

**Universidade Federal de São Carlos**  
**Departamento de Genética e Evolução**  
**Laboratório de Bioquímica e Genética Aplicada**

**Isolamento e caracterização de cepas termotolerantes de *Saccharomyces cerevisiae* e análise da expressão de genes possivelmente envolvidos com a termotolerância**

**São Carlos – SP**  
**2018**

**Jonas Paulino de Souza**

**Isolamento e caracterização de cepas termotolerantes de *Saccharomyces cerevisiae* e análise da expressão de genes possivelmente envolvidos com a termotolerância**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular do departamento de Genética e Evolução da Universidade Federal de São Carlos como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre.

**Orientador: Prof. Dr° Anderson  
Ferreira da Cunha**

**São Carlos – SP**

**2018**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde<sup>2</sup>  
Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular

---

**Folha de Aprovação**

---

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado do candidato Jonas Paulino de Souza, realizada em 28/03/2018:



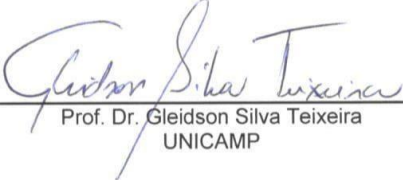
---

Prof. Dr. Anderson Ferreira da Cunha  
UFSCar



---

Prof. Dr. Flávio Henrique da Silva  
UFSCar



---

Prof. Dr. Gleidson Silva Teixeira  
UNICAMP

## **Agradecimentos**

Ao Departamento de Genética e Evolução e ao Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular.

À CAPES, pela bolsa concedida.

À FAPESP, pelo auxílio ao projeto ao qual se vincula esta pesquisa.

Ao Prof. Dr. Anderson pela orientação e pela confiança no meu trabalho.

Ao Prof. Dr. Iran Malavazi e ao Prof. Dr. Alberto Colli Badino (Departamento de Engenharia Química), pela contribuição à realização deste trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Bioquímica e Genética Aplicada pelo apoio durante a pesquisa.

Aos meus amigos, pela amizade, vivência, colaboração e trocas de conhecimento.

Aos meus pais Benedita e Paulino e aos meus irmãos Paulina e João, por estarem sempre ao meu lado e por sempre me ajudarem no que preciso.

“Não há saber mais ou saber  
menos: há saberes diferentes.”

Paulo Freire

## RESUMO

O Brasil é o segundo maior produtor mundial de etanol, que é produzido, em nosso país, a partir da fermentação da sacarose da cana-de-açúcar pela levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Apesar de possuir uma alta capacidade de produção de etanol, as leveduras industriais atuam em uma faixa estreita de temperatura, que varia entre 30 e 35°C. Para que essa faixa de temperatura seja mantida, utilizam-se resfriadores, acarretando aumento de custo e consumo de água. Além da temperatura, outros fatores de estresse, como altas concentrações de açúcares e de etanol e contaminação por microrganismos, também afetam os rendimentos da produção. Nesse sentido, o presente trabalho objetivou o isolamento e a caracterização de linhagens de leveduras *S. cerevisiae* termotolerantes provenientes do processo fermentativo industrial. Além disso, a expressão dos genes *OLE-1*, *YHR087W* e *HSP26*, correlacionados na literatura a diferentes fatores de estresse, foi avaliada nessas linhagens. Um total de 157 leveduras foi analisado quanto à capacidade de crescimento a 40°C. Oito linhagens de *S. cerevisiae*, identificadas através da região ITS 18S, foram capazes de crescer nessa condição, sendo que quatro apresentaram um excelente consumo de glicose, tanto a 30 quanto a 40°C. Após 27 ciclos fermentativos a 40°C, as quatro linhagens apresentaram uma preferência ao crescimento nessa temperatura, indicando uma possível fixação da característica termotolerante. Análises posteriores mostraram que essas linhagens possuem uma maior capacidade de crescimento celular, alta concentração de etanol e resistência a estresse osmótico e a tratamento ácido. Análises fermentativas evidenciaram que as leveduras termotolerantes produziram quantidades semelhantes de etanol, tanto a 30 quanto a 40°C. A expressão dos genes *HSP26* e *YHR087W* foi positivamente regulada durante a fermentação a altas temperaturas, enquanto que o gene *OLE-1* diminuiu a expressão nessa mesma condição. A aplicação de linhagens termotolerantes em fermentações a altas temperaturas poderá contribuir para o aumento da produção de etanol, sendo uma estratégia importante para a otimização da produção do etanol brasileiro. Além disso, a identificação de genes de *S. cerevisiae* diferencialmente expressos em condições de alta temperatura poderá contribuir para um melhor entendimento dos mecanismos moleculares que levam à ativação de vias metabólicas responsáveis pela termotolerância.

**Palavras-chave:** etanol, fermentação, termotolerância, *Saccharomyces cerevisiae*.

## ABSTRACT

Brazil is the world's second largest producer of ethanol, which is produced, in our country, from the fermentation of sugarcane sucrose by *Saccharomyces cerevisiae* yeast. Despite having a high capacity for ethanol production, the industrial yeasts act in a narrow band of temperature between 30 and 35°C. In order to maintain this band of temperature, chillers are used, which results in cost increase and water consumption. Besides the temperature, other stress factors, such as high sugar and ethanol concentrations and contamination by microorganisms, also affect the yields of production. In this sense, the present research aimed at isolating and characterizing thermotolerant *S. cerevisiae* yeast strains from the industrial fermentative process. In addition, the expression of the genes *OLE-1*, *YHR087W* and *HSP26*, which are correlated in literature to different stress factors, was evaluated in these strains. A total of 157 yeasts was analyzed for growth capacity at 40°C. Eight *S. cerevisiae* strains, which were identified through the ITS 18S region, were able to grow in this condition. Among the eight strains, four showed excellent glucose consumption at 30 and 40°C. After 27 fermentative cycles at 40°C, the four strains showed a preference for growth at this temperature and indicated to be possibly thermotolerant. Previous analyses showed that these strains have a higher capacity for cellular growth, high ethanol concentration and resistance to osmotic stress and acid treatment. Fermentative analyses evidenced that thermotolerant yeasts produced similar quantities of ethanol at 30 and 40°C. The expression of the genes *HSP26* and *YHR087W* was positively regulated during the fermentation at high temperatures, while the gene *OLE-1* reduced the expression at the same condition. The application of thermotolerant yeast strains in fermentations at high temperatures can contribute to increase ethanol production, which is an important strategy to optimize the production of ethanol in Brazil. In addition, the identification of *S. cerevisiae* genes that were differently expressed under high temperature conditions can contribute to a better understanding of molecular mechanisms that lead to the activation of metabolic pathways responsible for thermotolerance.

**Keywords:** ethanol, fermentation, thermotolerance, *Saccharomyces cerevisiae*.

## Lista de ilustrações

<b>Figura 1 - Esquema do processo de fermentação industrial brasileiro. ....</b>	<b>14</b>
<b>Figura 2 - Ciclo de vida da levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i>. ....</b>	<b>16</b>
<b>Figura 3 - Esquema da via glicolítica. ....</b>	<b>17</b>
<b>Figura 4. - Fatores de estresse que afetam a levedura durante a fermentação. ....</b>	<b>19</b>
<b>Figura 5 - Sucessão de leveduras ao longo da safra de produção de etanol. ....</b>	<b>22</b>
<b>Figura 6 - Identificação das linhagens mais prevalentes ao longo da safra na Usina São Luiz entre as safras de 2010 a 2012. ....</b>	<b>39</b>
<b>Figura 7 - Identificação de linhagens termotolerantes. ....</b>	<b>40</b>
<b>Figura 8 - Consumo de glicose durante fermentação em meio YPD 4% (40 g/L glicose). ....</b>	<b>41</b>
<b>Figura 9 - Genotipagem das linhagens isoladas como termotolerantes. ....</b>	<b>43</b>
<b>Figura 10 - Análise da viabilidade celular das leveduras termotolerantes após 27 ciclos de crescimento em condições de estresse. ....</b>	<b>44</b>
<b>Figura 11 Fotomicrografia das leveduras termotolerantes. ....</b>	<b>45</b>
<b>Figura 12 - Determinação do crescimento de e leveduras termotolerantes a 40°C e na condição controle de 30°C. ....</b>	<b>47</b>
<b>Figura 13 Determinação da viabilidade celular de leveduras termotolerantes após o tratamento ácido. ....</b>	<b>48</b>
<b>Figura 14 - Crescimento de leveduras termotolerantes em meio YPD 2% em pH=2 e pH=6. ....</b>	<b>49</b>
<b>Figura 15 Determinação da viabilidade celular de leveduras termotolerantes em altas concentrações de etanol. ....</b>	<b>50</b>
<b>Figura 16 Determinação da viabilidade celular de leveduras termotolerantes em altas concentrações de açúcar. ....</b>	<b>51</b>
<b>Figura 17. Ensaio Fermentativo das linhagens termotolerantes comparado com linhagem industrial CAT-1. ....</b>	<b>52</b>
<b>Figura 18. Ensaio fermentativo utilizando as linhagens termotolerantes em comparação com a linhagem industrial CAT-1 ....</b>	<b>53</b>
<b>Figura 19 – Análise da expressão gênica, consumo de glicose e crescimento de linhagens termotolerantes. ....</b>	<b>56</b>



## Lista de tabelas

Tabela 1. Meio YPD 2% .....	29
Tabela 2. Meio YPD ágar 2% .....	29
Tabela 3. Meio fermentativo .....	29
<b>Tabela 4 - Linhagens de leveduras utilizadas.....</b>	<b>30</b>
<b>Tabela 5. Genes e sequencias dos primers utilizados na genotipagem das leveduras.....</b>	<b>31</b>
Tabela 6. Sequencias e concentrações ótimas dos primers utilizados no PCR em tempo real (qRT-PCR).....	37
<b>Tabela 7. Ensaio fermentativo das leveduras termotolerantes comparadas a linhagem industrial CAT-1 a 40°C .....</b>	<b>53</b>
<b>Tabela 8. Ensaio fermentativo das leveduras termotolerantes comparadas a linhagem industrial CAT-1 a 40°C .....</b>	<b>54</b>

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	12
1.1 Histórico da produção de etanol.....	12
1.2 Produção de etanol brasileiro.....	12
1.3 Características e Metabolismo das leveduras.....	14
1.4 Condições ideais e adversas na produção de etanol.....	18
1.4.1 Contaminação com microrganismos.....	19
1.4.2 pH como fator de estresse.....	22
1.4.3 Estresse por etanol.....	23
1.4.4 Temperatura como fator de estresse na fermentação.....	24
1.4.4.1 Isolamento de leveduras termotolerantes.....	24
1.5 Expressão gênica ativada em resposta ao estresse.....	25
1.5.1 OLE1.....	26
1.5.2 HSP26.....	26
1.5.3 YHR087W.....	27
2. OBJETIVOS.....	28
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	29
3.1 Meios de Cultura.....	29
3.2 Microrganismos e Isolamentos de leveduras.....	29
3.3 Extrações do DNA total.....	30
3.4 Identificações molecular das linhagens.....	31
3.5 Identificações de espécie.....	31
3.6 Caracterização morfofisiológica.....	32
3.6.1 Fototomografia das leveduras.....	32
3.6.2 Curvas de crescimento.....	32
3.6.3 Teste de tolerância ao etanol.....	32
3.6.4 Fermentação em meio YPD 4%.....	33
3.7 Diluições seriada para testes de viabilidade em condições de estresse.....	33
3.8 Determinações de massa seca.....	33
3.9 Determinações de glicose por ensaio enzimático.....	34
3.10 Ensaio Fermentativo.....	34
3.10.2 Determinações de açúcar redutor e etanol.....	35
3.11 Análise de expressão gênica de <i>OLE1</i> , <i>YHR087W</i> e <i>HSP26</i> nas linhagens resistentes.....	35
3.11.1 Extrações de RNA.....	36
3.11.2 Sínteses de cDNA.....	36

