

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

– UNESP

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS - ARARAQUARA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ALIMENTOS E NUTRIÇÃO

**Avaliação fenotípica e genotípica de segregantes de
uma linhagem industrial de *Saccharomyces
cerevisiae***

Flávia Danieli Ibelli

Araraquara-SP
2015

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

– UNESP

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS - ARARAQUARA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ALIMENTOS E NUTRIÇÃO

***Avaliação fenotípica e genotípica de
segregantes de uma linhagem industrial de
Saccharomyces cerevisiae***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Alimentos e Nutrição, área de Biotecnologia de Alimentos, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutora em Alimentos e Nutrição.

Orientanda: Flávia Danieli Ibelli

Orientadora: Profa. Dra. Edwil Ap. Gattás

Co-orientador: Prof. Dr. Cleslei Fernando Zanelli

Araraquara-SP
2015

Ficha Catalográfica

Elaborada Por Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

- I12a** Ibelli, Flávia Danieli
Avaliação fenotípica e genotípica de segregantes de uma linhagem industrial de *Saccharomyces cerevisiae* / Flávia Danieli Ibelli. – Araraquara, 2015.
107 f.
- Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho".
Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Alimentos e
Nutrição. Área de Biotecnologia de Alimentos.
Orientadora: Edwil Aparecida de Lucca Gattás.
Coorientador: Cleslei Fernando Zanelli.
1. *Saccharomyces cerevisiae*. 2. Etanol. 3. Termorresistência. 4. Expressão gênica.
4. Fermentação. 5. RT-PCR quantitativa. I. Gattás, Edwil Aparecida de Lucca, orient. II.
Zanelli, Cleslei Fernando, coorient. III. Título.

CAPES: 50700006

DEDICATÓRIA

Gostaria de dedicar este trabalho a meus pais e minhas irmãs que sempre me incentivaram e deram forças para que esse sonho se tornasse possível... Entretanto, dedico especialmente ao meu grande amor: João Ibelli Neto, sem o qual talvez nada disso teria acontecido.

AGRADECIMENTOS

Agradecer é quase sempre uma injustiça, pois é impossível em apenas uma página trazer tudo e todos que contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho...

Inicialmente a Deus, que colocou em meu caminho todas as situações e oportunidades que me fizeram ser o que sou hoje!

Especialmente aos meus pais, Marivaldo e Célia, por me proporcionarem uma educação completa e por me ensinarem a amar e respeitar!

As minhas irmãs Fabiana e Fernanda, que sempre participaram de (quase) todos os momentos da minha vida, dando apoio para alcançar meus objetivos;

Ao meu marido pelo apoio incondicional sempre em todas as etapas da minha vida;

Um agradecimento especial a Professora Edwil de Lucca Gattás e ao Professor Cleslei F. Zanelli, pela confiança, dedicação, oportunidade e principalmente pelos grandes conhecimentos transmitidos sempre.

As professoras Dra. Ana Marisa Fusco Almeida e Dra. Maristela Freitas Sanches Peres pela participação e excelente contribuição no exame geral de qualificação deste trabalho.

Ao professor Dr. Rubens Monti pelos auxílios prestados sempre com muita simpatia durante o doutorado;

Ao professor Dr. Sandro R. Valentini, por me dar a oportunidade de fazer parte e aprender em seu laboratório de pesquisa;

À Adriana (in memorian), minha querida aluna de iniciação científica, que fez suas atividades sempre com muita dedicação e não pôde estar aqui para colher os frutos;

À todos os colegas de trabalho do laboratório de BiomolVZ pela orientação e ajuda sempre que necessário;

À Mariana, Rômulo e Adriana, técnicos dos laboratórios de Biologia Molecular e Biotecnologia de Alimentos, pelo auxílio nas análises práticas, sempre com muita atenção e boa vontade;

À UNESP e Faculdade de Ciências Farmacêuticas pelo apoio insitucional de infraestrutura, à CAPES pela bolsa concedida para a realização do projeto no país.

Às funcionárias da pós-graduação e biblioteca, sempre prontas para ajudar no que foi preciso.

OBRIGADA!

***“Embora ninguém possa voltar atrás e fazer um novo começo,
qualquer um pode começar agora e fazer um novo fim”.***

(Chico Xavier)

RESUMO

O processo de fermentação para produção de álcool combustível inclui a reutilização da biomassa de levedura, situação em que as células de levedura são expostas a condições de estresse, como temperaturas elevadas, aumento da concentração de etanol e baixos valores de pH. Este processo pode ocasionar uma redução da viabilidade celular, diminuindo de forma significativa o rendimento da fermentação. Algumas linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*, no entanto, apresentam termotolerância ou resistência a maiores concentrações de etanol, sendo capazes de se adaptar ao meio em que estão. Neste trabalho, uma linhagem de levedura industrial foi isolada da dorna de fermentação ao final de safra por apresentar capacidade de permanência no processo fermentativo e ser boa fermentadora. Com o intuito de avaliar quais genes estão envolvidos com essas características, a levedura isolada foi esporulada e dissecada para geração de novos segregantes, que foram analisados e selecionados quanto a termo e álcool resistência e capacidade fermentativa. Os resultados mostraram que dois dos segregantes avaliados apresentaram-se promissores com relação a capacidade fermentativa e resistência a altas temperaturas e concentrações de etanol quando comparados às linhagens industriais PE-2, CAT-1 e SA-1, largamente utilizadas nas usinas produtoras de etanol. Em seguida, foi realizado o ensaio de PCR em Tempo Real, para avaliar a relação dos genes APJ1, FPS1, MKT1, SWS2 e HSP12 com a tolerância ao etanol. Além disso, foi avaliado também a possibilidade do gene HSP12 ser um marcador molecular de estresse nas leveduras de linhagens industriais. Para isso, foram utilizadas duas linhagens de levedura: uma resistente ao etanol (MA-12) e não resistente (MA-139), excluída no início dos experimentos. Todos os genes avaliados apresentaram expressão significativa nas situações de estresse para a linhagem resistente MA-12, o que não aconteceu na linhagem sensível (com exceção do gene APJ1), o que evidencia que os genes selecionados estão diretamente relacionados com a resistência ao estresse. Os dados obtidos no ensaio de q-PCR também sugerem que o gene HSP12 pode ser utilizado como um marcador molecular de estresse em linhagens de levedura industriais, uma vez que apresentou expressão significativa nas duas situações de estresse.

Palavras-chave: *Saccharomyces cerevisiae*, Etanol, Termorresistência, Expressão gênica, Fermentação, RT-PCR quantitativa.

ABSTRACT

Fuel-ethanol fermentation process includes a reutilization of the yeast biomass, in which yeast cells are exposed to stress conditions as high temperature, increasing alcohol concentration and low pH values. This environment may cause a significant delay in fermentation and drop in cell viability. Some *Saccharomyces cerevisiae* strains, however, have thermotolerance or resistance to higher ethanol concentrations, while being able to adapt to the environment in which they are. In this work, the industrial resistant yeast strain was isolated from fermented sugar cane at the end of the harvest to be good leavening. Aiming to study genetic features associated with cell resistance to sustained stress in an industrial yeast strain, they were induced to sporulation and the ascospores were dissected in order to generate homozygous derivatives and were randomly selected for further phenotype analysis. The results have shown that two of segregating presented to be promising with the fermentative capacity and resistance to high temperature and ethanol concentration as compared to industrial strains PE-2, CAT-1 and SA-1. Following that, the real time PCR assay was performed to assess the relationship of APJ1, FPS1, MKT1, SWS2 and HSP12 genes with ethanol tolerance. Furthermore, was also analyzed the differential expression of the HSP12 gene as a molecular marker for stress-resistance in industrial yeast. The PCR was performed with two yeast strains: a resistant yeast (MA-12) and non-resistant (MA-139, ruled in the early experiments) and shows with all genes evaluated revealed a significant expression in stress situations for the resistant strain MA-12, which did not happen in the sensitive yeast (except for APJ1 gene), which shows that the selected genes are directly related to stress resistance. The results also suggest that HSP12 gene can be used as a molecular marker of stress in industrial yeast strains, since they have shown significant expression in the two situations of stress.

Keywords: *Saccharomyces cerevisiae*, Ethanol, Thermoresistance, Gene Expression, Fermentation, Quantitative RT-PCR.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fluxograma do processo simplificado de produção conjunta de açúcar e etanol.....	20
Figura 2. Identificação de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> por PCR com <i>primers</i> específicos para amplificação do gene HO (Scho-F and Scho-R).....	56
Figura 3. Morfologia das linhagens de leveduras selecionadas.....	57
Figura 4. Temperatura máxima de crescimento das leveduras selecionadas em meio contendo 10% de etanol.....	61
Figura 5. Floculação (%) das leveduras selecionadas na presença e ausência de cálcio.....	65
Figura 6. Probabilidade normal dos efeitos dos fatores avaliados e suas interações na viabilidade celular das leveduras avaliadas.....	68
Figura 7. Superfície de resposta ajustada e gráfico de contorno correspondente à viabilidade celular em função da concentração de etanol e pH com a temperatura ajustada em 32,5°C.....	69
Figura 8. Superfície de resposta ajustada e gráfico de contorno correspondente à viabilidade celular em função da concentração de etanol e pH com a temperatura ajustada em 40°C.....	70
Figura 9. Superfície de resposta ajustada e gráfico de contorno correspondente à viabilidade celular em função da temperatura e concentração de etanol com pH ajustado em 4,0.....	71
Figura 10. Curva analítica de concentração de Biomassa.....	74
Figura 11. Curva analítica de concentração de Glicose.....	77
Figura 12. Variação da velocidade de formação de NADH em função do tempo de reação da amostra em comparação ao branco e Atividade (U/mL) da enzima álcool desidrogenase em diferentes concentrações de etanol (coeficiente de correlação linear	

R2=0,9756)..... 80

Figura 13. Análise da expressão relativa dos níveis de RNA mensageiro dos genes APJ1, FPS1, MKT1, SWS2 e HSP12 em linhagens industriais de *S. cerevisiae*..... 87

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. <i>Primers</i> utilizados nas reações de PCR para amplificação do gene HO.....	37
Tabela 2. Programa utilizado no termociclador para amplificação do gene HO.....	37
Tabela 3. Descrição dos genes estudados, sequência dos primers utilizados e características do produto de amplificação.....	51
Tabela 4. Seleção das leveduras esporuladas em relação ao crescimento em diferentes temperaturas e concentrações de etanol.....	60
Tabela 5. Efeito do etanol e temperatura na viabilidade celular ao final de 48 horas de ensaio.....	64
Tabela 6. Crescimento das leveduras selecionadas em diferentes pHs.....	64
Tabela 7. Coeficientes de regressão dos fatores temperatura (T), pH e concentração de etanol (E) e as respectivas interações na viabilidade celular.....	67
Tabela 8. Análise de variância (ANOVA) dos fatores temperatura (T), pH e concentração de etanol (E) em níveis lineares (L) e quadráticos (Q) e as respectivas interações na viabilidade celular.....	67
Tabela 9. Biomassa (mg/mL) apresentada pelas fermentações com culturas puras e mistas de <i>S.cerevisiae</i> durante os quatro ciclos de fermentação.....	75
Tabela 10. Viabilidade celular (%) apresentada pelas fermentações com culturas puras e mistas de <i>S.cerevisiae</i> durante os quatro ciclos de fermentação.....	76
Tabela 11. Teor de ART residual (g/100 mL) apresentado pelas fermentações com culturas puras e mistas de <i>S.cerevisiae</i> durante os quatro ciclos de fermentação.....	78
Tabela 12. Teor alcoólico % (v/v) apresentado pelas fermentações com culturas puras e mistas de <i>S.cerevisiae</i> durante os quatro ciclos de fermentação.....	81
Tabela 13. Eficiência fermentativa (%) das culturas puras e mistas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> nos quatro ciclos de fermentação.....	82

ABREVIATURAS

ng	Nanograma
µg	Micrograma
mg	Miligrama
µL	Microlitro
mL	Mililitro
nm	Nanômetro
nM	Nanomolar
µM	Micromolar
mM	Milimolar
M	Molar
U	unidade de atividade enzimática
cDNA	DNA complementar ao mRNA
DNA	ácido desoxirribonucléico
RNA	ácido ribonucléico
mRNA	RNA mensageiro
dNTP	desoxirribonucleotídeos (dATP, dCTP, dGTP e dTTP)
D.O. _{600nm}	densidade óptica a 600nm
D.O. _{260nm}	densidade óptica a 260nm
D.O. _{570nm}	densidade óptica a 280nm
DTT	Ditiotreitol
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
HCl	ácido clorídrico
NaCl	cloreto de sódio
MgCl ₂	cloreto de magnésio
kDA	Quilodalton
YPD	“yeast extract, peptone, dextrose” (meio rico para levedura)
SC	meio sintético completo para levedura
pH	potencial hidrogeniônico
BME	beta-mercaptoetanol
S-SPO	“super-sporulation media” (meio para esporulação de levedura)
TE	tampão Tris-EDTA
Tris	tris-hidroximetilaminometano (trizma base)

<i>g</i>	aceleração gravitacional
kb	Kilobase
pb	pares de base
h	Hora
min	Minuto
UV	Ultravioleta
PBS	“phosphate buffered saline” (solução salina tamponada com fosfato)
PBST	PBS com Tween 20
mA	Miliampère
V	Volt
v/v	relação volume/volume
rpm	rotações por minuto

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. OBJETIVOS	16
2.1. Objetivo geral	16
2.2. Objetivos específicos e Justificativas	16
3. REVISÃO DE LITERATURA	19
3.1. Produção de etanol no Brasil	19
3.2. Processo fermentativo para produção de etanol	21
3.2.1. Fatores estressantes para a levedura durante o processo de fermentação alcoólica	24
3.2.2. Leveduras utilizadas no processo	26
3.3. Resposta ao estresse fermentativo	27
3.3.1. Temperatura	29
3.3.2. Ácido (pH)	30
3.3.3. Etanol	32
3. MATERIAL E MÉTODOS	34
3.1. MATERIAL	34
3.1.1. Microrganismos utilizados	34
3.1.2. Meios de cultura e tampões	34
3.2. MÉTODOS	35
3.2.1. Identificação das leveduras coletadas por técnica de PCR	36
3.2.1.1. Extração de DNA genômico	36
3.2.1.2. Condições da <i>PCR</i>	37
3.2.2. Armazenamento das linhagens de levedura	37
3.2.3. Esporulação da levedura, dissecação e caracterização de tétrades	38

3.2.3.1. Esporulação da levedura coletada.....	38
3.2.3.2. Dissecção e caracterização de tétrades.....	38
3.2.4. Seleção dos segregantes obtidos a partir do fenótipo de resistência ao estresse fermentativo, como altas temperaturas, altas concentrações de etanol, baixo pH e floculação.....	39
3.2.4.1. Análise do fenótipo de sensibilidade a temperatura e diferentes concentrações de etanol.....	39
3.2.4.2. Teste de tolerância a alta temperatura.....	39
3.2.4.3. Teste de tolerância ao etano.....	39
3.2.4.4. Teste de tolerância a alta temperatura e etanol.....	40
3.2.4.5. Teste de tolerância ao pH.....	40
3.2.4.6. Teste de floculação.....	40
3.2.5. Estudo dos efeitos significativos entre temperatura, pH e concentração de etanol na viabilidade celular.....	41
3.2.6. Ensaio fermentativo com reciclo de célula e tratamento do fermento.....	42
3.2.6.1. Determinação do °Brix.....	42
3.2.6.2. Crescimento celular (determinação da biomassa).....	43
3.2.6.3. Determinação da viabilidade celular.....	43
3.2.6.4. Determinação de açúcares totais.....	43
3.2.6.4.1. Preparo do reagente de DNS.....	44
3.2.6.4.2. Preparo do padrão.....	44
3.2.6.4.3. Preparo das amostras.....	44
3.2.6.4.4. Quantificação de açúcares nas amostras.....	45
3.2.6.5. Determinação do teor alcoólico.....	45
3.2.6.5.1. Dosagem de etanol nas amostras.....	46

3.2.6.6. Cálculo da eficiência fermentativa.....	47
3.2.7. Expressão Gênica por PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR).....	47
3.2.7.1. Extração e preparo de RNA total de levedura.....	48
3.2.7.2. Síntese de cDNA através da Transcrição Reversa.....	49
3.2.7.3. Desenho e padronização dos primers e reação de PCR em tempo real.....	50
3.2.8. Análise de dados.....	53
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	55
4.1. Identificação da levedura coletada como <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	55
4.2. Esporulação da levedura, dissecação e caracterização de tétrades.....	57
4.3. Seleção dos segregantes obtidos a partir do fenótipo de resistência ao estresse fermentativo, como altas temperaturas, altas concentrações de etanol, baixo pH e floculação.....	58
4.4. Estudo dos efeitos significativos entre temperatura, pH e concentração de etanol na viabilidade celular através da metodologia de superfície de resposta.....	65
4.5. Ensaio fermentativo com reciclo de célula e tratamento do fermento.....	72
4.6. Análise da expressão gênica quantitativa por PCR em tempo real.....	82
5. CONCLUSÕES.....	88
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	90

1. INTRODUÇÃO

A busca por fontes de energias alternativas aos combustíveis fósseis tem crescido devido à inevitável diminuição das reservas de petróleo e o seu consequente aumento de preço. Neste cenário atual, o etanol é o biocombustível mais utilizado e produzido em grande escala.

O uso do etanol no lugar de derivados do petróleo diminui significativamente a taxa de emissão de monóxido de carbono (CO), hidrocarbonetos e enxofre na atmosfera, sendo, portanto menos tóxico (GOLDEMBERG, 2008).

O etanol brasileiro é produzido pela fermentação dos açúcares presentes na cana-de-açúcar. O que torna a fermentação a forma mais importante de obtenção de etanol é a grande quantidade de matérias-primas naturais existentes em todo o país, sendo a cana-de-açúcar, sem dúvida, a mais importante (BAI, 2008).

Segundo Goldemberg *et al.* (2008) para uma produção viável de etanol industrial, o processo de fermentação deve ser extremamente robusto e pouco afetado por pequenas alterações da matéria-prima, além da minimização dos custos que podem ser obtidos pela obtenção do máximo rendimento de etanol, minimização na síntese de outros produtos (glicerol, ácido láctico), manutenção da alta viabilidade do fermento (70% - 80%) e minimização de gastos com manutenção (limpeza, vazamentos) e energia e água.

As leveduras, especialmente do gênero *Saccharomyces*, são os microrganismos principais na obtenção do etanol por via fermentativa. A fermentação para produção de bioetanol envolve 12 reações em sequência ordenada (LIMA *et al.*, 2005) e, resumidamente, consiste na transformação do açúcar (ou cereais, como a cevada e o malte) em álcool e gás carbônico, sob a ação das leveduras.

O grande sucesso da *Saccharomyces cerevisiae* na indústria de biotecnologia é devido à alta capacidade de produzir etanol e dióxido de carbono a partir de açúcares. Além disso, possui importantes características requeridas para o processo industrial, como: tolerância ao estresse fermentativo como, por exemplo, baixos valores de pH e alta concentração de açúcar e etanol, alta competitividade perante contaminação (bacteriana ou por outras leveduras) na dorna de fermentação e alta resistência a inibidores presentes na

biomassa hidrolisada e capacidade de crescer anaerobicamente (BRANDUARDI *et al.*, 2008; NEVOIGT, 2008).

Apesar dos grandes avanços tecnológicos e do vasto conhecimento a respeito do potencial produtivo das leveduras, ainda existe muitos aspectos desconhecidos, principalmente quando se trata da genética e bioquímica das leveduras utilizadas nas usinas para fermentação alcoólica (BASSO *et al.*, 2008).

Estudos mais recentes são relativos à análise genômica comparativa. As cepas mais estudadas são linhagens industriais fermentadoras principalmente para a produção de vinho (BORNEMAN *et al.*, 2008; CARRETO *et al.*, 2008). Muito pouco se conhece sobre as linhagens produtoras de etanol, especialmente quando se trata de caracterização fenotípica e genotípica e expressão gênica.

Estas linhagens precisam ser exploradas e estudadas mais detalhadamente para o entendimento de características e fenômenos que podem ser essenciais para o uso biotecnológico, pois o conhecimento dos fatores responsáveis pela alta eficiência fermentativa e robustez dessas leveduras industriais é essencial para se estabelecer uma estratégia para melhorar ainda mais estas linhagens.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliar, genotípica e fenotipicamente, segregantes obtidos de uma levedura industrial de produção de etanol.

2.2. Objetivos específicos e Justificativas

2.2.1. Identificação da levedura coletada como *Saccharomyces cerevisiae* através da técnica de PCR utilizando *primer* específico

Como o microambiente na dorna de fermentação é altamente suscetível a contaminação microbiana e por outras leveduras, essa identificação torna-se fundamental para evitar que outras leveduras do gênero *Saccharomyces* sejam isoladas para estudo.

2.2.2. Obtenção de segregantes da levedura coletada através da sua esporulação e dissecação

Para a geração de novos segregantes, optou-se pela esporulação pelo fato de esta ser, em leveduras, um tipo de reprodução e um fator importante por desempenhar uma função de produção de novos híbridos e manter a viabilidade das espécies durante as variações do meio ambiente.

2.2.3. Seleção dos segregantes obtidos a partir do fenótipo de resistência ao estresse fermentativo, como altas temperaturas, altas concentrações de etanol, baixo pH e floculação

Várias características são requeridas para uma levedura para um adequado processo industrial de produção de etanol, como: crescimento rápido e tolerância a altas concentrações de etanol e temperatura e atividade celular em ambientes ácidos. Por esse motivo, para saber se uma linhagem de levedura é adequada ao processo industrial, ela deve apresentar estas características e esses ensaios foram realizados com esse objetivo.

2.2.4. Avaliar o desempenho fermentativo dos segregantes selecionados

Entre as características citadas como fundamentais para uma levedura industrial para o processo de produção de bioetanol, a mais importante é a eficiência fermentativa. Existem algumas leveduras do gênero *Saccharomyces* que possuem resistência a altas temperaturas e concentrações de etanol, mas não possuem habilidade para produzir etanol de forma eficiente.

2.2.5. Verificar a expressão dos genes APJ1, FPS1, MKT1 e SWS2 dos segregantes selecionados nas condições de estresse por etanol e estresse geral (etanol, pH e temperatura).

Os genes descritos acima foram identificados e relacionados com uma maior tolerância ao etanol em estudos recentes utilizando linhagens industriais. A tolerância a altas concentrações de etanol é uma característica específica de algumas linhagens industriais de *Saccharomyces cerevisiae* e como foi descrito na revisão deste trabalho, permite que a levedura domine o processo de fermentação industrial em casos de contaminação por outros microrganismos. No entanto, ressalta-se que os fatores genéticos e mecanismos celulares para a tolerância à altas concentrações de etanol de linhagens industriais ainda não são totalmente conhecidos pois até o presente momento a maioria dos estudos que relacionam essa característica foram realizados com linhagens de laboratório que, na maioria das vezes, apresentam moderada tolerância ao etanol e não são boas fermentadoras.

Pelo fato dos segregantes obtidos da levedura isolada terem apresentado características desejáveis ao processo industrial (alta tolerância ao etanol e boa capacidade fermentativa) em ensaios preliminares, torna-se bem interessante a avaliação do perfil de expressão dos genes citados acima em condições de estresse por etanol em comparação com o estresse geral (etanol, temperatura e pH) com o intuito de verificar se esses genes estão relacionados somente com a tolerância ao etanol. Para isso, foram escolhidos dois segregantes obtidos da levedura isolada, um segregante que apresentou características desejáveis ao processo, conforme descrito acima, e um segregante que foi excluído na primeira etapa por apresentar maior sensibilidade soa fatores de estresse testados.

2.2.6. Verificar a expressão do gene *HSP12* dos segregantes selecionados nas condições de estresse por etanol em comparação com a sua expressão nas condições de estresse geral (etanol, pH e temperatura) e confirmar se este gene pode ser utilizado como um marcador molecular de estresse nas leveduras.

O HSP12 é um gene que codifica uma proteína de choque térmico e que é induzida por condições de estresse, e o seu nível de expressão é regulado pelos fatores de transcrição Msn2p/4p e Hsfp. Estudos relacionam a expressão do gene HSP12 como um indicador de leveduras em situação de estresse e por esse motivo ele foi selecionado para este ensaio.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Produção de etanol no Brasil

O etanol é considerado atualmente como o biocombustível mais consumido no mundo e sua maior produção se concentra no Brasil e nos EUA (BASSO *et al.*, 2011), responsáveis por mais de 80% da produção mundial (UNIÃO DA INDÚSTRIA DE CANA-DE-AÇÚCAR – ÚNICA, 2011).

O Brasil é o segundo maior produtor e exportador mundial de etanol, sendo o setor sucro-alcooleiro responsável pela movimentação de cerca de 2% do PIB brasileiro, assegurando milhões de empregos diretos e indiretos (BRASIL, 2011).

Apesar dos EUA serem os maiores produtores mundiais de etanol, o biocombustível é produzido naquele país a partir do amido de milho, gerando um custo maior de produção em comparação ao etanol brasileiro produzido a partir da cana-de-açúcar (TILMAN *et al.*, 2008). Assim pode-se afirmar que o etanol é um dos produtos biotecnológicos mais importantes no cenário brasileiro e até mesmo mundial quando se leva em conta os quesitos valor, quantidade e sustentabilidade.

O Brasil tem uma longa tradição na produção de etanol nas usinas de açúcar. Desde a década de 1920 a produção de bioetanol utilizando melaço final da fábrica de açúcar, conhecido como etanol residual, tornou-se uma prática comum em muitas usinas de açúcar e, em 1931, uma lei federal determinou a adição de 5% de etanol em toda a gasolina importada consumida no país, criando um mercado estável para uma quantidade considerável de etanol combustível (RIBEIRO, 2008).

Quando o Programa Nacional do Alcool (Proálcool) foi lançado em 1975, o Brasil já apresentava uma experiência significativa no cultivo da cana (sendo o segundo maior produtor do mundo) e produção de etanol (cerca de 600 milhões de litros já estavam sendo produzidos), e o sistema de produção conjunta de etanol e açúcar foi a base para a fase inicial do Proálcool (ZANIN *et al.*, 2007).

Após o segundo choque do petróleo, em 1979, o governo decidiu acelerar a produção de etanol e estimulou a instalação de destilarias autônomas que produziu só etanol a partir de caldo de cana; durante a fase de estagnação do Proálcool o aumento de exportações de açúcar, no início de 1990, induziu as destilarias autônomas a adicionarem uma fábrica de

açúcar em cada uma delas, consolidando, assim, o chamado modelo de produção de açúcar / etanol brasileiro (Figura 1) (FINGUERUT, 2007).

