

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA E EVOLUÇÃO

CLEITON DIAS DO PRADO

Caracterização fisiológica e avaliação do  
transcriptoma de linhagens de *Saccharomyces*  
*cerevisiae* termotolerantes isoladas durante a  
produção industrial de etanol

SÃO CARLOS – SP  
2022

CLEITON DIAS DO PRADO

Caracterização fisiológica e avaliação do transcriptoma de linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* termotolerantes isoladas durante a produção industrial de etanol

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular da Universidade Federal de São Carlos, para obtenção do título de doutor em Ciências, área de concentração: Bioquímica e Biologia Molecular

**Orientador:** Prof. Dr. Anderson Ferreira da Cunha  
**Coorientador:** Prof. Dr. Thiago Olitta Basso

SÃO CARLOS – SP  
2022

Dedico este trabalho ao meu pai, José Carlos Dias do Prado (*in memoriam*).

## AGRADECIMENTOS

À minha família por toda a luta, investimento e incentivo nesta jornada, especialmente minha mãe que sempre esteve ao meu lado e é minha luz e meu porto seguro.

Ao meu pai José Carlos Dias do Prado, que não mediu esforços para que eu chegasse onde cheguei, você me ensinou a ter coragem e buscar sempre aquilo que eu quis e sonhei, por falar em sonho, sonhamos esse caminho juntos, infelizmente eu tive que seguir só, mas não houve um dia sequer que eu não lembrasse de você e da conclusão deste sonho, obrigado pai, conseguimos!

Aos meus irmãos, Anderson, Cleberson e Emerson por me incentivar e estar comigo nesta jornada, ao Emerson só agradeço por ter escolhido ficar perto de mim e me ajudar incansavelmente, eu sempre serei grato por todo o cuidado comigo, meu querido irmão.

De alguma forma gostaria também de dedicar esse trabalho a minha querida madrinha Helena (*in memoriam*), jamais me esquecerei de você e de sua risada...

Ao meu querido Tio Nelson por ser um exemplo para mim, por sempre se preocupar comigo e com meus estudos, por me apoiar e por me encorajar a sempre não desistir. Obrigado!

Ao grupo de pesquisa do laboratório de engenharia de bioprocessos – BELA da escola politécnica da Universidade de São Paulo – USP principalmente aos meus queridos amigos e colaboradores, Dielle, Rodrigo, Thamires e Kevy. Muito obrigado pela colaboração e por compartilhar momentos de crescimento profissional e pessoal durante meu período no grupo.

Ao laboratório de pesquisa, o LBGA – Laboratório de Bioquímica e Genética Aplicada da UFSCAR, obrigado por contribuírem positivamente ao longo destes anos e claro também dividir todos os tipos de momentos e sentimentos que um aluno de pós-graduação tem durante esse processo. Gostaria aqui de pontuar a participação e ajuda dos meus queridos Jonas, Gustavo, João e Jeferson, o meu muito obrigado.

Ao Prof. Dr. Thiago Olitta Basso, por gentilmente me acolher em seu grupo de pesquisa e também me coorientar neste mundo tão intenso que é a fermentação e a fisiologia de leveduras, foi difícil e insano mas um dos maiores desafios da minha vida, obrigado por

me apresentar os biorreatores/quimiostatos e fazer deles um diferencial enorme em minha carreira.

Ao Prof. Dr. Iran Malavazi pela contribuição científica neste trabalho e também com todas as minhas dúvidas e questionamentos ao longo da pesquisa.

Ao grupo de pesquisa do Prof. Dr. Marcos Chiarati por dar todo o suporte e ajudar na construção das bibliotecas e análise do transcriptoma das leveduras termotolerantes.

Ao grupo de pesquisa do Prof. Marcelo Brandão e ao Thiago Simões por nos ajudar com as análises de bioinformática.

Finalmente gostaria de agradecer ao Prof. Dr. Anderson Ferreira da Cunha por brilhantemente me orientar neste trabalho e contribuir diretamente para a minha formação como pesquisador, foram muitos momentos de extrema dedicação, erros, acertos, dúvidas, alegrias e tristezas, mas de uma certeza de que eu estava nas mãos certas. Serei eternamente grato por tudo e não tenho palavras para mensurar o respeito, carinho e amizade que tenho e levarei de você, um grande mestre que inspira não só pelo profissional que é mas também pela pessoa e pela forma que ama o que faz. Muito obrigado e espero colaborar sempre no que eu puder, conte comigo.

Ao CNPQ pelos auxílios financeiros que proporcionaram o desenvolvimento deste trabalho e ao PPGGev pelo curso de doutorado e também por não medir esforços para manter a excelência do programa.

A A.A.A – UFSCAR (Associação Acadêmica de Atletas) por proporcionar momentos de alegria interação e relacionamento social não somente para mim mas para os seus inúmeros atletas, mantendo assim a sanidade mental e fazendo com que essa jornada fosse menos difícil. Aos títulos conquistados e as pessoas que conheci dentro do esporte, obrigado e VAI FEDERAL!!!!

A todas as pessoas que estiveram presentes e participaram diretamente ou indiretamente ao longo desta trajetória, nomes como Fran, Melissa, Diego, Ivan, Junior, Adilson, Gislene, Jorge, Camila, Carla, Grazi e Nath, muito obrigado, vocês jamais serão esquecidos.

Claro, não poderia deixar de agradecer a mim mesmo que diante de tantas emoções e dificuldades nesta vida nunca deixei de acreditar e de VIVER, se um dia alguém ler este trabalho, gostaria de deixar a seguinte mensagem...

*“A verdade das coisas não está no tempo que elas duram, mas na intensidade com que elas acontecem. Por isso existem momentos inesquecíveis coisas inexplicáveis e pessoas incomparáveis”*

Fernando Pessoa

## RESUMO

O uso de linhagens de leveduras termotolerantes pode melhorar a produtividade no processo da produção do etanol, permitindo que a fermentação ocorra a temperaturas superiores à 40°C. Essa característica pode beneficiar, por exemplo, a produção de bioetanol e permitir a sacarificação e fermentação simultâneas (SSF) de amido ou biomassa lignocelulósica. Além disso, uma cepa termotolerante pode elevar os níveis de rendimento em etanol e também minimizar o uso de sistemas de resfriamento das dornas e conseqüentemente diminuir o uso de água, contribuindo para a redução de custos e também para com o meio ambiente. O objetivo deste estudo foi identificar e caracterizar a fisiologia de uma nova cepa termotolerante (LBGA-01) isolada do processo de produção de etanol capaz de fermentar à 40°C, e também avaliar o transcriptoma desta cepa durante fermentações realizadas em quimiostatos. Para que a cepa pudesse ser caracterizada do ponto de vista fisiológico e molecular, foram realizados experimentos de crescimento em condições laboratoriais, como testes de crescimento na presença de glicose (4 e 8%) e também na presença de inibidores (sacarose, etanol, furfural, ácido lático e ácido acético). A expressão dos genes envolvidos com a eficiência fermentativa foi analisada por qPCR. Para ter um melhor entendimento da fisiologia da leveduras, fermentações em quimiostatos foram realizadas e os metabólitos analisados por HPLC. As células oriundas do estado estacionário das fermentações em quimiostatos tiveram o seu RNA extraídos para a análise do transcriptoma e posteriormente as análises de bioinformática foram realizadas em parceria com o CBMEG/UNICAMP. Para simular condições reais do processo industrial, fermentações com ciclos (4 ciclos) de células e tratamento ácido também foram realizados a 30 e à 40°C utilizando mosto (19 brix) como meio fermentativo. Os resultados apresentados neste estudo mostram que a cepa LBGA-01 possui uma boa taxa de crescimento celular a 30 e 40°C e é mais resistente a altas concentrações de sacarose (30%), furfural (0,9 mM) e etanol (16%) do que a cepa industrial CAT-1. Além disso, esta cepa foi capaz de alterar o padrão de expressão de genes envolvidos na assimilação de sacarose (*SUC2* e *AGTI*). Genes relacionados com a produção de proteínas envolvidas na produção de produtos secundários da fermentação também foram regulados diferencialmente a 40°C, com expressão reduzida de genes envolvidos na formação de glicerol (*GPD2*), acetato (*ALD6* e *ALD4*) e acetil-coenzima A sintetase 2 (*ACS2*). Testes de fermentação em quimiostatos mostraram que o LBGA-01 teve excelente desempenho nas velocidades de formação de etanol em a 40°C (11.50 mmol/g/h). Além disso quando comparados com as cepas industriais CAT-1 e PE-2 a

cepa LBGA-01 apresentou melhor rendimento em etanol à 40°C (0,478 g etanol/g glicose). Os resultados de transcriptoma mostraram que a cepa termotolerante LBGA-01 modula a ativação de genes alterando as vias metabólicas durante a fermentação em alta temperatura, aumentando sua resistência às altas concentrações de etanol, açúcar, ácido láctico e ácido acético. Os resultados evidenciaram que a cepa LBGA-01 quando submetida a altas temperaturas possui uma regulação mais intensificada de genes envolvidos com a integridade da parede celular (*SVS1*; *MCH5*) e na biossíntese de lipídeos (*ROX1*; *ERG3*; *ERG5*; *ERG10* e *ERG13*). Além disso foi possível também observar a expressão de genes relacionado com a capacidade fermentativa (*TOS3*) corroborando com resultados prévios analisados por q-PCR. Os resultados indicam que esta nova cepa isolada da produção de etanol, possui uma alta robustez na presença de inibidores do processo de produção de etanol (sacarose, etanol e furfural), além de apresentar bons níveis de rendimento em etanol e crescimento celular na temperatura controle (30°C) e na temperatura de estresse (40°C), com interessantes características de expressão gênica, e também, a transcrição de genes envolvidos com a resistência da célula à 40°C durante fermentações em quimostatos. Quando submetidas as condições simulando o processo industrial, a cepa LBGA-01 parece se adaptar as condições de reciclo e tratamento ácido, produzindo bons níveis de rendimento em etanol com base no teórico. Portanto, do ponto de vista tecnológico a cepa LBGA-01 tem potencial de aplicação científico e industrial e pode ser usada para melhorar produção de etanol no Brasil.

**Palavras-chave:** *Saccharomyces cerevisiae*, termotolerante, fermentação, transcriptoma, etanol, quimiostato, genes.

## ABSTRACT

The use of thermotolerant yeast strains can improve productivity in the ethanol production process, allowing fermentation to occur at temperatures above 40°C. This characteristic can benefit, for example, the production of bioethanol and allow simultaneous saccharification and fermentation (SSF) of starch or lignocellulosic biomass. In addition, a thermotolerant strain can increase ethanol yield levels and also minimize the use of vat cooling systems and consequently reduce water use, contributing to cost reduction and also to the environment. The aim of this study was to identify and characterize the physiology of a new thermotolerant strain (LBGA-01) isolated from the ethanol production process capable of fermenting at 40°C and also to evaluate the transcriptome of this strain during fermentations carried out in chemostats. So that the strain could be characterized from the physiological and molecular point of view, growth experiments were carried out under laboratory conditions, such as growth tests in the presence of glucose (4 and 8%) and also in the presence of inhibitors (sucrose, ethanol, furfural, lactic acid, and acetic acid). The expression of genes involved in fermentation efficiency was analyzed by qPCR. To have a better understanding of yeast physiology, fermentations in chemostats were performed and the metabolites were analyzed by HPLC. Cells originating from the steady state of fermentations in chemostats had their RNA extracted for transcriptome analysis and subsequently, the bioinformatics analyzes were carried out in partnership with CBMEG/UNICAMP. To simulate real conditions of the industrial process, fermentations with cycles (4 cycles) of cells and acid treatment were also carried out at 30 and 40°C using wort (19 brix) as fermentation medium. The results presented in this study show that the LBGA-01 strain has a good cell growth rate at 30 and 40°C and is more resistant to high concentrations of sucrose (30%), furfural (0.9 mM), and ethanol (16 %) than the industrial strain CAT-1. Furthermore, this strain was able to alter the expression pattern of genes involved in sucrose assimilation (*SUC2* and *AGT1*). Genes related to the production of proteins involved in the production of secondary fermentation products were also differentially regulated at 40°C, with reduced expression of genes involved in the formation of glycerol (*GPD2*), acetate (*ALD6* and *ALD4*), and acetyl-coenzyme A synthetase 2 (*ACS2*). Fermentation tests in chemostats showed that LBGA-01 performed excellently at ethanol formation rates at 40°C (11.50 mmol/g/h). Furthermore, when compared to the industrial strains CAT-1 and PE-2, the LBGA-01 strain showed better ethanol yield at 40°C (0.478 g ethanol/g glucose). The transcriptome

results showed that the thermotolerant strain LBGA-01 modulates the activation of genes by altering metabolic pathways during fermentation at high temperatures, increasing its resistance to high concentrations of ethanol, sugar, lactic acid, and acetic acid. The results showed that the LBGA-01 strain, when subjected to high temperatures, has a more intensified regulation of genes involved in cell wall integrity (*SVS1*; *MCH5*) and in lipid biosynthesis (*ROX1*; *ERG3*; *ERG5*; *ERG10* and *ERG13*). In addition, it was also possible to observe the expression of genes related to fermentative capacity (*TOS3*) corroborating with previous results analyzed by q-PCR. The results indicate that this new strain isolated from ethanol production, has high robustness in the presence of inhibitors of the ethanol production process (sucrose, ethanol, and furfural), in addition to presenting good levels of ethanol yield and cell growth at the control temperature (30°C) and stress temperature (40°C), with interesting characteristics of gene expression, and also the transcription of genes involved with cell resistance to 40°C during fermentations in chemostats. When subjected to conditions simulating the industrial process, the LBGA-01 strain seems to adapt to the conditions of recycling and acid treatment, producing good levels of ethanol yield based on theory. Therefore, from a technological point of view, the LBGA-01 strain has the potential for scientific and industrial application and can be used to improve ethanol production in Brazil.

**Keywords:** *Saccharomyces cerevisiae*, thermotolerant, fermentation, transcriptome, ethanol, chemostat, genes.

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1. Metabolismo de glicose em *S. cerevisiae*.** Fonte: elaborado pelo autor, adaptado de (LORCA MANDUJANO).

**Figura 2. Fluxograma simplificado da produção de etanol 1G e açúcar.** Fonte: adaptado de Pereira, 2016.

**Figura 3. Configurações de reatores para a produção de etanol classificados de acordo com a alimentação de substrato.** Fonte: elaborado pelo autor

**Figura 4. Esquema representativo das fermentações com ciclos seguindo o protocolo descrito por (Raghavendran et al., 2017).** Fonte: Elaborado pelo autor.

**Figura 5. Isolamento de leveduras termotolerantes da produção brasileira de etanol da usina São Luiz. Quatro leveduras termotolerantes foram identificadas como LBGA-01, LBGA-69, LBGA-157 e LBGA-175.** A cepa industrial CAT-1 foi usada como cepa controle não termotolerante. As células foram cultivadas de um dia para o outro por aproximadamente 16 horas em meio YPD 2%, e a concentração de células foi ajustada para  $10^6$  células/mL. Diluições em série de dez vezes foram plaqueadas em meio sólido YPD 2% contendo ágar. As células foram incubadas à 30 e 40°C por 2 dias. A cepa CAT-1 apresentou baixo crescimento a 40°C e as quatro cepas tiveram perfis similares de crescimento à 30 e 40°C

**Figura 6. Caracterização molecular das cepas termotolerantes.** Quatro regiões polimórficas dos genes *SPA2* (P1), *PYR3* (P2), *MNN4* (P3) e *EPL1* (P4), foram amplificadas conforme descrito por Carvalho Netto (Carvalho-Netto *et al.*, 2013). A amplificação do ITS foi feita com os primers específicos descritos na literatura (Šuranská *et al.*, 2016).

**Figura 7. Comparação do crescimento e consumo de glicose utilizando as leveduras isoladas.** O crescimento das leveduras a 30°C e 40°C foi obtido por densidade óptica a 600 nm (a, b). A taxa de consumo de glicose à 30°C e à 40°C foi avaliada com 4% de glicose (c, d) e 8% de glicose (e, f).

**Figura 8. Análise do perfil de crescimento da levedura termotolerante LBGA-01 em comparação com cepas industriais (CAT-01) e haploides (Sc-9721) sob diferentes concentrações de inibidores da produção de etanol 1G e 2G.** Os testes tiveram a duração de 8 h à 30°C e 180 rpm, uma alíquota do meio de cultura foi coletada a cada 2h e a absorbância foi medida em DO<sub>600</sub>. Os experimentos foram realizados em triplicata

**Figura 9. Perfil de expressão dos genes envolvidos na eficiência da fermentação usando a cepa LBGA-01 à 30 e 40°C.** A fermentação utilizando as cepas LBGA-01 e CAT-1 industrial foi realizada a 30°C e 40°C com 50 ml de meio líquido em erlenmeyer de 250 ml. O meio utilizado foi o YPD e YPS, Glicose (G) e sacarose (S) foram usadas como fontes de carbono respectivamente. As fermentações foram realizadas no sistema estacionário incubadas em estufas. As cores das barras representam o perfil de expressão gênica (vermelho: baixa expressão; azul: alta expressão)

**Figura 10. Expressão de genes envolvidos na formação de produtos secundários durante o processo fermentativo.** Os valores de mRNA de aldeído desidrogenase-6 (*ALD6*) (a), aldeído desidrogenase-4 (*ALD4*) (b), acetil CoA sintetase (*ACS2*) (c) e glicerol-3-fosfato desidrogenase 2 (*GPD2*) (d), foram normalizado usando a expressão de beta actina (*ACT1*). Os ensaios de fermentação foram realizados em duplicata com LBGA-01 à 30 e 40°C.

**Figura 11. Aspectos fisiológicos da cepa LBGA-01 em fermentação com ciclos utilizando melaço de cana-de-açúcar como meio fermentativo.** (A) Os perfis de CO<sub>2</sub> foram normalizados pela biomassa úmida. (B) A viabilidade celular foi avaliada em câmara de Neubauer ao longo de quatro ciclos. (C) A produção de glicerol (mmol/g/h) foi avaliado à 34°C e 40°C através dos resultados obtidos em HPLC. (D) O rendimento em etanol foi calculado considerando o máximo teórico (%) com base nos valores obtidos da concentração em (g/L) de etanol produzido ao longo dos ciclos, avaliados em HPLC.

**Figura 12. Gel de eletroforese das amostras de RNA para construção das bibliotecas de RNAseq.**

**Figura 13. Análise das sequências mapeadas no genoma de referência pela ferramenta STAR.** As barras em azul claro representam os reads mapeados uma única vez no genoma, os quais serão contabilizados na análise de expressão gênica.

**Figura 14. Treemap resumido em categorias de processos biológicos do GO (*gene ontology*).** Treemap foi construído usando as porcentagens de genes anotados com os termos GO não redundantes. Cada retângulo representa um termo GO significativo. O tamanho dos retângulos é proporcional ao valor de p dado pela análise Blast2GO (ou seja, quanto maior o retângulo, mais significativo o termo GO).

**Figura 15. Treemap resumido em categorias de processos biológicos do GO (*gene ontology*) para a cepa LBGA-01 à 30°C.**

**Figura 16. Treemap resumido em categorias de processos biológicos do GO (*gene ontology*) para a cepa LBGA-01 à 40°C.**

**Figura 17. Heatmap dos 269 genes diferencialmente expressos nas condições estacionária de cultivo em meio sintético Verduyn (Apêndice E) à 30 e 40°C.** Os reads counts foram utilizados para a construção do heatmap no software MEV.

**Figura 18. Heatmap de genes diferencialmente expressos ao longo do processo fermentativo à 30 e 40°C.** Para a construção deste heatmap foram utilizados os valores de reads counts do sequenciamento do transcriptoma e posteriormente analisados no software MEV.

**Figura 19. Artigo relacionado a tese de doutorado.** O trabalho intitulado “Physiological characterization of a new thermotolerant yeast strain isolated during Brazilian ethanol production, and its application in high-temperature fermentation” foi publicado no ano de 2020 em periódico Qualis A2.

**Figura 20. Artigo de revisão de literatura.** O artigo foi publicado no ano de 2018, o trabalho é baseado na experiência do grupo do Laboratório de Bioquímica e Genética Aplicada em biotecnologia e genética de leveduras para a produção de etanol.

**Figura 21. Artigo de caracterização de cepas de *S. cerevisiae* selvagens aplicadas na produção de cerveja.** O artigo intitulado “Identification and selection of a new *Saccharomyces cerevisiae* strain isolated from Brazilian ethanol fermentation process for application in beer production” foi publicado no ano de 2021.

**Figura 22. Capítulo de livro escrito em colaboração com o departamento de biotecnologia da Universidade Paulista (UNESP) de Araraquara.** O trabalho foi publicado no ano de 2022.

## **LISTA DE TABELAS**

**Tabela 1. Concentração limítrofes de inibidores/estressores selecionados na literatura para a realização dos testes de resistência na presença de inibidores da produção do etanol 1G e 2G utilizando a cepa LBGA-01 à 30 e 40°C.**

**Tabela 2. Fisiologia de *Saccharomyces cerevisiae* em condições limitantes de glicose**

**Tabela 3. Valores das concentrações de RNA extraídos das amostras de LBGA-01 fermentadas à 30°C e 40°C**

**Tabela 4. Relação de algumas funções biológicas expressas nas condições de estudo e os possíveis genes relacionados. A intensidade de cor indica a expressão dos genes diferencialmente expressos nas respectivas funções biológicas ativadas nas condições de estudo (30°C e 40°C) usando a cepa termotolerante LBGA-01.**

**Tabela 5. Top 30 genes mais expressos (30°C e 40°C) e agrupados de acordo com a sua função biológica descrita no *Gene Ontology***

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- LBGA – Laboratório de bioquímica e genética aplicada
- UFSCar – Universidade Federal de São Carlos
- PCR – Polimerase Chain Reaction
- ITS – Internal Transcribed Spacer
- HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
- COP21 – Conferência do Clima
- DNA – Ácido desoxirribonucleico
- RNA – Ácido ribonucleico
- OGMs – Organismos geneticamente modificados
- YPD – Yeast Stract, Peptone, Dextrose
- EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-ácido
- SDS – Eletroforese em gele de Poliacrilamida
- ITS1 - *Internal Transcribed Spacer 1*
- ITS4 - *Internal Transcribed Spacer 2*
- OD – Densidade Óptica
- USP – Universidade de São Paulo
- mRNA – RNA mensageiro
- HMF – Hidroximetil furfural
- NADH – Nicotinamida adenina dinucleotídeo
- $V_s$  - quantidade total de substrato
- $V_w$  - volume de vinho centrifugado
- ET - concentração de etanol no vinho
- P - pellet da biomassa de levedura
- Pp – pellet da biomassa de levedura do ciclo anterior
- ETp - concentração de etanol do vinho centrifugado do ciclo anterior
- $V_v$  - volume de vinho do ciclo anterior
- RNAseq - Sequenciamento do RNA
- GO – *Gene Ontology*

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	19
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	25
2.1. Produção de etanol no Brasil.....	25
2.2. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> na produção de etanol .....	26
2.3. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> termotolerante.....	27
2.4. Fermentação alcoólica e metabolismo celular de <i>S. cerevisiae</i> .....	28
2.5. Formas de obtenção de etanol e processos utilizados.....	30
2.6. Processo Batelada.....	31
2.7. Processo Batelada Alimentada.....	32
2.8. Processo Contínuo .....	32
3. OBJETIVOS GERAIS.....	35
3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	35
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	36
4.1. Isolamento de leveduras e identificação de leveduras termotolerantes.....	36
4.2. Extração do DNA .....	36
4.3. Identificação molecular para caracterização individual de cepas isoladas e classificação por espécies .....	37
4.4. Perfil de crescimento de levedura termotolerante.....	37
4.5. Ensaio de fermentação empregando cepas termotolerantes.....	37
4.6. Caracterização da resistência aos inibidores das células de levedura (etanol, açúcar, ácido acético, ácido láctico, furfural) .....	38
4.7. Análise de expressão gênica por q-PCR.....	39
4.8. Fermentações em biorreatores (quimiostato) nas condições controle (30°C) e de estresse (40°C).....	40
4.8.1 Fermentação em biorreatores (Quimiostato).....	40
4.9. Extração de RNA total das células de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	41
4.9.1. Preparo das bibliotecas para sequenciamento do transcriptoma .....	41
4.10. Análise por bioinformática das sequências geradas por RNA-Seq das fermentações a 30 e 40°C utilizando a linhagem termotolerante LBGA-01.....	42
4.11. Fermentação simulando o processo de produção de etanol brasileiro .....	42
4.11.1. Pré-inóculo e propagação .....	44
4.11.2. Fermentação .....	44
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	46
5.1. Isolamento, identificação e genotipagem de leveduras termotolerantes .....	46
5.2. Ensaio fermentativo com as linhagens termotolerantes a 30 e 40°C. ....	48

<b>5.3. Testes de resistência a estressores do processo fermentativo da produção de etanol 1G e 2G.....</b>	<b>51</b>
<b>5.4. Análise de expressão gênica da linhagem LBGA-01 em fermentações a altas temperaturas.....</b>	<b>53</b>
<b>5.5. Parâmetros fisiológicos quantitativos da linhagem LBGA-01 durante fermentações anaeróbicas em quimiostatos à 30 e 40°C .....</b>	<b>59</b>
<b>5.6. Performance fermentativa de LBGA-01 simulando as condições de produção de etanol brasileiro em altas temperaturas .....</b>	<b>62</b>
<b>5.7 Construção e análise das bibliotecas de mRNA para sequenciamento. ....</b>	<b>66</b>
<b>5.7.1. Análise da qualidade do RNA .....</b>	<b>66</b>
<b>5.7.2. Mapeamento das sequências obtidas do sequenciamento.....</b>	<b>68</b>
<b>5.7.3. Análise de expressão gênica diferencial.....</b>	<b>74</b>
<b>6. CONCLUSÕES .....</b>	<b>81</b>
<b>7. PERSPECTIVAS FUTURAS.....</b>	<b>83</b>
<b>8. COLABORAÇÕES E TRABALHOS REALIZADOS.....</b>	<b>84</b>
<b>REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>87</b>
<b>9. APÊNDICES.....</b>	<b>97</b>
<b>APÊNDICE A – TABELA DOS 269 GENES DIFERENTEMENTE EXPRESSOS AO LONGO DAS FEMENTAÇÕES À 30 E 40°C .....</b>	<b>97</b>
<b>APÊNDICE B – SEQUÊNCIA DO ITS DAS LINHAGENS UTILIZADAS NESTE TRABALHO .....</b>	<b>103</b>
<b>APÊNDICE C - SEQUÊNCIA DOS PRIMER UTILIZADOS NA ANÁLISE DE qPCR. FW- FORWARD PRIMER, RV-REVERSE PRIMER .....</b>	<b>108</b>
<b>APÊNDICE D – PRINCIPAIS GENES DISCUTIDOS NO TRABALHO E NOMENCLATURA .....</b>	<b>109</b>
<b>APÊNDICE E – COMPOSIÇÃO DO MEIO DE ALIMENTAÇÃO (VERDUYN) DAS FERMENTAÇÕES EM QUIMIOSTATO .....</b>	<b>112</b>

# 1. INTRODUÇÃO

A industrialização tem crescido ao longo do tempo, seja ela aliada ao capitalismo ou socialismo ela tem medido forças políticas e econômicas ao longo da história, este crescimento tem impactado o mundo de diversas formas, positivamente, como o surgimento de grandes empresas e marcas dominantes em vários seguimentos, ou negativamente, como a diferença social e econômica. Além disso a industrialização também tem contribuído diretamente no impacto ao meio ambiente e nos recursos naturais (Cidon *et al.*, 2021; Rodrigues *et al.*, 2021). O que podemos perceber é uma relação da industrialização nos grandes centros com o crescimento do poder de consumo da população, aliados a necessidade do aumento da demanda de certos produtos e bens de consumo (Rodrigues *et al.*, 2021). A exploração de fontes de energia e o alto consumo de combustíveis fósseis tem contribuído para uma diminuição dos custos energéticos causando uma supressão da demanda, impactando a economia e cada vez mais o meio ambiente (Vidal, 2020).

A necessidade de desenvolvimento de estratégias que visam minimizar tais impactos gerados pela utilização de recursos energéticos tem sido objeto de estudo e desenvolvimento ao longo do tempo. Um exemplo é a produção de biocombustíveis derivados da biomassa ou etanol de segunda geração (2G), uma alternativa renovável frente a disponibilidade e diversidade de biomassas existentes mas que ainda se encontra em desenvolvimento para a sua produção frente a complexidade e altos custo do processo para a obtenção do etanol 2G (Carvalho *et al.*, 2014; Rodrigues *et al.*, 2021). O diesel é a principal fonte de energia para a frota automobilística que movimenta a economia global, embora o consumo de etanol bem como a sua produção tenha contribuído com a redução da queima de combustíveis fósseis, o que tem se observado atualmente é uma inversão destes dados, segundo as últimas conferências ambientais (COP27) o aumento da emissões de gases do efeito estufa tem crescido de forma significativa (Demirbas, 2007; Neves *et al.*, 2009).

O Brasil é um país em desenvolvimento, pela sua riqueza em solo e geografia o país gera grandes possibilidades e expectativas para se beneficiar com o aumento de recursos energéticos para a produção de etanol (Goldemberg, 2007). Se tratando de energias renováveis o Brasil possui matéria prima suficiente para alavancar e aumentar a utilização de recursos renováveis e garantir o futuro energético do país (Goldemberg, 2007; Freitas *et al.*, 2014).

Ao longo dos anos o Brasil tem se firmado como um dos maiores produtores de etanol de cana-de-açúcar do mundo melhorando suas estruturas e estratégias fazendo do etanol um combustível alternativo, de grande potencial e valor econômico (Vidal, 2020 ; Vidal, 2022).

Com o desenvolvimento global e o aumento da demanda de automóveis e consumo de combustíveis, o que espera-se é um aumento de soluções biotecnológicas no campo e também no processo de produção de etanol, como por exemplo, o desenvolvimento de novas linhagens com características robustas e resistentes aos estresses presente na etapa fermentativa (Susmozas *et al.*, 2020).

Mesmo após a pandemia do SARS-COV2, período onde a produção de biocombustíveis caiu devido ao isolamento social e queda na venda de automóveis, o mercado do etanol e o seguimento se mantém forte movimentando mundialmente um capital de aproximadamente US\$ 80 bilhões por ano, suprindo produtos tradicionais de maneira sustentável e relevante, com energia mais limpa, utilizada majoritariamente pela frota nacional de veículos (Neves *et al.*, 2009; Ramos *et al.*, 2022). Estima-se que até o fim da safra de 2023 o Brasil produzirá cerca de 32 bilhões de litros de etanol. Este valor representa um aumento significativo de 5,6% comparado com a safra de 2022. Na safra de 2023, além da produção utilizando cana-de-açúcar os números para a produção nacional de etanol foram acrescidos da produção do etanol de milho que cada vez mais tem ganhado força, contribuindo para uma menor dependência dos combustíveis fósseis e potencializando o Brasil para uma matriz energética mais limpa e renovável (Vidal, 2022).

Estudos realizados nos EUA mostraram que o etanol produzido a partir da fermentação de carboidratos complexos como bagaço e palha da cana-de-açúcar dentre outros pode dar uma contribuição essencial para países com ambições de independência energética. Diante deste cenário, dois países concentram 70% da produção mundial, sendo o EUA e o Brasil, primeiro e segundo maiores produtores de etanol no mundo, respectivamente. No Brasil a maior produção de etanol está concentrada no estado de São Paulo (Marris, 2006; Sanderson, 2006). Segundo o Conab (Conselho Nacional de Abastecimento) o estado de São Paulo produzirá cerca de 11 milhões de litros até o final da safra 2021/2022.

O processo de produção de etanol se dá principalmente pela via fermentativa e tem décadas de tradição no Brasil. Sua produção tem sido constantemente aprimorada desde a produção artesanal de aguardente, passando pela industrialização em larga escala

do processo fermentativo, durante o Proálcool e até os dias atuais (Wheals *et al.*, 1999; Basso e Basso, 2019).

Industrialmente a produção de etanol ocorre pelos processos de batelada alimentada e fermentação contínua, sendo o primeiro o mais usado. Neste processo as dornas são alimentadas com elevadas concentrações celular e de substrato, cerca de  $[X]=10\sim 20$  g/L e 20 graus Brix respectivamente. O mosto (mistura de caldo de cana com melaço, ou somente caldo), nutrientes e levedura são adicionados à dorna e após aproximadamente oito horas de fermentação todo o conteúdo é retirado e centrifugado. O vinho termo empregado nas usinas, sem a levedura, é direcionado para as torres de destilação e o leite de levedura segue para o tratamento ácido com  $H_2SO_4$  para descontaminação por gotejamento constante até pH 2,0. Após esse processo as leveduras passam por uma lavagem para correção do pH e retornam à dorna onde é iniciado um novo ciclo fermentativo com uma nova carga de substrato (Wheals *et al.*, 1999; Da Silva Fernandes *et al.*, 2022).

Desde o início, os avanços tecnológicos para a produção de etanol se concentraram nos aspectos agrônômicos e de engenharia associados à produção, sendo a etapa microbiológica, que é responsável pela conversão de sacarose a etanol pelas leveduras, muito pouco explorada (de Souza *et al.*, 2018).

