooleira, como é o caso da *Saccharomyces cerevisiae*. Talvez por serem utilizadas, ainda que de maneira desconhecida, desde os primórdios da humanidade sem que se pudesse observar dano ou perigo à saúde humana, estes microrganismos não patogênicos acabaram tendo sua biologia e fisiologia bem estudadas, sendo ainda utilizado como modelo biológico em estudos bioquímicos e fisiológicos de eucariotos.

Entretanto nos dias atuais, muitos ramos da economia mundial que dependem deste microrganismo especificamente demonstram interesse em desenvolver processos cada vez mais viáveis, aumentando a produtividade, diminuindo tempo de processo e consequentemente aumentando o lucro e reduzindo os custos. Sabe-se que os substratos utilizados por microrganismos para a obtenção de produtos de interesse comercial devem receber atenção especial, principalmente na área de bioprocessos, contribuindo positivamente para a otimização destes. Porém, a condução do processo ocorre através do metabolismo desempenhado por um organismo vivo, que também apresenta características adversas de acordo com o meio ao qual é colocado, podendo ou não gerar de uma maneira ótima os produtos esperados.

Este trabalho foi realizado no intuito de compreender a fisiologia e a bioquímica pouco explorada da levedura *Saccharomyces cerevisiae* da linhagem CAT-1, uma levedura brasileira empregada em aproximadamente 50% das unidades produtoras de etanol do país, submentendo-a a diferentes condições, levando em consideração processos já bem estabelecidos para o setor (fermentação com alta gravidade de sólidos dissolvidos no meio) e também processos ainda pouco explorados, com uma maior quantidade de sólidos dissolvidos no meio. Desta forma, esperamos contribuir no melhoramento dos processos, assim como no condicionamento e no emprego desta levedura que apresenta um potencial excepcional na produtividade etanólica e também da enzima invertase, produto de interesse da indústria de bebidas e alimentos.

Ademais, a ferramenta de proteômica pode fornecer um panorama geral da expressão de genes codificantes de proteínas que podem ter papel chave no desempenho da levedura no processo fermentativo, propiciando entendimento metabólico deste microrganismo numa realidade industrial, podendo então fornecer

uma gama de informações necessárias para o desenvolvimento futuro de fermentações de larga escala com novos critérios, visando lucro, sustentabilidade e manutenção do setor sucroalcooleiro, que vem enfrentando crises sequenciais no país.

Outros aspectos como viabilidade celular, biomassa, atividade invertásica e produtividade etanólica foram também analisados.

Revisão Bibliográfica

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Etanol: histórico e condições do setor na atualidade

As monoculturas de cana-de-açúcar foram introduzidas no Brasil em 1532 no estado de Pernambuco, onde originou-se o primeiro engenho, coincidente com o período colonial (séculos XVI e XVII), quando o açúcar imperava como uma valiosa moeda de troca mercantil entre a colônia recém-formada e a Europa. A partir desta primeira plantação e suas conseqüências como, por exemplo, elevados lucros aos produtores, a cana-de-açúcar passou a ser plantada ostensivamente em grandes terrenos no litoral nordestino do país, voltados à produção de açúcar (Vieira et al., 2007).

De acordo com Vieira e colaboradores (2007), apesar de muitas décadas de desenvolvimento das culturas canavieiras no país, o etanol passou a ser utilizado como combustível apenas no século XX, sendo anteriormente produzido apenas com o intuito de compor as bebidas alcoólicas. A partir de 1930 teve seu uso esporádico como aditivo à gasolina em proporções não regulamentadas por legislação alguma, variando de acordo com a região do país em que era empregado.

Desde sua descoberta, o petróleo vem sendo utilizado extensivamente como combustível, sendo que nos dias atuais enfrentamos grandes oscilações de preços dos barris por se tratar de um recurso de acesso restrito e esgotável. Entre os anos de 1973 e 1974, período no qual o país importava cerca de 80% de todo o petróleo que consumia, houve a primeira grande crise do petróleo e em 1975 foi criado pelo governo federal o Proálcool, programa que visou a regulamentação da mistura de álcool anidro à gasolina para que diminuíssem as importações de petróleo como fonte exclusiva de combustível, contendo assim os gastos elevados com os barris de petróleo (Vieira et al., 2007). Além disso, através deste programa o governo lançou uma linha de crédito que impulsionou rapidamente o aumento das monoculturas de cana-de-açúcar por todo o país, proporcionando a instalação de novas unidades produtoras em novas áreas próximas aos maiores centros de consumo, equipadas com maquinários que comportassem grandes fluxos de produção. Este programa foi o maior, em todo o mundo, que visou a substituição de petróleo por energia obtida através de biomassa (fonte renovável) (ÚNICA, 2007).

Na primeira etapa do Proálcool houve a criação do CENAL (Comissão Executiva Nacional do Álcool), cuja função era definir as participações programáticas dos órgãos

direta ou indiretamente vinculados ao Programa, com vistas a atender a expansão da produção do etanol; definir os critérios de localização a serem observados na implantação de novos projetos de destilarias; estabelecer a programação anual dos diversos tipos de etanol, especificando o seu uso; decidir sobre o enquadramento das propostas e/ou projetos para modernização, ampliação ou implantação de destilarias nos objetivos do Programa; e definir os critérios de localização a serem observados na implantação de unidades armazenadoras (ÚNICA, 2006). A criação do Instituto do Açúcar e do Alcool (IAA) foi necessária para o respaldo científico e organizacional prestado ao CENAL. Houve ainda a disponibilização de financiamentos pelo Banco do Brasil. A segunda etapa do programa se caracterizou pelo forte estímulo à produção de etanol hidratado voltado ao seu uso como combustível direto em veículos automotores (Pitta e Mendonça, 2010). Após a finalização do programa, de acordo com Baccarin (2005), a extinção do IAA gerou uma desregulamentação do setor, o que garantiu a competitividade do etanol perante a gasolina, o que preparou o mercado para consumo de veículos movidos a ambos combustíveis disponíveis, ou seja, veículos tipo flex-fuel.

Em 1989, ano em que o Proálcool foi completamente extinguido, aproximadamente 60% da gasolina havia sido substituída por álcool no Brasil. Apesar de todo este cenário positivo proporcionado pela excelente execução do Proálcool, a elevação do preço do açúcar no mercado internacional e a queda do preço do barril de petróleo fez com o que os produtores se voltassem totalmente à produção de açúcar, levando a uma semiexaustão do etanol para o mercado consumidor interno, o que desacreditou o setor alcooleiro perante a sociedade daquela época. Este fator esteve totalmente relacionado ao fato de que a grande maioria das usinas brasileiras produzem açúcar e etanol na mesma planta produtora, o que não ocorre em outros países (Rabobank Industry Note, 2012).

A comercialização de etanol combustível voltou a ser uma realidade apenas em 2003, quando foram lançados veículos com motorização flex-fuel, ou seja, que poderiam ser abastecidos por gasolina, etanol ou por uma mistura destes dois combustíveis. Com a alta do petróleo e a grande produtividade da indústria sucroalcooleira, o etanol passou a ser novamente atraente ao consumidor. Desde 2003, 80% dos novos carros inseridos na frota brasileira apresentam motorização flex, sendo estes então 50% de todos os veículos circulantes no país. A partir deste novo cenário, 110 novas unidades produtoras de açúcar e etanol foram criadas no período de 2005/2006 a 2010/2011 (Rabobank Industry Note, 2012).

Embora a trajetória da produção alcoólica tenha apresentado pontos positivos e negativos, o Brasil detém aproximadamente 40 anos de experiência na produção e no uso do bioetanol como combustível e tem atualmente aproximadamente 40% de sua frota de veículos automotivos (motor de ciclo Otto) abastecida diretamente pelo combustível ou através da adição compulsória deste à gasolina, que varia de 20% a 25% de acordo com o mercado financeiro e o cenário político anualmente estabelecido. O Brasil é o único país do mundo onde o consumo de combustível alternativo supera o consumo de gasolina (UNICA, 2007)

Na safra 2013/2014, o país produziu cerca de 654mil toneladas de cana de açúcar, 35mil toneladas de açúcar, 11mil toneladas de etanol anidro, 15mil toneladas de etanol hidratado (ÚNICA, 2015). Reconhecido no mercado internacional por apresentar os menores custos de produção, o Brasil também é líder na área de biotecnologia vegetal que engloba conhecimentos em cana-de-açúcar (Vieira *et al.*, 2007), tendo atualmente como maior concorrente os EUA, que produzem etanol a partir do milho.

Mundialmente, o Brasil passou a ter lugar de destaque frente à disponibilidade e uso de um combustível obtido de maneira limpa e renovável, o que auxiliou na queda dos níveis de gases do efeito estufa, como é o caso do monóxido de carbono (50% de redução). Ademais, substituiu o antigo aditivo para a gasolina, o chumbo tetraetila, composto responsável por impactos negativos frente à saúde pública, por causar intoxicações aos trabalhadores do setor, e ao meio ambiente, através de contaminação de ar, solo e água (Landrigan, 2002).

O Proálcool deixou como herança um país com uma excelente infraestrutura no que se refere à produção e ao consumo de etanol em larga escala, detentor até os dias atuais de amplos conhecimentos científicos e tecnológicos nesta área. Mundialmente a produção alcoólica através da cana-de-açúcar consolida-se como a energia alternativa mais atraente atualmente disponibilizada no mundo em termos de sustentabilidade e biossegurança (Vieira *et al.*, 2007).

A partir de 1990 o planejamento e a gestão do setor sucroalcooleiro deixaram de ser liderados pelo setor público e passaram a ser responsabilidade da iniciativa privada. Atualmente representa um setor importante para a economia do país, embora conte com pouco subsidio governamental, apresentando preços bastante oscilatórios, variando de acordo com a oferta e a demanda (Vieira *et al.*, 2007).

Atualmente o país enfrenta uma crise na produção de etanol por razões que variam desde altas taxas tributárias até problemas com o replantio da planta de cana-de-açúcar. De acordo com o Rabobank Industry Note (2012), o replantio vem sendo dificultado pela exaustão a que a cana e seus subprodutos, como é o caso da vinhaça, levam o solo. Assim, a taxa de substituição das plantas tem diminuído ano após ano e a produção esta baseada, muitas vezes, em plantas antigas que apresentam menor potencial de rendimento. Outras complexidades ambientais estão compreendidas nos microclimas gerados pelas plantações de cana-de-açúcar, caracterizados pela escassez de água, gerando um clima bastante seco e com a temperatura elevada, o que enfraquece as safras (Rabobank Industry Note, 2012).

O setor vem enfrentando uma grande crise originada em meados de 2008, que alterou completamente as expansões previamente observadas: houve redução do ritmo de crescimento da produção, aumentou a dependência do setor de créditos subsidiados e também a expropriação de pequenos produtores (trazendo danos às lavouras voltadas a produção de alimentos). De acordo com Pitta e Mendonça (2010), outro fator que levou o setor a ter problemas financeiros graves foi a modernização arcaica do Brasil neste aspecto, através de subsídios estatais, aumento no uso de insumos químicos e mecanização extensiva, o que, segundo os autores, remete à *queda tendencial da taxa de renda da terra* previamente descrita por Marx.

Com a crise financeira mundial de 2008, muitas usinas canavieiras não conseguiram honrar os financiamentos concedidos antes deste ano, deixando credores e fornecedores sem pagamento. Desta forma, a produtividade neste período tornou-se economicamente insustentável, pois os gastos com produção e pagamentos de dívidas superaram a renda e, desta maneira, as unidades ficaram sem crédito no mercado, falindo ou sendo compradas por grandes companhias, como é o caso da Raízen (empresa do grupo Cosan-Shell). Em 2000, empresas estrangeiras tinham participação de apenas 1% no setor e, em 2010, subiu para 30% (Pitta e Mendonça, 2010). Neste sentido, faz-se necessária a inserção de novas tecnologias tanto nas plantas industriais quanto ampliação de conhecimento técnico-científico do processo como um todo, que envolve microrganismos, vegetais e meio ambiente, para diminuir gastos e impactos ambientais, permitindo o escape à crise que se instalou.

2.2. Fermentação alcoólica: bioquímica e o processo brasileiro

2.2.1. A bioquímica da fermentação alcoólica

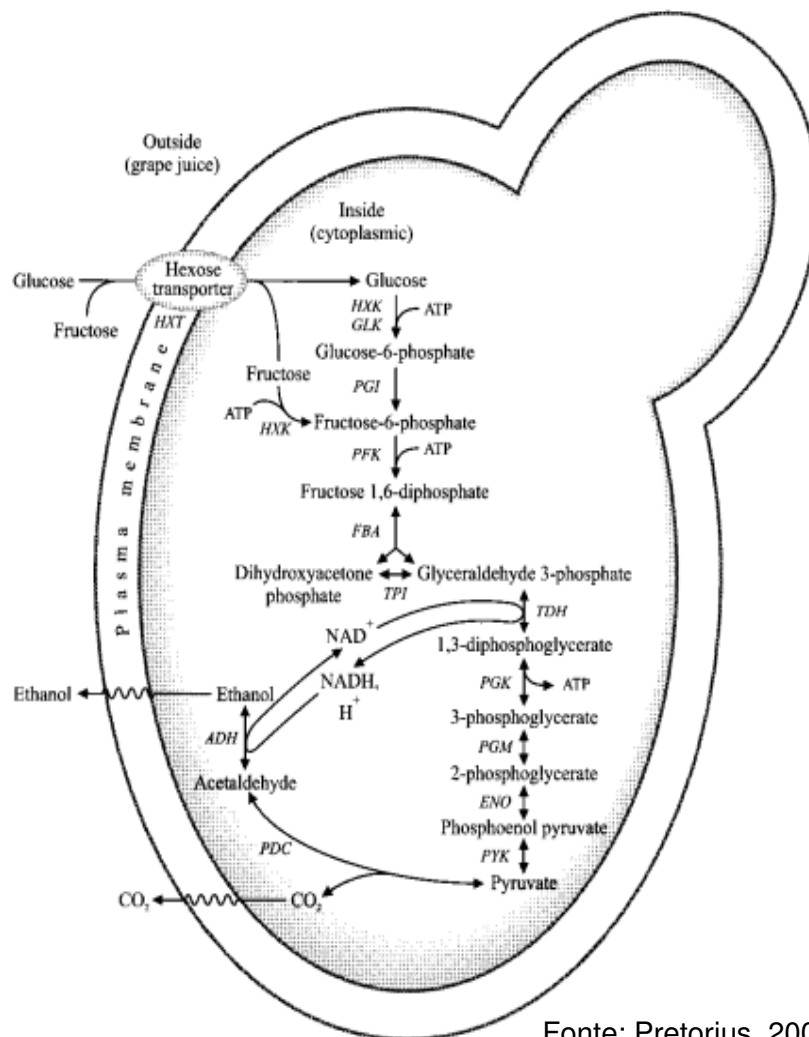
A fermentação alcoólica é um processo anaeróbio e catalisado por enzimas microbianas que compreende a transformação de sacarose ou açúcares simples em etanol e CO₂. Segundo Villen (2009), este processo é descrito desde as primeiras civilizações como, por exemplo, através da elaboração de alimentos e bebidas fermentadas por sumérios e egípcios, mesmo sem conhecimento básico dos microrganismos responsáveis pelas transformações das mais diversas matérias primas em produtos e tampouco da disponibilidade de tecnologias que facilitassem esses processos. O processo denominado fermentação pode ser definido como uma reação onde ocorre liberação de energia de açúcares e/ou outras moléculas orgânicas, que ocorre na ausência de oxigênio, embora muitas vezes ocorra a presença de baixas taxas de oxigênio dissolvido no meio, apresentando uma molécula orgânica como aceptor de final de elétrons e desprendendo duas moléculas de ATP para cada molécula inicial, normalmente uma hexose, uma vez que a maior parte da energia original permanece nas ligações químicas dos produtos finais, como é o caso do etanol (Tortora, Funke e Case, 2010).

A conversão de sacarose em etanol e gás carbônico se dá através de 12 reações seqüenciais que ocorrem no citoplasma microbiano, cada qual com sua enzima específica, com destaque àquelas que compreendem as reações da via glicolítica. Na fermentação alcoólica, uma molécula de glicose é convertida em duas moléculas de ácido pirúvico e duas moléculas de ATP. As duas moléculas de ácido pirúvico são convertidas em duas moléculas de acetaldeído e duas moléculas de CO₂, através da ação da enzima piruvato descarboxilase (PDC). Após esta reação, as duas moléculas de acetaldeído são reduzidas por duas moléculas de NADH e sofrem ação da enzima álcool desidrogenase (ADH), dando origem a duas moléculas de etanol (Pretorius, 2000). Duas moléculas de ATP produzidas na glicólise auxiliam na biossíntese das leveduras estabelecendo assim forte correlação entre a multiplicação de leveduras como subproduto e a obtenção de etanol como produto principal (Pacheco, 2010). De acordo com Badotti (2005), uma levedura colocada em meio anaeróbio ou com alta concentração de açúcar fermenta de maneira efetiva, pois a enzima piruvato descarboxilase é ativada. Uma das enzimas mais relevantes durante o processo de glicólise é a fosfofrutoquinase, que poderia ser inibida caso não ocorresse o consumo

contínuo de ATP pelas células de levedura em crescimento e brotamento, inviabilizando completamente a rota glicolítica (Bai apud Pacheco 2010).

Para a biotecnologia é essencial conhecer a capacidade fermentativa e respiratória das leveduras para que assim possam realizar-se estudos voltados a novos ou otimizados processos fermentativos. Na figura 1, pode-se observar a rota bioquímica dos açúcares fermentescíveis até a obtenção do etanol, considerando-se a célula de uma levedura.

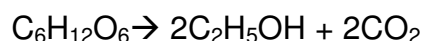
Figura 1. Esquema representativo da rota bioquímica de *S. cerevisiae* para a obtenção de etanol como produto final.



Fonte: Pretorius, 2000.

O rendimento teórico de conversão de 180g de açúcar em 92g de etanol (51,1%) e 88g de CO₂ (48,9%) não é observado em nenhum dos processos realizados no mundo, pois não leva em consideração nenhuma necessidade nutricional de

crescimento das células de levedura, consumo dos nutrientes por outros microrganismos indesejáveis ao processo, produção de outros metabólitos como, por exemplo, a trealose e o glicerol, e perda de etanol na forma de vapor (Boulton et al, 1996 apud. Pretorius, 2000). A equação de Gay Lussac representa o rendimento especificamente no número de moléculas e representa estequiometricamente o rendimento previamente descrito:



O etanol alcança concentrações entre 12 e 14% (v/v) em uma fermentação normal bem conduzida (Barre et al., 2004). Outros produtos formados durante o processo são: glicerol, ácido succínico, ácido acético, alcoóis superiores, ésteres, aldeídos, cetonas, ácidos graxos, gás sulfídrico, furfural e óleos essenciais. Segundo Alcarde (2007), existem diversos resíduos originados a partir da produção de etanol, chamados de subprodutos por apresentarem valor agregado. Até o presente momento, sabe-se que o excedente de gás carbônico pode ser comercializado, especialmente para a indústria de alimentos e bebidas. O óleo fúsel compõe-se de alcoóis superiores e resulta da destilação do etanol e é comercializado para a indústria química e de cosméticos. A torta de filtro, resultante da clarificação do caldo, é outro subproduto de valor comercial agregado, pois tem potencial de aplicação como fertilizante em lavouras e também como suplemento na alimentação animal, pois é uma rica fonte de nitrogênio, fósforo e outros minerais, além de conter altas taxas de proteínas e lipídeos (Meneguetti et al., 2010)

2.2.2. Obtenção de etanol no Brasil.

No Brasil, a matéria prima para o bioetanol combustível é a cana-de-açúcar, como descrito previamente, composta em sua maior parte por sacarose. Em outros países, a obtenção destes combustíveis baseia-se em matérias primas como o milho, a beterraba, o sorgo sacarino, entre outras (Berg, 2002). A partir da moenda da cana-de-açúcar, que consiste em extrair o caldo da planta, separando-o de fibras, pode-se obter o melaço e o caldo de cana-de-açúcar, ou mosto, sendo este último amplamente utilizado para produção de etanol em escala industrial no país. De acordo com Andrietta e colaboradores (2006), o rendimento etanólico atual num processo bem conduzido é de 80 litros de combustível para 1 tonelada de cana de açúcar.

Segundo Silveira (2013), as principais características desta fermentação são alta densidade celular, curto tempo de fermentação e reciclagem de leveduras. Este processo ocorre com aproximadamente 21% de sólidos (21°BRIX) dissolvidos, gerando um vinho com baixa concentração etílica, propriedade que provoca altos gastos energéticos durante a destilação e secundariamente produz grandes volumes de vinhaça. Este processo gera altos impactos ambientais, pois a vinhaça é um composto obtido em grandes volumes (aproximadamente 15 Litros: 1 Litro de álcool) que é altamente tóxico e poluente, não possuindo ainda uma destinação adequada.