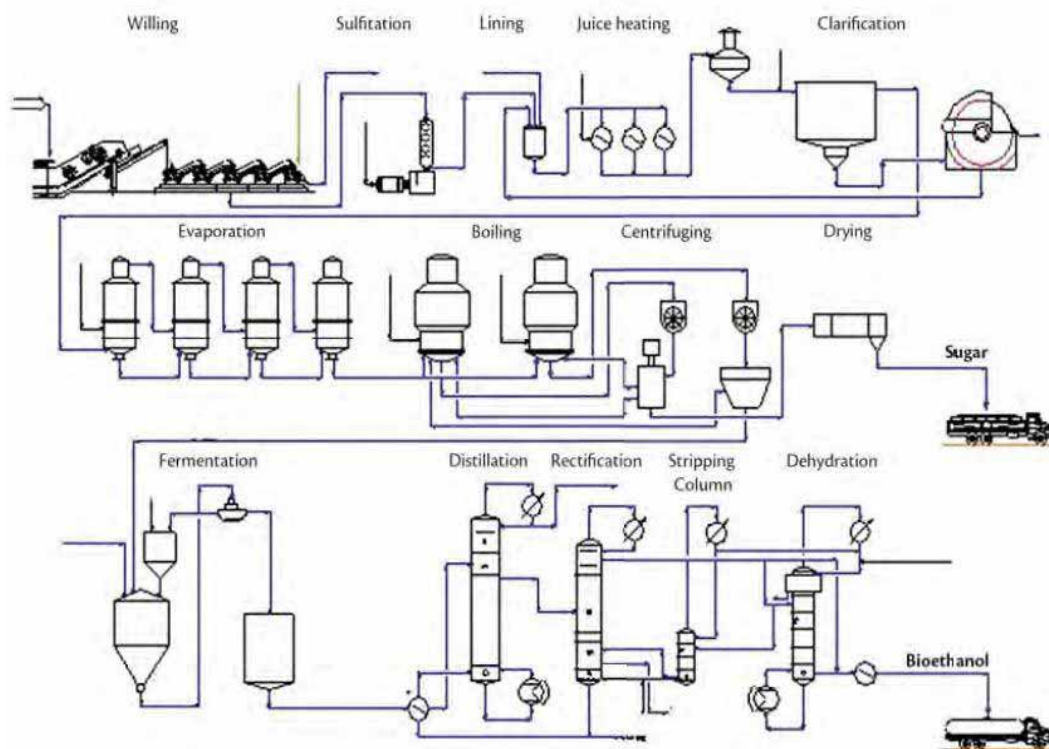


Figura 1. Fluxograma do processo simplificado de produção conjunta de açúcar e etanol (FINGUERUT, 2007).

Dessa forma, a expansão da produção e processamento de cana a partir de 1975 teve três períodos distintos até 2004: criação de destilarias de bioetanol para as usinas existentes, a instalação de destilarias autônomas e junção das fábricas de açúcar com as destilarias autônomas existentes (BRASIL, 2009).

Até 1990, as exportações de açúcar eram muito pequenas, em comparação com a produção total, raramente ultrapassando um milhão de toneladas, e a produção de etanol havia estagnado em cerca de 11 bilhões de litros / ano. De 1990 a 2002, o crescimento da produção de cana foi motivado pelo aumento das exportações de açúcar e o tamanho das usinas aumentaram em detrimento do número de unidades, como consequência da consolidação do setor após a crise no final da década de 1980, devido à estagnação do programa de etanol (BRASIL, 2009).

Finalmente, em 2003, a produção de etanol começou a aumentar novamente, motivado pelos crescentes preços do petróleo e a introdução dos veículos flex fuel (FFV), e até 2005 as novas unidades greenfields começaram a ser construídas a um ritmo rápido, alterando o perfil do crescimento de produção que é utilizado para ser baseado na expansão de unidades existentes. O tamanho médio das fábricas continuaram a aumentar para aproveitar as economias de escala e o desejo de implementar um crescimento muito rápido na produção de etanol (MACEDO, 2008).

O perfil do setor de açúcar e etanol no ano de 2008, avaliado pela Conab - Companhia Brasileira de Abastecimento (Companhia Brasileira de Abastecimento) (CONAB, 2008), refletia a situação do setor logo antes da crise de 2008, e após o período de rápida expansão entre 2004 e 2008, incluindo a instalação de 84 projetos greenfield (FIGLIOLINO, 2010). Mais de 85% da cana foi moída em usinas de açúcar com destilarias anexas, referindo-se a este sistema como o "modelo brasileiro"; a produção apenas de açúcar quase desapareceu, uma vez que representava apenas um pouco mais de 2% do total de cana processada.

Outra característica do modelo brasileiro é a crescente implementação da geração e venda de energia excedente como um produto de terceiros, depois de açúcar e de etanol. Segundo UNICA (2008), o crescimento esperado da percentagem média de energia elétrica é de 1% na temporada 2006/2007 para 16% no período 2015/2016.

Em meados da década de 1990, a auto-suficiência em energia foi atingida em quase todas as usinas, mas a geração de energia excedente estava presente em pouquíssimas usinas. Isso mudou somente depois que o quadro jurídico adequado começou a motivar as fábricas (as greenfields e essas antigas usinas que tinham atingido o fim da vida útil de algumas de suas caldeiras) para instalar unidades de alta pressão para gerar quantidades significativas de excedentes de eletricidade (MACEDO, 2008). Hoje a tendência é ter 67 bar/520 °C para as unidades que operam em cogeração pura e 100 bar/530 °C para as unidades maiores, usando geradores de turbinas de extração / condensação.

3.2. Processo fermentativo para produção de etanol

O etanol pode ser obtido por três vias: destilatória, sintética e fermentativa, sendo que no Brasil, a via fermentativa é a maneira mais importante para produção de álcool, cujo princípio é a transformação de açúcares, derivados de matérias-primas agrícolas como a cana-de-açúcar, em etanol e dióxido de carbono (LIMA, *et al.*, 2001).

O processo de fermentação alcoólica no Brasil é semelhante aos encontrados em outros países e é constituído por três unidades básicas: fermentação, unidade de separação e reciclo de células e unidade de tratamento de levedura (LEAL & MACEDO, 2004).

A unidade de fermentação propriamente dita é constituída de fermentadores onde os açúcares são convertidos em etanol. Estes fermentadores geralmente são construídos em aço carbono, com forro pintado corretamente para evitar a corrosão e tornar as paredes menos enrugadas, facilitando assim sua limpeza. São equipados com trocadores externos de calor e um sistema de agitação que utiliza a energia cinética do meio de fermentação, o qual é reciclado pelos permutadores de calor. Além disso, os fermentadores são fechados e com um sistema de limpeza, garantindo que a transformação ocorra de forma plenamente anaeróbia e os gases produzidos enviados para uma coluna de lavagem para a recuperação do etanol neles encontrados (SEABRA, 2008).

A unidade de separação de células é constituída por centrífugas separadoras. O meio de fermentação contendo entre 10 e 13% (v/v) de células de levedura, é enviado às centrífugas, que geram duas linhas de produtos, o vinho centrifugado e o creme de leveduras, cujas concentrações de células variam entre 0,2 e 1% e 60 e 75%, respectivamente. O vinho centrifugado é enviado para um tanque de destilação e o creme para os tanques de tratamento (OLIVÉRIO, 2008).

A unidade de tratamento consiste em tanques bem agitados, equipados com um sistema de arejamento e construído do mesmo modo que o tanques de fermentação, ou seja, em aço carbono com forro pintado corretamente para evitar corrosão e tornar as paredes menos enrugadas para facilitar a limpeza. A água tratada é adicionada ao creme de levedura neste tanque com uma diluição para a concentração de células entre 30 e 40% (v/v), seguida da adição de ácido sulfúrico concentrado para ajustar o pH entre 2 a 2,5. As células de levedura permanecem neste tratamento durante 1 a 2 horas. Após esta etapa, as células de levedura tratadas voltam aos fermentadores para novo ciclo (SEABRA, 2008).

Embora os processos de fermentação apresentem as mesmas etapas de processamento, o que pode ser diferente são os métodos de operação. O reator biológico

pode ser operado de forma contínua, descontínua, semicontínua ou descontínua alimentada (batelada alimentada), e todas podem trabalhar com ou sem recirculação do fermento. Segundo AMORIM (2005), a maior parte da produção industrial de álcool em grande escala ocorre em processos fermentativos em batelada e contínuo, onde 85% das unidades produtoras funcionam em sistema de batelada alimentada e 15% em sistema contínuo.

No processo de batelada-alimentada (fed-batch) ou Melle-Boinot inicialmente se transfere o inóculo (fermento tratado) do tanque de tratamento para os fermentadores através de um sistema de bombeamento. Em seguida se inicia a alimentação do reator com o substrato até que o volume final do fermentador seja alcançado. Após a transferência do açúcar, se inicia o processo de fermentação, onde o açúcar é convertido em álcool e outros produtos (DATAR, *et al.*, 2004). O meio fermentado é enviado para os centrifugadores onde ocorre a separação das células de levedura do vinho, as células são enviadas novamente para os tanques de tratamento, onde são diluídas e acidificadas a fim de iniciar um novo ciclo.

Esse processo foi concebido para ser usado nos casos em que os microrganismos utilizados na fermentação são submetido à inibição aguda pelo substrato. Neste caso, para se obter concentrações mais elevadas do produto final, o substrato pode ser adicionado de forma controlada ao fermentador, diminuindo assim esta inibição. Em geral, em plantas que utilizam este tipo de processo, as curvas de alimentação do substrato são exponenciais e visam manter o substrato constante no meio de fermentação e com uma concentração menor do que a de inibição (CARVALHO & SATO, 2001).

Já o processo de fermentação contínua normalmente contém 4 ou 5 fermentadores ligados em série, onde um meio de cultura e as células de levedura tratadas são adicionadas simultaneamente e de uma maneira contínua e controlada, no primeiro fermentador do sistema. O objetivo da utilização desta configuração é aproximar o comportamento do sistema para um fermentador de fluxo de pistão, minimizando o efeito de inibição pelo produto (etanol) na velocidade de transformação dos açúcares em etanol (LEAL & MACEDO, 2004).

A quantidade de ART (açúcares redutores totais) alimentado no primeiro fermentador é proporcional à quantidade de células de levedura, mantendo uma taxa média de 3,5 g de ART / g da massa de células (peso seco). Este controle é importante para manter a taxa de conversão de cada fermentador, proporcionando um tempo total de fermentação entre 7 a 8

horas, dependendo da estirpe utilizada e da matéria-prima empregada (LALUCE *et al.*, 1991).

O meio de fermentação passa de um fermentador para o outro até atingir o último, onde geralmente se tem os separadores de centrífuga e se separa o fermento do vinho e são novamente enviados para os tanques de tratamento. A unidade de tratamento deste tipo de processo é constituída por três tanques ligados em série. Ácido sulfúrico, água e creme de levedura são misturados num pequeno tanque, a partir de onde a efervescência acidificada segue para o tanque de tratamento (AMORIM, 2005).

Independente do tipo de processo, a fermentação se inicia com a adição do mosto com 18 a 22% de ART sobre a suspensão de levedura. De forma geral, após 6 a 10 horas de fermentação, os teores alcoólicos chegam de 8 a 10% (v/v) com as temperaturas de 32 a 38°C. No final da fermentação, as leveduras são separadas do vinho por centrifugação, diluídas a uma concentração de 30-40% (m/v) e submetidas a um tratamento com ácido sulfúrico, com o objetivo de reduzir a contaminação bacteriana, e em seguida utilizadas em um novo ciclo fermentativo (LALUCE *et al.*, 1991).

3.2.1. Fatores estressantes para a levedura durante o processo de fermentação alcoólica

As leveduras podem, frequentemente, serem submetidas a 2 ciclos fermentativos diários durante o período de safra anual. Por esse motivo, as leveduras utilizadas na fermentação industrial deverão ser tolerantes aos vários fatores estressantes impostos pelo processo de forma simultânea (alta concentração etanol, altas temperaturas, baixo pH, ácido, pressão osmótica, entre outros) (BASSO *et al.*, 2008).

No ambiente da fermentação alcoólica, condições estressantes são impostas às leveduras a todo momento. Alguns são ambientais como deficiência nutricional, altas temperaturas, estresse osmótico por açúcares e sais, acidez, sulfito, contaminação bacteriana, enquanto outros são decorrentes do próprio metabolismo celular da levedura, tais como o acúmulo de etanol e sua correspondente inibição do crescimento celular e da produção do etanol (BAI *et al.*, 2008; BASSO *et al.*, 2008).

Todos esses fatores são estressantes para a levedura e alguns podem agir sinergisticamente, afetando mais severamente a levedura do que um fator isolado,

resultando em redução da viabilidade e vitalidade celular e como consequência, na produtividade de etanol (DORTA *et al.*, 2006).

O nível crescente de etanol durante o processo de fermentação reduz as taxas de crescimento e viabilidade celular das leveduras (PIPER, 1995). Seus efeitos tóxicos nas células envolvem a alteração da polaridade da membrana citoplasmática, modificando sua fluidez. Em vista disso, pode ocorrer inibição da taxa de captação máxima do sistema de transporte de glicose por mudanças no ambiente lipídico da membrana plasmática e efluxo de compostos como aminoácidos através das células (ALEXANDRE E CHARPENTIER, 1998), o que é agravado pelo aumento da temperatura e dos teores de etanol (SALGUEIRO *et al.*, 1988).

Segundo OLIVEIRA (1988), em temperaturas elevadas, o metabolismo da levedura *S. cerevisiae* é afetado levando a uma diminuição da tolerância ao etanol e formação de metabólitos secundários como o glicerol. O efeito inibitório do etanol está relacionado à temperatura de fermentação. A faixa de melhor resistência ao etanol para cepas usuais de *S. cerevisiae* é de 13 a 27°C a 10% (v/v) de etanol no mosto. A tolerância ao etanol diminui para temperaturas menores que 13°C ou maiores que 27°C, de forma que a inibição do crescimento do microrganismo ocorre tanto em processos com baixa temperatura como alta.

Os fosfolipídios da membrana desempenham um papel importante no mecanismo de tolerância ao etanol. Alguns trabalhos evidenciaram sua importância, mostrando que a membrana apresenta grande versatilidade para se adaptar a esse estresse pois foram observados aumento da concentração de ácidos graxos insaturados e ergosterol em células de *S. cerevisiae* expostas ao etanol, indicando que a levedura sobrevive melhor com esses ajustes (WALKER-CAPRIOGLIO *et al.*, 1990; YOU *et al.*, 2003; VANEGAS *et al.*, 2012).

Em estudo realizado por CARTWRIGHT *et al.*, (1987), o etanol em concentrações de até 2,0 M (11,65% v/v) inibiu a atividade da ATPase na membrana de *S. cerevisiae* em culturas com 8 e 16 horas, e a composição da porção lipídica dos fosfolipídios também sofreu alteração, com a proporção de insaturação diminuindo com a idade da cultura.

Contudo, os mecanismos pelos quais o etanol causa inibição celular ainda permanecem obscuros em muitos aspectos, em especial em nível genético (BAI *et al.*, 2008). A base molecular do mecanismo pelo qual o etanol exerce efeito inibitório na fermentação torna-se complicada, pois o etanol, sendo um agente desnaturante, pode agir

não somente sobre as proteínas e provocar inativação ou inibição de enzimas da rota glicolítica, como também pode atuar sobre a integridade das membranas lipídicas, prejudicando outros fatores, como proteínas transportadoras e enzimas associadas à membrana (PASCUAL *et al.*, 1988).

3.2.2. Leveduras utilizadas no processo

O processo fermentativo é bastante afetado pelo tipo de microrganismo que o desenvolve. As leveduras, principalmente do gênero *Saccharomyces cerevisiae*, são as mais amplamente utilizadas neste tipo de processo e também para produção de biomassa.

A maioria das unidades produtoras de etanol, tradicionalmente iniciava a safra usando toneladas de leveduras oriundas da indústria de panificação até meados dos anos 90. A partir desta data, constatou-se que as leveduras utilizadas como inóculo eram completamente substituídas por leveduras nativas ou selvagens (ANDRIETTA *et al.*, 2007), pois ao se isolar uma levedura do processo no final da safra, pôde verificar-se que esta era diferente daquela introduzida no início.

As leveduras de panificação, pelo fato de serem facilmente obtidas no mercado e nas grandes quantidades requeridas, são largamente empregadas pela indústria alcooleira. No entanto, essas leveduras não suportam os estresses da fermentação industrial, sendo substituídas por linhagens selvagens que se mostram com as mais variadas habilidades fermentativas (BASSO *et al.*, 2008).

A partir desta constatação, as usinas começaram a analisar as leveduras de final de safra através de uma análise de cariotipagem para constatar a permanência de linhagens dominantes no processo e isolá-las para propagar sua própria levedura de início de safra. No entanto, a dificuldade de obtenção de grandes volumes desse fermento desestimulou as usinas a fazerem uso desse fermento.

Portanto, atualmente é uma prática muito frequente das usinas iniciar o processo fermentativo com uma determinada levedura previamente isolada nas usinas brasileiras devido as suas características de dominância e persistência no processo industrial e alto desempenho fermentativo, mas distribuídas por uma unidade produtora de biomassa (AMORIN *et al.*, 1996).

Por isso, leveduras isoladas do próprio processo fermentativo são hoje utilizadas na maioria das usinas brasileiras. A linhagem mais conhecida e utilizada em aproximadamente 30% das usinas é a Pedra 2 (PE-2), que leva esse nome pois foi isolada da Usina da Pedra. Estudos demonstraram que ela permanece na dorna de fermentação durante todo o período da safra. Além disso, a linhagem PE-2 apresenta características fundamentais para aperfeiçoar o processo fermentativo, como ser altamente fermentadora e resistente a temperatura e álcool, além de permanecer em suspensão, não apresentando características floculantes e não produzindo espuma (BASSO *et al.*, 2008).

Durante a fermentação industrial as leveduras passam por diversas formas de estresse (BROSNAN *et al.*, 2000), e na fase de maior atividade metabólica da fermentação há uma significativa elevação da temperatura, sendo necessário o resfriamento do mosto para viabilizar a continuação do processo fermentativo, uma vez que o fermento é reaproveitado em fermentações sucessivas (SILVA-FILHO *et al.*, 2006). Por esse motivo, a estabilidade populacional no ambiente fermentativo depende do uso de linhagens bem adaptadas às condições do processo industrial

A resistência a múltiplos estresses é uma característica desejada em leveduras industriais envolvidas em quaisquer processos biotecnológicos, pois as células são expostas às combinações simultâneas ou sequenciais de diferentes tipos de estresse (ATTFIELD, 1997; RANDEZ-GIL, *et al.*, 1999).

As características requeridas para o processo industrial são: tolerância ao estresse fermentativo como, por exemplo, baixos valores de pH e alta concentração de açúcar e etanol, alta competitividade perante contaminação (bacteriana ou por outras leveduras) na dorna de fermentação, não flocular ou produzir espuma e possuir alta resistência a inibidores presentes na biomassa hidrolisada e capacidade de crescer anaerobicamente (BRANDUARDI *et al.*, 2008; NEVOIGT, 2008).

3.3. Resposta ao estresse fermentativo

A resposta aos diferentes tipos de estresse é uma característica fundamental na adaptação dos organismos vivos às condições adversas do meio ambiente em que vivem (ALEXANDRE *et al.*, 2001).

Quando um microrganismo é exposto à alterações decorrentes do ambiente, que afetam o seu crescimento e reprodução e não são demasiadamente severas, ele produz um mecanismo para se adaptar a essas alterações e continuar sobrevivendo nessas condições, ou seja, se um organismo for exposto bruscamente a um choque de calor de 20 a 25°C acima da sua temperatura ótima de crescimento, ele vai morrer. No entanto, se antes dessa exposição, ele for exposto pela primeira vez durante um curto período de tempo a uma temperatura de 10 a 15°C acima da temperatura ótima de crescimento, ele adquire a capacidade para sobreviver à temperatura letal (LARCHER, 1995).

Alguns estudos mostram que a levedura *Saccharomyces cerevisiae* possui mecanismos “comuns” ou “gerais” de resposta ao estresse, onde são ativados pelo menos três elementos de transcrição. No estresse por choque térmico, o fator de transcrição induz a uma ou mais repetições nos genes HSP e é conhecido como Hsfp. Em situações de estresse oxidativo, a transcrição do fator Yap1p induz a transcrição dos genes TRX1/2 e GSH1 e, finalmente, a sequência STRE (elemento responsivo ao estresse geral) é capaz de mediar a transcrição induzida pelas diversas formas de estresse, através dos fatores de transcrição Msn2p e Msn4p. Segundo GASCH et al., (2000) a STRE corresponde ao conjunto de todos os genes que têm perfil de expressão similar sob várias condições de estresse.

Outras observações relacionam mudança nos padrões de expressão do gene CTT1 (que codifica a catalase T citosólica, uma enzima desintoxicante de peróxido de hidrogênio), que também é induzido não só pelo estresse osmótico, mas também por calor ou choque osmótico (ALEXANDRE et al., 2001).

Este sistema de resposta coordena e integra a necessidade de estabelecer um metabolismo basal, que é necessário para reduzir o custo de energia. Isto leva a uma diminuição na taxa de crescimento e à indução de vários mecanismos de proteção. A integração dessas respostas determina a capacidade de adaptação do organismo (GASCH et al., 2000).

Esse mecanismo de indução à tolerância têm sido observado em linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* utilizadas para produção de etanol combustível. As células de *S. cerevisiae*, quando submetidas à condições de estresse, desenvolvem uma rápida resposta molecular para reparar danos e proteger as estruturas celulares dos efeitos causados pelo

estresse da dorna de fermentação (RUIS & SCHULLER, 1995; SWAN & WATSON, 1998; ESTRUCH, 2000).

3.3.1. Temperatura

Elevadas temperaturas são comuns em processo de fermentação industrial, constituindo fator de seleção de linhagens de leveduras termotolerantes. A resposta ao choque térmico pode variar entre linhagens de *S. cerevisiae*, porém as leveduras industriais são geralmente mais termotolerantes do que as de laboratório (ESTRUCH, 2000).

Na levedura, a resposta ao estresse térmico é um dos processos mais estudados e bem caracterizados atualmente. Sabe-se que um aumento de 10 a 15°C acima da temperatura ótima de crescimento induz ao fator de transcrição de choque térmico (Hsfp), que por sua vez, induz a síntese de um grupo de proteínas chamado HSP (heat shock proteins), onde a maioria das proteínas funcionam como chaperonas moleculares nos processos de desnaturação e recuperação de proteínas danificadas. São altamente conservadas e desempenham funções importantes em condições normais de crescimento (KIANG & TSOKOS, 1998).

Algumas dessas proteínas estão presentes também em temperaturas ótimas de crescimento e estudos genéticos indicam que são proteínas essenciais para manutenção da estrutura correta da folha pregueada de outras proteínas e degradam proteínas desnaturadas ou com defeitos na estrutura secundária (LINDQUIST, 1992).

Entre as proteínas que fazem parte da família HSP estão a HSP104, a HSP70 e a HSP40, as quais formam o complexo chaperonina que de acordo com GLOVER & LINDQUIST (1998), reverte a conformação de proteínas alteradas pelo calor restaurando as atividades essenciais de proteínas na célula viva. Por esse motivo, o acúmulo dessas HSP's está associado com a termotolerância e um aumento da habilidade de sobreviver a pequenas exposições à temperatura letal.

Outro gene relacionado ao estresse por choque térmico é o HSP12, que codifica uma das duas principais proteínas de choque térmico em *S. cerevisiae*. A expressão do gene HSP12 é induzida várias vezes por choque de calor e na entrada na fase estacionária. Segundo SALES (2000), o RNAm de HSP12 é indetectável durante o crescimento

exponencial em meio rico, mas níveis baixos estão presentes quando as células são cultivadas em meio mínimo.

PRAEKELT & MEACOCK (1990), analisaram a expressão de HSP12 em mutantes fosforilados dependentes de cAMP (gene regulado por cAMP). A interrupção da codificação das HSP12 resulta na perda de uma abundante 14,4 kDa presente nas células de calor chocado e fase estacionária. Isto também leva a indução da resposta de choque de calor, sob condições normalmente associadas com a expressão de baixo nível de HSP12. A interrupção HSP12 não demonstrou nenhum efeito observável sobre o crescimento à diferentes temperaturas nem em sua capacidade de adquirir termotolerância.

Além da resposta ao choque térmico, importante ressaltar que o HSP12 é transcrito também em outras condições de estresse, incluindo alta osmolaridade, presença de etanol e falta de nutrientes no meio de crescimento e, por essa razão, vem sendo utilizado como marcador molecular de estresse em leveduras utilizadas para produção de vinho (HERBERT *et al.*, 2012).

IVORRA & PÉREZ-ORTÍN (1999) analisaram a expressão de vários genes marcadores sob condições específicas de estresse em leveduras industriais produtoras de vinho e encontraram uma expressão diferencial de HSP12 em comparação aos outros marcadores utilizados.

3.3.2. Ácido (pH)

A utilização de linhagens de *S. cerevisiae* resistente ao estresse ácido é uma característica importante para a indústria de álcool combustível. Nas fermentações industriais, os valores de pH do mosto geralmente encontram-se na faixa de 4,5 a 5,5 com uma boa capacidade tamponante. No entanto, as leveduras mantêm sua homeostase de forma quase independente do pH do meio, por isso toleram o tratamento ácido (BASSO *et al.*, 1996).

NARENDRANATH e POWER (2005) relataram que a redução do pH de 5,5 para 4,0 reduziu o crescimento de lactobacilos e sua correspondente produção de ácido lático, assim como o aumento da concentração de açúcares no meio, aumentando a pressão osmótica. No entanto, isso causou uma redução do etanol produzido pela levedura em pH 4,0, embora

não tenha afetado o crescimento da mesma em nenhuma concentração de açúcar em particular.

HERNÁNDEZ-CORTÉZ *et al.*, (2010), avaliaram a produção de biomassa de linhagens de *S. cerevisiae* em fermentação contínua de suco de agave para a produção de tequila e concluíram que não houve diferença significativa na produção de biomassa e de etanol em meio com pH controlado (pH 4,0) e sem controle (ajuste natural pH 2,5).

A maioria das leveduras é capaz de crescer em meio com pH entre 4,5 e 6,5 (WALKER, 1998), porém com ácidos orgânicos fracos como o ácido sórbico, o benzóico e o acético no meio. Estes inibem a resposta ao estresse e aumentam a frequência de mutações que causam deficiência no metabolismo respiratório de *Saccharomyces cerevisiae* (CHENG *et al.*, 1999). Segundo PIPER *et al.*, (2001) a diminuição da termotolerância das células de *S. cerevisiae* tratadas com ácidos orgânicos ocorre devido a inibição da síntese das HSPs.

No âmbito da fermentação alcoólica, o ácido acético e o ácido lático despertam um particular interesse, uma vez que ambos são inibidores do crescimento da levedura. O ácido lático é produzido por bactérias lácticas contaminantes do processo e o ácido acético é sintetizado em pequenas quantidades pela levedura, porém concentrações tóxicas advêm de bactérias lácticas e/ou acéticas (GRAVES *et al.*, 2006).