Na produção de etanol, as leveduras devem ter características importantes como: (1) habilidade de fermentação rápida, (2) estabilidade genética, (3) osmotolerância, (4) alta tolerância ao etanol e capacidade de produzir altos níveis deste produto, (5) viabilidade celular e tolerância aos reciclos, (6) tolerância à temperatura entre outros. Existem diversas leveduras capazes de produzir etanol em larga escala mas, sem dúvida, a espécie *Saccharomyces cerevisiae* se destaca entre as demais por se adaptar melhor ao processo e também apresentar bons rendimentos na produção de etanol (Stewart, 1987; Prado *et al.*, 2020).

Um ponto importante é que em muitas usinas, apesar da levedura original selecionada ser inoculada em altas concentrações, ela era substituída rapidamente por leveduras selvagens em poucos dias durante o processo de fermentação mantendo-se até o final da safra. Em muitos casos, essa substituição não era notada, uma vez que não havia queda na produtividade da usina e, possivelmente, por serem as leveduras invasoras melhores adaptadas às condições de processo (Wheals *et al.*, 1999). Leveduras selvagens muitas vezes são capazes de assimilar os açúcares e também de produzir etanol em condições robustas de eficiência de processo (Antunes *et al.*, 2022).

Essas leveduras podem ser selecionadas e melhoradas através de diversos métodos como hibridizações cruzadas e a seleção de linhagens da natureza. Embora o desenvolvimento de cepas através do melhoramento genético tenha sido um sucesso, a permanência das leveduras geneticamente modificadas, é comprometida pela maior rusticidade e adaptação das leveduras selvagens invasoras que estão presentes no meio ambiente da usina (Stewart e Russell, 1987; Almeida Tavares, 1995; Panchal, 2020).

Reconhecendo essa limitação, o setor sucroalcooleiro passou a selecionar entre essas leveduras invasoras, aquelas que possuem as melhores características de rendimento (Wheals *et al.*, 1999) e que alcançassem altos rendimentos e produtividade para a fermentação alcoólica (Santos *et al.*, 2015).

Como resultados, foram selecionadas cepas que associavam boas características de rendimento a excelentes propriedades de rusticidade que lhes permitiam permanecer no processo por longos períodos durante a safra. Estas cepas foram utilizadas nas últimas décadas e contribuíram de maneira significativa para o desenvolvimento da indústria de etanol no Brasil, como por exemplo as cepas CAT-1 e PE-2 (Wheals *et al.*, 1999).

No entanto, com a proibição da queima da cana-de-açúcar, o meio fermentativo mudou consideravelmente sua característica devido a alteração da microbiota, o que fez com que as linhagens de levedura comerciais perdessem as características citadas anteriormente não mais adaptando-se adequadamente ao processo e conseqüentemente sendo substituídas rapidamente por leveduras selvagens (Wheals *et al.*, 1999; Basso *et al.*, 2008). Diante deste cenário faz-se a necessidade de que novas linhagens sejam descobertas e estudadas para sanar este problema e contribuir para o aumento da produção de etanol (Wheals 1999; Basso *et al.*, 2008).

Embora as cepas industriais apresentem vantagens fermentativas, essas cepas ainda carecem de informações no que concerne a caracterização do seu genoma. Apesar de linhagens laboratoriais de *Saccharomyces cerevisiae*, em particular a linhagem S288c, e a CEN.PK113 serem as cepas de leveduras mais bem caracterizadas ao nível genético, celular e molecular (Mortimer e Johnston, 1986; Fisk *et al.*, 2006), essa informação não pode ser completamente estendida para as leveduras selvagens, pois apesar de pertencerem à mesma espécie, elas apresentam características genéticas e fenotípicas diferentes. Portanto o sequenciamento de leveduras industriais e selvagens pode trazer ferramentas importantes para a melhoria do processo industrial e também um melhor entendimento das vias metabólicas que levam à características interessantes do ponto de vista industrial (Deparis *et al.*, 2017).

Trabalhos pioneiros nesta área mostraram uma análise bem detalhada de todas as características genéticas da linhagem PE-2 revelando alterações tanto em sua estrutura genômica quanto na expansão de genes que modulariam diferentes vias metabólicas quando comparados com a linhagem padrão S288c (Argueso *et al.*, 2009). Isso mostra a importância e o quanto ainda deve ser explorado detalhadamente a estrutura genética de linhagens isoladas durante o processo fermentativo, a fim de fornecer informações fundamentais para desvendar os seus mecanismos de funcionamento celular e molecular e assim contribuir com o desenvolvimento de leveduras para aplicação industrial.

Diante do exposto e focado no desenvolvimento tecnológico e industrial, uma das características de maior interesse é a termotolerância. Uma levedura exposta a fermentação alcoólica é imposta a condições de estresse ambiental ou mesmo decorrente de seu próprio metabolismo celular afetando a fluidez da membrana e interferindo no *uptake* de nutrientes pela célula. Além disso a exposição a altas temperaturas afeta de forma significativa seu metabolismo e, conseqüentemente, uma diminuição da tolerância ao etanol bem como a formação de compostos secundários como o glicerol (Bai *et al.*, 2008; de Souza *et al.*, 2018; Da Silva Fernandes *et al.*, 2022).

Desde 2009 o LBGA (Laboratório de Bioquímica e Genética Aplicada) da UFSCar sob a coordenação do Prof. Dr. Anderson Ferreira da Cunha tem isolado leveduras do processo de produção de etanol brasileiro. Atualmente esta biblioteca conta com aproximadamente 500 leveduras. O grupo de pesquisa tem ao longo dos últimos anos buscado por fenótipos de interesse industrial para aplicação em processos biotecnológicos. Dentre os fenótipos de interesse estão, termotolerância, osmotolerância e resistência ao etanol. Estudo prévio realizado durante o mestrado do aluno Jonas Paulino de Souza (Souza, 2018) proporcionou a identificação de algumas linhagens com características termotolerantes e com boas capacidades fermentativas que serviram como base para o desenvolvimento desta tese de doutorado.

Esta tese de Doutorado visou a caracterização fisiológica de uma cepa termotolerante identificada no banco de linhagens do LBGA isolada da safra de 2009 na usina São Luiz da cidade de Ourinhos no estado de São Paulo. Além disso, realizou-se a expressão diferencial de genes relacionados à eficiência fermentativa nesta linhagem em temperaturas controle (30°C) e em altas temperaturas (40°C). De modo a compreender de maneira mais ampla a influência do fenótipo na fisiologia desta levedura e sua relação com a termotolerância, realizou-se análises de transcriptoma durante fermentações em biorreatores perfeitamente agitados com fermentação contínua e volume de reação

constante, este tipo de cultivo em estado estacionário é chamado de quimiostato. O RNA obtidos destas fermentações foram extraídos e analisados o transcriptoma da cepa LBGA-01 à 30 e à 40°C, os resultados mostram a importância de genes relacionados com funções biológicas de extrema importância para a sobrevivência celular da cepa LBGA-01 quando submetida a 40°C, além de permitir múltiplas possibilidades de pesquisa com relação ao transcriptoma desta cepa.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1. Produção de etanol no Brasil**

A evolução da humanidade está diretamente associada ao aumento do consumo de bens e recursos naturais (Baptista, 2010). Com a Revolução Industrial muitas máquinas e formas combustíveis de energia foram se aprimorando ao longo do tempo e com isso o consumo de combustíveis fósseis no mundo foi crescendo e movimentando até hoje a agricultura e economia de países, como por exemplo, nos EUA e Brasil (Cortez, 2018).

Na década de 1970, o Brasil movido pela crise no petróleo adotou um programa que revolucionaria a produção e o consumo de combustíveis até hoje, o PROÁLCOOL. O impacto deste programa motivou a produção de etanol através da cana-de-açúcar e também acelerou a produção de automóveis movidos a álcool. Mesmo diante a instabilidade da economia dos combustíveis na década de 1990, o etanol se firmou como combustível e o Brasil como um dos maiores produtores de etanol do mundo (*Andrade et al.*, 2010; Cortez, 2018).

Atualmente além de contribuir para a economia do país, resistindo a crises políticas e sanitárias como o SARS-Cov2 (Vidal, 2022), o uso do etanol se consolida como uma opção sustentável, menos poluidora e causadora do efeito estufa (Demirbas, 2007).

Com a crescente da temática e o apelo pelo desenvolvimento de energia limpa e tecnologias para o aumento de fontes limpas, o etanol e a sua tecnologia de produção se tornaram objeto de estudos e desafios para o aumento da produtividade e tecnologias que impulsionem o mercado e o consumo de fontes limpas de energia.

No Brasil o etanol produzido chamado de etanol 1G é produzido através da matriz energética proveniente da cana-de-açúcar e milho, responsáveis pela produção na safra 2019/2020 de aproximadamente 30 bilhões de etanol (de Oliveira *et al.*, 2020). O Brasil é o principal produtor de cana-de-açúcar do mundo, sendo que a geografia e as condições climáticas favorecem para que o Brasil desponte tanto na produção de biomassa quanto na produção de bioetanol. Por este motivo existe também a produção e incentivos para a exploração de etanol 2G no Brasil (de Oliveira *et al.*, 2020).

Após decretos como o acordo de Paris em 2016, conferências como a COP21 e mais recentemente a COP27 o mundo se voltou formalmente para a necessidade rápida de resposta as consequências das mudanças climáticas, sendo adotado como decreto a redução de emissões de gases do efeito estufa (Solomon, 2010; Salina *et al.*, 2020;

Bertrand Dussap, 2022). Com base nos decretos, e no apelo da redução da emissão de gases do efeito estufa, e também na busca de um combustível alternativo e mais barato, houve um aumento significativo da demanda de biocombustíveis no Brasil na última década e o etanol despontou elevando sua produção (Reis *et al.*, 2022).

Muitos países da União Europeia e até mesmo EUA não conseguiram suprir esta demanda, abrindo espaço para que o Brasil exportasse etanol. Porém, com isso faz-se necessário o aumento de outras fontes de substrato como o milho, como também novas tecnologias de produção.

A projeção para a produção de etanol na safra de 2021/2022 é de 30,1 bilhões de litros (Vidal, 2022). Se comparado com estudos que mostram a projeção da produção de etanol na última década, com o início da década atual pode-se observar um aumento significativo na produção de etanol no Brasil (Reis *et al.*, 2022; Vidal, 2022).

Isso mostra como a produção de cana-de-açúcar aumentou no país mediante a demanda global seja para a produção de etanol ou de açúcar, para exportação ou comércio local, acredita-se que estes resultados estão atrelados ao desenvolvimento de tecnologias e pesquisa para o aumento da produtividade (Reis *et al.*, 2022).

Uma das alternativas e investimento é a utilização de leveduras personalizadas com fenótipos de interesse. Essas leveduras podem alavancar a produtividade em etanol, contribuindo de forma significativa para a economia, suprimindo a demanda da planta energética, atendendo as necessidades de mercado e minimizando impactos ambientais (Prado *et al.*, 2020).

## **2.2. *Saccharomyces cerevisiae* na produção de etanol**

A espécie *Saccharomyces cerevisiae* é o microrganismo eucarioto mais usado em vários processos fermentativos industriais, sendo um dos principais a produção de etanol (Walker e Walker, 2018; Da Silva Fernandes *et al.*, 2022).

As leveduras são organismos unicelulares e estão presentes no ar, no solo, na pele, nas plantas dentre outros lugares. Sua forma celular pode ser esférica, oval ou ainda alargadas. Seu tamanho pode variar de acordo com a nutrição, tipo de linhagem entre outros fatores. Existem várias espécies de leveduras, porém a espécie *S. cerevisiae* é a mais usada e eficaz na fermentação alcoólica, por apresentar propriedades únicas de resistência a diversos fatores de estresse ambientais, como altas concentrações de etanol, pH ácido e níveis baixos de oxigênio. Além disso essa espécie de levedura apresenta

ótimo perfil fermentativo com altos valores de rendimento no processo de produção de etanol. (Dmytruk *et al.*, 2017).

Esta levedura é capaz de crescer em condições de pH de 4,6-6,5 e também em temperaturas de 30-40°C (Basso *et al.*, 2008; Favaro *et al.*, 2019). Além disso essa espécie possui a capacidade de se adaptar as mudanças de concentração de etanol e até mesmo desenvolver uma termotolerância conforme o aumento da temperatura ao longo do processo (de Vasconcelos, 2015). Vale a pena destacar que, embora esta linhagem apresente tais características, na indústria as células de leveduras são submetidas a diferentes estressores que afetam diretamente a atuação delas no processo fermentativo (Deparis *et al.*, 2017).

A elevação da temperatura nas dornas, pH ácido, toxicidade alcoólica e inibidores presente no caldo de cana ou no melaço são alguns dos estressores que a célula é exposta e que podem prejudicar o processo fermentativo (Coradini *et al.*, 2021). Contaminações por bactérias, altas concentrações de açúcar, pressão osmótica e problemas físicos durante o processo também podem fazer com que a levedura não atue adequadamente na conversão dos açúcares fermentescíveis em etanol (Baptista *et al.*, 2021).

### **2.3. *Saccharomyces cerevisiae* termotolerante**

As leveduras termotolerantes são capazes de fermentar açúcares e manter seu metabolismo acima de 40°C. Embora algumas linhagens de *S. cerevisiae* apresentem tal característica, existem algumas formas de se melhorar ou obter este fenótipo de interesse, por exemplo, com o uso da engenharia genética e evolutiva em meios de seleção, dentre outras (Edgardo A *et al.*, 2008).

Na produção de etanol existe o controle da variável temperatura uma vez que as leveduras da espécie *Saccharomyces Cerevisiae* possuem uma faixa de temperatura ótima de 30-35°C. Nesta faixa de temperatura o metabolismo da levedura não sofre influências negativas apresentando bons resultados fermentativos para obtenção do etanol. (Szczo drak e Targoński, 1988; Liu, 2006; Edgardo *et al.*, 2008; Deparis *et al.*, 2017).

Devido à vasta geografia do Brasil e, por ser um país tropical, em determinadas regiões o processo fermentativo pode atingir facilmente temperaturas acima de 40°C (Deparis *et al.*, 2017). O processo fermentativo pelas leveduras é exotérmico, determinando o aumento da temperatura nas dornas. Para controlar essa variável há o uso

de trocadores de calor, para a manutenção da temperatura ótima de processo (32-34°C), porém manter a temperatura nas dornas de fermentação se torna um processo caro mediante os gastos de energia e água para controlar esta variável (de Souza *et al.*, 2018).

O uso de água no resfriamento das dornas durante a safra é do ponto de vista ambiental uma preocupação diante a necessidade de mitigar cada vez mais a exploração de recursos hídricos. A captação de água, é de forma externa, com um grande volume de água captada e direcionada para o funcionamento do processo. Cabe ressaltar, que o uso de água nas usinas sucroalcooleiras não é somente utilizado para o resfriamento das dornas, mas também em outra etapas do processo, como por exemplo, a lavagem da cana, extração do caldo, geração de vapor e potência, dentre outros (Pereira, 2021).

Algumas usinas sucroalcooleiras acabam fazendo a captação da água de fontes naturais (poços, rios, lagos) por este motivo legislações e medidas restritivas foram criadas para minimizar a captação de água para uso nas usinas sucroalcooleiras (CETESB 2008; Pereira, 2021).

Uma maior resistência das leveduras a elevadas temperaturas de fermentação melhoraria a performance fermentativa do processo, minimizando o alto consumo de água nas dornas e o uso das torres de resfriamento. Além disso, também minimizaria as contaminações por outras leveduras (selvagens) bem como custos de destilação (Hamelinck *et al.*, 2005; Stephen *et al.*, 2012).

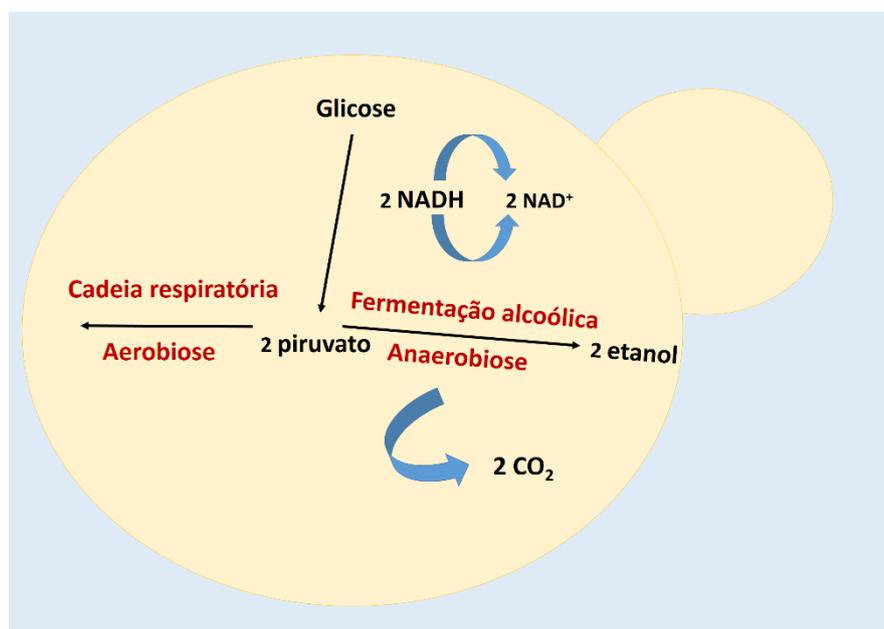
Diante os benefícios apresentados neste tópico, estudar linhagens termotolerantes com bons rendimentos de etanol pode melhorar as condições de operação do processo e aumentar a produtividade bem como reduzir custos e impactos ambientais (Dekker *et al.*, 2021).

#### **2.4. Fermentação alcoólica e metabolismo celular de *S. cerevisiae***

Na indústria sucroalcooleira a sacarose é convertida a glicose e frutose (equação 1) e são esses os açúcares catabolizados pela levedura para a produção de etanol (de Souza *et al.*, 2018). Posteriormente ocorre bioquimicamente a conversão anaeróbia da glicose em etanol através da via glicolítica (equação 2), principal via metabólica na produção de etanol em *S. cerevisiae* durante a fermentação alcoólica.

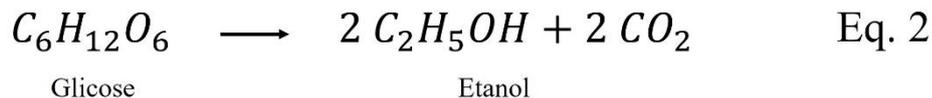
Mais detalhadamente, após a hidrólise da sacarose a glicose e frutose que são açúcares fermentescíveis são fermentados através da via glicolítica na ausência de oxigênio, para cada molécula de glicose metabolizada duas moléculas de piruvato são

produzidas no citoplasma da célula e posteriormente o piruvato é reduzido a etanol e CO<sub>2</sub> (Figura 1) em duas etapas sendo a primeira a descarboxilação catalisada pela piruvato-decarboxilase formando uma molécula de acetaldeído que na sequência é reduzida em etanol pela enzima álcool desidrogenase (Moriya e Johnston, 2004; Stambuk *et al.*, 2009; de Souza *et al.*, 2018).



**Figura 1. Metabolismo de glicose em *S. cerevisiae*.** Fonte: elaborado pelo autor, adaptado de (LORCA MANDUJANO).

O etanol pode ser obtido através da fermentação de uma gama de fontes de carbono, nas usinas de cana-de-açúcar para a produção do etanol 1G é utilizado o mosto rico em sacarose (C<sub>12</sub>H<sub>22</sub>O<sub>11</sub>) que através da ação da enzima invertase expressa pela levedura, este açúcar é hidrolisado em D-glicose e D-frutose, as equações 1 e 2 representam as principais reações químicas envolvidas na produção de etanol (Santiago e Rodrigues, 2017). Outros açúcares como os de origem de material lignocelulósicos também são uma alternativa no emprego para a produção de etanol, como por exemplo a galactose, manose, arabinose e xilose. Esses açúcares são considerados vantajosos pois são provenientes de uma fonte de matéria renovável encontrado em larga escala e de baixo custo (Santiago e Rodrigues, 2017).

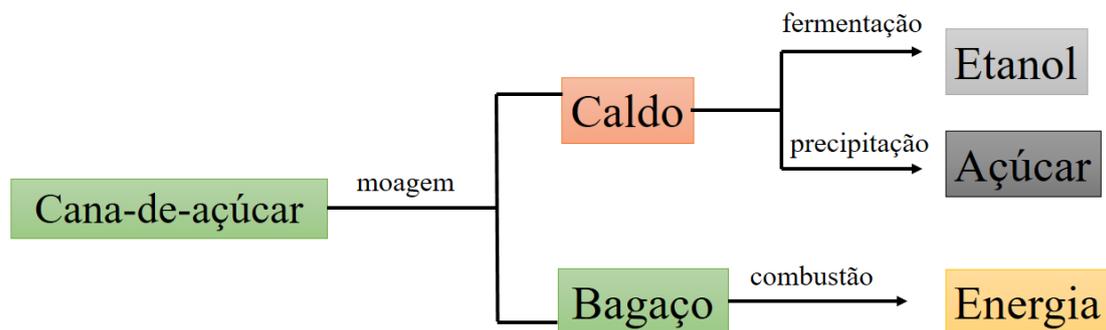


Os açúcares presentes na fermentação não são exclusivamente usados para a produção de etanol, mas também usados no crescimento celular e na produção de outros compostos como glicerol e álcoois superiores fazendo com que o rendimento da fermentação varie de acordo com as condições de processo. O rendimento teórico desta reação é 0,511 kg de etanol por kg de hexose consumida e de 0,489 kg de CO<sub>2</sub> por kg de hexose (Andrietta *et al.*, 2007, 2011; Bai *et al.*, 2008; de Souza *et al.*, 2018).

## 2.5. Formas de obtenção de etanol e processos utilizados.

A principal fonte de matéria-prima empregado na produção de etanol brasileiro é a cana-de-açúcar devido a sua alta disponibilidade e custo e também por ser rica em açúcares fermentescíveis. No processo brasileiro de produção de etanol o mesmo é produzido da fermentação de mostos produzidos a partir da mistura de caldo de cana-de-açúcar ou água e melão a fim de obter concentrações de açúcares fermentáveis de cerca de 20 Grau Brix (180 g.L<sup>-1</sup> de sacarose, considerando 90% de pureza) (Carlos *et al.*, 2011).

No Brasil, a expansão e crescimento da produção de etanol de cana-de-açúcar tem impulsionado a economia com projeções positivas para o futuro. Além de produzir etanol, a cana-de-açúcar quando processada pode gerar outros compostos de valor agregado como o açúcar e, através da queima do bagaço, a produção de energia. A figura 2 mostra os principais produtos de valor agregado derivados da cana-de-açúcar.



**Figura 2. Fluxograma simplificado da produção de etanol 1G e açúcar.** Fonte: adaptado de Pereira, 2016.

No Brasil a produção de etanol é realizada através dos processos fermentativos, operações unitárias classificadas de acordo com a adição do substrato e retirada de produto formado. As dornas de fermentação são reatores biológicos e podem ser operadas nas formas batelada, batelada alimentada e contínua, com ou sem recirculação de células. No Brasil a fermentação para a produção de etanol é principalmente realizada (75%) pelo processo batelada alimentada (Wheals *et al.*, 1999; Carlos *et al.*, 2011; de Souza *et al.*, 2018).

## 2.6. Processo Batelada

No processo batelada todos os nutrientes são adicionados no reator no início da fermentação (Badino JR e Cruz, 2011). Único líquido que pode ser adicionado ao processo no caso para controle de pH são soluções ácido/base e antiespumantes para o controle de espumas. O volume permanece constante durante o processo, porém, após algumas horas o processo se torna limitado devido à falta de nutrientes ou acúmulo de inibidores (Godoy *et al.*, 2008). Além disso neste modo de operação, as células não são reutilizadas, o reator é lavado e esterilizado a cada ciclo encarecendo os custos operacionais e, portanto, tornando-o inviável (Sanchez e Cardona, 2008).

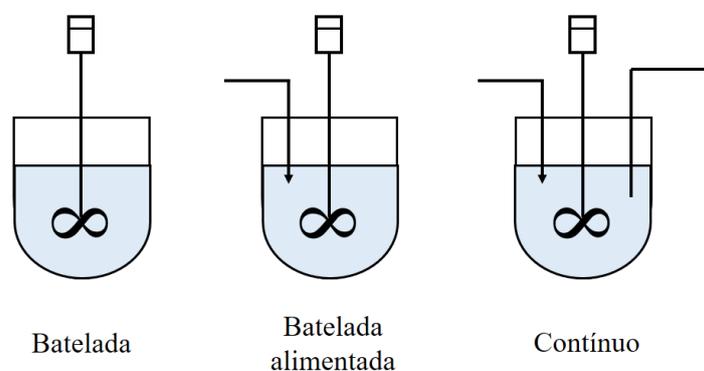
## 2.7. Processo Batelada Alimentada

Uma variação do processo onde somente um ou mais nutrientes são adicionados no biorreator e o produto permanece no biorreator até o final do processo ou seja até o final do ciclo fermentativo que corresponde a 8 horas (Basso *et al.*, 2011). Neste tipo de processo, a vazão de alimentação de substrato pode ser controlada com a intenção de deslocar vias metabólicas para a produção de determinado produto, o inóculo inicial corresponde em 20% do volume total da dorna (Della-Bianca *et al.*, 2013).

Ao longo do tempo, o processo de fermentação em batelada alimentada ganhou o emprego da etapa de tratamento ácido do creme de levedura. O objetivo desta etapa é diminuir a contaminação e possibilitar a reutilização das células de leveduras como inóculo nos próximos ciclos fermentativos. Este processo de reciclo consiste em uma centrifugação para a separação das células e do vinho, denominado “Melle-Boinot” este reciclo das leveduras tem como intuito aumentar a produtividade em relação ao processo batelada (Carlos *et al.*, 2011; Della-Bianca *et al.*, 2013; de Vasconcelos, 2015).

## 2.8. Processo Contínuo

O próprio nome já caracteriza este processo por possuir uma alimentação contínua do substrato a uma vazão constante ao mesmo tempo que o caldo fermentado é retirado mantendo o volume constante. Desta forma o sistema trabalha até atingir o estado estacionário sem alteração das variáveis do processo, neste ponto a concentração de células bem como o substrato e produtos permanecem constantes ao longo do tempo (Godoy *et al.*, 2008; Neto *et al.*, 2009). A figura 3 mostra um esquema simplificado dos processos descritos neste tópico.



**Figura 3. Configurações de reatores para a produção de etanol classificados de acordo com a alimentação de substrato. Fonte: elaborado pelo autor**

## **2.9. Biotecnologia de Leveduras**

A Biotecnologia tem impulsionado a evolução e o desenvolvimento de tecnologias nas áreas da saúde, agronomia e industrial dentre outras, causando impacto na sociedade e na qualidade de vida das pessoas e também na economia de empresas. Através de ferramentas de última geração a Biotecnologia tem mudado a direção das perguntas e respostas que antes não tinham solução (Glick e Patten, 2022).

Na indústria do etanol seja no campo ou na fábrica a biotecnologia está presente diretamente no processo fermentativo e nas plantações da cana-de-açúcar (de Souza; Prado *et al.*, 2020).

No campo da biotecnologia, para conhecimento da constituição genética e seleção das leveduras durante o processo fermentativo, as leveduras são acompanhadas ao longo da safra por testes de cariotipagem ou por genotipagem por PCR (Carvalho-Netto *et al.*, 2013; Prado *et al.*, 2020; Lorca Mandujano *et al.*, 2022). Ao nível molecular, a biotecnologia de leveduras ainda pode revelar muitas informações sobre o genoma e o transcriptoma de leveduras pois é no DNA e RNA que todas as respostas relacionadas a fenótipos de interesse para a indústria estão (Vezinhet *et al.*, 1990; Mortimer, 2000; Geladé *et al.*, 2003; Bernardi *et al.*, 2008).

Foi em 1996 que a levedura *S. cerevisiae* teve seu genoma sequenciado sendo o primeiro organismo eucarioto a ter o genoma sequenciado na era moderna (Engel *et al.*, 2014; García-Sancho *et al.*, 2022; Goffeau *et al.*, 1996). No Brasil na primeira década dos anos 2000 as linhagens CAT-1 e PE-2 tiveram seu genoma sequenciado permitindo um melhor conhecimento da levedura para pesquisas de melhoramento genético e até hoje são usadas como as principais leveduras para a produção de etanol devido suas ótimas características e rendimento (Argueso *et al.*, 2009; Babrzadeh *et al.*, 2012).

Atualmente tecnologias de biologia molecular tem gerado dados genéticos de leveduras em uma velocidade alta, o sequenciamento de última geração tem possibilitado não somente conhecer o genoma mas também o transcriptoma de leveduras bem como os genes envolvidos em determinados fenótipos de interesse (Hernández-García *et al.*, 2022). O sequenciamento alinhado a ferramentas de bioinformática são poderosas armas que unidas revelam a diferença dos genes expressos em uma linhagem, como por exemplo

em uma linhagem termotolerante comparada a uma termosensível. Com isso é possível até mesmo entender de forma evolutiva em seu genoma quais mutações ocorreram, polimorfismos, inserções ou deleções em seu DNA que levaram a aquisição do fenótipo (Deparis *et al.*, 2017; Jia *et al.*, 2022).

Essas ferramentas e estes conhecimentos podem auxiliar a manipulação de linhagens para a personalização de leveduras com características específicas do processo fermentativo solucionando problemas e impactando no rendimento em etanol e na produtividade diminuindo os custos do processo (Gavahian e Tiwari, 2020).

Com o advento da tecnologia de CRISPR a edição de genomas de leveduras tornou-se uma realidade e assim também o desenvolvimento de linhagens mais robustas para o processo (Cai *et al.*, 2019). No entanto, sua aplicação ainda é discutida mundialmente, uma vez que podem ser consideradas Organismos Geneticamente Modificados (OGMs) (Tyagi *et al.*, 2020). No Brasil já existe uma normativa aprovada em 2018 pelo Conselho Nacional de Comissão Técnica de Biossegurança (CTNBio) que autoriza a avaliação e análise de caso para considerar um produto como sendo GM ou não. De acordo com algumas considerações o organismo modificado pode ser considerado não transgênico e ser isento das diretivas de regulamentação e avaliação (Ceccato-Antonini e Covre, 2020; Nepomuceno *et al.*, 2020).

Com base no exposto e diante do ponto de vista biotecnológico e industrial, este trabalho de doutorado teve como objetivo caracterizar uma linhagem selvagem de *S. cerevisiae* isolada da produção de etanol e também fazer um estudo genético mais detalhado de genes envolvidos com o fenótipo de termotolerância através das técnicas de expressão gênica por q-PCR e sequenciamento do transcriptoma. Esses estudos são importantes para melhorar o processo de produção de etanol e permitir um melhor conhecimento sobre a fisiologia da levedura isolada.

### **3. OBJETIVOS GERAIS**

Caracterizar a fisiologia e o transcriptoma de uma linhagem termotolerante denominada LBGA-01 isolada da produção de etanol visando um melhor entendimento de seu potencial fermentativo e na identificação de genes diferencialmente expressos que possam ser alvos para estudo da característica de termotolerância.

#### **3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Para atingir o objetivo central deste trabalho foram realizados os seguintes testes:

- ✓ Identificação do fenótipo de termotolerância através da técnica de dropout
- ✓ Genotipagem por PCR e sequenciamento da região ITS para identificação das cepas isoladas
- ✓ Testes de crescimento e consumo de glicose em meio líquido à 30 e 40°C
- ✓ Testes de crescimento na presença de inibidores da produção de etanol 1G e 2G à 30 e 40°C
- ✓ Análise de expressão gênica por qPCR de genes relacionados a eficiência fermentativa à 30 e 40°C
- ✓ Análise dos metabólitos e compostos secundários produzidos por esta linhagem durante a fermentação em biorreatores à 30 e 40°C por HPLC
- ✓ Análise de parâmetros fermentativos à 30 e 40°C simulando a processo de produção brasileiro de etanol.
- ✓ Sequenciamento do transcriptoma desta linhagem em fermentação em biorreatores tipo quimiostato à 30 e 40°C
- ✓ Análises de Bioinformática de genes diferenciais nas condições analisadas.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Isolamento de leveduras e identificação de leveduras termotolerantes

As cepas de levedura usadas neste estudo foram obtidas de tanques de fermentação após tratamento ácido, na usina de cana-de-açúcar São Luiz localizada na cidade de Ourinhos SP, Brasil, ao longo das safras de 2009 à 2014.

Esta etapa foi realizada em trabalhos prévios e até a conclusão deste trabalho o protocolo foi mantido para o isolamento e caracterização das cepas, e aproximadamente 300 cepas foram avaliadas. As amostras foram coletadas e armazenadas em frascos cônicos estéreis, levadas ao laboratório e centrifugadas a 3000 rpm por 5 minutos. O precipitado foi lavado 3 vezes com água estéril, e após a última lavagem, 5g do precipitado foram ressuspensos em um volume de 50 mL.

Foram realizadas diluições em série (1:50; 1: 2500; 1: 12.500) e a levedura foi isolada usando YPD sólido (1% (m/v) de extrato de levedura, 2% (m/v) de peptona, 2% (m/v) de glicose e 2% (m/v) de ágar) incubados por aproximadamente 48h a 30°C. Após esse período, 10 colônias foram isoladas aleatoriamente para análises de crescimento na temperatura controle (30 °C) e na temperatura de estresse (40 °C) utilizando a análise de dropout com diluições em série de  $10^6$  a  $10^3$  cel/ml<sup>-1</sup>.