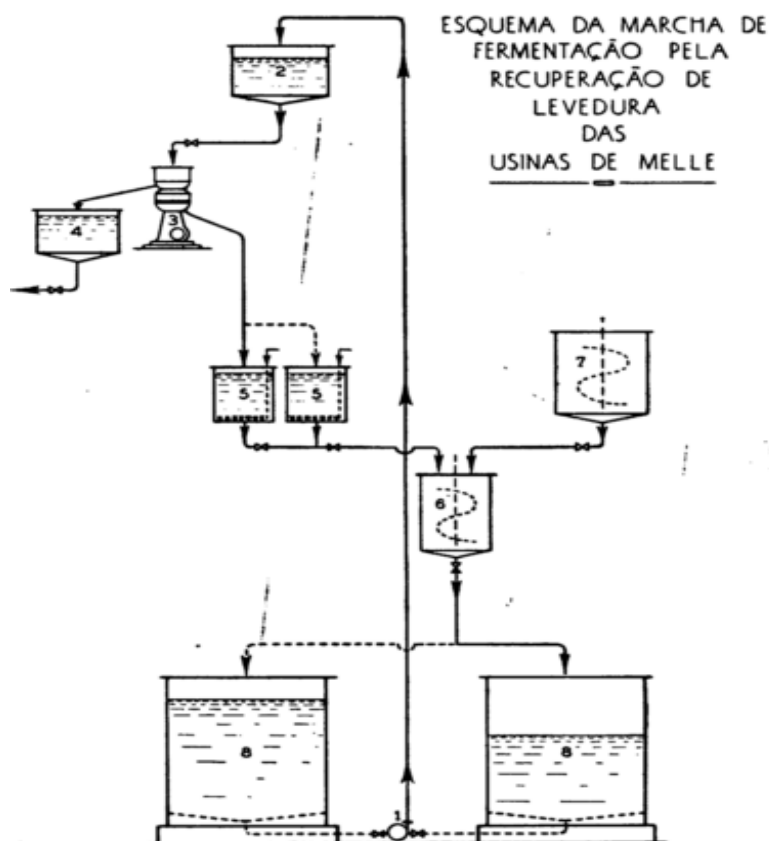
O mosto utilizado para fermentação na fabricação de etanol combustível nas usinas é obtido através do melaço e do caldo de cana-de-açúcar clarificado, compostos onde o açúcar predominante é a sacarose. Para que este processo se tornasse eficiente, leveduras *Saccharomyces cerevisiae* foram selecionadas pelo homem de forma que apresentassem as características adequadas a cada processo. Entretanto ainda são necessários estudos adicionais a fim de conhecer e obter microrganismos com alta produtividade e que apresentem menores custos de aplicação industrial (Basso et al., 2011).

A fermentação alcoólica por ação de leveduras *S. cerevisiae* ocorre pelo consumo de açúcares, produção de etanol e gás carbônico como consequência do metabolismo primário, sendo dividida em três partes: preparo do mosto, processo fermentativo e destilação do vinho (Lima et al., 2001). De acordo com Reis (2011), o sistema em batelada é o que apresenta maior rendimento do processo e melhor mensuração do rendimento. Além disso, causa impactos menos significativos no fermento, o que possibilita a obtenção de teores alcoólicos mais elevados, bem como melhor assepsia das dornas e maior controle de vazão (Reis, 2011).

O processo aplicado à produção de etanol no Brasil é o método de “Melle-Boinot”, um tipo de batelada alimentada presente em 70% de todas as usinas do país, onde o substrato é alimentado sob condições rigidamente controladas até que o volume máximo do biorreator seja atingido (Carvalho e Sato, 2011). A figura 2 representa o primeiro delineamento do método de Melle-Boinot para as usinas brasileiras e, embora date de 1944, representa fielmente o processo observado para a produção do etanol no Brasil. Quando um processo de batelada alimentada é conduzido com altas densidades celulares ocorre uma alta produtividade, pois a mortalidade celular é reduzida. De acordo com Viegas (2003), a adição gradativa de substrato possibilita o controle da concentração de açúcares, o que minimiza os efeitos de inibição por substrato. A

adição de mosto ocorre de forma contínua, apresentando então uma vazão de alimentação constante, entretanto estando passível de controle frente ao estado geral do processo. Segundo Carvalho e Sato (2011) é possível deslocar o metabolismo microbiano para uma determinada via metabólica através do controle de volume de substrato no reator, o que leva ao acúmulo de produto específico; esta característica é bastante desejável no sentido de diminuir a alta produtividade de vinhaça, desviando completamente a rota para a produção de etanol e outros subprodutos com menor toxicidade. Quando o melaço é utilizado como matéria prima o rendimento de uma usina produtora de etanol fica em torno de 87%, apresentando uma produtividade de 7,9 g de etanol por litro por hora (Viegas, 2003).

Figura 2. Representação de fermentação por processo Melle-Boinot. 1- Inóculo na bomba de recalque; 2- Depósito de espera; 3- Centrífuga; 4- Dorna de Espera; 5- Depósito de lêvedo; 6- Mexedor de lêvedo; 7- Diluidores para armazenamento de mosto; 8- Dorna principal de fermentação.



Fonte: Anais da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 1944.

Os grandes tanques onde ocorrem as fermentações são conhecidos por dornas, que podem ser abertas ou fechadas. Estas dornas nada mais são do que reatores do tipo tanque agitado. As dornas abertas permitem que até 2% do etanol produzido seja perdido na forma de vapor, porém o dióxido de carbono produzido é eliminado diretamente. As dornas fechadas são mantidas por reguladores térmicos (serpentinhas ou placas de resfriamento) a temperatura entre 33°C e 35°C e reduzem esta perda de etanol, porém requerem o bom funcionamento de sistema coletor de dióxido de carbono e etanol. Em ambas situações de processo, ocorre a destinação dos dois produtos para a torre de recuperação, que promove a lavagem do dióxido de carbono, visando a maior recuperação possível de etanol (Pacheco, 2010).

Geralmente o processo de fermentação alcoólica nas usinas brasileiras pode ser dividido em três partes: unidade de tratamento ácido, fermentadores e destiladores e centrífugas para separação de células de leveduras, totalizando um tempo de fermentação que varia de 6 a 10 h (Amorim Neto, 2009). Como previamente descrito, o sistema em batelada alimentada apresenta maior rendimento, maior teor alcoólico ao final do processo, menor suscetibilidade a contaminações e maior flexibilidade de acordo com o grau de autonomia do processo (Amorim, 2005). Por haver produção concomitante de etanol e açúcar, o sistema de batelada alimentada é o mais aceito por técnicos e engenheiros de processo.

A centrifugação é uma etapa onde ocorre a separação da massa de leveduras do vinho obtido durante a fermentação, visando retorno destes microrganismos em excelentes condições para seu futuro emprego no próximo processo. Esta recirculação é bastante viável já que reduz os custos para a reposição de agentes fermentadores, além de eliminar a necessidade da fase de produção de inóculo, uma vez que as células já estão adaptadas ao meio e com densidade celular ajustada. De acordo com Furtado e Scandiffio (2006), após a separação das leveduras e do etanol, o vinho é encaminhado às colunas de destilação e o precipitado de células de leveduras obtido na centrifugação é ressuspenso em água e ácido sulfúrico, sendo então as células colocadas em um pH baixo (variando de 2 a 2,5), o que promoverá a eliminação de microrganismos contaminantes e indesejáveis; a este procedimento dá-se o nome de pé-de-cuba ou cuba de tratamento, que tem duração de aproximadamente 4 h, até que as leveduras estejam recuperadas e viáveis para o início de um novo ciclo fermentativo.

Na finalização da fermentação, o vinho depositado no interior das dornas apresenta em sua composição água e alcoóis. Além deles, pode-se observar no interior

das dornas o dióxido de carbono dissolvido, sais minerais, leveduras e outros microrganismos, açúcares não fermentados, matéria prima inutilizada, óleo fúsel, aldeídos e alguns ácidos orgânicos (Pacheco, 2010). As leveduras são separadas por centrifugação, enquanto o restante do vinho é conduzido à destilação-retificação, obtendo-se o etanol hidratado, cuja concentração alcoólica varia entre 96 e 97% (v/v), e o etanol anidro como produtos finais. De acordo com Belter e colaboradores (1988), deve haver estado de equilíbrio entre uma fase líquida e uma fase gasosa, ajustadas a pressão e temperatura ideais para que se consiga uma diferença relativa de concentração das substâncias a serem separadas nesta etapa crucial ao processo.

2.3.Tecnologias relacionadas ao mosto fermentativo: Very High Gravity Fermentation (VHGF) e High Gravity Fermentation (HGF).

As usinas, tanto no Brasil como em outros países, utilizam-se de tecnologias fermentativas bem estabelecidas para que o processo de obtenção tanto de etanol quanto de açúcar possa ser o mais igualitário possível nas mais discrepantes safras. A high gravity fermentation é a tecnologia mais utilizada em usinas e destilarias de todo o mundo desde 1980, quando foi proposta. Esta tecnologia duplicou os rendimentos de etanol para o setor, que antes obtinha 7-8% (v/v) de concentração etanólica (Bai et al., 2008).

De acordo com Silveira (2013), o mosto empregado como substrato para fermentação nas usinas apresenta em torno de 21°Brix ou 21% de sólidos dissolvidos, o que proporciona uma baixa quantidade etanólica final, o que corrobora com um grande volume final de vinhaça. Segundo Puligundla e colaboradores (2011), na fermentação etanólica em condições de HGF o máximo de sólidos dissolvidos é de 24% (m/v), gerando de 10 a 12% (v/v) de etanol como produto final. Entretanto, nas condições da tecnologia VHGF a quantidade de sólidos dissolvidos deve ser maior ou igual a 27% (m/v), gerando como produto um etanol com concentrações variando entre 15-18% (v/v). De acordo com Thomas e Ingledew (1990), a tecnologia VHGF conta com 27% (m/v) de sólidos dissolvidos no meio, ocasionando níveis etanólicos de 19 a 21%, quando em ambientes completamente controlados.

A atual técnica de utilização do mosto ou caldo nas usinas, por gerar um etanol bastante diluído, promove altos gastos de água e de energia, que variam desde o preparo do material até o momento da destilação. Com a tecnologia VHGF, uma série de benefícios podem ser observados: aproximadamente 40% de economia de água se

comparado ao processo convencional, excelente nos dias atuais; incremento na produtividade de etanol; redução dos volumes e conseqüentes gastos com o tratamento da vinhaça; diminuição de aproximadamente 30% de gastos com energia, especialmente na fase de destilação; minimização da contaminação bacteriana, graças a alta osmolaridade do meio que não é bem tolerada especialmente por bactérias, o que reduziria os gastos com antibióticos ou outros métodos desenvolvidos para evitar as invasões bacterianas às dornas e, finalmente, menor custo global do processo, através das diminuições dos gastos citados (Puligundla et al., 2011).

A tecnologia VHGF apresenta a característica de alta osmolaridade do meio, o que poderia comprometer a fermentação pelas leveduras por causar alterações fisiológicas nestas células graças ao aumento interno da pressão osmótica. Consequentemente o teor etanólico ao final do processo é elevado, o que causaria, além do estresse osmótico inicial, também o estresse etanólico nas células observadas ao final do processo (Pereira et al., 2010). Entretanto, alguns trabalhos demonstram que uma alta taxa de células no inóculo de levedura prévio ao processo fermentativo ou a suplementação adequada do meio (fontes de nitrogênio, fontes de lipídeos etc.) somada à seleção de leveduras com características osmotolerantes pode favorecer o emprego da VHGF em diversas usinas sem que haja a necessidade de alteração das plantas de produção (Puligundla et al., 2011; Pradeep e Reddy, 2008).

Neste cenário, o estudo do processo como um todo se faz necessário, levando em conta tanto o microrganismo produtor quanto o meio e as fases implicadas na produção de etanol. A levedura *S. cerevisiae* é o microrganismo utilizado para ambos os tipos de fermentação previamente descritos, pois suas distintas linhagens podem resistir a condições adversas de processos, além de ser capaz de fermentar uma gama de hexoses e pentoses (Bai et al., 2008).

2.4. *Saccharomyces cerevisiae*: generalidades e a linhagem CAT-1

Atualmente muitas linhagens de *S. cerevisiae* são conhecidas e têm suas características estudadas por diferentes grupos de pesquisa. De acordo com Stewart e Russell, até o ano de 1998, foram identificadas aproximadamente 700 espécies de leveduras, porém com pouca caracterização das mesmas, apesar de estes microrganismos estarem relacionados qualitativamente e economicamente a relevantes processos industriais. Estima-se que até 2016 haverá um total de 1000 espécies de leveduras descritas (Lachance, 2006). Estes microrganismos apresentam como

aplicações a fermentação alcoólica para obtenção de bebidas, tais como cerveja e vinho, e de álcool combustível (Lodolo et al., 2008), processamento de alimentos como, por exemplo, pães (Viljoen et al., 2003; Romano et al., 2006) e a produção de proteínas heterólogas e pequenas moléculas com finalidade farmacêutica (Kolkman, 2005).

A levedura tem sido objeto de estudo tanto para biologia celular quanto para a biologia molecular, especialmente por ser um organismo relativamente simples, unicelular e eucariótico, o que serve como base para estudos correlacionando-a com outros eucariotos. Muitas proteínas humanas foram identificadas e tiveram estruturas e funções conhecidas através de estudos de homólogos em leveduras. Além disso, regulação e sinalização celulares em relação à assimilação de açúcares foram exaustivamente estudados e são bem conhecidos (Gancedo, 1998).

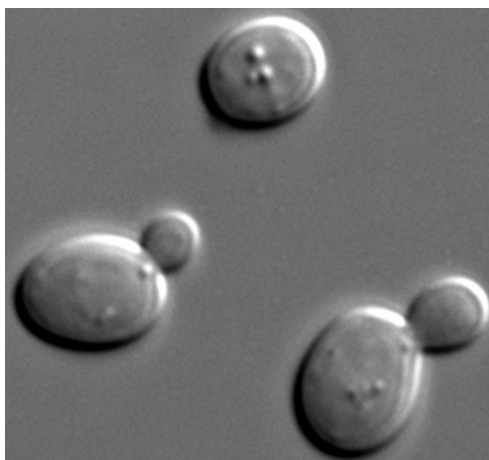
A levedura *S. cerevisiae* (figura 3) apresenta aproximadamente de 2 a 8 micrometros de diâmetro, com formato elipsóide e uma parede celular bastante densa. Podem apresentar-se totalmente desenvolvidos ou em forma de broto, quando em ambientes adequados a seu crescimento. De acordo com Lima e colaboradores (2001), apresenta inúmeras funções metabólicas, sendo inclusive capaz de alterar a estequiometria da fermentação de acordo com a condução do método fermentativo, proporcionando aumento da formação do produto de interesse. A escolha de espécies adequadas à fermentação alcoólica depende de alguns requisitos, como é descrito por Pacheco (2010): a velocidade de transformação de açúcar em álcool deve ser elevada, levando uma economia de tempo aos processos, o que proporciona economia monetária a cada processo finalizado; a resistência ao etanol é necessária, especialmente em processos VHGF; a eficiência de conversão deve ser elevada, uma vez que se não houver uma boa assimilação do substrato não haverá uma boa produtividade de etanol; apresentar resistência a alterações de pH, temperatura e antibióticos que possam ser empregados com o intuito de eliminar microrganismos indesejáveis e, especialmente, deve apresentar estabilidade genética, para que suas descendentes possam assegurar as mesmas características, logo o mesmo desempenho em todos os processos (Lima et al., 2001).

Estas características também corroboram as descritas por Andrietta e colaboradores (2008), onde descreve-se que *S. cerevisiae* apresenta alta taxa de crescimento, metaboliza de modo eficiente os açúcares a ela disponibilizados, produz e tolera bem altas concentrações de etanol e apresenta alta eficiência fermentativa. Além disso, adequa-se perfeitamente ao cenário industrial por se manter ativa em baixas

concentrações de oxigênio, tolerar variações na temperatura, apresentar atividade celular perante acidificação do meio e osmotolerância. Atualmente esta levedura é reconhecida como a mais adequada para a obtenção de etanol nas destilarias brasileiras, uma vez que se faz necessário neste tipo de processo o emprego de um microrganismo mais “robusto” por ocorrer produção em ambientes não estéreis, instáveis e mais suscetíveis a diferentes tipos de estresses (Reis, 2011).

De acordo com Barnett (1981), esta levedura mesmo na presença de oxigênio opta pela via anaeróbia para a metabolização dos açúcares, desde que a concentração de glicose esteja acima de um valor ao qual denomina-se concentração crítica (Ccrit), que oscila entre 0,09 e 0,9% em massa de glicose. Caso as concentrações estejam acima da Ccrit, a glicose causará uma repressão dos genes que expressam enzimas participantes no ciclo de Krebs, bem como enzimas da cadeia respiratória e estruturas mitocondriais, e promoverá a expressão de genes relacionados à fermentação (Barnett, 1981).

Figura 3. Foto de Microscopia de varredura de levedura *S. cerevisiae*.



Fonte: www.sciencenews.org

Em todos os processos industriais em que se utiliza a levedura *S. cerevisiae* os meios de cultivo devem conter necessariamente uma fonte de nitrogênio, uma fonte de carbono, sais e vitaminas (Horak, 1997 apud Silveira, 2013). Há algumas características que tornam o desempenho destes eucariotos bastante abaixo do ideal, sendo a principal delas a repressão catabólica ou a repressão por glicose. Como os meios disponíveis nas indústrias apresentam uma variedade de açúcares em suas composições, o consumo das fontes de carbono e nitrogênio deverá ocorrer

seqüencialmente, diminuindo o rendimento e a produtividade dos processos de interesse (Silveira, 2013). De acordo com Thevelein (1994), o comportamento diauxo das leveduras frente às fontes de carbono inicia-se preferencialmente com a glicose, sendo os demais açúcares consumidos após a exaustão desta e ocorre graças a repressão exercida pela glicose.

De acordo com Carvalho e Sato (2001), as leveduras em geral apresentam aproximadamente 25% de carbono em sua matéria seca, dividida entre parede celular e carboidratos de reserva e em média 60% de proteína bruta, com 20% de nitrogênio não orgânico, provenientes dos ácidos nucléicos e outros constituintes. As leveduras se reproduzem por um processo denominado gemulação, onde a nova célula se forma através de uma protuberância na célula mãe. Todas as células provenientes de um mesmo progenitor apresentam características genéticas idênticas. Outra característica relevante da *S. cerevisiae* é que esta apresenta comportamento de uma levedura Crabtree positivo, ou seja, mesmo em condições aeróbias a glicólise será desviada para a fermentação alcoólica, fato que ocorre porque se trata de um microrganismo facultativo ao oxigênio, somente apresentando metabolismo oxidativo quando colocado em meios com baixa concentração de fonte de carbono.

O completo sequenciamento do genoma deste organismo impulsiona cada vez mais as pesquisas de melhoramento genético e desenvolvimento de novas linhagens. Sabe-se que seu genoma apresenta tamanho de 12,1Mb. O genoma da linhagem CAT-1 foi determinado recentemente, por Babrzadeh e colaboradores (2012).

A linhagem utilizada como referência para todos os trabalhos que compreendem genômica apresentam como linhagem de referência a S288c. Babrzadeh e colaboradores (2012) seqüenciaram totalmente o genoma diplóide da linhagem CAT-1, que conta com 344 milhões de base, sendo identificados 34503 alelos heterozigotos, número que reflete a extensiva heterozigosidade da linhagem em questão. Os autores também demonstraram que a divergência da sequência genômica entre CAT-1 e outras linhagens é estimada entre 0.5-1% e encontra-se distribuída ao longo de todo o genoma e puderam elaborar a árvore filogenética que demonstra a proximidade da linhagem JAY291 e a de nosso interesse.

Aproximadamente 58% dos 6652 genes codificadores de proteínas observados para o genoma de CAT-1 apresentam diferentes alelos quando comparados aos genes presentes no genoma de referência. Quando comparadas, CAT-1 e PE-2, duas das leveduras mais utilizadas nas destilarias de todo o Brasil (Basso et al., 2008; Brown et

al., 2013), apresentam performances similares em distintos pontos da fermentação industrial. A disponibilidade da sequência genômica do esporo haplóide de PE-2, conhecido como JAY291, apresenta uma filogenia bastante próxima àquela observada para CAT-1, o que nos permite identificar algumas semelhanças quanto à genética de linhagens envolvidas nas fermentações industriais voltadas a obtenção de bioetanol (Babrzadeh et al., 2012).

A linhagem CAT-1 caracteriza-se como microrganismo bem floculante e que produz pouca espuma, fatores importantes para o manejo e performance do processo industrial (Basso et al., 2008). Já a linhagem S288c é não-floculante e apresenta uma mutação nonsense no regulador de transcrição *FLO8*, descrito por Liu e equipe (1996). De acordo com o trabalho de Babrzadeh e colaboradores (2012), tanto CAT-1, quanto a JAY291 não apresentam esta mutação, o que lhes confere as características positivas ao processo. Outro alelo identificado como *IRA2* relacionado à via de Ras-cAMP-PKA para CAT-1 está completamente relacionado à resistência ao estresse etanólico, embora os autores indiquem que esta via e suas interações gênicas necessitem ser mais estudadas.

A linhagem utilizada neste trabalho foi a CAT-1, isolada na Usina de Catanduva, que em conjunto com a linhagem PE-2 é utilizada aproximadamente por metade das destilarias brasileiras, sendo responsável pela produção de 60% de todo o etanol combustível do país (Basso et al., 2008; Brown et al., 2013). Esta linhagem vem sendo extensamente estudada pelo fato de apresentar grande tolerância a variáveis estressantes, como é o caso de aumento de temperatura. Estudos desenvolvidos por Amorim Neto e equipe (2009) demonstraram que em temperaturas relativamente amenas (30°C) a levedura CAT-1 não utiliza completamente a maltose disponibilizada no meio fermentativo. Adicionalmente, não foi capaz utilizar maltotriose. Surpreendentemente quando colocada em ambiente a 40°C, apresentou alto desempenho na fermentação de glicose, frutose e sacarose. Ainda segundo estes estudos, a CAT-1 é bastante tolerante a condições adversas de fermentação e mantém uma alta viabilidade sob diferentes condições fermentativas. A termotolerância pode ocorrer devido aos altos níveis intracelulares de trealose, glicerol e alta na síntese de *heat shock proteins*. Outro aspecto importante sobre essa linhagem é a manutenção da alta viabilidade mesmo nos estágios terminais das fermentações, apresentando alta eficiência fermentativa em altas concentrações de açúcar.

Considerando a importância desta linhagem de *S. cerevisiae*, o estudo proteômico desta levedura em diferentes concentrações de cultivo torna-se atrativo e interessante. De acordo com Kolkman e colaboradores (2005), os estudos de proteômica são limitados pelo número de produtos de genes que podem ser avaliados simultaneamente. Porém diversos estudos corroboram a hipótese de que a abundância de mRNA não é proporcional aos níveis de expressão proteica e, desse modo, é essencial o estudo de adaptação de leveduras à diferentes condições de estresses no nível proteômico.