3.11.3 Primers utilizados nas qRT- PCRs .....	36
3.11.4 Padronizações dos primers para utilização nas qRT- PCRs.....	37
3.11.5 Análise dos dados do qRT-PCR.....	37
4.RESULTADOS .....	38
4.1 Caracterizações molecular da população de leveduras das dornas de fermentação.....	38
4.2 Linhagens com características de termotolerancia isoladas do processo produtivo .....	39
4.2.2 Análise do consumo de glicose em leveduras termotolerantes comparando com a linhagem industrial CAT-1 .....	40
4.3 Identificações molecular dos isolados por sequenciamento .....	43
4.5 Avaliações do crescimento sob condições de estresse.....	43
4.5.1 Testes de fixação da característica de termotolerancia .....	44
4.4.1 Fotomicrografia das leveduras termotolerantes .....	45
4.4.2 Avaliação do perfil de crescimento das leveduras termotolerantes .....	46
4.5.2 Crescimentos em meio liquido YPD 2% pH 2 .....	47
4.5.3 Crescimentos em YPD 14% etanol .....	49
4.5.4 Crescimentos em meio sólido estresse osmótico .....	50
4.6 Ensaio Fermentativo.....	51
4.7 Análise de expressão dos genes <i>OLE1</i> , <i>YHR087W</i> e <i>HSP26</i> .....	54
5. DISCUSSÃO .....	57
6. CONCLUSÕES .....	63
7. REFERENCIAS.....	64
<b>Anexo 1. Curva de calibração – massa seca</b> .....	67
<b>Anexo 2. Curva de calibração glicose</b> .....	67
<b>Anexo 3. Artigo publicado - Improvement of Brazilian bioethanol production – Challenges and perspectives on the identification and genetic modification of new strains of <i>Saccharomyces cerevisiae</i> yeasts isolated during ethanol process.</b> .....	68

## **1 INTRODUÇÃO**

### **1.1 Histórico da produção de etanol**

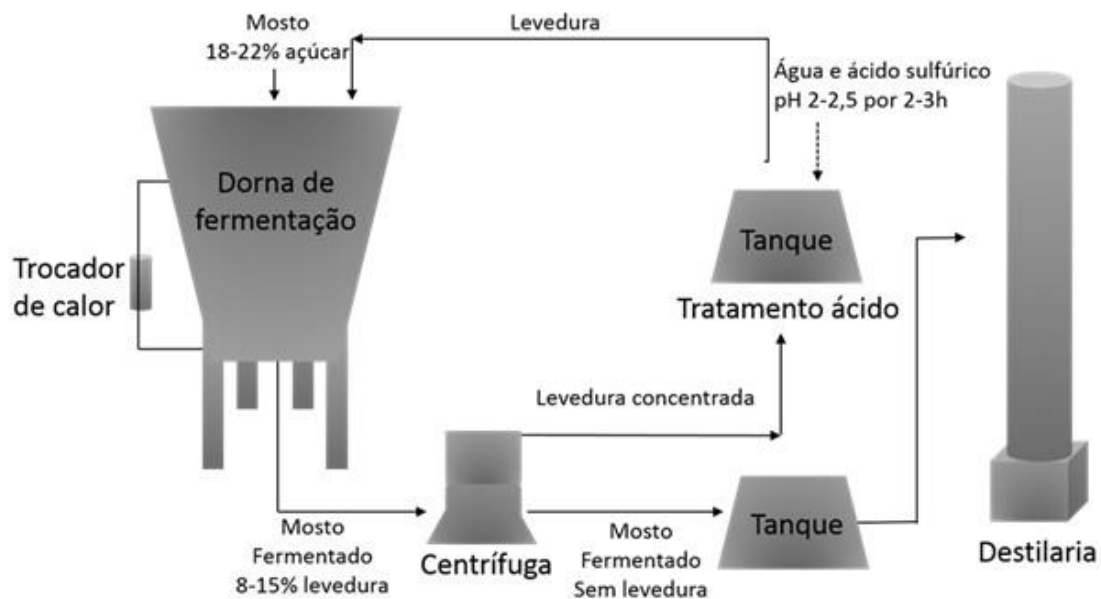
O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar, com cerca de um terço do total colhido no mundo, e o segundo maior produtor mundial de álcool (1). A produção de cana-de-açúcar para a safra 2016/17 foi de 690,98 milhões de toneladas, com um crescimento estimado em 3,8% em relação à safra anterior. A produção de etanol vem aumentando gradativamente nos últimos anos e a estimativa é que irá se manter acima de 30 bilhões de litros na próxima safra (2). Todo o aporte tecnológico desenvolvido pelo país na produção de álcool se deve ao Programa Nacional do Álcool PROÁLCOOL, empreendido pelo governo brasileiro a partir de 1975. Com o apoio governamental o desenvolvimento e surgimento de diversas usinas para a produção de etanol foi estimulado, levando o Brasil a ser o maior produtor mundial de etanol. Recentemente este posto foi ocupado pelos Estados Unidos, que nas últimas décadas investiu em esforços para o aumento dessa produção (3). Para a retomada do crescimento de produção é portanto necessário um grande investimento em tecnologias que propiciem a melhora tanto do processo industrial quanto do processo fermentativo. Vale ressaltar que o processo de produção americano utiliza como matéria prima o milho que torna o produto final mais caro e menos competitivo que o etanol brasileiro (4).

### **1.2 Produção de etanol brasileiro**

No Brasil, para a obtenção desse combustível, utiliza-se como substrato (mosto) uma mistura de caldo da cana-de-açúcar e o melaço (um subproduto líquido da cana-de-açúcar extraído durante o processo de refinamento ainda rico em açúcares). Esse processo ocorre em um período de fermentação que varia entre 6 e 11 horas e em temperaturas que variam entre 30-35 °C, levando a volumes de etanol que variam entre 8-11% do mosto fermentado (v/v) (5). O método mais utilizado nas usinas produtoras de etanol no Brasil é conhecido como batelada. O processo inicia com a adição da levedura *Saccharomyces cerevisiae* ao caldo de cana nas dornas de fermentação (que variam de volumes

entre 400 a 2 mil m<sup>3</sup>) a uma concentração de açúcares totais que varia entre 180 e 220 g/L. Após a fermentação, o fermentado (denominado vinho pela indústria) é separado das leveduras (que é denominado então como leite de levedura) por centrifugação. O vinho segue para as unidades de destilação, resultando o etanol absoluto ou o anidro com teor de álcool de no mínimo 99,7% (6). Uma grande vantagem da produção brasileira de etanol está no processo de reciclagem das leveduras. Neste processo, o leite de levedura sofre um tratamento com ácido sulfúrico, para a redução de possíveis contaminantes e é reutilizado na fermentação seguinte. Esta alternativa, faz com que nas usinas brasileiras, o processo fermentativo ocorra em altas densidades celulares (10-17% w/v), contribuindo para um tempo de fermentação que dura entre 4 e 8 horas (5) (Figura 1).

**Figura 1 - Esquema do processo de fermentação industrial brasileiro.**



No processo de produção de etanol em batelada, a conversão de sacarose em etanol é realizada em tanques independentes de fermentação pelas leveduras. Ao final da fermentação o mosto fermentado é centrifugado e o vinho (mosto fermentado sem levedura) é direcionado para as torres de destilação. A levedura é então direcionada para o tanque de tratamento ácido e após o tratamento é reutilizada em um outro ciclo fermentativo. Imagem adaptada (7)

### 1.3 Características e Metabolismo das leveduras

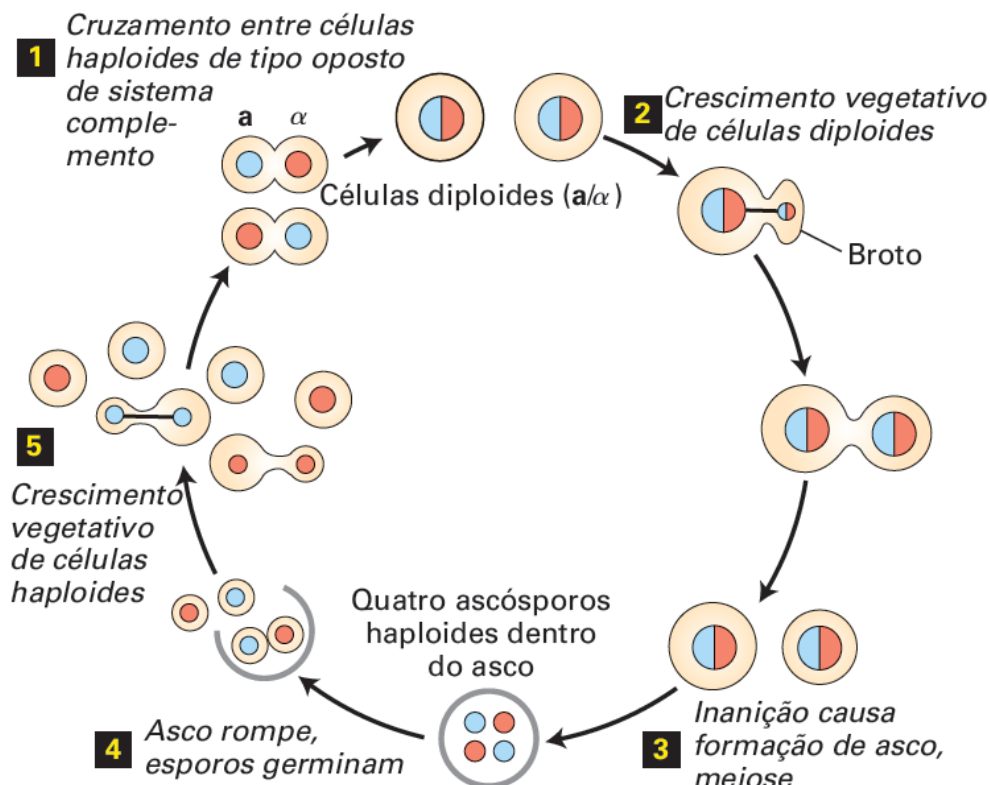
Como mencionado, anteriormente, o microorganismo responsável pela transformação do açúcar em etanol é a levedura da espécie *Saccharomyces cerevisiae*. Este microrganismo vem servindo de modelo biológico para diferentes estudos moleculares e foi o primeiro organismo eucarioto a ter seu genoma completamente sequenciado (8). *Saccharomyces* é um gênero do reino fungi com diversas espécies, suas características de resistência a baixos valores de pH, concentrações elevadas de açúcar, bem como sua excelente capacidade na produção de etanol a partir de açúcares, possuem um papel importante na pesquisa aplicada e na utilização industrial (9).

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é um microrganismo eucariótico unicelular de formato globular alongado, podendo haver a formação de pseudo hifas que são resultantes do brotamento multilateral. A *Saccharomyces*

*cerevisiae* contêm todas as principais organelas que também são comuns às células animais, como o núcleo, retículo endoplasmático, as mitocôndrias, aparelho de Golgi, vacúolo, citoesqueleto e se diferencia por apresentar parede celular constituída principalmente por glucano e mananoproteínas (9). A parede celular confere um papel importante no transporte de moléculas, além de conter enzimas associadas que são responsáveis pela hidrólise extracelular de nutrientes ou de macromoléculas. Algumas das macromoléculas que fazem parte da constituição da parede celular, participam no processo de agregação celular que ocorre durante a reprodução e floculação, e também são receptores específicos e inespecíficos para outras moléculas (10). A utilização de parede celular como aditivo em ração animal vem sendo muito empregada para a ativação do sistema imune, absorção de toxinas e conseqüentemente melhora da saúde animal (11)

Além disso, a *Saccharomyces cerevisiae* é um organismo aeróbio facultativo que se reproduz tanto de forma sexuada através da formação de ascósporos, quanto na forma assexuada com formação de brotamento que pode ocorrer tanto na forma haploide quanto diploide (12), figura 2.