O efeito do ácido acético sobre a fermentação e sobre o pH intracelular é potencializado pelo etanol (PAMPULHA & LOUREIRO-DIAS, 1989), e o efeito inibitório tanto do ácido acético quanto do ácido lático torna-se maior quanto menor for o pH do meio, devido a maior concentração da forma não dissociada dos mesmos (GRAVES *et al.*, 2006).

Além dos efeitos no crescimento da levedura, o pH é importante no controle da contaminação bacteriana, a qual é um agente estressante que acarreta perdas significativas no rendimento fermentativo. Por isso a necessidade de se optar entre dois fatores estressantes, como no caso do tratamento ácido, que estressa a levedura, mas acaba sendo benéfico pois controla a contaminação.

Embora a lavagem ácida utilizada na indústria alcooleira seja um fator de estresse, ainda não está claro como os ácidos inorgânicos afetam a viabilidade das células de levedura (BROSNAN *et al.*, 2000).

3.3.3. Etanol

Durante a fermentação alcoólica industrial, o aumento da concentração de etanol reduz a velocidade específica de crescimento, a velocidade específica de produção de etanol e a viabilidade de células de leveduras (ZUZUARREGUI & OLMO, 2004). Altas concentrações de etanol, acima de 10% (v/v), constituem fator limitante nas fermentações industriais por *S. cerevisiae*, diminuindo a produção de CO₂ mesmo em meio rico em glicose (CARLSEN, 1991).

Por esse motivo, a tolerância à altas concentrações de etanol é atualmente uma das características mais requeridas para uma linhagem industrial produtora de álcool combustível. Essa característica está presente em algumas linhagens de *S. cerevisiae* e permite que este microrganismo seja dominante em processos de fermentações naturais e industriais.

ALEXANDRE *et al.* (2001), investigaram o perfil de expressão gênica de uma linhagem laboratorial de *S. cerevisiae* em resposta ao etanol, utilizando microchips de DNA (DNA microarrays). Do total de genes codificados no genoma da levedura, 3,1% dos genes foram superexpressos e 3,2% foram regulados negativamente após 30 minutos de estresse por etanol (7% v/v). Dos genes superexpressos em resposta ao etanol, 49% pertencem à resposta ao estresse ambiental e 14% pertencem à família dos genes de estresse. Os genes induzidos por etanol previamente identificados, em sua maioria, foram genes envolvidos também na homeostase iônica, proteção contra o calor, síntese de trealose e de defesa antioxidante.

Em estudo realizado por SWINNEN *et al.*, (2012), onde foi analisado o sequenciamento do genoma de segregantes provenientes de um cruzamento entre uma linhagem de levedura industrial (altamente tolerante ao etanol) e uma linhagem laboratorial (de menor tolerância), com o objetivo de mapear todos os *loci* de características quantitativas (QTL) que determinam a alta tolerância ao etanol, foram identificados, pela primeira vez, três genes que estão diretamente ligados a esta característica, como o MKT1, o SWS2 e o APJ1, sendo o SWS2 um alelo negativo localizado entre dois alelos positivos. SWS2 e APJ1 apresentaram polimorfismos significativos apenas fora da ORF e uma menor expressão de APJ1 foi relacionada à tolerância superior de etanol.

TEIXEIRA *et al.*, (2009), selecionaram mutantes com susceptibilidade diferencial ao estresse induzido por altas concentrações de etanol em meio de crescimento mínimo. Foram identificados mais de 250 fatores genéticos determinantes da resistência ao etanol, onde a maioria são aqueles associados à organização intracelular, biogênese e transportes, em especial, em relação ao vacúolo, o peroxissomo, o endossomo, e ao citoesqueleto, e os que estão associados com a maquinaria transcricional.

Com base nos resultados de análise de todo o genoma, foi destacado e investigado, em particular, o papel do gene FPS1, que codifica uma aquaglyceroporin da membrana plasmática que media o efluxo controlado de glicerol na resistência ao estresse por etanol. A expressão de FPS1 contribui para a diminuição do acúmulo de etanol em células de levedura, o que sugere que Fps1p também podem desempenhar um papel na manutenção do nível intracelular de etanol durante a fermentação ativa. O aumento da expressão de FPS1 confirmou o papel importante deste gene na fermentação alcoólica, levando a um aumento da concentração final de etanol, sob condições que conduzem à produção elevada de etanol (TEIXEIRA *et al.*, 2009).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. MATERIAIS

3.1.1. Microrganismos utilizados

Foram utilizadas quatro linhagens de levedura *Saccharomyces cerevisiae* para o desenvolvimento deste trabalho:

- MA-1 (*MATa/α LEU2-3 ADE2 ADE3 URA3 TRP1 HIS3 LYS*): isolada a partir da dorna de fermentação de uma destilaria brasileira do estado de São Paulo e cedida gentilmente para estudo para o Laboratório de Micologia da Profa. Dra. Ana Marisa Fusco Almeida, do Departamento de Análises Clínicas FCFAR/UNESP.

- PE-2, CAT-1 e SA-1: linhagens isoladas de usinas de produção de etanol pela empresa Fermentec e amplamente utilizadas por usinas do setor sucro-energético (BASSO et al., 2008), também obtidas da coleção do mesmo Laboratório.

Ressalta-se que a linhagem MA-1 foi escolhida para estudo por apresentar capacidade de permanência no processo e resistência aos estresses causados pelas condições existentes em unidades industriais de produção de etanol. As linhagens PE-2, CAT-1 e SA-1 foram utilizadas como controle.

3.1.2. Meios de cultura e tampões

A composição e o preparo dos meios de cultura e soluções utilizados no experimento seguiram procedimentos padrões (GUTHRIE & FINK, 1991; SAMBROOK *et al.*, 1989;).

Para manutenção e cultivo das linhagens de leveduras foram utilizados os meios de cultivo YEPD (Yeast Extrat – Peptone – Dextrose) líquido (extrato de levedura – 1%, peptona – 1% e dextrose – 2%) e sólido (extrato de levedura – 1%, peptona – 1%, dextrose – 2%, e água destilada, ágar – 1,5%).

Para a esporulação, foi utilizado o meio S-SPO líquido (extrato de levedura 2,5 g/L; acetato de potássio 15 g/L; adenina, uracil e tirosina 0,04 g/L; histidina, leucina, lisina, triptofano, metionina e arginina 0,02 g/L; fenilalanina 0,1 g/L e treonina 0,35 g/L).

Para o teste de tolerância ao etanol foi utilizado o meio YEPD conforme citado acima, porém com diferentes concentrações de etanol.

Para o teste de tolerância ao baixo pH foi utilizado o meio YEPD conforme citado acima, porém o pH foi ajustado com diferentes concentrações de HCl.

Para o teste de tolerância ao etanol e baixo pH simultaneamente foi utilizado o meio YEPD conforme citado acima, com diferentes concentrações de etanol e o pH ajustado com HCl.

Para o ensaio do desempenho fermentativo foi utilizado o mosto preparado através de caldo de cana diluído. O caldo de cana foi previamente fervido e filtrado para retirada de sólidos insolúveis e em seguida diluído com água destilada até uma concentração final de 19% de ART. Depois foram autoclavados a 121°C durante 15 minutos, resfriados à temperatura ambiente e congelados a -18°C até o momento do uso.

Para a extração do DNA genômico foram utilizados os tampões de extração Tris – EDTA pH 8,0 (Tris 10 mM pH 8,0 e EDTA 1 mM pH 8,0) e o tampão TBE 1x (90 mM Tris-Cl, 90 mM ácido bórico, 2 mM EDTA).

No ensaio de dosagem de etanol foi utilizado o tampão pirofosfato (pirofosfato de sódio 0,13 M, semicarbazida 0,079 M e glicina 0,024 M, pH 8,8).

Na extração do RNA utilizou-se o tampão de lise (1 M sorbitol, 0,1 M EDTA pH 7,4, 0,1% de β -mercapto etanol, 10% zimolise) e os tampões RLT e RW1 provenientes do Kit utilizado para extração.

3.2. MÉTODOS

A manutenção e o cultivo das linhagens de levedura, a composição e o preparo dos meios de cultura e soluções e as técnicas básicas utilizadas neste trabalho seguiram procedimentos padrões (GUTHRIE e FINK, 1991; AUSUBEL *et al.* 2005; AMBERG *et al.* 2005).

3.2.1. Identificação das leveduras coletadas como *Saccharomyces cerevisiae*

A levedura estudada (MA-1) e a PE-2, CAT-1 e SA-1, foram identificadas como *Saccharomyces cerevisiae* pelo método de PCR utilizando *primers* específicos, segundo a metodologia descrita por MELO PEREIRA et al., (2010).

3.2.1.1. Extração de DNA genômico

Uma colônia de cada linhagem de levedura foi inoculada em 10 mL de meio adequado e incubada a 30°C sob agitação durante toda noite. As culturas foram centrifugadas a 5.000 *xg*, à temperatura de 4°C durante 5 minutos e lavadas com água estéril gelada. Esse processo foi realizado por 2 vezes consecutivas. As células foram ressuspensas em 200 µL de tampão de extração, transferidas para microtubos estéreis, adicionados 1 g de pérolas de vidro e 200 µL de solução fenol-clorofórmio (1:1).

Os tubos foram agitados vigorosamente em vórtex durante 2 minutos e foram acrescentados 200 µL de tampão Tris – EDTA pH 8,0 seguido de cuidadosa homogeneização por inversão de 6 a 10 vezes e centrifugação a 13.000 *xg* durante 5 minutos. A fase aquosa foi separada, recolhida em novo microtubo estéril, acrescentando 400 µL de clorofórmio, homogeneizado por inversão e repetido o processo de centrifugação anterior. Em um novo microtubo, foi recolhida a fase aquosa, acrescentando 1 mL de etanol absoluto por inversão e centrifugado a 13.000 *xg* durante 2 minutos. O sobrenadante foi removido e o sedimento formado lavado com 1 mL de etanol 70% (v/v) e centrifugado a 13.000 *xg* durante 2 minutos. O sobrenadante foi separado e o tubo com sedimento colocado em estufa a 37°C até secagem completa do material. Após secagem, o DNA foi ressuspenso em 400 µL de solução tampão Tris - EDTA pH 8,0 contendo uma concentração final de 2 µg/mL de RnaseA e incubado a 37°C durante 30 minutos. Esse processo foi repetido desde a etapa da adição do clorofórmio até a secagem completa do DNA. O DNA foi ressuspenso em 50 µL de solução tampão Tris – EDTA pH 8,0 e mantido a 4°C.

Para a verificação da extração, foi feito um gel de agarose analítico em uma concentração de 1,5%, com diluição em tampão TBE 1x, corados com gel red.

3.2.1.2. Condições da PCR

A PCR foi realizada da seguinte forma: 12,5 µL de Mix GoTaq® Green Master (10 x) (Promega), 2 µL de DNA diluído para 10 ng/µL-1 e 0,5 ng/µL-1 de cada primer, para um volume final de 25 µL. As seqüências e a localização dos primers na região alvo estão descritas na Tabela 1 e o programa de amplificação na Tabela 2.

Tabela 1. Primers utilizados nas reações de PCR para amplificação do gene HO.

Primer	Gene	Seqüência (5' → 3')	Orientação
ScHO	Gene HO/ cromossomo IV	GTTAGATCCCAGGCGTAGAACAG	Forward
	Gene HO/ cromossomo IV	GCGAGTACTGGACCAAATCTTATG	Reverse

Tabela 2. Programa utilizado no termociclador para amplificação do gene HO.

Fase	Temperatura	Tempo	Etapa
1	94°C	2 minutos	Desnaturação inicial
2*	94°C	30 segundos	Desnaturação
3*	61°C	30 segundos	Anelamento
4*	72°C	7 minutos	Extensão final
5	4°C	Indefinido	Manter as amostras

*Fases repetidas por 35 ciclos

3.2.2. Armazenamento das linhagens de levedura

As linhagens selecionadas foram armazenadas em placas com YEPD sólido e nitrogênio líquido para posterior utilização.

As placas foram preparadas com meio YEPD sólido esterilizado previamente, onde em seguida, as leveduras foram inoculadas e incubadas a 30°C por 48 horas, e posteriormente armazenadas em geladeira.

Para congelamento em nitrogênio líquido, preparou-se uma solução de 20% de glicerol (v/v) e em cada microtubo acrescentou-se a solução de glicerol e material celular centrifugado. Em seguida, o microtubo foi colocado em nitrogênio líquido e armazenado em freezer a - 80°C.

Antes da realização de qualquer teste, as leveduras foram reativadas em placas com YEPD sólido e incubadas a 30°C por 48 horas.

3.2.3. Esporulação da levedura, dissecação e caracterização de tétrades

3.2.3.1. Esporulação da levedura coletada

A levedura MA-1 foi cultivada em meio S-SPO líquido (extrato de levedura 2,5 g/L; acetato de potássio 15 g/L; adenina, uracil e tirosina 0,04 g/L; histidina, leucina, lisina, triptofano, metionina e arginina 0,02 g/L; fenilalanina 0,1 g/L e treonina 0,35 g/L) a 25°C, sob agitação até a formação de ascos.

3.2.3.2. Dissecação e caracterização de tétrades

Foram centrifugados momentaneamente 200 µL da cultura submetida à esporulação. Após a remoção do sobrenadante, as células foram suspensas em 100 µL de sorbitol 20%. Então, foram adicionados 3 µL de zimoliase (10 mg/mL) e a reação incubada à temperatura ambiente por 15 minutos. Foi adicionado 1 mL de sorbitol 20% e as células foram mantidas em gelo até a dissecação. Os ascos foram dissecados em microscópio de dissecação, utilizando placa de meio YEPD, a qual foi incubada a 25°C até a obtenção de colônias. O genótipo das células haplóides obtidas foi caracterizado utilizando-se diferentes meios de cultura seletivos.

Em seguida, essas células foram selecionadas segundo o fenótipo de sensibilidade a temperatura e diferentes concentrações de etanol.

3.2.4. Seleção dos segregantes obtidos a partir do fenótipo de resistência ao estresse fermentativo, como altas temperaturas, altas concentrações de etanol, baixo pH e floculação.

3.2.4.1. Análise do fenótipo de sensibilidade a temperatura e diferentes concentrações de etanol

As células de levedura foram selecionadas quanto ao fenótipo de sensibilidade à temperatura e etanol. Para isto, as leveduras foram crescidas a 25°C em 10 mL de meio seletivo até aproximadamente $1-2 \times 10^7$ células/mL. Após centrifugação a 3.000 $\times g$ por 1 minuto e remoção do meio de cultura, as células foram suspensas na concentração de $2,5 \times 10^8$ células/mL. Em seguida 200 μ L da suspensão foram transferidos para um poço de microplaca.

A suspensão foi diluída seriadamente (1:10) em meio líquido apropriado. Utilizando um pipetador multicanal, 4 μ L da suspensão original e das diluições foram aplicados nos meios de cultura de interesse normais ou contendo diferentes concentrações de etanol para posterior incubação a 25°C ou nas temperaturas desejadas, até a observação de crescimento em todas as diluições para a seleção das mais resistentes.

3.2.4.2. Teste de tolerância a alta temperatura

Para avaliar a tolerância a altas temperaturas, as leveduras selecionadas no item 3.2.4.1 foram inoculadas com uma densidade celular inicial de 2×10^6 célula/mL e incubadas a 25°C por 24 horas. Em seguida, as amostras foram retiradas, diluídas, plaqueadas em meio YEPD sólido e incubadas em diferentes temperaturas (25°C controle, 40°C, 41°C e 42°C durante três dias).

A viabilidade celular foi expressa pela porcentagem de unidades formadoras de colônias de cada tratamento em comparação ao controle.

3.2.4.3. Teste de tolerância ao etanol

Para avaliar a tolerância ao etanol, as leveduras selecionadas no item 3.2.4.2 foram cultivadas em meio YEPD líquido elaborado com diferentes concentrações de etanol absoluto (0% controle, 5%, 7%, 8%, 10% e 12% v/v). As leveduras foram inoculadas com uma densidade celular inicial de 2×10^6 célula/mL e então incubadas a 25°C por 48 horas, sob agitação de 80 rpm.

A viabilidade celular foi determinada às 0, 8, 24 e 48 horas do período de incubação sob as condições de estresse etanólico. Após coloração com azul de metileno as células vivas e mortas das leveduras foram contadas em microscópio ótico (Olympus BH), usando câmara de Neubauer (OLIVEIRA et al., 1996).

3.2.4.4. Teste de tolerância a alta temperatura e etanol

As culturas de leveduras foram submetidas aos dois estresses (itens 3.2.4.2 e 3.2.4.3) concomitantemente, ou seja, elevação da temperatura e concentração de etanol do meio de cultivo para 37°C e 10% (v/v) respectivamente, com incubação por 48 horas, sob agitação de 80 rpm.

A viabilidade celular foi determinada às 0, 8h, 24 e 48 horas do período de incubação sob as condições de estresse. Após coloração com azul de metileno as células vivas e mortas das leveduras serão contadas em microscópio ótico (Olympus BH), usando câmara de Neubauer (OLIVEIRA *et al.*, 1996).

3.2.4.5. Teste de tolerância ao pH

Para avaliar a capacidade das células de levedura de crescerem ao baixo pH, as células de levedura selecionadas no item 3.2.8 foram inoculadas com uma densidade celular inicial de 2×10^6 célula/mL e incubadas a 25°C por 24 horas. Em seguida, as amostras foram retiradas, diluídas, plaqueadas em meio YEPD ajustado para os seguintes valores de pH: 5,5; 5,0; 4,5; 4,0; 3,5; 3,0; 2,5; 2,0; 1,5 e 1,0, com solução de ácido clorídrico 6N ou solução de hidróxido de sódio 1N.

3.2.4.6. Teste de floculação

O ensaio de floculação foi realizado de acordo com metodologia descrita por WANG *et al.*, (2008), onde a floculação (sedimentação) das células foi determinada na ausência ou presença de solução de cloreto de cálcio a 10 mM. Após uma agitação vigorosa dos tubos, amostras foram retiradas da parte superior do tubo para determinação da D.O._{600nm} no tempo 0 e após 10 minutos da suspensão ter sido colocada em repouso. A porcentagem da floculação foi calculada da seguinte forma:

$$\text{Floculação (\%)} = \frac{(A_0 - A_{10})}{A_0} \times 100$$

Onde:

A₀: Absorbância medida no tempo 0

A₁₀: Absorbância medida após 10 minutos

3.2.5. Estudo dos efeitos significativos entre temperatura, pH e concentração de etanol na viabilidade celular através da metodologia de superfície de resposta

As linhagens MA-12 e MA-135 (segregantes selecionadas nos testes de resistência anteriores) foram crescidas em meio líquido e temperaturas apropriados sob agitação constante por uma noite. No dia seguinte as células foram diluídas para uma D.O._{600nm} 0,1. A partir desse momento, as linhagens foram colocadas em diferentes combinações de temperatura, pH e concentração de etanol e foram monitoradas através da D.O._{600nm}, contagem celular em câmara de Neubauer e viabilidade celular com corante azul de metileno a cada 2 horas num período de 6 horas.

Em seguida, foram otimizados os parâmetros temperatura (T), pH (pH) e concentração de etanol (E) na viabilidade celular (VC) através de um planejamento fatorial 3³ com duas repetições, utilizando-se 3 variáveis independentes (T, pH e E) apresentando 3 níveis cada um e uma variável dependente (VC). A temperatura variou entre 25°C, 32°C e 40°C, o pH entre 2,0, 4,0 e 6,0 e a concentração de etanol entre 0%, 5% e 10%. O estabelecimento dessas variações foi baseado nos resultados obtidos previamente.

A partir das superfícies de resposta obtidas foram determinadas as interações com efeitos significativos e as condições máximas de temperatura, pH e etanol em que a

viabilidade celular se manteve maximizada. Calcularam-se os efeitos linear e quadrático de cada uma das variáveis independentes sob estudo, assim como suas interações na viabilidade celular. A significância foi avaliada por análise de variância.

3.2.6. Ensaio fermentativo com reciclo de célula e tratamento do fermento

Foram utilizadas cinco linhagens de levedura para este ensaio, MA-12 e MA-135 (segregantes isolados nos testes de resistência anteriormente) e PE-2, SA-1 e CAT-1 (padrões usadas em algumas destilarias).

Os testes foram conduzidos com culturas puras e mistas das leveduras (sendo 33,33% (v/v) de cada linhagem nas culturas mistas) em biorreator com condições controladas, contendo mosto preparado para esta finalidade. Foram realizados 4 ciclos fermentativos de 8 horas cada um, realizando um tratamento ácido do fermento a cada reciclo.

As culturas foram pré-inoculadas em meio definido de crescimento YEPD e incubadas por 16 horas a 30°C sob agitação a 150 rpm. Em seguida foram transferidas para um frasco Erlenmeyer de 250 mL, contendo 100 mL de meio definido de crescimento acrescido de 5% de sacarose e incubadas por 24 horas a 30°C sob agitação. E assim sucessivamente até atingir a quantidade de células adequada para cada ensaio.

Ao final da incubação, as culturas foram levadas à câmara fria por 2 horas para a sedimentação das células. Logo após, foram centrifugadas a 5.000 $\times g$ durante 15 minutos à 4° C e ressuspensas em água destilada estéril. As fermentações foram realizadas no biorreator onde foram adicionados 1,75 L de mosto de caldo de cana preparado (pH 4,0 e 19°Brix) e 750 mL de creme de leveduras a 30% (m/v) totalizando um volume de 2,5 L, que foram conduzidos durante 8 horas à temperatura de 32°C, com agitação de 120 rpm e condições controladas de aeração durante cada ciclo.

A cada 4 horas foram coletadas amostras e realizadas leituras para verificar a atenuação de sólidos totais (ART) em °Brix utilizando um refratômetro de campo, leitura da biomassa e viabilidade celular. Ao final da fermentação, as amostras foram centrifugadas a 5.000 $\times g$ por cinco minutos a 4°C e o sobrenadante transferido para tubos com roscas e mantidos a 4 °C para posterior determinação do teor alcoólico (g/100 mL) e açúcares redutores.

3.2.6.1. Determinação do °Brix

A determinação do °Brix foi realizada utilizando-se o refratômetro, no tempo zero e após 8 horas de fermentação.

3.2.6.2 Crescimento celular (determinação da biomassa)

Para determinação da biomassa, foi coletado 1,0 mL do meio fermentado de fermentação e centrifugado a 600 *xg* durante 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado transferido para um balão volumétrico de 25 mL com água destilada, onde o volume foi aferido com água destilada. Após homogeneização, a biomassa foi determinada por D.O._{570nm} com o auxílio da curva padrão de peso seco, previamente estabelecida.

3.2.6.3. Determinação da viabilidade celular

Para determinação da viabilidade celular as células de levedura foram coradas com azul de metileno e tanto as células viáveis quanto as não viáveis foram contadas em microscópio ótico (Olympus BH), usando câmara de Neubauer (OLIVEIRA *et al.*, 1996).

Os resultados foram expressos em porcentagem de células vivas pelo total de células, de acordo com a fórmula abaixo:

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

3.2.6.4. Determinação de açúcares totais

A determinação do teor de açúcares totais foi realizada no início e após 8 horas de fermentação através da metodologia descrita e modificada por MILLER, (1959).

O presente método baseia-se na redução do ácido 3,5-dinitrossalicílico a ácido 3-amino-5-nitrossalicílico (DNS) ao mesmo tempo em que o grupo aldeído do açúcar redutor

é oxidado a ácido carboxílico, com desenvolvimento de coloração avermelhada (SILVA, *et al.*, 2003).

3.2.6.4.1. Preparo do reagente de DNS

Em um balão volumétrico de 500 mL contendo aproximadamente 300 mL de água deionizada, foram dissolvidos 5 g de hidróxido de sódio, 96 g de tartarato duplo de sódio e potássio e 5 g de ácido dinitrossalicílico, todos adicionados lentamente. Após a dissolução total dos reagentes, o balão volumétrico foi preenchido até o menisco com água deionizada. A solução foi estocada em frasco âmbar a temperatura ambiente e na ausência de luz.

3.2.6.4.2. Preparo do padrão

A solução padrão foi preparada a partir da adição de 1 g de glicose em 50 mL de água deionizada. Em seguida essa solução foi diluída sucessivamente nas concentrações de 0,0 g.L⁻¹, 1,0 x 10⁻¹ g.L⁻¹, 2,0 x 10⁻¹ g.L⁻¹, 5,0 x 10⁻¹ g.L⁻¹, 1,0 g.L⁻¹, 1,5 g.L⁻¹, 2,0 g.L⁻¹ para realização da curva analítica.

3.2.6.4.3. Preparo das amostras

O método DNS quantifica apenas os açúcares redutores, por isso foi necessário hidrolisar os açúcares não redutores das amostras para que os açúcares totais presentes fossem quantificados.

Para a hidrólise ácida, alíquotas de 1 mL das amostras foram colocadas em frascos de 10 mL e posteriormente adicionados 20 µL de ácido clorídrico concentrado (37%). Os frascos foram incubados a 70°C em banho-maria durante 20 minutos. Em seguida, as amostras foram resfriadas em banho de gelo e adicionados 30 µL de solução de hidróxido de sódio a 5 mol.l⁻¹.

No mesmo frasco em que se realizou a hidrólise, foram adicionados 2 mL do reagente de DNS às amostras, que foram mantidas a aproximadamente 100°C em banho-maria durante 15 minutos para se processar a reação. Em seguida as amostras foram resfriadas em banho de gelo até atingirem a temperatura ambiente.

3.2.6.4.4. Quantificação de açúcares nas amostras

A leitura de absorbância das amostras foi efetuada em espectrofotômetro ajustado para o comprimento de onda de 540 nm. A quantificação dos açúcares das amostras, realizada em duplicata, foi feita por comparação com uma curva analítica (concentração de glicose versus absorbância em 540 nm).

Os limites de detecção e quantificação foram estatisticamente estimados a partir das equações A e B (INMETRO, 2003).

$$\text{Abs}_{\text{L.D.}} = \text{Abs}_{\text{br}} + 3s \quad (\text{A})$$

$$\text{Abs}_{\text{L.Q.}} = \text{Abs}_{\text{br}} + 10s \quad (\text{B})$$

Onde:

$\text{Abs}_{\text{L.D}}$ = Absorbância do analito cuja concentração é igual ao limite de detecção

$\text{Abs}_{\text{L.Q}}$ = Absorbância do analito cuja concentração é igual ao limite de quantificação

Abs_{br} = Absorbância do branco

s = Desvio padrão da curva analítica

3.2.6.5. Determinação do teor alcoólico

A determinação de etanol nas amostras foi realizada segundo a metodologia descrita por GATTÁS *et al.* (2002) com algumas modificações. O método desenvolvido baseia-se na utilização da enzima álcool desidrogenase de levedura de panificação para converter álcool etílico a acetaldeído e NADH, através de reação de óxido-redução, tendo o NAD⁺ comoceptor de elétrons. Neste estudo o método foi adaptado para a utilização da enzima comercial álcool desidrogenase de *Saccharomyces cerevisiae* - ADH (Sigma A7011).