2.5. Proteômica

2.5.1 Proteômica: técnica e generalidades

A proteômica consiste no estudo do conjunto de proteínas de um organismo e tem como objetivo prover uma visão compreensiva de sua estrutura, função e regulação nos sistemas biológicos. Avanços na instrumentação e nas metodologias da área da proteômica têm permitido a expansão do estudo das proteínas (Wilkins et al., 1996) e, embora tecnologias alternativas à eletroforese bidimensional (eletroforese-2D) tenham surgido, essa metodologia ainda é a mais acessível e funcional disponível para a resolução de milhares de proteínas simultaneamente de maneira eficiente (Rabilloud, 2002).

O proteoma é um conjunto completo de proteínas expressas por um genoma em uma situação celular específica, incluindo o conjunto de todas as proteínas, isoformas e modificações pós-traducionais (Newton et al., 2004). Segundo Wilkins e colaboradores (1996), a análise proteômica aplica-se na comparação de células em distintos momentos fisiológicos, sendo este tipo de informação muito útil para o estudo funcional de proteínas e seu envolvimento nas vias metabólicas celulares.

A eletroforese 2D é uma técnica que acopla a focalização isoeletrica (IEF), na primeira dimensão, ao SDS-PAGE, na segunda dimensão, permitindo assim a separação de uma mistura complexa de proteínas de acordo com seu ponto isoeletrico (pI), massa molecular (MM), solubilidade e abundância relativa (Görg et al., 2004). Dependendo do tamanho do gel e do gradiente de pH utilizado, a eletroforese 2D pode resolver mais de cinco mil proteínas simultaneamente e pode detectar quantidades menores do que 1ng de proteínas por spot. Os resultados então obtidos fornecem um

mapa de proteínas, o qual é capaz de revelar mudanças nos níveis de expressão protéica, isoformas ou modificações pós-traducionais (Görg et al., 2004).

Atualmente, a eletroforese bidimensional tem sido empregada em associação à espectrometria de massa, o que possibilita a identificação das proteínas isoladas a partir do gel 2D por meio do sequenciamento de alguns de seus peptídeos trípticos e comparação das sequências obtidas com as de proteínas “teóricas” presentes em banco de dados do organismo em estudo, anotadas a partir de sua sequência genômica.

Ao longo dos anos, avanços importantes têm sido introduzidos na eletroforese 2D, a qual tem mantido sua importância como instrumento para a análise proteômica (Görg et al., 2004), frente a outras técnicas emergentes. O aumento de resolução tem sido possível pela utilização de faixas mais estreitas de gradiente de pH durante a focalização isoeletrica, enquanto um aumento do nível de detecção de proteínas menos abundantes tem sido proposto pelo pré-fracionamento subcelular da amostra (Görg et al., 2004). Segundo Unlu e colaboradores (1997), é possível uma quantificação bastante precisa das proteínas que compõem o perfil do gel 2D pela técnica 2D-DIGE (Fluorescence Difference 2-D Gel Electrophoresis). A estratégia do fracionamento do extrato celular, como citado acima, é importante para a redução da complexidade da amostra e para seu enriquecimento com certas proteínas, tais como as encontradas em menor quantidade.

Em 2008, com o avanço na tecnologia em proteômica e em espectrometria de massas, Godoy e colaboradores determinaram completamente o proteoma de *Saccharomyces cerevisiae*. De acordo com este estudo, são expressas aproximadamente 4200 proteínas, se considerados todos os sub-proteomas. Contudo, até o momento o proteoma da linhagem CAT-1, utilizada em grande parte da indústria sucroalcooleira brasileira, ainda não foi determinado.

2.5.2. Proteômica de *Saccharomyces cerevisiae*: estado da arte

São poucos os trabalhos publicados em torno da análise proteômica de *S. cerevisiae* bem como são poucos os grupos de pesquisa que os exploram, entretanto é possível se obter uma visão global das proteínas predominantes para estas análises. Embora o genoma da levedura CAT-1 tenha sido elucidado, até o presente momento não houve publicação de nenhum estudo proteômico para esta linhagem.

No trabalho desenvolvido por Cheng e colaboradores (2008) a levedura alvo foi a linhagem industrial de *S. cerevisiae* Angel, uma levedura termotolerante amplamente utilizada na produção de bioetanol. Foram identificadas 47 proteínas, das quais 17 correspondentes a 12 enzimas envolvidas nas vias de pentose fosfato, glicólise e gliconeogênese, além da via de biossíntese de glicerol. Além disso, foram identificadas proteínas relacionadas a oito processos oxidativos e *heat shock proteins*, sugerindo a necessidade de controle osmótico, frente à possível observação de oxidação nos processos industriais. Como foram comparados dois processos diferentes, fermentação contínua e por batelada alimentada, os autores puderam verificar diferentes expressões protéicas especialmente no que diz respeito às vias glicolítica e de gliconeogênese.

Garrels e colaboradores (1997) tiveram como objeto de estudo a levedura S288C, utilizada como organismo referência para todos os trabalhos conduzidos com *S. cerevisiae*, porém não apresentam em quais condições estas foram cultivadas. Foram identificado 169 spots que representavam cerca de 149 proteínas, o que corrobora os dados obtidos por Boucherie e equipe (1996), que analisaram as linhagens J400, J409, W303-la e AMRI cultivadas em meio complexo em cultura de frascos agitados, sendo então identificadas 158 proteínas. Foram identificadas *heat shock proteins*, enzimas envolvidas na via glicolítica e na síntese de etanol.

A linhagem CEN.PK113-7D cultivada a 30°C em biorreator por batelada alimentada, apresentou 892 proteínas possíveis de serem analisadas no trabalho conduzido por Groot e equipe (2007). De 137 proteínas expressas em altos níveis, 92 foram identificadas como envolvidas em funções metabólicas, além de 36 proteínas envolvidas em geração de energia. Os autores também verificaram que ocorreu uma expressão de 2 a 10 vezes maior de proteínas envolvidas na via glicolítica em cultivo anaeróbios quando comparados aos cultivos aeróbios, embora os níveis correspondentes de mRNA tenham permanecido os mesmos, sugerindo assim que as modulações pós-transcricionais apresentam um papel de destaque na regulação da glicólise em leveduras (Groot et al., 2007).

Hu e colaboradores (2003) utilizaram a linhagem BY4741 cultivada em meio líquido suplementado com fonte de nitrogênio e contendo 2% glicose, obtendo em sua análise proteômica de 1000 à 2000 spots por gel. Foram identificadas proteínas com propriedades antioxidantes, *heat shock proteins* e chaperonas, algumas proteases, 4 proteínas que ainda não tiveram suas funções elucidadas e principalmente proteínas envolvidas no metabolismo de açúcares: aldeído desidrogenase, malatosintase,

enolase, frutose bifosfatoaldolase, piruvato descarboxilase, glicose-6-fosfato isomerase entre outras.

A proteômica de células imobilizadas de *S. cerevisiae* KAY446 também foi explorada por Pham e Wright (2008) utilizadas em processos do tipo VHGF, demonstrando o estímulo deste rico meio frente à diversas vias metabólicas, sendo descritas como as mais importantes a Ras/cAmp, a glicólise e biossíntese de aminoácidos. Além disso, para estes autores, a forte presença de *heat shock proteins* e proteínas envolvidas na manutenção da viabilidade celular confirmam a plasticidade do metabolismo deste microrganismo de acordo com o ambiente em que é cultivado.

Zuzuarregui e equipe (2006) cultivaram leveduras da linhagem ICV 16 e ICV 27 em meio contendo de 20 a 30% de açúcares simples (frutose e glicose), de acordo com a uva que se utilizou, uma vez que o intuito era a vinificação. Foram identificadas proteínas relacionadas ao metabolismo de etanol e a via glicolítica, manutenção de telômero e de parede celular e ao metabolismo de esteróis para a linhagem ICV 16. Para a linhagem ICV 27 foram identificadas proteínas transmembrana relacionadas ao transporte ativo de íons e sais.

Assim, a proteômica é uma ferramenta chave para este tipo de análise minuciosa, pois é capaz de elucidar as alterações sofridas pelo organismo frente às alterações causadas pelo meio em que está inserido. Além desta compreensão global do organismo através da proteômica, a combinação desta com dados sobre atividades enzimáticas auxiliam a elucidar o comportamento dinâmico do processo, identificando alvos para o melhoramento do desempenho do bioprocessos como um todo, verificando os passos metabólicos limitantes e a estimativa dos fluxos intracelulares (Wang et al., 2003).

2.6. β -D-frutofuranosidase

Como descrito previamente, o mosto disponibilizado para a obtenção de etanol nas usinas brasileiras é composto por diversas moléculas, sendo a principal delas a sacarose. De acordo com Gáscon e colaboradores (1981), para que seja possível a utilização deste açúcar como fonte de carbono, as leveduras apresentam uma enzima denominada β -D-frutofuranosidase, popularmente conhecida como invertase (EC 3.2.1.26), que pode estar tanto na parede celular associada à manana quanto no citoplasma, responsável por hidrolisar sacarose em glicose e frutose (figura 4), obtendo-se o chamado açúcar invertido, amplamente utilizado na indústria de alimentos

e bebidas. Segundo Naumov e colaboradores (1996), essas diferenças ocorrem devido à expressão diferencial de RNAm, embora ambas as enzimas sejam derivadas da família de genes *SUC* (*SUC1* a *SUC5* e *SUC7*). A invertase extracelular não é sintetizada quando a levedura encontra-se em meios com altas concentrações de sacarose, frutose ou glicose; todavia a invertase intracelular continua a desempenhar seu papel (Naumov *et al.*, 1996). É importante salientar que a invertase extracelular é glicosilada no retículo endoplasmático, de onde é direcionada ao complexo de Golgi, sendo empacotada e exportada até o espaço periplasmático durante a gemulação.

Figura 4. Hidrólise da sacarose pela enzima invertase

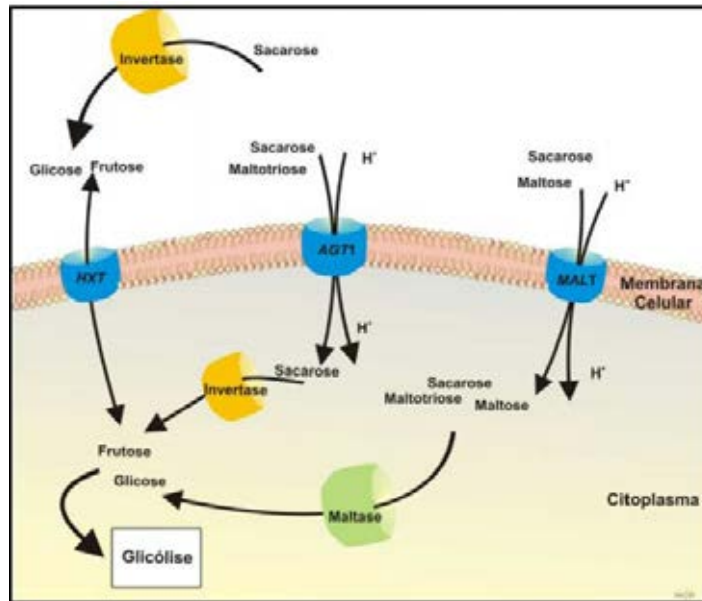


Fonte: www.fcfar.unesp.br/alimentos/bioquimica/imagens/hidrolise_sacarose.GIF

Além disso, em determinadas condições esta enzima apresenta capacidade de catalisar a transfrutossilacção para produção de frutooligossacarídeos (FOS), amplamente aplicados como prebióticos como é o caso da kestose, nistose e frutofuranosilnistose (Nguyen *et al.*, 2005). Algumas β -D-frutofuranosidases de distintos microrganismos foram descritas como capazes de hidrolisar rafinose, inulina e gentianose em melibiose, D-frutose e gentibiose (Said e Pietro, 2004).

A invertase de levedura pode se apresentar como distintas isoformas, apresentando comumente pH ácido (pH 4-4.5). Em torno de 80% das invertases empregadas na indústria compreendem a forma extracelular. Na figura 5 podemos verificar as duas vias distintas da utilização de sacarose pela levedura *S. cerevisiae*. De acordo com Stambuk e equipe (1999), pode ocorrer o co-transporte de sacarose- H^+ mediado por uma permease nomeada Agt1, que permite a entrada de sacarose diretamente no citoplasma, onde será hidrolisada em frutose e glicose pela invertase intracelular, podendo então iniciar a via glicolítica. Já a invertase extracelular promove a hidrólise de sacarose no espaço periplasmático, encaminhando por transportadores de hexoses (HXT) a glicose e a frutose para o citoplasma. Além disso, a sacarose pode entrar por modo ativo através de um transportador de maltose, alcançando o citoplasma e sendo hidrolisada pela invertase intracelular (Salvato, 2010).

Figura 5. Diferentes vias de utilização de sacarose pela levedura *S. cerevisiae*.



Fonte: Salvato, 2010

A repressão catabólica causada pela glicose ocorre quando as células de um determinado microrganismo, no caso a levedura *S. cerevisiae*, são submetidas a diferentes concentrações de glicose, atingindo diretamente o controle da expressão gênica na etapa de transcrição (Gombert, 2001). De acordo com Peter e colaboradores (2006), a repressão pela glicose regula a expressão dos genes envolvidos com a produção de enzimas necessárias tanto para o metabolismo de sacarose quanto de maltose e galactose, além das enzimas relacionadas à gliconeogênese, à cadeia respiratória e também às enzimas da via fermentativa. Como a glicose promove esta repressão, há o favorecimento do metabolismo diauxo da levedura (que metaboliza primeiramente a glicose), com o intuito de aliviar a célula deste fenômeno, havendo então a possibilidade de expressão enzimática cruciais para a utilização de outras fontes de carbono. Apesar de ser a mais conhecida, a repressão por glicose não é a única que pode ocorrer, podendo ser observadas repressões por frutose e manose (Holzer, 1976).

Objetivos

3. OBJETIVOS

Este estudo teve como objetivo elucidar as diferentes respostas de *S. cerevisiae* CAT-1 tanto em relação à expressão diferencial de proteínas durante os processos fermentativos quanto em relação aos parâmetros fisiológicos obtidos durante fermentações alcoólicas com 30% de sacarose, representando a condição da tecnologia de mosto VHGF e 14% de sacarose, representando a condição da tecnologia de mosto HGF.

Os objetivos específicos foram:

- analisar o proteoma em alta concentração de sacarose (30%);
- analisar o proteoma em baixa concentração de sacarose (14%);
- determinar a atividade invertásica;
- analisar parâmetros fisiológicos como biomassa e viabilidade celular;
- analisar a produção de etanol, correlacionando-a aos teores de sacarose aplicados em cada condição de cultivo;
- analisar a repressão catabólica.

Materiais e Métodos

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos apresentados neste trabalho foram realizados no Laboratório de Microbiologia e Biologia Celular da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, USP sob coordenação do Professor Doutor Luis Henrique Souza Guimarães e no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular de Microrganismos do Instituto de Química de Araraquara, UNESP sob coordenação do Professor Doutor José Roberto Ernandes. Todos os experimentos foram feitos em triplicatas.

4.1 Microrganismo

O microrganismo utilizado neste trabalho foi a levedura *Saccharomyces cerevisiae* linhagem CAT-1, cordialmente cedida pelo grupo de pesquisas coordenado pelo Prof. Dr. José Roberto Ernandes (Instituto de Química de Araraquara – UNESP). Esta linhagem é selvagem e isolada na Usina de Catanduva, do Grupo Virgolino de Oliveira, no município de Catanduva, São Paulo.

4.2 Meios, preparação de inóculo e cultivo

Através das leveduras coletadas na cultura estoque houve preparo dos inóculos. As células foram retiradas do tubo estoque com auxílio de alça de platina e em seguida transferidas para um tubo contendo 4 mL de água destilada estéril. Após a homogeneização, 1 mL desta suspensão foi adicionado a frascos contendo meio YPSac 10% (pH 5), composto por 10 g/L de peptona, 10 g/L de extrato de levedo e 100 g/L de sacarose, em condições estéreis. Estes frascos foram incubados a 30 °C e com agitação de 250 rpm, em mesa agitadora, por 20 h, a fim de se obter a concentração de células necessária para realizar fermentação com alta densidade celular.

O mosto industrial, cedido pela usina Santa Cruz (Américo Brasiliense/SP), foi utilizado como meio fermentescível e sofreu ajuste de acordo com a condição que se desejava investigar, alto ou baixo teor de sacarose, através da adição de sacarose (para as condições de 21% e 30%). Previamente, o meio YPSac contendo as células, como descrito anteriormente, foi centrifugado a 4°C e 3100 x *g* por 10 min para separação total das células, as quais foram lavadas com NaCl 0,85% (m/m) gelado, para retirada de possíveis açúcares, seguido por mistura em Vortex e centrifugação como previamente descrita, sendo este passo repetido por três vezes. Após a terceira centrifugação, as células foram ressuspensas em 25 mL de mosto esterilizado ou de

meio contendo 2% de sacarose e houve a transferência para os frascos de cultivo. Os frascos de cultivo foram incubados a 37,5°C, com pH inicial 5,0 e agitação de 250 rpm. Foram coletadas alíquotas de 0,3 mL a cada 2,5 h, totalizando um cultivo de 10 h.

4.3 Ativação e manutenção da linhagem

A ativação das leveduras liofilizadas foi realizada em solução de NaCl 0,85%(m/m) sob agitação e diluições seriadas foram realizadas para inoculação em placa de Petri contendo meio YPD-ágar (10 g/L de extrato de levedura, 20 g/L de ágar, 20 g/L de peptona e 20 g/L de glicose), previamente esterilizado a 120°C, 1,5 atm por 20 min. As placas foram incubadas em BOD a 37°C por 2 dias. Após esse período, identificou-se uma colônia isolada que serviu como fonte de microrganismos para os posteriores repiques em meio YPD-ágar inclinado. Para verificar a pureza da colônia isolada, uma alçada da colônia foi inoculada em meio YPGlic 2% (10 g/L de extrato de levedura, 10 g/L de peptona e 20 g/L de glicose) com pH ajustado para 5,0 e constatou-se então que a colônia estava pura e livre de contaminantes, podendo então ser utilizada em todos os experimentos deste estudo. As culturas estoque foram mantidas em meio YPD-ágar e foram consideradas viáveis para cultivo quando estocadas em geladeira até o 15º dia.

4.4 Obtenção de células pós-cultivo e ruptura celular

As proteínas analisadas por eletroforeses unidimensional e bidimensional foram obtidas através da ruptura das células obtidas após 10 h de cultivo como previamente descrito. Para separação das células do meio fermentado houve centrifugação por 15 min a 4°C e 3100 x *g*, sendo o sobrenadante descartado e as células lavadas em solução de NaCl 0,85% (m/m), seguida de nova centrifugação, repetindo-se esse passo por 3 vezes. Após este procedimento, as células foram submetidas a extração por lise física através de maceração utilizando-se nitrogênio líquido, seguida da solubilização das proteínas extraídas por tampão de extração contendo Tris 100 mM pH 8,0, PMSF 1 mM, EDTA 1 mM, DTT 2mM e Benzamidina 2mM (modificado de Luna et al., 2010). Houve centrifugação a 3100 x *g*, 4°C por 15 min, sendo o sobrenadante utilizado como extrato protéico bruto.

4.5 Quantificação da proteína total

A quantificação de proteínas totais dos extratos utilizados para a análise proteômica foi realizada através do Método de Bradford (Bradford, 1976), utilizando-se albumina de soro bovino (BSA) como padrão.

4.6 Precipitação de proteínas e solubilização

O extrato protéico foi submetido a precipitação com TCA 40%(v/v) por 24 h a 4°C, sendo em seguida centrifugado a 9300 x *g* e 4°C por 20 min, por diversas vezes, até que nenhum precipitado fosse observado. Os pellets protéicos obtidos foram lavados 2 vezes com acetona P.A. gelada e foram deixados em temperatura ambiente por 5 h para total evaporação deste solvente.

Após a quantificação protéica, padronizou-se as amostras para 2 µg de proteína para cada 1 mL de tampão de re-hidratação ou de amostra (Uréia 8 M, 2% CHAPS, DTT 50mM, 0,2% Bio-Lyte e 0,001% de azul de bromofenol), de modo a prover a quantidade de proteínas necessárias para a re-hidratação das tiras de isofocalização (IPG). Após a solubilização protéica, o extrato obtido foi aliquoteado e armazenado a -20°C.

4.7 Eletroforese Unidimensional

Os extratos obtidos através da ruptura celular contendo quantidades conhecidas de proteínas foram preparados segundo protocolo estabelecido por Laemmli (1970) e aplicadas em géis comerciais 4-15% Mini-PROTEAN TGX Gel (Biorad). Os géis foram submetidos a condições eletroforéticas de 120 V, 20 mA/gel e 8 W em sistema completo de eletroforese Mini-PROTEAN Tetra Cell (Biorad). A coloração dos géis foi realizada utilizando o corante Comassie Brilliant Blue R-250 e a visualização das bandas protéicas foi possível através da descoloração dos géis utilizando-se uma solução contendo 45% (v/v) de metanol e 10% (v/v) de ácido acético.

4.8 Re-hidratação das tiras de IPG e Focalização Isoelétrica (IEF)

A primeira dimensão foi realizada utilizando-se tiras de 7 cm com pH de 3,0 a 10,0. A re-hidratação das tiras foi realizada através da deposição de 125 µL de amostra sobre o suporte, totalizando 250 µg de proteínas totais, seguida por contato direto com a tira de IPG voltada para baixo. Após 40 min, adicionou-se óleo mineral suficiente para

que não ocorresse desidratação ou rompimento da tira, deixando o sistema em repouso por 18 h (re-hidratação passiva).