**Figura 2 - Ciclo de vida da levedura *Saccharomyces cerevisiae*.**

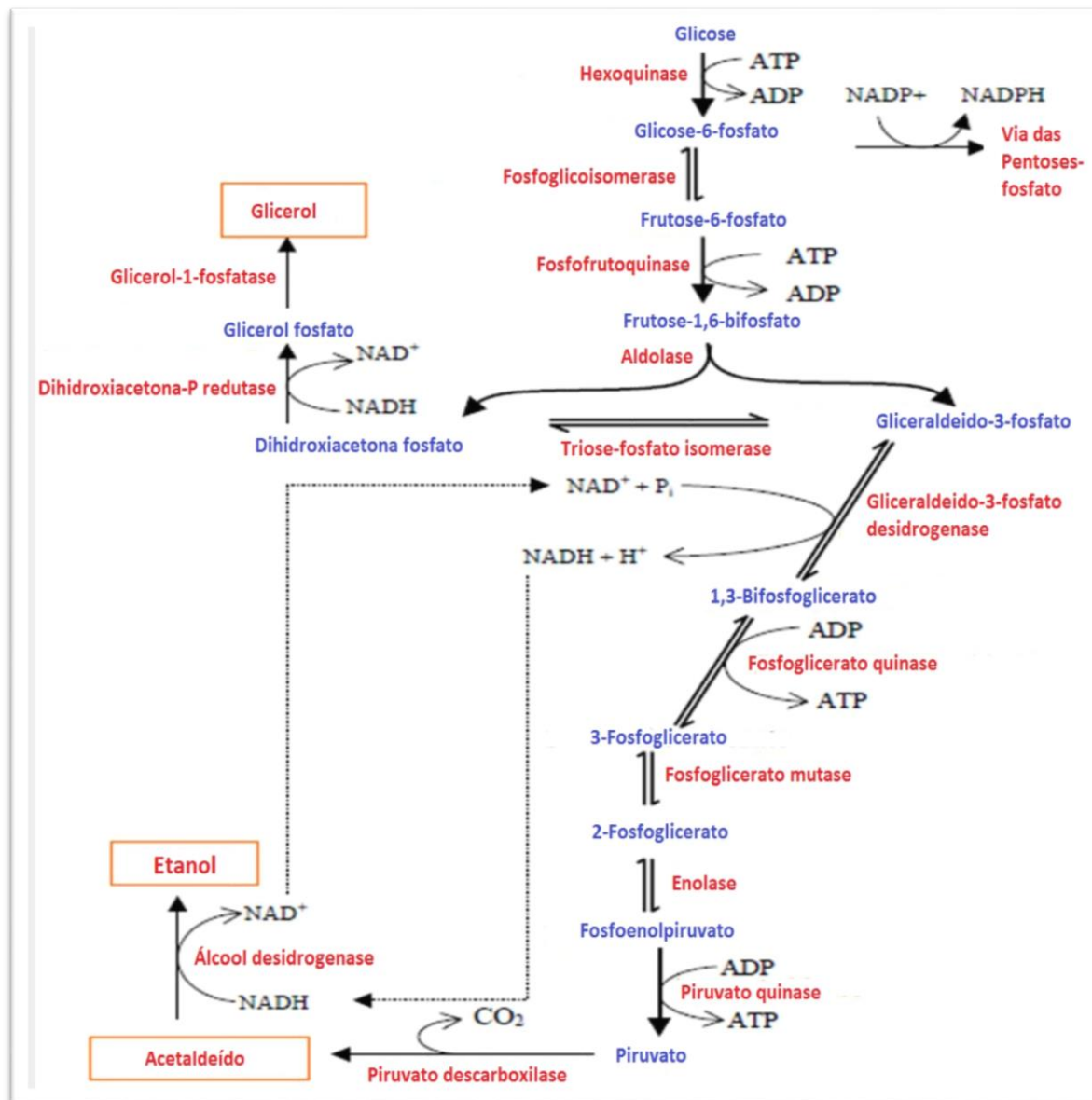


Fonte: Lodish, 2014.

Deste modo, ela é capaz de ajustar seu metabolismo em condições de aerobiose ou anaerobiose. Em condições aeróbicas a maior parte do açúcar consumido pela levedura é convertido em biomassa, CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O, enquanto que em condições anaeróbicas ocorre a conversão a etanol e CO<sub>2</sub> em um processo denominado fermentação. Outro processo importante envolve a metabolização da sacarose em glicose e frutose, catalisado pela enzima invertase. Nesse processo, a sacarose é hidrolisada no espaço periplasmático e transportada para o citoplasma celular onde se dá a via glicolítica (9). A fermentação alcoólica, é portanto um processo intracelular que envolve a participação de 12 passos catalisados por reações enzimáticas até a formação de etanol, figura 3.



Figura 3 - Esquema da via glicolítica.



Etapas da via glicolítica e geração de etanol pela levedura. Quando em condições de aneroiose, o piruvato é descarboxilado a acetaldeído, que será reduzido a etanol pela enzima álcool desidrogenase. Imagem obtida e traduzida de (13).

Em condições de aerobiose o piruvato gerado na via glicolítica é direcionado para o ciclo de Krebs, enquanto que em condições anaeróbicas o piruvato é descarboxilado, formando-se acetaldeído que, através da ação da enzima álcool desidrogenase I (ADH1) é reduzido a etanol. Além das reações enzimáticas direcionadas para a formação de etanol, existem também vias alternativas relacionadas a formação de moléculas necessárias a constituição da biomassa, como polissacarídeos, proteínas, lipídios, ácidos nucleicos entre

outros (14). Adicionalmente, as enzimas que participam da via glicolítica podem sofrer influências de diversos fatores, tais como pH e temperatura, influenciando a atividade enzimática e por consequência afetando o desempenho do processo fermentativo.

#### **1.4 Condições ideais e adversas na produção de etanol**

A fermentação alcoólica em condições ideais de acordo com a equação de Gay Lussac, teoricamente, produz 511g de etanol e 489 g de CO<sub>2</sub> a partir de 1000g de glicose. Assim como observado por Pasteur apresenta um rendimento de 95 % de etanol, os outros 5 % estão relacionados a formação de produtos como glicerol, ácidos orgânicos, álcoois superiores, acetoína, acetaldeídos, butilenoglicol entre outros que são excretados pela célula, além da formação de biomassa (14). Por outro lado, no processo de fermentação industrial a levedura está sujeita a diversos fatores de estresse, sendo estes fatores químicos, físicos e microbiológicos que afetam seu metabolismo e por consequência somente 90 % de rendimento pode ser obtido, figura 4 (14).

Dentre os compostos orgânicos secundários formados durante a fermentação industrial, o glicerol é o mais abundante. A formação de glicerol está relacionada ao estresse osmótico e manutenção do equilíbrio redox pela célula. Trealose e glicogênio são carboidratos de reserva para energia adicional quando as células necessitam de fonte de carbono. A trealose é um composto protetor para a membrana da célula e auxilia para aumentar a tolerância à desidratação e a altas concentrações de etanol, bem como outros fatores de estresse industriais (14).

**Figura 4. - Fatores de estresse que afetam a levedura durante a fermentação.**



Fatores de estresse que afetam as células de leveduras nos processos indústrias de fermentação durante a produção de etanol e componentes produzidos pelas células em resposta aos fatores de estresse, trealose, glicogênio, ácido succínico e glicerol. Imagem adaptada de (3).

O ácido succínico juntamente com o etanol apresentam um efeito antibacteriano. No entanto, a contaminação por bactérias e leveduras selvagens ocorrem com frequência, sendo um fator de suma importância na qualidade do processo produtivo (14).

#### **1.4.1 Contaminação com microrganismos**

As contaminações com microrganismos invasores ocorrem principalmente devido às dificuldades encontradas para esterilizar grandes volumes do caldo da cana-de-açúcar, bem como os equipamentos. Isso permite que diferentes microrganismos entrem no processo, sendo a maior parte bactérias e levedura selvagens (*Saccharomyces* e não *Saccharomyces*). Lactobacilos são os contaminantes mais frequentes da fermentação devido estes crescerem nas mesmas condições que a levedura *Saccharomyces cerevisiae* (15). Tanto lactobacilos quanto outras leveduras contaminantes competem com as cepas de leveduras inoculadas no início do processo podendo reduzir a eficiência do

processo fermentativo de maneira importante (16). Assim, para minimizar os efeitos da contaminação são utilizados como métodos para manter os níveis de contaminação em valores aceitáveis, o tratamento ácido e também o lúpulo, uma vez que este oferece uma proteção contra as bactérias. O uso de antibióticos não vem sendo mais realizado, uma vez que o uso desse produto implica em um alto custo para as usinas, pode disseminar a resistência bacteriana. Além disso, a levedura excedente da produção vem sendo utilizada como matéria na produção de ração animal (15).

As contaminações por leveduras selvagens são mais difíceis de controlar do que as bacterianas uma vez que seu metabolismo é muito semelhante ao das linhagens industriais. Além disso, em alguns casos, as leveduras selvagens podem apresentar características inadequadas como floculação celular, produção excessiva de espuma e baixo rendimento fermentativo (5).

No entanto, algumas destas linhagens se adaptam adequadamente ao ambiente da usina e possuem uma capacidade fermentativa melhor que as anteriormente estudadas, contribuindo com a melhora do processo fermentativo (17). Essa dinâmica da população microbiana no processo ainda é pouco compreendida no sistema industrial brasileiro, isto reforça a necessidade de estudos sistemáticos para um melhor conhecimento da sucessão destas linhagens nas dornas, assim como um melhor conhecimento de suas características bioquímicas e genéticas.

#### **1.4.1.1 Seleção de leveduras adaptadas ao processo industrial**

Devido as dificuldades de se identificar as leveduras por métodos tradicionais como análises morfológicas e bioquímicas, por muito tempo a dinâmica de sucessão de leveduras nas usinas brasileiras de etanol foi algo pouco explorado. Uma vez que diferentes leveduras podem apresentar morfologias semelhantes entre si, bem como uma mesma levedura pode modificar sua morfologia em condições de estresse.

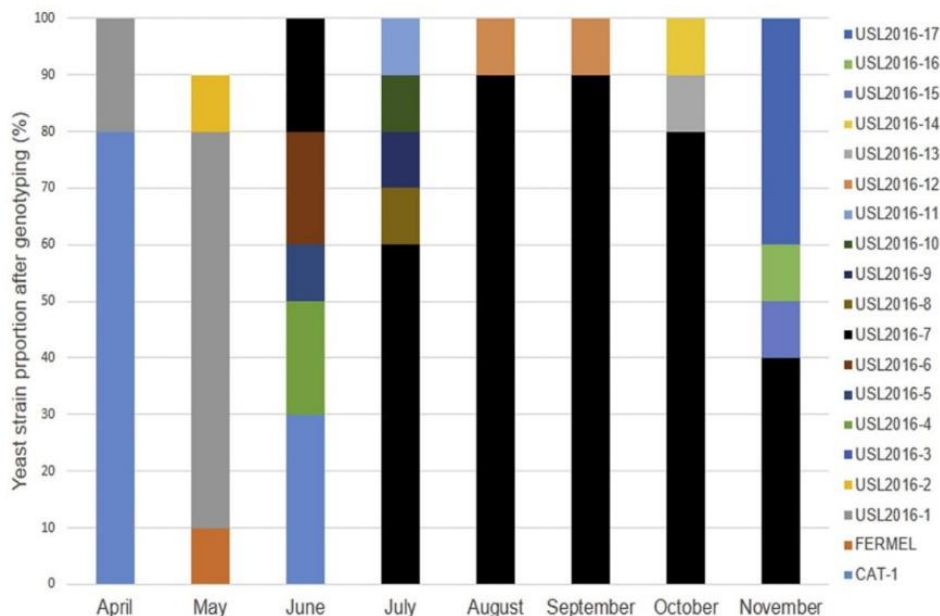
Com o avanço das tecnologias moleculares de análises do DNA, foi possível se basear nas diferenças do genoma para a identificação das linhagens. Uma das primeiras metodologias utilizadas para esta finalidade foram a de cariotipagem por eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE), a análise de

restrição do DNA mitocondrial (RFLP-mtDNA) e a técnica de *fingerprinting* baseado nas sequências delta repetitivas (18). Em vista disso, foram desenvolvidas no Brasil pesquisas com o intuito de isolar linhagens de leveduras invasoras que estariam bem adaptadas ao processo fermentativo (5). Dessa forma, leveduras que apresentam características desejáveis para a produção de etanol, tais como rápida capacidade fermentativa, estabilidade genética, osmotolerância, alta tolerância ao etanol, tolerância aos ciclos fermentativos, resistência ao estresse térmico entre outros (19). Ao longo da década de 1990, com a utilização de técnicas de cariotipagem, foram isoladas e caracterizadas no Brasil linhagens de leveduras que apresentavam características interessantes para a produção de etanol industrial. Entre elas, destacam-se duas linhagens, CAT-1 e PE-2. As linhagens isoladas CAT-1 e PE-2 mostraram se capazes de resistirem por mais tempo a sucessivos ciclos fermentativos. As linhagens CAT-1 e PE-2 foram responsáveis por 60% do total da produção de etanol Brasileira (20).

Entretanto, a constituição do mosto sofreu modificações ao longo do tempo, tendo como principais motivos a proibição da queima da cana-de-açúcar (a partir do ano de 2009), e a adição do melaço ao caldo de cana-de-açúcar, por conta do aumento da produção de açúcar (21). Devido a essas modificações, as leveduras isoladas no passado estão se tornando menos adaptadas ao processo e sendo rapidamente substituídas por outras linhagens ao longo das safras (22).