Inicialmente foi realizado um ensaio da atividade da ADH, conforme descrito por RACKER (1955), baseada na conversão enzimática do etanol a acetaldeído através de reação de óxido-redução, tendo o NAD⁺ (β-Nicotinamide adenine dinucleotide) como

aceptor de elétrons. A atividade da enzima frente ao etanol foi feita pela diferença da absorbância a 340 nm, por minuto, entre o ensaio e o controle correspondente.

Em seguida, foi realizada uma curva analítica (concentração de etanol versus absorbância em 340 nm) com o objetivo de detectar a linearidade do método através dos limites de detecção e quantificação que foram estatisticamente estimados a partir das equações C e D (INMETRO, 2003), para então serem realizadas as dosagens nas amostras.

$$Abs_{L.D.} = Abs_{br} + 3s \quad (C)$$

$$Abs_{L.Q.} = Abs_{br} + 10s \quad (D)$$

Onde:

$Abs_{L.D.}$ = Absorbância do analito cuja concentração é igual ao limite de detecção

$Abs_{L.Q.}$ = Absorbância do analito cuja concentração é igual ao limite de quantificação

Abs_{br} = Absorbância do branco

s = Desvio padrão da curva analítica

3.2.6.5.1. Dosagem de etanol nas amostras

A reação ocorreu a pH 8,8 com o equilíbrio deslocado para a formação do acetaldeído pela reação do mesmo com semicarbazida. O Tubo P onde ocorreu a reação enzimática completa foi preparado da seguinte forma: 0,1 mL de NAD^+ 0,03 M; 0,04 mL da amostra diluída 200 vezes; 3 mL de solução tampão pirofosfato; 0,1 mL de volume da preparação enzimática purificada (0,35 U em 0,1mL) para um volume final de 3,24 mL.

Uma curva padrão para a dosagem do etanol foi construída utilizando soluções de etanol em diferentes concentrações. O Tubo P diferiu do Tubo R por conter solução padrão do etanol (concentração final no Tubo R ao redor de $6,9 \times 10^{-3} \text{ g. L}^{-1}$) no lugar da amostra, sendo que o Tubo B_{r-e} foi preparado para conter água no lugar da amostra (controle da preparação enzimática).

A reação enzimática foi iniciada no tempo zero com a adição da preparação enzimática e a reação ocorreu por 15 minutos à temperatura ambiente. As diferenças entre

as absorvâncias (D.O._{340 nm}) das soluções dos tubos R e B_{r-e} ($A_R - A_{B_{r-e}}$), bem como, a diferença entre o Tubo P e o tubo B_{r-e} ($A_P - A_{B_{r-e}}$) foram obtidas e utilizadas na determinação da concentração do etanol utilizando-se a seguinte equação:

$$C \text{ g/L} = \frac{(A_R - A_{B_{r-e}})}{(A_P - A_{B_{r-e}})} \times V \times \text{dil.} \times \frac{1}{v} \times c \times PM_{(\text{etanol})}$$

Onde:

C = concentração do etanol em g/L;

($A_R - A_{B_{r-e}}$) = Abs. amostra – Abs. branco;

($A_P - A_{B_{r-e}}$) = Abs. padrão – Abs. branco;

V = volume da reação (mL);

dil. = diluição da amostra;

v = volume da amostra (mL);

c = concentração do padrão na cubeta (M);

PM = massa molecular do etanol

3.2.6.6. Cálculo da eficiência fermentativa

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

$$\text{Eficiência fermentativa (\%)} = \frac{\text{Etanol}}{0,511} \times 100$$

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

3.2.7. Análise da expressão gênica quantitativa por PCR em tempo real

Para este ensaio foram utilizadas amostras de cDNA obtidas a partir das linhagens de levedura MA-12 (resistente) e MA-139 (sensível) selecionadas anteriormente, em 3

diferentes condições: estresse por etanol (meio de cultura YEPD contendo 10% de etanol, pH 4,5 e temperatura de 30°C), estresse por etanol, pH e temperatura (meio de cultura YEPD contendo 10% de etanol, pH 2,0 e temperatura de 37°C) e controle (meio de cultura YEPD sem etanol, com pH 4,5 e temperatura de 30°C), durante 2 horas. Assim, a metodologia de PCR em tempo real foi utilizada para determinar os níveis de mRNA produzidos para os genes APJ1, FPS1, MKT1, SWS2 e HSP12 normalizados para os genes de referência (controle endógeno) ACT1, GCN4 e PGK1, usando oligonucleotídeos iniciadores específicos.

3.2.7.1. Extração e preparo de RNA total de levedura

As linhagens desejadas foram crescidas em meio líquido e temperatura apropriados sob agitação constante por uma noite. No dia seguinte, as células foram diluídas para uma D.O._{600nm} 0,1 e submetidas a três situações diferentes: estresse por etanol (meio de cultura YEPD contendo 10% de etanol, pH 4,5 e temperatura de 30°C), estresse por etanol, pH e temperatura (meio de cultura YEPD contendo 10% de etanol, pH 2,0 e temperatura de 37°C) e controle (meio de cultura YEPD sem etanol, com pH 4,5 e temperatura de 30°C), durante 2 horas.

Em seguida, alíquotas das culturas foram coletadas por centrifugação a 3.000 *xg* por 5 minutos a temperatura de 4°C para extração de RNA total. A extração de RNA para o ensaio de PCR em Tempo Real, foi feito com RNeasy Mini Kit (QIAGEN).

Para isso, os pellets celulares foram ressuspensos em 4 mL de tampão de lise e incubados por 30 minutos à temperatura de 30°C sob leve agitação. Os tubos foram centrifugados por 5 minutos a 3.000 *xg* e o sobrenadante removido cuidadosamente com o pipetador. Foram adicionados 350 μ L de tampão RLT (kit) e agitados vigorosamente em vórtex. Procedeu-se a nova centrifugação por 2 minutos e o sobrenadante foi recolhido. Depois de adicionar 350 μ L de solução de etanol a 70% (v/v), as amostras foram transferidas para coluna de purificação e centrifugadas por 15 segundos a 10.000 *xg* para posterior descarte do flow-throw.

Foram adicionados 700 μ L do tampão RW1 (kit) e novamente as amostras foram centrifugadas por 15 segundos a 10.000 *xg* e o flow-throw descartado. Em seguida, foram adicionados 500 μ L do tampão RPE (kit) e centrifugados por 2 minutos a 10.000 *xg* e o

flow-throw descartado. Para finalizar, as colunas foram colocadas em um microtubo novo e foram adicionados 30 µL de água tratada com DEPC (200 mL água Mili-Q estéril, 200 mL DEPC) na membrana e centrifugadas por 1 minuto a 10.000 *xg*.

Os RNAs extraídos das amostras foram quantificados através da leitura em espectrofotômetro nos comprimentos de onda 260/280 nm. O grau de pureza da amostra foi verificado através da relação entre 260 e 280 nm, sendo considerada uma boa extração aquela que apresentou valores de razão entre 1,6 e 1,9.

Em seguida, os RNAs foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% contendo formaldeído 2,2 M e NBC 1x. Para a aplicação no gel, as amostras de RNA foram desnaturadas a 65°C por 10 minutos e adicionadas a um tubo contendo tampão de amostra para RNA (MOPS 20 mM pH 7.0; EDTA 0,1 M) e brometo de etídio. Após 3 horas de corrida a 70 V, o gel foi fotografado sob luz ultravioleta para posterior análise.

Após constatação da qualidade e pureza do RNA foi realizado o tratamento do RNA total com rDNase para evitar possíveis contaminações. Para cada 1 µg de RNA total adicionou-se 1 unidade de rDNase I (DNase recombinante bovina Usb, USA), 1 µL de tampão 10x rDNase e água DEPC q.s.p. Para 9 µL e a reação foi incubada a temperatura ambiente por 15 minutos. Após o tempo de incubação, foi adicionado 1 µL da solução de inativação da enzima para cada 1 µg de RNA total e incubou-se por 10 minutos a 65°C. Para avaliar a qualidade do RNA após tratamento com DNase I, 1 µg de RNA tratado foi submetido a eletroforese em gel de agarose 1%. As amostras foram consideradas adequadas quando as bandas de 28S e 18S se mostraram íntegras e nenhum traço de DNA genômico foi detectado.

3.2.7.2. Síntese de cDNA através da Transcrição Reversa

A transcrição reversa do RNA em cDNA foi realizada com 5 µg de RNA utilizando-se a enzima transcriptase reversa Super-script IITM Reverse Transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

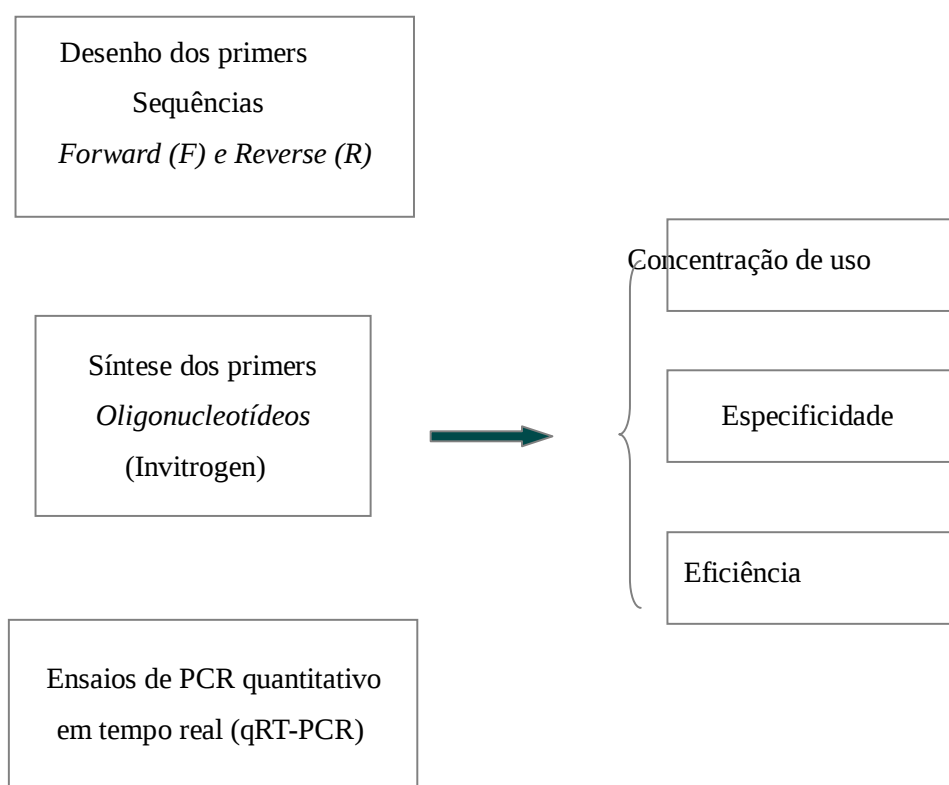
Para este protocolo foi adicionado ao RNA 5 µL de oligodT (500 µg/mL), 2 µL de dNTP (10 mM de dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 5 µL de tampão de transcrição 5x e por último 3 µL da enzima transcriptase reversa.

A transcrição foi realizada em triplicata e para todas as amostras foi realizado um controle negativo, onde foi adicionado 3 µL de água DEPC no lugar da enzima transcriptase reversa.

As amostras foram então colocadas em termociclador (MJ Research, Inc. Watertown, MA, USA) a temperatura de 25°C por 10 minutos, seguidos de 37°C por 120 minutos e 85°C durante 5 minutos. Ao final da transcrição o cDNA foi mantido a temperatura de -20°C.

3.2.7.3. Desenho e padronização dos primers e reação de PCR em tempo real

Os primers utilizados nas reações de PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR) foram desenhados, sintetizados e padronizados quanto a sua concentração de uso e verificados quanto a sua especificidade e eficiência, como mostrado no esquema abaixo:



Todas as etapas citadas acima, que antecedem os ensaios de qRT-PCR são necessárias e foram cuidadosamente seguidas, garantindo a qualidade dos resultados.

Os primers foram desenhados com auxílio do programa *Primer Express 2.0* (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA) para todos os genes selecionados, ou seja, para os genes alvos e para os genes escolhidos como controles endógenos. Os tamanhos variaram de 19 a 21 pares de bases (pb), T_m de 59-61°C (T_m, do inglês “melting point”) e o conteúdo de GC de 50 a 60%. O tamanho dos produtos de amplificação gerados variou de 80 a 125 pb e seu T_m de 74-80°C.

A Tabela 3 demonstra a sequência e as características dos primers utilizados neste ensaio.

Tabela 3. Descrição dos genes estudados, sequência dos primers utilizados e características do produto de amplificação.

Gene	Oligonucleotídeo (Sequências 5' → 3')	Tam. Ampl	T _m . Ampl	Concentração inicial do primer
APJ1	F: TGCTACCCCCTCTTCTAATGG R: ACAGATTGTTACGCCACTG	107 pb	76°C	100 µM
FPS1	F: GACTGCTTTCCCGATTCAAG R: GCGGGACCGTTATCTTTATG	81 pb	74°C	100 µM
MKT1	F: GAGGCTGGACACAATGGAAC R: TGGCTCTTGGGGTTGAATAG	80 pb	75°C	100 µM
SWS2	F: GTTAGGGGCCAGCATAACAAG R: GACCAAAGGGACGGATTATG	119 pb	76°C	100 µM
HSP12	F: CGCAGGTAGAAAAGGATTCG R: GAACCTTACCAGCGACCTTG	125 pb	80°C	100 µM
ACT1	F: ATTGAGAGTTGCCCCAGAAG R: GAAGGCTGGAACGTTGAAAG	118 pb	76°C	100 µM
GCN4	F: GCGTTCGATTCCACTTTCTC R: GCGGCTTCAGTGTTTCTAGC	81 pb	75°C	100 µM
PGK1	F: TCCCATTTGGACGGTAAGAAG R: CGTATCTTGGGTGGTGTTC	93 pb	77°C	100 µM

*Tam. Ampl.: tamanho do produto de amplificação em pares de base; T_m. Ampl.: temperatura do produto amplificado em °C;

Posteriormente, foram realizadas as reações de otimização, para escolher a melhor concentração de oligonucleotídeo iniciador a utilizar na análise de cada gene alvo e controle endógeno (concentração mínima de oligonucleotídeos iniciadores possível, sem que haja alteração na eficiência de amplificação). As concentrações testadas foram 0,25 µM, 0,40 µM, 0,50 µM e 0,70 µM. O sistema de detecção utilizado foi o sistema SYBRTM

Green, baseado no fluorocromo SYBR, fazendo uso do kit Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems). As reações de otimização foram realizadas em equipamento para PCR em tempo real ABI Prism® 7500 (Applied Biosystem), em triplicatas para cada gene contendo 20 ng de cDNA, 10 µL de Master Mix SYBRTM Green (Applied Biosystem) e os oligonucleotídeos iniciadores, cujas concentrações variaram como descrito acima. As condições das reações foram 10 minutos a 95°C, 40 ciclos de 15 segundos a 95°C e 1 minuto a 60°C para extensão. Ao final, acrescentou-se um passo de dissociação que compreende duas etapas de 15 segundos 95°C, intercaladas por uma etapa de 30 segundos a 60°C. A curva de dissociação tem como objetivo a verificação de ocorrência de primer dimer, produtos inespecíficos e de contaminações.

Em seguida, foi iniciada a etapa de validação com a finalidade de analisar se a eficiência de amplificação dos oligonucleotídeos iniciadores é a mesma (90% - 110%) para as diferentes concentrações de amostra. Para tanto, foram realizadas diluições seriadas de cDNA: 100 ng/µL, 10 ng/µL, 1 ng/µL, 0,1 ng/µL e 0,01 ng/µL. Essa etapa foi realizada para cada gene utilizando a concentração de iniciadores otimizada anteriormente.

Após a padronização das reações de PCR em tempo real utilizando os oligonucleotídeos específicos e confirmação da eficiência de amplificação, foram realizadas as reações com testes em triplicada para cada amostra.

As reações de qRT-PCR foram realizadas em placas de 96 poços, usando o reagente “SYBR-Green PCR Master Mix” (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) e o equipamento “Perkin-Elmer ABI PRISM 7500 Sequence Detection System” (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). A reação foi realizada em 40 ciclos de 15 segundos a 94°C e 1 minuto a 60°C.

Para a quantificação relativa foi estabelecido um valor de ΔR_n , correspondente a linha de corte (Threshold) para cada curva de amplificação de um dado par de primers. O número do ciclo que a ΔR_n cruza o threshold corresponde ao Ct (Ct do inglês “cycle threshold”) da amostra. O valor de Ct é preditivo da quantidade de RNAm alvo presente na amostra e quanto menor o seu valor, maior é a quantidade de RNAm presente na amostra. O cálculo da quantificação relativa foi feito pelo método de $2^{-\Delta\Delta C_t}$ descrito por LIVAK & SCHMITTGEN (2001), utilizando como gene de referência (endógeno) PGK1. Amostras das leveduras no meio sem estresse foram utilizadas como controle (calibrador) do ensaio, ou seja, o valor de quantificação relativa (QR) de cada amostra foi calculado considerando

o valor da média ΔCt do grupo controle. Foi considerado significativo todo o valor de $QR \geq 2$ (genes regulados positivamente) ou $QR \leq 0,5$ (genes regulados negativamente) em relação à amostra controle.

A fórmula utilizada para o cálculo da quantificação relativa (QR) está descrita abaixo:

$$QR = 2^{\Delta\Delta Ct}$$

Onde:

$\Delta Ct = Ct \text{ alvo} - Ct \text{ de referência}$

$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ amostra} - \Delta Ct \text{ controle}$

3.2.8. Análise de dados

Em um primeiro momento, foram realizados experimentos com a finalidade de se determinarem as melhores condições isoladas de crescimento das leveduras selecionadas, testando diferentes temperaturas, pHs e concentrações de etanol. Nesta fase, os dados foram inseridos em gráficos e tabelas através do programa Excel versão 2007.

Em seguida, foram otimizados os parâmetros temperatura (T), pH (pH) e concentração de etanol (E) na viabilidade celular (VC) através de um planejamento fatorial 3^3 com duas repetições, utilizando-se 3 variáveis independentes (T, pH e E) apresentando 3 níveis cada um e uma variável dependente (VC). A temperatura variou de 25°C a 40°C, o pH de 2,0 a 6,0 e a concentração de etanol de 0% a 10%. O estabelecimento dessas variações foi baseado nos resultados obtidos previamente.

A partir das superfícies de resposta obtidas foram determinadas as interações com efeitos significativos e as condições máximas de temperatura, pH e etanol em que a viabilidade celular se manteve maximizada. Calcularam-se os efeitos linear e quadrático de cada uma das variáveis independentes sob estudo, assim como suas interações na viabilidade celular. A significância foi avaliada por análise de variância.

Para o ensaio de fermentação, os resultados foram tabulados e analisados através de análise de variância (ANOVA) com comparação das médias entre si pelo Teste t a 5% de

significância. Os resultados dos experimentos foram analisados por meio do software “Statistica TM”, versão 8 (Statsoft®, Tulsa, EUA).

No ensaio de expressão gênica por PCR em tempo real, a diferença dos níveis de cada gene analisado foi calculada utilizando o método de PFAFFL, (2001). Esse modelo leva em consideração a eficiência de amplificação dos iniciadores no cálculo da expressão relativa, permitindo a quantificação relativa da expressão quando as eficiências de amplificação dos iniciadores são diferentes entre si.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Identificação da levedura coletada como *Saccharomyces cerevisiae*

Sabe-se que no processo de produção de álcool combustível ocorre uma sucessão intensiva de linhagens de *Saccharomyces* no mosto de fermentação e geralmente, o fermento original é substituído por linhagens selvagens ou leveduras contaminantes de outras espécies e não produtoras de etanol (SILVA-FILHO *et al.*, 2005).

Entre as leveduras do grupo stricto sensu *Saccharomyces*, as espécies *S. cerevisiae*, *S. bayomyces anus* e *S. pastorianus* são as mais comumente encontradas em ambientes antrópicos devido as suas altas capacidades fermentativas (NAUMOV *et al.*, 2000).

Tradicionalmente, a classificação e identificação de linhagens e espécies de leveduras têm sido baseadas em características morfológicas e habilidades fisiológicas, sendo um processo laborioso e que consome tempo. Dadas as dificuldades deste processo, técnicas moleculares utilizando a amplificação de fragmentos específicos de DNAs têm sido utilizadas como métodos alternativos para identificação de leveduras (KURTZMAN E ROBNETT, 1998).

No intuito de confirmar se a levedura isolada da dorna de fermentação pertence ao gênero *Saccharomyces cerevisiae* foi realizada uma PCR com primers específicos da região HO (MELO PEREIRA *et al.*, 2010).

Em *Saccharomyces cerevisiae*, o gene HO codifica uma endonuclease responsável pela troca da reação sexual, ou seja, pela troca de “mating type” da levedura, onde as células MAT α mudam para células MATa ou vice-versa (KODAMA *et al.*, 2003). As linhagens selvagens de *Saccharomyces cerevisiae* expressam HO, sendo portanto, homotáticas.

A Figura 2 mostra a amplificação do gene HO da levedura cedida para estudo, a MA-1, bem como as leveduras utilizadas como controle, PE-2, CAT-1 e SA-1 respectivamente. A utilização dos iniciadores SCHO produz uma amplificação de 400 pb na espécie *S. cerevisiae*. Ao se usar o iniciador Scho é possível distinguir *S. cerevisiae* de outras espécies de *Saccharomyces* pelo tamanho das bandas (MELO PEREIRA *et al.*, 2010).

Buscando conhecer melhor as leveduras isoladas, foi realizada a macromorfologia das leveduras. Na Figura 3 observa-se a macromorfologia das leveduras selecionadas.

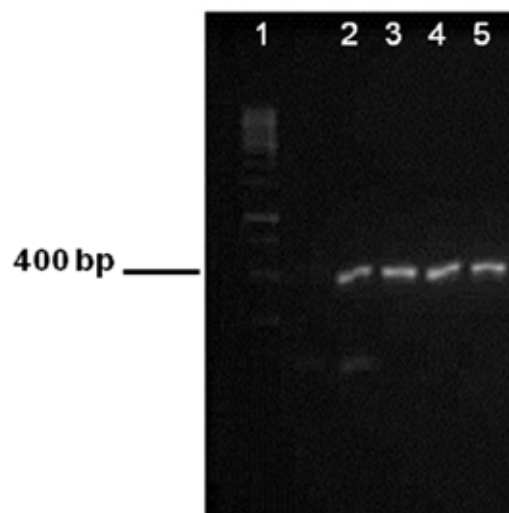


Figura 2. Identificação de *Saccharomyces cerevisiae* por PCR com *primers* específicos para amplificação do gene HO (Scho-F and Scho-R). Eletroforese em gel de agarose 0,8% dos produtos amplificados da PCR. Canaleta 1: padrão de tamanho molecular “Ladder Plus” (Invitrogen); canaletas 2, 3, 4 e 5: *Saccharomyces cerevisiae* PE-2, CAT-1, SA-1 e MA-1 respectivamente.

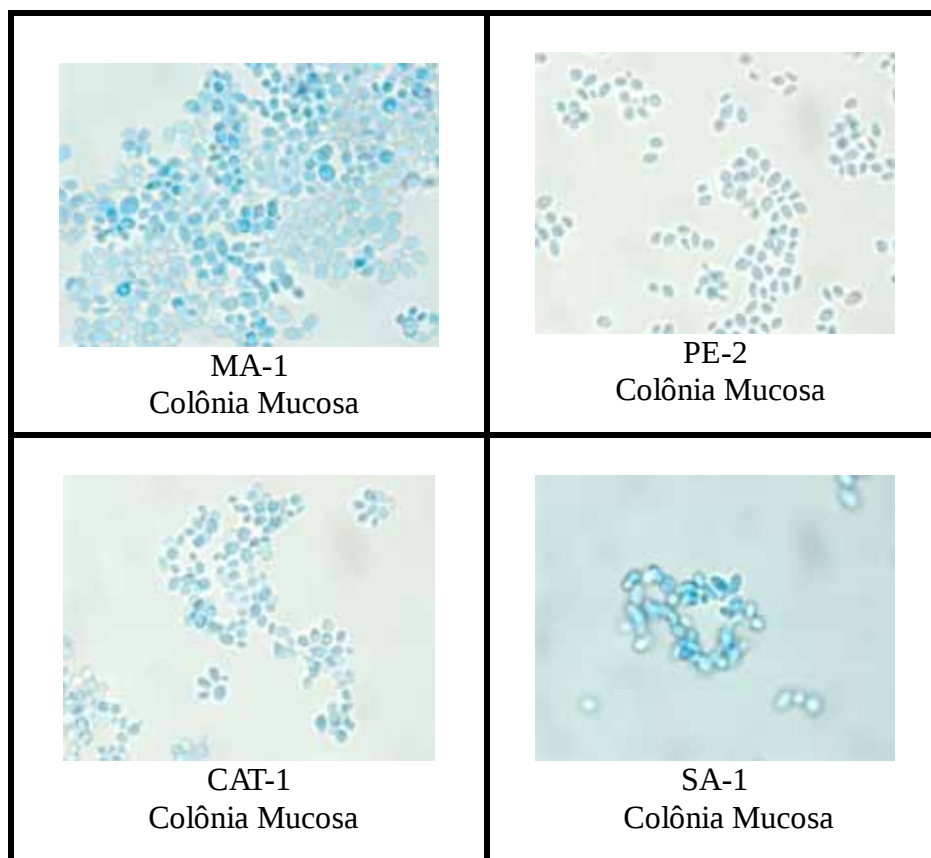


Figura 3. Morfologia das linhagens de leveduras selecionadas (imagem ao microscópio em aumento de 400X).

4.2. Esporulação da levedura, dissecação e caracterização de tétrades

Como apresentado também na revisão deste trabalho, as condições estressantes impostas à levedura na produção industrial de etanol, principalmente quando as células são reutilizadas de um ciclo fermentativo para outro subsequente, durante o período de uma safra (200-250 dias), estão exercendo uma pressão seletiva sobre a população de linhagens selvagens (normalmente presentes nas dornas), levando à evolução de linhagens multi-tolerantes (BASSO *et al.*, 2008).

Essas linhagens constituem excelente material genético para a compreensão das bases moleculares das tolerâncias aos vários estresses impostos pelo processo como também para a obtenção de novas linhagens (ARGUESO *et al.*, 2009). Sendo assim, uma vez

caracterizada como *Saccharomyces cerevisiae*, a levedura MA-1 foi esporulada para obtenção de segregantes com características desejáveis ao processo industrial.