Logo após o fim do período de re-hidratação, as tiras foram posicionadas com o gel para cima na bandeja de corrida de primeira dimensão e cobertas novamente por óleo mineral. A isofocalização foi conduzida no aparelho Protean IEF cell (BioRad) sob quatro passos com voltagens distintas, todos à 50 μ A: 1) 250 V com duração de 15 min; 2) 4000 V com duração de 1 h; 3) 4000 V até obtenção do valor de 15000 V.h e 4) 500 V, sendo esta a etapa de manutenção de focalização isoeletrica. As focalizações isoeletricas duraram aproximadamente 6 h.

4.9 Equilíbrio das tiras e segunda dimensão

Ao final da focalização isoeletrica, as tiras IPG foram imersas em duas soluções de equilíbrio para redução e alquilação das proteínas já focalizadas. O primeiro tampão de equilíbrio denominado comercialmente como Tampão de equilíbrio I (Biorad) continha 375 mM Tris-HCl (pH 8,8), 6 M uréia, 2% de DTT, 2% de SDS, 0,001% de azul de bromofenol e 30% de glicerol, onde as tiras foram imersas por 15 min sob agitação branda. O tampão de equilíbrio II (Biorad) continha 375 mM de Tris-HCl (pH 8,8), 6 M uréia, 2% de SDS, glicerol 30%, 25 mg/mL de iodoacetamida, onde as tiras foram imersas por 15 min sob agitação branda.

Após o equilíbrio completo, as tiras foram imersas no tampão de corrida, composto por 25 mM Tris-HCl, 1,92 mM glicina e 0,1% SDS, por 5 min sob agitação branda e em seguida foram posicionadas horizontalmente no topo do gel de poliacrilamida 12%, de modo que houvesse contato total entre a tira e o gel, sendo ainda vedados por 1 mL de agarose preparada no mesmo tampão de corrida e acrescida por alguns cristais de azul de bromofenol. A corrida eletroforética foi conduzida a 8 W, 120 V e 20 mA, por um período aproximado de 2 h, utilizando a fonte PowerPac Universal Power Supply (BioRad).

4.10 Visualização dos géis

Após a finalização da corrida eletroforética, os géis foram lavados três vezes (5 min cada) com água milli-Q para a retirada do SDS e em seguida foram fixados em uma solução que continha ácido fosfórico 2% (v/v) e metanol 2%(v/v) por 1 h. Após a fixação os géis foram brandamente lavados em água milli-Q e em seguida adicionou-se

o corante Blue Silver (Candiano et al., 2004), baseada no corante Coomassie G-250, deixando por no mínimo 12 h sob agitação.

O corante residual foi removido com lavagens em água milli-Q e os géis foram estocados em água milli-Q a 4°C até a captura de imagens e excisão dos spots.

4.11 Captura e análise de imagens

As imagens dos géis bidimensionais foram capturadas em densitômetro GS-800 (Biorad) com precisão de 12 bits e resolução de 36,3 µm, possibilitando escaneamento completo e análise das bandas mais claras. As imagens obtidas foram exportadas a partir do software QuantityOne (Biorad). A avaliação total dos géis, bem como análises estatísticas foram realizadas através do software PDQuest (Biorad).

4.12 Excisão dos spots dos géis bidimensionais e digestão trípica

A excisão dos spots para posterior análise por espectrometria de massas foi realizada com auxílio de uma ponteira de 200 µL estéril e com a ponta cortada. Os géis foram colocados em placas de vidro livres de queratina e todos os cuidados para evitar contaminações foram tomados. Para a remoção do corante, os spots foram transferidos para tubos de 1,5 mL, onde foram acrescentados 250 µL de solução contendo bicarbonato de amônio 50% (0,1 M pH 8,0) e acetonitrila P.A. 50% (v/v), deixando em repouso por 3 h. A solução foi completamente retirada e adicionou-se 700 µL da mesma solução, deixando em repouso por 12 h.

Após este período, a solução foi retirada completamente e adicionou-se ao tubo 250 µL de acetonitrila P.A., deixando-o em repouso por 2 h para total desidratação do gel. A acetonitrila P.A. foi retirada e o tubo foi deixado em repouso à temperatura ambiente por 24 h.

O gel desidratado foi transferido para um tubo de 0,5 mL e a ele adicionou-se 2,5 µL de tripsina (Promega) e 17 µL de bicarbonato de amônio (0,1 M pH 8,0) em repouso por 2 h a 37°C. Após o período de 2 h, foi acrescentado mais 150 µL de bicarbonato de amônio e o tubo foi novamente mantido a 37°C por 22 h. Em seguida, para finalizar a digestão, adicionou-se 4 µL de ácido fórmico P.A., deixando o tubo em repouso por 2 h. Os digeridos foram armazenados a -20°C para posterior análise por espectrometria de massas.

4.13 Dessalinização dos spots em micro-tips com resina C18

Os micro-tips foram montados em laboratório através do uso de ponteiros longos para eletroforese, colocando-se um pequeno pedaço de fibra de vidro no afunilamento do canal da ponteira. Foram adicionados à ponteira 150 µL de metanol 100% (grau HPLC) e sequencialmente de 10 a 15 µL da resina C18 previamente suspensa em metanol 100%. Houve a eluição até o volume mínimo, porém sem que a resina ficasse seca. O equilíbrio foi realizado através da lavagem da resina por três vezes com uma solução aquosa de ácido fórmico 0,2% (v/v). Após a fase de equilíbrio, houve a adição da amostra à coluna de dessalinização e eluição até o volume mínimo. Ocorreu a lavagem por três vezes da coluna com solução aquosa de ácido fórmico 0,2% (v/v) e eluição até o volume mínimo sem que a coluna secasse, para retirada de sais e outros possíveis contaminantes. Após esta etapa, houve a adição de 30 a 50 µL de ácido fórmico 5% (v/v) em solução aquosa de metanol 60% (v/v), havendo então a eluição total, até que a coluna ficasse seca, dos peptídeos dessalinizados. As amostras dessalinizadas contendo os peptídeos foram secas em SpeedVac (Savant DNA) por aproximadamente 3 h ou até que não se observasse mais nenhuma solução no tubo.

4.14 Análise por MALDI-TOF/TOF e identificação protéica

Os peptídeos concentrados e secos obtidos (descrito no item 4.13) foram hidratados em 6 µL de solução matriz (5mg/mL de ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico em 50% (v/v) de acetonitrila e 0,1% (v/v) de ácido trifluoracético), dos quais apenas 2 µL foram aplicados na placa de MALDI-TOF/TOF (AximaPerformace, Kratos-Shimadzu, Manchester, UK). Os MS/MS obtidos de cada spot digerido foram analisados utilizando o software MASCOT (Matrix Science, London, UK) e os bancos de dados utilizados foram SwissProt e NCBIInr.

4.15 Determinação do crescimento celular

A determinação do crescimento da levedura foi realizada através do acompanhamento da produção de biomassa no decorrer de cada cultivo através de medidas turbidimétricas de uma suspensão de células com diluição conhecida e leitura realizada a 570 nm, relacionando-a com a massa celular, através da equação: [células] (mg/mL) = $\Delta A_{570} \times \text{Diluição} \times f$, onde f corresponde ao fator de conversão de absorbância em massa seca, que para a levedura *S. cerevisiae* é $0,6711 \pm 0,0469$. O fator f foi determinado em estudos preliminares a partir da medida de absorbância de

suspensões com diferentes concentrações de células comparadas à massa seca obtida após a secagem a 100 °C por um período de 2 h de 1 mL de cada suspensão filtrada em membrana Millipore.

4.16 Viabilidade Celular

A viabilidade celular foi analisada através do método de coloração com azul de metileno, seguido por análises em microscópio óptico com aumento de 40X sobre câmara de Neubauer, segundo descrição de Lee e colaboradores (1981). 50 µL de amostra foram transferidos para 450 µL de azul de metileno e após 10 min ocorreram as contagens. As células viáveis conservaram sua morfologia e também permaneceram incolores, enquanto as inviáveis apresentaram coloração azul. Os brotos também foram observados e quantificados.

4.17 Consumo da fonte de carbono

A avaliação do consumo de açúcar ocorreu através do método DNS descrito por Miller (1959).

Após a diluição adequada das amostras livres de células houve a adição de 100 µL de HCl 6M e 150 µL de água destilada e esta mistura foi incubada a 60°C por 7 min para a hidrólise da sacarose. Logo após este processo, adicionou-se 500 µL de NaOH 2,4 M e 1 mL de DNS. Houve preparo de um tubo branco, substituindo-se a amostra por 200 µL de água. Todos os tubos foram transferidos para banho de ebulição por 5 min e em seguida para resfriamento em banho de gelo. As leituras foram realizadas em 546 nm e a quantidade de sacarose foi expressa em percentagem de açúcar residual.

4.18 Atividade Invertásica

A atividade da enzima invertase foi determinada pelo procedimento descrito por Vitolo e Borzani (1983), com algumas modificações, onde células intactas, obtidas por centrifugação de meio de crescimento, foram lavadas com solução de NaCl 0,85% (m/m) e ressuspensas em tampão acetato de sódio 50 mM e pH 4,6. O substrato utilizado para esta quantificação era composto por 100 g/L de sacarose em tampão acetato de sódio 50 mM (pH 4,6), ocorrendo a reação à 45°C por 15 min. Os açúcares redutores liberados da sacarose pela ação da invertase extracelular foram quantificados de acordo com o descrito por Miller (1959). A absorbância foi determinada em 540 nm. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima

necessária para produzir 1 μmol de açúcar redutor por minuto nas condições de ensaio. O valor de ϵ obtido foi 0,276.

4.19 Produção de Etanol

A percentagem de etanol nas amostras foi determinada de acordo com o descrito por Zanon e colaboradores (2006), utilizando-se kit comercial da Sigma-Aldrich, onde o etanol é oxidado a acetaldeído na presença da enzima álcool desidrogenase, tendo como co-fator a nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD^+). Nesta reação, o equilíbrio é deslocado para a formação de acetaldeído. O tampão de reação foi composto por semicarbazida/pirofosfato de sódio/glicina 0,1 M. Assim a reação com semicarbazida é favorecida pelas condições alcalinas do meio e essa metodologia de dosagem de etanol, baseada em Bonnichsen (1965) é possível. A quantidade de NADH gerado na reação é estequiometricamente igual à quantidade de etanol consumido. A quantificação foi realizada a 340 nm.

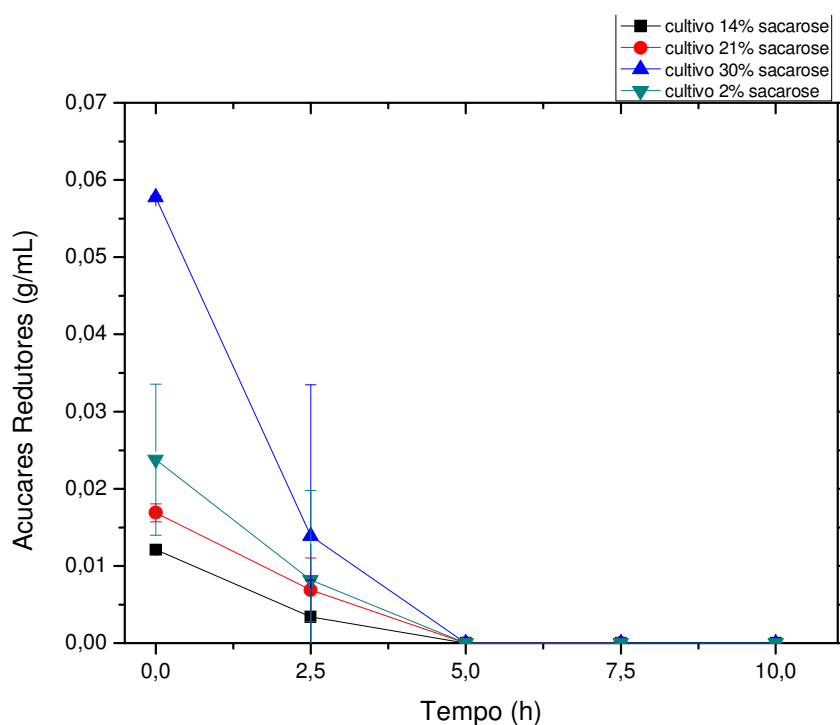
Resultados e Discussão

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Quantificação de Açúcares Redutores:

Os resultados obtidos para as análises de açúcares redutores estão representados na figura 6, onde podemos observar que a exaustão da sacarose disponibilizada indica um crescimento completo e adequado do agente fermentador utilizado, sendo possível afirmar que a concentração de açúcar diminui até chegar a exaustão com o aumento do tempo de cultivo.

Figura 6. Perfil do consumo de açúcar pela levedura CAT-1 para as quatro condições estudadas.



(Fonte: autor)

Como somente a frutose e a glicose apresentam estrutura que possibilitam a sua quantificação e qualificação, é necessário realizar a hidrólise da sacarose para se

estimar a quantidade de açúcares redutores totais e consecutivamente a quantidade de açúcares que podem ser convertidos em etanol.

Sabe-se que as leveduras utilizam como fonte de carbono os monossacarídeos como, por exemplo, glicose, frutose e galactose e/ou os dissacarídeos como, por exemplo, maltose e sacarose. Caso o cultivo da levedura ocorra em meio que contenha uma mistura de açúcares, tanto mono quanto dissacarídeos, observa-se o que é descrito como metabolismo diáuxico, o que indica que haverá utilização primordial da glicose por conta do fenômeno de repressão catabólica, exercida pela glicose (Miranda, 2008). O mosto é composto por uma mistura de fontes de carbono que consiste em 10-20% de sacarose e 0,1-2% de açúcares redutores (Lima et al., 2001), o que indica que os açúcares redutores, representados por frutose e glicose, serão consumidos nas primeiras horas de cultivo, sendo a sacarose hidrolisada pela enzima invertase, o que resultará em frutose e glicose, utilizada em seguida.

5.2 Parâmetros Fermentativos

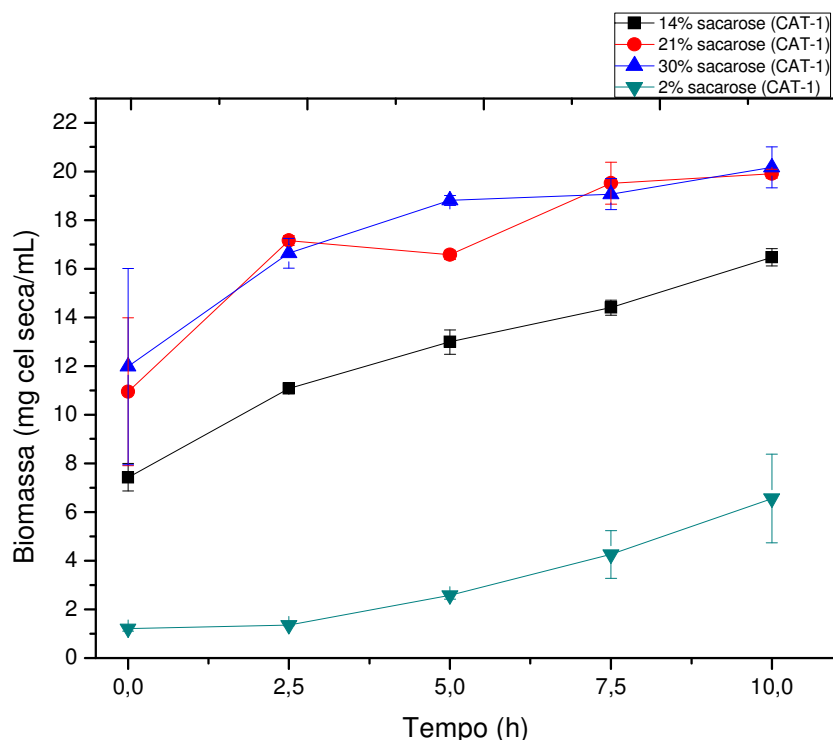
5.2.1 Biomassa

A figura 7 representa o crescimento celular de acordo com o tempo de cultivo das células da levedura CAT-1, cultivadas sob diferentes concentrações de sacarose: 2%, 14%, 21% e 30% em intervalos de 2,5h, totalizando 10h de cultivo. A fase log expressa na figura 7 somente é possível caso as células estejam completamente adaptadas ao meio em que foram colocadas, podendo assim consumir consistentemente os substratos disponibilizados, no caso a sacarose. Nota-se que as células colocadas em meios com 30% de sacarose mantêm um padrão mais constante de crescimento celular, embora no final do cultivo igualem-se aquelas colocadas em meio contendo 21% de sacarose. Entretanto, fica evidente que as células cultivadas em mosto contendo 14% de sacarose apresentam menor crescimento celular, se

comparado aos cultivos contendo 21% e 30% de sacarose, desde o início do processo fermentativo até o seu final, o que indica baixa taxa de multiplicação celular e produto de baixo teor alcoólico. A condição de cultivo contendo 2% de sacarose representa o metabolismo basal da levedura em questão, pois nesta concentração de açúcar a levedura não é capaz de desviar seu metabolismo para a fermentação alcoólica, o que propicia um acúmulo final de células maior se comparado às demais condições resguardando a proporcionalidade da taxa inicial.

Para a condição contendo 14% de sacarose, iniciou-se o cultivo com aproximadamente 7,42 mg de célula seca/mL e finalizou-se o cultivo com aproximadamente 16,46 mg de célula seca/mL, o que pode ser representado por uma taxa de incremento celular de 2,21 vezes. Para a condição contendo 21% de sacarose, iniciou-se o cultivo com aproximadamente 10,95 mg de célula seca/mL e finalizou-se o cultivo com aproximadamente 19,90 mg de célula seca/mL, obtendo-se assim uma taxa de incremento de biomassa de 1,85 vezes, valor muito próximo ao obtido para a condição de cultivo contendo 30% de sacarose (1,68 vezes), onde iniciou-se com 11,98 mg de célula seca/mL e finalizou-se o cultivo com 20,17 mg de célula seca/mL. Para a condição de cultivo contendo 2% de sacarose, obteve-se uma taxa de incremento de biomassa igual a 5,42 vezes, demonstrando total desvio da rota metabólica para crescimento e desenvolvimento celular, sendo que o cultivo iniciado com aproximadamente 1,21 mg de célula seca/mL e finalizado com aproximadamente 6,56 mg de célula seca/mL.

Figura 7. Produção de biomassa em função do tempo de cultivo em mosto com diferentes concentrações de sacarose (14, 21, 30 e 2%).



(Fonte: autor)

A produção de biomassa variou de acordo com o teor de sacarose nos quais as células foram colocadas para o desenvolvimento do processo fermentativo. Observou-se maior acúmulo de biomassa nas condições fermentativas contendo 21% e 30% de sacarose quando comparadas a utilização de 2% e 14% de sacarose. Porém em nenhuma das condições de fermentação alcoólica houve crescimento exacerbado do microrganismo, fato bastante favorável ao processo de fermentação alcoólica, pois demonstra que a levedura canalizou a utilização de sacarose em suas rotas bioquímicas para a produção etanólica e não para o aumento de biomassa ou multiplicação celular, como observa-se para a condição de 2% de sacarose. Este é um dos aspectos relevantes para a indústria sucroalcooleira, que visa a obtenção de um produto de boa qualidade com os menores custos possíveis (Puliglundla et al., 2011).

Caso houvesse a necessidade de suplementar com outros nutrientes que favorecessem a fermentação etanólica, o custo seria aumentado, característica indesejável no mercado atual.

De acordo com Schautz (2011), em experimentos com a CAT-1 cultivada em meio composto por 15% de sacarose com suplementação por peptona, houve produção de biomassa igual a 15 mg de células/mL, ao final de 50 h. Em comparação a estes dados, no presente trabalho os meios utilizados não sofreram suplementação com fontes assimiláveis de nitrogênio (FAN), como é o caso da peptona. Apesar da não suplementação, para a condição de 14% de sacarose no meio para este presente trabalho, foi obtida biomassa de $16,47 \pm 0,02$ mg de célula/mL de cultivo, considerando o ciclo fermentativo de 10 h. A suplementação dos meios fermentativos para obtenção de etanol como produto final, seja na indústria sucroalcooleira ou na indústria alimentícia, é um método muito empregado e tem como intuito promover o excelente desempenho fermentativo da levedura. Entretanto novos estudos demonstram que um inóculo com grande quantidade de células pode ser tão ou mais eficaz do que suplementações com FAN, além de poder diminuir consideravelmente o tempo de fermentação (Nguyen e Viet Man, 2009). Os mesmos autores ainda ressaltam que uma taxa elevada de inoculação pode causar o aumento em 1,36 vezes o número de células presentes no cultivo.

Os dados revelados por Barbosa (2013) para CAT-1 cultivada em meio contendo 30% de sacarose a 30°C para o período de 10 h foi de aproximadamente 31 mg de células secas/mL, enquanto para este trabalho a média obtida foi de $20,17 \pm 0,04$ mg de células secas/mL. Para os cultivos em meio contendo 21% de sacarose a 30°C por um período de 6 h, Barbosa (2013) obteve aproximadamente 25 mg de células secas/mL contra aproximadamente 19 mg de células secas/mL obtidos no mesmo período neste presente trabalho. Embora as diferenças para ambas as condições possam ser

pequenas, sabe-se que o mosto utilizado para os trabalhos não foram os mesmos, sendo então de diferentes safras e podendo apresentar distintas condições nutricionais podendo potencializar ou não o acúmulo de biomassa. Como as taxas de inoculação foram as mesmas para este e para o trabalho de Barbosa (2013), pode-se sugerir que a levedura CAT-1 apresentou comportamento de melhor adaptação nos experimentos deste presente trabalho, uma vez que o maior acúmulo de biomassa parece ser proporcionalmente inverso a utilização de açúcares nas vias fermentativas.

A condição de 2% de sacarose foi examinada por ser conhecida como a condição na qual as leveduras desviarão todas suas rotas metabólicas para seu crescimento (Silveira, 2013). Neste trabalho obteve-se uma concentração final de aproximadamente 8 mg de células secas/mL para a condição descrita e este dado corrobora o obtido por Silveira (2013), que no mesmo período para CAT-1 obteve aproximadamente 7 mg de células secas/mL.