Para cultivo e estoque das linhagens selecionadas foi feito um pré-inóculo em meio líquido YPD 2% (1% (m/v) de extrato de levedura, 2% (m/v) de peptona, 2% (m/v) de glicose) seguidos de um crescimento por 16 horas em câmara rotativa (Shaker) à 30°C e 180 rpm. Após o crescimento, 500 µl do meio de cultura contendo a linhagem *S. cerevisiae* foi transferida para tubos contendo 500 µl de glicerol 60% (v/v) e mantidos a -80°C no ultrafreezer. Todas as linhagens foram genotipadas e descritas a seguir. Também foram avaliadas o crescimento em altas temperaturas usando a técnica de dropout com diluição seriadas de  $10^6$  a  $10^3$  cel/ml<sup>-1</sup>.

### 4.2. Extração do DNA

Para obter o DNA das cepas termotolerantes avaliadas neste estudo, foi utilizado o protocolo de extração de DNA contendo fenol-clorofórmio. As células foram cultivadas overnight em 2% de meio YPD (1% (m/v) de extrato de levedura, 2% (m/v) de peptona, 2% (m/v) de glicose) líquido. Após esse período, as células foram centrifugadas e lisadas com esferas de vidro em 500 µL de tampão de extração (200 mM Tris-HCl, 25 mM EDTA

e 0,5% SDS) (Malavazi e Goldman, 2012). Posteriormente, foram adicionados 400 µL de fenol-clorofórmio (1:1) e a amostra foi centrifugada por 10 min a 13.000 rpm. O DNA foi precipitado usando 600 µL de isopropanol e lavado com 300 µL de etanol 70%. O DNA foi eluído em 80 µL de água (RNase Free Water) e armazenado a - 20°C para análises subsequentes.

### **4.3. Identificação molecular para caracterização individual de cepas isoladas e classificação por espécies**

Para identificar as espécies de leveduras, experimentos de PCR foram realizados para amplificar o fragmento de DNA entre as regiões intergênicas ITS-1, ITS2 e o gene 5.8S, utilizando primers específicos ( ITS1 e ITS4) como descrito na literatura (*Josepa et al.*, 2000; *Šuranská et al.*, 2016).

O produto de amplificação (PCR) foi enviado para sequenciamento, e os resultados foram comparados usando a ferramenta BLASTN (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), bem como os resultados de tamanho de fragmento correspondentes amplificados. A fim de caracterizar as cepas termotolerantes foi realizada a análise de genotipagem por PCR usando primers que foram desenvolvidos com base na amplificação de regiões polimórficas (*Carvalho-Netto et al.*, 2013).

### **4.4. Perfil de crescimento de levedura termotolerante**

Os testes de crescimento das cepas termotolerantes e controle (CAT-1) foram realizados em 50 mL de meio YPD 2% (1% (m/v) de extrato de levedura, 2% (m/v) de peptona, 2% (m/v) de glicose) em erlenmeyer de 250 ml com DO<sub>600nm</sub> de 0,1 à 30 e 40°C, com agitação a 180 rpm por 6 horas (condição industrial). A cada 2 horas foi retirada uma alíquota de 1 ml e a DO<sub>600nm</sub> foi medida para a construção das curvas de crescimento. Os resultados foram obtidos a partir de triplicatas biológicas.

### **4.5. Ensaios de fermentação empregando cepas termotolerantes**

Para investigar a capacidade fermentativa das células, leveduras isoladas foram submetidas a testes de fermentação em meio YPD usando 4 e 8% (m/v) de glicose como

substrato fermentativo, em duas temperaturas distintas, 30 e 40°C por 8 horas de fermentação a fim de simular o tempo de um ciclo fermentativo da usina de cana-de-açúcar. As leveduras foram inoculadas em 50 ml de meio YPD (4 e 8% (m/v) em erlenmeyer de 250 mL com densidade óptica final a 600 nm ( $DO_{600nm}$ ) de 0,1 para garantir inoculações padronizadas, e incubadas em estufas à 30 e 40°C sem agitação.

A cada 2 horas uma alíquota de 1 ml das amostras foram coletadas para análises de consumo de glicose. O açúcar (glicose) foi medido por método enzimático colorimétrico da glicose oxidase (glicose GOD-PAP), seguindo as recomendações do fabricante. Neste método o indicador colorimétrico é a Quinonimina, o qual é gerado a partir da 4 - Aminoantipirina e Fenol pelo peróxido de Hidrogênio sob ação catalítica da peroxidase (Reação Trinder).

#### **4.6. Caracterização da resistência aos inibidores das células de levedura (etanol, açúcar, ácido acético, ácido lático, furfural)**

Para cada inibidor, foram estabelecidas concentrações de acordo com a literatura (Tabela 1). As concentrações foram usadas para avaliar a resistência da levedura termotolerante LBG-01 em comparação com a levedura industrial CAT-1 e a levedura haploide de laboratório Sc-9721 (MATa *his 3-D200 URA 3-52 leu2D1 lys 2D202 trp 1D63*) na presença dos inibidores.

As cepas foram mantidas até a fase de logarítmica de crescimento, à 30°C com agitação de 180 rpm, posteriormente foram diluídas para um valor de 0,1  $DO_{600nm}$  em 50 mL de meio YPD (1% (m/v) de extrato de levedura, 2% (m/v) de peptona e 2% (m/v) de dextrose) contendo o estressor/inibidor avaliado na concentração desejada. O ensaio foi realizado em triplicata usando Erlenmeyer de 250 ml, incubados à 30°C, 180 rpm por 8h. A cada 2 horas, um alíquota de meio de cultura foi removida e a absorbância foi medida a 600 nm.

**Tabela 1. Concentração limítrofes de inibidores/estressores selecionados na literatura para a realização dos testes de resistência na presença de inibidores da produção do etanol 1G e 2G utilizando a cepa LBGA-01 à 30 e 40°C.**

<i>Inibidor</i>	<i>Concentração</i>	<i>Referência</i>
<i>Etanol</i>	16% (v/v)	(Pais et al., 2013)
<i>Sacarose</i>	30% <sup>a</sup> (m/v)	(Mukherjee et al., 2017)
<i>Ácido acético</i>	2% (v/v)	(Giannattasio et al., 2005)
<i>Ácido lático</i>	4% (v/v)	(Dorta et al., 2006)
<i>HMF</i>	40mM	(de Mello et al., 2019)
<i>Furfural</i>	0.9mM	(de Mello et al., 2019)

<sup>a</sup>Neste caso o meio de cultura usado foi somente composto de YP2X (2% Extrato de levedura e 4% de peptona), adicionando a concentração do carboidrato desejado. Fonte: Elaborada pelo autor.

#### **4.7. Análise de expressão gênica por q-PCR**

O RNA total foi extraído com o reagente Trizol (Invitrogen, Rockville, MS, EUA), de acordo com o protocolo do fabricante. As amostras foram quantificadas usando um NanoVue Espectrofotômetro ND-1000 (GE Healthcare, Chicago, Illinois, EUA). Amostras de RNA (1 µg) foram submetidas ao tratamento com DNaseI (Invitrogen, Rockville, MS, EUA) e para a obtenção do cDNA as amostras foram transcritas utilizando oligo dTV e mistura de primers aleatórios (Termo Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA). Os oligonucleotídeos foram projetado usando o programa PrimerExpress™ (Aplicado Biosystems, Foster City, CA, EUA) (Apêndice C). A concentração de cada primer foi determinada (a melhor concentração foi de 150 nM para todos os primers usados neste estudo) e a eficiência de amplificação foi calculada de acordo com a equação  $E (-1/\text{inclinação})$  para confirmar a precisão e reprodutibilidade das reações. Amplificação a especificidade foi verificada executando um protocolo de dissociação. qPCRs foram realizados no aparelho StepOne Plus Real-time PCR System (Termo Scientific Waltham, Massachusetts, EUA). A “fold-change” na abundância de mRNA foi calculado usando  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  (Regenberg *et al.*, 2006) e todos os valores foram normalizados como a expressão do gene beta actina (ACT1).

#### **4.8. Fermentações em biorreatores (quimiostato) nas condições controle (30°C) e de estresse (40°C).**

As fermentações utilizando quimiostatos foram realizadas nas dependências do laboratório de bioprocessos do Dep. de Engenharia Química da Escola Politécnica de Engenharia da Universidade de São Paulo - USP sob a orientação do Prof. Dr. Thiago Olitta Basso. Todos os ensaios foram realizados em triplicatas biológicas. Os ensaios tiveram como objetivo obter dados relacionados com a formação dos produtos secundários bem como a produção de etanol à 30 e 40°C bem como averiguar as vias metabólicas envolvidas com a formação destes produtos. Além disso através destes ensaios foi possível obter as células de leveduras no estado estacionário da fermentação para a obtenção do RNA e posteriormente as análises de transcriptoma.

##### **4.8.1 Fermentação em biorreatores (Quimiostato)**

Os cultivos em biorreatores (quimiostato) com cepa *S. cerevisiae* LBGA-01 foram realizados em um biorreator do modelo Labfors 5 (Infors AG, Suíça) de 2,0 L com jaqueta d'água e volume de trabalho de 1,0 L mantido constante por um dreno mecânico controlado por uma bomba peristáltica. A composição do meio de cultura (Apêndice E) para todos cultivos foi a descrita por Verduyn (Verduyn *et al.*, 1992), contendo glicose como fonte de carbono (24 g/L), sulfato de amônio como fonte de nitrogênio e suplementado com ergosterol e ácidos graxos insaturados na forma de Tween 80, que foram dissolvidos em etanol 96% (v/v) em ebulição até concentrações de 0,01 e 0,42 g/L<sup>-1</sup>, respectivamente (Andreasen, 1953; Andreasen e Stier, 1954). Todos os cultivos quimiostáticos foram realizados sob condição anaeróbica, que foi controlada por descarga de gás nitrogênio industrial com vazão de 0,5 nl/min.

A frequência de agitação foi ajustada para 800 rpm, temperatura foi controlada à 30°C e 40°C, e o pH foi controlado em 5,0 via adição controlada de solução de KOH 2 M. O Pré-inóculo para os cultivos em biorreatores foi cultivado em um agitador orbital (shaker) overnight a 30°C e 200 rpm em erlenmeyer de 250 ml contendo 30 ml do meio definido, com 20 g/L<sup>-1</sup> glicose inicial. Posteriormente o pré-inóculo foi adicionado no biorreator e um cultivo em batelada foi iniciado para crescimento da levedura e acompanhado por 24 horas. Após exaustão da fonte de carbono (que foi monitorada por

uma queda acentuada na concentração de CO<sub>2</sub> utilizando um analisador de gases acoplado ao sistema do biorreator), o cultivo em batelada foi alterado para modo contínuo com um meio fresco, em uma alimentação de 100 ml/h<sup>-1</sup>, que correspondeu a uma taxa de diluição de 0,10 h<sup>-1</sup>, assumindo um volume de trabalho de 1,0 L. O tempo de fermentação em quimiostato foi por pelo menos cinco tempos de residência de 10 horas antes da amostragem. Neste ponto as células se encontram em estado estacionário e é observado uma variação inferior a 2% em sua massa durante, durante pelo menos cinco tempos de residência. A fonte de carbono residual, etanol, glicerol e concentrações de ácidos orgânicos foram quantificados por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) usando o HPLC modelo Prominence (Shimadzu Corporation, Japão) e uma coluna analítica HPX-87H (Bio-Rad Laboratories, EUA) a 60 °C com 5 mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> como fase móvel a 0,6 ml/min<sup>-1</sup>.

#### **4.9. Extração de RNA total das células de *Saccharomyces cerevisiae***

A extração do RNA total das fermentações a 30°C e 40°C foi realizada usando aproximadamente 100 mg de células congeladas. O RNA foi isolado usando o kit da marca Qiagen<sup>®</sup> seguindo o protocolo estabelecido pelo fabricante e as amostras foram reservadas em ultrafreezer -80°C para o sequenciamento do mRNA. A qualidade e concentração do RNA foi verificada no Bioanalyzer 2100<sup>®</sup> (Agilent, Santa Clara, CA, USA).

##### **4.9.1. Preparo das bibliotecas para sequenciamento do transcriptoma**

As bibliotecas de sequenciamento foram preparadas usando o TruSeq<sup>®</sup> Stranded mRNA Kit (Illumina<sup>®</sup>). Em resumo, os RNAs poli-A foram capturados usando esferas magnéticas poli-T oligo-ligadas. Os RNAs poli-A foram então fragmentados, submetidos à síntese de cDNA de fita dupla, ligados com adaptadores de índice duplo, enriquecidos por PCR e purificados para criar a biblioteca de cDNA final. Um kit de DNA de alta sensibilidade (Agilent) foi usado para confirmar o comprimento da biblioteca (~300 bp) e a falta de dímeros. Finalmente, as bibliotecas foram quantificadas por PCR quantitativa usando o KAPA Library Quantification Kit (KAPA), agrupadas e a concentração final da biblioteca ajustada a 1 nM com base no Qubit dsDNA HS Assay Kit (ThermoFisher Scientific). O sequenciamento foi realizado no instrumento NextSeq 550 (Illumina)

usando 1,8 pM de bibliotecas agrupadas e o Kit NextSeq 500/550 High Output v2.5 (75 ciclos).

A preparação das bibliotecas bem como o sequenciamento foram conduzidos pelo grupo de pesquisa do Prof. Dr. Marcos Chiaratti da Universidade Federal de São Carlos – UFSCar (São Carlos, São Paulo, Brasil)

#### **4.10. Análise por bioinformática das sequências geradas por RNA-Seq das fermentações a 30 e 40°C utilizando a linhagem termotolerante LBGA-01**

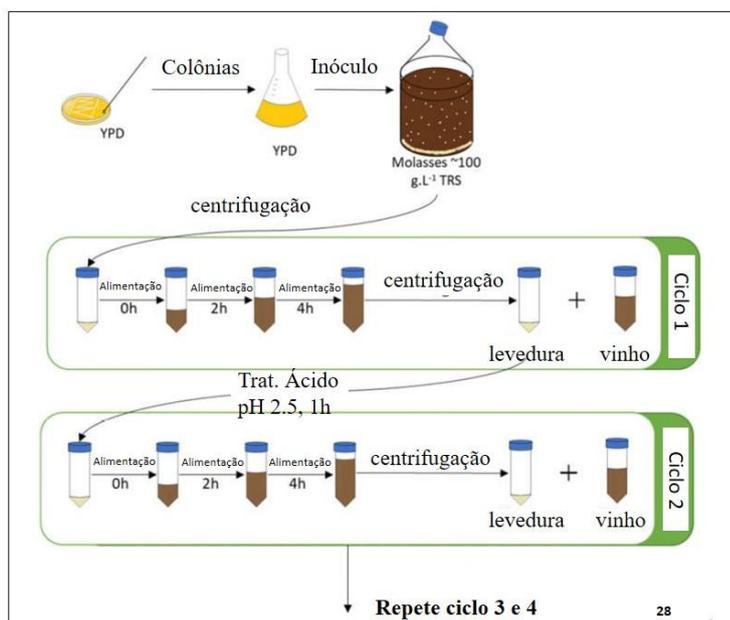
As análises foram realizadas em colaboração com o grupo do laboratório de biologia integrativa e sistêmica (CBMEG-UNICAMP) coordenado pelo Prof. Marcelo Mendes Brandão. Resumidamente, as sequências originadas foram submetidas a triagens de qualidade utilizando as ferramentas FastQC e Trimmomatic (Bolger *et al.*, 2014), para remoção de adaptadores e possíveis erros de leitura. As sequências geradas foram alinhadas utilizando o software STAR v 2.5.3 (Dobin *et al.*, 2013) com os parâmetros recomendados para o genoma de leveduras, sequência de referência S288C, versão R64-1-1, obtida pelo consórcio *Saccharomyces* Genome Database (SGD). A expressão gênica diferencial foi avaliada usando o pacote DESeq2 (Love *et al.*, 2014)

#### **4.11. Fermentação simulando o processo de produção de etanol brasileiro**

Os ensaios em escala de bancada da fermentação industrial foram realizados em triplicata usando o protocolo para produção brasileira de etanol 1G descrito na literatura (Raghavendran *et al.*, 2017). Para elucidar e melhor entender o processo utilizado no protocolo, abaixo é mostrado no esquema representativo, como o experimento foi conduzido. Vale ressaltar que estes ensaios foram realizados com a intenção de mimetizar e chegar mais próximos a condições reais de processo das usinas de cana-de-açúcar para a produção de etanol. Este método em nenhum momento deve ser comparados com as condições realizadas nos ensaios utilizando o quimiostato, uma vez que no quimiostato as condições são controladas e ideais.

Nos ensaios de ciclos as condições assemelham-se as condições de operação nas dornas fermentativas bem como os inibidores presentes no processo. O que pode ser esperado com relação aos resultados nestes ensaios é uma tendência com relação ao o

perfil fermentativo utilizando a cepa termotolerante à 34 e à 40°C em condições próximas a do processo industrial brasileiro.



**Figura 4. Esquema representativo das fermentações com ciclos seguindo o protocolo descrito por (Raghavendran *et al.*, 2017). Fonte: Elaborado pelo autor.**

O rendimento do etanol para cada ciclo foi calculado conforme descrito na literatura (Lino *et al.*, 2018). Um fator de correção para a densidade celular foi aplicado e um volume específico de 0,7 mg.g<sup>-1</sup> (base úmida) foi considerado para células de leveduras. Assim para o rendimento em etanol é considerado o etanol do vinho centrifugado e a da biomassa (pellet).

Um balanço de massa para etanol é aplicado como diferença entre o teor de etanol no final de cada ciclo e o etanol no início (vinho retornado + biomassa de levedura (pellet) do ciclo anterior). O rendimento de etanol é expresso como uma porcentagem de etanol teórico máximo que pode ser produzido pelo teor total de açúcar pela equação 3 abaixo.

Eq. 3:

$$Etanol\% = \left( \frac{100}{51,11 \cdot V_s \cdot ART} \right) * \{ (V_w + 0,7 \cdot P) * ET (V_v + 0,7 \cdot Pp) * ET_p \}$$

Onde,  $V_s$  é o volume de substrato (ml), o ART (g.100/mL<sup>-1</sup>) é a concentração de açúcares totais no mosto, 51,11 é a quantidade de etanol (g<sub>etanol</sub>) capaz de ser produzido

em cada 100g de ART<sup>-1</sup>.  $V_w$  é o volume de vinho centrifugado (ml),  $P$  é o pellet centrifugado da biomassa,  $ET$  é a concentração de etanol no vinho (% w \* V<sup>-1</sup>),  $P_p$  é o pellet da biomassa de levedura do ciclo anterior,  $ET_p$  é a concentração de etanol do vinho centrifugado do ciclo anterior e  $V_v$  é o volume de vinho do ciclo anterior.

#### **4.11.1. Pré-inóculo e propagação**

O pré-inóculo foi preparado com uma colônia da cepa LBGA- em 100 ml de meio YPD (4% glicose, 2% de extrato de levedura e 2% de peptona) em condições estéreis a 30°C e 200 rpm incubadas em incubadora orbital (shaker). A suspensão de células resultante foi transferida para um frasco contendo 1 L do meio de propagação (1 L de melaço de cana-de-açúcar (10° Grau Brix), da Usina São Luiz diluído em água) e mantidos em condições estáticas por aproximadamente 36 horas em temperatura ambiente. O frasco foi cuidadosamente agitado de tempos em tempos para liberar CO<sub>2</sub> aprisionado. Esta etapa foi realizada sob condições não estéreis. Após 36 horas, as células decantadas foram separadas do vinho por centrifugação a 2000g, 4 °C, 15 min.

#### **4.11.2. Fermentação**

Após a etapa de propagação, o inóculo para a etapa de fermentação foi preparado em triplicatas em tubos falcon de 50 mL contendo 4g de células (massa úmida) da etapa de propagação, 6 mL de água destilada e 2 mL de “vinho” produzindo uma suspensão celular que simulava a eficiência das centrífugas industriais (Lino *et al.*, 2018). Os ciclos fermentativos consistiram na adição de 9,25 ml de meio fermentativo (19% ART de melaço de cana da Usina São Luiz) em três diferentes tempos (0, 2 e 4h), totalizando um volume de 27,75 ml em tubos falcon de 50 ml. Os tubos foram mantidos em uma incubadora a 34°C em condições estáticas fechados hermeticamente e pesados em balança analítica a cada uma hora até 10h, para monitorar a perda de massa de CO<sub>2</sub>. No dia seguinte, a massa final de cada tubo foi medida e na sequência, centrifugadas (2000g, 4°C, 15 min) para separar a biomassa do vinho. Posteriormente o vinho foi reservado e os tubos falcon de 50 mL foram pesados, para contabilizar o aumento de biomassa através da diferença de peso do tubo com a biomassa e do tubo vazio pesado previamente antes do início da inoculação. O tratamento ácido foi realizado depois que os tubos foram

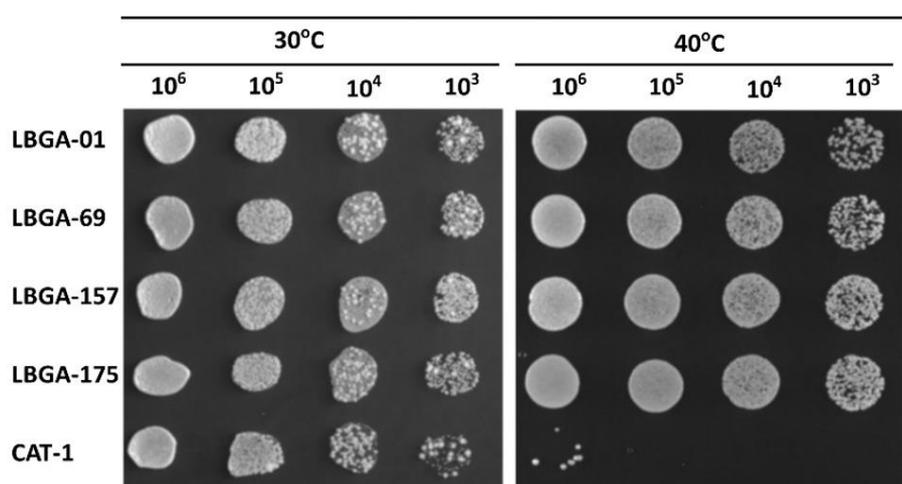
pesados, pela adição de 2 ml de vinho e 6 ml de água para as células úmidas. O pH final foi ajustado para 2-2,5 com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1N, e os tubos foram deixados à temperatura ambiente por uma hora antes da primeira adição da fermentação meio para iniciar um novo ciclo (repete o mesmo procedimento descrito desde o início a partir do ponto 0h hora). A simulação foi avaliada em quatro ciclos, representando 4 dias. O mesmo procedimento foi realizado à 40°C em uma incubadora estática, seguindo os passos anteriores. A análise de viabilidade celular foi realizada através da contagem de células em câmara de Neubauer utilizando azul de metileno como corante para marcar as células mortas (Fioravante Guerra, 2016). No tópico 4.11 encontra-se um desenho experimental para melhor entendimento das etapas de trabalho.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Isolamento, identificação e genotipagem de leveduras termotolerantes

Durante anos, desde 2009 o LBGA (Laboratório de Bioquímica e Genética Aplicada) da UFSCar tem isolado leveduras com características de interesse para a indústria de etanol.

Neste trabalho usou-se essa coleção para selecionar cepas capazes de crescer em altas temperaturas. Dentre todas as linhagens analisadas da biblioteca de leveduras, quatro apresentaram o fenótipo de termotolerância com perfis similares de crescimento em placas de Petri à 30 e 40°C. Essas linhagens foram identificadas como LBGA-01, LBGA-69, LBGA-157 E LBGA-175 (Figura 4).



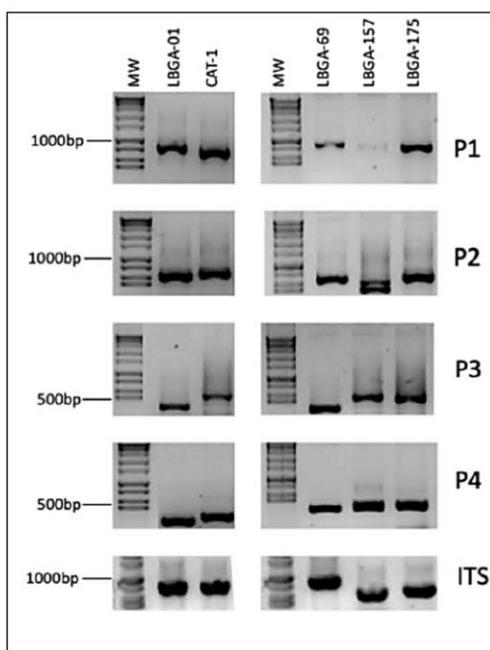
**Figura 5. Isolamento de leveduras termotolerantes da produção brasileira de etanol da usina São Luiz. Quatro leveduras termotolerantes foram identificadas como LBGA-01, LBGA-69, LBGA-157 e LBGA-175. A cepa industrial CAT-1 foi usada como cepa controle não termotolerante. As células foram cultivadas de um dia para o outro por aproximadamente 16 horas em meio YPD 2%, e a concentração de células foi ajustada para 10<sup>6</sup> células/mL. Diluições em série de dez vezes foram plaqueadas em meio sólido YPD 2% contendo ágar. As células foram incubadas à 30 e 40°C por 2 dias. A cepa CAT-1 apresentou baixo crescimento à 40°C e as quatro cepas tiveram perfis similares de crescimento à 30 e 40°C**

A fim de identificar as linhagens a nível molecular, foi realizada a amplificação da região ITS (Internal transcribed spacer) do DNA ribossomal (Šuranská *et al.*, 2016) e caracterização por genotipagem por PCR.

Os resultados da genotipagem mostraram que as quatro linhagens são geneticamente distintas umas das outras e também da linhagem controle CAT-1 de acordo com a amplificação dos primers específicos uma vez que o teste de genotipagem funciona como se fosse um teste de paternidade e mostra a possibilidade de semelhança genética de acordo com a amplificação de regiões idênticas presente no genoma da cepa (Figura 6).

As análises de ITS indicaram que somente as linhagens LBGA-01 e LBGA-69 possuíam amplificações de aproximadamente 900bp, tamanho característico para a identificação de possíveis linhagens de *Saccharomyces* (Guimarães *et al.*, 2006; Šuranská *et al.*, 2016). LBGA-157 e LBGA-175 apresentaram um padrão diferente de amplificação sugerindo que esta linhagens provavelmente não pertencem ao gênero *Saccharomyces*.

Mesmo assim, os amplicons dos ITS foram sequenciados e confirmados através das análises da sequência (Apêndice B) por BLAST e os resultados comprovaram que LBGA-01 e LBGA-69 eram *S. cerevisiae* e LBGA-157 e LBGA-175 cepas de *Kluyveromyces marxianus*.



**Figura 6. Caracterização molecular das cepas termotolerantes.** Quatro regiões polimórficas dos genes SPA2 (P1), PYR3 (P2), MNN4 (P3) e EPL1 (P4), foram

amplificados conforme descrito por Carvalho Netto (Carvalho-Netto *et al.*, 2013). A amplificação do ITS foi feita com os primers específicos descritos na literatura (Šuranská *et al.*, 2016).

## 5.2. Ensaios fermentativos com as linhagens termotolerantes a 30 e 40°C.

Para este teste, todas as linhagens foram testadas, embora somente a LBGA-01 e LBGA-69 sejam *S. cerevisiae* as outras duas linhagens, LBGA-157 e LBGA-175 também foram incluídas por serem uma espécie conhecida na literatura como termotolerante.

Os resultados de crescimento celular (Figura 7 A e B) mostram que as linhagens LBGA-01 e LBGA-69 possuem um perfil de crescimento semelhante ao da linhagem industrial CAT-1 à 30°C, porém quando submetidos à 40°C as linhagens tiveram o crescimento superior a linhagem industrial, resultado esperado uma vez que a linhagem CAT-1 não possui a capacidade de crescer em temperaturas mais elevadas (Babrzadeh *et al.*, 2012; Della-Bianca e Gombert, 2013, ; Costa *et al.*, 2014). As linhagens LBGA-157 e LBGA-175 apresentaram um crescimento lento em ambas as temperaturas.

Na indústria do etanol uma das características de interesse é a capacidade da levedura converter o etanol nas primeiras horas de fermentação e assim convertendo todo ao açúcar em aproximadamente 4-6 horas de fermentação. A fim de avaliar o potencial fermentativo das linhagens isoladas, realizamos teste partindo com uma concentração inicial de açúcar de 4% (m/v) de glicose.

Mais uma vez os resultados (Figura 7 C e D) mostram que as linhagens LBGA-01 e LBGA-69 possuem um perfil muito parecido com a linhagem industrial CAT-1 a 30°C, embora a linhagem industrial tenha sido superior nas primeiras 4 horas de fermentação, de forma similar as linhagens LBGA-01 e LBGA-69 apresentaram um perfil superior a linhagem industrial quando submetida a 40°C após 4 horas de fermentação. Assim como observado anteriormente, as linhagens LBGA-157 e LBGA-175 apresentaram uma performance inferior em ambas temperaturas no final da fermentação, porem ao longo do experimento pode ser observado como por exemplo, que a cepa LBGA-157 cepa metaboliza muito bem glicose nos tempos iniciais (2 horas) da fermentação à 30°C. Além disso com à 40°C e seis horas de fermentação todas as

linhagens apresentam uma boa conversão dos açúcares porém com 8 horas de fermentação o que podemos observar é a superioridade das cepas LBGA-01 e LBGA-69.

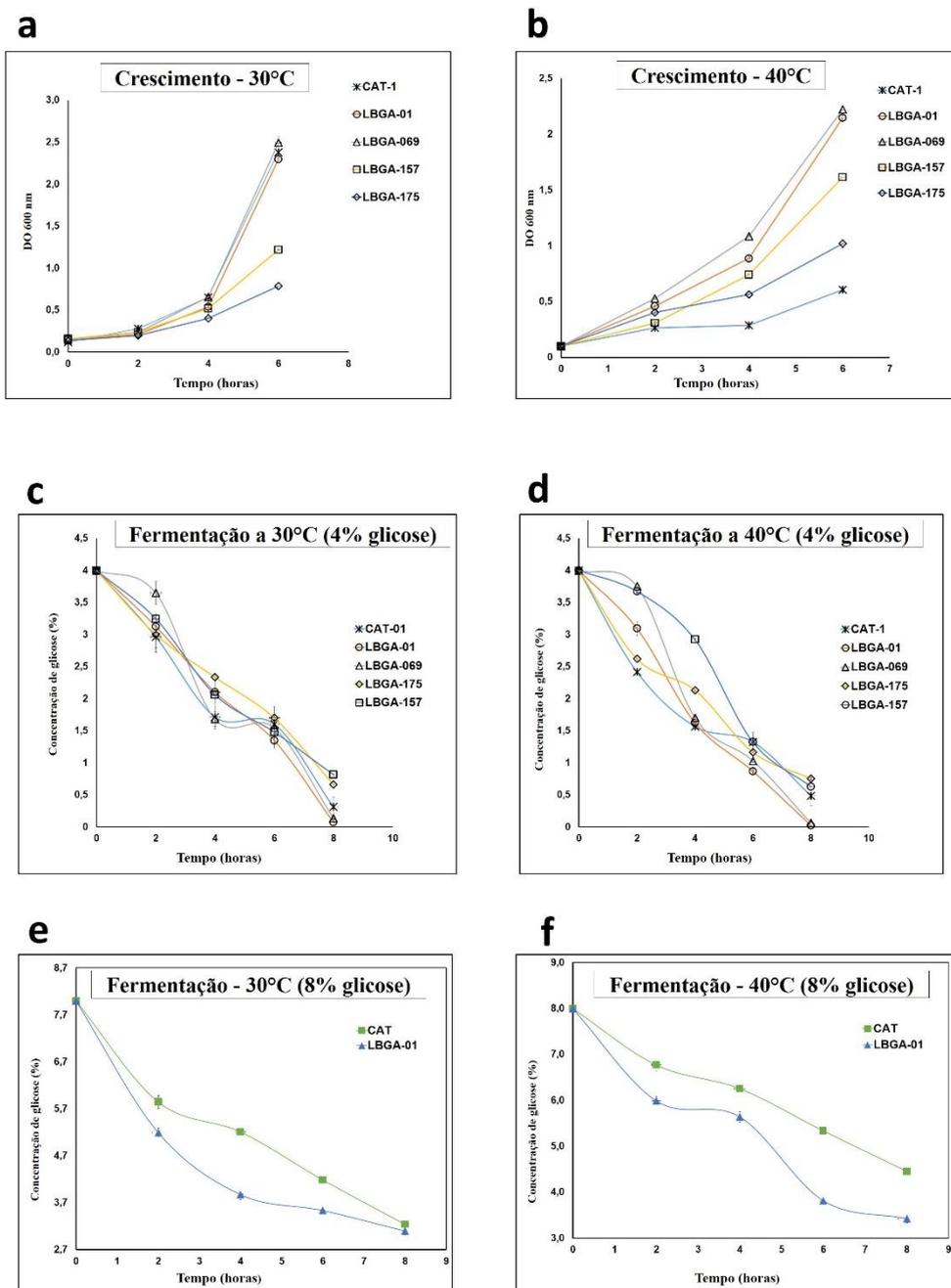
As leveduras são expostas a altas concentrações de açúcares durante o processo fermentativo sofrendo constantemente com o estresse osmótico. Pelo fato de que a linhagem LBGA-01 apresentou uma boa performance fermentativa na presença de glicose e bom crescimento celular à 40°C, a mesma foi selecionada para testes fermentativos usando glicose a 8% (m/v) de concentração inicial. Vale a pena ressaltar que a cepa LBGA-69 se encontra armazenada na biblioteca de leveduras do laboratório para testes futuros uma vez que esta cepa também apresentou bons resultados de crescimento e fermentação. Da mesma forma, as cepas LBGA-157 e LBGA-175 também serão objetos de estudos futuros.