Alguns esporos se mostraram inviáveis (não germinaram), não sendo possível o seu cultivo. Segundo LITI & LOUIS (2005), a inviabilidade de alguns esporos pode ocorrer devido a perdas de cópias de um dado cromossomo durante a meiose, o que pode ser letal para células haplóides.

Após a esporulação, os ascas foram dissecados para separação das tétrades. Para isso, foi utilizado um tratamento com a enzima zimoliase, que tornou o processo mais eficiente e facilitou a separação das tétrades.

Foram selecionados 48 haplóides que apresentaram crescimento viável durante as primeiras 24 horas. Essas novas células foram codificadas de MA-11 até MA-148, respectivamente.

4.3. Seleção dos segregantes obtidos a partir do fenótipo de resistência ao estresse fermentativo, como altas temperaturas, altas concentrações de etanol, baixo pH e floculação

A resistência a múltiplos estresses é uma característica desejada em leveduras industriais envolvidas em qualquer processo biotecnológico, pois as células são expostas a combinações simultâneas ou sequenciais de diferentes tipos de estresse.

Algumas das características requeridas para o processo industrial de produção de álcool combustível são: tolerância a altas temperaturas e altas concentrações de etanol, resistência a baixo pH e ausência de floculação.

A produção de etanol no Brasil dispõe de poucas, porém excelentes leveduras quanto aos atributos citados acima, sendo que algumas delas (CAT-1, PE-2 e SA-1) apresentam histórico de longos anos com capacidade de implantação em processos industriais.

Por esse motivo, todos os segregantes viáveis obtidos, num total de 48, foram avaliados quanto ao fenótipo de sensibilidade a temperatura, etanol e pH com o objetivo de selecionar os mais resistentes a esses fatores, e as linhagens industriais PE-2, CAT-1 e SA-1 foram utilizadas como controle para comparação.

Inicialmente todas as leveduras foram submetidas ao crescimento à diferentes temperaturas e diferentes concentrações de etanol de forma isolada e foram selecionadas

somente as leveduras que cresceram até 42°C e concentração de até 10% de etanol (Tabela 4).

Em seguida, as leveduras selecionadas foram testadas quanto à capacidade de crescimento em temperatura de até 42°C e 10% de etanol simultaneamente para uma nova seleção (Figura 4).

Nessas duas etapas, as linhagens mostraram diferentes graus de tolerância, mas evidenciou-se uma sensibilidade maior à temperatura quando o etanol está presente no meio, ou seja, sem o etanol a maior temperatura de crescimento de algumas leveduras foi de 42°C, no entanto quando foi avaliado o crescimento dessas leveduras no meio contendo 10% de etanol, a maior temperatura de crescimento foi de 40°C.

O etanol, em elevadas concentrações, pode tornar-se tóxico para o metabolismo celular, sendo a membrana plasmática o primeiro alvo a ser atingido, pois o etanol tem a capacidade de desarranjar as proteínas (INGRAM & BUTTKE, 1984) e lípidos de membrana (GURTOVENKO & ANWAR, 2009; MISHRA & PRASAD, 1989). A interferência do etanol na fluidez da membrana tem um papel fundamental (QUINTAS *et al.*, 2000), tendo como consequência a estimulação do transporte passivo de prótons, o aumento da sensibilidade à temperatura com diminuição da temperatura ótima e máxima de crescimento e a inibição do transporte de açúcares (LOUREIRO-DIAS & PEINADO, 1982).

Tabela 4. Seleção das leveduras esporuladas em relação ao crescimento em diferentes temperaturas e concentrações de etanol.

Levedura	Temperatura				Concentração de etanol			
	35°C	40°C	41°C	42°C	0%	5%	8%	10%
MA-1	+	+	+	-	+	+	+	+
MA-11	+	-	-	-	+	+	+	+
MA-12	+	+	+	+	+	+	+	+
MA-13	+	-	-	-	+	+	+	-
MA-14	+	+	-	-	+	+	+	-
MA-15	+	+	+	-	+	+	+	+
MA-16	+	+	+	-	+	+	+	-
MA-17	+	+	+	+	+	+	+	-
MA-18	+	+	+	-	+	+	+	+
MA-19	+	+	+	-	+	+	+	-
MA-110	+	+	-	-	+	+	+	+
MA-111	+	+	-	-	+	+	+	+
MA-112	+	+	+	+	+	+	+	+
MA-113	+	+	+	-	+	+	+	+
MA-114	+	+	-	-	+	+	+	+
MA-115	+	+	-	-	+	+	+	+
MA-116	+	+	+	+	+	+	+	+
MA-117	+	+	+	+	+	+	+	+
MA-118	+	+	-	-	+	+	+	+
MA-119	+	+	-	-	+	+	+	+
MA-120	+	+	+	+	+	+	+	+
MA-121	+	+	+	-	+	+	+	-
MA-122	+	+	+	+	+	+	+	-
MA-123	+	+	+	+	+	+	+	-
MA-124	+	+	-	-	+	+	+	+
MA-125	+	+	+	-	+	+	+	+
MA-126	+	+	-	-	+	+	+	+
MA-127	+	+	-	-	+	+	+	-
MA-128	+	+	+	-	+	+	+	-
MA-129	+	+	+	+	+	+	+	+

MA-130	+	+	+	-	+	+	+	+
MA-131	+	+	+	+	+	+	+	+
MA-132	+	+	+	-	+	+	+	-
MA-133	+	+	+	+	+	+	+	+
MA-134	+	+	-	-	+	+	+	-
MA-135	+	+	+	+	+	+	+	+
MA-136	+	+	-	-	+	+	+	-
MA-137	+	+	-	-	+	+	+	+
MA-138	+	-	-	-	+	+	+	-
MA-139	+	-	-	-	+	+	+	-
MA-140	+	+	+	+	+	+	+	+
MA-141	+	+	-	-	+	+	+	+
MA-142	+	+	-	-	+	+	+	+
MA-143	+	-	-	-	+	+	+	+
MA-144	+	+	-	-	+	+	+	+
MA-145	+	+	+	+	+	+	+	+
MA-146	+	+	+	-	+	+	+	+
MA-147	+	+	+	-	+	+	+	+
MA-148	+	+	+	-	+	+	+	+

(+) crescimento; (-) sem crescimento

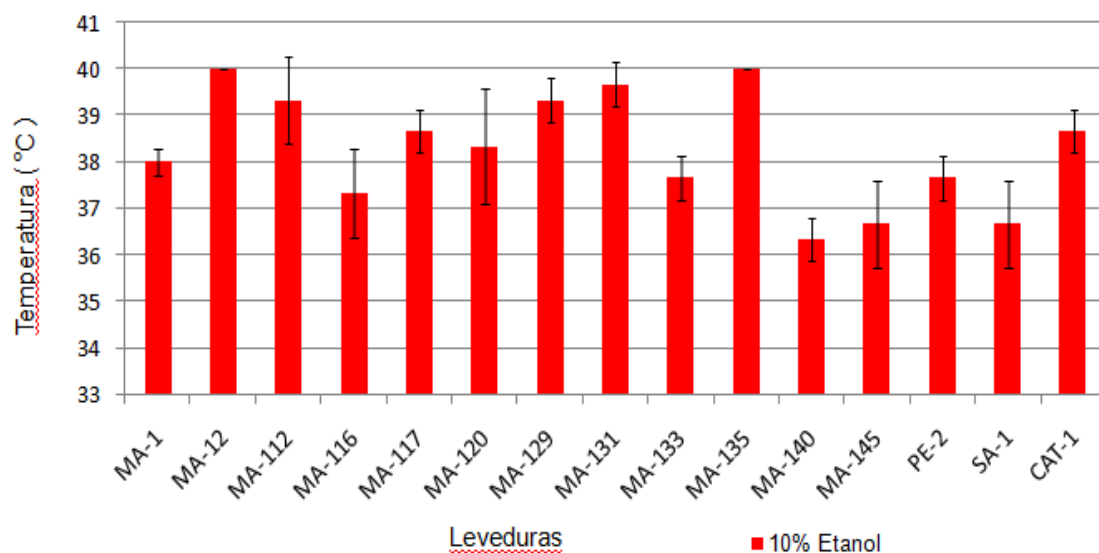


Figura 4. Temperatura máxima de crescimento das leveduras selecionadas em meio contendo 10% de etanol.

As leveduras que cresceram a 42°C em meio contendo 10% de etanol foram selecionadas e testadas quanto a viabilidade celular, a capacidade de crescer em diferentes pHs e se são floculantes (Tabelas 5 e 6 e Figura 5).

Com esses resultados, foi realizado um ranqueamento das células mais resistentes (que mantiveram a viabilidade igual ou superior às linhagens industriais, apresentaram crescimento em baixo pH e possuíam baixa capacidade floculante) para posterior seleção.

O ensaio de viabilidade celular foi realizado com o intuito de identificar, de forma mais completa, o efeito do tratamento sobre as células, já que através do crescimento pode-se analisar somente a inibição da taxa proliferativa, porém não se pode diferenciar as células mortas das células vivas. Segundo (SOUZA, 2013), a viabilidade permite constatar se os tratamentos utilizados apenas diminuem a taxa de crescimento ou matam as células.

A partir dos dados da Tabela 5 pode-se notar que a viabilidade celular diminui conforme se aumenta os fatores de estresse avaliados, ou seja, após 48 horas de ensaio, as taxas de viabilidade apresentaram pequena redução nos tratamentos isolados (25°C sem etanol, 25°C com 10% de etanol e 37°C sem etanol) quando comparados ao tratamento contendo 10% de etanol a 37°C, para todas as linhagens estudadas. No entanto, das 6 leveduras avaliadas, apenas 2 apresentaram desempenho superior às linhagens industriais utilizadas como controle.

Em relação ao pH, 3 das leveduras avaliadas cresceram em meio ajustado em pH a 1,5, no entanto, conforma relatado na revisão deste trabalho, o pH baixo não impede o crescimento das células de levedura, mas é um fator significativo para as fermentações industriais devido à sua importância tanto no controle da contaminação bacteriana quanto ao seu efeito na taxa de fermentação e formação de subprodutos (SOUZA, 2009).

Para finalizar esta etapa, as leveduras selecionadas foram submetidas ao teste de capacidade de floculação. A floculação é uma das características mais intrigantes e importantes industrialmente manifestadas pelas leveduras, dificultando o controle do processo (VERSTREPEN *et al.*, 2003). Esse fenômeno pode causar grandes prejuízos nas usinas brasileiras produtoras de etanol, uma vez que se inicia repentinamente durante o processo, sem uma causa aparente conhecida. A floculação aumenta o tempo de fermentação, pois diminui a área de contato célula-meio, além disso, o processo para promover a desfloculação é difícil, sendo que muitas vezes as usinas são obrigadas a trocar o fermento.

BRITES (2003), atribui à floculação como um aspecto positivo para o processo de fermentação, justificando que a floculação deixaria o mosto livre de células mais rapidamente, diminuindo o tempo de espera para decantação e eliminando a necessidade de utilização de processos de filtração e/ou centrifugação. No entanto, para que isso aconteça de forma positiva, deveria haver um controle do momento exato do início da floculação durante o processo, o que ainda não é possível na prática.

Os fenótipos de adesão dependem de uma família de proteínas de superfície celular, também chamada de adesinas ou floculinas que são codificados pelos genes FLO na *S. cerevisiae* (VERSTREPEN & KLIS, 2006)

Sabe-se que as proteínas Flo conferem adesão por dois mecanismos distintos. A primeira é a adesão célula-superfície, que se acredita depender de interações hidrofóbicas entre certos domínios na adesina e a superfície de ligação (VAN MULDER *et al.*, 2009).

O segundo mecanismo é a adesão célula-célula ou também chamado de floculação em si. Esse é um mecanismo físico, reversível, dependente de íons de cálcio e foi primeiramente denominado Lectin-like theory of flocculation (MIKI *et al.*, 1982). As proteínas de membrana das leveduras floculantes funcionam como lectinas e se ligam a carboidratos na parede celular das células vizinhas (EDDY & RUDIN, 1958). As células floculantes possuem em sua membrana celular floculinas (lectinas) e carboidratos, enquanto que as células não floculantes possuem apenas carboidratos (STRATFORD, 1996).

Sendo assim, a característica de floculação das linhagens estudadas foi determinada na presença e ausência de solução de cloreto de cálcio a 10 mM, com o intuito de avaliar a capacidade de floculação espontânea ou induzida das leveduras.

Em todas as leveduras testadas foi observada uma baixa porcentagem de floculação, tanto espontânea como induzida pelo cloreto de cálcio (Figura 5). Nota-se que, com exceção das leveduras MA-12, MA-112 e MA-129, todas as leveduras apresentaram uma porcentagem de floculação maior depois da indução do cálcio.

Tabela 5. Efeito do etanol e temperatura na viabilidade celular ao final de 48 horas de ensaio.

Levedura	Temperatura – 48h			
	25°C		37°C	
	0% etanol	10% etanol	0% etanol	10% etanol
MA-1	100,0 $\pm$ 0,00 ^a	98,00 $\pm$ 0,33 ^a	96,50 $\pm$ 0,50 ^a	69,50 $\pm$ 0,51 ^c
MA-12	100,0 $\pm$ 1,53 ^a	97,5 $\pm$ 1,11 ^a	100,0 $\pm$ 0,00 ^a	80,00 $\pm$ 1,27 ^a
MA-112	99,00 $\pm$ 1,05 ^a	98,50 $\pm$ 1,13 ^a	95,50 $\pm$ 1,42 ^b	73,50 $\pm$ 1,15 ^c
MA-129	96,50 $\pm$ 0,58 ^b	92,00 $\pm$ 1,52 ^b	97,50 $\pm$ 0,91 ^a	77,50 $\pm$ 0,21 ^b
MA-131	97,00 $\pm$ 1,01 ^b	95,00 $\pm$ 1,08 ^b	100,0 $\pm$ 0,00 ^a	57,50 $\pm$ 0,50 ^d
MA-135	100,0 $\pm$ 0,00 ^a	97,5 $\pm$ 0,68 ^a	99,00 $\pm$ 1,00 ^a	82,00 $\pm$ 0,89 ^a
PE-2	96,67 $\pm$ 0,58 ^b	87,50 $\pm$ 1,73 ^c	90,00 $\pm$ 1,86 ^b	58,50 $\pm$ 0,50 ^d
CAT-1	97,23 $\pm$ 0,27 ^b	93,46 $\pm$ 0,12 ^b	95,77 $\pm$ 1,10 ^b	79,55 $\pm$ 1,18 ^b
SA-1	94,97 $\pm$ 0,59 ^c	88,03 $\pm$ 1,19 ^c	94,49 $\pm$ 1,63 ^b	71,95 $\pm$ 0,34 ^c

*Médias seguidas de mesma letra na mesma linha não diferem entre si (P<0,05).

Tabela 6. Crescimento das leveduras selecionadas em diferentes pHs.

Levedura	pH						
	1,0	1,5	2,0	2,5	3,0	3,5	4,0
MA-1	-	-	-	+	+	+	+
MA-12	-	+	+	+	+	+	+
MA-112	-	-	+	+	+	+	+
MA-129	-	-	-	+	+	+	+
MA-131	-	-	-	+	+	+	+
MA-135	-	+	+	+	+	+	+
PE-2	-	+	+	+	+	+	+
CAT-1	-	-	-	+	+	+	+
SA-1	-	-	-	+	+	+	

(+) crescimento; (-) sem crescimento

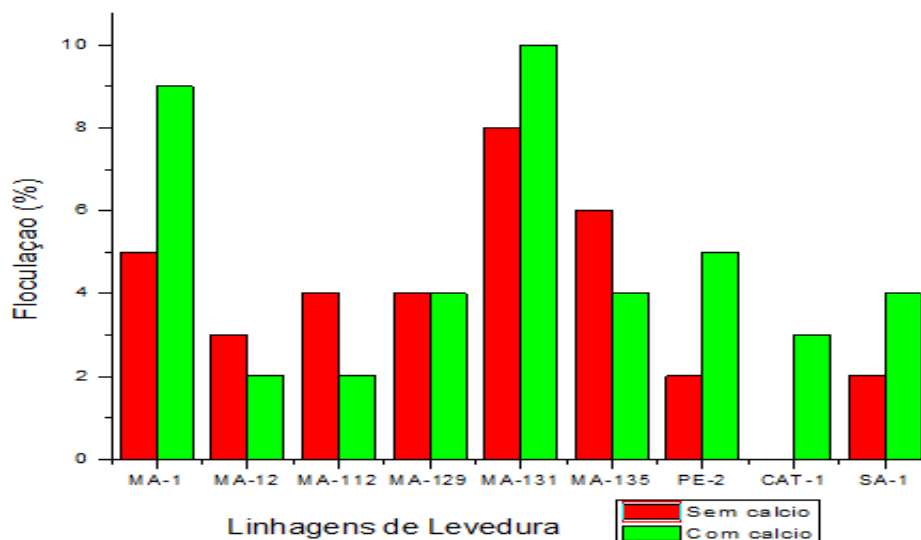


Figura 5. Floculação (%) das leveduras selecionadas na presença e ausência de cálcio.

4.4. Estudo dos efeitos significativos entre temperatura, pH e concentração de etanol na viabilidade celular através da metodologia de superfície de resposta

O método de otimização por análise de superfície de resposta tem como base o método de planejamento fatorial, e consiste em um grupo de técnicas usadas para o estudo empírico das relações entre uma ou mais respostas medidas para um número de variáveis de entrada que possam ser controladas (RIBEIRO, *et al.*, 2000).

Para aplicar o método de análise de superfície de resposta é necessário primeiramente programar ensaios através de um planejamento fatorial. Este método consiste em selecionar um número fixo de níveis para cada uma das variáveis de entrada. Então executam-se experimentos com todas as possíveis combinações (BUTTON, 2001).

Com os resultados obtidos do planejamento é possível calcular os efeitos principais e de interação das variáveis sobre as respostas e determinar quais são os efeitos mais significativos (SMITH, 1998).

Antes de iniciar a etapa de fermentação, foram realizados alguns experimentos com o intuito de avaliar os efeitos significativos entre temperatura, pH e concentração de etanol

na viabilidade celular das leveduras selecionadas e definir a melhor combinação entre esses fatores (condição em que a viabilidade se manteve maximizada) para o ensaio de fermentação.

A partir da análise estatística dos resultados, obteve-se os efeitos de cada variável, os coeficientes de regressão dos modelos lineares (L) e quadráticos (Q), a análise de variância (ANOVA) do modelo e as superfícies de resposta para a viabilidade celular.

Na Tabela 7 estão apresentados os efeitos principais de cada variável e os efeitos de sua interação sobre a viabilidade celular. Observa-se que os três fatores avaliados (temperatura, etanol e pH) exercem efeito significativo ($p \leq 0,05$), na variável resposta estudada, que foi a viabilidade celular. Pode-se perceber que o etanol (E) é o efeito principal das variáveis, que é a média dos efeitos na resposta devido a mudança da variável da faixa de -1 para 0 ou de 0 para +1. Isto significa, por exemplo, que ao passar a concentração de etanol (E) de 5% para 10%, a resposta, no caso a viabilidade, cai em média 34%.

Quando foram avaliadas as interações entre os fatores que mais influenciaram na viabilidade, nota-se que somente as interações dependentes de etanol (etanol+pH e etanol+temperatura) apresentaram efeito significativo (Tabelas 7 e 8).

Como o princípio do planejamento é uma análise multivariável, é possível avaliar o efeito da interação entre as variáveis (RIBEIRO, *et al.*, 2000). Isso significa que ao variar, por exemplo, a concentração de etanol (E) de -1 para 0 ou +1, a mudança na resposta pode não ser a mesma, pois depende da variação da temperatura (T) (Tabela 7).

A importância dos efeitos juntamente com os efeitos de interação podem ser melhor visualizados pelo gráfico de probabilidade normal dos fatores e suas interações na viabilidade celular (Figura 6), que mostra uma estimativa dos efeitos absolutos e das variáveis estatisticamente significativas.

Tabela 7. Coeficientes de regressão dos fatores temperatura (T), pH e concentração de etanol (E) e as respectivas interações na viabilidade celular.

Fator	Coefficiente de regressão	Erro padrão	t	P
Média	41,67	2,25	18,52	0,000000
(1) Temperatura (L)	2,20	5,51	0,39	0,692141
Temperatura (L)	12,68*	4,77	2,65	0,011775
(2) pH (L)	20,15*	5,52	3,65	0,000832
pH (Q)	22,30*	4,77	4,67	0,000043
(3) Etanol (L)	-33,98*	5,51	-6,16	0,000000
Etanol (L)	-3,15	4,77	-0,66	0,513527
1L*3L	-18,15*	6,74	-2,69	0,010860
1L*3Q	14,51*	5,84	2,48	0,017968
2L*3L	-18,65*	6,75	-2,76	0,009058
2L*3Q	-19,32*	5,84	-3,30	0,002191

*Valores significativos (no nível de 95%)

Tabela 8. Análise de variância (ANOVA) dos fatores temperatura (T), pH e concentração de etanol (E) em níveis lineares (L) e quadráticos (Q) e as respectivas interações na viabilidade celular.

Fonte de variação	Soma Quadrado	g.l.	Quadrado Médio	F0	P
Temperatura (L+Q)*	1973,96	2	986,982	3,61154	0,037503
pH (L+Q)*	9626,14	2	4813,072	17,61186	0,000005
Concentração de Etanol (L+Q)*	10516,27	2	5258,136	19,24043	0,000002
T x pH	2228,73	4	557,182	2,03882	0,110224
T x E*	3961,92	4	990,480	3,62434	0,014228
pH x E*	5269,52	4	1317,381	4,82052	0,003334
Erro	9565,00	35	273,286		
Total	43141,55	53			

*Fatores ou interação com efeito significativo ($p < 0,05$)

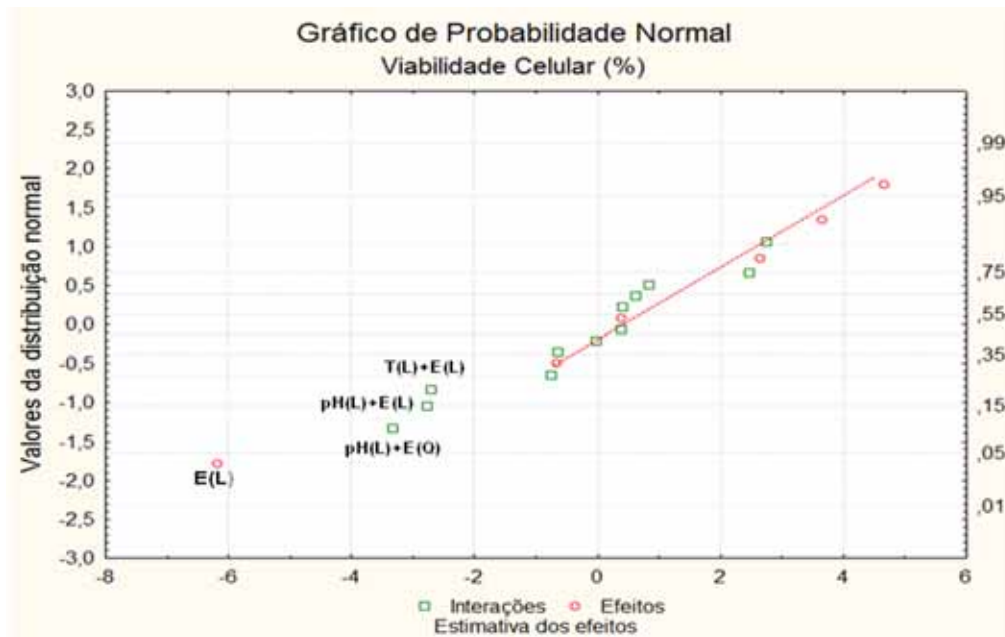


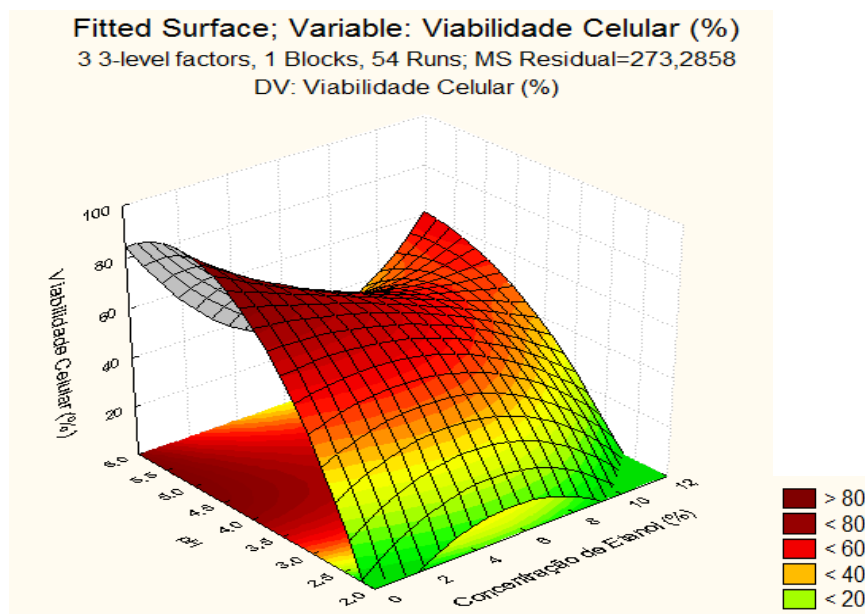
Figura 6. Probabilidade normal dos efeitos dos fatores avaliados e suas interações na viabilidade celular das leveduras avaliadas.

Em seguida, foi possível gerar as superfícies de resposta e as curvas de contorno otimizadas da viabilidade celular da levedura. A Figura 7 apresenta a superfície de resposta e as curvas de contorno para a viabilidade celular em função da concentração de etanol e do pH, com a temperatura ajustada para 32°C (temperatura máxima que a viabilidade se manteve desejável em conjunto com os outros fatores). Esse comportamento mostra que a queda da viabilidade celular está vinculada com o aumento da concentração de etanol e redução do pH do meio de fermentação.

Na Figura 8 é apresentada a mesma interação mas com a temperatura ajustada para 40°C. Esta temperatura, em conjunto com os outros fatores, não mantém a viabilidade alta, mas é importante ressaltar que, como se tratam de linhagens termotolerantes, observa-se que a viabilidade celular só começa a diminuir significativamente (<60%) quando a concentração de etanol está por volta de 8% em pH 4,0.

Já a figura 9 demonstra a interação entre temperatura e concentração de etanol com o pH ajustado para 4,0.