A biomassa de *Saccharomyces* sp. obtida após os processos fermentativos em usinas também é importante produto comercial para a indústria alimentícia, pois tem alto teor protéico, é fonte de microelementos, constitui excelente fonte de fibra alimentar solúvel e apresenta altos teores de lisina, culminando com sua utilização como complemento para proteínas de cereais (Caballero-Córdoba, 1997). Como são obtidas principalmente como subprodutos da indústria sucroalcooleira, há mais uma vantagem na utilização de alta densidade celular e de fermentações no formato VHGF, uma vez que desta maneira haverá maior produção de álcool e biomassa microbiana.

5.2.2 Viabilidade Celular

A levedura CAT-1 é conhecida por se tratar de um organismo bastante robusto e tolerante a diferentes tipos de estresses ocasionados durante o processo fermentativo visando a obtenção de etanol. Isto deve-se ao fato de que as verdadeiras leveduras

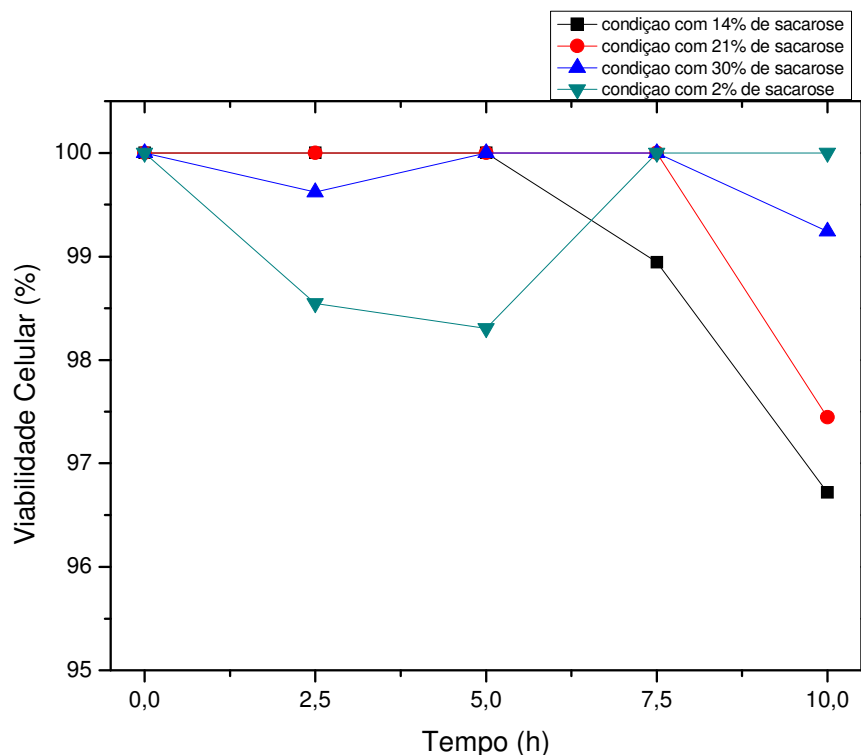
“industriais” são aquelas selecionadas pelo próprio processo, pois apresentam alta viabilidade celular ao final dele.

A manutenção da viabilidade celular é um fator de extrema importância para as fermentações alcoólicas, pois está diretamente relacionada ao sucesso para a produção de etanol, uma vez que se ocorre perda de viabilidade, ou seja, morte celular, a obtenção do produto ficará comprometida, embora a longa exposição a teores elevados de etanol pode causar estresse etanólico e perda da viabilidade. Desta forma, na indústria alcooleira, ocorrem as sangrias para revitalização celular e, assim restabelecimento da viabilidade celular e ativação metabólica das leveduras (Barbosa, 2013).

Na figura 8 pode-se verificar que a viabilidade para esta linhagem é bastante linear, apresentando baixa percentagem de perda nos tempos finais dos cultivos. Isso ocorre principalmente pelo estresse causado às células por componentes do meio como, por exemplo, o etanol dissolvido somado a oscilações de temperatura e pH no cultivo. Entretanto, é possível afirmar que nos cultivos contendo 30% de sacarose, a viabilidade celular observada é superior às verificadas nos teores de 14% e 21% de sacarose nos tempos finais dos cultivos. Isso faz com que esta condição apresente-se vantajosa, uma vez que com a alta viabilidade haverá rendimento ótimo de produtos e, para a indústria, os próximos ciclos fermentativos serão realizados com sucesso e com menor custo para a revitalização dos organismos. A condição testada com meio contendo 2% de sacarose, nos revela uma alta manutenção da viabilidade celular e isso acontece pois neste meio ocorre o favorecimento do crescimento do microrganismo, ou seja, a rota fermentativa está parcialmente reprimida pela baixa concentração de açúcar disponibilizado no cultivo, o que proporcionará desvio das rotas metabólicas visando o crescimento e desenvolvimento celular (aumento da biomassa e manutenção de mais células vivas). Pode-se verificar que para a condição de cultivo

com 2% de sacarose, ocorre uma queda da porcentagem de viabilidade celular nos tempos 2,5 e 5 h, o que pode ter ocorrido pelo fato de a levedura utilizar inicialmente o carboidrato disponibilizado (sacarose) para seu crescimento e produção de etanol, sendo que após a exaustão do carboidrato, o etanol passará a ser utilizado como fonte de carbono (Silveira, 2013), bem como o glicerol, que é um carboidrato de reserva energética imediata e a trealose, carboidrato responsável pela manutenção da viabilidade celular de leveduras (Lillie e Pringle, 1980; Thevelein, 1984).

Figura 8. Viabilidade celular em função do tempo de cultivo em mosto contendo 14, 21, 30 e 2% de sacarose.



(Fonte: autor)

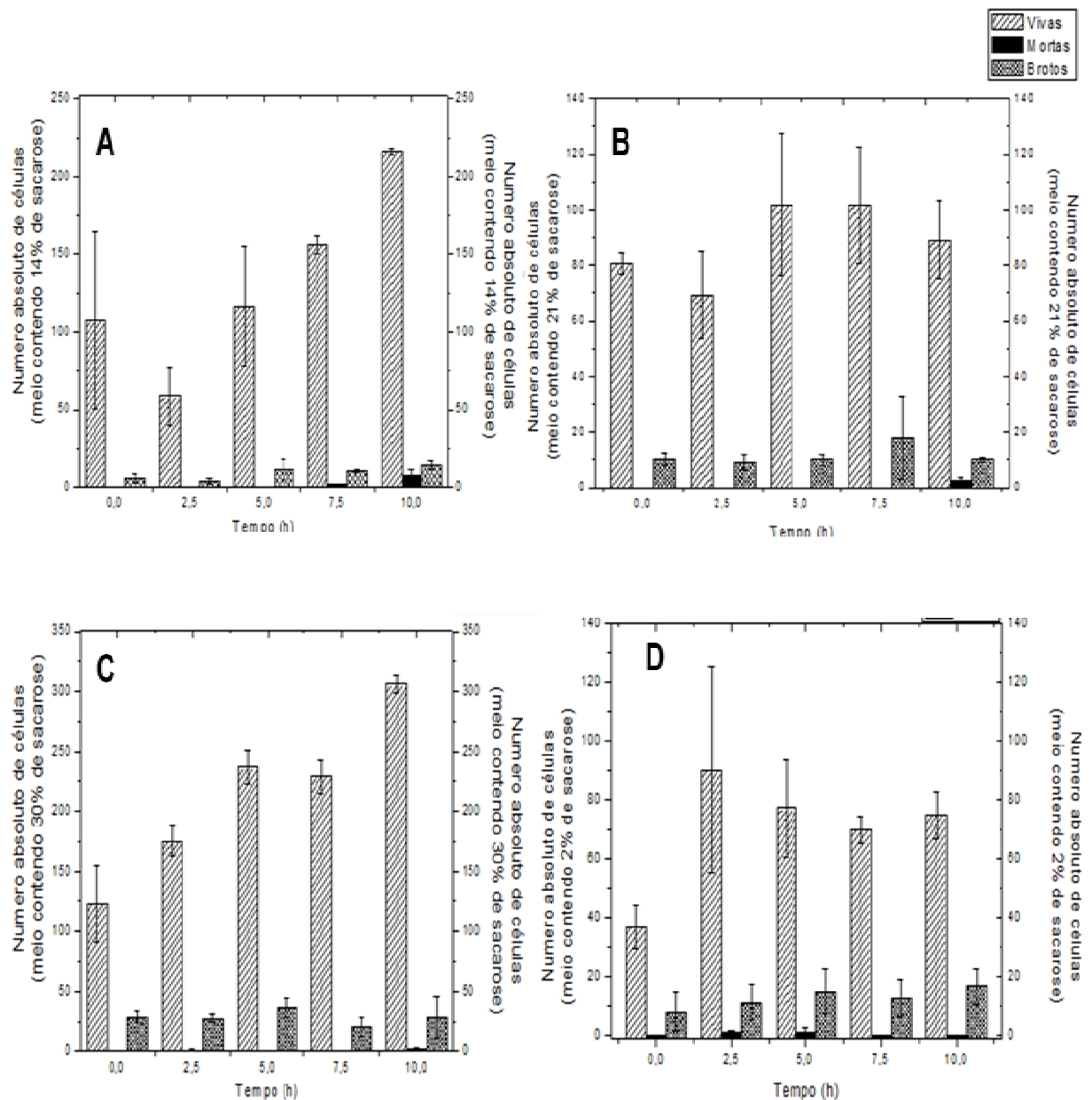
De acordo com Nobre e colaboradores (2007), a queda da viabilidade celular oriunda de diversos fatores, tem como consequência a redução do rendimento e da

produtividade da fermentação, característica indesejável para a indústria. Assim sendo, os processos industriais visam utilizar microrganismos com desempenho linear numa faixa ampla de variações, como demonstra-se neste estudo para a condição de cultivo contendo 30% de sacarose . Basso e colaboradores (2008) afirmam que a linhagem CAT-1, além de apresentar um elevado rendimento em termos de produção de etanol, tem a característica de formar pouco glicerol, mantendo-se viável durante muitos ciclos fermentativos. Apresenta ainda elevados teores de glicogênio e trealose intracelulares, importantes carboidratos de reserva relacionados à proteção celular contra estresses ocasionados por alterações físico-químicas do meio (Thevelein, 1994). De acordo com Panek (1995), a trealose tem relação direta com a manutenção da integridade e permeabilidade da membrana celular, além de ter papel relevante na proteção de enzimas glicolíticas que poderiam ser denaturadas em condições estressantes para a célula. Embora a trealose não tenha sido alvo de estudo no presente trabalho, abre-se uma possibilidade para compreensão da excelente manutenção da viabilidade celular de CAT-1 em processos fermentativos de extrema importância industrial e econômica em futuros estudos.

Ainda levando-se em consideração o processo industrial de produção etanólica, deve-se lembrar que o mosto, ou melaço, utilizado é acrescido de caldo clarificado, o que reduziria o número de células viáveis do meio, uma vez que a clarificação pode ser realizada pela adição de anidrido sulfuroso (Castro e Andrade, 2007), processo denominado sulfitação, fato que promove a observação em plantas industriais da queda da viabilidade celular, bem como do crescimento em termos de biomassa e consequentemente levando a redução do rendimento alcoólico. Porém, considerando que a linhagem CAT-1 foi selecionada pelo próprio processo industrial, pode-se sugerir que ela apresente também bom desempenho na situação de suplementação do mosto com caldo clarificado, embora esta hipótese ainda necessite ser melhor estudada.

Observa-se que as leveduras colocadas em mosto cujo teor de sacarose é de 14% apresentam maior variação, se comparadas as condições de 21% e 30% de sacarose, quanto à viabilidade celular durante todo o processo (figura 8). Este fato pode ser justificado pelo esgotamento de açúcar do meio, o qual parece ocorrer mais rapidamente, o que afeta a manutenção da viabilidade. É possível ainda correlacionar este comportamento ao observado na figura 7, uma vez que nesta concentração a biomassa é bastante discrepante das quantidades observadas para as demais condições e em relação aos cultivos contendo 21 e 30% de sacarose. Ao final do processo, para a condição de 14% de sacarose, observa-se que há uma queda da viabilidade para 96,7%, característica que não inviabiliza a fermentação, porém compromete a obtenção do produto final e a produção de biomassa, enquanto produto secundário. Na figura 9 estão representados os valores em números absolutos de células, separados em células vivas, mortas e células em fase de brotamento para os cultivos com mosto contendo 14%, 21% e 30% de sacarose e cultivo contendo 2% de sacarose (A, B, C e D, respectivamente). É válido afirmar que este método é qualitativo, não estando matematicamente correlacionado a quantificação de biomassa. De acordo com Carvalho (2001) os números absolutos de células observados por coloração diferencial não guardam relação com o incremento de biomassa de leveduras e nem com a viabilidade expressa em percentual, pois trata-se de uma medida pontual, além de que em cada uma das amostras aliquotadas no momento de amostragem, podemos ter o desprendimento mais rápido ou mais lento do broto em relação à célula-mãe.

Figura 9. Viabilidade celular em números absolutos para os cultivos contendo (A) 14% de sacarose no mosto industrial, (B) 21% de sacarose no mosto industrial, (C) 30% de sacarose no mosto industrial e (D) 2% de sacarose.



(Fonte: autor)

A figura 9-A indica a viabilidade celular, em números absolutos, para os cultivos que continham 14% de sacarose, indicando que a partir do tempo 7,5 h houve a observação de células mortas, sendo maior ainda em 10 h. Dentre todas as condições de cultivo apresentadas na figura 9, observa-se que é nesta condição onde ocorre maior número absoluto de células mortas, corroborando os dados apresentados na

figura 8, onde observa-se que nesta condição a viabilidade celular é menor (96,7% de células viáveis).

Na figura 9-B está representada a viabilidade celular, em números absolutos, da levedura CAT-1 cultivada em mosto com teor de sacarose de 21%. Relacionando estes dados a figura 8, onde a viabilidade celular ao final do processo corresponde a 97,45%, verificamos que a manutenção da viabilidade celular durante todo o processo é bastante semelhante ao que ocorre nos cultivos com 30% de sacarose. Entretanto no tempo 10h verificamos uma pequena queda desta viabilidade, que se encaixa na média entre aquelas observadas para os teores de 14% e 30% de sacarose.

A alta disponibilidade de açúcar fermentescível proporciona às células a possibilidade de manter uma alta viabilidade, por não sofrerem estresse etanólico nem repressão catabólica por outros açúcares. Na figura 9-C está representada a viabilidade celular, em números absolutos, da levedura CAT-1 cultivada em mosto com teor de sacarose igual a 30%. Nesta condição, de acordo com a figura 8, observamos uma excelente manutenção de viabilidade (99,2%). Assim pode-se afirmar que a maior disponibilização de açúcar nestes ensaios reflete na total adaptação da levedura CAT-1, conhecida por ser uma linhagem tolerante as variáveis de estresse, inclusive no que diz respeito ao aumento da pressão osmótica no meio. Em temperaturas elevadas e na presença de teores elevados de sacarose apresenta excelente desempenho no processo fermentativo, fazendo com que atinja alta viabilidade nas fases finais de cultivo (Amorim Neto, 2009). Neste caso, o alto teor de sacarose propiciou incremento da taxa de sobrevivência e da atividade fisiológica do microrganismo.

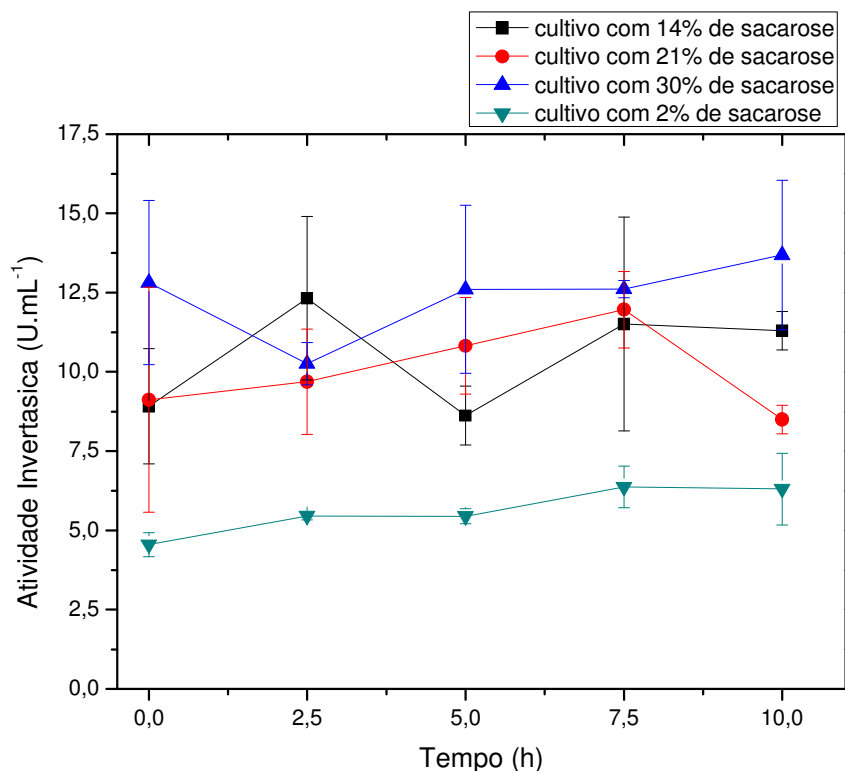
A figura 9-D nos revela a viabilidade celular em números absolutos para a condição de observação do meio em que ocorre estímulo de crescimento celular e não de um processo fermentativo. Verifica-se que no período inicial de inoculação das células (alta densidade celular), ocorre uma pequena queda da viabilidade, pois as

células estão em fase de adaptação, especialmente pela baixa disponibilidade de sacarose no meio. A partir de 5 h, pode-se observar o restabelecimento total da viabilidade celular em 100%, até o final do processo. Neste tempo, o esgotamento de açúcar é observado, entretanto a célula utiliza-se de outros substratos como fonte de carbono, sejam eles carboidratos de reserva da célula ou o próprio etanol por ela gerado (Silveira, 2013; Alcarde e Basso, 1997), desta forma não se observa a morte total de células nos tempos finais de cultivo.

5.3 Atividade invertásica:

A atividade invertásica (figura 10) nas quatro condições de cultivo contendo diferentes concentrações de sacarose apresenta-se com valores oscilatórios de acordo com os tempos em que foi verificada. Estes dados podem ser justificados através da repressão catabólica induzida por açúcares presentes no meio fermentativo após a exaustão de sacarose, possivelmente pela presença de glicose e frutose dissolvidas no meio fermentativo. Além disso, as baixas atividades invertásicas, se comparadas as de outras leveduras descritas na literatura, como é o caso das leveduras selecionadas em processos alimentícios, podem estar relacionadas a especificidade da CAT-1 para produção de etanol e não para produção enzimática voltada à indústria de alimentos. Segundo Rubio e colaboradores (2002), a invertase é capaz de hidrolisar sacarose sob concentrações menores do que 10% (m/v) em uma mistura de glicose e frutose, o que corrobora os dados aqui expressados, uma vez que a condição analisada para 2% de sacarose no meio promoveu a produção e funcionalidade desta enzima, mesmo que em baixas quantidades se comparadas às outras condições estudadas, que continham taxas de sacarose que superaram os 10% de sacarose, como descrito por Rubio e equipe (2002), e apresentaram atividade hidrolítica satisfatória como descrito a seguir.

Figura 10. Atividade Invertásica relacionada ao tempo de cultivo para as quatro condições fermentativas (sacarose 14, 21, 30 e 2%).



(Fonte: autor)

É importante ressaltar que a invertase estudada neste trabalho encontra-se associada à membrana celular. Mesmo que a CAT-1 não se caracterize como uma boa produtora de invertase, podemos dizer que esta apresentou resultados satisfatórios no presente estudo, uma vez que no trabalho de Silveira (2013) a levedura EthanolRed, uma linhagem muito utilizada na indústria alimentícia, apresentou aproximadamente 16 U.mL⁻¹ em 10 h de cultivo em meio sintético contendo 30% de sacarose, enquanto no presente trabalho para a condição de 30% de sacarose em mosto houve a produção de aproximadamente 13,7 U.mL⁻¹.

Os resultados obtidos por Silveira (2013) para cultivos com 30% de sacarose no mosto também são constantemente variáveis, ficando entre 2 e 4 U.mL⁻¹, embora os aqui apresentados estejam em torno de 12 U.mL⁻¹. Os resultados obtidos para 21% de sacarose por Silveira (2013) estão em torno de 2,5 U.mL⁻¹, enquanto os obtidos neste trabalho estão em torno de 9 U.mL⁻¹.

Para os cultivos contendo 14% de sacarose, os picos de atividade invertásica ocorreram em 2,5 h de fermentação com valor de $12,32 \pm 2,58 \text{ U.mL}^{-1}$. Para os cultivos com 21% de sacarose, o pico de atividade invertásica se deu em 7,5 h ($11,96 \pm 1,21 \text{ U.mL}^{-1}$). Nos cultivos com 30% de sacarose observa-se uma atividade praticamente constante, portanto não se pode afirmar que houve um pico de produção enzimática, embora no tempo de 10 h tenha ocorrido uma atividade invertásica de $13,68 \pm 2,36 \text{ U.mL}^{-1}$, maior que a média observada durante todo o processo.

De acordo com Vitolo e Borzani (1983), a gemulação corresponde ao período celular onde o metabolismo global das leveduras é mais intenso, o que promove aumento dos brotos e, portanto, isso pode levar a maiores alterações na parede celular da levedura, onde encontra-se a invertase extracelular investigada neste trabalho. Assim, pode-se sugerir que os resultados não lineares obtidos neste trabalho para a atividade invertásica estejam relacionados às oscilações do número de brotos em cada um dos períodos analisados, ou seja, quanto maior o número de brotamento das células-mãe, maior será a oscilação da parede celular e portanto maior será a oscilação da atividade enzimática.