Recentemente, pesquisas que acompanharam a dinâmica de sucessão de leveduras nas dornas de fermentação demonstraram que as linhagens industriais atualmente utilizadas, rapidamente foram substituídas por linhagens selvagens. A figura 5 mostra o acompanhamento realizado por nosso grupo em na usina São Luís localizada na cidade de Ourinhos - SP. As linhagens selvagens vêm persistindo ao longo das safras, o que indica que essas leveduras provavelmente devem estar bem adaptadas ao processo fermentativo dessa usina.

**Figura 5 - Sucessão de leveduras ao longo da safra de produção de etanol.**



Dinâmica da população de leveduras avaliada durante toda a safra de 2016, em uma usina localizada no estado de São Paulo. No início da safra de produção (Abril), uma mistura de 80% de fermento de padeiro (azul claro) e 20% de linhagem industrial CAT-1 (cinza claro) foram genotipadas. Em maio, levedura CAT-1 representou 70% das cepas amostradas nos tanques. USL2016-7 (preto) foi genotipada pela primeira vez em junho e rapidamente dominou os tanques de fermentação até outubro. No final da safra, uma nova estirpe (USL2016-17 azul escuro) foi encontrada na mesma proporção para USL2016-7 nos tanques de fermentação. 1 a 8 referem-se sequencialmente aos meses de Abril a Novembro (3).

#### 1.4.2 pH como fator de estresse

As variações no pH do mosto ao longo dos ciclos de produção industrial de etanol, ocorrem devido ao tratamento ácido empregado com o intuito de diminuir a contaminação por bactérias. Porém, isso pode diminuir o rendimento e produtividade do processo por afetar a fisiologia das leveduras (23). O pH muito baixo aumenta o efeito tóxico do etanol, ácidos orgânicos e dióxido de enxofre, e pode causar uma diminuição na taxa de brotamento das leveduras (24). Além disso, o pH baixo pode causar a floculação das leveduras que também é um importante fator negativo para a produção de etanol. Isso ocorre, provavelmente porque os valores baixos de pH alteram a ionização dos aminoácidos das lectinas, presentes nas células floculantes, causando mudança no estado de

conformação e assim, impede que reconheça e interaja com resíduos de carboidratos de alfa manose de células vizinhas (25). A floculação impede que ocorra a conversão máxima do substrato em etanol nos processos industriais, por isso as leveduras devem estar suspensas no caldo de fermentação (26). Em usinas que os processos de fermentação ocorrem com reciclagem celular por centrifugação, a floculação é um problema importante, uma vez que esta pode reduzir a eficiência da centrifugação, com isso, o creme de levedura que vai para o tratamento ácido é menos concentrado. Por consequência, mais vinho vai para o tratamento ácido e devido a sua capacidade tamponante, mais ácido sulfúrico é requerido para reduzir o pH. Dessa forma, o estresse causado nessas condições pode ser ainda mais prejudicial a viabilidade da levedura (27). As células floculantes também podem decantar no fundo dos fermentadores deixando os açúcares residuais no vinho sem fermentar e aumentando assim o tempo de fermentação (7). O baixo pH também está relacionado à toxicidade do sulfito. Nas destilarias o sulfito é normalmente utilizado no processo de clarificação do açúcar e está presente em alto nível no melaço de cana-de-açúcar, as formas mais tóxicas de sulfito para células de levedura são  $\text{SO}_2$  e  $\text{HSO}_3$  e são encontradas a pH 1,0-4,5 e não a  $\text{SO}_3$  que é mais abundante a pH 5-7, isso contribui para a diminuição do rendimento alcoólico e da viabilidade da levedura (28).

#### **1.4.3 Estresse por etanol**

Outro fator que pode afetar o rendimento produtivo na indústria é o acúmulo de etanol durante a fermentação, este pode inibir o crescimento celular da *Saccharomyces cerevisiae* e conseqüentemente a fermentação completa do substrato (29). Os efeitos tóxicos do etanol envolvem a modificação da composição lipídica da membrana, síntese de proteínas de estresse, modulação de processos de troca iônica, tal como redução da atividade metabólica que causa a inibição da absorção de glicose, diminuição da taxa de crescimento (30) e estresse hídrico (31). O  $\text{CO}_2$  acumulado também pode afetar a viabilidade celular e reduzir o rendimento final da produção (32).

#### **1.4.4 Temperatura como fator de estresse na fermentação**

Assim como as contaminações nas destilarias, a alta temperatura constitui-se como uma importante condição de estresse durante a fermentação, pois é responsável por quedas de produção devido a fermentações mal sucedidas, principalmente em usinas localizadas em regiões mais quentes. Por isso, no processo de produção é necessária a implantação de trocadores de calor que mantenham a temperatura dentro da faixa adequada para a fermentação com leveduras convencionais. (5).

A temperatura é também conhecida por afetar o metabolismo das leveduras, e como resultado obtém-se a formação de metabolitos secundários tal como o glicerol, ácido acético, ácido succínico, entre outros (33). A diminuição da viabilidade das células de leveduras em temperaturas mais elevadas se deve a um maior acúmulo de etanol intracelular, na qual produziria toxicidade celular e alteraria a estrutura da membrana, diminuindo sua funcionalidade (34).

No entanto, se a levedura for resistente a temperaturas mais elevadas, com medias entre 40-50°C, a frequência deste tipo de perda pode ser significativamente reduzida, além disso, muitos dos custos associados com o resfriamento do processo de fermentação poderiam ser minimizados (5).

##### **1.4.4.1 Isolamento de leveduras termotolerantes**

Devido a característica exotérmica da fermentação é necessário o uso contínuo de resfriadores ao longo dos ciclos fermentativo para manutenção térmica. Uma vez que as leveduras utilizadas nos processos possuem uma temperatura ideal de operação que varia entre 28 e 33°C. No entanto, mesmo utilizando resfriadores, a temperatura durante a fermentação pode atingir ou exceder 35 °C, especialmente em destilarias situadas em regiões de temperatura mais elevada, o que pode prejudicar a eficiência de produção de etanol favorecendo a contaminação por bactérias e outros microrganismos oportunistas (35). Assim, quando as temperaturas atingem 40°C ou mais, poucos microrganismos podem sobreviver ao processo de fermentação, porque a combinação de temperaturas e quantidades elevadas de etanol criam um



ambiente ainda mais hostil nos tanques (36). Assim, a seleção ou desenvolvimento de linhagens de leveduras termotolerantes que mostram alta produtividade de etanol em temperaturas acima de 40 °C é de grande interesse para o processo de fermentação alcoólica e por isso têm sido o foco de vários estudos. Além disso, leveduras termotolerantes reduziriam os custos de controle de temperatura em destilarias, especialmente em países tropicais como o Brasil (37).

### 1.5 Expressão gênica ativada em resposta ao estresse

A resposta ao estresse pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* envolve a detecção dessas condições de estresse, a ativação de vias de transdução de sinal, de transcrição e de regulação pós-transcricional, o que resulta na acumulação de agentes de proteção e reparação de atividades (38). Todos esses mecanismos contribuem para que as células de leveduras possam se adaptar às mudanças do ambiente (39). A capacidade da *Saccharomyces cerevisiae* se alterar sob várias condições ambientais ocorre por uma via de resposta ao estresse conhecida por ESR (Resposta ao Estresse Ambiental), caracterizada por alterações na expressão de aproximadamente 900 genes. A maioria desses genes contém a sequência consenso em seu promotor, que é reconhecida pelos fatores de transcrição Msn2p e Msn4p (39). O par de fatores de transcrição Msn2p / Msn4p se ligam a elementos de resposta ao estresse (STREs) Esses elementos são caracterizados por uma sequência conservada. Msn2p / Msn4p controlam a resposta de estresse geral, uma vez que os genes alvo são induzidos por temperatura, choque osmótico, estresse oxidativo e da falta nutrientes (39).

Diversos genes respondem aos diferentes tipos de estresses. Entre eles os genes *OLE-1*, *YHR087W* e *HSP26* destacaram-se e serão discutidos em detalhes abaixo:

### 1.5.1 OLE1

O estresse por etanol inibe o sistema de transporte de aminoácidos e o transporte de glicose, e com isso pode conduzir à perda de viabilidade e a inibição do crescimento celular. Assim, uma compreensão mais aprofundada da tolerância da levedura ao etanol é importante para a criação de uma cepa de levedura com tolerância ao etanol melhorado (40). O principal alvo de estresse por etanol é a membrana plasmática. A tolerância da levedura ao etanol está relacionada com múltiplos componentes da membrana plasmática, por exemplo, fosfolípidios, o teor de ergosterol, e a composição de lipídios da membrana plasmática (40). A *ole1p* é uma enzima de um grupo de enzimas biossintéticas de lípidos que modificam ácidos graxos antes da sua integração na bicamada lipídica de membrana (41). Na linhagem de *Saccharomyces cerevisiae* S288C o gene *OLE1* está localizado no cromossomo VII, sendo a proteína codificada por esse gene com cerca de 500 aminoácidos (42). O gene *OLE1* codifica para a enzima  $\Delta$ -9 dessaturase de ácido graxo (*ole1p*), este gene foi caracterizado pela primeira vez por (43). Em *Saccharomyces cerevisiae* a *ole1p* é uma enzima de membrana do retículo endoplasmático altamente regulada, envolvida na formação de ácidos graxos insaturados a partir de precursores saturados. Assim, esta enzima converte os ácidos graxos palmitoil-CoA e estearoil-CoA, respectivamente, em ácidos palmitoleico e oleico, através da introdução de uma ligação dupla entre os carbonos 9 e 10 desses ácidos graxos (41). Estes ácidos graxos são componentes cruciais das membranas celulares, assim, o gene *OLE1* é essencial a menos que o meio seja suplementado com ácidos graxos insaturados (43).

### 1.5.2 HSP26

Nas leveduras *Saccharomyces cerevisiae* a proteína *sHsp26* (small heat shock protein) possui a capacidade de detectar diretamente o aumento da temperatura e mudar de um estado inativo para um estado ativo. Ao contrário de outras proteínas de choque térmico a Hsp26 é uma chaperona eficiente apenas em temperaturas elevadas (44). Na linhagem S288C de *Saccharomyces cerevisiae* o gene *HSP26* está localizado no cromossomo II. A proteína

codificada por este gene a sHsp26 possui atividade chaperona e apresenta 214 aminoácidos (54 kDa) (Saccharomyces Genome Database, 2016). As proteínas de choque térmico (HSPs) compreendem uma família de proteínas cuja expressão pode ser induzida quando uma célula está a responder a certos estímulos. Essas proteínas podem manter o estado enovelado normal das proteínas, degradar proteínas deformadas, estabilizar cadeias polipeptídicas, e evitar a inatividade proteica (45). A Hsp26 sob condições fisiológicas encontra-se na forma de complexos oligoméricos que consiste em 24 monômeros, após o choque térmico a Hsp26 é diretamente ativada por meio da dissociação dos 24 monômeros em dímeros (44). Estes por sua vez, reconhecem e se ligam especificamente a uma cadeia polipeptídica na forma não nativa. Posteriormente, os complexos dímero substrato se organizam em grandes e bem definidos complexos Hsp26-substrato, em um processo cooperativo, a proteína não nativa dissocia-se do complexo de forma espontânea ou com ajuda de outras chaperonas e , em seguida retorna para o estado nativo (44).

### 1.5.3 YHR087W

A expressão do gene *YHR087W* está relacionado a condições de estresse hiperosmótico. O gene *YHR087W* exibe maior expressão nesta condição, ele é induzido aproximadamente 5 vezes em glicose 20% e, codifica para uma proteína de função desconhecida de 111 aminoácidos (12 kDa) (39). A expressão deste gene também aumenta sob outras condições de estresses hiperosmóticos (sal e sorbitol) e em resposta a outras condições de estresse, tais como o choque térmico, dano oxidativo produzido por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ou diamida, etanol, pH ácido ou básico durante a fase estacionária da célula (39).

O entendimento do metabolismo durante os diferentes tipos de estresse é de suma importância para a melhora do processo produtivo. A termotolerância foi o foco de investigação deste estudo, no qual procuramos identificar leveduras termotolerantes, caracterizando-as do ponto de vista morfológico, genético e suas possíveis aplicações industriais.