A



B

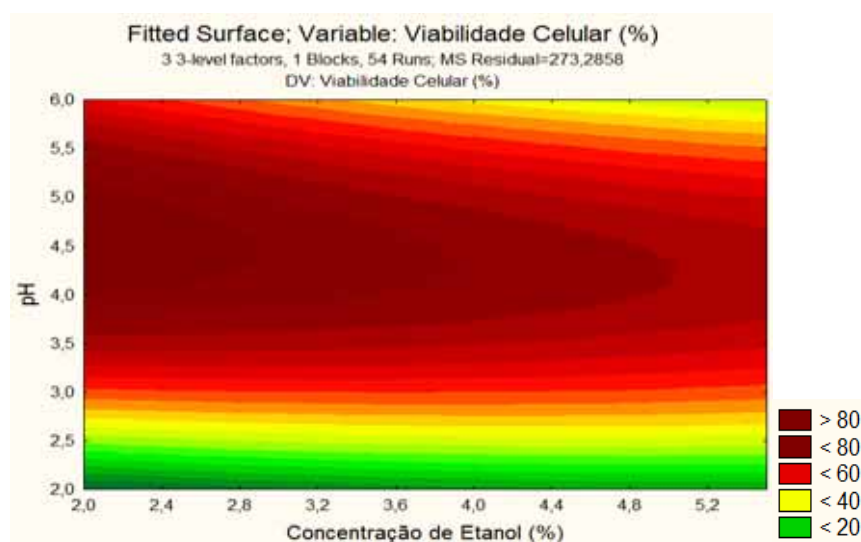
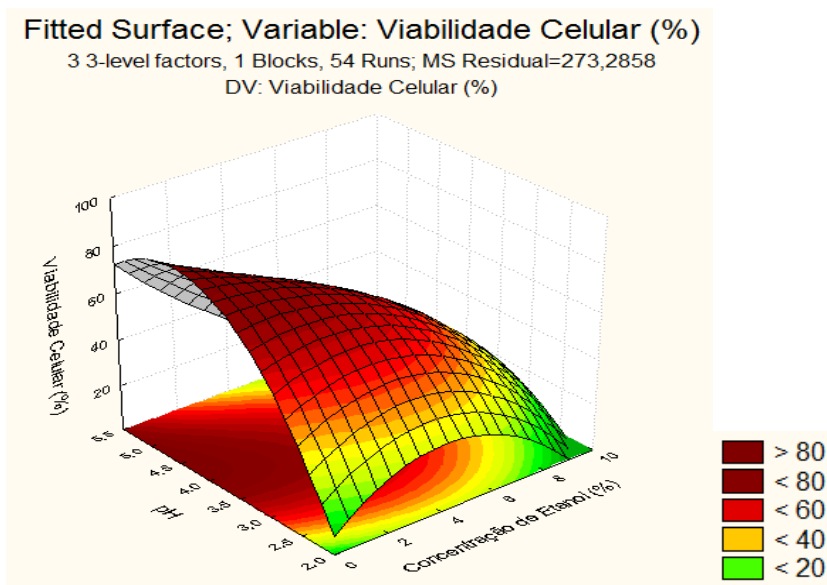


Figura 7. (A) Superfície de resposta ajustada correspondente à viabilidade celular em função da concentração de etanol e pH com a temperatura ajustada em 32,5°C. **(B)** Gráfico de contorno da superfície de resposta em função da concentração de etanol e pH.

A



B

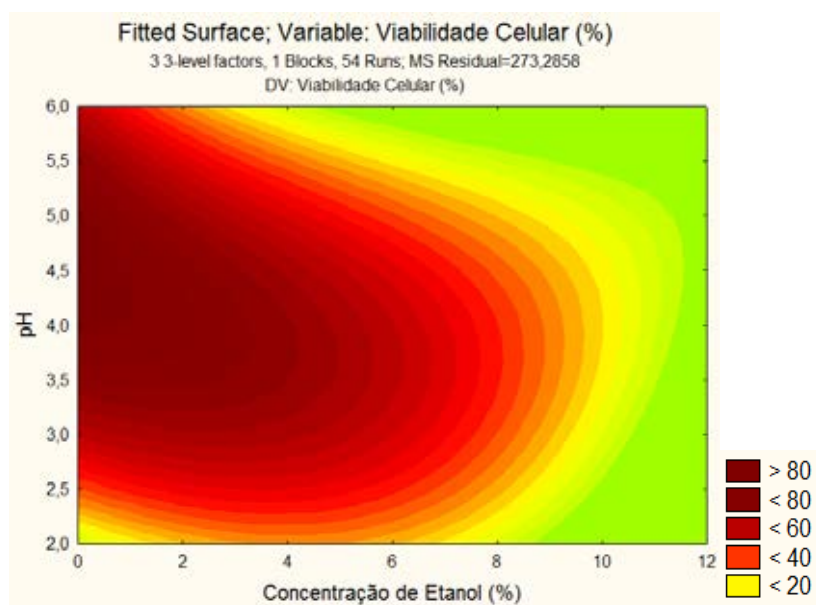
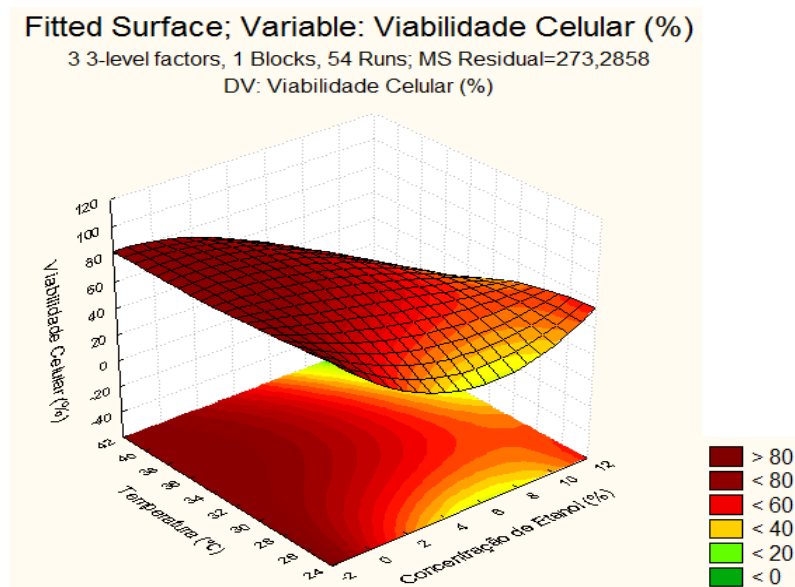


Figura 8. (A) Superfície de resposta ajustada correspondente à viabilidade celular em função da concentração de etanol e pH com a temperatura ajustada em 40°C. **(B)** Gráfico de contorno da superfície de resposta em função da concentração de etanol e pH.

A



B

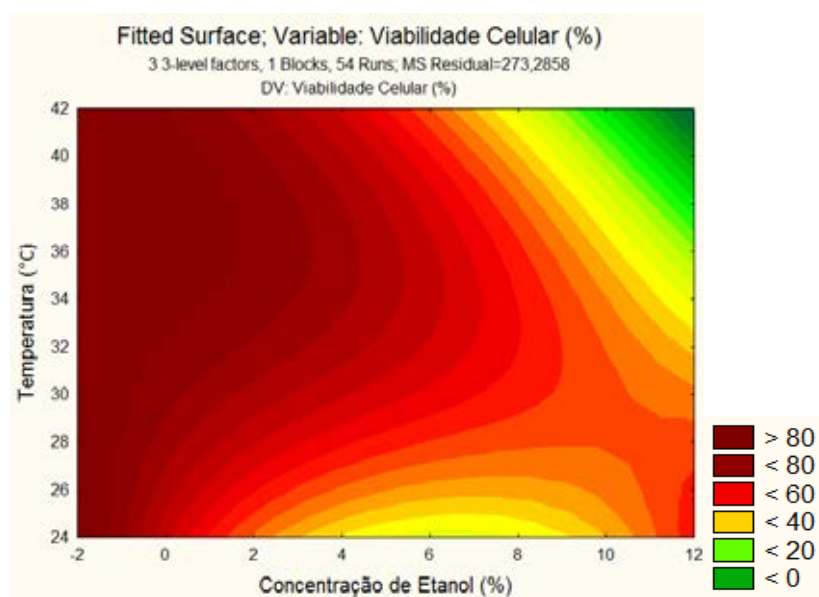


Figura 9. (A) Superfície de resposta correspondentes à viabilidade celular em função da temperatura e concentração de etanol com pH ajustado em 4,0. **(B)** Gráfico de contorno da superfície de resposta em função da temperatura e concentração de etanol com pH ajustado em 4,0.

4.5. Ensaio fermentativo com reciclo de célula e tratamento do fermento

Além das características de resistência ao estresse fermentativo, a eficiência fermentativa da levedura é outra habilidade fundamental exigida de uma levedura industrial para o processo de produção de bioetanol.

O ensaio de fermentação permite avaliar as células de levedura de processos industriais utilizando parâmetros comportamentais e, além de determinar se uma célula é igual a outra, avalia suas características fermentativas evidenciando se elas são fermentativas (adequadas aos processos fermentativos industriais) ou não fermentativas (inadequadas aos processos fermentativos) (ANDRIETTA *et al.*, 1999).

Na fermentação alcoólica, existem dois ciclos distintos que definem o processo de transformação de açúcares solúveis em moléculas menores pela ação da levedura. O primeiro, denominado glicólise, tem a função de “quebrar” a molécula de glicose até ácido pirúvico, através de uma série de reações catalisadas por enzimas específicas, que se situam na parede celular e no interior da célula (AMORIM *et al.*, 2011). Na ausência de oxigênio há uma tendência para a atuação das enzimas piruvato-descarboxilase e álcool-desidrogenase, produzindo etanol e água a partir do ácido pirúvico. Porém, na presença de oxigênio há um deslocamento reacional de parte do ácido pirúvico para o ciclo de Krebs, onde será oxidado enzimaticamente a dióxido de carbono e água (CARVALHO, 1996).

A reação global da glicólise demonstra que 1 mol de glicose (180 g) produz 2 mols de etanol (92 g), 2 mols de dióxido de carbono (88 g) e 57 kcal de energia. Assim, o rendimento teórico ($Y_{P/S}$) para a produção de etanol é de 0,511 g/g (RIBEIRO, 2010). Na prática, no entanto, esse valor não é observado devido a influência de alguns fatores como pH, temperatura, pressão, concentração de nutrientes e etanol no meio, etc., que afetam os parâmetros que definem as taxas de reprodução celular, consumo de substrato e produção de etanol.

Por esse motivo, para compreender a influência de fatores externos como pH, temperatura e inibidores na produção de etanol deve-se quantificar a produção específica de células, consumo de substrato ou substrato residual, formação de produtos, produtividade e demais parâmetros relacionados (CEBALLOS SCHIAVONE, 2009).

A produção específica de células ou biomassa expressa a massa celular produzida por grama de açúcar consumido. Valores superiores ao do padrão indicam um maior desvio de açúcar para a produção de células em detrimento a produção de etanol (ANDRIETTA *et al.*, 1999).

Na fermentação alcoólica é necessário que a levedura cresça apenas para sustentar a alta viabilidade celular durante o reciclo de células. Segundo AMORIM (2005), o excesso de fermento nas dornas das usinas (acima de 15%) pode esgotar os nutrientes mais rapidamente causando exaustão dos elementos essenciais à levedura, decréscimo da viabilidade, aumento do consumo de ácido (durante o tratamento ácido) e redução do rendimento da fermentação. Além disso, operando nessas condições, circula-se uma quantidade maior de células mortas nas centrífugas, que liberam vitaminas, aminoácidos e minerais que servem como fonte de alimento para as bactérias, agravando os problemas causados pela contaminação.

Importante ressaltar também que, a perda de biomassa durante o processo é um indicativo de estresse etanólico para a levedura, pois o etanol interfere no metabolismo e biossíntese de macromoléculas e na estrutura e funções da membrana plasmática, podendo resultar em perda da biomassa (WALKER, 1998). Além disso, segundo DORTA *et al.*, (2006), o efeito sinérgico entre os vários estresses resulta em um aumento na energia de manutenção da levedura sob condições desfavoráveis, o que promoveria um desvio de ATP em detrimento da formação de biomassa (ALVES, 1994).

Para determinação da biomassa, previamente foi estabelecida uma curva padrão que relacionou os valores de absorbância a 570 nm com a concentração (massa seca) das amostras. Inicialmente foi determinada a massa seca das suspensões concentradas de células, para as linhagens de *S. cerevisiae* (20,51 mg/mL) e, a partir desta suspensão concentrada, foram feitas as diluições para a curva padrão.

Em seguida, foi calculado o valor do fator de conversão ($F = 0,84 \text{ mg célula/mL}^{-1}$), que corresponde ao coeficiente angular desta curva. A fórmula geral utilizada para o cálculo foi: $[\text{mg/mL}] = F \times \Delta A \times \text{diluição}$.

A Figura 10 mostra a curva que relaciona as massas secas equivalentes, de cada suspensão diluída, com as absorbâncias. A regressão linear $Y = A + B \cdot X$ mostrou os seguintes parâmetros: $A = 1,179$ com desvio de 0,04139, $B = 0,06053$ com desvio de 0,03941 e o fator de correlação da reta ($R = 0,9902$). O coeficiente angular ($F = 1/A =$

1/1,179) considerado foi o fator de correlação $F = 0,84$ com desvio padrão (SD) de 0,00137.

A Tabela 9 mostra a Biomassa (mg/mL) das culturas puras e mistas de *Saccharomyces cerevisiae* durante os quatro ciclos de fermentação. Observa-se que o tipo de cultura (pura ou mista) não influenciou na produção de biomassa e que, as culturas que apresentaram as maiores médias de biomassa durante os quatro ciclos de fermentação foram, a M8 (PE-2+MA-12+MA-135), a P2 (CAT-1) e a M1 (PE-2+CAT-1+SA-1), respectivamente.

Esperava-se encontrar um valor menor de biomassa no último (quarto) ciclo de fermentação, no entanto, curiosamente o último ciclo foi o que apresentou maior valor entre os quatro ciclos, para todas as culturas. Esse resultado sugere que, no último ciclo, as células de levedura possam estar mais adaptadas ao estresse sofrido pelo processo de fermentação do que nos ciclos iniciais.

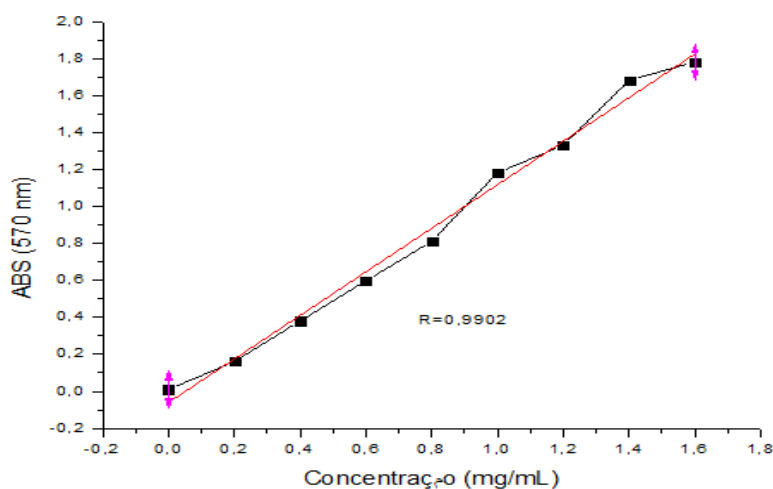


Figura 10. Curva analítica de concentração de Biomassa.

Tabela 9. Biomassa (mg/mL) apresentada pelas fermentações com culturas puras e mistas de *S.cerevisiae* durante os quatro ciclos de fermentação.

Culturas	C1*	C2*	C3*	C4*	Media $\pm$ DP
P1	31,00	31,86	31,65	32,33	31,71 $\pm$ 0,55ef
P2	37,84	35,02	35,15	38,94	36,74 $\pm$ 1,96ab
P3	23,31	24,49	26,77	24,12	24,67 $\pm$ 1,48h
P4	29,11	29,56	29,22	29,98	29,47 $\pm$ 0,39g
P5	34,52	33,63	35,29	35,61	34,76 $\pm$ 0,88bcd
M1**	32,44	36,29	37,19	39,48	36,35 $\pm$ 2,93abc
M2	29,57	31,34	33,21	33,97	32,02 $\pm$ 1,97e
M3	27,13	28,76	30,38	29,54	28,95 $\pm$ 1,38g
M4	35,20	33,99	34,18	36,47	34,96 $\pm$ 1,14abcd
M5	34,98	33,09	33,74	36,62	34,61 $\pm$ 1,55cd
M6	32,80	32,43	33,28	33,12	32,91 $\pm$ 0,38de
M7	27,25	29,64	30,17	31,53	29,65 $\pm$ 1,79fg
M8	36,49	35,15	37,99	38,11	36,94 $\pm$ 1,40a
M9	28,47	28,16	29,32	29,40	28,84 $\pm$ 0,62g
M10	32,19	35,44	35,24	34,04	34,23 $\pm$ 1,49d
Media $\pm$ DP	31,49$\pm$4,02a	31,92$\pm$3,28a	32,85$\pm$3,19a	33,55$\pm$4,21a	

*Após 8 horas de fermentação;**Controle das culturas mistas; P1(PE-2); P2(CAT-1); P3(SA-1); P4(MA-12); P5(MA-135); M1(PE-2+CAT-1+SA-1); M2(PE-2+CAT-1+MA-12); M3(PE-2+ SA-1+MA-12); M4(CAT-1+SA-1+MA-12); M5(PE-2+CAT-1+MA-135); M6(PE-2+SA-1+MA-135); M7(CAT-1+SA-1+MA-135); M8(PE-2+MA-12+MA-135); M9(CAT-1+MA-12+MA-135); M10(SA-1+MA-12+MA-135). As médias seguidas pela mesma letra nas colunas e linhas não diferem estatisticamente entre si pelo Teste ao nível de 5% de probabilidade

A viabilidade celular é outro parâmetro afetado pelo estresse oferecido pela dorna de fermentação. No entanto, de acordo com BASSO *et al.*, (2008), a viabilidade é um parâmetro de extrema significância, visto que é determinante para o sucesso das fermentações com reciclos e, juntamente com o crescimento definem a tolerância de uma linhagem.

TORIJA *et al.*, (2003) estudaram o efeito da temperatura em relação aos parâmetros analíticos de produção de etanol, ácido acético e glicerol e em relação a viabilidade das leveduras, demonstrando que a temperatura afeta não somente a cinética da fermentação, mas também o metabolismo das leveduras. Eles observaram uma curva de crescimento

usual às temperaturas entre 25°C e 30°C, mas à 35°C uma grande quantidade de leveduras já estavam mortas. Concluíram que a alta mortalidade celular pode induzir a uma finalização demorada do processo e produzir “paradas” nas fermentações (*stuck fermentations*), com grandes quantidades de açúcares residuais.

Na fermentação, à medida que a temperatura aumenta a viabilidade celular diminui devido, provavelmente, ao acúmulo de etanol intracelular, o qual altera a estrutura da membrana e diminui sua funcionalidade. Por esse motivo, os quatro ciclos de fermentação em conjunto com o tratamento ácido do fermento entre cada reciclo, levariam a uma queda acentuada da viabilidade da levedura, porém esta se manteve constante e elevada (acima de 80%) durante todos os ciclos de fermentação (Tabela 10), para todas as culturas, ou seja, tanto para as culturas puras quanto para as mistas. Curiosamente a viabilidade das culturas mistas se mantiveram acima de 90%, ou seja, foram maiores quando comparadas as culturas puras (Tabela 10).

Tabela 10. Viabilidade celular (%) apresentada pelas fermentações com culturas puras e mistas de *S.cerevisiae* durante os quatro ciclos de fermentação.

Culturas	C1*	C2*	C3*	C4*	Media $\pm$ DP
P1	84,56	85,21	83,77	87,12	85,17 $\pm$ 1,43 ^c
P2	89,73	89,18	92,95	94,29	91,54 $\pm$ 2,48 ^b
P3	93,45	95,29	91,73	93,38	93,46 $\pm$ 1,45 ^b
P4	96,30	92,46	95,61	95,38	94,94 $\pm$ 1,70 ^a
P5	88,98	84,82	83,17	81,94	84,73 $\pm$ 3,07 ^c
M1**	94,01	94,46	94,15	94,66	94,32 $\pm$ 0,29 ^b
M2	96,49	98,59	98,16	97,03	97,57 $\pm$ 0,97 ^a
M3	98,19	98,73	98,60	97,97	98,37 $\pm$ 0,35 ^a
M4	92,47	93,11	96,91	96,10	94,65 $\pm$ 2,19 ^a
M5	96,92	95,80	96,09	96,30	96,28 $\pm$ 0,47 ^a
M6	96,13	96,78	94,34	96,88	96,03 $\pm$ 1,18 ^a
M7	94,21	95,23	95,96	95,47	95,22 $\pm$ 0,74 ^a
M8	97,28	93,49	95,19	96,26	95,56 $\pm$ 1,62 ^a
M9	92,61	94,38,	94,77	96,02	94,47 $\pm$ 1,73 ^b

M10	91,99	92,63	91,59	92,57	92,20 ± 0,50 ^b
Media ± DP	93,55 ^a	93,27 ^a	93,53 ^a	94,09 ^a	

*Após 8 horas de fermentação; **Controle das culturas mistas; P1(PE-2); P2(CAT-1); P3(SA-1); P4(MA-12); P5(MA-135); M1(PE-2+CAT-1+SA-1); M2(PE-2+CAT-1+MA-12); M3(PE-2+ SA-1+MA-12); M4(CAT-1+SA-1+MA-12); M5(PE-2+CAT-1+MA-135); M6(PE-2+SA-1+MA-135); M7(CAT-1+SA-1+MA-135); M8(PE-2+MA-12+MA-135); M9(CAT-1+MA-12+MA-135); M10(SA-1+MA-12+MA-135). As médias seguidas pela mesma letra nas colunas e linhas não diferem estatisticamente entre si pelo Teste ao nível de 5% de probabilidade

A quantificação dos açúcares redutores totais inicial e final (residual), foi realizada em duplicata e também foi feita em comparação com uma curva padrão (concentração de glicose X absorbância em 540 nm) que apresentou um coeficiente de correlação ($R = 0,9955$) e um desvio de 0,0049 para a seguinte equação de regressão linear: $Y = 0,60977 + 0,02946X$ (Figura 11).

Os limites de detecção e quantificação, estimados a partir das equações descritas no item 3.2.12.4.4, foram respectivamente iguais a $0,0148 \text{ g/L}^{-1}$ e $0,0491 \text{ g/L}^{-1}$.

A Tabela 11 mostra os teores residuais de açúcares redutores totais presentes no mosto de fermentação das culturas puras e mistas, durante os quatro ciclos de fermentação. Os teores de açúcares residuais foram baixos ao longo dos ciclos, diminuindo a cada ciclo de fermentação.

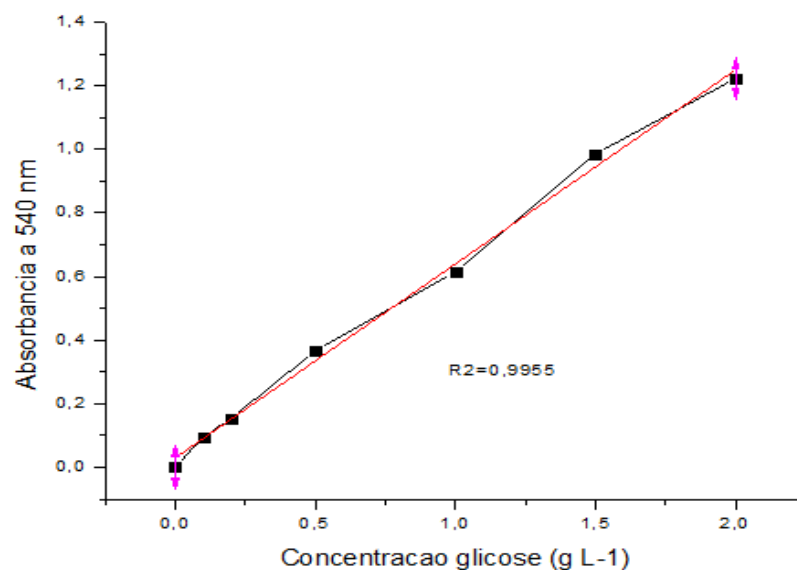


Figura 11. Curva analítica de concentração de Glicose.

Tabela 11. Teor de ART residual (g/100 mL) apresentado pelas fermentações com culturas puras e mistas de *S.cerevisiae* durante os quatro ciclos de fermentação.

Culturas	C1*	C2*	C3*	C4*	Media $\pm$ DP
P1	6,23	3,78	1,90	1,82	3,43 $\pm$ 2,07a
P2	8,40	6,78	3,31	4,75	5,81 $\pm$ 2,24a
P3	5,56	5,20	3,09	3,17	4,26 $\pm$ 1,31a
P4	5,97	4,11	2,92	1,75	3,69 $\pm$ 1,80a
P5	6,12	4,83	3,10	2,34	4,10 $\pm$ 1,70a
M1**	7,56	4,85	3,89	2,14	4,61 $\pm$ 2,26a
M2	7,11	4,05	2,52	2,25	3,98 $\pm$ 2,23a
M3	8,27	4,72	2,99	1,90	4,47 $\pm$ 2,79a
M4	5,49	3,93	3,79	1,14	3,59 $\pm$ 1,80a
M5	7,95	4,31	2,81	2,08	4,29 $\pm$ 2,61a
M6	6,10	4,25	2,77	1,30	3,61 $\pm$ 2,06a
M7	10,44	5,11	3,24	2,41	5,30 $\pm$ 3,61a
M8	5,57	3,96	3,37	1,89	3,70 $\pm$ 1,52a
M9	7,34	4,20	3,29	1,57	4,10 $\pm$ 2,42a
M10	5,68	3,98	3,22	2,47	3,84 $\pm$ 1,37a
Media $\pm$ DP	6,92$\pm$1,42a	4,54$\pm$0,77b	3,08$\pm$0,49c	2,20$\pm$0,86d	

ART: Açúcares Redutores Totais; *Após 8 horas de fermentação; **Controle das culturas mistas; P1(PE-2); P2(CAT-1); P3(SA-1); P4(MA-12); P5(MA-135); M1(PE-2+CAT-1+SA-1); M2(PE-2+CAT-1+MA-12); M3(PE-2+ SA-1+MA-12); M4(CAT-1+SA-1+MA-12); M5(PE-2+CAT-1+MA-135); M6(PE-2+SA-1+MA-135); M7(CAT-1+SA-1+MA-135); M8(PE-2+MA-12+MA-135); M9(CAT-1+MA-12+MA-135); M10(SA-1+MA-12+MA-135). As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo Teste ao nível de 5% de probabilidade.

Antes da realização da dosagem de álcool nas amostras da fermentação, foi realizada uma adaptação da metodologia padrão utilizada anteriormente no Laboratório de Biotecnologia de Alimentos da Unesp. Essa adaptação consistiu em substituir a enzima álcool desidrogenase proveniente de fermento de panificação pela álcool desidrogenase de *Saccharomyces cerevisiae* comercial - ADH (Sigma A7011).