Como pode ser observado (Figura 7 E e F) a linhagem LBGA-01 apresentou uma melhor performance fermentativa do ponto de vista das velocidades de formação/conversão do açúcar em etanol do que a linhagem industrial CAT-1 a 30°C, porém ao final da fermentação ambas apresentam valores similares de conversão dos açúcares e de glicose residual. Quando submetida à 40°C, a linhagem termotolerante foi claramente superior, consumindo mais açúcar e produzindo mais etanol.

Levando-se em consideração fatores econômicos na indústria de etanol esta linhagem apresenta um perfil de interesse para o processo uma vez que a conversão do substrato inicial foi maior do que a linhagem industrial, principalmente na temperatura mais elevada.

Assim como mencionado anteriormente, além de aumentar a produtividade e os rendimentos em etanol, o uso de uma potencial levedura termotolerante em um processo em temperaturas mais elevadas, pode minimizar o uso de água para o resfriamento das dornas. Além disso, o uso de linhagem termotolerantes pode contribuir com a redução da captação de água de fontes naturais bem como o uso de torres de resfriamento no processo industrial da produção de etanol.

Cabe ressaltar, que o uso de leveduras termotolerantes pode minimizar a contaminação das dornas por outras leveduras contaminantes do processo.



**Figura 7. Comparação do crescimento e consumo de glicose utilizando as leveduras isoladas.** O crescimento das leveduras à 30°C e 40°C foi obtido por densidade óptica a 600 nm (a, b). A taxa de consumo de glicose à 30°C e à 40°C foi avaliada com 4% (m/v) de glicose (c, d) e 8% (m/v) de glicose (e, f).

### 5.3. Testes de resistência a estressores do processo fermentativo da produção de etanol 1G e 2G

As leveduras são constantemente submetidas aos diversos tipos de inibidores presente na produção do etanol 1G e 2G impactando diretamente no rendimento final em etanol. Assim com a finalidade de avaliar o perfil de crescimento da LBGA-01 na presença de estressores/inibidores, a linhagem foi submetida a fermentações na presença de concentrações de estressores/inibidores como açúcar, etanol, furfural, HMF, ácido acético e ácido lático. Para este ensaio os resultados foram comparados com a linhagem industrial CAT-1 e a linhagem laboratorial Sc9721. A concentração de cada estressor foi estabelecida de acordo com a literatura (Tabela 1) assim como descrito na metodologia.

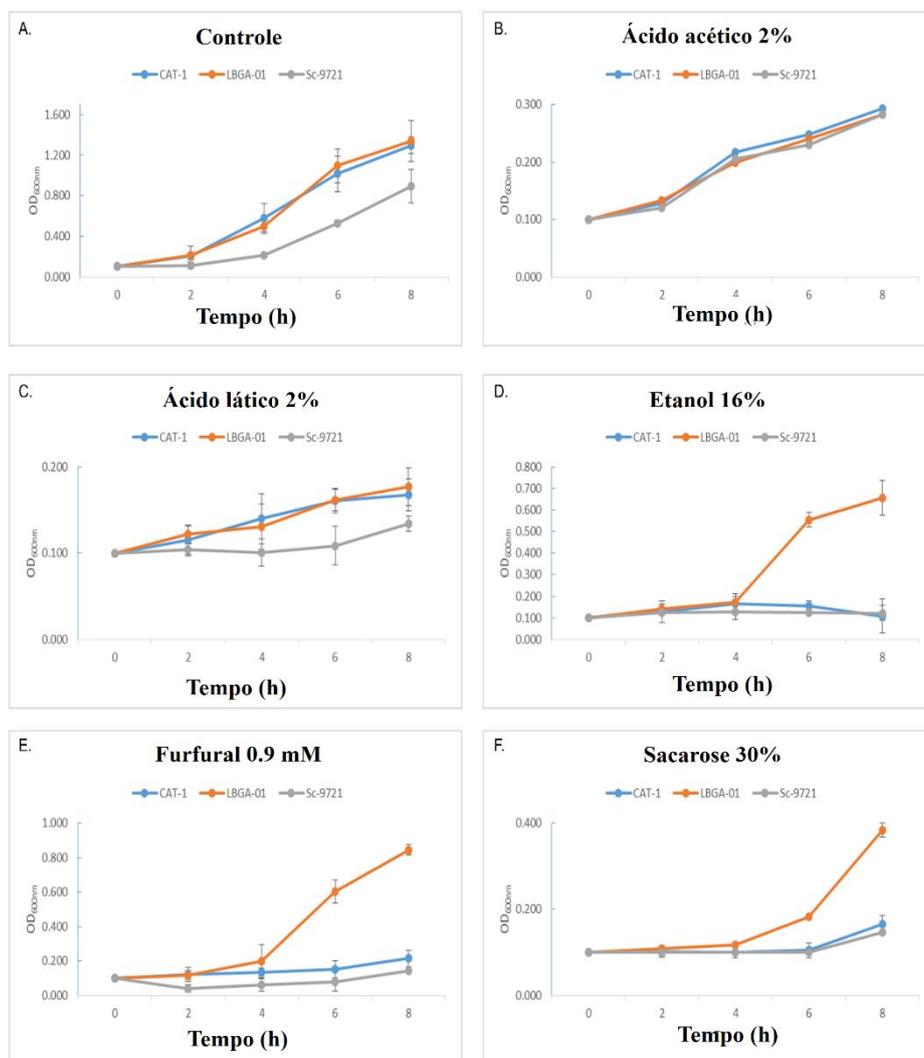
Os resultados das curvas de crescimento em meio líquido mostram que a linhagem LBGA-01 é mais resistente na presença da maioria dos estressores. Os resultados destes experimentos superaram as expectativas principalmente pela resistência da linhagem LBGA-01 ser semelhante a linhagem industrial e de laboratório na presença 2% (v/v) de ácido acético (Figura 8 B), quando submetidas a 4% (v/v) de ácido acético todas as linhagens apresentaram inibição de seu crescimento (resultado não apresentado).

Na presença de 4% (v/v) de ácido lático as linhagens LBGA-01 e CAT-1 foram mais resistentes do que a linhagem de laboratório (Figura 8 C), esse resultado indica que esta linhagem pode ser resistente a contaminações por *Bacillus* spp e/ou a outras bactérias produtoras de ácido lático (Costa *et al.*, 2018) sem afetar a produção de etanol. Contudo ainda há a necessidade de testar novas concentrações de ácido lático para saber ao certo qual a concentração limitante para a linhagem LBGA-01.

Quando submetida a 16% (v/v) de etanol a linhagem LBGA-01 mostrou uma alta superioridade de resistência em comparação a linhagem CAT-1 e Sc2791 sendo essas, drasticamente afetada pela concentração do inibidor (Figura 8 D). Na presença de 30% (m/v) de sacarose a linhagem termotolerante também apresentou uma melhor performance do que a linhagem industrial CAT-1 e de laboratório corroborando com ensaios prévios realizados por Paulino, 2018, mostrando a sua resistência a osmotolerância e a sua capacidade de produzir altos níveis de etanol (Figura 8 F).

Para os testes com HMF 40 mM nenhuma linhagem apresentou crescimento ou resistência a este inibidor (resultados não mostrados). O furfural, assim como o HMF, são inibidores do processo de produção de etanol 2G através da degradação de material lignocelulósico (Field *et al.*, 2015). Testes realizados na presença deste inibidor (Furfural 0,9 mM) mostrou que a linhagem LBGA-01 é mais resistente em comparação com a

linhagem CAT-1 e Sc9721 (Figura 8 E). Portanto esse resultado leva-nos a acreditar que esta característica aliada ao fenótipo de termotolerância pode ser uma interessante alternativa para a produção de etanol 2G.



**Figura 8.** Análise do perfil de crescimento da levedura termotolerante LBGA-01 em comparação com cepas industriais (CAT-01) e haploides (Sc-9721) sob diferentes concentrações de inibidores da produção de etanol 1G e 2G. Os testes tiveram a duração de 8 horas à 30°C e 180 rpm, uma alíquota do meio de cultura foi coletada a cada 2 horas e a absorbância foi medida a 600 nm. Os experimentos foram realizados em triplicata

Outro ponto de destaque é que as condições de estresse na qual a cepa LBGA-01 foi submetida, são condições de estresse superiores às encontradas no processo

industrial, como por exemplo, a alta concentração de sacarose avaliada (30% m/v) no início da fermentação e também a presença de 16% de etanol (v/v) no meio fermentativo.

Para a sacarose por exemplo, em uma batelada industrial alimentada, o mosto rico em sacarose é alimentado nas dornas em uma velocidade controlada de adição para que as leveduras não sofra choque osmótico, e conseqüentemente inibição pelo substrato, e assim seja obtido bons níveis de etanol no final do processo (Della-Bianca *et al.*, 2013; Basso e Basso, 2019).

Com relação ao etanol, a levedura pode sofrer inibição pelo produto, ou seja, embora o etanol seja o produto de interesse nas fermentações alcoólicas, o mesmo pode causar estresse para a célula e inibir o seu crescimento celular (Liu *et al.*, 2023; Mavrommati *et al.*, 2023).

Altas concentrações de etanol afetam a permeabilidade da membrana celular aumentando a hidrofobicidade de seu interior diminuindo a sua espessura, além disso, ao mesmo tempo influencia diretamente na diminuição de ácidos graxos saturados, como por exemplo, o ácido esteárico (Mavrommati *et al.*, 2023). Cabe ressaltar que transportadores de açúcares são afetados por altas concentrações de etanol (Ledo e Uden, 1982; Salmon *et al.*, 1993).

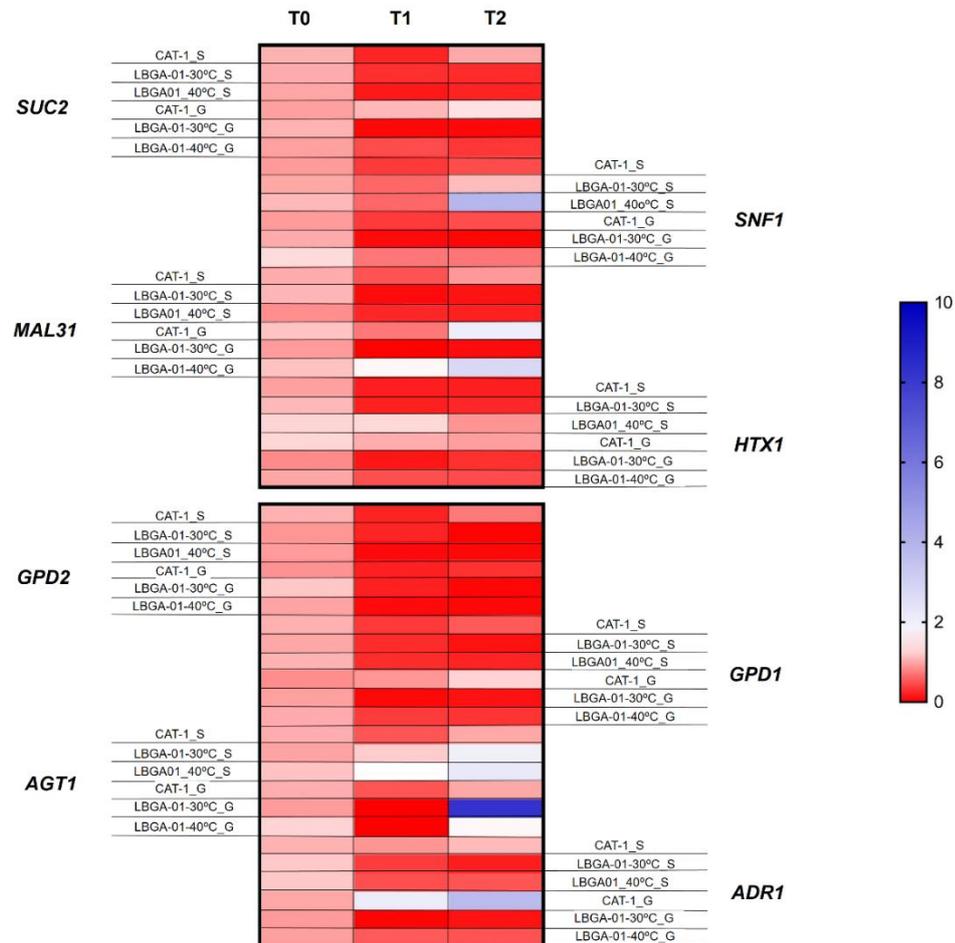
Levando em consideração que os valores de  $\mu_{Max}$  da cepa LBGA-01 tanto a 30 quanto a 40°C são respectivamente 0,5 (Figura 7a e 7b), evidenciando a capacidade de ótimo crescimento celular da cepa LBGA-01 em ambas as temperaturas, estes resultados aliados aos resultados de crescimento na presença de inibidores/estressores mencionados acima, mostra que a linhagem termotolerante LBGA-01 demonstra uma robustez, mesmo na presença de inibidores do processo fermentativo (sacarose, etanol e furfural) tornando-se uma potencial levedura para aplicação na produção de etanol 1G e 2G.

Portanto investir em estudos fermentativos e genéticos com a cepa LBGA-01 pode trazer respostas e resultados interessantes do ponto de vista biotecnológico, genético e do bioprocessos.

#### **5.4. Análise de expressão gênica da linhagem LBGA-01 em fermentações a altas temperaturas.**

Para entender melhor o que acontece com as vias metabólicas na linhagem LBGA-01 em fermentações com elevadas temperaturas, genes envolvidos na eficiência fermentativa, na biossíntese de membrana e assimilação de sacarose foram avaliados por

q-PCR. Essas análises foram realizadas e os resultados comparados com a linhagem industrial CAT-1 para ambas as temperaturas (30 e 40°C) e os genes de mRNA envolvidos na eficiência fermentativa estão ilustrados na figura 8.



**Figura 9. Perfil de expressão dos genes envolvidos na eficiência da fermentação do LBGA-01 fermentado à 30 e 40°C.** A fermentação das cepas LBGA-01 e CAT-1 industrial foi realizada a 30°C e 40°C com 50 ml de meio líquido em erlenmeyer de 250 ml. O meio utilizado foi o YPD e YPS, Glicose (G) e sacarose (S) foram usadas como fontes de carbono respectivamente. As fermentações foram realizadas no sistema estacionário incubadas em estufas. As cores das barras representam o perfil de expressão gênica (vermelho: baixa expressão; azul: alta expressão)

Uma característica observada para a linhagem LBGA-01 durante os quimiostatos e em fermentações em batelada alimentada (Tabela 2) é o fato do glicerol

apresentar aumento do perfil de produção à 40°C quando comparado com à condição controle 30°C, mediante os valores das velocidades de formação dos produtos quantificados por HPLC.

Os genes *GPD1* e *GPD2* são enzimas chave na síntese de glicerol, assim levamos à hipótese de que esses genes estariam com sua expressão aumentada durante as fermentações à 40°C realizadas para a investigação de genes envolvidos com a capacidade fermentativa.

Porém, os resultados obtidos através das análises de qPCR (Figura 9) mostram que para estes genes não houve uma alteração na expressão, comparando cultivos realizados à 30 e 40°C (Figura 9), uma hipótese é de que a não expressão dos genes *GPD1* e *GPD2* relacionados com a formação de glicerol pode estar atrelados a formação de mutantes sem *GPD1* e *GPD2* causando o acúmulo de Dihidroxiacetona que pode ser convertido em metilglioxal, um composto citotóxico que inibe o crescimento da levedura (Overkamp *et al.*, 2002). Porém diferentemente deste fenômeno o crescimento de LBGA-01 não foi afetado em ambas as temperaturas (Figura 7 a e 7 b).

Outra possibilidade é o fato de *GPD1* e *GPD2* estarem sendo codificados para a produção da isoenzima glicerol-3-fosfato desidrogenase que tem o papel importante nas osmoadação e condições de crescimento da levedura (Pählman *et al.*, 2001).

De forma interessante os mesmo resultados mostraram que a expressão do gene *SNF1* foi aumentado nas fermentações usando a LBGA-01 a 40°C (Figura 9). Na literatura o gene *SNF1* foi descrito como um repressor de *GPD2* via fosforilação para interromper a produção de glicerol em condições limitantes de nutrientes (Nicastro *et al.*, 2015).

Portanto, estes resultados levam à hipótese de que a não alteração da expressão de *GPD2* ocorre por que existe uma repressão exacerbada em LBGA-01 devido ao aumento da expressão de *SNF1* (Figura 9). Desta a forma a cepa LBGA-01 quando submetida a 40°C nas fermentações em erlenmeyer, por estar em um ambiente de escassez de nutrientes parece ativar a expressão de *SNF1* inibindo a expressão de *GPD1* e *GPD 2* justamente para não gastar energia e poder redutor com a produção de glicerol.

O gene *SUC2* apresentou uma diminuição de sua expressão para a linhagem LBGA-01 à 30 e à 40°C na presença de glicose e sacarose, porém na presença de glicose essa redução foi menor quando comparado com os cultivos na presença de sacarose para ambas as temperaturas (30 e 40°C) com um destaque à 40°C onde a levedura apresentou uma expressão mais relevante, levando à hipótese de que nesta temperatura a levedura

está consumindo mais rapidamente a glicose para conversão do açúcar e também na manutenção de sua célula, e provavelmente à 40°C na presença de sacarose a levedura está demorando mais tempo para fermentar os açúcares disponíveis, ou seja, a levedura está levando mais tempo para adaptação ao estresse de osmotolerância e assim iniciar a ativação de genes transportadores de açúcares.

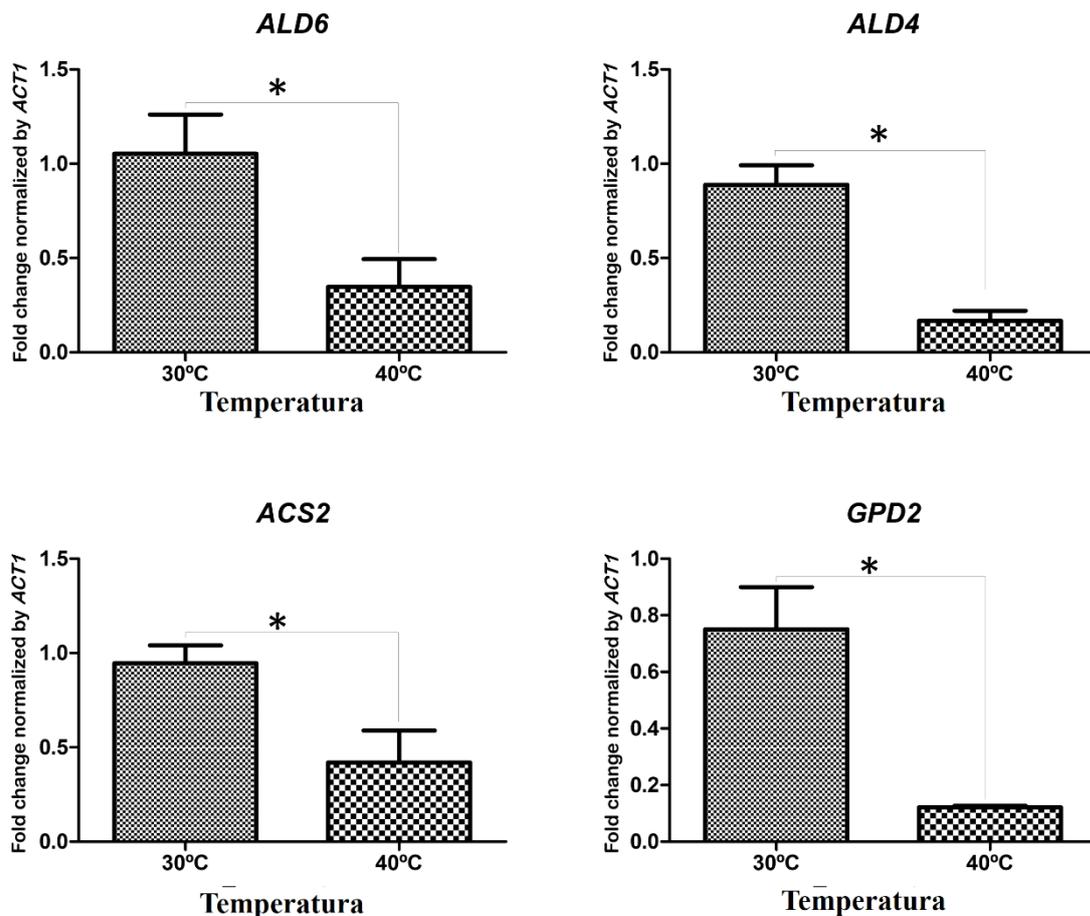
Outra hipótese para a diminuição do gene *SUC2* nas fermentações utilizando a LBGA-01 é o fato de ocorrer um aumento de glicose e frutose devido a hidrólise da sacarose durante as primeiras horas de fermentação afetando a atividade da invertase (Kayikci e Nielsen, 2015).

Durante fermentação usando a linhagem CAT-1, o gene *SUC2* é reativado a medida que a concentração de glicose diminui e a invertase retorna o metabolismo da sacarose residual. Essa troca metabólica causada pela concentração de açúcar e pela inativação e reativação de *SUC2* é acompanhada pela expressão de *SNF1*.

A ativação do gene *SNF1* depende da glicose e está diretamente ligado ao estímulo para a ativação dos genes transportadores de glicose (*MAL31* e *AGT1*) e ativação de genes envolvidos no uso de fontes alternativas de carbono como o *TOS3* (Tomás-Cobos e Sanz, 2002; Kayikci e Nielsen, 2015).

Conforme já descrito anteriormente, a expressão de *SNF1* na linhagem LBGA-01 é mantida em níveis elevados ao longo da fermentação enquanto isso a expressão de *SUC2* diminui e o consumo de sacarose permanece inalterado. A produção de etanol usando esta linhagem termotolerante é maior a 40°C do que a 30°C como pode ser observado nas fermentações em biorreatores (Tabela 2) e mais tarde confirmados através das análises de transcriptoma através da presença da alta expressão do gene *SNF1* (Figura 9).

Este processo pode ocorrer devido a um aumento na internalização da sacarose pelos transportadores *MAL31* e *AGT1*, proteínas capazes de transportar sacarose, maltose e maltotriose, embora esse processo ocorra na ausência de glicose (Stambuk e de Araujo, 2001; Stambuk *et al.*, 2006).



**Figura 10. Expressão de genes envolvidos na formação de produtos secundários durante o processo fermentativo.** Os valores de mRNA de aldeído desidrogenase-6 (*ALD6*) (a), aldeído desidrogenase-4 (*ALD4*) (b), acetil CoA sintetase (*ACS2*) (c) e glicerol-3-fosfato desidrogenase 2 (*GPD2*) (d), foram normalizado usando a expressão de beta actina (*ACT1*). Os ensaios de fermentação foram realizados em duplicata com LBGA-01 à 30 e 40°C.

Essa hipótese é sustentada pela expressão do gene *SNF1* que é altamente expresso na cepa LBGA-01 mesmo na presença de glicose, assim possivelmente ativando receptores (Young *et al.*, 2003; Bisson *et al.*, 2016).

Um fato interessante é que a expressão de *SNF1* embora tenha reduzido no meio da fermentações a expressão do gene *SNF1* voltou a aumentar e foi maior no final da fermentação usando a LBGA-01 em ambas as temperaturas usando sacarose como fonte de carbono.

Portanto, com base nesses resultados a LBGA-01 poderia ser utilizada em maiores concentrações de açúcar uma vez que os genes *MAL31* e *AGT1* transportam a sacarose sendo invertida pelo gene *SUC2* intracelular, o que pode aumentar a capacidade fermentativa da cepa LBGA-01.

O gene *SNF1* de acordo com os resultados apresentados na figura 4 mostra uma alta expressão ocasionando a repressão dos genes *GPD1* e *GPD2* inibindo a formação de glicerol a 40C, no entanto o gene *SNF1* ativa esses transportadores de hexoses ao mesmo tempo permitindo que a sacarose seja transportada para dentro da célula da levedura e consequentemente hidrolisada.

Todo este mecanismo provavelmente apresenta um custo energético muito elevado para a célula, esta hipótese vai de acordo com os resultados obtidos nas fermentações realizadas em quimiostatos à 40°C uma vez que foi possível observar que a cepa LBGA-01 a 40°C gasta muito mais energia para se manter viva do que para produzir massa celular apresentando valores de produção de biomassa em função do substrato ( $Y_{x/s}$ ) menores do que as fermentações à 30°C (Tabela 2).

Vale a pena destacar que o gene *MAL31* industrialmente é inibido por glicose, porém para cepa LBGA-01 o que pode ser observado é que este gene não é inibido na presença de glicose, sendo esta característica muito interessante e relevante, fazendo da cepa LBGA-01 uma cepa com características do ponto de vista da expressão gênica. Esta característica possibilita ainda a utilização desta cepa na produção de outros produtos de interesse econômico como a produção de cerveja, uma vez que o gene *MAL31* estando ativo na presença de glicose, pode ser então mandando para dentro da célula outros açúcares como a maltose e maltotriose para serem fermentados (Pires e Brányik, 2015).

## 5.5. Parâmetros fisiológicos quantitativos da linhagem LBGA-01 durante fermentações anaeróbicas em quimiostatos à 30 e 40°C

Cultivos em quimiostatos tem sido aplicados nos estudos de parâmetros fisiológicos de *S. cerevisiae*. Por este motivo foram investigados os impactos de uma elevada temperatura (40°C) na fisiologia da levedura em condições anaeróbicas em comparação com a temperatura controle (30°C).

Foram também comparados os resultados obtidos com os de (Della-Bianca *et al.*, 2014) que utilizaram a linhagem industrial PE-2, linhagem amplamente usada na produção de etanol brasileiro.

Os ensaios foram conduzidos usando quimiostatos anaeróbicos com meio sintético a uma diluição de  $0,1L * h^{-1}$ . As taxas específicas de  $q$  são dadas em  $mmol/g^{-1}h^{-1}$ . Os dados apresentados na tabela 2 são os valores médios de experimentos em triplicatas, considerando o desvio padrão ( $\pm$ ).

Para quimiostatos anaeróbicos usando culturas de LBGA-01, a fonte de carbono (glicose 24g/l) foi principalmente direcionada para a produção de etanol e CO<sub>2</sub>, e poucas quantidade de glicerol e ácido lático com produção de biomassa.

Quando comparados os dados de LBGA-01 cultivados a 40°C e à 30°C, observou-se um aumento no consumo de glicose (38%) bem como nos níveis de produção de CO<sub>2</sub> (51%) e etanol (36%). Diferente destes resultados, à 40°C, foi possível observar uma queda na produção de biomassa (25%), porém, esta redução não afetou os níveis de produção de etanol e os níveis de crescimento máximo específico durante a fase batelada.

Não foi possível observar a diferença entre 40°C e a condição controle no rendimento em etanol durante o estado estacionário, porém observou-se que a concentração de glicose residual foi maior à 40°C durante o estado estacionário sugerindo uma possível inibição da captação de glicose.

Condições de estresse como altas temperaturas podem gerar perturbações no balanço redox dentro das células (Ask *et al.*, 2013). O aumento na taxa de síntese de subprodutos como o acetato e lactato envolvidos na reoxidação de NADH, são indicativos de como as células estão respondendo a essa condição estressante bem como a expressão gênica diferenciada do gene ACS2 relatado nos ensaios de expressão gênica por qPCR.

Resultados obtidos no presente estudo mostram que a LBGA-01 apresenta níveis maiores de produção de etanol e glicose disponível do que linhagem PE-2 à 30°C. Esses dados sugerem uma vantagem de seu uso no processo industrial.

**Tabela 2. Fisiologia de *Saccharomyces cerevisiae* em condições limitantes de glicose**

<i>S. cerevisiae</i> strain	<b>LBGA-01</b> ( <i>este trabalho</i> )		<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <b>PE-2</b> (Della-Bianca <i>et al.</i> , 2014)
<b>Temperatura (°C)</b>	<b>30°C</b>	<b>40°C</b>	<b>30°C</b>
<b><i>q</i> glucose (mmol/g/h)</b>	-5.28 ± 0.50	-7.22 ± 0.93	-5.06 ± 0.15
<b><i>q</i> CO<sub>2</sub> (mmol/g/h)</b>	7.98 ± 0.69	12.02 ± 1.04	8.51 ± 0.28
<b><i>q</i> Etanol (mmol/g/h)</b>	8.79 ± 1.03	11.50 ± 1.72	7.70 ± 0.26
<b><i>q</i> Glicerol (mmol/g/h)</b>	0.89 ± 0.22	1.38 ± 0.32	0.89 ± 0.04
<b><i>q</i> Lactato (mmol/g/h)</b>	0.05 ± 0.03	0.11 ± 0.02	0.05 ± 0.00
<b><i>q</i> Piruvate (mmol/g/h)</b>	0.01 ± 0.00	0.08 ± 0.03	Not reported
<b><i>q</i> Acetato (mmol/g/h)</b>	0.00 ± 0.00	0.01 ± 0.02	0.00 ± 0.00
<b>X (g<sub>massa seca</sub> / L<sup>-1</sup>)</b>	2.64 ± 0.30	2.09 ± 0.26	2.63 ± 0.01
<b>Y<sub>X/S</sub> (g<sub>massa seca</sub> / g glicose<sup>-1</sup>)</b>	0.11 ± 0.01	0.08 ± 0.01	0.11 ± 0.00
<b>Y<sub>ETH/S</sub> (g etanol / g glicose<sup>-1</sup>)</b>	0.43 ± 0.12	0.41 ± 0.01	Not reported
<b>Y<sub>G/S</sub> (g glicerol / g glicose<sup>-1</sup>)</b>	0.09 ± 0.01	0.10 ± 0.01	Not reported
<b>Glicose residual (mM)</b>	0.17 ± 0.23	2.4 ± 0.58	Not reported
<b>C recuperação (%)</b>	101.97 ± 1.73	101.28 ± 1.35	100.9 ± 0.7

Fonte: Elaborada pelo autor.

Outro fato positivo que foi possível observar é uma notável característica da cepa LBGA-01 não ter sua rota desviada para a produção de acetato, como pode ser observado na tabela 2 a ausência de ácido acético em todos os cultivos, esta característica já tinha sido mencionado em trabalhos realizados por Della-Bianca *et al.*, 2014 (Della-Bianca *et al.*, 2014).

Neste trabalho as análises de qPCR de fermentações à 40°C utilizando a cepa LBGA-01 mostraram que a expressão de genes envolvidos com as vias metabólicas de produção de acetato (Figura 10) está sendo reprimida, levando a crer toda a glicose disponível está sendo utilizada exclusivamente para a produção de etanol.

Um estudo anterior analisou a termotolerância de cepas industriais de *S. cerevisiae* isoladas da produção de etanol como CAT-1, PE-2, BG-1 e JP-1 em meio sintético com glicose como única fonte de carbono e energia (Della-Bianca e Gombert, 2013). Os resultados obtidos pelo autor mostraram taxas de crescimento de algumas cepas (JP-1 e CAT-1) maiores à 37°C do que à 30°C (0,39 e 0,38 h<sup>-1</sup> respectivamente). No entanto os resultados obtidos pelos autores foram menores do que as taxas de crescimento obtidas pela LBGA-01 (Figura 7) tanto à 30°C quanto à 40°C (0,53 e 0,51 h<sup>-1</sup> respectivamente).

Com relação ao rendimento em etanol, JP-1 e BG-1 apresentaram um aumento nos cultivos a 37°C quando comparados a 30°C (Della-Bianca e Gombert, 2013). A linhagem PE-2 apresentou um pequeno aumento no rendimento em etanol à 37°C em comparação à 30°C (Della-Bianca e Gombert, 2013).

Os resultados obtidos neste estudo pela cepa LBGA-01 à 40°C mostram uma pequena redução no rendimento em etanol em função do substrato (Tabela 2), porém as velocidades de formação não foi afetada sendo os valores maiores a 40°C do que à 30°C quando comparado com a linhagens LBGA-01 a 30°C e a PE-2 à 30°C.

Com relação a taxa específica de produção de etanol, os resultados revelaram que a linhagem LBGA-01 tem uma taxa mais alta à 40°C do que à 30°C com rendimentos de etanol semelhantes em ambas condições (Tabela 2).

Da mesma forma a produção de glicerol também foi observada nas mesmas condições e os resultados mostraram um ligeiro aumento dos níveis de glicerol à 40°C quando comparado com a temperatura controle e a linhagem PE-2, porém este aumento não afetou a produção de etanol. O desvio de carbono da formação de biomassa à 40°C parece ser devido às produções de piruvato e lactato. Esse resultado pode ser explicado pela reduzida expressão de genes que codificam enzimas responsáveis pela a produção de produtos secundários.

Uma outra hipótese considerando o balanço de massa de carbono e também as reações estequiométricas na formação de etanol e CO<sub>2</sub>, é que a 40°C provavelmente o rendimento em etanol foi superior a 30°C, uma vez que à 40°C há uma maior perda de etanol evaporado.

Se considerar o rendimento em CO<sub>2</sub> em função do substrato ( $Y_{CO_2/S}$ ) a 30°C (0,332 g CO<sub>2</sub>/g glicose<sup>-1</sup>) e à 40°C (0,500 g CO<sub>2</sub>/g glicose<sup>-1</sup>) pode ser inferido o rendimento em etanol ( $Y_{etanol/S}$ ). Considerando os mesmos cálculos e a estequiometria da reação, à 40°C o rendimento em etanol é 0,478 g etanol/g glicose<sup>-1</sup>, este valor superior ao rendimento em etanol da cepa LBGA-01 à 30°C, 0,317 g etanol/g glicose<sup>-1</sup> respectivamente.