## 2. OBJETIVOS

### Objetivo geral

Isolar e caracterizar linhagens de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* termotolerantes, provenientes do processo de produção industrial de etanol, bem como avaliar a expressão de genes que estão relacionados a termotolerância.

### Objetivos específicos

- i. Isolamento de linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* termotolerantes do banco de linhagens do LBGA (laboratório de bioquímica e genética aplicada).
- ii. Caracterização molecular das linhagens isoladas.
- iii. Caracterização das linhagens isoladas quanto ao consumo de glicose, taxa de crescimento a 40°C, resistência ao etanol e glicose, análise microscópica dos isolados e viabilidade durante o tratamento ácido.
- iv. Análise da expressão dos genes *OLE-1*, *YHR087W* e *HSP26* durante a fermentação das leveduras termotolerantes.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Meios de Cultura

Tabela 1. Meio YPD 2%

	g/L
Extrato de levedura.....	10g
Peptona.....	20g
Glicose.....	20g

Tabela 2. Meio YPD ágar 2%

	g/L
Extrato de levedura.....	10g
Peptona.....	20g
Glicose.....	20g
Ágar.....	20g

Tabela 3. Meio fermentativo

	g/L
Sacarose.....	180g
Fosfato de potássio.....	5,6g
Sulfato de magnésio.....	1,4g
Extrato de levedura.....	6,8g
Uréia.....	5,32g

#### 3.2 Microrganismos e Isolamentos de leveduras

As leveduras foram coletadas de uma usina sucroalcooleira localizada na cidade de Ourinhos no estado de São Paulo. Para isso, o leite de leveduras foi coletado das dornas de fermentação durante a etapa de centrifugação. No laboratório as amostras foram lavadas com água deionizada e posteriormente realizado uma diluição seriada para, então, serem espalhadas em placas de ágar YPD 2%. As placas foram incubadas a 30 °C durante 24-48h. Dez colônias de leveduras foram selecionadas de cada placa. As culturas puras de leveduras foram armazenadas em 30% de glicerol a -80°C. Os isolados foram analisados quanto a capacidade de crescimento a 40°C e as linhagens que apresentaram

perfil de termotolerância foram submetidas a análise molecular para diferenciação entre as linhagens e também para a identificação de espécies. As leveduras com perfil de termotolerância utilizadas nesse trabalho encontram-se listadas na tabela 1. Os meios de cultivo utilizados para manutenção, ativação e fermentação foram o YPD 2%, YPD 4%. Todas as linhagens foram estocadas e mantidas em glicerol 30% a -80°C.

**Tabela 4 - Linhagens de leveduras utilizadas**

Linhagem	Espécie	Genótipo	Origem
AZJ-01	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Selvagem	USL -LBGA
AZJ-02	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Selvagem	USL -LBGA
AZJ04	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Selvagem	USL -LBGA
AZJ05	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Selvagem	USL -LBGA
CAT-1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Industrial	---

Relação dos nomes das linhagens de leveduras utilizadas nesse estudo.

### 3.3 Extrações do DNA total

Para extração do DNA total, as linhagens isoladas foram crescidas em 4 mL de YPD durante 24 h a 30°C e o DNA extraído pelo método fenol clorofórmio. Para tanto, o pellet de células foi tratado com um tampão de extração (Tris-HCl 200mM, NaCl 250mM, EDTA 25mM e SDS 0,5%) por 10 minutos sob agitação com pérolas de vidro. Após esse período adicionou-se 200uL de solução fenol-clorofórmio (50-50%) sob agitação por 10 minutos e submetido a centrifugação. Em seguida o sobrenadante foi transferido para um outro tubo e adicionados 300 ul de isopropanol, e deixado no ultra freezer por 30 minutos. Posteriormente, o tubo foi submetido a centrifugação (5000rpm) por 5 minutos, o sobrenadante foi descartado e adicionado etanol 70%. Novamente a amostra foi centrifugada a (5000rpm) por 5 minutos, o sobrenadante foi descartado e o tubo contendo o DNA genômico foi deixado em temperatura ambiente para secar. A amostra foi ressuspensa em 80 ul de água deionizada. A integridade do DNA foi avaliada em gel de agarose 0,8%. E o DNA foi quantificado em espectrofotômetro nanodrop.

### 3.4 Identificações molecular das linhagens

Para identificação molecular dos isolados de leveduras, foi realizado a técnica de PCR, utilizando iniciadores que amplificam regiões polimórficas de acordo com a metodologia proposta por (46). A sequência de genes e primers utilizados, estão listados na tabela 5.

**Tabela 5. Genes e sequencias dos primers utilizados na genotipagem das leveduras.**

Genes	Sequências do Primer	Temperatura de Melting (°C)
SPA2F SPA2R	GAAAATGACGATGCAGACGA AGGACTCGCTTCCCTTACC	55
MN4F MN4R	TAGACCTTTTTGCGCCAAC ATTACCACGATTCCGTCGAA	57
PIR3F PIR3R	TGTCGCCTCATCTAAAGCAA TGTAATTTGGGATGCAGCAG	54
EPL1F EPL1R	ACGATTCCAAATACGACGAA TTCTGTTTCGCTTCTGAATTG	57

### 3.5 Identificações de espécie

Para determinação da espécie foi realizado o sequenciamento do produto amplificado ITS-18S. A análise das sequencias foram avaliadas utilizando a ferramenta BLASTn disponível no portal NCBI. Dessa forma, as sequencias obtidas foram comparadas com as sequencias depositadas no GenBank.

## **3.6 Caracterização morfofisiológica**

### **3.6.1 Fotomicrografia das leveduras**

A caracterização morfológica das linhagens identificadas como termotolerantes foi realizada através de fotomicrografia em microscópio óptico, analisando o perfil de cada linhagem após o crescimento em meio líquido YPD 2% durante 16 horas nas condições de 30 e 40°C.

### **3.6.2 Curvas de crescimento**

Para determinar a taxa específica de crescimento as células na fase exponencial de crescimento, foram inoculadas em meio YPD 2% com densidade óptica inicial de 0,1 ( $D.O_{600nm}$ ) e incubadas na condição teste e de controle com rotação de 180 rpm por 8 horas, tendo os valores de absorvância medidos em intervalos de 2 horas.

### **3.6.3 Teste de tolerância ao etanol**

Para o teste de resistência ao etanol as leveduras foram incubadas overnight em meio líquido YPD 2%, e posteriormente inoculadas em meio líquido com  $D.O_{600nm}$  igual a 0,1 por 4h de crescimento a 30°C sob agitação de 180 rpm. Após este período, foi adicionado etanol ao meio de cultura, para uma concentração final de 8 e 14% (v/v). Nas linhagens controle o mesmo volume de água foi adicionado. Em seguida, todas as linhagens foram incubadas por mais 5h a 30°C sob agitação de 180 rpm. Ao final do experimento essas leveduras foram avaliadas quanto ao crescimento e viabilidade pela técnica de diluições em série e meio sólido YPD e incubadas durante 24 horas a 30°C.



### **3.6.4 Fermentação em meio YPD 4%**

As linhagens de leveduras isoladas foram submetidas a ensaios de fermentação utilizando como substrato fermentativo glicose 4 % [(p/v) YPD] em duas temperaturas distintas 30 e 40°C. A concentração inicial de inoculo com  $D.O_{600nm}$  correspondeu a 1. As leveduras foram inoculadas em meio YPD 2%, em frascos erlenmeyers de 100 mL, para cada ponto de coleta de cada linhagem havia um frasco contendo um volume de 20ml. As amostras foram coletadas em intervalos de 2 horas, para determinação de massa celular e quantificação de glicose pelo método de glicose oxidase. Assim, todo o conteúdo de 20 ml foi centrifugado em cada coleta a 500 rpm por 5 minutos a uma temperatura de 4°C. O sobrenadante foi utilizado para determinação dos níveis de glicose e o pellet utilizado para extração de RNA.

### **3.7 Diluições seriada para testes de viabilidade em condições de estresse**

A diluição seriada foi realizada para avaliar a tolerância das leveduras isoladas as condições de estresse. As linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* foram inoculadas em meio líquido YPD 2% overnight a 30°C sob agitação de 180 rpm. Foram realizadas medidas de absorvância para que assim, fosse feita diluições seriadas (1:10), para obter-se as seguintes concentrações celulares  $10^6$ ,  $10^5$ ,  $10^4$ ,  $10^3$ . Um volume de 5ul de cada diluição foi aplicado em placas de YPD 2% sólido.

### **3.8 Determinações de massa seca**

A linhagem comercial Fleischmann liofilizada foi utilizada como modelo para estimar a concentração celular dos experimentos de fermentação. Dessa forma, foi construída uma curva padrão que relaciona a massa seca de levedura por absorvância. Para isso, massa seca de leveduras (5, 7, 10, 12, 15, 18 e 20 g/L) foram inoculadas em meio YPD 2% a 30°C por 30 minutos. Posteriormente, para cada concentração foi realizado uma leitura de absorvância em espectrofotômetro a 600nm. Cada amostra foi centrifugada a 500 rpm durante 5

minutos em tubos previamente pesados e secos em estufa a 60°C por 24 horas. O sobrenadante foi descartado para que o tubo fosse seco novamente em estufa a 60°C por 24 horas. Posteriormente, os tubos foram pesados e o valor de massa obtido descontando a massa inicial do tubo. Os valores de massa e a absorvância obtidos foram utilizados para construir uma curva padrão. Essa curva foi utilizada para estimar o valor de massa seca dos experimentos de fermentação.

### **3.9 Determinações de glicose por ensaio enzimático**

A dosagem de açúcar foi realizada pelo método enzimático colorimétrico da glicose oxidase (Glicose GOD-PAP), seguindo as recomendações do fabricante. Seu fundamento se baseia na oxidação da glicose catalisada pela glicose oxidase formando ácido glicônico e peróxido de hidrogênio. Este peróxido de hidrogênio, através de uma reação oxidativa de acoplamento catalisada pela peroxidase, reage com 4-aminoantipirina e fenol formando um complexo de cor vermelha (quinoneimina), cuja absorvância medida em 505 nm, é diretamente proporcional à concentração de glicose na amostra.

### **3.10 Ensaio Fermentativo**

Para determinar a capacidade fermentativa, as leveduras isoladas foram submetidas a ensaios de fermentação utilizando como substrato fermentativo sacarose (100g/L) em duas temperaturas distintas 30 e 40°C. A concentração inicial de inóculo correspondeu a aproximadamente 4 g/L de células. As leveduras foram inoculadas em meio fermentativo (100 mL) em frascos erlenmeyers de 250 mL. As amostras foram coletadas em intervalos de 2 horas, para determinação de glicose, frutose e etanol pelo método de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).

### 3.10.1 Determinações dos Parâmetros fermentativos

A taxa de conversão de substrato em etanol ( $Y_{ps}$  E/ART) foi calculado ao final de 8 horas, dividindo-se a diferença da massa final e inicial de etanol pela massa inicial de açúcar redutor total (ART), ambos expressos em gramas por litro (g/L).

O rendimento de etanol foi calculado ao final das 8 horas de fermentação, dividindo-se a taxa de conversão ( $Y_{ps}$ ) pelo rendimento teórico (0,51), multiplicado por 100, para que assim os valores obtidos fossem expressos em porcentagem (%).

### 3.10.2 Determinações de açúcar redutor e etanol

A determinação das concentrações de glicose, frutose e etanol foi realizado por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), utilizando uma coluna Sugar-Pak I. mantida a 80°C, acoplada a um detector de índice de refração. Foram utilizadas soluções de sacarose, glicose, frutose, etanol e glicerol em concentrações entre 0,1 e 8,0 g/L como padrões para calibração.

A análise foi realizada em colaboração no departamento de engenharia química (UFSCar), sob coordenação do Prof. Drº Alberto Colli Badino.

### 3.11 Análise de expressão gênica de *OLE1*, *YHR087W* e *HSP26* nas linhagens resistentes

As análises de expressão genica foram realizadas com o objetivo de avaliar o padrão de expressão dos genes *OLE1*, *YHR087W* e *HSP26* em condições de estresse ao longo da fermentação em escala laboratorial. Dessa forma, as amostras de células foram coletadas ao longo da fermentação e tiveram seus RNAs extraídos para realizar os experimentos de expressão gênica.

### 3.11.1 Extrações de RNA

A extração do RNA total foi realizada utilizando o reagente TRIzol® de acordo com as instruções do fabricante, e os RNAs extraídos armazenados em freezer a -80°C. A análise da integridade do RNA total extraído foi feita por eletroforese em gel desnaturante 1,5% contendo formaldeído.