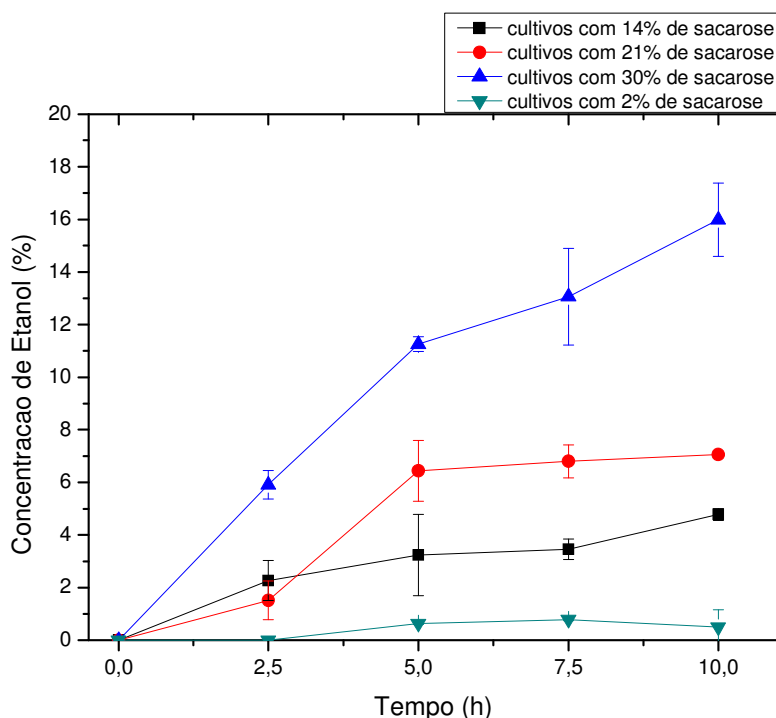
A partir dos resultados obtidos neste trabalho, pode-se sugerir que a CAT-1 quando cultivada em meio com alta disponibilidade de nutrientes necessários à fermentação, como a sacarose, e em pH e temperatura adequados, conduz o processo fermentativo de forma eficiente, propiciando a atividade invertásica, o que pode ser um possível marcador de vitalidade fermentativa. A discussão dos dados em torno da produção da enzima invertase pela levedura CAT-1 foi bastante dificultada pela pouca disponibilidade de trabalhos que avaliem este parâmetro para este microrganismo.

5.4 Rendimento Alcoólico

De acordo com a figura 11, na qual é mostrada a produção de etanol em cada uma das condições de cultivo em função da concentração de sacarose é possível observar que nas condições com maiores teores de açúcar ocorrem as maiores produções de etanol, aproximando-as dos níveis teóricos. Em contraponto, observamos que em 14% de sacarose os níveis de produção etanólica correspondem a aproximadamente $\frac{1}{4}$ da produção de etanol a partir de teores iguais a 30% de sacarose ao total de 10 h.

É interessante que a levedura tenha uma boa taxa de crescimento, sendo o etanol um produto de excreção das células que, em altas concentrações, torna-se tóxico às células de levedura. O açúcar disponibilizado a levedura não é totalmente convertido em etanol, pois ocorre durante o processo fermentativo a formação de vários compostos secundários como, por exemplo, glicerol, trealose, ácidos orgânicos e outros compostos em menor quantidade (Lima, 2001).

Figura 11. Rendimento alcoólico obtido através de fermentações com CAT-1 para os quatro diferentes teores de sacarose (14%, 21%, 30% e 2%) em função do tempo de cultivo.



(Fonte: autor)

De acordo com Pereira e colaboradores (2011), mostos com altos teores de açúcares fermentescíveis em meios com glicose como fonte de carbono variando entre 28 e 35%, complementado com xarope de milho, uréia e alguns íons metálicos, podem ter rendimento etanólico de aproximadamente 19%. Neste estudo, utilizou-se apenas o mosto industrial suplementado com a quantidade necessária para caracterizar cada uma das três concentrações de sacarose e o resultado obtido frente ao rendimento alcoólico foi de, em média, $16 \pm 1,4\%$, dado bastante significativo para um estudo de pequena escala. Deve-se levar em consideração a sensibilidade do método utilizado para a dosagem etanólica neste trabalho (método enzimático), bem como possíveis perdas de teor alcoólico no período de cultivo e de análise.

Os cultivos realizados com 30% de teor de sacarose apresentam aproximadamente o dobro do rendimento dos cultivos realizados com 21% de

sacarose. Isso implica um menor custo de destilação do etanol e menor gasto de água para tal processo, uma vez que os teores de etanol obtidos são maiores. O ajuste do mosto fermentescível pode ser realizado com melaço da própria usina, o que não acarretaria maior custo para as usinas e proporcionaria otimização da produção alcooleira.

Muitos são os trabalhos encontrados na literatura que trazem a suplementação dos mais diversos meios fermentativos com fontes de nitrogênio assimiláveis ou alguns aminoácidos (Bafrcová et al., 1999; Wang et al., 2006; Casey et al., 1984; Thomas e Ingledew, 1990), porém alguns autores apresentam como alternativa à suplementação nutricional dos meios o aumento da taxa de células inoculadas no início do processo fermentativo, ou seja, uma alta taxa de inoculação, que apresenta-se como uma boa alternativa aos altos custos de suplementação (Nguyen e Viet Man, 2009). A concentração final de etanol com uma alta taxa de inóculo (entre 10^6 e 10^7 células por mL) em meio contendo aproximadamente 24% de sólidos dissolvidos elevou em até 73% a produção etanólica pela levedura *S. cerevisiae* (Nguyen e Viet Man, 2009).

No trabalho apresentado por Bafrcová e equipe (1999), assume-se a relevância da manutenção de uma biomassa com pouco incremento final de número de células e da eficiência fermentativa destas células ao longo dos processos, para tanto ocorre a suplementação do meio tipo VHGF com fontes de assimiláveis de nitrogênio (FAN) que mantém um pequeno incremento do aumento da biomassa, resultando numa concentração final igual a 17% de etanol. Entretanto, no presente trabalho não houve adição de componentes nutricionais ao meio, e na condição VHGF, ou seja, 30% de concentração de sacarose obteve-se aproximadamente 16% de concentração etanólica final.

Atualmente, as usinas utilizam um mosto que contem 21% de sólidos solúveis, o que proporciona baixo rendimento alcoólico, fazendo com que o processo de destilação

seja requerido promovendo aumento no consumo de água e energia, além de gerar grandes volumes de vinhaça. De acordo com a literatura, os rendimentos para 21% de sólidos solúveis no mosto variam de 7 a 11%, sendo em média 9% de etanol. Para fermentações com 14% de sólidos solúveis no mosto são esperados rendimentos médios de 7% de etanol (Castro, 2013). A tabela 1 mostra os rendimentos alcoólicos obtidos neste estudo em comparação aos rendimentos teóricos.

Tabela 1. Relação entre o rendimento alcoólico obtido neste estudo e o rendimento esperado (teórico).

Sólidos solúveis no mosto industrial	Rendimento (neste estudo)	Rendimento (teórico)
14%	4,8 ± 0,22 %	7%
21%	7,062 ± 0,06%	7-11%
30%	15,99 ± 1,38%	17-19%

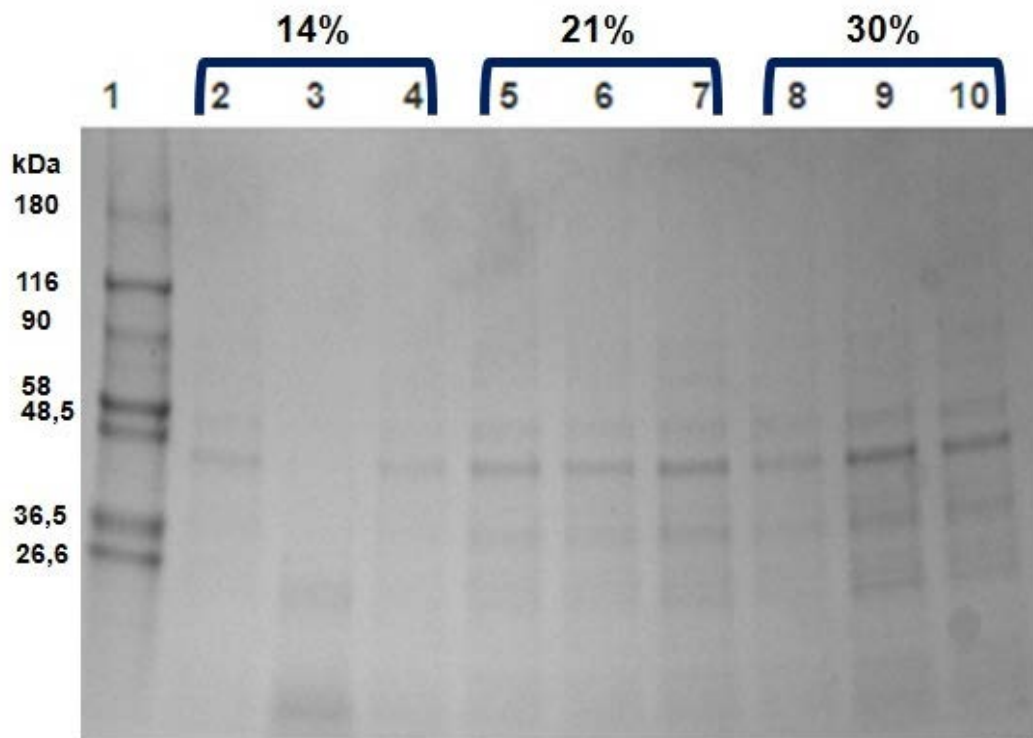
(Fonte: autor)

5.5 Eletroforese unidimensional

Os extratos obtidos a partir da ruptura de células retiradas ao final dos cultivos com período de duração de 10 h nas diferentes concentrações de sacarose foram submetidas a eletroforese em condições desnaturantes (SDS-PAGE) (figura 12). A partir do perfil eletroforético obtido, pode-se observar a predominância de proteínas com massa molecular inferiores a 58 kDa. Algumas destas proteínas estão presentes nas três condições de cultivo, ao passo que outras não, indicando respostas fisiológicas diferentes de acordo com a concentração de sacarose utilizada. Através da figura 13 sugere-se que o metabolismo ativado na condição contendo 2% de sacarose apresenta-se distinto daquele observado para as demais condições, podendo ser um futuro objeto de estudo proteômico para diferenciar o metabolismo fermentativo do metabolismo canalizado ao crescimento celular. O mosto utilizado na corrida

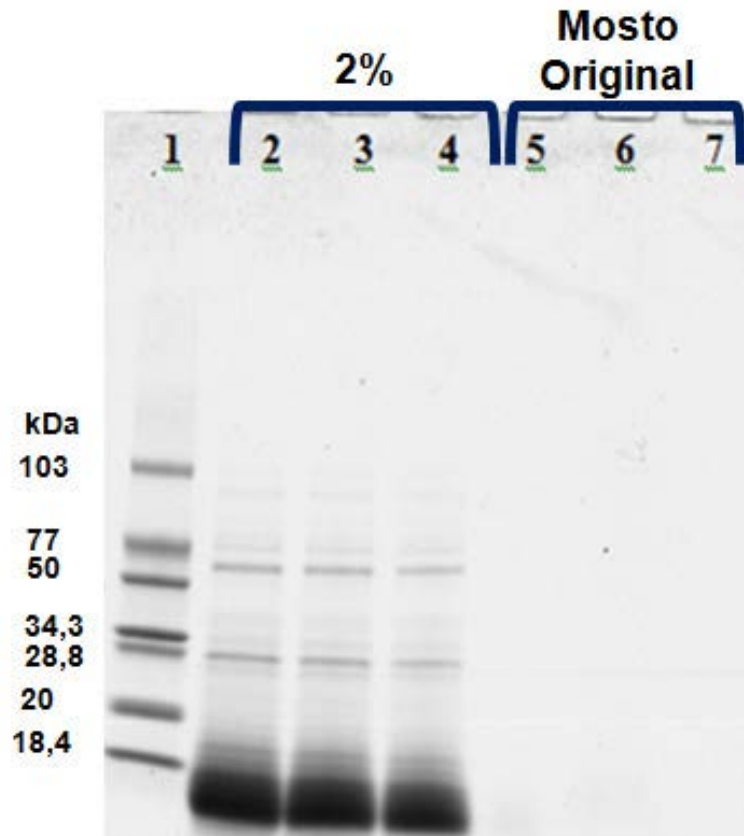
eletroforética (figura 13) possui 14% de sacarose, como determinado pela dosagem de açúcares, contendo aproximadamente 14,36°BRIX. Desta forma, podemos verificar que o mosto estudado não apresenta quaisquer contribuições relevantes em termos de proteínas que poderiam ser expressas tanto nos géis unidimensionais como nos géis bidimensionais, o que levaria a uma interferência indesejável na análise protéica de levedura nas diferentes condições.

Figura 12. SDS-PAGE para amostras proteicas intracelulares obtidas após cultivo da levedura CAT-1 em mosto com diferentes concentrações de sacarose. Raia 1: Marcadores de massa molecular; Raias 2-4: cultivo com 14% de sacarose; Raias 5-7: cultivo com 21% de sacarose; Raias 8-10: cultivo com 30% de sacarose.



(Fonte: autor)

Figura 13. SDS-PAGE para amostras protéicas intracelulares obtidas após cultivo da levedura CAT-1 em meio composto por 2% de sacarose (raias de 2-4) e perfil eletroforético do mosto original estéril, que continha 14% de sacarose (raias 5-6). Raia 1: marcadores de massa molecular.



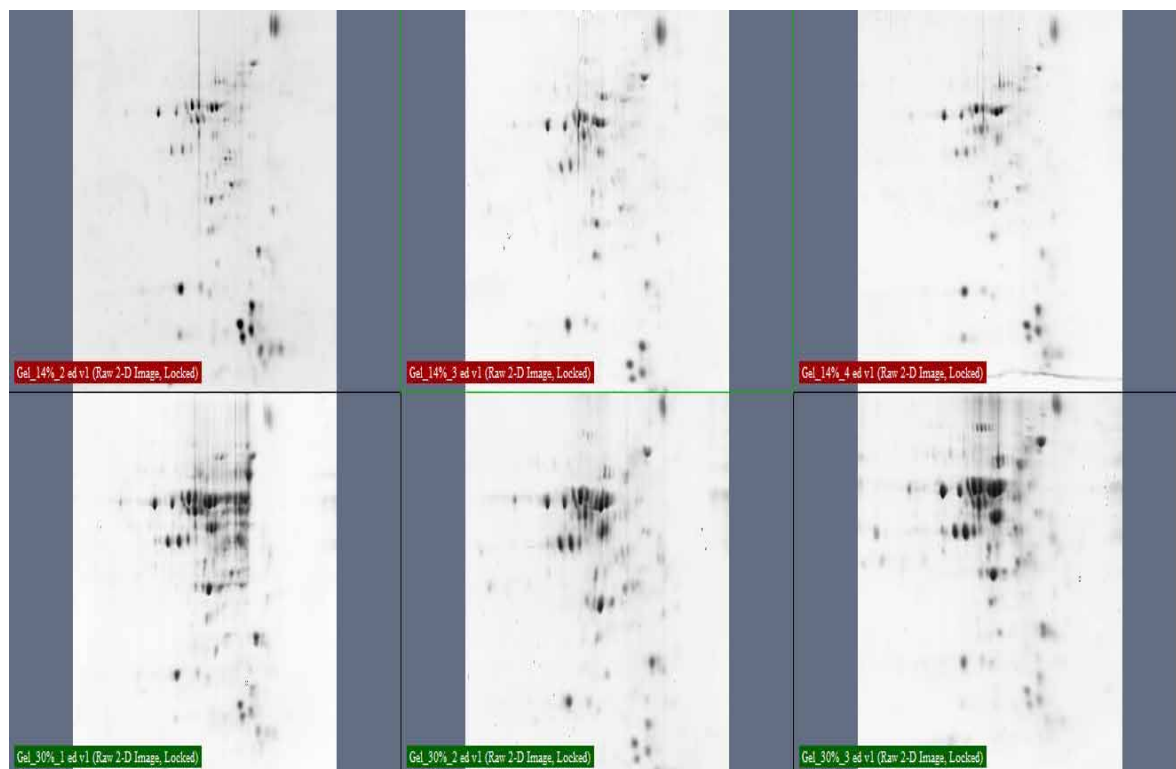
(Fonte: autor)

A partir dos resultados até aqui detalhados e após a avaliação em eletroforese unidimensional optou-se por prosseguir os estudos com duas das condições fermentativas: 14% e 30% de sacarose no mosto. Ademais, o estudo com o mosto contendo 14% de sacarose nos traz a elucidação do metabolismo global que compreende a levedura em uma das maiores usinas do interior paulista (Usina Santa Cruz), tendo em contraponto a análise da tecnologia VHGF representada pelo mosto ajustado para 30% de sacarose, uma promessa para a produção etanólica no país e no mundo.

5.6 Análise Proteômica

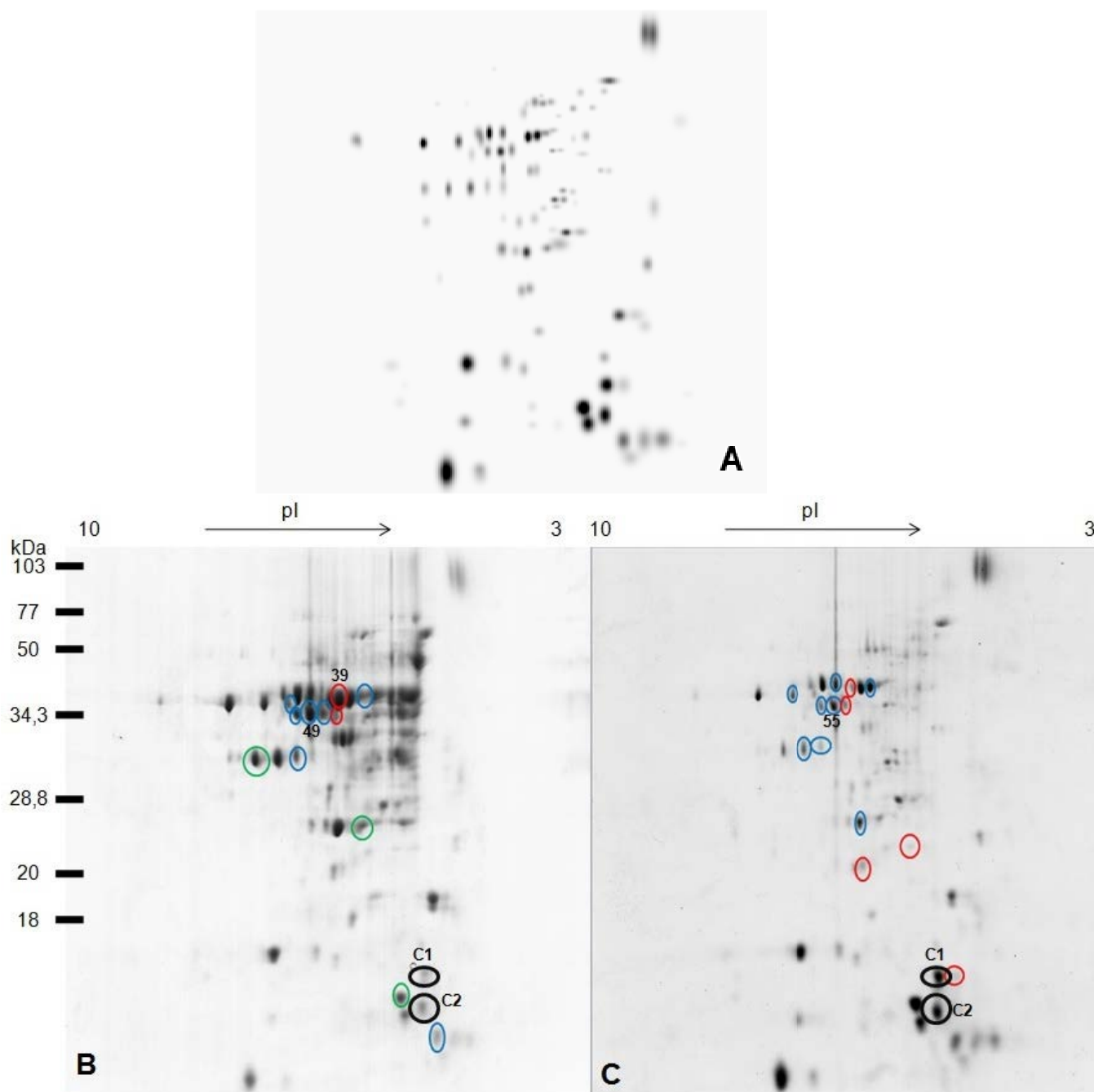
Os extratos celulares obtidos para as condições de cultivo contendo 14% e 30% de sacarose no mosto foram submetidos à eletroforese bidimensional. As triplicatas dos géis para ambas as condições são apresentadas na figura 14, evidenciando-se a boa reprodutibilidade. Na figura 15 são mostrados os géis representativos para ambas as condições de cultivo evidenciando os spots protéicos considerados diferenciais, bem o como o gel master. É possível observar que existem algumas bandas proteicas (spots) semelhantes para ambas as condições de cultivo empregadas. Por outro lado, outros spots são característicos e únicos de uma ou outra condição, reforçando o que foi previamente observado para a eletroforese unidimensional. Pode-se notar também diferenças quanto a intensidade de expressão protéica, o que foi confirmado mediante análise dos géis utilizando o software PDQuest. A maior quantidade de spots encontram-se entre pl 5 e 8 considerando ambas as concentrações de sacarose.

Figura 14. Triplicatas dos géis obtidos para os cultivos contendo 14% de sacarose (rotulação vermelha) e 30% de sacarose (rotulação verde). Cada um dos géis foi obtido em corrida eletroforética independente.



(Fonte: autor)

Figura 15. Gel Master (A) e perfis eletroforéticos bidimensionais dos extratos celulares obtidos a partir dos cultivos em mosto contendo 30% (B) e 14% (C) de sacarose. Os círculos vermelhos indicam os spots quantitativamente diferenciais segundo o teste t de Student, os azuis indicam spots proteicos quantitativamente diferenciais e os verdes indicam spots protéicos qualitativamente diferenciais. Os círculos pretos indicam spots que foram selecionados para estudos por estarem presentes em ambos os cultivos.