Isso explica o fato dos resultados apresentados na tabela 2 para os rendimentos em etanol, a cepa LBGA-01 apresentou um maior rendimento em etanol à 30°C, pois à 40°C provavelmente ocorreu uma maior evaporação do etanol devido à alta temperatura na qual a cepa LBGA-01 está sendo submetida.

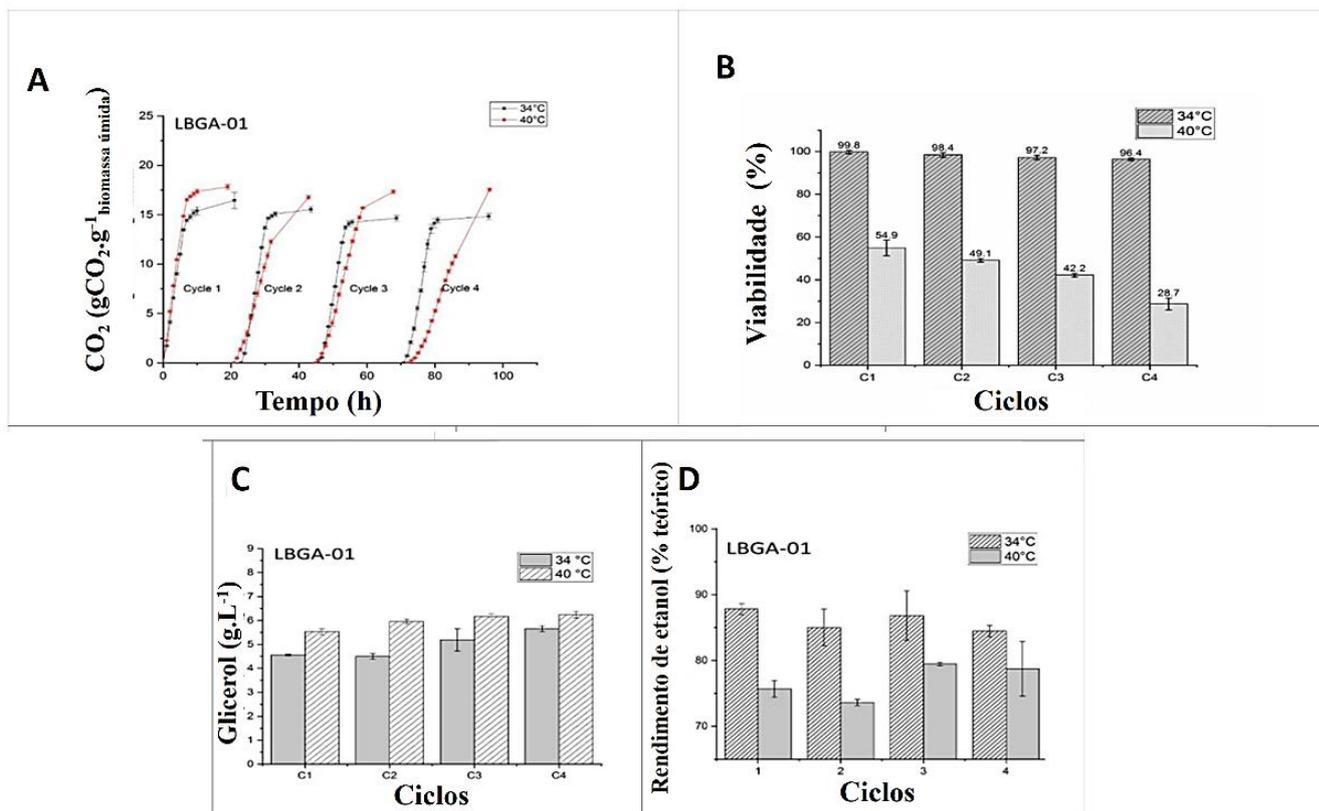
Contudo, fica evidenciado a sua potencialidade em obter maiores rendimentos em etanol. Uma sugestão seria a realização de uma fermentação extrativa para a retirada do etanol sem que houvesse a perda do mesmo durante o processo fermentativo nas dornas.

## **5.6. Performance fermentativa de LBGA-01 simulando as condições de produção de etanol brasileiro em altas temperaturas**

Diferentes aspectos de *S. cerevisiae* como crescimento, rendimento em etanol, glicerol e produtividade celular são investigados em condições laboratoriais usando operações em batelada e meios de cultivos sintéticos oferecendo condições adequadas de nutrientes para o máximo desempenho de crescimento e fermentação. No meio sintético a fonte de carbono geralmente é o nutriente limitante (Raghavendran *et al.*, 2017).

Em condições industriais essas variáveis não são reprodutivas e variam de batelada a batelada. A literatura carece de dados que reproduzam as condições industriais e as diferentes características encontradas no ambiente industrial.

Pensando nisso ensaios com ciclos e condições mais próximas do ambiente real das usinas de cana-de-açúcar foram realizados (Figura 11).



**Figura 11. Aspectos fisiológicos da cepa LBG-01 em fermentação com ciclos utilizando melaço de cana-de-açúcar como meio fermentativo.** (A) Os perfis de CO<sub>2</sub> foram normalizados pela biomassa úmida. (B) A viabilidade celular foi avaliada em câmara de Neubauer ao longo de quatro ciclos. (C) A produção de glicerol (mmol/g/h) foi avaliada à 34°C e 40°C através dos resultados obtidos em HPLC. (D) O rendimento em etanol foi calculado considerando o máximo teórico (%) com base nos valores obtidos da concentração em (g/L) de etanol produzido ao longo dos ciclos, avaliados em HPLC.

Especialmente na produção de etanol 1G no Brasil o melaço de cana-de-açúcar e o mosto são frequentemente usados como fontes de carbono de baixo custo para a fermentação (Lino *et al.*, 2018). Sua composição e qualidade também variam entre diferentes bateladas e os períodos de safra. Portanto replicatas laboratoriais usando meio sintético são pobres do ponto de vista real do processo e podem ter seus resultados mal interpretados (Della-Bianca *et al.*, 2013).

Além da fonte de carbono específica outros estresses são associados à produção industrial do etanol do ponto de vista real do processo, como, a toxicidade em condições não assépticas, inibição pelo substrato, reciclo de células, tratamento ácido, contaminações por bactérias e estresse de temperatura (Raghavendran *et al.*, 2017). Portanto, possuir uma alta tolerância a essa variedade de condições de estresse é uma desejável característica para a levedura na produção de etanol (Raghavendran *et al.*, 2017; Madeira-Jr e Gombert, 2018; Saini *et al.*, 2018).

Para avaliar e estudar aspectos fisiológicos e a performance da cepa LBGA-01 em condições de estresse, reproduziu-se a produção de etanol 1G usando melaço de cana-de-açúcar como fonte de carbono, seguindo o protocolo descrito por (Raghavendran *et al.*, 2017).

A linhagem termotolerante LBGA-01 foi investigada e as células submetidas a fermentações a 34 e 40°C, ambas as temperaturas incomum para condições de laboratório porém, comuns nas usinas de cana-de-açúcar no Brasil, devido as reações exotérmicas que ocorrem dentro das dornas para a produção de etanol (Della-Bianca *et al.*, 2013). O processo brasileiro de produção de etanol é operado na forma batelada alimentada com reaproveitamento de células para a conversão dos açúcares presente no melaço em etanol.

A alimentação do mosto nas dornas dura entre 4 e 6h e a fermentação cessa dentre 6-10 horas. Posteriormente, o conteúdo final da cuba é centrifugado, produzindo vinho e as células concentradas, 60 a 70% de células (peso úmido).

Essa suspensão é diluída em água e sofre um tratamento ácido em pH 1,8-2,0 pela adição de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> para reduzir a contaminação bacteriana e, posteriormente, a suspensão celular é reciclada para encher a dorna de fermentação (Raghavendran *et al.*, 2017).

O protocolo descrito por Raghavendran *et al.*, 2017, engloba todas as características da indústria brasileira do etanol permitindo a avaliação da capacidade fermentativa, etanol, glicerol, biomassa e viabilidade. A capacidade fermentativa foi monitorada plotando a produção de CO<sub>2</sub> por grama de biomassa em função do tempo de fermentação (Saini *et al.*, 2018; Prado *et al.*, 2020).

Como mostrado em estudos, pode haver o aumento e a diminuição da biomassa, e os gráficos de CO<sub>2</sub> em função do tempo de fermentação pode não representar muito bem a capacidade fermentativa. Neste caso a normalização da massa específica é necessária.

A fermentação a 34°C mostrou uma capacidade fermentativa um pouco mais baixa no primeiro ciclo comparado com a fermentação à 40°C, em ambas as temperaturas a levedura iniciou a fermentação com a mesma viabilidade de aproximadamente 80% (Figura 11). A capacidade fermentativa à 34°C do primeiro ciclo foi mantida nos ciclos seguintes com viabilidade de 100%.

À 40°C o que pode ser observado foi que a produção específica de CO<sub>2</sub> foi caindo ciclo após ciclo como pode ser observado na redução da inclinação dos dados experimentais (Figura 11), isto pode estar provavelmente relacionado com a redução da viabilidade.

À 40°C, a viabilidade de LBGA-01 diminuiu após o primeiro ciclo, chegando a 28,7% de viabilidade no ciclo 4. Por outro lado embora a produção específica de CO<sub>2</sub> esteja caindo, pode ser observado um aumento do rendimento de etanol entre os ciclos 2 e 4 à 40°C indicando que a capacidade fermentativa não foi afetada.

Os resultados à 34°C corroboram com os resultados para PE-2 no processo “scaled dow” (Saini *et al.*, 2018). Contudo, à 40°C a indução da temperatura resultou na diminuição da viabilidade da cepa LBGA-01. Etanol e glicose também foram avaliados durante a fermentação. Como mencionado acima, a produção de glicerol está associada com a resposta fisiológica das células ao choque osmótico.

Como resposta celular, o glicerol intracelular diminui a atividade de água no citosol, levando a uma maior absorção de água (Tamás *et al.*, 2000). Os níveis de glicerol foram monitorados e os resultados mostram um aumento a cada ciclo em ambas temperaturas, porém, maior à 40°C do que à 34°C. Como mecanismo de proteção, o aumento dos níveis de glicerol são causados pelo estresse ao aumento da temperatura.

O rendimento teórico em etanol foi similar nos 4 ciclos à 34°C com média de 86,03 ± 1,56%. Cabe ressaltar que os resultados obtidos para a LBGA-01 são semelhantes aos obtidos para CEN.PK 113-71 e S288c, que variou de 86 a 92% (Raghavendran *et al.*, 2017).

Além disso, os resultados de rendimento teórico em etanol também são comparáveis aos obtidos para as duas principais linhagens industriais PE-2 (87, 2±3,9%) e Etanol Red™ (87,6 ± 5,1%), ambas empregadas na produção brasileira de etanol 1G (Della-Bianca e Gombert, 2013; Lino *et al.*, 2018).

Conforme discutido anteriormente, a produção específica de CO<sub>2</sub> e a viabilidade celular foi reduzida após os ciclos à 40°C embora o rendimento teórico em etanol tenha sido ligeiramente inferior ao obtido à 34°C no último ciclo com um valor de 79,9 ± 2,72%.

Essa redução no rendimento teórico em etanol pode ser explicada, pelo desvio para a produção de outros compostos no metabolismo fermentativo, como a produção de glicerol e também pela maior perda de etanol atribuída a elevação da temperatura. Se tratando de capacidade fermentativa, a cepa LBGA-01 mostra-se robusta mediante as condições reais de processo simuladas neste ensaio, principalmente por apresentar bons rendimentos teóricos de etanol à 40°C nos ciclos 3 e 4 respectivamente.

De forma coletiva estes resultados mostram que a LBGA-01 possuiu uma boa eficiência fermentativa à 40°C. No entanto, esta levedura precisa melhorar a viabilidade celular durante os ciclos para poder ser usada na produção industrial de etanol, uma vez que esta cepa parece sofrer não somente a influência da temperatura em sua viabilidade mas também a concentração de etanol produzida ao longo dos ciclos parece também influenciar de forma sinérgica na capacidade fermentativa e rendimentos de etanol.

Uma alternativa é usar tecnologias de evolução adaptativa para ajustar as características genéticas e aumentar a viabilidade desta levedura durante os ciclos com elevadas temperaturas.

## **5.7 Construção e análise das bibliotecas de mRNA para sequenciamento.**

Após a extração do RNA total das cepas LBGA-01 das fermentações a 30 e 40°C, foi então realizado a construção das bibliotecas para sequenciamento em parceria com o LAGENBIO da UFSCAR.

### **5.7.1. Análise da qualidade do RNA**

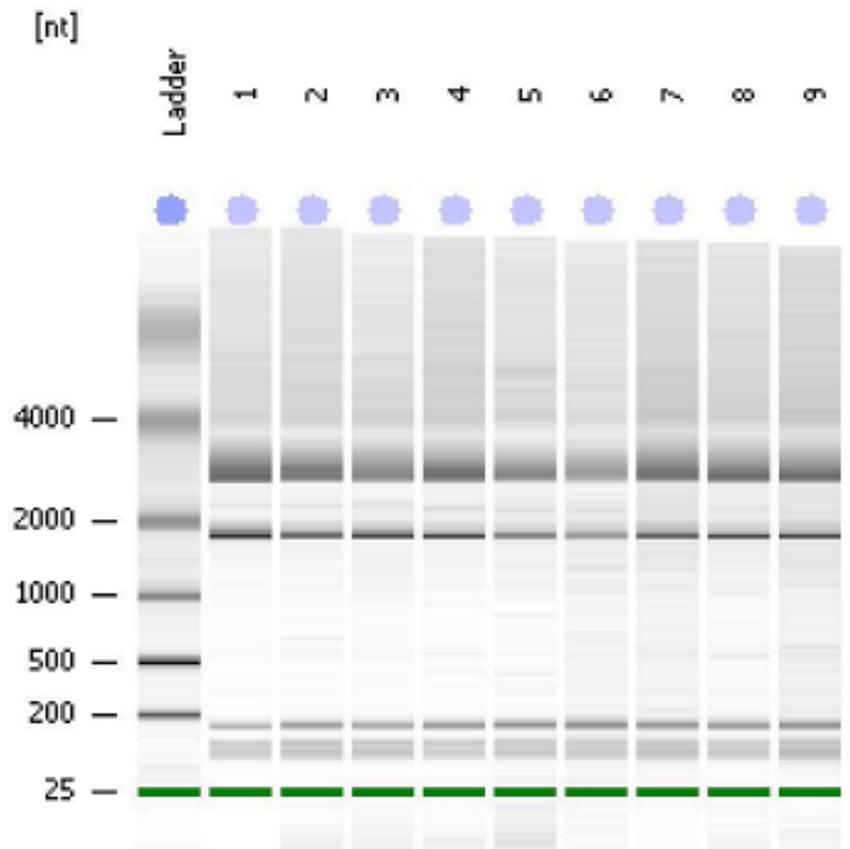
As amostras provenientes das fermentações em quimostato tiveram seu RNA total extraído e para assegurar a qualidade do sequenciamento as amostras foram quantificadas no NanoVue e Qubit e posteriormente a integridade do RNA foi avaliada através da obtenção dos valores de RIN > 7 no bioanalyser seguindo os protocolos do fabricante. Esses dados estão apresentados na tabela 3 e a foto do gel de agarose estão descritos na figura 12.

**Tabela 3. Valores das concentrações de RNA extraídos das amostras de LBGA-01 fermentadas à 30°C e 40°C**

	<b>Qubit ng/ul</b>	<b>NanoVue ng/ul</b>	<b>Bioanalyzer RIN Values</b>
1	334	406	8
2	174	223	8.80
3	230	291	10
4	108	129	10
5	59,8	61,6	10
6	47,4	52	10
7	149	190	10
8	109	131	8.50
9	118	120	8.20

Nota: As amostras de 1 a 9 correspondem aos ensaios realizados em triplicatas biológicas: 1-3 LBGA-01 30°C; 4-6 LBGA-01 40°C e 7-9 CAT-1 30°C. A linhagem industrial CAT-1 foi avaliada como controle uma vez que os dados fisiológicos e de transcriptomas para esta linhagem ainda são desconhecidos na literatura. Fonte: Elaborada pelo autor.

A figura 12, abaixo, foi obtida através da eletroforese das amostras de RNA e a imagem do gel mostra a integridade dos fragmentos das subunidades do RNA ribossomal com os tamanhos específicos esperados (1800bp e 3000bp) para as amostras. Todas as amostras apresentaram o mesmo padrão de amplificação. Esses resultados evidenciam que as amostras estão puras e o RNA íntegro e assim podem ser usadas para a construção das bibliotecas de mRNA e posteriormente sequenciadas. A importância desta avaliação também mostra a qualidade dos experimentos realizados anteriormente para a obtenção do RNA.



**Figura 12. Gel de eletroforese das amostras de RNA para construção das bibliotecas de RNAseq.**

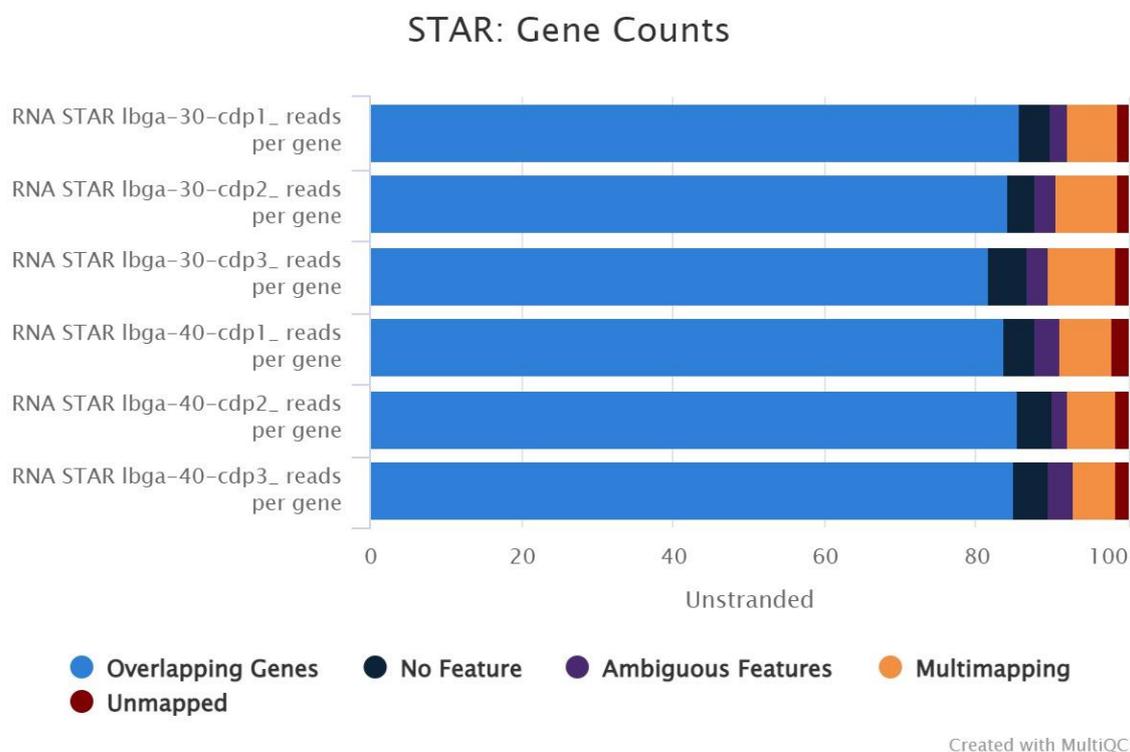
### **5.7.2. Mapeamento das seqüências obtidas do sequenciamento**

O controle de qualidade (QC) das leituras de RNA-Seq bruto foi realizado com FastQC v.0.11.2 (<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>). A qualidade do sequenciamento das amostras se mostraram altas com valores de FASTQC Quality Scores acima de 30 podendo assim serem utilizados nas análises computacionais.

As leituras de seqüência restantes foram alinhadas ao genoma de referência da levedura S288c e posteriormente quantificado os reads brutos através do software STAR v.2.5.4 (Dobin *et al.*, 2013) usando os parâmetros padrão. Os arquivos de anotação gênica do tipo GTF foram obtidos do banco de dados Ensembl.

O mapeamento foi realizado utilizando a ferramenta STAR e o resultado visualizado com o software MULTIQC. Os resultados evidenciam que a maioria das seqüências (acima de 80% em todas as bibliotecas) mapearam uma única vez no genoma e foram consideradas para análises posteriores (Figura 12). Os *reads* mapeados no

genoma de referência e o arquivo BAM gerado pelo software STAR foram submetidos a contagem na ferramenta HTSEQ-COUNT. As tabelas obtidas para cada amostra foram utilizadas no cálculo de transcritos expressos por milhão de reads (TPM) e, também, nas análises de expressão gênica diferencial.



**Figura 13. Análise das seqüências mapeadas no genoma de referência pela ferramenta STAR.** As barras em azul claro representam os reads mapeados uma única vez no genoma, os quais serão contabilizados na análise de expressão gênica.

Utilizando um fold change de  $\geq 2$ , e  $p < 0,05$  os genes diferenciais foram obtidos. No total foram identificados 269 genes diferentemente expressos (anexo 1).

Para elucidar de forma funcional a resposta transcricional do fenótipo de termotolerância, uma análise de enriquecimento dos termos GO (*Gene Ontology*) utilizando o software Blast2go foi realizada para cada condição do experimento, os termos foram enriquecidos na categoria processos biológicos para os genes up e down-regulados e os valores de p-value foram utilizados para a construção de treemaps através do software Revigo (<http://revigo.irb.hr/>) (figuras 14, 15 e 16). Essa análise inicial mostrou primeiramente quais são as funções biológicas ativadas para os 269 genes



Fernandes *et al.*, 2022). Pensando nisso, os treemaps analisados separadamente de acordo com as condições do estudo (30 e 40°C) mostraram exatamente esta diferença de ativação das funções biológicas.

A figura 14 e 15 mostram funções biológicas ativadas em ambas as temperaturas de estudo porém divergindo os grupos de vias metabólicas relacionadas com essas funções. Possivelmente, estes genes diferencialmente expressos estão relacionados com as regulações biológicas dessas vias nas diferentes temperaturas.

Quando comparado os treemaps dos genes mais expressos à 30°C com os mais expressos à 40°C, podemos observar que ambos compartilham de vários clusters com expressão de genes relacionado às mesmas funções biológicas para ambos.

Por outro lado é interessante observar a existência de clusters únicos de acordo com a temperatura, por exemplo à 30°C podemos observar a presença de grupos de funções biológicas relacionadas com processos catabólicos, processos catabólicos de oligossacarídeos, processos metabólicos de vitaminas dentre outros, já à 40°C essas funções não são observadas.

Porém, funções ativadas à 40°C como as de organização da cromatina e segregação do cromossomo não são observadas à 30°C, evidenciando uma possível readequação da célula ao novo panorama a ela imposto.

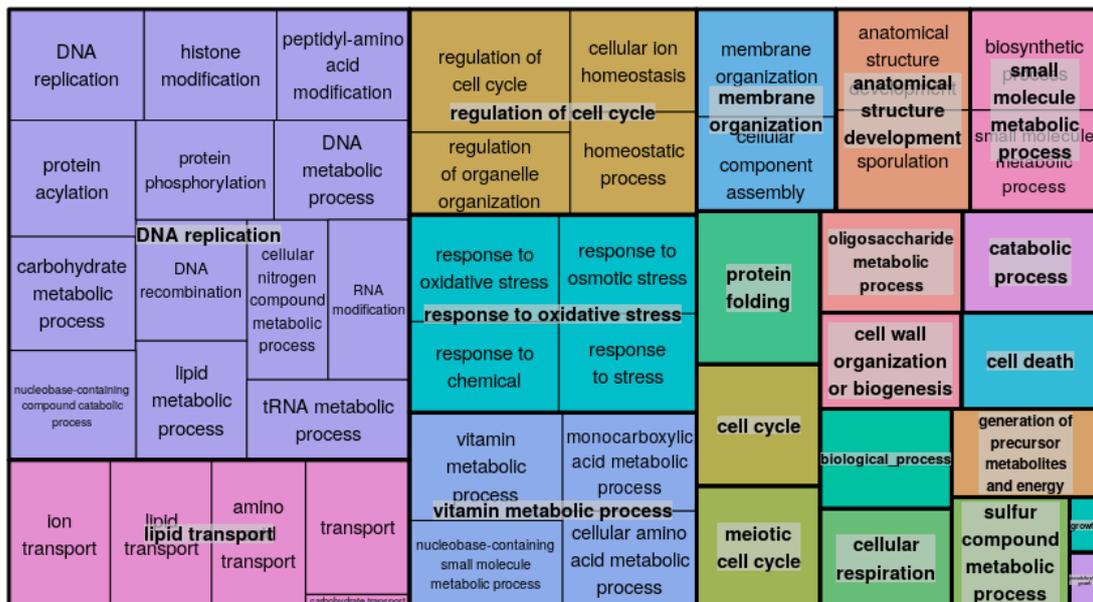
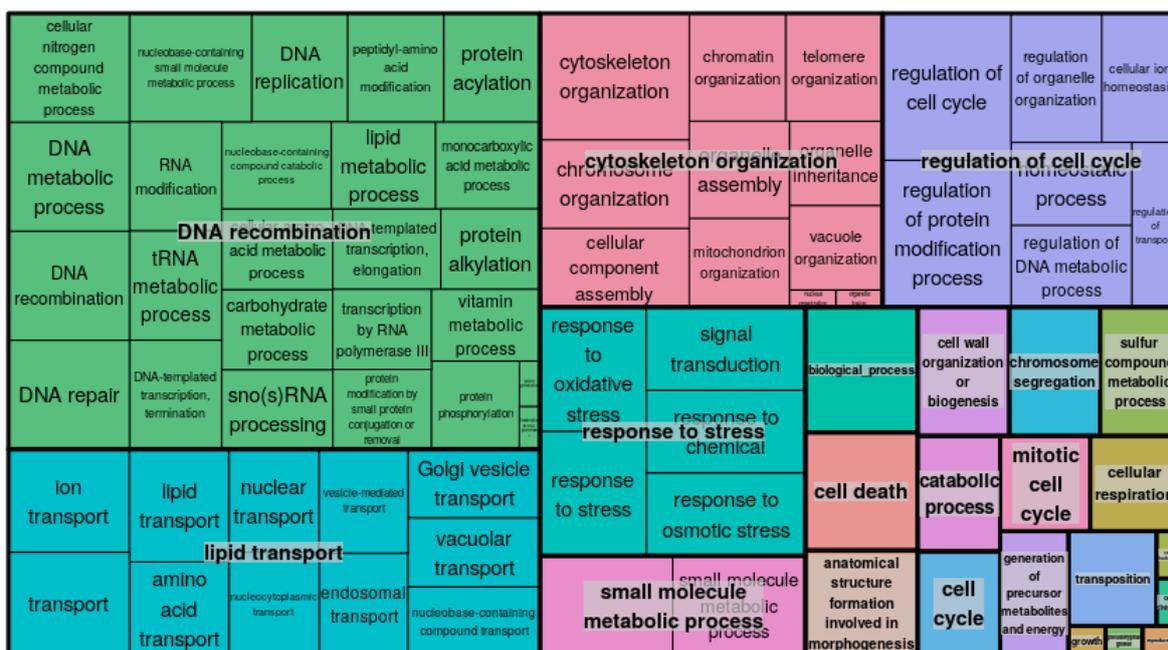


Figura 15. Treemap resumido em categorias de processos biológicos do GO (gene ontology) para a cepa LBG-01 à 30°C.

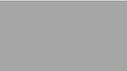


**Figura 16.** Treemap resumido em categorias de processos biológicos do GO (gene ontology) para a cepa LBG-01 à 40°C.

Para melhor exemplificar e visualizar essas diferenças, a tabela 4 mostra algumas funções biológicas diferentemente expressas e o link de acesso aos genes envolvidos com essas funções que estão anotados no Gene Ontology Term do SGD (*Saccharomyces* Data Base).

**Tabela 4.** Relação de algumas funções biológicas expressas nas condições de estudo e os possíveis genes relacionados. A intensidade de cor indica a expressão dos genes diferencialmente expressos nas respectivas funções biológicas ativadas nas condições de estudo (30°C e 40°C) usando a cepa termotolerante LBG-01.

<i>Função Biológica</i>	<i>30°C</i>	<i>40°C</i>	<i>Link do SGD</i>
<i>Processos metabólicos de oligossacarídeos</i>			<a href="https://www.yeastgenome.org/go/GO:0009311">https://www.yeastgenome.org/go/GO:0009311</a>
<i>Organização de membrana</i>			<a href="https://www.yeastgenome.org/go/GO:0061024">https://www.yeastgenome.org/go/GO:0061024</a>
<i>Organização do citoesqueleto</i>			<a href="https://www.yeastgenome.org/go/GO:0007010">https://www.yeastgenome.org/go/GO:0007010</a>

<i>Segregação de cromossomo</i>			<a href="https://www.yeastgenome.org/go/GO:0007059">https://www.yeastgenome.org/go/GO:0007059</a>
<i>Dobramento de proteínas</i>			<a href="https://www.yeastgenome.org/go/GO:0006457">https://www.yeastgenome.org/go/GO:0006457</a>
<i>Organização de cromatina</i>			<a href="https://www.yeastgenome.org/go/GO:0006325">https://www.yeastgenome.org/go/GO:0006325</a>
<i>Transporte de lipídios/ Transporte da vesícula de golgi</i>			<a href="https://www.yeastgenome.org/go/GO:0006869">https://www.yeastgenome.org/go/GO:0006869</a> <a href="https://www.yeastgenome.org/go/GO:0048193">https://www.yeastgenome.org/go/GO:0048193</a>

Fonte: Elaborada pelo autor.

Cabe ressaltar, mesmo que as funções biológicas como por exemplo transporte de lipídeos estejam expressas em ambas condições, quando comparadas entre si as mesmas apresentam grupos de funções e vias metabólicas diferentemente expressas.

À 40°C, genes relacionados com as vias de transporte de lipídios estão muito mais associados à esta função biológica do que à 30°C.

Isso pode ocorrer devido às condições de estresse da célula ou pelo fato de à 40°C, a levedura ativar mais vias relacionadas com a síntese de transporte de lipídios do que à 30°C (Caspeta *et al.*, 2014; Johnston *et al.*, 2020; Jordá e Puig, 2020). Na tabela 4 pode-se observar alguns genes anotados para esta função biológica.

Outra função biológica apresentada à 40°C e não apresentada à 30°C no treemap, é a organização do citoesqueleto e dentro desta função biológica podemos observar a via de organização de cromatina que não está presente à 30°C.

De forma geral a análise dos treemaps de acordo com a expressão diferencial dos genes pode mostrar quais funções biológicas estão mais ativadas de acordo com os genes diferentemente expressos obtidos da análise do transcriptoma.

O que pode se notar é que existem genes sendo ativados tanto à 30°C quanto à 40°C, regulando atividades biológicas importante para a célula no processo fermentativo, porém fica claro que algumas funções biológicas ativadas à 40°C são reprimidas à 30°C e o contrário também. Por isso avaliar os genes mais detalhadamente e tentar encontrar genes relacionados a essas vias são de extrema importância para este estudo.

### 5.7.3. Análise de expressão gênica diferencial

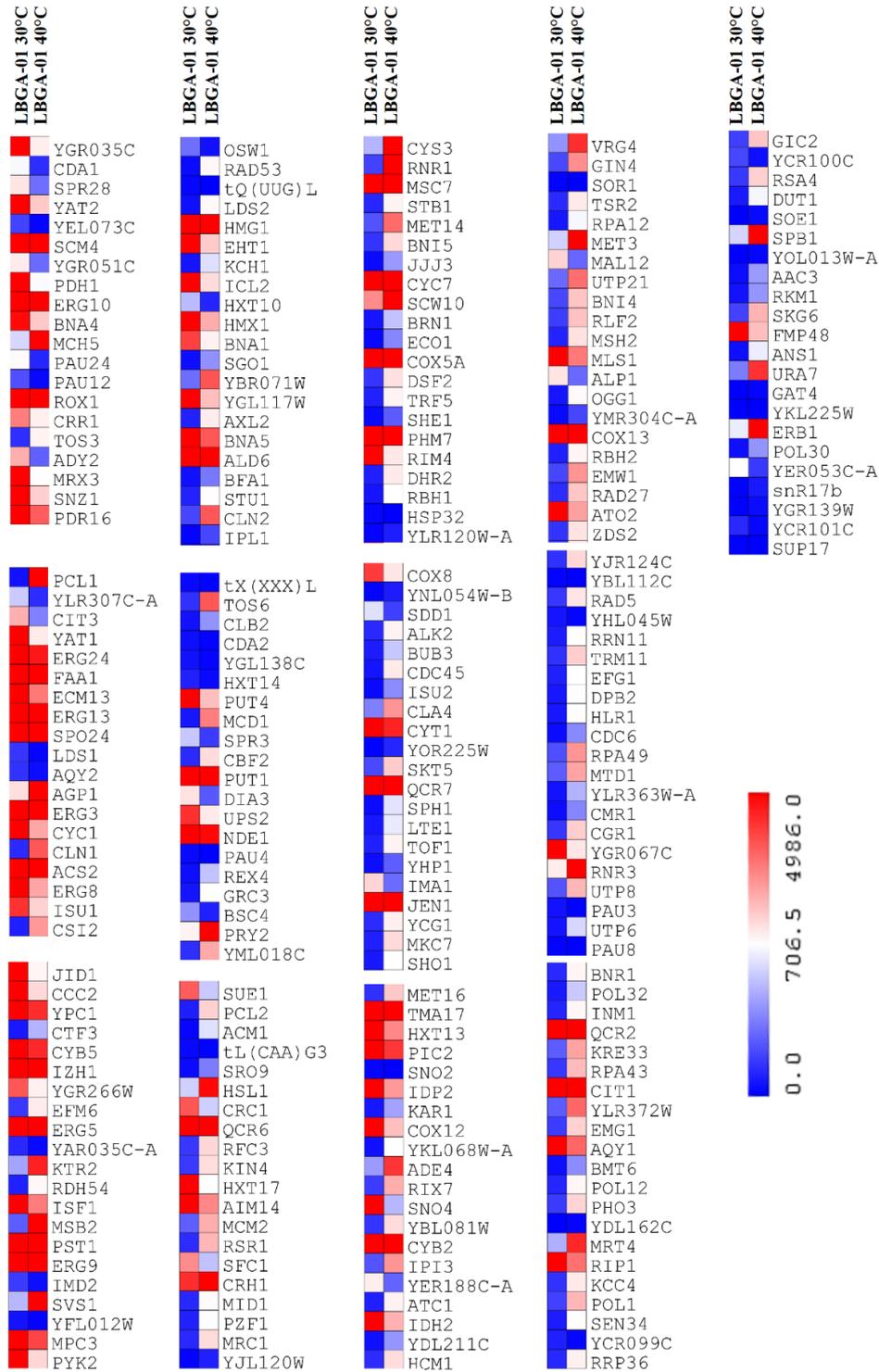
Após a avaliação inicial pelos treemaps, os 269 genes anotados como diferencialmente expressos tiveram seu *reads counts* avaliados em forma de heatmap (Figura 17).