### 3.11.2 Sínteses de cDNA

As amostras de RNA obtidas foram submetidas à síntese de DNA complementar (cDNA) utilizando-se o kit de transcrição reversa seguindo as recomendações do fabricante. Para verificar a síntese de cDNA foi realizado à amplificação de uma região do gene que codifica a subunidade ribossomal 5.8S, um gene com expressão constitutiva em *Saccharomyces cerevisiae*.

### 3.11.3 Primers utilizados nas qRT- PCRs

Os primers para a amplificação do gene OLE1 YHR087W e HSP2 foram desenhados tendo como base a sequência do gene depositada no SGD (*Saccharomyces Genome Database*). Como controle endógeno foi utilizado o gene que codifica a subunidade ribossomal 5.8S de leveduras, amplamente utilizado na literatura em experimentos de PCR em tempo real. A sequência dos primers, bem como as concentrações utilizadas e sua eficiência testada para o experimento de qRT-PCR estão descritos na tabela 6.

Tabela 6. Sequências e concentrações ótimas dos primers utilizados no PCR em tempo real (qRT-PCR).

Gene	Sequencia	Concentração.(uM) F/R	Eficiência
5.8S-F	CCCCAAACTTTCAACAACGGATCTCTTG	100/100	98%
5.8S-R	GCCAAATGACGCTCAAACAGGC		
HSP-F	5'-GATTCGGATCCGGTATTCAAAAAGCAAACA 3'	100/100	97,72%
HSP-R	5'-GATCCTCGAGGAAGTAGAAGTAGGCAAGAC 3'		
YHR-F	5'-TTAGCAAACACACCCGCAAAGG 3'	100/150	95,07%
YHR-R	5'-ACCGAAACCAGATGGGAACAGG 3'		
OLE1F	5'-GTCTACCGTCACTCAAATGC -3'	150/150	97,70 %
OLE1R	5'-CCAGTTTCGTAGATTCACCTC -3'		

### 3.11.4 Padronizações dos primers para utilização nas qRT- PCRs

Em PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR), a concentração ideal de primer a ser utilizada deve ser a mínima suficiente para permitir a duplicação de todas as cópias do material a cada ciclo de reação. Para isso, utilizando a mesma quantidade de amostra, foram realizadas reações contendo cada um dos primers (sense e anti-sense) nas concentrações de 100 nM, 200 nM e 300 nM. Todas as combinações possíveis destas concentrações foram utilizadas, porém foi escolhida a menor concentração que não verificou-se a formação de dímeros de primers.

### 3.11.5 Análise dos dados do qRT-PCR

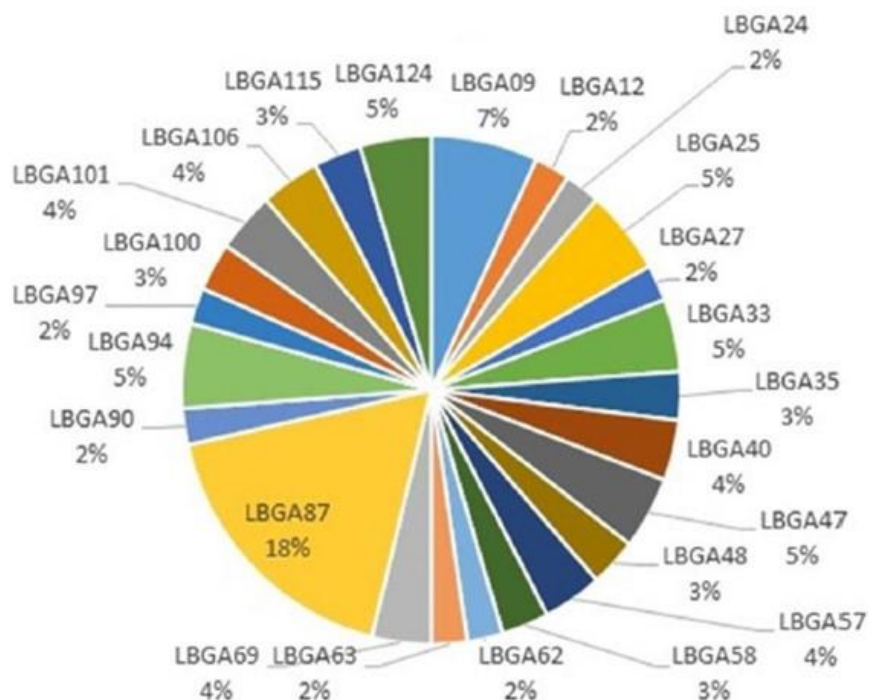
A expressão dos genes foi determinada de forma relativa. Dessa forma, os valores de expressão foram normalizados em relação ao gene endógenos, 5.8S. Os valores de Ct para cada gene estudado foi obtido em duplicata, para o cálculo da média aritmética dos resultados. Em seguida, foi obtido o valor de delta Ct ( $\Delta Ct$ ), que consiste na subtração do Ct do gene com o Ct do gene endógeno. O próximo passo foi de determinação do delta-delta Ct ( $\Delta\Delta Ct$ ), que consiste na subtração do Ct das amostras testes (condição em que se deseja avaliar as alterações na expressão gênica) com o Ct da amostra calibradora (condição controle). Assim, a expressão relativa foi calculada de acordo com a fórmula  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , fornecendo os resultados de variações da expressão em relação à amostra calibradora.

## **4.RESULTADOS**

### **4.1 Caracterizações molecular da população de leveduras das dornas de fermentação.**

A caracterização molecular dos isolados do banco de leveduras, a fim de diferenciar os isolados entre si, foi realizada por PCR baseado na amplificação de regiões polimórficas (46). Para tanto, um total de 289 isolados foram caracterizados molecularmente e como resultado obteve-se 157 linhagens identificadas como sendo diferentes entre si. O gráfico da figura 6 mostra a porcentagem de leveduras diferentes encontradas neste banco de leveduras. Pode-se notar que a linhagem LBGA87 foi a mais prevalente durante toda a amostragem. Nosso laboratório vem analisando a dinâmica de leveduras nas dornas de fermentação desta usina anualmente e, curiosamente, esta linhagem continua sendo a mais prevalente (dados não mostrados).

**Figura 6 - Identificação das linhagens mais prevalentes ao longo da safra na Usina São Luiz entre as safras de 2010 a 2012.**



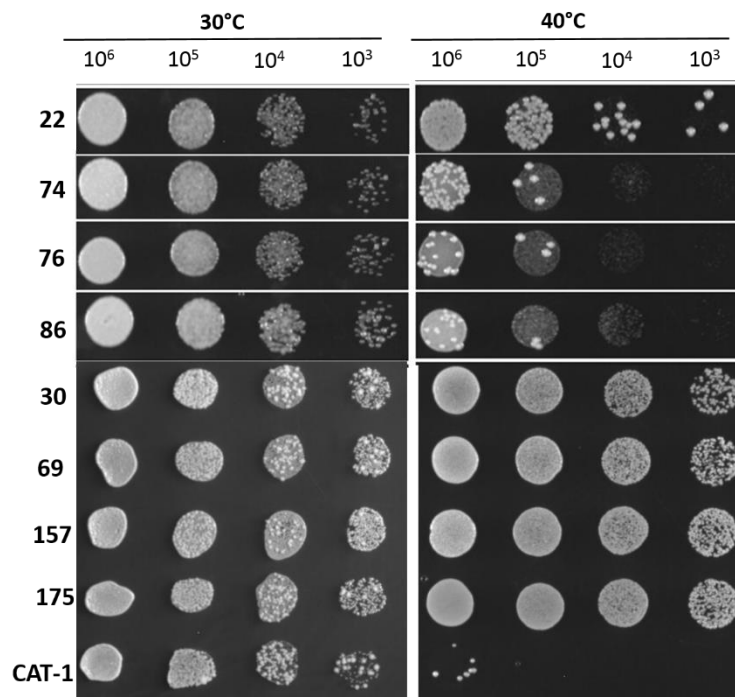
Porcentagem de linhagens de leveduras isoladas do processo de produção de etanol da usina São Luiz, localizada na cidade de Ourinhos –SP. 25 linhagens foram mais predominantes no banco e a linhagem LBGA087 foi a mais prevalente.

#### **4.2 Linhagens com características de termotolerância isoladas do processo produtivo**

As leveduras isoladas foram avaliadas quanto a capacidade de crescimento em temperatura elevada através do cultivo dos isolados e da linhagem de referência CAT-1 em meio YPD sólido a 40°C. Após estas análises foi possível a obtenção de oito isolados com potencial característica de termotolerância (figura 7). As linhagens 22, 30, 69, 157 e 175 apresentaram crescimento em todas as diluições na temperatura de 40°C após 24h de incubação. Enquanto que a linhagem industrial CAT-1 não apresentou crescimento a 40°C. Como pode ser observado, as linhagens 74, 76, 86 apresentaram crescimento evidente apenas até a segunda diluição. Embora essas linhagens tenham apresentado esse perfil de crescimento, estas foram também analisadas no teste posterior de consumo de glicose. Na condição

controle de 30°C pode ser notado que todas as linhagens apresentaram crescimento em todas as diluições.

**Figura 7 - Identificação de linhagens termotolerantes.**



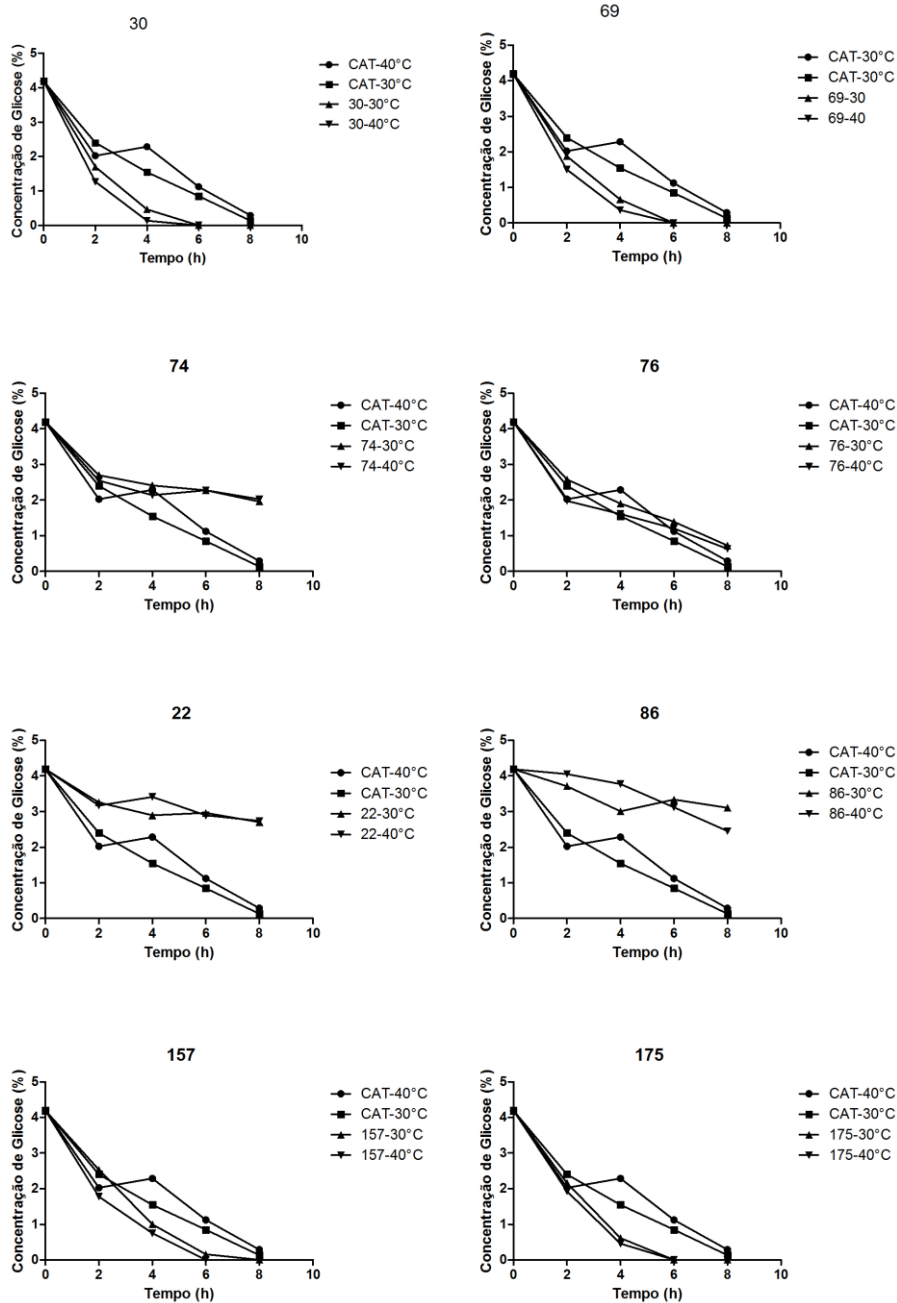
As linhagens foram diluídas em série, plaqueadas em meio sólido YPD 2% e incubadas em diferentes temperaturas (30 e 40°C). Linhagens foram consideradas termotolerantes quando o crescimento observado a 40°C foi semelhante à condição controle de 30°C.