(Fonte: autor)

As análises no software foram realizadas com base em três parâmetros distintos: diferenças estatísticas entre os spots reveladas através do teste T de Student (intervalo

de confiança de 95%), diferenças quantitativas (considerando o aumento de 0,01 até 5 vezes na expressão de uma mesma proteína) e diferenças qualitativas. Para as análises estatísticas foram encontrados 7 spots protéicos diferenciais entre as condições estudadas, levando-se em consideração os parâmetros quantitativos. Quando analisada apenas as diferenças quantitativas entre as condições estudadas no presente trabalho, o número foi de 15 spots protéicos diferenciais e para as análises qualitativas observamos apenas 3 spots protéicos diferenciais, observando-se as condições de 14% e 30% de teor de sacarose. Na tabela 2 são apresentados os resultados para os géis analisados; o número de spots protéicos encontrados em cada um dos géis; a porcentagem de spots protéicos detectados em relação a todos os spots dos demais géis (taxa 1); a porcentagem de spots protéicos detectados em relação ao total de spots representados no gel master (taxa 2) e o coeficiente de correlação linear destas análises. Salienta-se neste ponto que um bom coeficiente, demonstrando que a análise é aceitável e confiável, corresponde a um número maior ou igual a 0,7. O gel master é um gel virtual, construído pelo software, que contém todos os spots protéicos observados em todas as condições analisadas para um grupo de géis, que neste caso envolveu três géis correspondentes às condições de cultivo da levedura CAT-1 contendo 14% de sacarose e três géis correspondentes às condições de cultivo da levedura CAT-1 contendo 30% de sacarose.

Tabela 2. Análise e taxas de correlação dos géis correspondentes às condições de cultivo de levedura em 14 e 30% de sacarose.

Gel	Spots Marcados	Taxa 1 (*)	Taxa 2 (**)	Coefficiente Colinear
14%_1	107	100%	91%	1.000
14%_2	98	78% + 4%	65% + 3%	0.833 +0.018
14%_3	79	78% + 8%	52% + 5%	0.755 +0.058
30%_1	137	60% + 5%	70% + 7%	1.000
30%_2	104	66% + 6%	58% + 1%	0.719 +0.014
30%_3	133	50%	57%	0.716 +0.030

* percentagem de spots protéicos detectados em relação a todos os spots dos demais géis.

** percentagem de spots protéicos detectados em relação a todos os spots do gel master.

(Fonte: autor)

Os spots protéicos foram submetidos à análise por espectrometria de massas e obteve-se a identificação de 5 proteínas já observadas para *S. cerevisiae* S288c, microrganismo padrão na comparação com demais linhagens, na literatura. As proteínas identificadas correspondem à: ditiol glutarredoxina – GRX 1 (spot C1), Rtc3p (spot C2), Fosfopiruvato hidratase – ENO 2 (spot 39), Álcool desidrogenase – ADH 1 (spot 49) e Álcool Desidrogenase – ADH1 (spot 55). Na tabela 3 pode-se verificar o nome do gene, o pl experimental e o pl teórico, a massa molecular experimental e a massa molecular teórica, o score obtido na identificação, a taxa de cobertura e expressão, o nome da proteína, o tipo de situação diferencial observado através do PDQuest, bem como base de dados utilizada e microrganismo de referência.

Tabela 3. Identificação dos spots protéicos de *S. cerevisiae* CAT-1 sob condições de cultivo contendo 14% e 30% de sacarose.

Spot	Gene	pI observado	pI teórico	Massa observada (kDa)	Massa teórica (kDa)	Score	Taxa de cobertura (%)	Expressão	Nome	Situação Diferencial	Microorganismo Referência	Base de Dados
C1	GRX1	5,00	4,98	12,46	12,49	104	22	-	Ditol Glutarredoxina	-	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> S288c	NCBI
C2	RTC3	5,60	5,05	12,00	12,09	286	33	-	Rtc3p	-	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> S288c	NCBI
39	ENO2	6,30	5,67	45,00	46,97	52	8	1,91**	Fosfopiruvato hidratase / Enolase	Estatística	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> S288c	NCBI
49	ADH1	6,10	6,21	34,50	37,00	159	10	1,08**	Álcool Desidrogenase	Quantitativa	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> S288c	NCBI
55	ADH1	6,10	6,27	35,00	37,3	489	484	0,52*	Álcool Desidrogenase	Quantitativa	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> S288c	NCBI / Swisspro

* mais expresso na condição contendo 14% de sacarose.

** mais expresso na condição contendo 30% de sacarose.

(Fonte: autor)

A proteína identificada como ditiol glutarredoxina é uma oxiredutase dependente de glutathione responsável por regular o estado reduzido das células da levedura, ou seja, sua função é proteger as células de estresse oxidativo causados pelo meio em que esta está sendo cultivada (Molina et al., 2004). Localiza-se no citosol das células de levedura e promove a redução de ligações dissulfeto em proteínas intracelulares em acoplamento com glutathione, NADPH e a glutathione redutase (Holmgren, 1989; Fernandes e Holmgren, 2004). Alguns autores revelam que esta mesma proteína apresenta papel importante na síntese de DNA e também no dobramento de proteínas (Grant, 2001; Holmgren, 1989). São proteínas pequenas e estáveis frente à altas temperaturas e apresentam correlação direta, embora pouco elucidada, com as tioredoxinas citosólicas (Trx1p/Trx2p), sendo estas últimas responsáveis pela manutenção da viabilidade celular da célula de levedura (Draculic, 2000). Embora esta proteína não tenha sido apontada pelo software PDQuest como sendo uma proteína nem qualitativamente nem quantitativamente diferencial, optou-se por investigá-la, uma vez que é encontrada em ambas as condições de cultivo estudadas de maneira bastante marcante. Desta forma, pode-se supor que a manutenção de uma boa viabilidade para as duas condições estudadas esteja relacionada à síntese e funcionalidade desta proteína e de outras correlatas. A Grx1p é encontrada em alguns trabalhos que investigam proteínas relacionadas ao estresse oxidativo sofrido por *S. cerevisiae* de diferentes linhagens (Molina et al., 2004; Luikenhuis et al., 1998; Silva, 2010; Rodrigues-Manzaneque et al., 1999).

O spot protéico denominado C2 também não foi apontado como diferencialmente expresso em uma ou outra condição de estudo, entretanto sua presença em todos os géis obtidos gerou uma análise mais detalhada sobre esta possível proteína. Através do sequenciamento, obteve-se como resultado a proteína Rtc3p (restriction of telomere capping protein 3), com função relacionada ao metabolismo de RNA. A Rtc3p

apresenta estrutura similar à uma proteína humana denominada SBDS, que quando sofre mutação origina a síndrome de Shwachman-Diamond, sendo utilizada como modelo para estudos nesta área (Savchenko et al., 2005). Zhao e equipe (2014), utilizando *S. cerevisiae* S288C cultivada em meios contendo diferentes fontes de nitrogênio, sugerem que esta proteína em conjunto com outras proteínas expressas por diferentes genes tem papel fundamental na metabolização das fontes de nitrogênio pela levedura. Gutteridge e colaboradores (2010) também observaram a expressão da proteína Rtc3p e descreveram-na como proteína associada ao metabolismo de RNA, sendo expressa sob condições limitantes de enxofre. Pela análise realizada através do software PDQuest, fica evidente que a taxa de sacarose não interfere na expressão desta proteína por *S. cerevisiae*.

A proteína ENO2p, fosfopiruvato hidratase, corresponde ao spot protéico numerado como 39 conforme descrito na tabela 3. Esta proteína tem sido reportada por diversos autores como responsável por catalizar a conversão de 2-fosfoglicerato em fosfoenolpiruvato na via glicolítica e converter 2-fosfoglicerato em fosfoenolpiruvato na gliconeogênese, ou seja, sua expressão é induzida em resposta aos níveis de glicose (McAlister e Holland, 1982; Byrne e Wolfe, 2005; Entian et al., 1987). A ENO2p, como reportada em outros artigos, sempre está relacionada à via glicolítica e, desta forma, tem impacto direto na formação de etanol como produto final nos processos fermentativos industriais (Cheng et al., 2008; Zuzuarregui et al., 2006; Kolkman et al., 2005; Hu et al., 2003), o que pode justificar neste estudo sua expressão aproximadamente 2 vezes maior nas condições de cultivo contendo 30% de sacarose.

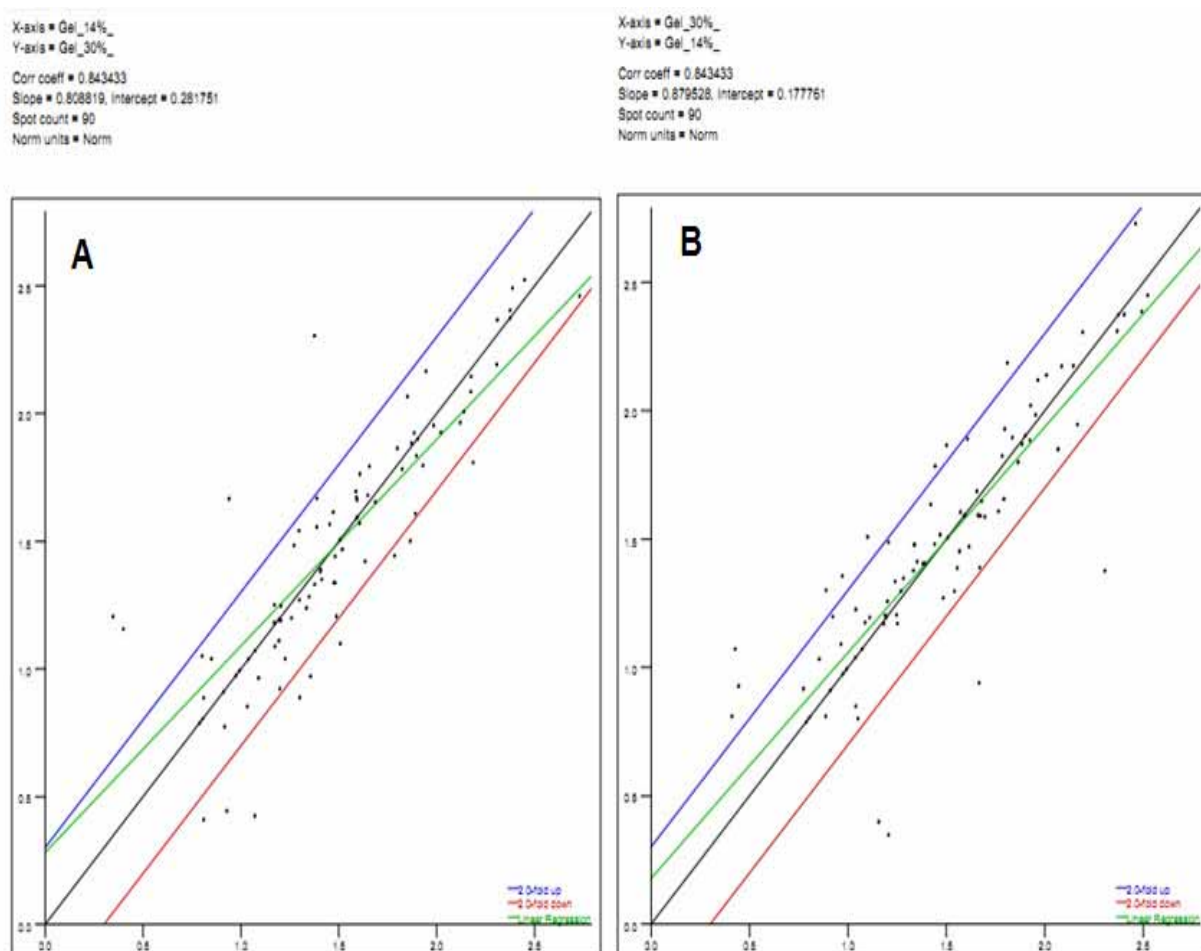
Os spots 49 e 55 foram seqüenciados e obteve-se como resultado a proteína ADH1p, conhecida como álcool desidrogenase 1. A ocorrência em dois spots de uma mesma proteína pode estar relacionada ao processamento pós-traducional desta como, por exemplo, acetilação e fosforilação (Cheng et al., 2008; Kolkman et al., 2005;

Boucherie et al., 1995). A álcool desidrogenase é uma enzima requerida para a redução de acetaldeído a etanol, ou seja, está completamente envolvida na fermentação alcoólica (Huang et al., 2012). Verifica-se que para este presente estudo, a ADH1p referente a condição contendo 30% de sacarose foi expressa 1,08 vezes mais se comparada à mesma proteína da condição contendo 14% de sacarose. Entretanto, a ADH1p referente a condição contendo 14% de sacarose apresentou expressão aproximadamente 0,52 vezes maior que na condição contendo 30% de sacarose, resguardando-se a correspondência dos spots protéicos. Isso pode sugerir que a partir da ativação do metabolismo fermentativo haverá a expressão de ADH1p, levando-se em consideração a produção de etanol e sua concentração total ao final do processo, isto é, quanto maior o nível de sacarose disponível no meio, maior será a conversão em glicose e consequentemente maior será a obtenção do produto de interesse, o etanol.

As demais proteínas apontadas na figura 15 como diferenciais estão sendo analisadas e em breve auxiliarão na compreensão do metabolismo global da levedura CAT-1. Como esta é uma das leveduras mais empregadas na indústria brasileira de álcool, é de extrema importância que ocorra a elucidação de seu metabolismo frente a diferentes condições para que possa ocorrer o aprimoramento do processo e consequentemente a obtenção de um produto de melhor qualidade e com menor gasto embutido.

Na figura 16 constam os dados referentes à dispersão dos spots protéicos de acordo com os dados quantitativos, levando-se em consideração um coeficiente de correlação linear calculado para os grupos experimentais de acordo com as condições examinadas: grupo 30% e grupo 14%.

Figura 16. Gráfico de dispersão correlacionando spots do grupo 14% e spots do grupo 30% (A) e do grupo 30% e 14% (B). A linha preta agrupa os spots presentes em ambos os grupos. As linhas vermelha e azul consideram os resultados quantitativos (menores ou maiores que duas vezes, respectivamente). A linha verde indica a regressão linear. Esta figura foi gerada pelo software PDQuest, sem quaisquer alterações, baseada no gel master elaborado.



(Fonte: autor)

Estes gráficos de dispersão (figura 16) mostram que a correlação do agrupamento 14% e 30% (A) apresenta o mesmo coeficiente de regressão linear que a correlação do agrupamento 30% e 14% (B), sendo igual à 0,84, sendo considerado adequado pelo software um coeficiente $\geq 0,7$. Ressalta-se que a construção dos gráficos de dispersão de acordo com cada agrupamento indica a reprodutibilidade da triplicata dos géis 2D-PAGE. A regressão linear (linha verde) observada na figura 16-B apresentou-se pouco deslocada em relação à figura 16-A, assim como alguns pontos,

correspondente aos spots, apresentaram maiores diferenças quantitativas (acima da linha azul ou abaixo da linha vermelha, indicando respectivamente 2 vezes mais ou menos expressão de proteína), o que indica algumas discrepâncias entre as tréplicas de géis bidimensionais, fato que não prejudica dado algum, uma vez que o coeficiente está acima do valor padrão que assegura a reprodutibilidade dos experimentos.

Conclusões

6. CONCLUSÕES

Até o presente momento, é possível afirmar que os cultivos realizados com 30% de sacarose são realmente mais vantajosos quando comparados aos demais. Os resultados obtidos em relação à biomassa, viabilidade celular, ao rendimento etanólico e a atividade invertásica foram superiores para os cultivos contendo 30% de sacarose, evidenciando um melhor desempenho da levedura CAT-1 em cultivos com elevados teores de açúcares dissolvidos, favorecendo assim altos rendimentos de produto.

A atividade invertásica não diferiu grandemente quando analisada as quatro condições de cultivo empregadas, embora tenha apresentado um pico de atividade enzimática mais saliente para a condição de cultivo contendo 30% de sacarose. Os rendimentos de etanol foram bastante satisfatórios, pois se encontram dentro da linearidade teórica, reforçando a validade do cultivo de bancada com possíveis ampliações futuras de escala, sendo assim viável para a indústria alcooleira. Além disso, demonstra-se que a condição VHGF apresenta produção de etanol bastante superior se comparada à HGF, empregada atualmente em usinas brasileiras.

Adicionalmente, a análise inicial do proteoma para as condições de 14% e 30% de sacarose no mosto foi satisfatória e reprodutível. Foram observadas proteínas diferenciais em ambos os géis e, após o sequenciamento identificou-se tais proteínas, obtendo como diferenciais entre os dois cultivos proteínas relacionadas diretamente ao metabolismo de glicose (ENO2p), bem como relacionadas a conversão final de acetaldeído em etanol (ADH1p). Outras proteínas também foram analisadas pela presença marcante em ambas as condições de estudo e revelaram relação com estresse oxidativo (GRX1p) e metabolismo de RNA (Rtc3p).

Estudos futuros serão necessários para elucidação completa do proteoma diferencial da *S. cerevisiae* CAT-1. Faz-se necessária a dosagem dos nutrientes do mosto para compreensão do metabolismo de fontes de nitrogênio. Além disso, as

demais proteínas apontadas aqui como diferenciais deverão ser seqüenciadas para a compreensão do metabolismo global desta levedura, especialmente no que se refere à repressão catabólica.

Referências

REFERÊNCIAS

- ALCARDE, A.R. **Processamento da cana-de-açúcar**. Brasília, DF: Agencia Embrapa de Informação Tecnológica, 2007. Disponível em: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/cana-de-acucar/arvore/CONTAG01_102_22122006154841.html>. Acesso em: 15 fev. 2014.
- AMORIM, H. V.; LEÃO, R. M. **Fermentação alcoólica**: ciência e tecnologia. Piracicaba: Fermentec, 2005. v. 30. 433 p.
- AMORIM NETO, H.B.; YOHANNAN, B.K.; BRINGHURST, T.A.; BROSNAN, J.M.; PEARSON, S.Y.; WALKER, J.W.; WALKER, G.M. Evaluation of a brazilian fuel alcohol yeast strain for scotch whisky fermentations. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 3, n. 115, p. 198-207, 2009.
- ANDRIETTA, S.R.; STECKELBERG, C.; ANDRIETTA, M.G.S. Bioetanol - Brasil, 30 anos na vanguarda. **Multiciência**: Revista Interdisciplinar dos Centros e Núcleos da UNICAMP, 2006. Disponível em: <https://www.multiciencia.unicamp.br/art02_7.htm>. Acesso em: 21 fev. 2014.
- ANDRIETTA, S.R.; STECKELBERG, C.; ANDRIETTA, M.G.S. Study of flocculent yeast performance in tower reactors for bioethanol production in a continuous fermentation process with no cell recycling. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 8, p. 3002-3008, 2008.
- BABRZADEH, F.; JALILI, R.; WANG, C.; SHOKRALLA, S.; PIERCE, S.; ROBINSON-MOSHER, A.; NYREN, P.; SHAFER, R.W.; BASSO, L.C.; AMORIM, H.V.; OLIVEIRA, A.J.; DAVIS, R.W.; RONAGHI, M.; GHARIZADEH, B.; STAMBUK, B.U. Whole-genome sequencing of the efficient industrial fuel-ethanol fermentative *Saccharomyces cerevisiae* strain CAT-1. **Molecular Genetics and Genomics**, v. 287, n. 6, p. 485-494, 2012.
- BACCARIN, J.G. **Adesregulamentação e a dupla concentração sucroalcooleira**. 2005. 287 f. Tese (Doutorado em Engenharia de Produção)- Centro de Ciências Exatas e Tecnologia, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2005.
- BADOTTI, F. **Caracterização de populações de leveduras associadas à produção de cachaça artesanal e estudos bioquímicos do metabolismo de sacarose por linhagens de *Saccharomyces cerevisiae***. 2005. 78 f. Dissertação (Mestrado em Ciências dos Alimentos) - Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005.
- BAFRNCOVÁ, P.; SMOGROVICOVÁ, D.; SLÁVIKOVÁ, I.; PATKOVÁ, J.; DOMÉNY, Z. Improvement of very high gravity fermentation by media supplementation using *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology Letters**, v. 21, n. 4, p. 337-341, 1999.
- BAI, F.W.; ANDERSON, W.A.; MOO-YOUNG, M. Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks. **Biotechnology Advances**,

v. 26, n. 1, p. 86-105, 2008.

BARBOSA, H.S. **Fermentação de mosto com alto teor de sacarose para a produção de bioetanol combustível por diferentes linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* usando alta densidade celular**. 2013. 91 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2013.

BARFORD, F.; PHILLIPS, P.J.; ORLOWSKI, J.H. A new model of uptake of multiple sugars by *S. cerevisiae*. **Bioprocess Engineering**, v. 7, n. 7, p. 297-302, 1992.

BARNETT, J.A. The utilization of dissaccharides and some other sugars by yeast. **Advances in Carbohydrate Chemistry & Biochemistry**, v. 39, n. 1, p. 347-404, 1981.

BARRE, P.; BLONDIN, B.; DEQUIN, S.; FEUILLAT, M.; SABLAYROLLES, J.M.; BASSO, L.C. Fisiologia e ecologia microbiana. In: WORKSHOP TECNOLÓGICO SOBRE PRODUÇÃO DE ETANOL, 1., 2004, Piracicaba. **Resumos...** Piracicaba: ESALQ, 2004. p. 26.

BASSO, T. O. **Melhoramento da fermentação Alcoólica em *Saccharomyces cerevisiae* por engenharia evolutiva**. 2011. 137 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

BASSO, L.C.; AMORIM, H.V.; OLIVEIRA, A.J.; LOPES, M.L. Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil. **FEMS Yeast Research**, v. 8, n. 7, p. 1155-1163, 2008.