Como pode ser observado na figura 16 os genes diferentemente expressos apresentam uma regulação de expressão muito diferente de acordo com a condição que a levedura está sendo submetida.

Por exemplo se observarmos à 40°C alguns genes podem ser citados como sendo mais expressos nesta condição. São eles: *PCL1*; *CLN1*; *CSI2*; *TOS6*; *PRY2*; *MET3*; *ERB1*; *ADE4*; *PCL2*; *HSL1*; *CYS3*; *MET16*; *RNR1* dentre outros que também podem ser observados. Assim como já descrito neste trabalho, experimentos de expressão gênica por q-PCR mostraram a importância de genes e vias metabólicas envolvidas nas fermentações utilizando a cepa LBG-01.

Um gene muito importante e que foi bem abordado em resultados anteriores, foi o gene *SNF1* que à 40°C está altamente expresso e mostrou um papel importante tanto na repressão do gene *GPD2* a elevadas temperaturas quanto na reativação de *SUC2* em fermentações utilizando a cepa comercial CAT-1. Fazendo uma avaliação das funções biológicas de acordo com a expressão gênica representada no heatmap foi possível observar uma maior expressão do gene *TOS3* à 40°C do que na temperatura controle de 30°C.

Este gene desempenha papel-chave na resposta ao estresse nutricional e também está diretamente ligado a necessidade da célula usar fontes não fermentescíveis como fonte de carbono (Hong *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2005). O gene *TOS3* codifica uma proteína quinase que fosforila e ativa o gene *SNF1*. Este resultado corrobora com resultados prévios e evidencia a importância do gene *SNF1* em fermentações a elevadas temperaturas.



**Figura 17. Heatmap dos 269 genes diferencialmente expressos nas condições estacionária de cultivo em meio sintético Verduyn (Apêndice E) à 30 e 40°C. Os reads counts foram utilizados para a construção do heatmap no software MEV.**



**Tabela 5. Top 30 genes mais expressos (30°C e 40°C) e agrupados de acordo com a sua função biológica descrita no *Gene Ontology***

Gene	Função Biológica
<i>CYC7; QCR6; QCR7; COX5A</i>	Transporte de elétrons
<i>PRY2</i>	Exportação de ácidos graxos
<i>MCH5</i>	Transportador de riboflavina
<i>SVS1; CRH1; SCW10; PST1; PHM7</i>	Organização da parede celular
<i>RNR3</i>	Replicação e reparo do DNA
<i>TMA17</i>	Biossíntese de ácidos graxos
<i>FAA1</i>	Atividade de acetil-coa e importação de ácidos graxos de cadeia longa para a célula
<i>ALD6</i>	Conversão de acetaldeído a acetil-coa
<i>ROX1</i>	Repressor Coordena a biossíntese de ergosterol
<i>ACS2</i>	Necessário para crescimento em glicose
<i>IZH1</i>	Homeostase de zinco
<i>MSC7</i>	Recombinação meiótica
<i>CYB2</i>	Utilização do lactato
<i>PUT1</i>	Utilização de fontes de nitrogênio
<i>AGP1</i>	Afinidade de aminoácidos
<i>ERG3; ERG5; ERG13; ERG10; HMG1</i>	Biossíntese de ergosterol
<i>CIT1</i>	Atividade de citrato
<i>JEN1</i>	Transportador de monocarboxilato

Fonte: Elaborada pelo autor.

Interessante observar que genes relacionados a síntese da membrana celular são mais expressos à 40°C do que à 30°C, isso pode ser um mecanismo de defesa e atuação da célula em relação a condição de estresse a qual está sendo submetida. O gene *PST1* é uma proteína da parede celular que é regulada positivamente pela via da integridade celular e superexpressada por danos na parede da célula ligados a ruptura de *FKS1*. À 40°C o gene *PST1* foi mais expresso do que a 30°C mostrando que a temperaturas mais

elevadas a parede da célula está em total fase de manutenção de sua integridade (*Pardo et al.*, 1999; *Terashima et al.*, 2000).

Outro gene relacionado com a organização da parede celular que também está mais expresso à 40°C é o gene *SVSI* o qual é pouco reportado na literatura com relação a sua função molecular para a célula, o que sabe-se é que este gene é necessário para a resistência a qualquer sal ou éster do ácido vanádico ou ânion dele derivado (*Nakamura et al.*, 1995). A expressão gênica de *CRHI* e *SCW10* também fazem parte deste seletivo grupo de genes relacionado com a organização da parede celular sendo ambos mais expressos a 40°C do que a 30°C, o gene *CRHI* está relacionado com o transporte de quitina para a parede celular (*Cabib et al.*, 2007) e o gene *SW10* é relacionado com a atividade de glicosidase e a similaridade por glucanases (*Cappellaro et al.*, 1998).

Quando submetidas a situações de estresse a as células de leveduras passam por danos em seu DNA, de acordo com os resultados de expressão gênica diferencial foi possível encontrar genes ligados com a replicação e reparação do DNA. O gene *RNR3* mais expresso à 40°C catalisa a conversão de nucleotídeos em desoxirribonucleotídeos, este gene não é expresso durante o crescimento celular mas sim em momentos de danos ao DNA e sua superexpressão suprime a letalidade de algumas mutações (*Elledge e Davis* 1987, 1990).

De acordo com os resultados prévios obtidos nos treemaps foi possível observar que genes estão clusterizados e envolvidos em processos catabólicos de carboidratos e lipídeos, o gene *MCH5* é um gene requerido para processos que depende de FAD além de ser um facilitador na absorção de vitaminas e também ser um transportador de riboflavinas para a membrana plasmática (*Reihl e Stolz*, 2005). Este gene à 40°C se encontra mais expresso em comparação com a temperatura controle, assim hipotetizamos que a 40°C a célula da levedura precisa de mais energia para conseguir catabolizar as fontes de carbono e outros compostos, essa hipótese vai de encontro com a clusterização de genes observadas nos treemaps para a função biológica de organização da parede celular.

Também podemos relacionar a expressão deste gene com a capacidade da célula a 40°C estar desempenhando um mecanismo de detecção e defesa, aumentando a expressão de *MCH5* evitando a sua deficiência e assim contribuindo para a absorção de vitaminas pela membrana plasmática (*Reihl e Stolz*, 2005).

A cepa de *S. cerevisiae* LBGA-01 parece desempenhar um forte mecanismo para manter a integridade celular e suas funções vitais para seu metabolismo a temperaturas

elevadas. A célula da levedura está sujeita a várias condições de estresse ao longo da fermentação, alguns compostos que não conseguem resistir a essas condições são acetilados e secretados no meio de cultura, enquanto os lipídios passam pelo ciclo e são desacetilados e retidos dentro da célula (Choudhary e Schneiter, 2012).

Existe uma família de proteínas conservadas, as proteínas Pathogen-Related Yeast (*PRY*), uma classe de proteínas de ligação a esteróis. A cepa *S. cerevisiae* tem três membros desta família, dois dos quais, *Pry1* e *Pry2*, são secretados, enquanto *Pry3* é uma proteína associada à parede celular (Choudhary e Schneiter, 2012). Avaliando a expressão gênica da cepa termotolerante LBGA-01 foi possível observar uma maior expressão deste gene a 40°C do que a 30°C, talvez esta expressão esteja relacionada com a biossíntese de esteróis como o ergosterol (*ERG*) ao longo da fermentação, uma vez que essa via é coordenada pela expressão de *ROX1* que é ativado em condições de estresse (Jordá e Puig, 2020).

O ergosterol é um importante componente para a membrana das células em *S. cerevisiae* determinando a fluidez, permeabilidade e atividade das proteínas e também na adaptação a estresses (Tarkowská e Strnad, 2016). Segundo Jordá, 2020, a biossíntese de ergosterol é um processo complexo que envolvem muitas enzimas e requer uma alta energia (Jordá e Puig, 2020). Isso pode explicar a maior expressão de *MCH5* à 40°C uma vez que a sua expressão está relacionado com a requisição de maiores níveis de energia para catabolizar carboidratos e lipídeos.

A biossíntese de ergosterol apresenta muitos genes *ERG* com diferentes sinais e vias, por este motivo muitos aspectos de regulação e resposta desta biossíntese ainda são desconhecidos (Jordá e Puig, 2020). Vale apenas ressaltar que os resultados do transcriptoma da cepa LBGA-01 mostrou genes *ERG* sendo expressos ao longo das fermentações contribuindo com a biossíntese do ergosterol, à 30°C a expressão destes genes é mais atenuada do que à 40°C, embora estes genes sejam mais expressos em condições de estresse o ergosterol também está atrelado ao estímulo de crescimento e proliferação celular, isso nos leva à hipótese de que essas vias podem ser rapidamente mais ativadas na condição controle de processo, exigido tanto para o crescimento e proliferação celular quanto para as outras funções da biossíntese de ergosterol (Jordá e Puig, 2020).

Outra hipótese de acordo com a expressão aumentada de *ERG3* (precursor) a 30°C é de que a biossíntese de ergosterol está mais ativa à 30°C do que à 40°C simplesmente pelo fato da concentração de ergosterol estar maior nesta condição do que

na outra, uma vez que *ERG3* é regulado negativamente quando ergosterol está em excesso (Jordá e Puig, 2020). Outros genes (*ERG5*, *ERG13* e *ERG10*) que participam das etapas sequenciais da biossíntese de ergosterol também estão mais expressos à 30°C do que à 40°C reforçando esta hipótese.

Além disso, os níveis de ergosterol no meio fermentativo são de extrema importância para respostas em condições de hipóxia em *S. cerevisiae* (Jordá e Puig, 2020). Essa afirmação corrobora com os estudos realizados com a cepa termotolerante LBGA-01 uma vez que os ensaios realizados em quimiostatos para obtenção do RNA total e a realização do transcriptoma foram conduzidos em condições anaeróbias.

A cepa *S. cerevisiae* tem seu metabolismo pronto para operar em condições de anaerobiose porém de acordo com os resultados obtidos à 30°C a cepa LBGA-01 parece ser muito mais suscetível a condições de hipóxia do que à 40°C uma vez que a expressão do gene *CYC7* é bem mais evidenciada na temperatura controle.

Os resultados obtidos do transcriptoma até o momento mostram que a cepa LBGA-01 termotolerante possui um mecanismo diferentemente expresso para a regulação de vias metabólicas relacionadas com a integridade da membrana celular quando comparado a temperatura controle. Além disso a temperaturas mais elevadas a regulação de outros genes envolvidos com a organização celular e regulação do ciclo celular estão mais expressos.

A biossíntese de ergosterol mostrou ser uma importante via para a LBGA-01 tanto à 30 quanto à 40°C e sua regulação é de extrema importância para o desenvolvimento da célula. Vale a pena ressaltar que atualmente tem crescido os estudos e pesquisas relacionado a produção de esteróis por *S. cerevisiae*, a síntese deste produto possui um alto valor agregado para as indústrias alimentícias e farmacêuticas (Johnston *et al.*, 2020).

Assim o transcriptoma da cepa LBGA-01 mostrou diferentes e interessantes características do ponto de vista transcricional quando submetida a elevadas temperaturas, esses resultados nos dá uma ideia inicial do fato desta cepa ser resistente a tantos estressores do processo fermentativo, alguns fatores indicam que uma das respostas é o fato de vias metabólicas relacionadas com a integridade da célula estarem mais expressas e de certa forma mais ativadas ao longo do processo.

Os resultados obtidos do sequenciamento desta cepa ainda serão objeto de estudos e análises de bioinformática mais aprofundados trazendo novas respostas e um melhor entendimento para este estudo.

## 6. CONCLUSÕES

Este trabalho realizou a caracterização de uma nova linhagem de *S. cerevisiae* com importantes características fermentativas, além disso essa linhagem pode ter características biotecnológicas importantes como a capacidade de crescer sob condições de estresse como altas temperaturas e presença de inibidores bem como uma alta velocidade de crescimento celular.

Os resultados mostram que embora tenha havido uma queda na viabilidade ao longo dos ciclos à 40°C a cepa LBGA-01 ainda se caracteriza como uma potencial linhagem termotolerante produzindo altos níveis de etanol à 40°C, aparentando ter boa adaptação a etapas de ciclos e tratamento ácido.

Adicionalmente, esta linhagem aparentemente muda suas vias metabólicas para resistir a vários estressores produzidos na produção de etanol 1G e 2G, incluindo altas concentrações de etanol e açúcar, gerando melhores rendimentos em etanol bem como apresentando resistência a concentrações inibitórias de ácido acético, ácido láctico e furfural.

Os resultados do transcriptoma mostraram funções biológicas mais ativadas à 40°C e a expressão diferencial de genes com papel importante para a manutenção e integridade da célula à 40°C, esses resultados podem ser relacionados e corroboram com os estudos fisiológicos e de caracterização da levedura.

Fica evidenciado a robustez da cepa LBGA-01, sua característica de crescimento bem como a resistência a inibidores do processo e bons rendimentos em etanol, faz desta cepa uma potencial cepa para a produção de etanol em maiores escalas.

Por fim, do ponto de vista industrial esses resultados também pode contribuir com o desenvolvimento do processo de produção de etanol em elevadas temperaturas, a fim de reduzir o uso de água para resfriar as dornas favorecendo a prevalência desta linhagem ao longo da fermentação à 40°C.

**Os dados apresentados no item de caracterização da leveduras fazem parte do trabalho publicado.**

Prado et al. *Biotechnol Biofuels* (2020) 13:178  
<https://doi.org/10.1186/s13068-020-01817-6>

Biotechnology for Biofuels

RESEARCH

Open Access

## Physiological characterization of a new thermotolerant yeast strain isolated during Brazilian ethanol production, and its application in high-temperature fermentation



Cleiton D. Prado<sup>1</sup>, Gustavo P. L. Mandrujano<sup>1</sup>, Jonas. P. Souza<sup>1</sup>, Flávia B. Sgobbi<sup>1</sup>, Hosana R. Novaes<sup>1</sup>, João P. M. O. da Silva<sup>1</sup>, Mateus H. R. Alves<sup>1</sup>, Kevy P. Eliodório<sup>2</sup>, Gabriel C. G. Cunha<sup>2</sup>, Reinaldo Giudici<sup>2</sup>, Diele P. Procópio<sup>2</sup>, Thiago O. Basso<sup>2</sup>, Iran Malavazi<sup>1</sup> and Anderson F. Cunha<sup>1\*</sup> 

**Figura 19. Artigo relacionado a tese de doutorado.** O trabalho intitulado “Physiological characterization of a new thermotolerant yeast strain isolated during Brazilian ethanol production, and its application in high-temperature fermentation” foi publicado no ano de 2020 em periódico Qualis A2.

## 7. PERSPECTIVAS FUTURAS

A realização bem como a conclusão deste trabalho de doutorado, possibilita novos estudos para um melhor entendimento do perfil genético e fermentativo da cepa LBGA-01. Abaixo estão descritos alguns pontos relevantes e que podem potencializar ainda mais a utilização desta cepa na indústria:

- Do ponto de vista fermentativo, testes em maiores escalas ainda são necessários para avaliar a resistência desta cepa bem como o seu perfil de fermentação em condições mais próximas ao da usina de cana-de-açúcar;
- Testes de competitividade com as linhagens comerciais (CAT-1 E PE-2) usadas na indústria a fim de avaliar a predominância da cepa LBGA-01;
- Testes fermentativo (30 e 40°C) usando a LBGA-01 na presença de *Lactobacillus* a fim de investigar a resistência da cepa termotolerante em condições de contaminações bacteriana bem como o perfil fermentativo nesta condição;
- Realizar a esporulação para isolamento de DNA de haploides termotolerantes e termosensíveis para análise genômica e assim identificar genes diferencialmente expressos, polimorfismos mutações, inserções ou deleções gênicas associadas à aquisição de termotolerância visando a aplicação de linhagens termotolerantes com alta performance fermentativa, para aplicação industrial;
- Após o melhor entendimento do transcriptoma e do genoma da cepa termotolerante, o uso da tecnologia de edição genética CRISPR poderá ser utilizado para avaliar genes alvos e locais de interesse no genoma;
- A performance do fenótipo da cepa LBGA-01 pode ser melhorada usando técnicas de engenharia evolutiva, posteriormente a mesma estratégia de caracterização utilizada neste trabalho para a cepa LBGA-01 pode ser utilizadas para a cepa evoluída;
- A cepa evoluída apresentando bons resultados de fermentação bem como melhora no seu fenótipo poderá ter seu transcriptoma sequenciado e comparado com sua parental para entender quais genes e regiões estão envolvidas com a aquisição e melhora do fenótipo;
- A linhagem termotolerante poderá ser investigada em outros processos de interesse biotecnológicos como a produção de cerveja e também a como fermento na produção de pães.

## 8. COLABORAÇÕES E TRABALHOS REALIZADOS

Neste tópico de forma especial serão mencionados as colaborações e o trabalhos bem como o envolvimento com outras linhas de pesquisa.

Assim como mencionado na introdução desta tese, o LBGA vêm isolando linhagens selvagens não somente da produção de etanol desde 2009. Diante a experiência do grupo e o número de estudos previamente realizados, em 2018 o grupo de pesquisa do LBGA elaborou um trabalho de revisão de literatura de leveduras no qual o autor desta tese é coautor e o mesmo está publicado no periódico Fungal Biology.



Fungal Biology  
Volume 122, Issue 6, June 2018, Pages 583-591



### Improvement of Brazilian bioethanol production – Challenges and perspectives on the identification and genetic modification of new strains of *Saccharomyces cerevisiae* yeasts isolated during ethanol process

Jonas Paulino de Souza <sup>a</sup>, Cleiton Dias do Prado <sup>a</sup>, Elis C.A. Eleutherio <sup>b</sup>, Diego Bonatto <sup>c</sup>, Iran Malavazi <sup>a</sup>, Anderson Ferreira da Cunha <sup>a</sup>  

**Figura 20. Artigo de revisão de literatura.** O artigo foi publicado no ano de 2018, trabalho baseado na experiência do grupo do Laboratório de Bioquímica e Genética Aplicada em biotecnologia e genética de leveduras.

O Laboratório de Bioquímica e Genética Aplicada também tem pesquisadores envolvidos com a seleção e caracterização de leveduras da produção de cerveja. Portanto ao longo desta tese de doutorado houve a participação em estudos ligados a esta temática. Os resultados desta colaboração geraram um trabalho no qual sou autor e está publicado no periódico Food Microbiology.



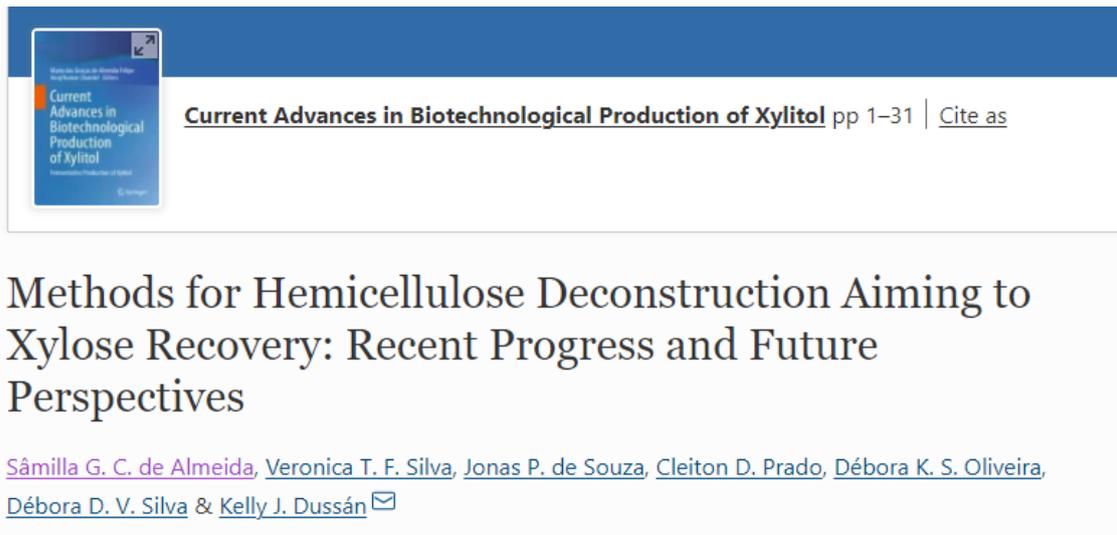
## Identification and selection of a new *Saccharomyces cerevisiae* strain isolated from Brazilian ethanol fermentation process for application in beer production

Gustavo P. Lorca Mandujano <sup>a, c, 1</sup>, Henrique C. Alves <sup>a, 1</sup>, Cleiton D. Prado <sup>a, 1</sup>, Jeferson G.O. Martins <sup>a, c</sup>, Hosana R. Novaes <sup>a</sup>, João Pedro Maia de Oliveira da Silva <sup>a</sup>, Gleidson Silva Teixeira <sup>d</sup>, André Ohara <sup>d</sup>, Mateus H.R. Alves <sup>a</sup>, Isadora C. Pedrino <sup>a</sup>, Iran Malavazi <sup>a</sup>, Cristina Paiva de Sousa <sup>b, c</sup>, Anderson F. da Cunha <sup>a, c</sup>

**Figura 21. Artigo de caracterização de cepas de *S. cerevisiae* selvagens aplicadas na produção de cerveja.** O artigo intitulado “Identification and selection of a new *Saccharomyces cerevisiae* strain isolated from Brazilian ethanol fermentation process for application in beer production” foi publicado no ano de 2021.

Vale a pena ressaltar que para a conclusão do trabalho citado acima, foi necessário realizar um evento para testar a aceitação da cerveja produzida, o evento realizado no caso envolveu todo o grupo de pesquisa do LBGA e também a participação de grandes nomes da área cervejeira bem como empresas do ramo e da biotecnologia que ajudaram o evento como patrocinadores e palestrantes. O resultados do evento foram positivos e ainda foi possível conseguir um *budget* para o estudo e avaliação do genoma das cepas isoladas da produção de cerveja e também da cepa termotolerante LBGA-01. Este evento serviu e servirá como modelo para eventos futuros no qual será necessário ter a avaliação qualitativa de cervejas e vinhos produzidos utilizando cepas de leveduras selvagens.

Mais recentemente foi publicado o capítulo de um livro (Figura 22) no qual o autor desta tese contribuiu na elaboração do texto, uma importante colaboração com o departamento de Biotecnologia da Universidade Paulista (UNESP) de Araraquara.



**Figura 22.** Capítulo de livro escrito em colaboração com o departamento de biotecnologia da Universidade Paulista (UNESP) de Araraquara. O trabalho foi publicado no ano de 2022.

Outras duas colaborações também foram realizadas em parceria com pesquisadores da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz da Universidade de São Paulo (ESALQ/USP ). Os trabalhos estão em fase de submissão/aceite pelos periódicos selecionados para publicação.

Durante a realização do cronograma de atividades desta tese de doutorado a pandemia teve o seu agravamento global, devido a capacidade técnica e por possuir condições para análises com material viral, o Laboratório de Bioquímica e Genética Aplicada – LBGA em parceria com o governo federal começou de forma voluntária a realizar os testes para o diagnóstico do vírus SARS-COV 19 na cidade de São Carlos e região. Ao todo foram realizados mais de 5.000 testes e assim foi possível contribuir com um diagnóstico mais rápido evitando a propagação do vírus na região de São Carlos.

Durante o período de testes (9 meses) o autor desta tese de doutorado trabalhou diariamente realizando a extração do material genético do vírus SARS-COV 19 para posterior análise da carga viral por q-PCR. Embora este período tenha sido de muito trabalho e também de isolamento social, em nenhum momento o cronograma de atividades da tese de doutorado foi afetado. De certa forma foi uma experiência satisfatória para todo o grupo de pesquisa que pode contribuir de forma positiva ajudando a sociedade e mostrando a importância da pesquisa e da ciência para o mundo.

Além disso, de forma paralela foram iniciados os estudos de evolução dirigida e testes dos haploides da cepa termotolerante LBGA-01 para o sequenciamento do genoma.

## REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- ALMEIDA TAVARES FC. Control of spoilage yeasts in fuel ethanol production. **Biotechnology letters** 17:1121-1126,1995.
- ANDREASEN AA. Anaerobic nutrition of *Saccharomyces cerevisiae*. Indiana University, 1953.
- ANDREASEN AA, STIER TJB. Anaerobic nutrition of *Saccharomyces cerevisiae*. II. Unsaturated fatty and requirement for growth in a defined medium. **Journal of cellular and comparative physiology** 43:271–281, 1954.
- ANDRIETTA M da GS, ANDRIETTA SR, STUPIELLO ÉNA. Bioethanol—what has Brazil learned about yeasts inhabiting the ethanol production processes from sugar cane. **Biofuel production—recent developments and prospects InTech**, Rijeka 67–84, 2011.
- ANDRIETTA MGS, ANDRIETTA SR, STECKLBERG C, STUPIELLO ENA. Bioethanol-Brazil, 30 years of Proálcool. **International Sugar Journal** 109:195–200, 2007.
- ANTUNES FAF, RAJAN K, DJIOLEU A, *et al.* Sustainable Second-Generation Ethanol Production from Switchgrass Biomass via Co-fermentation of Pentoses and Hexoses Using Novel Wild Yeasts. **Bioenergy Research** 15:1157–1168, 2022. <https://doi.org/10.1007/s12155-021-10302-3>
- ARGUESO JL, CARAZZOLLE MF, MIECZKOWSKI PA, *et al.* Genome structure of a *Saccharomyces cerevisiae* strain widely used in bioethanol production. **Genome research** 19:2258–2270, 2009.
- ASK M, BETIGGA M, MAPELLI V, OLSSON L . The influence of HMF and furfural on redox-balance and energy-state of xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology for biofuels** 6:1–13, 2013.
- BABRZADEH F, JALILI R, WANG C, *et al.* Whole-genome sequencing of the efficient industrial fuel-ethanol fermentative *Saccharomyces cerevisiae* strain CAT-1. **Molecular genetics and genomics** 287:485–494, 2012.
- BADINO JR AC, CRUZ AJG **Fundamentos de Balanço de Massa e Energia**. São Paulo: Editora Edufscar, 2011.
- BAIFW, ANDERSON WA, MOO-YOUNG M . Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks. **Biotechnology advances** 26:89–105, 2008.
- BAPTISTA SL *et al.* Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for the production of top value chemicals from biorefinery carbohydrates. **Biotechnology Advances** 47:107697, 2021.
- BAPTISTA VF . A relação entre o consumo e a escassez dos recursos naturais: uma abordagem histórica. **Saúde & Ambiente em Revista** 5:8–14, 2010.
- BASSO LC, BASSO TO, ROCHA SN . Ethanol production in Brazil: the industrial process and its impact on yeast fermentation. **Biofuel production-recent developments and prospects** 1530:85–100, 2011.

- BASSO LC, DE AMORIM H V, DE OLIVEIRA AJ, LOPES ML . Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil. **FEMS yeast research** 8:1155–1163, 2008.
- BASSO TP, BASSO LC **Fuel ethanol production from sugarcane**. BoD–Books on Demand, 2019.
- BERNARDI TL, DE MELO PEREIRA GV, CARDOSO PG, *et al.* Saccharomyces cerevisiae strains associated with the production of cachaça: identification and characterization by traditional and molecular methods (PCR, PFGE and mtDNA-RFLP). **World Journal of Microbiology and Biotechnology** 24:2705–2712, 2008.
- BERTRAND E, DSUSSAP C-G. First Generation Bioethanol: Fundamentals—Definition, History, Global Production, Evolution. In: **Liquid Biofuels: Bioethanol**. Springer, pp 1–12, 2022.
- BISSON LF, FAN Q, WALKER GA . **Sugar and glycerol transport in Saccharomyces cerevisiae**. Yeast membrane transport 125–168, 2016.
- BOLGER AM, LOHSE M, USADEL B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. **Bioinformatics** 30:2114–2120, 2014.
- CABIB E, BLANCO N, GRAU C, *et al.* Crh1p and Crh2p are required for the cross-linking of chitin to  $\beta$  (1-6) glucan in the Saccharomyces cerevisiae cell wall. **Molecular microbiology** 63:921–935, 2007.
- CAI P, GAO J, ZHOU Y . CRISPR-mediated genome editing in non-conventional yeasts for biotechnological applications. **Microbial Cell Factories** 18:1–12, 2019. <https://doi.org/10.1186/s12934-019-1112-2>
- CAPPELLARO C, MRSA V, TANNER W . New potential cell wall glucanases of Saccharomyces cerevisiae and their involvement in mating. **Journal of bacteriology** 180:5030–5037, 1998.
- CARLOS L, OLITTA T, NITSCHKE S . Ethanol Production in Brazil: The Industrial Process and Its Impact on Yeast Fermentation. **Biofuel Production-Recent Developments and Prospects** 85–100, 2011. <https://doi.org/10.5772/17047>
- CARVALHO-NETTO O V, CARAZZOLLE MF, RODRIGUES A, *et al.* A simple and effective set of PCR-based molecular markers for the monitoring of the Saccharomyces cerevisiae cell population during bioethanol fermentation. **Journal of biotechnology** 168:701–709, 2013.
- CARVALHO, LN, BORTOLINE, GJ, BARCELLOS L **Biocombustíveis: Uma opção para o desenvolvimento sustentável** V.2, N.2, Edição Especial, 2014. 2
- CASPETA L, CHEN Y, GHIACI P, *et al.* Altered sterol composition renders yeast thermotolerant. **Science** 346:75–78, 2014.
- CECCATO-ANTONINI SR, COVRE EA. From baker's yeast to genetically modified budding yeasts: The scientific evolution of bioethanol industry from sugarcane. **FEMS Yeast Research** 20:1–10, 2020. <https://doi.org/10.1093/femsyr/foaa065>
- CETESB** (2008) Resolução SMA - 88, de 19-12-2008
- CHOUDHARY V, SCHNEITER R. Pathogen-Related Yeast (PRY) proteins and members of the CAP superfamily are secreted sterol-binding proteins. **Proceedings of the National Academy of Sciences** 109:16882–16887, 2012.

- CIDON C, THEIS V, SCHREIBER D, *et al.* Analysis of organic agriculture in the Southern Region of Brazil, from the perspective of sustainability. **Revista em Agronegocio e Meio Ambiente**, 2021 14:. <https://doi.org/10.17765/2176-9168.2021v14Supl.1.e9420>
- CORADINI AL *et al.* QTL mapping of a Brazilian bioethanol strain links the cell wall protein-encoding gene GAS1 to low pH tolerance in *S. cerevisiae*. **Biotechnology for Biofuels** 14:1–16, 2021.
- CORTEZ LAB. **Proálcool 40 anos: Universidades e empresas: 40 anos de ciência e tecnologia para o etanol brasileiro**. Editora Blucher, 2018.
- COSTA DA *et al.* Physiological characterization of thermotolerant yeast for cellulosic ethanol production. **Applied microbiology and biotechnology** 98:3829–3840, 2014.
- COSTA MAS, CERRI BC, CECCATO-ANTONINI SR . Ethanol addition enhances acid treatment to eliminate *Lactobacillus fermentum* from the fermentation process for fuel ethanol production. **Letters in applied microbiology** 66:77–85, 2018.
- DA SILVA FERNANDES F *et al.* Current Ethanol Production Requirements for the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **International Journal of Microbiology** 2022:. <https://doi.org/10.1155/2022/7878830>
- DE ANDRADE E, DE CARVALHO SR, DE SOUZA LF . Programa Do Proálcool E O Etanol No Brasil. **Engevista** 11:127–136, 2010. <https://doi.org/10.22409/engevista.v11i2.236>
- DE MELLO F da SB *et al.* Static microplate fermentation and automated growth analysis approaches identified a highly-aldehyde resistant *Saccharomyces cerevisiae* strain. **Biomass and Bioenergy** 120:49–58, 2019.
- DE OLIVEIRA RA *et al.* Energy supply design for the integrated production of 1G + 2G ethanol from sugarcane. **Renewable Energy Focus** 35:171–177, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.ref.2020.10.005>
- DE SOUZA JP *et al.* Improvement of Brazilian bioethanol production—challenges and perspectives on the identification and genetic modification of new strains of *Saccharomyces cerevisiae* yeasts isolated during ethanol process. **Fungal biology** 122:583–591, 2018.
- DE VASCONCELOS JN Ethanol fermentation. In: **Sugarcane**. Elsevier, pp 311–340, 2015.
- DEKKER WJ *et al.* Engineering the thermotolerant industrial yeast *Kluyveromyces marxianus* for anaerobic growth. **Metabolic Engineering** 67:347–364, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2021.07.006>
- DELLA-BIANCA, Bianca Eli; GOMBERT AK Stress tolerance and growth physiology of yeast strains from the Brazilian fuel ethanol industry. **Antonie Van Leeuwenhoek** 104:1083–1095, 2013.
- DELLA-BIANCA BE *et al.* Physiology of the fuel ethanol strain *Saccharomyces cerevisiae* PE-2 at low pH indicates a context-dependent performance relevant for industrial applications. **FEMS yeast research** 14:1196–1205, 2014.