#### 4.2.2 Análise do consumo de glicose em leveduras termotolerantes comparando com a linhagem industrial CAT-1

Para melhor caracterizar as oito linhagens identificadas como termotolerantes, estas foram avaliadas quanto a capacidade de consumir glicose em YPD (40 g/L), a 30 e 40°C. Os resultados foram comparados a linhagem industrial CAT-1 e estão apresentados na figura 8.



**Figura 8 - Consumo de glicose durante fermentação em meio YPD 4% (40 g/L glicose).**



As linhagens 30,69,157 e 175 apresentaram consumo de glicose mais rápido que a linhagem industrial CAT-1 em ambas as condições (30 e 40°C).

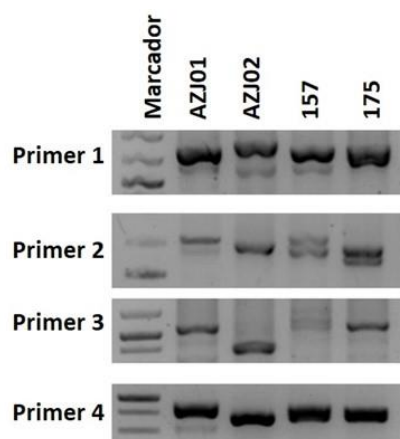
Pode se observar que a 40°C, quatro isolados sendo estes, as leveduras identificadas como, 30, 69, 157 e 175 apresentaram comportamento parecido entre si, consumindo a glicose em menor tempo que a levedura industrial CAT-1. A linhagem 30 foi capaz de consumir a glicose a 30° e 40°C em 6 horas de

experimento. A linhagem 69, também foi capaz de consumir toda a glicose do meio em 6 horas de experimento a 30 e 40°C. A linhagem 157, consumiu toda a glicose a 40°C em 6 horas, enquanto que a 30° consumiu toda a glicose em 8 horas. Para a linhagem 175, o consumo de toda a glicose aconteceu em 6 horas tanto a 30 quanto a 40°C. No entanto, as outras 4 linhagens não apresentaram um consumo de glicose satisfatório. Pode se observar que a linhagem 74 foi capaz de consumir aproximadamente apenas 50% da glicose durante as 8 horas de experimento a 30 e 40°C. A linhagem 76 apresentou açúcar residual ao final das 8 horas de experimento a 30 e 40°C. As linhagens 22 e 86 também não foram capazes de consumir toda a glicose ao longo do experimento, sendo que as linhagens 22 e 86 consumiram apenas 10 % do total de glicose ao longo das 8 horas.

Inesperadamente, a linhagem controle CAT-1 consumiu toda a glicose em 8 horas tanto a 30°C quanto a 40 °C.

Assim, com esses resultados, as linhagens 30, 69, 157 e 175 foram escolhidas para as análises posteriores e renomeadas da seguinte forma: AZJ01, AZJ02, AZJ04 e AZJ05, respectivamente. Essas linhagens foram selecionadas para as análises posteriores devido ao fato de serem capazes de consumir em menor tempo toda a glicose, principalmente a 40°C. Pode-se notar que as quatro linhagens isoladas apresentam perfil diferentes entre si e por isso foram identificadas individualmente.

**Figura 9 - Genotipagem das linhagens isoladas como termotolerantes.**



Os produtos de PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose 2%. Marcador de massa molecular 1Kb.. As linhagens termotolerantes estão identificadas como AZJ01, AZJ02, AZJ04 e AZJ05. P1-P4- Iniciadores utilizados para a amplificação dos fragmentos por PCR. As quatro linhagens testadas apresentaram padrões diferentes de amplificação.

#### **4.3 Identificações molecular dos isolados por sequenciamento**

Para que essas linhagens termotolerante fossem identificadas como sendo leveduras da espécie *Saccharomyces cerevisiae*, foi realizado o sequenciamento da subunidade 18S do DNA ribossomal das leveduras. O resultado do sequenciamento foi submetido a comparação com sequências do banco de dados GenBank utilizando a ferramenta BLASTn da plataforma do NCBI. O resultado da análise identificou todas as leveduras como pertencentes a espécie *Saccaromyces cerevisiae*.

#### **4.5 Avaliações do crescimento sob condições de estresse**

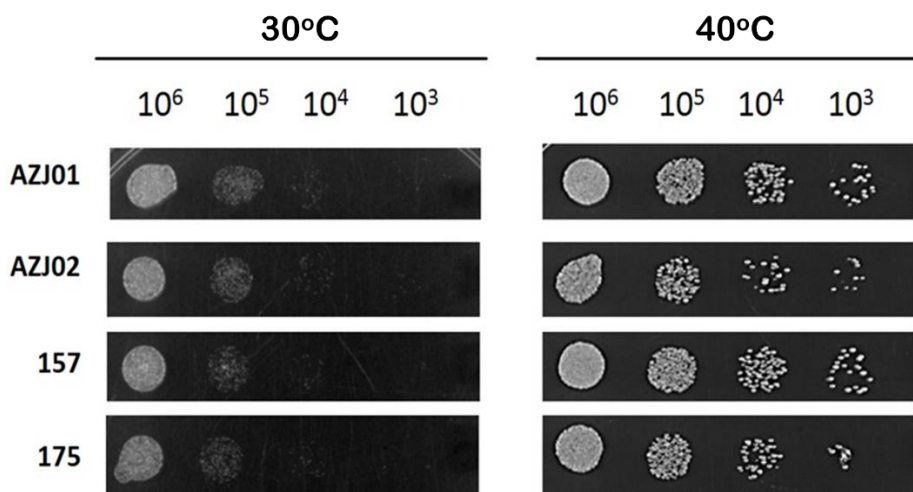
Buscando melhor caracterizar as leveduras em relação a capacidade de crescer em condições de estresses existentes na produção industrial de etanol, tais como concentrações elevadas de etanol e de açúcares, bem como o tratamento ácido que as leveduras são submetidas a cada ciclo de fermentação. As leveduras foram avaliadas nessas condições de estresse.

#### 4.5.1 Testes de fixação da característica de termotolerância

Uma vez que o objetivo desse trabalho é o estudo de genes relacionados as características de termotolerância, foi realizado um experimento para aumentar a fixação desta característica. As leveduras previamente selecionadas como resistentes a temperatura de 40°C foram submetidas a um teste para verificar a capacidade de fixar a característica de termotolerância, após passarem por diversos ciclos de crescimento na temperatura de 40°C. Ao longo de 9 dias essas leveduras foram incubadas em meio YPD 2%, sendo que a cada ciclo de crescimento (8h), 20% do conteúdo de células eram transferidos para um novo meio de cultivo. Após esse período, as células foram avaliadas quanto a sua capacidade de crescimento e viabilidade nas temperaturas de 30 e 40°C.

Pode se observar que após passar por um longo período de crescimento na temperatura de 40°C essas linhagens apresentaram uma preferência maior de crescimento nesta condição do que a 30°C (figura 12).

**Figura 10 - Análise da viabilidade celular das leveduras termotolerantes após 27 ciclos de crescimento em condições de estresse.**

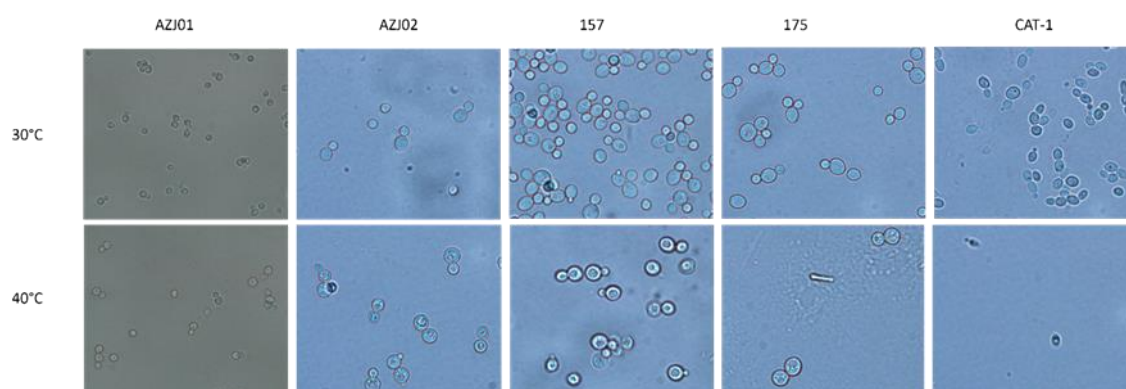


Perfil de crescimento das linhagens termotolerantes em meio sólido YPD 2% após 27 ciclos de crescimento na temperatura de 30 e 40°C em meio líquido YPD 2% sob agitação de 180rpm. As quatro linhagens apresentaram uma capacidade aumentada de crescimento na condição de estresse, sugerindo a fixação de características termotolerância.

#### 4.4.1 Fotomicrografia das leveduras termotolerantes

Para visualizar a morfologia das células de leveduras termotolerantes de *Saccharomyces cerevisiae* foi realizado uma fotomicrografia dessas leveduras e da levedura de referência CAT-1, após o cultivo por 16 horas em meio líquido YPD 2% nas temperaturas de 30 e 40°C. Na figura 11 encontram-se as imagens das leveduras termotolerantes e da linhagem CAT-1 utilizada como controle de comparação.

**Figura 11 Fotomicrografia das leveduras termotolerantes.**



Fotomicrografia em microscópio óptico em aumento de 40x na lente objetiva. A fotomicrografia evidencia o perfil morfológico das linhagens de leveduras previamente inoculadas overnight nas temperaturas de 30 e 40°C. Observa-se que a linhagem CAT-1 a 40°C apresenta menor tamanho, além de ter menos células de leveduras nessa condição.

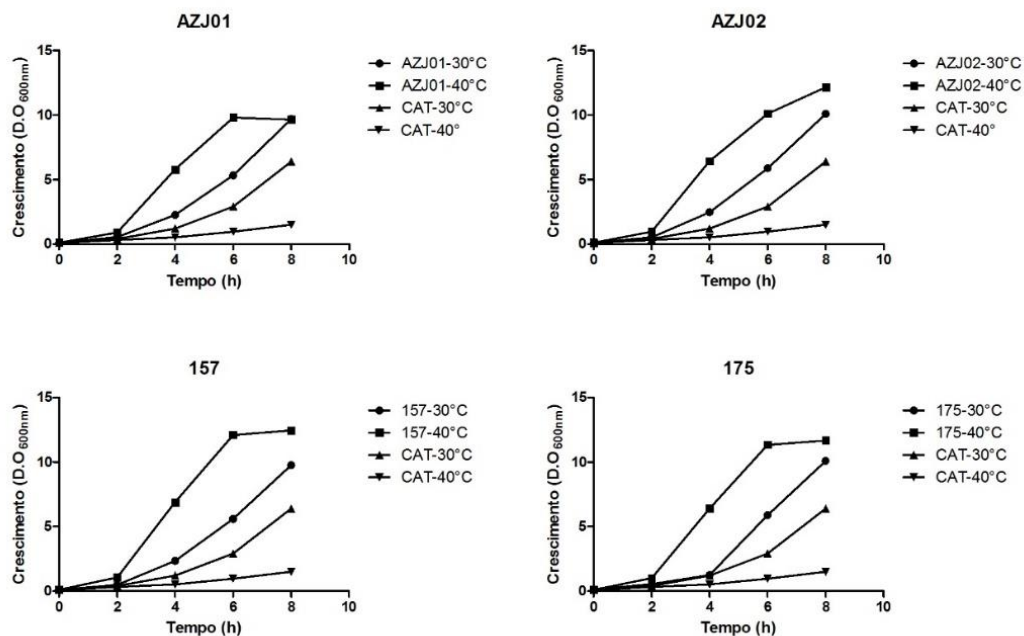
Os isolados AZJ01, AZJ02, AZJ04 e AZJ05 cultivados a 30°C apresentaram aparência arredondada e presença de brotamentos. No entanto, a linhagem CAT-1 apresentou células arredondadas e em formato elíptico, e também células com brotamentos. Na temperatura de 40°C as células das leveduras termotolerantes mantiveram o mesmo perfil fenotípico que a 30°C. No entanto, a linhagem CAT-1 apresentou um tamanho muito diminuído a 40°C. Além disso a concentração celular tanto de CAT-1 quanto da AZJ05 diminuiu consideravelmente.