Para isso, foram determinados o tempo de formação do NADH em função do tempo com esta enzima, atividade enzimática (U/mL) e uma curva analítica com diferentes concentrações de etanol em função da absorbância (Figura 12 A e B).

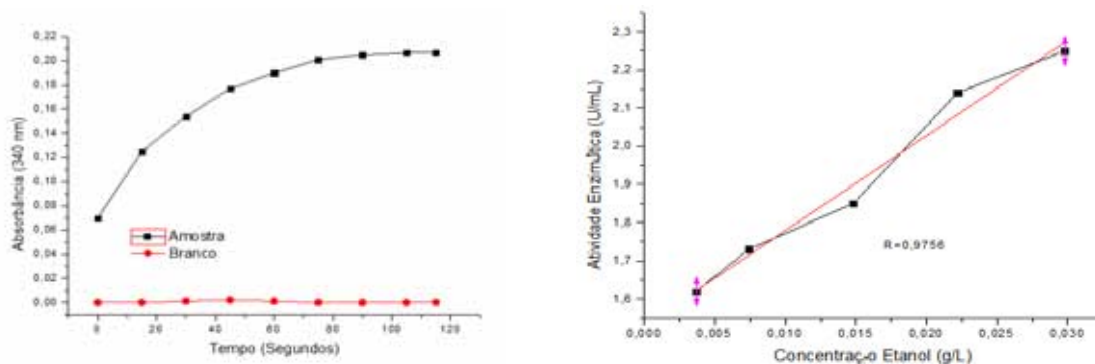
Os limites de detecção e quantificação, estimados a partir das equações descritas no item 3.2.6.5, foram respectivamente iguais a 0,02312 uM e 0,0584 uM.

Em seguida, foi realizada a dosagem de álcool nas amostras provenientes da fermentação, o que pode ser visto na Tabela 12. Observa-se que os teores alcoólicos aumentaram no transcorrer dos ciclos para todas as culturas avaliadas, chegando a duplicar em algumas culturas. As culturas mistas M2 (PE-2+CAT-1+MA-12) e M9 (CAT-1+MA-12+MA-135) foram as que apresentaram os maiores teores médios de etanol entre todas as culturas avaliadas. Importante destacar que essas culturas produziram baixos teores de biomassa. A biomassa e o etanol são gerados em rotas metabólicas distintas, portanto se mais açúcar é desviado para a produção de etanol, menos biomassa será formada.

Observando somente as culturas puras, nota-se que a P1 (PE-2) a P2 (CAT-1) e a P4 (MA-12) destacaram-se por produzirem maior teor de etanol e as culturas P2 (CAT-1) e P4 (MA-12) produziram quantidades superiores às da PE-2. Isso é um fator extremamente positivo, pois a linhagem PE-2 é conhecida pelo seu alto rendimento em etanol (BASSO *et al.*, 2008), e portanto linhagens com eficiência próximas da mesma, seriam linhagens com atributos desejáveis neste parâmetro.

Já para as culturas mistas, nota-se que o teor de etanol produzido por todas as culturas mistas, com exceção da M5 (PE-2+CAT-1+MA-135), foram superiores ao valor encontrado pela cultura M1 (PE-2+CAT-1+SA-1) utilizada como controle.

A



B

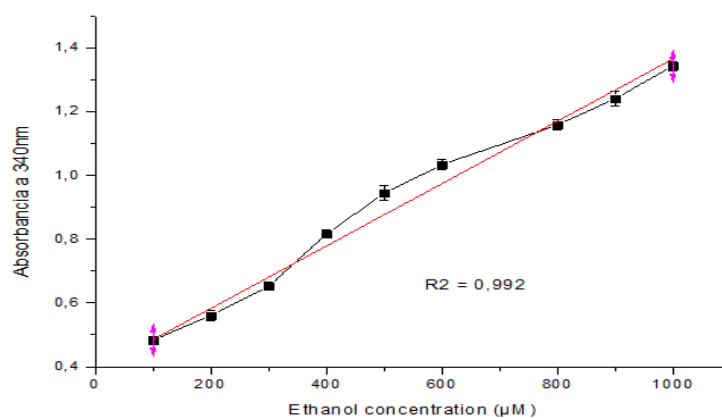


Figura 12. (A) Variação da velocidade de formação de NADH em função do tempo de reação da amostra em comparação ao branco e Atividade (U/mL) da enzima álcool desidrogenase em diferentes concentrações de etanol (coeficiente de correlação linear $R^2=0,9756$). **(B)** Curva analítica de concentração de Etanol.

Tabela 12. Teor alcoólico % (v/v) apresentado pelas fermentações com culturas puras e mistas de *S.cerevisiae* durante os quatro ciclos de fermentação.

Culturas	C1*	C2*	C3*	C4*	Media $\pm$ DP
P1	2,50	4,92	5,08	6,54	4,76 $\pm$ 1,67a
P2	2,05	4,01	4,63	5,55	4,06 $\pm$ 1,48a
P3	2,55	4,73	5,54	6,26	4,77 $\pm$ 1,61a
P4	3,11	5,16	5,82	7,47	5,39 $\pm$ 1,80a
P5	2,40	4,27	5,25	6,38	4,58 $\pm$ 1,69a
M1*	2,87	3,68	4,49	6,14	4,30 $\pm$ 1,40a
M2	4,43	4,44	7,00	8,87	6,19 $\pm$ 2,16a
M3	3,05	5,48	6,02	8,45	5,75 $\pm$ 2,22a
M4	4,06	6,10	7,04	6,71	5,98 $\pm$ 1,34a
M5	2,33	4,37	3,86	5,60	4,04 $\pm$ 1,35a
M6	4,48	4,67	4,06	4,80	4,50 $\pm$ 0,32a
M7	2,06	5,69	7,38	7,82	5,74 $\pm$ 2,62a
M8	3,47	4,58	5,75	5,85	4,91 $\pm$ 1,12a
M9	3,89	4,46	7,16	8,77	6,07 $\pm$ 2,30a
M10	2,83	6,02	6,74	7,62	5,80 $\pm$ 2,09a
Media $\pm$ DP	3,07 $\pm$ 0,82d	4,84 $\pm$ 0,72c	5,72 $\pm$ 1,16b	6,86 $\pm$ 1,25a	

*Teor de álcool produzido após 8 horas de fermentação; **Controle das culturas mistas; P1(PE-2); P2(CAT-1); P3(SA-1); P4(MA-12); P5(MA-135); M1(PE-2+CAT-1+SA-1); M2(PE-2+CAT-1+MA-12); M3(PE-2+ SA-1+MA-12); M4(CAT-1+SA-1+MA-12); M5(PE-2+CAT-1+MA-135); M6(PE-2+SA-1+MA-135); M7(CAT-1+SA-1+MA-135); M8(PE-2+MA-12+MA-135); M9(CAT-1+MA-12+MA-135); M10(SA-1+MA-12+MA-135). As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo Teste ao nível de 5% de probabilidade.

A Tabela 13 apresenta a eficiência fermentativa (%) das culturas puras e mistas durante os quatro ciclos de fermentação. Todas as culturas avaliadas, com exceção da M6 (PE-2+SA-1+MA-135), apresentaram uma eficiência fermentativa crescente ao longo dos quatro ciclos de fermentação, ou seja, a eficiência foi aumentando gradativamente do primeiro ao quarto ciclo, sendo menor no primeiro e maior no último ciclo.

As culturas que apresentaram maior eficiência fermentativa (%) foram as mistas M2 (PE-2+CAT-1+MA-12) e M7 (CAT-1+SA-1+MA-135). Ressalta-se que as culturas que apresentaram maior eficiência não são necessariamente as que produziram maior quantidade de etanol, pois a eficiência fermentativa é medida através do etanol produzido em relação ao teor de açúcar consumido.

Tabela 13. Eficiência fermentativa (%) das culturas puras e mistas de *Saccharomyces cerevisiae* nos quatro ciclos de fermentação.

Culturas	C1	C2	C3	C4	Media $\pm$ DP
P1	39,46	62,14	55,66	71,21	57,12 $\pm$ 13,39 ^{cd}
P2	41,71	67,07	56,29	76,19	60,32 $\pm$ 14,83 ^{abcd}
P3	37,68	67,59	66,24	75,35	64,63 $\pm$ 16,52 ^{abcd}
P4	47,80	66,99	68,67	80,89	66,09 $\pm$ 13,67 ^{abcd}
P5	37,44	59,04	62,80	72,06	57,84 $\pm$ 14,66 ^b
M1*	52,63	51,07	57,37	68,48	57,39 $\pm$ 7,86 ^{bcd}
M2	77,05	57,48	80,28	99,63	78,61 $\pm$ 17,26 ^a
M3	61,01	75,12	71,45	92,57	75,04 $\pm$ 13,13 ^{abc}
M4	59,77	78,15	89,11	69,80	74,21 $\pm$ 12,46 ^{abc}
M5	44,73	57,75	45,25	62,14	52,47 $\pm$ 8,82 ^d
M6	69,98	61,46	47,48	50,45	57,34 $\pm$ 10,35 ^{bcd}
M7	57,37	80,69	89,41	88,85	79,08 $\pm$ 15,01 ^a
M8	51,41	58,84	70,34	64,08	61,17 $\pm$ 8,03 ^{abcd}
M9	69,37	58,38	86,99	93,85	77,15 $\pm$ 16,21 ^{ab}
M10	42,48	77,33	81,46	87,07	72,09 $\pm$ 20,14 ^{abcd}
	52,66 $\pm$ 12,70				
Media $\pm$ DP	c	65,27 $\pm$ 8,98 ^b	68,59 $\pm$ 14,59 ^{ab}	76,84 $\pm$ 13,56 ^a	

*Controle das culturas mistas; P1(PE-2); P2(CAT-1); P3(SA-1); P4(MA-12); P5(MA-135); M1(PE-2+CAT-1+SA-1); M2(PE-2+CAT-1+MA-12); M3(PE-2+ SA-1+MA-12); M4(CAT-1+SA-1+MA-12); M5(PE-2+CAT-1+MA-135); M6(PE-2+SA-1+MA-135); M7(CAT-1+SA-1+MA-135); M8(PE-2+MA-12+MA-135); M9(CAT-1+MA-12+MA-135); M10(SA-1+MA-12+MA-135).As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo Teste ao nível de 5% de probabilidade.

4.6. Análise da expressão gênica quantitativa por PCR em tempo real.

Diante dos resultados deste trabalho, que apontaram o etanol como o principal efeito inibidor da viabilidade celular, este ensaio foi proposto e realizado para estudar a expressão de genes relacionados diretamente com a tolerância ao etanol nos segregantes termo e álcool resistente (MA-12) e não resistente (MA-139), que foi selecionada por ser excluída

logo no início do experimento, por apresentar crescimento máximo até 35°C. Segundo BARBOSA (2008), estudos com caracterização fenotípica e genotípica e expressão gênica são uma ferramenta importante na determinação da função de genes no modelo *S. cerevisiae*.

Os genes escolhidos para este ensaio, com exceção do HSP12, foram identificados e relacionados em estudos recentes utilizando linhagens industriais, com uma maior tolerância ao etanol (SWINNEN *et al.*, 2012; TEIXEIRA *et al.*, 2009; ALEXANDRE *et al.*, 2001).

SWINNEN *et al.*, (2012), investigaram, através da análise de sequenciamento do genoma, segregantes com alta tolerância ao etanol (16% e 17%) e identificaram três genes estreitamente relacionados com esta característica: MKT1, SWS2 e APJ1, com SWS2 sendo um alelo negativo localizado entre dois alelos positivos.

O gene MKT1 parece estar relacionado aos diversos aspectos da função celular sob condições estressantes. Alguns estudos identificaram MKT1 como um gene de características quantitativas responsável pela determinação do crescimento da levedura em alta temperatura (STEINMETZ, *et al.*, 2002; SINHA, *et al.*, 2006), a eficiência na esporulação (DEUTSCHBAUER & DAVIS, 2005) e de resistência a drogas (DEMOGINES, *et al.*, 2008; KIM & FAY, 2009; EHRENREICH, *et al.*, 2010). Em todos os estudos acima, o mapeamento foi realizado na linhagem laboratorial S288c. O efeito pleiotrópico de MKT1 na função celular pode provavelmente ser atribuído ao seu papel regulador estabelecido recentemente na expressão gênica global (ZHU, *et al.*, 2008).

TADAUCHI *et al.* (2004) investigaram a regulação da expressão de HO e sugeriu que MKT1 pode controlar a expressão pós-transcricional do gene. Sugeriu também que MKT1 é recrutado para os polissomos através da atividade de PBP1. Como MKT1 interage fisicamente com PBP1, foi investigado se PBP1 é um gene de características quantitativas para a determinação da alta tolerância ao etanol (TADAUCHI *et al.*, 2004).

Já o gene SWS2 foi previamente associado com a tolerância ao etanol em dois estudos onde foram selecionados mutantes sensíveis ao etanol (deleção do SWS2). Um estudo investigou o crescimento das cepas com a deleção do gene em placas contendo 8% de etanol (TEIXEIRA *et al.*, 2009), e o outro determinou a taxa de crescimento específico das cepas, também com deleção do gene, em meio líquido contendo 8% de etanol (v/v)

(YOSHIKAWA, *et al.*, 2009). O gene SWS2 codifica uma proteína ribossomal mitocondrial que é essencial para o crescimento celular (MERZ & WESTERMANN, 2009).

Em relação ao gene APJ1, (ALEXANDRE, *et al.*, 2001) encontrou uma expressão aumentada em pelo menos três vezes em estudo que investigou a resposta da transcrição de S288C a um choque de etanol a curto prazo (7% de etanol, durante 30 min). No entanto, a relevância deste gene para a tolerância ao etanol não foi investigada. APJ1 codifica uma proteína de chaperona da família Hsp40 que é conhecida por estimular a atividade de membros da família Hsp70 (QIU, *et al.*, 2006). Como SWS2, APJ1 está localizada na mitocôndria e seu efeito pode ter a ver com a exigência de respiração mitocondrial eficiente durante o crescimento com altos níveis de etanol como única fonte de carbono.

TEIXEIRA, *et al.* (2009), também encontrou, em estudo realizado, a participação de FPS1 na redução da concentração intracelular de etanol em células de levedura, ou seja, a medida em que a expressão de FPS1 aumenta, aumenta a capacidade da levedura para conseguir se manter a elevadas concentrações finais de etanol durante a fermentação alcoólica. O FPS1 é um gene que codifica a membrana plasmática aquaglicerolporina (facilita o transporte trans membrana de moléculas pequenas não carregadas, como polióis e uréia) e facilita a difusão de compostos tóxicos em toda a membrana plasmática da levedura, incluindo o arsenito e Antimonite (51), ácido acético (28), e de boro (30).

Outro gene selecionado para esta etapa foi o HSP12, uma proteína de choque térmico, relacionada ao estresse em levedura. Alguns estudos evidenciaram a expressão do gene HSP12 como sendo um indicador problemas com resistência ao estresse em linhagens de leveduras (RISI, *et al.*, 1997; VELCULESCU, *et al.*, 1997).

Assim, considerando a existência dessa correlação, neste trabalho foi realizada também a verificação dos níveis de expressão do gene HSP12 nas células submetidas ao estresse por etanol e ao estresse por etanol, pH e temperatura, na tentativa de investigar se o HSP12 pode ser utilizado como um marcador molecular de estresse na levedura.

Antes de iniciar os ensaios de PCR em tempo real com as amostras de cDNA a partir das linhagens selecionadas, foi necessário determinar as concentrações ideais dos oligonucleotídeos, assim como sua especificidade em amplificar apenas o fragmento de interesse. Além disso, também foi necessário determinar a eficiência de amplificação de cada fragmento.

Para isso, foram realizadas reações de amplificação com os pares de oligonucleotídeos para cada gene alvo e do controle endógeno. Em seguida, foram geradas curvas de dissociação dos fragmentos amplificados dos genes APJ1, FPS1, MKT1, SWS2, HSP12, ACT1, GCN4 e PGK1 e foi observado apenas um pico de dissociação para cada par de oligonucleotídeo dos genes analisados. Para esses pares de oligonucleotídeos dos genes que comprovam que apenas um fragmento está sendo amplificado, independentemente da concentração de oligonucleotídeo, foram estabelecidas as concentrações ideais dos pares de oligonucleotídeos (Tabela 14).

Para determinação da eficiência de amplificação dos oligonucleotídeos, foi utilizada uma curva de concentração de amostras contendo diferentes concentrações de cDNA. A partir dos valores de “slope” das curvas de concentração, foi possível calcular as eficiências de cada par de oligonucleotídeos (Tabela 14).

Após a etapa de padronização da técnica de PCR em tempo real, foi dado início à análise da expressão diferencial dos genes selecionados. Como o gene PGK1 apresentou melhor eficiência de amplificação comparada com os outros endógenos (ACT1 e GCN4), esse gene foi escolhido para os cálculos da expressão relativa. As amostras foram testadas em triplicata com controles negativos. A diferença dos níveis de cada gene analisado foi calculada utilizando o método de Pfaffl (PFAFFL, 2001). O *cut-off* para validar a diferença de expressão de cada gene nas amostras submetidas ao estresse em relação à controle (sem estresse) foi de ≥ 2.0 fold change, para expressão aumentada e ≤ 0.5 para expressão reduzida (CALMON *et al.*, 2009).

A Figura 12 mostra as análises de expressão dos RNAm utilizando cDNA das linhagens MA-12 e MA-139 respectivamente para os genes APJ1 (Painel A), FPS1 (Painel B), MKT1 (Painel C), SWS2 (Painel D) e HSP12 (Painel E). Como pode ser visto nesta figura, foi possível detectar um aumento significativo do nível de expressão de todos os genes avaliados na linhagem resistente (MA-12). Além disso, para a linhagem não resistente (MA-139), foi possível observar uma pequena variação da expressão dos genes analisados, porém, com exceção do gene APJ1, em nenhum deles essa expressão foi significativa, ou seja, com valor superior ao *cut-off* ≥ 2.0 .

Observando-se a expressão dos genes avaliados na linhagem resistente, observa-se que esta foi superior no estresse geral (Etanol+Temperatura+pH) para todos os genes avaliados, com exceção do MKT1, que apresentou expressão aumentada para as duas

situações de estresse, mas esta foi maior no estresse por etanol. Esperava-se encontrar uma expressão superior no estresse por etanol, pelo fato de serem genes descritos e relacionados, em trabalhos anteriores, com a resistência ao etanol. Por esse motivo, esses resultados sugerem que os genes avaliados estão diretamente relacionados à resistência ao estresse de forma geral sofrido pela levedura industrial na dorna de fermentação.

Tabela 14. Concentração otimizada e eficiência de amplificação dos oligonucleotídeos utilizados para amplificação por q-PCR em tempo real dos genes alvos e controles endógenos.

Gene	Concentração otimizada (μM)	Eficiência de amplificação (%)	R2
APJ1	0,50	97	0,99
FPS1	0,50	102	0,99
MKT1	0,70	98	0,99
SWS2	0,40	94	0,99
HSP12	0,40	93	1,00
ACT1	0,25	95	0,99
GCN4	0,25	91	0,99
PGK1	0,25	91	0,99

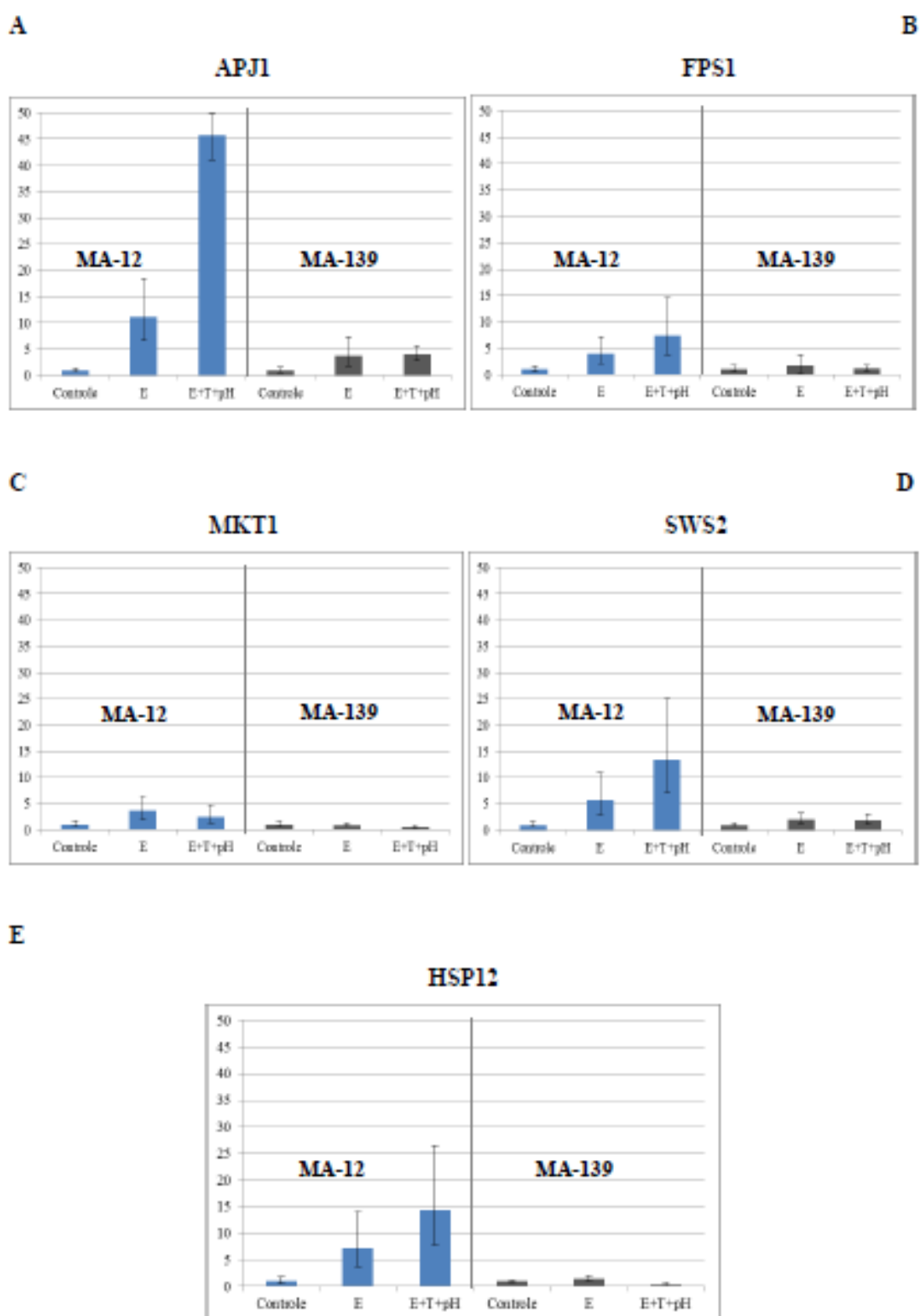


Figura 13. Análise da expressão relativa dos níveis de RNA mensageiro dos genes APJ1, FPS1, MKT1, SWS2 e HSP12 em linhagens industriais de *S. cerevisiae*.

5. CONCLUSÕES

- O ensaio de identificação das leveduras através da técnica de PCR com *primers* específicos do gene HO sugeriu que tanto a levedura isolada na usina brasileira de produção de etanol quanto às linhagens PE-2, CAT-1 e SA-1 são leveduras do gênero *Saccharomyces cerevisiae*. Além disso, é uma técnica rápida e relativamente fácil para esse tipo de identificação;
- Nos testes de resistência ao estresse por temperatura, pH e etanol, duas das células geradas a partir da linhagem isolada, apresentaram maior resistência às concentrações de etanol e elevadas temperaturas quando comparadas aos controles industriais; Em relação à floculação, todas as leveduras analisadas apresentaram pouca ou nenhuma floculação (< 20%) tanto na ausência quanto presença de cálcio; Já em relação ao estudo dos efeitos significativos entre temperatura, pH e concentração de etanol na viabilidade celular através da metodologia de superfície de resposta mostrou que a interação entre os fatores citados acima interferiram de forma significativa na viabilidade celular; Além disso, o fator que mais influenciou na redução da viabilidade celular foi o etanol;
- O ensaio de fermentação com reciclo de célula não resultou em prejuízo na eficiência fermentativa, muito pelo contrário, pois pode-se constatar que a eficiência fermentativa foi maior no último ciclo de fermentação. Além disso, esses resultados nos permite sugerir que os segregantes obtidos a partir da levedura isolada, possuem boa capacidade fermentativa;
- Os dados obtidos no ensaio de q-PCR mostraram um aumento significativo do nível de expressão de todos os genes avaliados na linhagem resistente (MA-12). Para a linhagem não resistente (MA-139), foi possível observar uma pequena variação da expressão dos genes analisados, porém, com exceção do gene APJ1, em nenhum deles essa expressão foi significativa, ou seja, com valor superior ao cut-off ≥ 2.0 . Esses dados sugerem que os genes avaliados neste trabalho (APJ1, FPS1, MKT1, SWS2 e HSP12) estão diretamente relacionados com o estresse sofrido pela linhagem industrial de *Saccharomyces cerevisiae* na dorna de fermentação; Em relação ao gene HSP12, os dados sugerem que ele pode ser

utilizado como um marcador molecular de estresse em linhagens de levedura industriais, uma vez que apresentou expressão significativa nas duas situações de estresse, sendo maior na situação de estresse geral (Etanol+Temperatura+pH).

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALEXANDRE, V.H. ANSANAY-GALEOTE, S. DEQUIN, B.B. Global gene expression during short-term ethanol stress in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEBS Letters**, v. 498, p. 98-103, 2001.
- ALVES, D.M.G. **Fatores que afetam a formação de ácidos orgânicos, bem como outros parâmetros de fermentação alcoólica**. 1994. 251 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1994.
- AMBERG, D., *et al.* **Methods in Yeast Genetics: A Cold Spring Harbor Laboratory Course Manual**, 2005 Edition (Cold Spring).
- AMORIM, H.V.; BASSO, L.C.; ALVES, D.M.G. **Processos de produção de álcool**. Piracicaba, Centro de Biotecnologia Agrícola, 1996. 103p.
- AMORIM, H.V. **Fermentação alcoólica: ciência e tecnologia**. São Paulo: Fermentec, 2005, 448 p.
- AMORIM, H.V.; LOPES, M.L.; OLIVEIRA, J.V.C.; BUCKERIDGE, M.S.; GOLDMAN, G.H. Scientific challenges of bioethanol production in Brazil. **Applied Microbiology Biotechnology**, Oxford, v. 91, p. 1267-1275, 2011.
- ANDRIETTA, M.G.S.; ANDRIETTA, S.R.; STECKELBERG, C.; STUPIELLO, E.N.A. Bioethanol – 30 years of Proálcool. **International Sugar Journal**, Campinas, v.109, n.1299, p.195-200, 2007.
- ANDRIETTA, S.R.; MIGLIARI, P.C.; ANDRIETTA, M.G.S. Classificação de cepas de levedura de processos industriais de fermentação alcoólica utilizando capacidade fermentativa. **STAB – Açúcar e Álcool e Subprodutos**, v. 17, n. 5, p. 54-59, 1999.
- ARGUESO, J.L. *et al.* Genome structure of a *Saccharomyces cerevisiae* strain widely used in bioethanol production. **Genome Research**, Cold Spring Harbor, v. 19, p. 2271-2278, 2009.
- ATTFIELD, P.V. Stress tolerance: the key to effective strains of industrial baker's yeast. **Nature Biotechnology**, New Iork, v. 15, p. 1351-1357, 1997.