- DELLA-BIANCA BE *et al.* What do we know about the yeast strains from the Brazilian fuel ethanol industry? **Applied Microbiology and Biotechnology** 97:979–991, 2013. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4631-x>
- DEMIRBAS A Progress and recent trends in biofuels. **Progress in Energy and Combustion Science** 33:1–18, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.pecs.2006.06.001>
- DEPARIS Q *et al.* Engineering tolerance to industrially relevant stress factors in yeast cell factories. **FEMS yeast research** 17:1–17, 2017. <https://doi.org/10.1093/femsyr/fox036>
- DMYTRUK KV *et al.* Genetic improvement of conventional and nonconventional yeasts for the production of first-and second-generation ethanol. In: **Biotechnology of yeasts and filamentous fungi**. Springer, pp 1–38, 2017.
- DOBIN A *et al.* STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. **Bioinformatics** 29:15–21, 2013.
- DORTA C *et al.* Synergism among lactic acid, sulfite, pH and ethanol in alcoholic fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* (PE-2 and M-26). **World Journal of Microbiology and Biotechnology** 22:177–182, 2006.
- DOS REIS, Marcelo Cardoso; GONÇALVES, Wellington; DE FREITAS RR Panorama Evolutivo Da Produtividade De Biocombustíveis No Brasil Nos Últimos 10 Anos. **Brazilian Journal of Production Engineering - BJPE** 34–46, 2022. <https://doi.org/10.47456/bjpe.v8i3.36951>
- EDGARDO A *et al.* Selection of thermotolerant yeast strains *Saccharomyces cerevisiae* for bioethanol production. **Enzyme and Microbial Technology** 43:120–123, 2008.
- ELLEDGE, Stephen J.; DAVIS RW Two genes differentially regulated in the cell cycle and by DNA-damaging agents encode alternative regulatory subunits of ribonucleotide reductase. **Genes & development** 4:740–751, 1990.
- ELLEDGE, STEPHEN J.; DAVIS RW Identification and isolation of the gene encoding the small subunit of ribonucleotide reductase from *Saccharomyces cerevisiae*: DNA damage-inducible gene required for mitotic viability. **Molecular and cellular biology** 7:2783–2793, 1987.
- ENGEL SR *et al.* The reference genome sequence of *Saccharomyces cerevisiae*: then and now. **G3: Genes, Genomes, Genetics** 4:389–398, 2014.
- FAVARO, Lorenzo; JANSEN, Trudy; VAN ZYL WH Exploring industrial and natural *Saccharomyces cerevisiae* strains for the bio-based economy from biomass: the case of bioethanol. **Critical reviews in biotechnology** 39:800–816, 2019.
- FIELD SJ *et al.* Identification of furfural resistant strains of *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces paradoxus* from a collection of environmental and industrial isolates. **Biotechnology for biofuels** 8:1–8, 2015.
- FISK DG *et al.* *Saccharomyces cerevisiae* S288C genome annotation: a working hypothesis. **Yeast** 23:857–865, 2006.
- FREITAS, Elisa Pinheiro de; ROSSINI, Rosa Ester; QUEIRÓS M **O poder das empresas transnacionais sobre o território brasileiro**. Reflexões a partir do sector sucroenergético. XIII Colóquio Internacional de Geocrítica: El control del espacio y

los espacios de control Barcelona, 2014

- GARCÍA-SANCHO M *et al.* Yeast Sequencing: “Network” Genomics and Institutional Bridges. **Historical Studies in the Natural Sciences** 52:361–400, 2022.
- GAVAHIAN, Mohsen; TIWARI BK Moderate electric fields and ohmic heating as promising fermentation tools. **Innovative Food Science & Emerging Technologies** 64:102422, 2022.
- GELADÉ R *et al.* Multi-level response of the yeast genome to glucose. **Genome biology** 4:1–5, 2003.
- GIANNATTASIO S *et al.* Acid stress adaptation protects *Saccharomyces cerevisiae* from acetic acid-induced programmed cell death. **Gene** 354:93–98, 2005.
- GLICK, Bernard R.; PATTEN CL (2022) *Molecular biotechnology: principles and applications of recombinant DNA*. John Wiley & Sons
- GODOY A *et al.* Continuous and batch fermentation processes: advantages and disadvantages of these processes in the Brazilian ethanol production. **International sugar journal** 110, 2008.:
- GOFFEAU A *et al.* Life with 6000 genes. **Science** 274:546–567, 1996.
- GOLDEMBERG J Ethanol for a sustainable energy future. **science** 315:808–810, 2007.
- GUERRA FA **Métodos de contagem microbiana**. Microbiologia de Alimentos, 2016
- GUIMARÃES TM *et al.* Isolation and characterization of *Saccharomyces cerevisiae* strains of winery interest. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas** 42:119–126, 2006.
- HAMELINCK, Carlo N.; VAN HOOIJDONK, Geertje; FAAIJ AP Ethanol from lignocellulosic biomass: techno-economic performance in short-, middle-and long-term. **Biomass and bioenergy** 28:384–410, 2005.
- HERNÁNDEZ-GARCÍA JA *et al.* **Yeast Taxonomy**
- HONG S *et al.* Activation of yeast Snf1 and mammalian AMP-activated protein kinase by upstream kinases. **Proceedings of the National Academy of Sciences** 100:8839–8843, 2003.
- HUANG X *et al.* Response of *Saccharomyces cerevisiae* to Ethanol Stress Involves Actions of Protein Asr1p. **Journal of microbiology and biotechnology** 20:1630–1636, 2010.
- JIA B *et al.* Directed yeast genome evolution by controlled introduction of trans-chromosomal structural variations. **Science China Life Sciences** 1–15, 2022.
- JOHNSTON, Emily J.; MOSES, Tessa; ROSSER SJ The wide-ranging phenotypes of ergosterol biosynthesis mutants, and implications for microbial cell factories. **Yeast** 37:27–44, 2020.
- JORDÁ, Tania; PUIG S Regulation of Ergosterol Biosynthesis in. **Genes**, 2020
- JOSEPA, Sabaté; GUILLAMON, José M.; CANO J PCR differentiation of *Saccharomyces cerevisiae* from *Saccharomyces bayanus*/*Saccharomyces pastorianus* using specific primers. **FEMS Microbiology Letters** 193:255–259,

2020.

- KAYIKCI, Ömur; NIELSEN J Glucose repression in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS yeast research** 15:fov068, 2015.
- KIM, Myoung-Dong; HONG, Seung-Pyo; CARLSON M Role of Tos3, a Snf1 protein kinase kinase, during growth of *Saccharomyces cerevisiae* on nonfermentable carbon sources. **Eukaryotic Cell** 4:861–866, 2005.
- LEÃO, Cecilia; VAN UDEN N Effects of ethanol and other alkanols on the glucose transport system of *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology and Bioengineering** 24:2601–2604, 1982.
- LINO, Felipe Senne de Oliveira; BASSO, Thiago Olitta; SOMMER MOA A synthetic medium to simulate sugarcane molasses. **Biotechnology for biofuels** 11:1–12, 2018.
- LIU S *et al.* Effects of rice husk on the tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* to high temperature and ethanol concentration. **Fuel** 333:126406, 2023.
- LIU ZL Genomic adaptation of ethanologenic yeast to biomass conversion inhibitors. **Applied Microbiology and Biotechnology** 73:27–36, 2006.
- LORCA MANDUJANO GP **Seleção e evolução dirigida de leveduras para a utilização nas indústrias do bioetanol e cervejeiras**. 2018. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2018.
- LOVE, Michael I.; HUBER, Wolfgang; ANDERS S Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. **Genome biology** 15:1–21, 2014.
- MADEIRA-JR, José Valdo; GOMBERT AK Towards high-temperature fuel ethanol production using *Kluyveromyces marxianus*: On the search for plug-in strains for the Brazilian sugarcane-based biorefinery. **Biomass and bioenergy** 119:217–228, 2018.
- MALAVAZI, Iran; GOLDMAN GH Gene disruption in *Aspergillus fumigatus* using a PCR-based strategy and in vivo recombination in yeast. In: **Host-Fungus Interactions**. Springer, pp 99–118, 2012.
- MANDUJANO GPL *et al.* Identification and selection of a new *Saccharomyces cerevisiae* strain isolated from Brazilian ethanol fermentation process for application in beer production. **Food Microbiology** 103:103958, 2022. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fm.2021.103958>
- MARRIS E Drink the best and drive the rest. **Nature** 444:670–672, 2006.
- MAVROMMATI, Maria; PAPANIKOLAOU, Seraphim; AGGELIS G Improving ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* through adaptive laboratory evolution using high ethanol concentrations as a selective pressure. **Process Biochemistry** 124:280–289, 2023.
- MORIYA, Hisao; JOHNSTON M Glucose sensing and signaling in *Saccharomyces cerevisiae* through the Rgt2 glucose sensor and casein kinase I. **Proceedings of the National Academy of Sciences** 101:1572–1577, 2004.
- MORTIMER, Robert K.; JOHNSTON JR Genealogy of principal strains of the yeast genetic stock center. **Genetics** 113:35–43, 1986.

- MORTIMER RK Evolution and variation of the yeast (*Saccharomyces*) genome. **Genome research** 10:403–409, 2000.
- MUKHERJEE V *et al.* Phenotypic landscape of non-conventional yeast species for different stress tolerance traits desirable in bioethanol fermentation. **Biotechnology for biofuels** 10:1–19, 2017.
- NAKAMURA T *et al.* Cloning and characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* SVS1 gene which encodes a serine-and threonine-rich protein required for vanadate resistance. **Gene** 165:25–29, 1995.
- NEPOMUCENO AL *et al.* Brazilian biosafety law and the new breeding technologies. **Front Agr Sci Eng** 7:204–210, 2020.
- NETO HB de A *et al.* Evaluation of a Brazilian fuel alcohol yeast strain for scotch whisky fermentations. **Journal of the Institute of Brewing** 115:198–207, 2009.
- NEVES, Marcos Fava; TROMBIN, Vinícius Gustavo; CONSOLI MA **Mapeamento e quantificação do setor sucroenergético em 2008**. Centro de Pesquisa e Projetos em Marketing e Estratégia e Fundação para Pesquisa e Desenvolvimento da Administração, Contabilidade e Economia Ribeirão Preto/SP, setembro de 2009
- NICASTRO R *et al.* Enhanced amino acid utilization sustains growth of cells lacking Snf1/AMPK. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research** 1853:1615–1625, 2015.
- OVERKAMP KM *et al.* Metabolic engineering of glycerol production in *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied and Environmental Microbiology** 68:2814–2821, 2002.
- PÅHLMAN A-K *et al.* The yeast glycerol 3-phosphatases Gpp1p and Gpp2p are required for glycerol biosynthesis and differentially involved in the cellular responses to osmotic, anaerobic, and oxidative stress. **Journal of Biological Chemistry** 276:3555–3563, 2001.
- PAIS TM *et al.* Comparative polygenic analysis of maximal ethanol accumulation capacity and tolerance to high ethanol levels of cell proliferation in yeast. **PLoS genetics** 9:e1003548, 2013.
- PANCHAL CJ **Yeast strain selection**. CRC Press, 2020.
- PARDO M *et al.* Two-dimensional analysis of proteins secreted by *Saccharomyces cerevisiae* regenerating protoplasts: a novel approach to study the cell wall. **Yeast** 15:459–472, 1999.
- PEREIRA JV **Análise termodinâmica de uma usina sucroalcooleira visando o uso racional e sustentável da água de resfriamento**. 2021. Dissertação (Mestrado em Eng. Mecânica) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Ilha Solteira, 2021.
- PIRES, Eduardo; BRÁNYIK T **Biochemistry of beer fermentation**. Springer, 2015.
- PRADO CD *et al.* Physiological characterization of a new thermotolerant yeast strain isolated during Brazilian ethanol production, and its application in high-temperature fermentation. **Biotechnology for Biofuels** 13:1–15, 2020. <https://doi.org/10.1186/s13068-020-01817-6>
- RAGHAVENDRAN V *et al.* A simple scaled down system to mimic the industrial production of first generation fuel ethanol in Brazil. **Antonie Van Leeuwenhoek**

- 110:971–983, 2017.
- RAMOS MDN *et al.* Enzymatic catalysis as a tool in biofuels production in Brazil: Current status and perspectives. **Energy for Sustainable Development** 68:103–119, 2022.
- REGENBERG B *et al.* Growth-rate regulated genes have profound impact on interpretation of transcriptome profiling in *Saccharomyces cerevisiae*. **Genome biology** 7:1–13, 2006.
- REIHL, Petra; STOLZ J The monocarboxylate transporter homolog Mch5p catalyzes riboflavin (vitamin B2) uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of biological chemistry** 280:39809–39817, 2005.
- RODRIGUES GO *et al.* Um Modelo Para Análise De Impactos Ambientais E Dos Custos Financeiros Do Uso De Diferentes Combustíveis Em Um Veículo. **Gestão & Planejamento** 22:51–68, 2021. <https://doi.org/10.53706/gep.v.21.5653>
- SAINI P *et al.* Response and tolerance of yeast to changing environmental stress during ethanol fermentation. **Process Biochemistry** 72:1–12, 2018.
- SALINA, Fernando Henriques; DE ALMEIDA, Isabela Aroeira; BITTENCOURT FR RenovaBio opportunities and biofuels outlook in Brazil. In: **Renewable energy and sustainable buildings**. Springer, pp 391–399, 2020.
- SALMON J-M *et al.* Sugar transport inhibition and apparent loss of activity in *Saccharomyces cerevisiae* as a major limiting factor of enological fermentations. **American Journal of Enology and Viticulture** 44:56–64, 1993.
- SANCHEZ, Oscar J.; CARDONA CA Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. **Bioresource technology** 99:5270–5295, 2008.
- SANDERSON K A field in ferment. **Nature** 444:673–676, 2006.
- SANTIAGO, Bárbara Luiza Silva; RODRIGUES F de Á Processamento De Biomassa Lignocelulósica Para Produção De Etanol: Uma Revisão. **The Journal of Engineering and Exact Sciences** 3:1011–1022, 2017. <https://doi.org/10.18540/jcecv13iss7pp1011-1022>
- SANTOS LD *et al.* Estudo do controle da contaminação na fermentação alcoólica com *saccharomyces cerevisiae* floculantes utilizando antibióticos naturais e comerciais. **Blucher Chemical Engineering Proceedings** 1:2017–2024, 2015.
- SOLOMON BD Biofuels and sustainability. **Annals of the New York Academy of Sciences** 1185:119–134, 2010.
- SOUZA JP de. **Isolamento e caracterização de cepas termotolerantes de *Saccharomyces cerevisiae* e análise da expressão de genes possivelmente envolvidos com a termotolerância**, 2018. Dissertação (Mestrado em genética) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2018
- STAMBUK, Boris U.; DE ARAUJO PS Kinetics of active  $\alpha$ -glucoside transport in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Yeast Research** 1:73–78, 2001.
- STAMBUK BU *et al.* Improvement of maltotriose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. **Letters in applied microbiology** 43:370–376, 2006.

- STAMBUK BU *et al.* Industrial fuel ethanol yeasts contain adaptive copy number changes in genes involved in vitamin B1 and B6 biosynthesis. **Genome research** 19:2271–2278, 2009.
- STEPHEN, James D.; MABEE, Warren E.; SADDLER JN Will second-generation ethanol be able to compete with first-generation ethanol? Opportunities for cost reduction. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining** 6:159–176, 2012.
- STEWART, Graham G.; RUSSELL I Biochemistry and genetics of carbohydrate utilization by industrial yeast strains. **Pure and applied chemistry** 59:1493–1500, 1987.
- STEWART GG *et al.* (1987) **Biological research on industrial yeasts**. In: Symposium on the Biochemistry and Molecular Biology of Industrial Yeasts (1985: Kalamazoo, Mich.). CRC Press
- ŠURANSKÁ, Hana; VRÁNOVÁ, Dana; OMELKOVÁ J (2016) Isolation, identification and characterization of regional indigenous *Saccharomyces cerevisiae* strains. **Brazilian journal of microbiology** 47:181–190
- SUSMOZAS A *et al.* Process strategies for the transition of 1G to advanced bioethanol production. **Processes** 8:1–45, 2020. <https://doi.org/10.3390/pr8101310>
- SZCZODRAK, J.; TARGOŃSKI Z Selection of thermotolerant yeast strains for simultaneous saccharification and fermentation of cellulose. **Biotechnology and bioengineering** 31:300–303, 1988.
- TAMÁS MJ *et al.* Stimulation of the yeast high osmolarity glycerol (HOG) pathway: evidence for a signal generated by a change in turgor rather than by water stress. **FEBS letters** 472:159–165, 2000.
- TARKOWSKÁ, Danuše; STRNAD M Plant ecdysteroids: plant sterols with intriguing distributions, biological effects and relations to plant hormones. **Planta** 244:545–555, 2016.
- TERASHIMA H *et al.* Up-regulation of genes encoding glycosylphosphatidylinositol (GPI)-attached proteins in response to cell wall damage caused by disruption of FKS1 in *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular and General Genetics** MGG 264:64–74, 2000.
- TOMÁS-COBOS, Lidia; SANZ P Active Snf1 protein kinase inhibits expression of the *Saccharomyces cerevisiae* HXT1 glucose transporter gene. **Biochemical Journal** 368:657–663, 2002.
- TYAGI S *et al.* CRISPR-Cas9 system: A genome-editing tool with endless possibilities. **Journal of Biotechnology** 319:36–53, 2020.
- VERDUYN C *et al.* Effect of benzoic acid on metabolic fluxes in yeasts: a continuous-culture study on the regulation of respiration and alcoholic fermentation. **Yeast** 8:501–517, 1992.
- VEZINHET, Françoise; BLONDIN, Bruno; HALLET J-N Chromosomal DNA patterns and mitochondrial DNA polymorphism as tools for identification of enological strains of *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Microbiology and Biotechnology** 32:568–571, 1990.

VIDAL M de F **Produção e mercado de etanol**, 2020.

VIDAL M de F **Agroindústria-Etanol**, 2022.

WALKER, Graeme M.; WALKER RS Enhancing yeast alcoholic fermentations. **Advances in Applied Microbiology** 105:87–129, 2018.

WHEALS AE et al. Wheals *et al.* **Fuel ethanol after 25 years**. *Focus* 17:482–487, 1999.

YOUNG ET *et al.* Multiple pathways are co-regulated by the protein kinase Snf1 and the transcription factors Adr1 and Cat8. **Journal of Biological Chemistry** 278:26146–26158, 2003.

## 9. APÊNDICES

APÊNDICE A – TABELA DOS 269 GENES DIFERENTEMENTE EXPRESSOS AO LONGO DAS FEMENTAÇÕES À 30 E 40°C

<b>GeneID</b>	<b>GeneSymbol</b>	<b>log2(FC)</b>	<b>P-value</b>
<i>YNL289W</i>	<i>PCL1</i>	-4,92	1,05E-12
<i>YMR199W</i>	<i>CLN1</i>	-3,77	5,85E-10
<i>YOL007C</i>	<i>CSI2</i>	-3,67	2,29E-09
<i>YDL003W</i>	<i>MCD1</i>	-3,44	6,77E-06
<i>YPL153C</i>	<i>RAD53</i>	-3,44	2,65E-07
<i>YGR014W</i>	<i>MSB2</i>	-3,44	4,89E-08
<i>YNL300W</i>	<i>TOS6</i>	-3,28	3,79E-06
<i>YOR306C</i>	<i>MCH5</i>	-3,25	9,35E-16
<i>YPL267W</i>	<i>ACM1</i>	-3,21	2,02E-05
<i>YER070W</i>	<i>RNR1</i>	-3,17	5,72E-05
<i>YOL047C</i>	<i>LDS2</i>	-3,08	3,61E-07
<i>YPL256C</i>	<i>CLN2</i>	-3,06	2,76E-06
<i>YPL209C</i>	<i>IPL1</i>	-3,05	2,86E-06
<i>YPL163C</i>	<i>SVS1</i>	-3,04	6,79E-08
<i>YDL127W</i>	<i>PCL2</i>	-2,93	1,89E-05
<i>YKR013W</i>	<i>PRY2</i>	-2,93	1,24E-05
<i>YLR313C</i>	<i>SPH1</i>	-2,84	0,00017581
<i>YML018C</i>	-	-2,80	1,33E-05
<i>YLR103C</i>	<i>CDC45</i>	-2,80	0,000157626
<i>YGR152C</i>	<i>RSR1</i>	-2,76	3,97E-05
<i>YBR071W</i>	-	-2,73	1,02E-06
<i>YOL080C</i>	<i>REX4</i>	-2,72	1,11E-05
<i>YFR027W</i>	<i>ECO1</i>	-2,72	8,94E-05
<i>YOR225W</i>	-	-2,68	0,000165774
<i>YKL001C</i>	<i>MET14</i>	-2,66	6,07E-05
<i>YJR097W</i>	<i>JJJ3</i>	-2,62	6,24E-05
<i>YOR226C</i>	<i>ISU2</i>	-2,62	0,00015952
<i>YLL035W</i>	<i>GRC3</i>	-2,61	1,20E-05
<i>YDR144C</i>	<i>MKC7</i>	-2,61	0,000239774
<i>YJR054W</i>	<i>KCH1</i>	-2,60	5,86E-07
<i>YIL140W</i>	<i>AXL2</i>	-2,59	1,52E-06
<i>YCL061C</i>	<i>MRC1</i>	-2,58	5,54E-05
<i>YCL037C</i>	<i>SRO9</i>	-2,56	2,07E-05
<i>YOR073W</i>	<i>SGO1</i>	-2,56	8,69E-07
<i>YJL181W</i>	<i>RBH1</i>	-2,55	0,000109531
<i>YKL068W-A</i>	-	-2,54	0,000282142
<i>YGR140W</i>	<i>CBF2</i>	-2,53	7,89E-06
<i>YDR507C</i>	<i>GIN4</i>	-2,51	0,000463734

YDL162C	-	-2,51	0,001921566
YML060W	OGG1	-2,50	0,000595236
YKL113C	RAD27	-2,48	0,000667923
YOL090W	MSH2	-2,47	0,00056041
YBR073W	RDH54	-2,47	4,33E-08
YKR061W	KTR2	-2,45	3,96E-08
YKL078W	DHR2	-2,45	0,000103487
tE(UUC)G1	SOE1	-2,44	0,002341686
YNL313C	EMW1	-2,43	0,00064272
YOL013W-A	-	-2,43	0,002406709
YCL025C	AGP1	-2,43	4,11E-10
YNL273W	TOF1	-2,42	0,000212824
YLL034C	RIX7	-2,42	0,000289933
YPR167C	MET16	-2,41	0,000239728
YAL024C	LTE1	-2,41	0,000192607
YJR010W	MET3	-2,38	0,00051684
YDR528W	HLR1	-2,37	0,000921138
YPR175W	DPB2	-2,37	0,000909356
YLR372W	-	-2,37	0,001438083
YGL225W	VRG4	-2,36	0,000460568
YNL290W	RFC3	-2,35	2,73E-05
YPR119W	CLB2	-2,34	3,81E-06
YAL012W	CYS3	-2,33	5,71E-05
YJL194W	CDC6	-2,33	0,000948938
YIL104C	SHQ1	-2,33	0,000239859
YJR030°C	RBH2	-2,33	0,000629113
YCR065W	HCM1	-2,32	0,000455823
YKL101W	HSL1	-2,32	2,41E-05
YPR018W	RLF2	-2,32	0,000549145
YHR126C	ANS1	-2,32	0,002737082
YNL182C	IPI3	-2,31	0,000379704
YDR184C	ATC1	-2,31	0,000422188
YNL309W	STB1	-2,30	5,98E-05
YNL166C	BNI5	-2,30	6,13E-05
YNL299W	TRF5	-2,29	9,34E-05
YLR409C	UTP21	-2,29	0,000541869
YOR340°C	RPA43	-2,29	0,001376261
LYJR063W	RPA12	-2,29	0,000508258
YBL097W	BRN1	-2,28	9,04E-05
YIR013C	GAT4	-2,28	0,003202316
YNL248C	RPA49	-2,27	0,000959298
YDL156W	CMR1	-2,26	0,001051136
YMR300C	ADE4	-2,26	0,000288326
YOL124C	TRM11	-2,26	0,000887294
YGL179C	TOS3	-2,26	7,56E-14
YNL102W	POL1	-2,26	0,001998546

<i>YDR449C</i>	<i>UTP6</i>	-2,26	0,001213101
<i>YMR305C</i>	<i>SCW10</i>	-2,25	8,20E-05
<i>YBL031W</i>	<i>SHE1</i>	-2,25	9,46E-05
<i>YBL034C</i>	<i>STU1</i>	-2,25	2,65E-06
<i>YBR007C</i>	<i>DSF2</i>	-2,24	9,24E-05
<i>YLR381W</i>	<i>CTF3</i>	-2,24	3,75E-09
<i>YGR189C</i>	<i>CRH1</i>	-2,24	4,34E-05
<i>YBL009W</i>	<i>ALK2</i>	-2,24	0,000146634
<i>YDR055W</i>	<i>PST1</i>	-2,23	5,93E-08
<i>YBL081W</i>	-	-2,23	0,000317473
<i>YHR149C</i>	<i>SKG6</i>	-2,22	0,002556399
<i>YJL120W</i>	-	-2,22	5,56E-05
<i>YDL211C</i>	-	-2,22	0,000453359
<i>YBR085W</i>	<i>AAC3</i>	-2,22	0,002416993
<i>YJR124C</i>	-	-2,21	0,000758169
<i>YBL039C</i>	<i>URA7</i>	-2,21	0,002990833
<i>YLR363W-A</i>	-	-2,20	0,000967555
<i>YAR008W</i>	<i>SEN34</i>	-2,20	0,002061915
<i>YBL023C</i>	<i>MCM2</i>	-2,19	3,92E-05
<i>YNL233W</i>	<i>BNI4</i>	-2,19	0,000549606
<i>YKR080W</i>	<i>MTD1</i>	-2,19	0,000961494
<i>YGL029W</i>	<i>CGR1</i>	-2,19	0,001078831
<i>YLR435W</i>	<i>TSR2</i>	-2,18	0,000482427
<i>YDR309C</i>	<i>GIC2</i>	-2,18	0,002165649
<i>YLR063W</i>	<i>BMT6</i>	-2,18	0,001576416
<i>YNL054W-B</i>	-	-2,17	0,000139811
<i>YOR233W</i>	<i>KIN4</i>	-2,16	3,26E-05
<i>YML109W</i>	<i>ZDS2</i>	-2,16	0,000701876
<i>YBL061C</i>	<i>SKT5</i>	-2,15	0,000173683
<i>YBR252W</i>	<i>DUT1</i>	-2,15	0,002302654
<i>YIL066C</i>	<i>RNR3</i>	-2,14	0,001111176
<i>YBR088C</i>	<i>POL30</i>	-2,13	0,00385496
<i>YDR325W</i>	<i>YCG1</i>	-2,13	0,000233791
<i>YJR053W</i>	<i>BFA1</i>	-2,12	1,97E-06
<i>YML043C</i>	<i>RRN11</i>	-2,09	0,000868751
<i>snR17b</i>	-	-2,09	0,004181226
<i>YNL132W</i>	<i>KRE33</i>	-2,09	0,001376792
<i>YLR186W</i>	<i>EMG1</i>	-2,09	0,001491517
<i>YLR120W-A</i>	-	-2,09	0,000132234
<i>YMR304C-A</i>	-	-2,08	0,000604217
<i>YOR026W</i>	<i>BUB3</i>	-2,08	0,000155604
<i>YPL208W</i>	<i>RKM1</i>	-2,08	0,00254641
<i>YBL035C</i>	<i>POL12</i>	-2,08	0,001593738
<i>YNL188W</i>	<i>KAR1</i>	-2,08	0,000272801
<i>YNL291C</i>	<i>MID1</i>	-2,08	4,86E-05
<i>YPR186C</i>	<i>PZF1</i>	-2,07	5,00E-05

YLR032W	RAD5	-2,05	0,000794082
YKL009W	MRT4	-2,05	0,001973203
YCR072C	RSA4	-2,05	0,002292045
YIL159W	BNR1	-2,05	0,001321413
YJR043C	POL32	-2,05	0,001322299
YGR128C	UTP8	-2,04	0,001161637
YNL298W	CLA4	-2,04	0,000164646
YDR451C	YHP1	-2,03	0,000213535
YHR046C	INM1	-2,03	0,001354683
YGR139W	-	-2,03	0,004876708
YNL024C	EFM6	-2,03	1,77E-08
YBR092C	PHO3	-2,03	0,001765804
YMR049C	ERB1	-2,02	0,00329222
YCL024W	KCC4	-2,02	0,002010249
YOR287C	RRP36	-2,01	0,002130922
YGR271C-A	EFG1	-2,00	0,000895592
YCL054W	SPB1	-2,00	0,002349663
YPL135W	ISU1	2,00	1,88E-09
YOR136W	IDH2	2,00	0,000433987
YEL024W	RIP1	2,00	0,001985333
<i>tS(UGA)I</i>	SUP17	2,01	0,008074569
YPR191W	QCR2	2,01	0,00135694
YER053C-A	-	2,02	0,004046976
YDL110C	TMA17	2,03	0,000242801
YGL160W	AIM14	2,03	3,40E-05
YMR015C	ERG5	2,04	1,92E-08
YLR038C	COX12	2,05	0,000278635
YCR101C	-	2,05	0,005565106
YBL098W	BNA4	2,05	3,26E-16
YFR033C	QCR6	2,05	2,59E-05
<i>tL(CAA)G3</i>	-	2,06	2,05E-05
YLR395C	COX8	2,06	0,000136009
YDR492W	IZH1	2,07	9,98E-09
YEL057C	SDD1	2,07	0,000145832
YER188C-A	-	2,07	0,000408851
YHR039C	MSC7	2,07	5,99E-05
YGL117W	-	2,07	1,35E-06
YHR190W	ERG9	2,07	5,89E-08
YOL084W	PHM7	2,07	9,45E-05
YGR059W	SPR3	2,08	7,40E-06
YAL068C	PAU8	2,08	0,001301003
YCR100C	-	2,08	0,002264016
YML126C	ERG13	2,09	6,68E-11
YLR213C	CRR1	2,09	3,45E-14
YPR065W	ROX1	2,09	3,19E-14
YMR081C	ISF1	2,10	4,75E-08

<i>YGL191W</i>	<i>COX13</i>	2,10	0,000620736
<i>YMR220W</i>	<i>ERG8</i>	2,10	7,13E-10
<i>YGR052W</i>	<i>FMP48</i>	2,11	0,002589326
<i>YCR099C</i>	-	2,11	0,002118993
<i>YNL280C</i>	<i>ERG24</i>	2,12	1,49E-11
<i>YOR065W</i>	<i>CYT1</i>	2,12	0,00016439
<i>YNR001C</i>	<i>CIT1</i>	2,13	0,001423691
<i>YLR142W</i>	<i>PUT1</i>	2,14	8,07E-06
<i>YNL270C</i>	<i>ALP1</i>	2,14	0,000577095
<i>YNL318C</i>	<i>HXT14</i>	2,15	5,80E-06
<i>YDR529C</i>	<i>QCR7</i>	2,15	0,000176029
<i>YLR056W</i>	<i>ERG3</i>	2,16	4,06E-10
<i>YHL045W</i>	-	2,18	0,000856387
<i>YPR192W</i>	<i>AQY1</i>	2,19	0,001570565
<i>YPL061W</i>	<i>ALD6</i>	2,20	1,60E-06
<i>YML054C</i>	<i>CYB2</i>	2,20	0,000321639
<i>YLR308W</i>	<i>CDA2</i>	2,22	4,51E-06
<i>YGR292W</i>	<i>MAL12</i>	2,23	0,000550269
<i>YNL052W</i>	<i>COX5A</i>	2,25	9,03E-05
<i>YLR153C</i>	<i>ACS2</i>	2,27	6,22E-10
<i>YJR159W</i>	<i>SOR1</i>	2,27	0,000469147
<i>YGL138C</i>	-	2,28	5,72E-06
<i>YGR067C</i>	-	2,29	0,001112376
<i>YNL117W</i>	<i>MLS1</i>	2,30	0,000568913
<i>YLR168C</i>	<i>UPS2</i>	2,30	8,83E-06
<i>YBR177C</i>	<i>EHT1</i>	2,30	5,85E-07
<i>YNR002C</i>	<i>ATO2</i>	2,31	0,000667812
<i>YGR287C</i>	<i>IMA1</i>	2,31	0,000219642
<i>YHL024W</i>	<i>RIM4</i>	2,31	9,98E-05
<i>YJR025C</i>	<i>BNA1</i>	2,31	7,62E-07
<i>YLR231C</i>	<i>BNA5</i>	2,32	1,56E-06
<i>YPR006C</i>	<i>ICL2</i>	2,32	6,78E-07
<i>tX(XXX)L</i>	-	2,32	3,48E-06
<i>YGR266W</i>	-	2,32	1,76E-08
<i>YML075C</i>	<i>HMG1</i>	2,33	4,30E-07
<i>YMR145C</i>	<i>NDE1</i>	2,34	9,16E-06
<i>YBL112C</i>	-	2,36	0,000774631
<i>YGR051C</i>	-	2,37	7,28E-18
<i>YCR104W</i>	<i>PAU3</i>	2,37	0,001170962
<i>YHR216W</i>	<i>IMD2</i>	2,39	6,50E-08
<i>YJR095W</i>	<i>SFC1</i>	2,42	4,06E-05
<i>YDR218C</i>	<i>SPR28</i>	2,44	3,28E-27
<i>YKL225W</i>	-	2,44	0,003205397
<i>YLL052C</i>	<i>AQY2</i>	2,44	2,91E-10
<i>YNL269W</i>	<i>BSC4</i>	2,44	1,21E-05
<i>YOR347C</i>	<i>PYK2</i>	2,45	1,20E-07