BELTER, P.A.; CUSSTER, E.L.; HU, W.S. **Bioseparation**: downstream processing for biotechnologies. New York: John Wiley & Sons, 1988. 368 p.

BERG, J.M.; TYMOCZKO, J.L.; STRYER, I. **Biochemistry**. 5th ed. New York: Freeman, 2002. 1050 p.

BONNICHSEN, R. Determination with alcohol dehydrogenase and DPN. In: BERGMAYER, H. U. **Methods of enzymatic analysis**. New York: Academic Press, 1965. p. 285-287.

BOUCHERIE, H.; SAGLIOCCO, F.; JOUBERT, R.; MAILLET, I.; LABARRE, J.; PERROT, M. Two-dimensional gel protein database of *Saccharomyces cerevisiae*. **Electrophoresis**, v. 17, n. 11, p. 1683-1699, 1996.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1/2, p. 248-254, 1976.

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

Transcriptional profiling of brazilian *Saccharomyces cerevisiae* strains selected for semi-continuous fermentation of sugarcane must. **FEMS Yeast Research**, v. 13, n. 3, p. 277-290, 2013.

BYRNE, K. P.; WOLFE, K. H. The yeast gene order browser: combining curated homology and syntenic context reveals gene fate in polyploidy species. **Genome Research**, v. 15, n. 10, p. 1456-1461, 2005.

CABALLERO-CÓRDOBA, G.M.; PACHECO, M.T.B.; SGARBIERI, V.C. Composição química de biomassa de levedura integral (*Saccharomyces* sp.) e determinação do valor nutritivo da proteína, em células íntegras ou rompidas mecanicamente. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.17, n.2, p.102-106, 1997.

CANDIANO, G.; BRUSCHI, M.; MUSANTE, L.; SANTUCCI, L.; GHIGGERI, G.M.; CARNEMOLLA, B.; ORECCHIA, P.; ZARDI, L.; RIGHETTI, P.G. Blue silver: a very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. **Electrophoresis**, v. 25, n. 9, p. 1327-1333, 2004.

CARVALHO, R.S. **Interações entre leveduras e bactérias durante a fermentação alcoólica**. 2001. 74 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2001.

CARVALHO, J. C. M.; SATO, S. Fermentação descontínua. In: SCHIMIDELL, W.; LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotecnologia industrial: engenharia bioquímica**. São Paulo: Edgar Blucher, 2001. v. 2, cap. 9, p. 205-222.

CASEY, G.P.; MAGNUS, C.A.; INGLEDEW, W.M. High-gravity Brewing: effects of nutrition on yeast composition, fermentative ability and alcohol production. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 48, n. 3, p. 639-646, 1984.

CASTRO, H.F. **Indústria alcooleira: processos químicos industriais II**. Lorena: Escola de Engenharia de Lorena, 2013. 21 p. Apostila. Disponível em: <<http://sistemas.eel.usp.br/docentes/arquivos/5840556/434/Apostila2IndustriaAlcooleira-2011.pdf>>. Acesso em 15 jan. 2015.

CASTRO, S. B.; ANDRADE, S. A.C. **Tecnologia do açúcar**. Recife: Ed. UFPE, 2007. 382 p.

CHENG, J.-S.; QIAO, B.; YUAN, Y.-J. Comparative proteome analysis of robust *Saccharomyces cerevisiae* insights into industrial continuous and batch fermentation. **Genomics and Proteomics**, v. 81, n. 2, p. 327-338, 2008.

DRACULIC, T.; DAWES, I. W.; GRANT, C. M. A single glutaredoxin or thioredoxin gene is essential for viability in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular Microbiology**, v. 36, n. 5, p. 1167-1174, 2000.

ENTIAN, K. D.; MEURER, B.; KÖHLER, H.; MANN, K. H.; MECKE, D. Studies on the regulation of enolases and compartmentation of cytosolic enzymes in

Saccharomyces cerevisiae. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 923, n. 2, p. 214-221, 1987.

FERNANDES, A. P.; HOLMGREN, A. Glutaredoxins: glutathione-dependent redox enzymes with functions far beyond a simple thioredoxin backup system. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 6, n. 1, p. 63-74, 2004.

FURTADO, T.A.; SCANDIFFIO, M.G. Alcool no Brasil - uma longa história. **Scientific American Brasil**, São Paulo, 2006. p. 66-71.

GANCEDO, J. M. Yeast carbon catabolite repression. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 62, n. 2, p. 334-361, 1998.

GARRELS, J.I.; McLAUGHLIN, C.S.; WARNER, J.R.; FUTCHER, B.; LATTE, G.I.; KOBAYASHI, R. Proteome studies of *Saccharomyces cerevisiae*: identification of abundant proteins. **Electrophoresis**, v. 18, n. 8, p. 1347-1360, 1997.

GÁSCON, S.; NEUMANN, N. P.; LAMPEN, J. O. Comparative study of the properties of the purified internal and external invertase from yeast. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 243, n. 7, p. 33-35, 1981.

GODOY, L.M.; OLSEN, J.V.; COX, J.; NIELSEN, M.L.; HUBNER, N.C.; FRÖHLIC, F.; WALTHER, T.C.; MANN, M. Comprehensive mass-spectrometry-based proteome quantification of haploid versus diploid yeast. **Nature**, v. 455, n. 7217, p. 1251-1254, 2008.

GOMBERT, A.K.; SANTOS, M.M.; CHRISTENSEN, B.; NIELSEN, J. Network identification and flux quantification in the central metabolism of *Saccharomyces cerevisiae* under different conditions of glucose repression. **Journal of Bacteriology**, v. 183, n. 4, p. 1441-1451, 2001.

GÖRG, A.; WEISS, W.; DUNN, M. J. Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. **Proteomics**, v. 4, n. 12, p. 3665-3685, 2004.

GRANT, C.M. Role of the glutathione/glutaredoxin and thioredoxin systems in yeast growth and response to stress conditions. **Molecular Microbiology**, v. 39, n. 3, p. 533-541, 2001.

GROOT, M.J.L.; DARAN-LAPUJADE, P.; van BREUKELN, B.; KNIJNENBURG, T.A.; HULSTER, E. A.F.; REINDERS, M.J.T.; PRONK, J.T.; HECK, A.J.R.; SLIJPER, M. Quantitative proteomics and transcriptomics of anaerobic and aerobic yeast cultures reveals post-transcriptional regulation of key cellular processes. **Microbiology**, v. 153, n. 11, p. 3864-3878, 2007.
GUTTERIDGE, A.; PIR, P.; CASTRILLO, J.I.; CHARLES, P.D.; LILLEY, K.S.; OLIVER, S.G. Nutrient control of eukaryote cell growth: a systems biology study in yeast. **BMC Biology**, v. 8, n. 68, 2010. doi:10.1186/1741-7007-8-68.

HOLMGREN, A. Thioredoxin and glutaredoxin systems. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 264, n. 24, p. 13963-13966, 1989.

HOLZER, H. Catabolite inactivation in yeast. **Trends in Biochemistry**, v. 1, n. 8, p. 178-181, 1976.

HU, Y.; WANG, G.; CHEN, G.Y.J.; FU, X.; YAO, S.Q. Proteome analysis of *Saccharomyces cerevisiae* under metal stress by two-dimensional differential gel electrophoresis. **Electrophoresis**, v. 24, n. 9, p. 1458-1470, 2003.

HUANG, E.L.; ORSAT, V.; SHAH, M.B.; HETTICH, R.L.; VerBERKMOES, N.C.; LEFSRUD, M.G. The temporal analysis of yeast exponential phase using shotgun proteomics as a fermentation monitoring technique. **Journal of Proteomics**, v. 75, p. 5206-5214, 2012.

KOLKMAN, A.; SLIJPER, M.; HECK, A.J. Development and application of proteomics technologies in *Saccharomyces cerevisiae*. **Trends in Biotechnology**, v. 23, n. 12, p. 598-604, 2005.

KOLKMAN, A.; OLSTHOORN, M.M.A.; HEEREMANS, C.E.M.; HECK, A.J.R.; SLIJPER, M. Comparative proteome analysis of *Saccharomyces cerevisiae* grown in chemostat cultures limited for glucose or ethanol. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 4, n.1, p. 1-11, 2004.

LACHANCE, M.-A. Yeast biodiversity: how many and how much? In: ROSA, C. A.; PETER, G. **Biodiversity and ecophysiology of yeasts**. Berlin: Springer, v. 1, chap. 1, p.1-5.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v.227, p. 680-685, 1970.

LANDRIGAN, P.J. The worldwide problem of lead in petrol. **Bulletin of the World Health Organization**, 2002. Disponível em: <<http://www.who.int/bulletin/archives/80%2810%29768.pdf>>. Acesso em: 21 jan. 2015.

LEE, S.S.; ROBINSON, F.M.; WANG, H.Y. Rapid determination of yeast viability. **Biotechnology Bioengineering Symposium**, v. 11, n. 3, p. 641-649, 1981.

LILLIE, S.H.; PRINGLE, J.R. Reserve carbohydrate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*: responses to nutrient limitation. **Journal of Bacteriology**, v. 143, n. 3, p. 1384-1394, 1980.

LIMA, U.A. Produção de etanol. In: SHMIDELL, W.; LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; MORZANI, W.; BLUCHER, E. (Ed.). **Biotechnologia industrial: processos fermentativos e enzimáticos**. São Paulo: Edgard Blucher, 2001. v. 2, p. 1-43.

LIU, X.D.; THIELE, D.J. Oxidative stress induced heat shock factor phosphorylation and HSF-dependent activation of yeast metallothionein gene transcription. **Genes & Development**, v. 10, n. 5, p. 592-603, 1996.

LODOLO, E.J.; KOCK, J.L.F.; AXCELL, B.C.; BROOKS, M. The yeast *Saccharomyces cerevisiae*: the main character in beer brewing. **FEMS Yeast Research**, v. 8, n. 7, p. 1018-1036, 2008.

LUIKENHUIS, S.; PERRONE, G.; DAWES, I.W.; GRANT, C.M. The yeast *Saccharomyces cerevisiae* contains two glutaredoxin genes that are required for protection against reactive oxygen species. **Molecular Biology of the Cell**, v. 9, n. 5, p. 1081-1091, 1998.

McALISTER, L.; HOLLAND, M.J. Targeted deletion of a yeast enolase structural gene. Identification and isolation of yeast enolase isozymes. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 257, n. 12, p. 7181-7187, 1982.

MENEGUETTI, C.C.; MEZAROBA, S.; GROFF, A.M. Processos de produção do álcool etílico de cana-de-açúcar e os possíveis reaproveitamentos dos resíduos resultantes do sistema. In: ENCONTRO DE ENGENHARIA DE PRODUÇÃO AGROINDUSTRIAL, 4., Campo Mourão. **Anais...** Campo Mourão: FECILCAM, 2010. p. 1-9.

MILLER, G.L. Dinitrosalicylic and reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.

MIRANDA JÚNIOR, M. **A utilização diferencial de glicose e frutose por leveduras vinícolas em meios contendo fontes de nitrogênio estruturalmente complexas**. 2008. 108 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2008.

MOLINA, M.M.; BELLÍ, G.; TORRE, M.A.; RODRÍGUEZ-MANZANEQUE, M.T.; HERRERO, E. Nuclear monothiolglutaredoxins of *Saccharomyces cerevisiae* can function as a mitochondrial glutaredoxins. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 50, p. 51923-51930, 2004.

NAUMOV, G.I.; NAUMOVA, E.S.; SANCHO, E.D.; KORHOLA, M.P. Polymeric SUC genes in natural populations of *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 135, n. 1, p. 31-35, 1996.

NEWTON, R.P.; BRENTON, A.G.; SMITH, C.J.; DUDLEY, E. Plant proteome analysis by mass spectrometry: principles, problems, pitfalls and recent developments. **Phytochemistry**, v. 65, n. 11, p. 1449-1485, 2004.

NGUYEN, T.H.; VIET MAN, L.V. Using high pitching rate for improvement of yeast fermentation performance in high gravity brewing. **International Food Research Journal**, v. 16, p. 547-554, 2009.

NGUYEN, Q.D.; REZESSY-SZABDO, J.M.; BHAT, M.K.; HOSCHKE, A. Purification and some properties of beta-fructofuranosidase from *Aspergillus niger* IM303386. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 2461-2466, 2005.

NOBRE, T.P.; HORII, J.; ALCARDE, A.R. Viabilidade celular de *Saccharomyces cerevisiae* cultivada em associação com bactérias contaminantes da fermentação alcoólica. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 1, p. 20-25, 2007.

PACHECO, T.F. **Fermentação alcoólica com leveduras de características floculantes em reator tipo torre com escoamento ascendente**. 2010. 106 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Faculdade de Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2010.

PANEK, A.D. Trehalose metabolism: new horizons in technological applications. **Brazilian Journal of Medical Biology Research**, v. 28, n. 2, p. 169-181, 1995.

PEREIRA, F.B.; GUIMARÃES, P.M.R.; TEIXEIRA, J.A.; DOMINGUES, L. Optimization of low-cost medium for very high gravity ethanol fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* using statistical experimental designs. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 20, p. 7856-7863, 2010.

PETER, G.J.; DURING, L.; AHMED, A. Carbon catabolite repression regulates amino acid permeases in *Saccharomyces cerevisiae* via the TOR signaling pathway. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 9, p. 5546-5552, 2006.

PHAM, T.K.; WRIGHT, P.C. Proteomic analysis of calcium alginate-immobilized *Saccharomyces cerevisiae* under high-gravity fermentation conditions. **Journal of Proteome Research**, v. 7, n. 2, p. 515-525, 2008.

PITTA, F.T.; MENDONÇA, M.L. O etanol e a reprodução do capital em crise. **Agrária**, v. 13, p. 4-33, 2010.

PRADEEP, P.; REDDY, O.V.S. High gravity fermentation of sugarcane molasses to produce ethanol: effect of nutrients. **Indian Journal Microbiology**, v. 50, p. 582-587, 2008.

PRETORIUS, I.S. Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking. **Yeast**, v. 16, n. 8, p. 675-729, 2000.

PULIGUNDLA, P.; SMOGROVICOVA, D.; OBULAM, V.S.R.; KO, S. Very high gravity (VHG) ethanolic brewing and fermentation: a research update. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 38, n. 9, p. 1133-1144, 2011.

RABILLOUD, T. Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: old, old fashioned, but it still climbs up the mountains. **Proteomics**, v. 2, n. 1, p. 3-10, 2002.

RABOBANK INDUSTRY NOTE. The future of ethanol: Brazilian and US perspectives. **Food & Agribusiness Research and Advisory**, n. 303, p. 1-14, 2012.

REIS, V.R. **Caracterização de linhagens selvagens de *Saccharomyces cerevisiae* isoladas de processos fermentativos para produção de etanol**. 2011. 81 f. Dissertação (Mestre em Ciências) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011.

RODRÍGUEZ-MANZANEQUE, M.T.; ROS, J.; CABISCOL, E.; SORRIBAS, A.; HERRERO, E. Grx5 glutaredoxin plays a central role in protection against oxidative damage in *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular and Cellular Biology**, v. 19, n. 12, p. 8180-8190, 1999.

RUBIO, M.C.; RUNCO, R.; NAVARRO, A.R. Invertase from a strain of *Rhodotorula glutinis*. **Phytochemistry**, v.61, n. 6, p.605-609, 2002.

SAID, S.; PIETRO, R.C.L.R. **Enzimas como agentes biotecnológicos**. Ribeirão Preto: Legis Summa, 2004. 416 p.

SALVATO, F. **Fermentação de mosto industrial por linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* com transportador de sacarose e expressão de invertase interna**: estudo comparativo com linhagens com alta e baixa atividade de invertase externa. 2010. 93 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

SAVCHENKO, A.; KROGAN, N.; CORT, J.R.; EVDOKIMOVA, E.; LEW, J.M.; YEE, A.A.; SÁNCHEZ-PULIDO, L.; ANDRADE, M.A.; BOCHKAREV, A.; WATSON, J.D.; KENNEDY, M.A.; GREEBLATT, J.; HUGHES, T.; ARROWSMITH, C.H.; ROMMENS, J.M.; EDWARDS, A.M. The Shwachman-Bodian-Diamond syndrome protein family is involved in RNA metabolism. **The Journal Biological Chemistry**, v. 280, n. 19, p. 13213-13220, 2005.

SCHAUTZ, L.C.A. **Interação das diferentes fontes de carbono e nitrogênio no metabolismo de linhagens *Saccharomyces cerevisiae* utilizadas em usinas**. 2011. 31 f. Monografia (Licenciatura em Química) - Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, Dourados, 2011.

SILVA, G.M. **Estudo e caracterização do processo de glutatilação e desglutatilação da unidade 20s do proteassomo da levedura *Saccharomyces cerevisiae***: implicações na regulação do metabolismo redox intracelular e na geração de peptídeos. 2010. 159 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

SILVEIRA, E.A. **Caracterização bioquímica de leveduras industriais produtoras de etanol cultivadas em diferentes açúcares**. 2013. 71 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2013.

STAMBUK, B.U.; SILVA, M.A.; ARAUJO, P.S. Active α -glucoside transport in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 170, n. 1, p. 105-110, 1999.

STEWART, G.G.; RUSSELL, I. **Brewer's yeast**: an introduction to brewing science & technology. London: The Institute of Brewing, 1998.108 p.

THEVELEIN, J.M. Regulation of energy metabolization in fungi. **Microbiology Reviews**, v. 48, n. 1, p. 42-59, 1984.

THEVELEIN, J.M. Signal transduction in yeast. **Yeast**, v. 10, n. 13, p. 1753-1790, 1994.

THOMAS, K.C.; INGLEDEW, W.M. Fuel alcohol production: effects of free amino nitrogen on fermentation of very-high-gravity wheat mashes. **Applied Environmental Microbiology**, v. 56, n. 7, p. 2046-2050, 1990.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. **Microbiologia**. 10. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

UNIÃO DA INDÚSTRIA DE CANA-DE-AÇÚCAR. **Moagem de cana-de-açúcar e produção de açúcar e etanol – safra 2013/2014**. São Paulo, 2014. Disponível em: <www.unica.com.br/unicadata>. Acesso em: 23 jan. 2015.

UNIÃO DA INDÚSTRIA DE CANA-DE-AÇÚCAR. **O etanol**: combustível limpo e renovável. São Paulo, 2008. Disponível em: <<http://www.unica.com.br/content/show.asp?cntCode=11891360-41CC-459C-9A22-191506941834>>. Acesso em: 15 jun. 2014.

UNIÃO DA INDÚSTRIA DE CANA-DE-AÇÚCAR. **Produção e uso do etanol combustível no Brasil**: respostas às questões mais frequentes. São Paulo, 2007. 70 p. Disponível em: <<http://www.unica.com.br/documentos/publicacoes/pag=7>>. Acesso em: 15 jun. 2014.

UNLU, M.; MORGAN, M.E.; MINDEN, J.S. Difference gel electrophoresis: a single gel method for detecting changes in protein extracts. **Electrophoresis**, v. 18, n. 11, p. 2071-2077, 1997.

VIEGAS, M. C. **Otimização de sistema de fermentação alcoólica contínua utilizando reatores tipo torre e leveduras com características floculantes**. 2003. 150 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) -Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.

VIEIRA, M.C.A.; LIMA, J.F.; BRAGA, N.M. **Setor sucroalcooleiro brasileiro**: evolução e perspectivas. Rio de Janeiro: BNDES, 2007. Disponível em: <http://www.bndes.gov.br/SiteBNDES/export/sites/default/bndes_pt/Galerias/Arquivos/conhecimento/liv_perspectivas/07.pdf>. Acesso em: 03 jul. 2014.

VILJOEN, B.C.; KNOX, A.M.; de JAGER, P.H.; LOURENS-HATTINGH, A. Development of yeast populations during processing and ripening of blue veined cheese. **Food Technology and Biotechnology**, v. 41, p. 291-297, 2003.

VILLEN, R. A. **Biotecnologia**: histórico e tendências. 2009. Disponível em: <<http://www.hottopos.com/regeq10/rafael.htm>> Acesso em: 04 jan. 2014.

VITOLO, M.; BORZANI, W. Measurement of invertase activity of cells of *Saccharomyces cerevisiae*. **Analytical Biochemistry**, v. 130, n. 2, p. 469-470, 1983.

WANG, B.; GE, X.M.; LI, N.; BAI, F.W. Continuous ethanol fermentation coupled with recycling of yeast flocs. **Chinese Journal of Biotechnology**, v. 22, n. 5, p. 816-820, 2006.

WANG, W.; SUN, J.; HARTLEP, M.; DECKWER, W.-D.; ZENG, A.-P. Combined use of proteomic analysis and enzyme activity assays for metabolic pathway analysis of glycerol fermentation by *Klebsiella pneumonia*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 83, n. 5, p. 525-536, 2003.

WILKINS, M.R.; PASQUALI, C.; APPEL, R.D.; OU, K.; GOLAZ, O.; SANCHEZ, J.C.; JAN, J. X.; GOOLEY, A.A.; HUGHES, E.; HUMPHERY-SMITH, I.; WILLIAMS, K.L.; HOCHSTRASSER, D.F. From proteins to proteomes: large scale protein identification by two-dimensional electrophoresis and amino acid analysis. **Nature**, v.14, n. 1, p. 61-65, 1996.

ZANON, J.P.; PERES, F.S.; GATTÁS, E.A.L. Colorimetric assay of ethanol using alcohol dehydrogenase from dry baker's yeast. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, n. 3, p. 466-470, 2007.

ZHAO, S.; ZHAO, X.; ZOU, H.; FU, J.; DU, G.; ZHOU, J.; CHEN, J. Comparative proteomic analysis of *Saccharomyces cerevisiae* under different nitrogen sources. **Journal of Proteomics**, v. 101, p. 102-112, 2014.

ZUZUARREGUI, A.; MONTEOLIVA, L.; GIL, C.; OLMO, M.-L. Transcriptomic and proteomic approach for understanding the molecular basis of adaptation of *Saccharomyces cerevisiae* to wine fermentation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 1, p. 836-847, 2006.