- AUSUBEL, F. M.; BRENT, R.; KINGSTON, R. E.; MOORE, D. D.; SEIDMAN, J. G.; SMITH, A. J.; STRUHL, K. (1998). **Current Protocols in Molecular Biology**. New York - USA, John Wiley & Sons Inc.
- BAI, F.W.; ANDERSON, W.A.; MOO-YOUNG, M. Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks. **Biotechn. Adv.**, p.26, p.89-105, 2008.
- BASÍLIO, A.C.; DE ARAÚJO, P.R.; DE MORAES, J.O.; DA SILVA FILHO, E.A.; MORAES, J.M.A.; SIMÕES, D.A. Detection and identification of wild yeast contaminants of the industrial fuel ethanol fermentation process. **Curr Microbiol. Apr**, v.56, n.4, p.322-6, 2008.
- BASSO, L.C.; ALVES, D.M.G.; AMORIN, H.V. Fermentação alcoólica e alguns fatores que afetam o desempenho fermentativo. In: AMORIN, H.V. (Ed.). **Processo de produção de álcool: controle e monitoramento**. 2 ed. Piracicaba: FERMENTEC/FEALQ/ESALQ-USP, cap. 4, p. 38-85, 1996.
- BASSO, L.C.; DE AMORIM, H.V.; DE OLIVEIRA, A.J.; LOPES, M.L. "Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil." **FEMS Yeast Res**, v.8, n.7, p.1155-63, 2008.
- BASSO, L.C.; BASSO, T.O; ROCHA, S.N. Ethanol production in Brazil: the industrial process and its impact on yeast fermentation. In: DOS SANTOS BERNARDES, M.A. (E.D.). Biofuel production – recent developments and prospects. Croatia: **INTECH**, cap. 5, p. 85-100, 2011.
- BORNEMAN, A.R.; FORGAN, A.H.; PRETORIUS, I.S.; CHAMBERS, P.J. "Comparative genome analysis of a *Saccharomyces cerevisiae* wine strain." **FEMS Yeast Res**, v.8, n.7, p.1185-95, 2008.
- BRANDUARDI, P.; SMERALDI, C.; PORRO, D. "Metabolically engineered yeasts: 'potential' industrial applications." **J Mol Microbiol Biotechnol**, v.15, p.31-40, 2008.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA. **Anuário estatístico da agroenergia**. Brasília: Mapa/ACS, 160 p. 2009.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Anuário estatístico de agroenergia**. Brasília: Mapa/ACS, 175 p. 2011.
- BRITES, A.S.M. **Seleção de linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* potencializadas pelo fator killer, H₂S e o caráter floculante**. Piracicaba, 2003. (Dissertação –

- Mestrado) – Escola superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.
- BROSNAN, M.P.; DONNELLY, D.; JAMES, T.C.; BOND, U. The stress response is repressed during fermentation in brewery strains of yeast. **Journal of Applied Microbiology**, v.88, p.746-755, 2000.
- BUTTON, S.T. (2001). **Metodologia para planejamento experimental e análise de resultado**. São Paulo, Universidade Estadual de Campinas. /Apostila/
- CARLSEN, H.N.; DEGN, H.; LLOYD, D. Effects of alcohols on the respiration and fermentation of aerated suspensions of baker's yeast. **Journal of General Microbiology**, v. 137, p. 2879-2883, 1991.
- CARRETO, L.; EIRIZ, M.F.; GOMES, A.C.; PEREIRA, P.M.; SCHULLER, D. *et al.* "Comparative genomics of wild type yeast strains unveils important genome diversity." **BMC Genomics**, v.9, p.524, 2008.
- CARVALHO, B.S. **Efeito da temperatura na cinética de morte celular e em fermentação alcoólica contínua com reciclo de células**. 1996. 215 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1996.
- CARVALHO, J.C.M.; SATO, S. Fermentação descontínua alimentada. In: SCHMIDELL, W.; LIMA, U.A.; AQUARONE, W. (Ed.). **Biotecnologia Industrial**: Engenharia Bioquímica. 6. ed. São Paulo: Editora Edgard Blucher, p. 205-218, 2001.
- CEBALLOS SCHIAVONE, C. A. D. M. **Tratamento térmico do caldo de cana-de-açúcar visando a redução de contaminantes bacterianos – Lactobacillus – na produção de etanol e eficiência de tratamento do fermento por etanol**. 2009. 177 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2009.
- CHENG, L.; MOGHRABY, J.; PIPER, P.W. Weak organic acid treatment causes a trehalose accumulation in low-pH cultures of *Saccharomyces cerevisiae*, not displayed by the more preservative-resistant *Zygosaccharomyces bailii*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 170, p. 89-95, 1999.
- COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO – CONAB. Perfil do setor do açúcar e do álcool no Brasil. Brasília: **CONAB**, MAPA, 76 p. 2008.

- DATAR, R.P.; SHENKMAN, R.M.; CATENI, B.G.; HUHNKE, R.L.; LEWIS, R.S., Fermentation of biomass generated producer gas to ethanol. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 86, n. 5. 2004.
- DEMOGINES, A.; SMITH, E.; KRUGLYAK, L.; ALANI, E. Identification and dissection of a complex DNA repair sensitivity phenotype in baker's yeast. **PloS Genet** 4: e1000123. doi: 10.1371/journal.pgen.1000123. 2008.
- DEUTSCHBAUER, A.M.; DAVIS, R.W. Quantitative trait loci mapped to singlenucleotide resolution in yeast. **Nat Genet**, 37:1333–1340. 2005.
- DORTA, C.; OLIVA-NETO, P.; DE-ABREU-NETO, M.S.; NICOLAU-JUNIOR, N.; NAGASHIMA, A.I. Synergism among lactic acid, sulfite, pH and ethanol in alcoholic fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* (PE-2 and M-26). **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Oxford, v. 22, p. 177-182, 2006.
- EDDY, A.A.; RUDIN, A.D. Part of the yeast surface apparently involved in flocculation. **J. Inst. Brew.** (64): 19-21, 1958.
- EHRENREICH, I.M.; TORABI, N.; JIA, Y.; KENT, J.; MARTIS, S.; SHAPIRO, J.A.; GRESHAM, D.; CAUDY, A.A.; KRUGLYAK, L. Dissection of genetically complex traits with extremely large pools of yeast segregants. **Nature**, 464:1039–1042. 2010.
- ESTRUCH, F. Stress-controlled transcription factor, stress-induced genes and stress tolerance in budding yeast. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 24, p. 469-486, 2000.
- FIGLIOLINO, A. Visão e tendências do setor de Açúcar e Alcool no Brasil. **Anula Canaplan**. Ribeirão Preto, SP: 2010.
- FINGUERUT, J. **Simultaneous production of sugar and alcohol from sugarcane**. In: International Society Of Sugar Cane Technologists (ISSCT) CONGRESS, 25., Guatemala City, Guatemala, 2007.
- GASCH, A.P. *et al.* Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. **Mol. Biol. Cell**. v. 11, p. 4241-4257, 2000.
- GATTÁS, E.A.L.; TININIS, C.R.C.S.; LALUCE, C. Kit econômico de aplicação na rotina industrial para os ensaios de glicerol, malato e etanol. BR n. PI 0205552, 2002.
- GLOVER, J.R.; LINDQUIST, S. Hsp104, Hsp70 and Hsp40: A novel chaperone system that rescues previously aggregated proteins. **Cells**, v. 94, n. 1, p. 73-82, 1998.

- GOLDEMBERG, J. "The Brazilian biofuels industry." **Biotechnol Biofuels**, v.1, n.1, p.6, 2008.
- GOLDEMBERG, J.; NIGRO, F. E. B.; COELHO, S. T. Bioenergia no Estado de São Paulo: situação atual, perspectivas, barreiras e propostas. São Paulo, **Imprensa Oficial do Estado de São Paulo**, 2008.
- GRAVES, T.; NARENDRANATH, N.V.; DAWSON, K.; POWER, R. Effect of pH and lactic or acetic acid on ethanol productivity by *Saccharomyces cerevisiae* in corn mash. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, Hampshire, v. 33, n. 6, p. 469-474, 2006.
- GURTOVENKO, A. A. & ANWAR, J. "Interactions of ethanol with biological membranes: the formation of non-bilayer structures within the membrane interior and their significance", **J. Phys. Chem. B.**, 113: 1983-1992, 2009.
- GUTHRIE, C.; FINK, G. **Methods Enzymol**, 194:281–301,373–389. 1991.
- HERBERT, A.P. *et al.* NMR structure of Hsp12, a protein induced by and required for dietary restriction-induced lifespan extension in yeast. **Plos. One**, v. 7, n. 7, e41975, 2012.
- HERNANDEZ-CORTES, G.; CORDOVA-LOPEZ, J.A.; HERRERA-LOPEZ, E.J.; MORAN-MARROQUIN, G.A.; VALLE-RODRIGUEZ, J.O.; DIAZ-MONTANO, D.M. Effect of pH, aeration and feeding non sterilized agave juice in a continuous agave juice fermentation. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 90, n. 9, p. 1423-1428, 2010.
- INGRAM, L.O. & BUTTKE, T.M. "Effects of alcohols on microorganisms", **Adv. Microb. Physiol.**, 25: 253-300, 1984.
- INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA. Normalização e qualidade: orientações sobre validação de métodos analíticos. Fev 2003.
- IVORRA, C.; PEREZ-ORTIN, J.E.; DEL-OLMO, M. An Inverse Correlation between Stress Resistance and Stuck Fermentations in Wine Yeasts. A Molecular Study. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 64, n. 6, 1999.
- KIANG, J.G. AND TSOKOS, G.C. Heat shock protein 70 kDa: molecular biology, biochemistry, and physiology. **Pharmacology Therapeutics**, v. 80, n. 2, p. 183-201, 1998.

- KIM, H.S.; FAY, J.C. A combined-cross analysis reveals genes with drug-specific and background-dependent effects on drug sensitivity in *Saccharomyces cerevisiae*. **Genetics**, 183:1141–1151. 2009.
- KODAMA, T.; HISATOMI, T.; UCHIDA, K.; YAMAKI, T.; TSUBOI, M. Isolation and characterization of HO gene from the yeast *Saccharomyces paradoxus*. **FEMS Yeast Res**, 4, 51–57, 2003.
- KURTZMAN, C.P. & FELL, J.W. **The yeast: a taxonomic study**, 4th edn. Amsterdam: Elsevier, 1998.
- LALUCE, C.; PALMIERI, M.C.; CRUZ, R.C.L. Growth and fermentation characteristics of new selected strains of *Saccharomyces* at high temperatures and high cell densities. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 37, p. 528-536, 1991.
- LANE, J.H.; EYNON, L. **Determination of reducing sugars by fehling solution with methylene blue indicator**. London: N. Rodger, 1934. 8 p.
- LEAL, M.R.L.V.; MACEDO, I.C. Evolução tecnológica dos sistemas de geração de energia nas usinas de açúcar e álcool. **Biomassa & Energia**, v. 1, n. 3, p. 245-253. 2004.
- LIMA, A.O.S.; QUECINE, M.C.; FUNGARO, M.H.P.; ANDREOTE, F.D.; MACHERONI JR, W. *et al.* Molecular characterization of a β -1,4-endoglucanase from an endophytic *Bacillus pumilus* strain. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 68: 57-65, 2005.
- LIMA, U.A.; BASSO, L.C.; AMORIM, H.V. **Produção de etanol**. In: SCHMIDELL, W.; LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. (Coord.). *Biotecnologia industrial: processos fermentativos e enzimáticos*, v. 3, capítulo 1, São Paulo: Editora Edgard Blucher, p. 1-40, 2001.
- LINDQUIST, S. Heat shock proteins and stress tolerance in microorganisms. **Curr. Opin. Genet. Dev.**, v. 2, n. 5, p. 748-755, 1992.
- LITI, G.; LOUIS, E.J. Yeast evolution and comparative genomics. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 59, p. 135-153, 2005.
- LIVAK, K.J.; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$. **Methods**. 25(4):402-8, 2001.

- LOUREIRO-DIAS, M.C.; PEINADO, J.M. Effect of ethanol and other alkanols on the maltose transport system of *Saccharomyces cerevisiae*", **Biotechnol. Lett.**, 4: 721-724, 1982.
- MACEDO, ID. Greenhouse gas emissions and energy balances in bio-ethanol production and utilization in Brazil. **Biomass & Bioenergy**. 14:77-81, 1996.
- MACEDO, I.C. Tecnologia para a produção e uso do etanol: desenvolvimento, situação atual e perspectivas. **Estudos Avançados**. v. 21, n. 59, São Paulo, Abril, 2007.
- MACEDO, I.C.; SEABRA, J.E.A.; SILVA, J.E.A.R. Green house gases emissions in the production and use of ethanol from sugarcane in Brazil: The 2005/2006 averages and the prediction for 2020. **Biomass and Bioenergy**. (32)7:582-595. 2008.
- MELO PEREIRA, G.V.; RAMOS, C.L.; GALVÃO, C.; SOUZA DIAS, E.; SCHWAN, R.F. Use of specific PCR primers to identify three important industrial species of *Saccharomyces* genus: *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces bayanus* and *Saccharomyces pastorianus*. **Letters in Applied Microbiology**, v.51, p.131–137, 2010.
- MERZ, S.; WESTERMANN, B. Genome-wide deletion mutant analysis reveals genes required for respiratory growth, mitochondrial genome maintenance, and mitochondrial protein synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. **Genome Biol**, 10: R95. doi: 10.1186/gb-2009-10-9-r95. 2009.
- MIKI, B.L.; POON, N.H.; JAMES, A.P.; SELIGY, V.L. Possible mechanism for flocculation interactions governed by gene FLO1 in *Saccharomyces cerevisiae*. **J Bacteriol**. 150(2): 878-89, 1982.
- MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v.31, n.3, p.426-428, 1959.
- MISHRA, P. & PRASAD, R. "Relationship between ethanol tolerance and fatty acyl composition of *Saccharomyces cerevisiae*", **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, 30: 294-298, 1989.
- NARENDRANATH, N.V.; POWER, R. Relationship between pH and medium dissolved solids in terms of growth and metabolism of lactobacilli and *Saccharomyces cerevisiae* during ethanol production. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 7, n. 5, p. 2239-2243, 2005.

- NAUMOV, G.I., JAMES, S.A., NAUMOVA, E.S., LOIS, E.J. AND ROBERTS, I.N. Three new species in the *Saccharomyces sensu stricto* complex: *Saccharomyces cariocanus*, *Saccharomyces kudriavzevii* and *Saccharomyces mitakae*. **Int J Syst Evol Microbiol**, 50, 1931–1942, 2000.
- NEVOIGT, E. "Progress in metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*." **Microbiol Mol Biol Rev**, v.72, n.3, p.379-412, 2008.
- OLIVEIRA, E.S. **Efeito da adição de suplementos nutricionais na fermentação alcoólica de melaço de cana-de-açúcar em diferentes temperaturas**. 1988. 63 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1988.
- OLIVEIRA, A.J. *et al.* **Métodos para o controle microbiológico na produção de álcool e açúcar**. Piracicaba: FERMENTEC; FEALQ; ESALQ-USP, 1996.
- OLIVÉRIO, J.L. Cogeração: **Uma nova fonte de renda para usinas de açúcar e álcool**, SIMTEC, Piracicaba, 2008.
- PASCUAL, C.; ALONSO, A.; GARCIA, I.; ROMAY, C. Effect of ethanol on glucose transport, key glycolytic enzymes, and proton extrusion in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 32, n. 3, p. 374-378, 1988.
- PAMPULHA, M.E.; LOUREIRO-DIAS, M.C. Combined effect of acetic acid, pH and ethanol on intracellular pH of fermenting yeast. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 31, n. 5/6, p. 547-550, 1989.
- PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Res.**, v. 29, n. 9, p. E45, 2001.
- PIPER, P.; CALDERON, C.O.; HATZIXANTHIS, K.; MOLLAPOUR, M. Weak acid adaptation: the stress response that confers yeast with resistance to organic acid food preservatives. **Microbiology**, v. 147, p. 2635-2642, 2001.
- PIPER, P.W. Molecular events associated with acquisition of heat tolerance by the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 11, n. 4, p. 339-356, 1995.
- PRAEKELT, U.M.; MEACOCK, P.A. Hsp12, a new small heat shock gene of *Saccharomyces cerevisiae*: Analysis of structure, regulation and function. **Molecular and General Genetics**, v. 223, n. 1, p. 97-106, 1990.

- QIU, X.B.; SHAO, Y.M.; MIAO, S.; WANG, L. The diversity of the DnaJ/Hsp40 family, the crucial partners for Hsp70 chaperones. **Cell Mol Life Sci**, 63:2560–2570. 2006.
- QUINTAS, C.; LIMA-COSTA, E.; LOUREIRO-DIAS, M.C. The effect of ethanol on the plasma membrane permeability of spoilage yeasts, **Food Technol. Biotechnol.**, 38(1): 47-51, 2009.
- RACKER, E. Alcohol dehydrogenase from baker's yeast. In: COLOWICK, S.P.; KAPLAN, N.O. (Ed.). **Methods in enzymology**. New York: Academic Press, 1955. v.1, p.500-503.
- RANDEZ-GIL, F.; SANZ, P.; PRIETO, J.A. Engineering baker's yeast: room for improvement. **Trends in Biotechnology**, Amsterdam, v. 17, p. 237-244, 1999.
- RIBEIRO, E. J. **Fermentação Alcoólica**. Apostila do Módulo II. Processamento na Indústria Sucroalcooleira, Uberaba, 2010.
- RIBEIRO, F. A. M. **Álcool e açúcar: uma via de mão dupla**. In: ROSSAFA, L. A. (Coord.). **Álcool combustível – série indústria em perspectiva**. Brasília: Instituto Evaldo Lodi, p. 48-57, 2008.
- RIBEIRO, J.L.D.; FOGLIATTO, F.S.; CATEN, C.S.T. **Step for multiresponse optimization in product development**. Building competencies for international manufacturing: perspectives for developing countries. FEENG, Porto Alegre, p. 1-8. 2000.
- RUIS, H. AND SCHULLER, C. Stress signalling in yeast. **Bioassays**, v.17, n. 11, p. 959-965, 1995.
- SALES, K. *et al.* The LEA-like protein Hsp12 in *Saccharomyces cerevisiae* has a plasma membrane location and protects membranes against desiccation and ethanol-induced stress. **Biochim. Biophys Acta**, v. 1463, n. 2, p. 267-78, 2000.
- SALGUEIRO, S.P.; SÁ-CORREIA, I.; NOVAIS, J.M. Ethanol-induced leakage in *Saccharomyces cerevisiae*: kinetics and relationship to yeast ethanol tolerance and alcohol fermentation productivity. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 54, n. 4, p. 903-909, 1988.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F. & MANIATIS, T. **Molecular Cloning -A Laboratory Manual** (2^a ed.). Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989.

- SEABRA, J.E.A. **Avaliação técnico-econômica de opções para o aproveitamento integral da biomassa de cana no Brasil**. Tese (doutorado). Faculdade de Engenharia Mecânica - UNICAMP. Campinas, 274 p. 2008.
- SILVA-FILHO, E.A.; MEOL, H.F.; ANTUNES, D.F.; SANTOS, S.K.B.; RESENDE, A.M.; SIMÕES, D.A.; MORAIS JR, M.A. Isolation by genetic and physiological characteristics of fuel-ethanol fermentative *Saccharomyces cerevisiae* strain with potential for genetic manipulation. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Hampshire, v.32, p.481-486, 2006.
- SILVA, R.N.; MONTEIRO, V.N.; ALCANFOR, J.D.X.; ASSIS, E.M.; ASQUIERI, E.R. Comparação de métodos para determinação de açúcares redutores e totais em mel. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.23, n.3, p.337-341, 2003.
- SMITH, G.M. **Statistical process control and quality improvement**. Columbus, Prentice Hall, cap. 4, p. 79-112. 1998.
- SINHA, H.; NICHOLSON, B.P.; STEINMETZ, L.M.; MCCUSKER, J.H. Complex genetic interactions in a quantitative trait locus. **PLoS Genet** 2: Doi: 10.1371/journal.pgen.0020013. 2006.
- SOUZA, C.S. **Avaliação da produção de etanol em temperaturas elevadas por uma linhagem de *S. cerevisiae***. 2009. 136 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto Butantã, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.
- SOUSA, G.F. **Identificação de alvos moleculares associados à resistência e a sensibilidade aos antitumorais carboplatina e análogos de rebecamicina utilizando *Saccharomyces cerevisiae* como modelo celular**. 2013. 123 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.
- STEINMETZ, L.M.; SINHA, H.; RICHARDS, D.R.; SPIEGELMAN, J.I.; OEFNER, P.J.; MCCUSKER, J.H.; DAVIS, R.W. Dissecting the architecture of a quantitative trait locus in yeast. **Nature**, 416:326–330. 2002.
- STRATFORD, M. Induction of flocculation in brewing yeasts by change in pH value. **FEMS Microbiol Lett**, 136(1): 13-8, 1996.
- SUZZI, G.P.; ROMANO, P.; ZAMBONELLI, C. Flocculation of wine yeasts: frequency, differences, and stability of the character. **Canadian Journal of Microbiology**, v.30, p.36-39, 1984.

- SWAN, T.M. AND WATSON, K. Stress tolerance in yeast sterol auxotroph: role of ergosterol, heat shock proteins and trehalose. **FEMS Microbiology Letters**, v. 169, p. 191-197, 1998.
- SWINNEN, S. *et al.* Identification of novel causative genes determining the complex trait of high ethanol tolerance in yeast using pooled-segregant whole-genome sequence analysis. **Genome Research**, v. 22, p. 975–984, 2012.
- TADAUCHI, T.; INADA, T.; MATSUMOTO, K.; IRIE, K. Posttranscriptional regulation of HO expression by the Mkt1-Pbp1 complex. **Mol Cell Biol**, 24:3670–3681. 2004.
- TEIXEIRA, M.C.; RAPOSO, L.R.; MIRA, N.P.; LOURENÇO, A.B.; SÁ-CORREIA, I. Genome-Wide Identification of *Saccharomyces cerevisiae* Genes Required for Maximal Tolerance to Ethanol. **Appl. Environ. Microbiol**, v. 75, n. 18, p. 5761, 2009.
- TILMAN, D.; HILL, J.; NELSON, E.; POLASKY, S.; TIFFANY, D. Environmental, economic and energetic costs and benefits of biodiesel and ethanol biofuels. **Proc. Natl. Acad. Sci USA**. 103:11206-10, 2008.
- TORIJA, M.J.; ROZES, N.; POBLET, M.; GUILLON, J.M.; MAS, A. Effects of fermentation temperature on the strain population of *Saccharomyces cerevisiae*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 80, p. 47-53, 2003.
- UNICA – União da Indústria de cana-de-açúcar. **Etanol Brasileiro terá livre acesso aos EUA em 2012 depois de mais de 30 anos de protecionismo**. Publicado em 23/12/2011. Disponível em: <<http://www.unica.com.br/noticias>> Acesso em 07 ag. 2014.
- VANEGAS, J.M.; CONTRERAS, M.F.; FALLER, R.; LONGO, M.L. Role of unsaturated lipid and ergosterol in ethanol tolerance of model yeast biomembranes. **Biophysical Journal**, New York, v. 102, n. 3, p. 507-516, 2012.
- VAN MULDER, S.E.; CHRISTIANEN, E.; SAERENS, S.M.; DAENEN, L.; VERBELEN, P.J.; WILLAERT, R.; VERSTREPEN, K.J.; DELVAUX, F.R. Phenotypic diversity of Flo protein family-mediated adhesion in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Yeast Res**, 9(2): 178-90, 2009.

- VELCULESCU, V.E.; ZHANG, L.; ZHOU, W.; VOGELSTEIN, J.; BASRAI, M.A.; BASSETT, D.E.; HIETER, P.; VOGELSTEIN, B.; KINZLER, K.W. Characterization of the yeast transcriptome. **Cell**, 88:243–251, 1997.
- VERSTREPEN, K.J.; DERDELINCKX, G.; VERACHTERT, H.; DELVAUX, F.R. Yeast flocculation: what brewers should know. **Appl Microbiol Biotechnol**. 61(3): 197-205, 2003.
- VERSTREPEN, K.J.; KLIS, F. M. Flocculation, adhesion and biofilm formation in yeasts. **Mol Microbiol**, 60(1): 5-15, 2006.
- WALKER, G.M. **Yeast: physiology and biotechnology**, p. 203-264. Chichester: John Wiley & Sons Ltda, 1998.
- WALKER-CAPRIOGLIO, H.M.; CASEY, W.M.; PARKS, L.W. *Saccharomyces cerevisiae* membrane sterol modifications in response to growth in the presence of ethanol. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 56, n. 9, p. 2853-2857, 1990.
- WANG, F.; SHEN, W.; RAO, Z.-M.; FANG, H.Y.; ZHAN, X.-B. & ZHUGE J. Construction of a flocculating yeast for fuel ethanol production. **Biotechnology Letters**, Kew, v.37, p.97-102, 2008.
- YOSHIKAWA, K.; TANAKA, T.; FURUSAWA, C.; NAGAHISA, K.; HIRASAWA, T.; SHIMIZU, H. Comprehensive phenotypic analysis for identification of genes affecting growth under ethanol stress in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Yeast Res**, 9:32–44. 2009.
- YOU, K.M.; ROSENFELD, C.L.; KNIPPLE, D.C. Ethanol tolerance in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* is dependent on cellular oleic acid content. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, n. 3, p. 1499-1503, 2003.
- ZANIN, G.M. *et al.* Brazilian Bioethanol Program. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 84-86, p. 1147-1161, Spring, 2000.
- ZHU, J.; ZHANG, B.; SMITH, E.N.; DREES, B.; BREM, R.B.; KRUGLYAK, L.; BUMGARNER, R.E.; SCHADT, E.E. Integrating large-scale functional genomic data to dissect the complexity of yeast regulatory networks. **Nat Genet**, 40:854–861. 2008.

ZUZUARREGUI, A.; OLMO, M. Analyses of resistance under laboratory conditions constitute a suitable criterion for wine yeast selection. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 85, p. 271-80, 2004.