<i>YEL039C</i>	<i>CYC7</i>	2,45	7,99E-05
<i>YLR205C</i>	<i>HMX1</i>	2,45	7,50E-07
<i>YKL217W</i>	<i>JEN1</i>	2,45	0,000231401
<i>YGR243W</i>	<i>MPC3</i>	2,48	1,19E-07
<i>YLR461W</i>	<i>PAU4</i>	2,49	1,05E-05
<i>YNL111C</i>	<i>CYB5</i>	2,50	4,42E-09
<i>YDL024C</i>	<i>DIA3</i>	2,51	8,27E-06
<i>YAR035C-A</i>	-	2,52	2,76E-08
<i>YPR036W-A</i>	<i>SPO24</i>	2,52	1,16E-10
<i>YNL334C</i>	<i>SNO2</i>	2,54	0,00025633
<i>YFL012W</i>	-	2,55	1,00E-07
<i>YER053C</i>	<i>PIC2</i>	2,55	0,000251763
<i>YLR174W</i>	<i>IDP2</i>	2,57	0,00026176
<i>YDR270W</i>	<i>CCC2</i>	2,57	2,49E-09
<i>YFL011W</i>	<i>HXT10</i>	2,58	7,01E-07
<i>YGR049W</i>	<i>SCM4</i>	2,61	4,60E-18
<i>YLR307C-A</i>	-	2,61	1,11E-12
<i>YMR096W</i>	<i>SNZ1</i>	2,62	2,12E-13
<i>YOR317W</i>	<i>FAA1</i>	2,63	2,72E-11
<i>YPR151C</i>	<i>SUE1</i>	2,64	1,60E-05
<i>YJR048W</i>	<i>CYC1</i>	2,67	5,81E-10
<i>YOR100C</i>	<i>CRC1</i>	2,67	2,49E-05
<i>YOR348C</i>	<i>PUT4</i>	2,68	6,03E-06
<i>YPL028W</i>	<i>ERG10</i>	2,71	1,09E-16
<i>YBR183W</i>	<i>YPC1</i>	2,73	3,15E-09
<i>YMR322C</i>	<i>SNO4</i>	2,73	0,000293743
<i>YOR255W</i>	<i>OSW1</i>	2,81	2,17E-07
<i>YEL069C</i>	<i>HXT13</i>	2,82	0,000242168
<i>YPR001W</i>	<i>CIT3</i>	2,86	4,19E-12
<i>YBL043W</i>	<i>ECM13</i>	2,89	5,27E-11
<i>YLR307W</i>	<i>CDA1</i>	2,90	6,53E-31
<i>YPL280W</i>	<i>HSP32</i>	2,91	0,000115501
<i>YPR061C</i>	<i>JID1</i>	2,94	2,36E-09
<i>tQ(UUG)L</i>	-	3,04	3,36E-07
<i>YNL231C</i>	<i>PDR16</i>	3,04	9,38E-13
<i>YNR072W</i>	<i>HXT17</i>	3,07	3,30E-05
<i>YBR301W</i>	<i>PAU24</i>	3,16	1,48E-14
<i>YBL095W</i>	<i>MRX3</i>	3,17	1,98E-13
<i>YER024W</i>	<i>YAT2</i>	3,20	4,48E-21
<i>YAR035W</i>	<i>YAT1</i>	3,20	9,07E-12
<i>YCR010C</i>	<i>ADY2</i>	3,25	1,07E-13
<i>YGR294W</i>	<i>PAU12</i>	3,37	3,02E-14
<i>YGR035C</i>	-	3,38	2,03E-39
<i>YPR002W</i>	<i>PDH1</i>	3,44	9,50E-18
<i>YAL018C</i>	<i>LDS1</i>	3,56	2,01E-10
<i>YEL073C</i>	-	3,74	4,95E-20

# APÊNDICE B – SEQUÊNCIA DO ITS DAS LINHAGENS UTILIZADAS NESTE TRABALHO

## >LBGA-01

TTTTGAATGGATTTTTTTGTTTTGGCAAGAGCATGAGAGCTTTTACTGGGCAAGAAGACAAG  
 AGATGGAGAGTCCAGCCGGCCTGCGCTTAAGTGC GCGGTCTTGCTAGGCTTGTAAGTTTCT  
 TTCTTGCTATTCCAAACGGTGAGAGATTTCTGTGCTTTTGTATAGGACAATTA AACCGTTT  
 CAATACAACACACTGTGGAGTTTTCATATCTTTGCAACTTTTTCTTTGGGCATTTCGAGCAATC  
 GGGGCCAGAGGTAACAAACACAAACAATTTTATTTATTCATTAATTTTTGTCAAAAACAA  
 GAATTTTCGTAACTGGAAATTTTAAAATATTA AAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTC  
 GCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGCAGAAATCCGTGAATC  
 ATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCTTGGTATTCCAGGGGGCATGCCTGTTTGAGCGT  
 CATTTCCTTCTCAAACATTCTGTTTGGTAGTGAGTACTCTTTGGAGTTAACTTGAAATTG  
 CTGGCCTTTTCATTGGATGTTTTTTTTTCCAAAAAAGGTTCCCTGCCTGCTTGAGGGAAAA  
 AGCAAATACGG

### Blast result:

BLAST<sup>®</sup> » blastn suite » results for RID-M7S5FGCT014 Home Recent Results Saved Strategies Help

[< Edit Search](#) [Save Search](#) [Search Summary](#) How to read this report? [BLAST Help Videos](#) [Back to Traditional Results Page](#)

**Job Title** 5 sequences (LBGA-01)  
**RID** M7S5FGCT014 Search expires on 08-25 23:45 pm [Download All](#) ▼  
**Results for** 1:|cl|Query\_6775 LBGA-01(635bp) ▼  
**Program** BLASTN [Citation](#) ▼  
**Database** nt [See details](#) ▼  
**Query ID** |cl|Query\_6775  
**Description** LBGA-01  
**Molecule type** dna  
**Query Length** 635  
**Other reports** [Distance tree of results](#) ?

**Filter Results**

**Organism** only top 20 will appear  exclude  
 Type common name, binomial, taxid or group name  
[+ Add organism](#)

**Percent Identity**  to  **E value**  to  **Query Coverage**  to   
[Filter](#) [Reset](#)

**Descriptions** [Graphic Summary](#) [Alignments](#) [Taxonomy](#)

**Sequences producing significant alignments** [Download](#) [Manage Columns](#) Show  ?

select all 100 sequences selected [GenBank](#) [Graphics](#) [Distance tree of results](#)

	Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Saccharomyces cerevisiae internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2</a>	1129	1129	100%	0.0	98.74%	<a href="#">KP998094.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Saccharomyces cerevisiae strain T6 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed sr</a>	1127	1127	100%	0.0	98.74%	<a href="#">GU320706.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Saccharomyces cerevisiae isolate agarose gel electrophoresis internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene</a>	1123	1123	100%	0.0	98.58%	<a href="#">MK307700.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Saccharomyces cerevisiae isolate 60 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and</a>	1123	1123	100%	0.0	98.58%	<a href="#">KJ729298.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Saccharomyces cerevisiae strain ZJU internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed;</a>	1123	1123	97%	0.0	99.36%	<a href="#">KF442632.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Saccharomyces cerevisiae strain MK 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1; 5.8S ribosomal RNA gene</a>	1123	1123	100%	0.0	98.58%	<a href="#">JX047334.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Saccharomyces cerevisiae isolate Sc01 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; a</a>	1122	1122	99%	0.0	98.58%	<a href="#">MT322634.1</a>

>CAT-1

AAGAGCATGAGAGCTTTTACTGGGCAAGAAGACAAGAGATGGAGAGTCCAGCCGGGCCTGC  
 GCTTAAGTGCGCGGTCGTGCTAGGCTTGTAAAGTTTCTTTCTTGCTATTCCAAACGGTGAGAGA  
 TTTCTGTGCTTTTGTATAGGACAATTAACCGTTTCAATACAACACACTGTGGAGTTTTCA  
 TATCTTTGCAACTTTTTCTTTGGGCATTTCGAGCAATCGGGGCCAGAGGTAACAAACACAAA  
 CAATTTTATCTATTCATTAATTTTTGTCAAAAACAAGAATTTTCGTAACGGAAATTTTAAA  
 ATATTA AAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAAT  
 GCGATACGTAATGTGAATTGCAGAATCCGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGC  
 CCCTTGGTATTCCAGGGGGCATGCCTGTTTGAGCGTCATTCCTTCTCAAACATTCTGTTTGG  
 TAGTGAGTGATACTCTTTGGAGTTAACTTGAAATTGCTGGCCTTTTCATTGGATGTTTTTTTC  
 CAAAGAGAGGTTTCTCTGCGTGCTTGAGGTATAATGCAAGTACGGTCGTTTAGGTTTTACC  
 AACTGCGGCTAATCTTTTTTATACTGAGCGTATTGGAACGTTATCGATAAGAAGAGAGCGT  
 CTAGGCGAACAAATGTTCTTAAAGTTTGACCTCAAATCAGGTAGGAGTACCCGCTGAACTTAA  
 GCATATAAAACCCGGAGAGAAAAAGAAGAAAAAATAAATAAATTTGGAAAAAGG  
 AAATTTTTGTTTGGGGAAGAGCAAGGAGAGATTTTACTGGGGGAAGAAGACAAGAGATGGA  
 GAAGTCCAGCCGGGCCTGCGCTTAAGTGCGCGGTCGTGCT

**Blast result:**

BLAST® » blastn suite » results for RID-M7S5FGCT014 Home Recent Results Saved Strategies Help

[< Edit Search](#) [Save Search](#) [Search Summary](#) [How to read this report?](#) [BLAST Help Videos](#) [Back to Traditional Results Page](#)

**Job Title** 5 sequences (LBGA-01)

**RID** M7S5FGCT014 Search expires on 08-25 23:45 pm [Download All](#)

**Results for** 2:lcl|Query\_6776 CAT-1(910bp)

**Program** BLASTN [Citation](#)

**Database** nt [See details](#)

**Query ID** lcl|Query\_6776

**Description** CAT-1

**Molecule type** dna

**Query Length** 910

**Other reports** [Distance tree of results](#)

**Filter Results**

**Organism** only top 20 will appear  exclude

Type common name, binomial, taxid or group name

[+ Add organism](#)

**Percent Identity**  to  **E value**  to  **Query Coverage**  to

[Filter](#) [Reset](#)

Descriptions

Graphic Summary

Alignments

Taxonomy

**Sequences producing significant alignments** [Download](#) [Manage Columns](#) Show

select all 100 sequences selected [GenBank](#) [Graphics](#) [Distance tree of results](#)

Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Saccharomyces cerevisiae 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and in</a>	1447	1592	100%	0.0	95.60%	<a href="#">KT764940.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Saccharomyces cerevisiae strain LY183 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcrip</a>	1430	1558	100%	0.0	95.29%	<a href="#">KY711301.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Saccharomyces cerevisiae isolate L26A internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcrip</a>	1413	1413	85%	0.0	99.61%	<a href="#">KP723679.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Saccharomyces cerevisiae strain TY-1 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribe</a>	1400	1400	100%	0.0	94.46%	<a href="#">KJ781352.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Saccharomyces cerevisiae isolate B-WHX-12-40 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal</a>	1400	1529	95%	0.0	99.35%	<a href="#">KC544484.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Saccharomyces cerevisiae isolate N8 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribe</a>	1399	1538	98%	0.0	99.35%	<a href="#">KX824758.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Saccharomyces cerevisiae isolate Sol103 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transc</a>	1399	1399	84%	0.0	99.35%	<a href="#">KP723682.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Saccharomycotina sp. isolate ACBL-14 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcrib-</a>	1395	1523	95%	0.0	99.35%	<a href="#">MH001970.1</a>

>LBGA-69

```

GGCAAGAGCATGAGAGCTTTTACTGGGCAAGAAGACAAGAGATGGAGAGTCCAGCCGGGCC
TGCGCTTAAGTGC GCGGTCTTGCTAGGCTTGTAAGTTTCTTTCTTGCTATTCCAAACGGTGAG
AGATTTCTGTGCTTTTGTATAGGACAATTA AAAACCGTTTCAATACAACACACTGTGGAGTTT
TCATATCTTTGCAACTTTTTCTTTGGGCATTCGAGCAATCGGGGCCAGAGGTAACAAACAC
AAACAATTTTATTTATTCATTAATTTTTGTCAAAAACAAGAATTTTCGTAACCTGGAAATTTT
AAAATATTA AAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGA
AATGCGATACGTAATGTGAATTGCAGAATTCCGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTG
CGCCCCTTGGTATTCCAGGGGGCATGCCTGTTTGAGCGTCATTTCTTCTCAAACATTCTGTT
TGGTAGTGAGTGATACTCTTTGGAGTTAACTTGAAATTGCTGGCCTTTTCATTGGATGTTTTT
TTTCAAAGAGAGGTTTCTCTGCGTGCTTGAGGTATAATGCAAGTACGGTCGTTTTAGGTTTT
ACCAACTGCGGCTAATCTTTTTTTATACTGAGCGTATTGGAACGTTATCGATAAGAAGAGAG
CGTCTAGGCGAACAATGTTCTTAAAGTTTGACCTCAAATCAGGTAGGAGTACCCGCTGAAC
TAAGCATATCATAAACCGGAAGAAAAAGAACAATTA AAAAATTTAAAAATTATAAAAAGG
ATTTTTTTGTTTTGGGCAAAATATGAGAGCTTACGGGCCAAAAA AAAAAAAGAAAGTCACC
GGCCC GCCCTTAATGGCCGGTCCAACAAGCCTTGAAAATTTCTTCTTGTTTTCCAAAAGG
GGAAAAATTTTTATGCTTTTGTGTATAGGAAAATTA AAAAATTAACCACCATGGGGGATTT
CCGTTCTGCACCTTTTCTGGGGTTCAAATAGGGGGCCAAAGGAAAAAACAAAAATTTTTTTT
CCTAGAATTTTTTC
    
```

**Blast result:**

BLAST <sup>®</sup> » blastn suite » results for RID-M7S5FGCT014 Home Recent Results Saved Strategies Help

[← Edit Search](#) [Save Search](#) [Search Summary](#) How to read this report? BLAST Help Videos Back to Traditional Results Page

**Job Title** 5 sequences (LBGA-01)  
**RID** M7S5FGCT014 Search expires on 08-25 23:45 pm [Download All](#) ▼  
**Results for** 3:|cl|Query\_6777 LBGA-69(1071bp) ▼  
**Program** BLASTN [Citation](#) ▼  
**Database** nt [See details](#) ▼  
**Query ID** |cl|Query\_6777  
**Description** LBGA-69  
**Molecule type** dna  
**Query Length** 1071  
**Other reports** [Distance tree of results](#) ?

**Filter Results**

**Organism** only top 20 will appear  exclude  
  
[+ Add organism](#)

**Percent Identity**  to   
**E value**  to   
**Query Coverage**  to

**Descriptions** Graphic Summary Alignments Taxonomy

**Sequences producing significant alignments** Download ▼ Manage Columns ▼ Show 100 ▼ ?

select all 100 sequences selected [GenBank](#) [Graphics](#) [Distance tree of results](#)

	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Saccharomyces cerevisiae 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and inte</a>	1448	1549	79%	0.0	97.42%	<a href="#">KT764940.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Saccharomyces cerevisiae strain LY183 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcrib</a>	1443	1443	79%	0.0	97.31%	<a href="#">KY711301.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Saccharomyces cerevisiae isolate N8 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed</a>	1421	1421	72%	0.0	99.74%	<a href="#">KX824758.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Saccharomyces cerevisiae isolate L26A internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribe</a>	1419	1419	72%	0.0	99.61%	<a href="#">KP723679.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Saccharomyces cerevisiae strain levure 1 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcri</a>	1415	1415	72%	0.0	99.61%	<a href="#">KT732653.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Saccharomyces cerevisiae isolate Sol103 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcri</a>	1415	1415	72%	0.0	99.61%	<a href="#">KP723682.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Saccharomyces cerevisiae isolate B-WHX-12-43 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal!</a>	1413	1413	72%	0.0	99.61%	<a href="#">KC544486.1</a>

>LBGA-157

AAGTTTAGTTAGGCATTTATACAGTGAAGTGGCTCATTAAATCAGTTATCGTTTATT  
 TGATAGTTCCTTTACTACATGGATATCTGTGGTAATTCTAGAGCTAATACATGCTTAAAATCT  
 CGACCCTTTGGAAGAGATGTATTTATTAGATAAAAAATCAATGTCTTCGGACTCCTTGATGA  
 TTCATAATAACTTTTTCGAATCGCATGGCCTTGTGCTGGCGATGGTTCATTCAAATTTCTGCC  
 TATCAACTTTCGATGGTAGGATAGTGGCCTACCATGGTTTCAACGGGTAACGGGGAATAAGG  
 GTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATCCAAGGAAGGCAGCAGGCGC  
 GCAAATTACCCAATCCTAATTCAGGCCGCAGAAGGCGGGGAAGGGAATTCCAAGGAGGAGG  
 GGGGGGGGGGAGGAGAGGGGGGGGGGGGGGGGAGGAGGTGGGGAAGAT

**Blast result:**

BLAST » blastn suite » results for RID-M7S5FGCT014 Home Recent Results Saved Strategies Help

---

[< Edit Search](#) [Save Search](#) [Search Summary](#) ▼

**Job Title** 5 sequences (LBGA-01)

**RID** M7S5FGCT014 Search expires on 08-25 23:45 pm [Download All](#) ▼

**Results for** 4:|cl|Query\_6778.LBGA-157(483bp) ▼

**Program** BLASTN [Citation](#) ▼

**Database** nt [See details](#) ▼

**Query ID** |cl|Query\_6778

**Description** LBGA-157

**Molecule type** dna

**Query Length** 483

**Other reports** [Distance tree of results](#) ⓘ

[How to read this report?](#) [BLAST Help Videos](#) [Back to Traditional Results Page](#)

**Filter Results**

**Organism** only top 20 will appear  exclude

Type common name, binomial, taxid or group name

[+ Add organism](#)

**Percent Identity**  to  **E value**  to  **Query Coverage**  to

[Filter](#) [Reset](#)

---

Descriptions

Graphic Summary

Alignments

Taxonomy

---

**Sequences producing significant alignments** Download ▼ Manage Columns ▼ Show 100 ⓘ

select all 100 sequences selected [GenBank](#) [Graphics](#) [Distance tree of results](#)

	Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Kluyveromyces marxianus isolate MON-24 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	712	712	81%	0.0	99.24%	<a href="#">MT079142.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Kluyveromyces marxianus strain Y15 18S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	710	710	80%	0.0	99.74%	<a href="#">JF715170.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Kluyveromyces lactis strain CBS 2105 chromosome 4</a>	706	1413	79%	0.0	99.74%	<a href="#">CP042458.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Kluyveromyces marxianus strain CCT 7735 (JFV-3) chromosome 5 sequence</a>	706	1413	79%	0.0	99.74%	<a href="#">CP009307.2</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Kluyveromyces lactis isolate M3 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	706	706	81%	0.0	98.99%	<a href="#">MK020404.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Chain 2, Structure of a partial yeast 48S preinitiation complex in open conformation</a>	706	706	81%	0.0	98.99%	<a href="#">3JAQ_2</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Chain 2, Structure of a partial yeast 48S preinitiation complex in closed conformation</a>	706	706	81%	0.0	98.99%	<a href="#">3JAP_2</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Kluyveromyces marxianus DMKU3-1042 18S ribosomal RNA (KLMA_R533), rRNA</a>	706	706	81%	0.0	98.99%	<a href="#">XR_002675592.1</a>

>LBGA-175

AAGTTTTAGTATCGCATTTATACAGTGAAGTGGCTCCATTTAAATCAGTTATCGTTT  
 ATTTGATAGTACCTTTACTACTTGGTATAACCGTGGTAATTCTAGAGCTAATACATGCTAAAA  
 ACCCCGACTGTTTGAAGGGGTGTATTTATTAGATAAAAAATCAATGCTCTTCTGAGCTCTTT  
 GATGATTCATAAATACTTTTCGAATCGCATGACTTCGTGTCGGCGATGGTTCATTCAAATTC  
 TGCCCTATCAACTTTCGATGGTAGGATAGTGGCCTACCATGGTTTCAACGGGTAACGGGGAA  
 TAAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTG

**Blast result:**

BLAST® » blastn suite » results for RID-M7S5FGCT014 Home Recent Results Saved Strategies Help

[< Edit Search](#) [Save Search](#) [Search Summary](#) How to read this report? BLAST Help Videos Back to Traditional Results Page

**Job Title** 5 sequences (LBGA-01)  
**RID** M7S5FGCT014 Search expires on 08-25 23:45 pm [Download All](#) ▼  
**Results for** 5.lcl|Query\_6779 LBGA-175(343bp) ▼  
**Program** BLASTN [Citation](#) ▼  
**Database** nt [See details](#) ▼  
**Query ID** lcl|Query\_6779  
**Description** LBGA-175  
**Molecule type** dna  
**Query Length** 343  
**Other reports** [Distance tree of results](#) ?

**Filter Results**

**Organism** only top 20 will appear  exclude  
  
[+ Add organism](#)

**Percent Identity**  to   
**E value**  to   
**Query Coverage**  to

[Filter](#) [Reset](#)

**Descriptions** [Graphic Summary](#) [Alignments](#) [Taxonomy](#)

**Sequences producing significant alignments** Download Manage Columns Show 100 ?

select all 100 sequences selected [GenBank](#) [Graphics](#) [Distance tree of results](#)

	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Wickerhamomyces anomalus strain XF-22 18S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	595	595	98%	4e-166	98.53%	<a href="#">KJ923324.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Pichia anomala 18S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	593	593	98%	2e-165	98.52%	<a href="#">EF427893.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Wickerhamomyces anomalus strain 0935-9 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	588	588	97%	8e-164	98.23%	<a href="#">MH654986.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Uncultured Pichia clone PS-05 18S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	588	588	97%	8e-164	98.23%	<a href="#">KX016004.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Kluyveromyces marxianus strain JCABKM4 18S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	588	588	95%	8e-164	99.09%	<a href="#">KJ058153.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Kluyveromyces marxianus strain JCABKM3 18S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	588	588	95%	8e-164	99.09%	<a href="#">KJ058152.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Kluyveromyces marxianus strain JCABKM2 18S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	588	588	95%	8e-164	99.09%	<a href="#">KJ058151.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Kluyveromyces marxianus strain JCABKM1 18S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	588	588	95%	8e-164	99.09%	<a href="#">KJ058150.1</a>

APÊNDICE C - SEQUÊNCIA DOS PRIMER UTILIZADOS NA ANÁLISE DE qPCR.

FW- FORWARD PRIMER, RV-REVERSE PRIMER

Gene	Sequência dos Primers	FW/RV concentração	Threshold	Eficiência %
GPD1	FW: CATTGCCACCGAAGTCGCTC	150/150	0,1	98
	RV: GCCCTCGCCTCTGAAATCCT			
GPD2	FW: TTCGAGTTGGGCTCCAAGGG	150/150	0,1	100
	RV: ACCAATGCTCCTTGCCACT			
ALD6	FW: CCTTAGCCCGTGGGGATGTT	300/300	0,097	95
	RV: GCCGTCACCGGTGTTGATTG			
ALD4	FW: GCGGACGCCGAGTTGAAAAA	150/150	0,109	98
	RV: TGAACCCGCACAACAGACCT			
ACS2	FW: TGGTTCTGCTACCGTGCCAT	150/150	0,099	96
	RV: ACGGTCGTGGTGGTTCCAAA			
AGT1	FW: AGGTATGGCCACCGACAAGG	150/150	0,078	99
	RV: GCGCTGCTTCCAGAACCAAA			
MAL31	FW: TGGGACAGGCATTGTGTGGT	150/150	0,2	103
	RV: GTTGACCGAACGCCAACAT			
SUC2	FW: GGGGCCATGCTACTTCCGAT	150/150	0,1	95
	RV: TCGTTACGCTTGGGAGCGAT			
SNF1	FW: CACAGCACCTGCCAATGCAA	150/150	0,08	99
	RV: CCCCTCTCCCAGCGTTTTGA			
HXT1	FW: GCTGGCAGAATCGACGAAGC	150/150	0,7	100
	RV: GCAGTACCAGCGGCTTCAT			
ADR1	FW: ACGAGAGCGTTCGCAAGACA	150/150	0,072	100
	RV: GTTGCAGAGGCCACAGGGAT			
BACT	FW: AGGTATTGCCGAAAGAATGC	100/300	0,1	99
	RV: AAGGTAGTCAAAGAAGCAAG			

## APÊNDICE D – PRINCIPAIS GENES DISCUTIDOS NO TRABALHO E NOMENCLATURA

- *GPD1* – Glicerol-3-fosfato-desidrogenase
- *GPD2* – Glicerol-3-fosfato-desidrogenase
- *SNF1* – Proteína quinase
- *SUC2* – Enzima responsável pela hidrólise de sacarose
- *MAL31* – Maltose permease
- *AGT1* – Transportador de sacarose
- *ACS2* – Acetil-coA sintetase
- *CWH41* – Processamento de alfa glicosidase
- *YMR196W* – Gene codificante para a proteína localizada no citoplasma (não caracterizada)
- *SAR1* - Gene da família GTPase
- *PER33* – Proteína do retículo endoplasmático
- *POM33* – Nucleoporina transmembranar
- *YGR026W* – Gene codificante para a proteína localizada na zona periférica da célula (não caracterizada)
- *MIC10* – Componente de um complexo da membrana interna mitocondrial
- *SEY1* – GTPase de fusão
- *BUD14* – Regulador cortical da dineína
- *CMD1* – Calmiomodulina
- *STH1* – Complexo de remodelação da cromatina
- *TOR2* – Proteína Kinase
- *HSP42* – Proteína de choque térmico
- *PFD1* – Subunidade de prefoldin hetero-hexamérico
- *SYPI* – Regulador negativo do complexo WASP-Arp23
- *RGD2* – Proteína ativadora de GTPase
- *HSP26* – Proteína de choque térmico
- *SSA3* – ATPase de enovelamento de proteínas
- *CNN1* – Proteína cinetócoro
- *FLC2* – Proteína envolvida na liberação de cálcio

- *CAP2* - Subunidade beta do heterodímero da proteína capping
- *TAO3* – Componente de rede de sinalização
- *DOP1* – Proteína de transporte
- *YCK1* – Isoforma da caseína quinase 1
- *YCK2* – Isoforma da caseína quinase 1 (parólogo da *YCK1*)
- *RNY1* – RNase vacuolar
- *ELM1* – Serina/treonina proteína kinase
- *HTB2* – Proteína do núcleo da histona
- *HTA2* – Proteína do núcleo da histona
- *HIR1* – Complexo de montagem de nucleossomos
- *HHF1* – Histona H4
- *SPT7* – Subunidade do complexo regulador transcricional SAGA
- *HPC2* – Complexo de montagem de nucleossomos
- *TAF5* – Proteína envolvida na iniciação da transcrição de RNA polimerase II e na modificação da cromatina
- *GOS1* – Proteína envolvida no transporte de Golgi
- *COY1* – Proteína de membrana de Golgi
- *TRS20* – Componente central dos complexos de partículas de proteína de transporte
- *PCL1* - Ciclina
- *CLN1* – Ciclina G1
- *CST26* - Aciltransferase
- *TOS6* – Proteína da parede celular
- *PRY2* – Proteína ligadora de esteróis
- *MET3* – ATP sulforilase
- *ERB1* – Constituintes de partículas pré-ribossômicas
- *ADE4* - Fosforribosilpirofosfato amidotransferase
- *PCL2* - Ciclina
- *HSL1* – Proteína quinase
- *CYS3* – Cistationina gama-liase
- *MET16* - 3'-fosfoadenilsulfato redutase

- *RNR1* - Isoforma principal da subunidade grande da ribonucleotídeo-difosfato redutase
- *CYC7* – Citocromo c – isoforma 2
- *QCR6* - Subunidade 6 do complexo ubiquinol citocromo-c redutase
- *MCH5* – Membrana plasmática transportadora de riboflavina
- *SVS1* – Proteína da parede celular
- *CRH1* – Quitina transglicosilase
- *SCW10* – Proteína da parede celular
- *PST1* – Proteína da parede celular
- *RNR3* - Isoforma menor da subunidade grande da ribonucleotídeo-difosfato redutase
- *TMA17* - Subunidade gama reguladora da síntese de ácido graxo
- *FAA1* - Sintetase de acil-CoA graxo de cadeia longa
- *ALD6* – Aldeído desidrogenase citosólica
- *ROX1* - Repressor dependente de heme de genes hipóxicos
- *IZH1* - Proteína de membrana envolvida na homeostase do íon zinco
- *MSC7* – Proteína do retículo endoplasmático (não caracterizada)
- *CYB2* – Citocromo b2
- *PUT1* – Prolina Oxidase
- *AGP1* – Permease de aminoácidos de baixa afinidade
- *ERG3* – C-5 esterol dessaturase
- *ERG5* – C-22 esterol dessaturase
- *ERG10* - Acetil-CoA C-acetiltransferase
- *ERG13* - 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA) sintase
- *HMG1* - HMG-CoA redutase
- *CIT1* – Sintase Mitocondrial
- *JEN1* - Simportador de monocarboxilato/próton da membrana plasmática
- *FKS1* - Subunidade catalítica de 1,3-beta-D-glucano sintase
- *Pry1* – Proteína de ligação a lipídeos
- *Pry2* – Proteína ligadora de esteróis
- *Pry3* - Proteína de parede celular ancorada em GPI envolvida na exportação de esteróis

APÊNDICE E – COMPOSIÇÃO DO MEIO DE ALIMENTAÇÃO (VERDUYN) DAS FERMENTAÇÕES EM QUIMIOSTATO

Reagente	Fórmula (MW)	Concentração
Sulfato de amônio	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	5,0 g/L
Fosfato de potássio	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3,0 g/L
Sulfato de magnésio heptahidratado	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,5 g/L
Solução de elementos-traço	-	1 mL/L
Fonte de carbono	-	(Glicose 25 g/L)
Solução de vitaminas	-	1 mL/L
Solução de antiespumante “C emulsion”	-	*3 g
Solução de Tween 80	-	*420 mg/L
Ergosterol	-	*10 mg/L
Água destilada	-	-

1. Pesar os 3 sais na concentração adequada e dissolvê-los em água destilada, num volume de aproximadamente 90% do total de meio a ser preparado. Caso sejam utilizados ácidos orgânicos como fonte de carbono (lactato, acetato, gluconato, etc), utilizar sais de sódio e adicioná-los nessa etapa. Utilizar um garrafão de meio calibrado (com marcações de 1 em 1 L) com uma barra magnética grande.

2. Caso sejam utilizados açúcares como fonte de carbono, dissolver a quantidade adequada em 1 L de água destilada.

3. Preparar a solução de \*antiespumante.

Para 20 L de meio: 3 g de antiespumante + água destilada até totalizar 15 g.

Para 12 L de meio: 1,8 g de antiespumante + água destilada até totalizar 9 g.

4. Autoclavar separadamente a solução de sais, a solução de glicose e a solução de antiespumante a 121°C por 20 minutos. Autoclavar também 1 L de água destilada.

5. Preparar a solução de \*Tween 80/ergosterol, conforme protocolo específico.

- Após a pesagem, misturar o ergosterol com Tween 80 e etanol absoluto (0,85 ml/L)
- Levar a estufa a 80C por 30 minutos até total diluição dos reagentes (neste momento deve ficar agitando o frasco em intervalos de tempo para auxiliar a diluição)

OBS: o ergosterol é sensível a luz.

6. Após o resfriamento das soluções autoclavadas, adicionar assepticamente a solução de glicose, a solução de antiespumante, a solução de Tween 80/ergosterol e os volumes adequados das soluções de vitaminas e elementos-traço à solução de sais.

7. Completar o volume do meio com a água destilada estéril.