#### 4.4.2 Avaliação do perfil de crescimento das leveduras termotolerantes

Para melhor caracterizar o crescimento das linhagens resistentes as temperaturas foram realizadas experimentos de crescimento em frascos de 50ml, contendo 20 ml de meio líquido YPD 2% com densidade óptica inicial de 0,1 D.O<sub>600nm</sub>. Por meio deste foram traçadas curvas de crescimento realizados nas temperaturas de 30°C (controle) e 40°C sob agitação de 180rpm por um período de 8h. Os resultados das curvas de crescimento das linhagens AZJ01, AZJ02, AZJ04, AZJ05 em comparação com a linhagem CAT-1, estão apresentados na figura 12.

Como o esperado, todas as linhagens cresceram a 30°C apresentando a fase lag (fase de adaptação) com um período de cerca de 2h, seguido pela fase exponencial. Na temperatura de 40°C as linhagens termotolerantes também apresentaram fase lag com um período de 2 horas, porém apresentando maior crescimento que a 30°C. Para a linhagem CAT a 40°C foi observado que a fase lag se estendeu por todo o período de 8 horas de crescimento, não foi detectado a fase log nessa linhagem.

**Figura 12 - Determinação do crescimento de e leveduras termotolerantes a 40°C e na condição controle de 30°C.**



Curva de crescimento em meio YPD 2% a 30 e 40°C sob agitação (180 rpm) ao longo de 8 horas das linhagens identificadas como termotolerantes AZJ01, AZJ02, AZJ04 e AZJ05 em comparação com a linhagem industrial CAT-1. Observa-se que as linhagens termotolerantes apresentam maior taxa de crescimento tanto a 30°C quanto a 40°C que a linhagem industrial CAT-1.

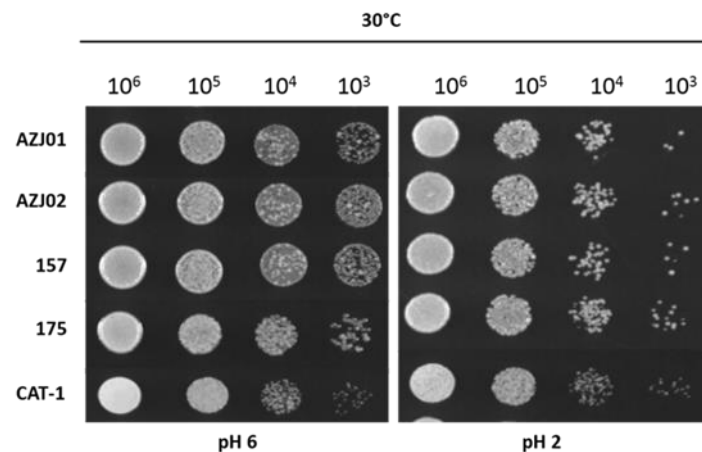
#### 4.5.2 Crescimentos em meio líquido YPD 2% pH 2

No processo industrial de fermentação, após o final de cada ciclo fermentativo, o mosto fermentado é centrifugado. Isso é realizado para que a levedura seja separada do mosto, que é direcionado para as torres de destilação. Após esse processo, as leveduras passam por um processo de descontaminação com ácido sulfúrico (pH aproximadamente 2). Com o intuito de analisar os efeitos do tratamento ácido nas leveduras, estas foram submetidas ao tratamento com ácido sulfúrico por 4h e posteriormente plaqueadas em diferentes diluições em meio sólido YPD 2%. Além disso, foi realizado uma curva de crescimento em pH 2 ao longo de 8 horas.

Como pode ser visualizado na figura 13, as linhagens termotolerantes e a linhagem controle CAT-1, após tratamento ácido por 4 horas apresentaram perfil de crescimento semelhantes após o tratamento ácido, com uma pequena queda

de viabilidade. Isso demonstra que todas essas linhagens são resistentes ao tratamento ácido.

**Figura 13 Determinação da viabilidade celular de leveduras termotolerantes após o tratamento ácido.**

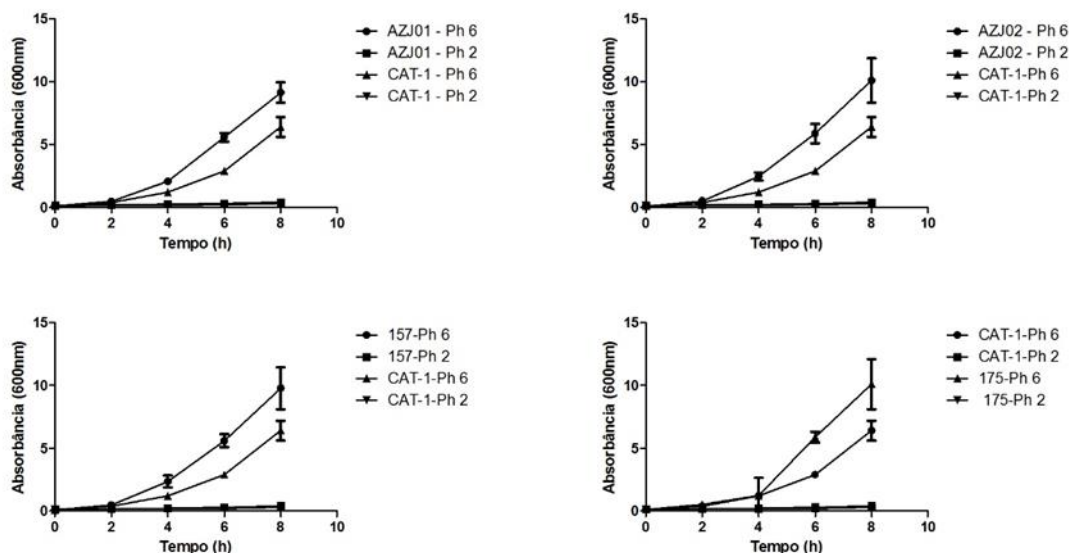


Perfil de crescimento em meio sólido YPD 2% após tratamento ácido em solução de água e ácido sulfúrico por 4h em pH 2 e pH 6 (condição de controle) sob agitação (180rpm) em temperatura ambiente. Observa-se a capacidade resistência ao tratamento ácido tanto das linhagens termotolerantes quanto da CAT-1.

No entanto, ao avaliar o crescimento celular dessas em meio YPD líquido em pH=2, conforme esperado, nenhum crescimento foi observado, porém as células se mantiveram viáveis mesmo após 8 horas nesta condição (Figura 14). Este resultado mostra o caráter inibitório do tratamento ácido sob as células, que não inviabiliza as leveduras isoladas. As células se mantiveram viáveis até o fim do experimento.



**Figura 14 - Crescimento de leveduras termotolerantes em meio YPD 2% em pH=2 e pH=6.**



Curva de crescimento em meio YPD 2% com valores de pH de 2 e 6 sob agitação (180 rpm) ao longo de 8 horas das linhagens identificadas como termotolerantes AZJ01, AZJ02, AZJ04 e AZJ05 em comparação com a linhagem industrial CAT-1. Observa-se que todas as linhagens não cresceram em meio YPD 2% com pH 2.

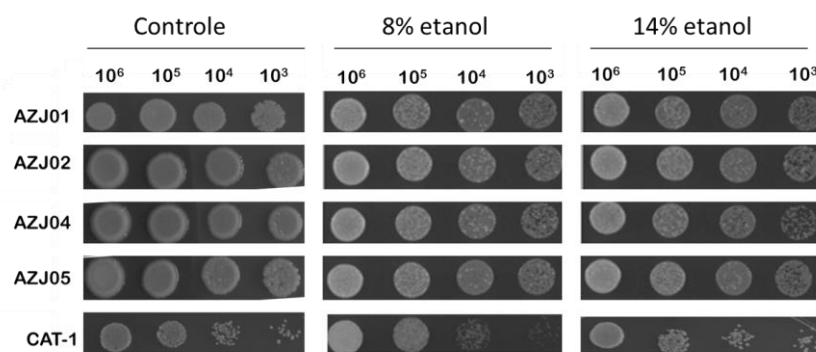
#### 4.5.3 Crescimentos em YPD 14% etanol

Os processos fermentativos necessitam de linhagens de leveduras capazes de suportar a altas concentrações de etanol. Portanto, para a análise de viabilidade em estresse de etanol, as leveduras foram crescidas por 16 horas em meio líquido YPD 2%, e posteriormente inoculadas em meio líquido com  $DO_{600}=0,1$  por 4h de crescimento a 30°C sob agitação de 180 rpm, para que duas gerações destas linhagens fossem formadas. Após este período, foi adicionado etanol ao meio de cultura, para que ficasse com uma concentração final de 8 e 14% (v/v). Ao final do experimento essas leveduras foram avaliadas quanto ao crescimento e viabilidade pela técnica de gotejamento (dropout) em diferentes diluições em meio sólido e incubadas durante 24 horas a 30°C.

Os resultados evidenciam a capacidade de resistência das leveduras termotolerantes e da linhagem industrial CAT-1 na condição de 8% de etanol. Este resultado já era esperado, uma vez que essa concentração normalmente é encontrada ao final do processo fermentativo nas usinas e com o qual a levedura

CAT-1 está bem adaptada. No entanto em concentrações superiores, a levedura CAT-1 teve uma importante redução em sua viabilidade, enquanto as linhagens termotolerantes isoladas apresentaram crescimento semelhante ao observado sem a adição de etanol, figura 15.

**Figura 15 Determinação da viabilidade celular de leveduras termotolerantes em altas concentrações de etanol.**

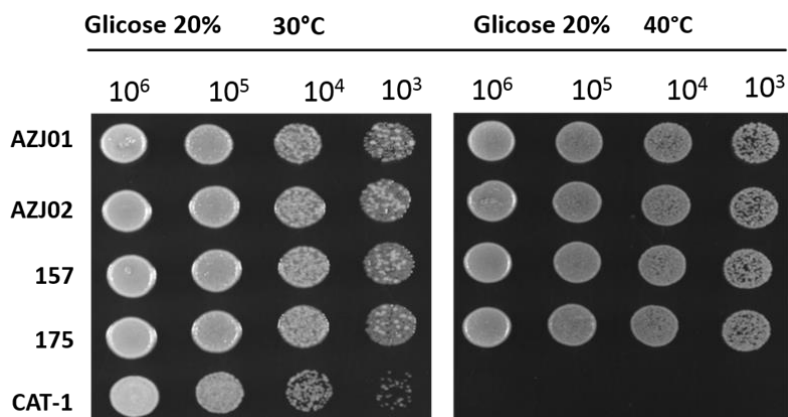


Perfil de crescimento em meio sólido YPD 2% após estresse de etanol nas concentrações de 8 e 14% por 5h sob agitação (180rpm) a 30°C. Observa-se a perda de viabilidade linhagem CAT-1 na concentração de 14% de etanol.

#### 4.5.4 Crescimentos em meio sólido estresse osmótico

Para o experimento de resistência osmótica, as leveduras foram incubadas em meio líquido YPD 2% por 16 horas, posteriormente foi realizado uma diluição em série em meio YPD ágar suplementado com 20% de glicose e as placas incubadas a 30 e 40°C. Pode-se observar na figura 16 que todas as leveduras cresceram a 30°C, porem o controle CAT-1 não cresceu a 40°C, o que já era esperado uma vez que essas linhagens não possuem a característica de crescer a 40°C. Contudo as leveduras termotolerantes não tiveram o crescimento afetado a 40°C em meio YPD sólido suplementado com 20% de glicose. Esse resultado evidencia que a concentração de açúcar não foi suficiente para inibir por estresse osmótico nenhuma das linhagens nesse experimento. Novos experimentos estão sendo conduzidos em concentrações crescentes de glicose para a avaliação da concentração limite de crescimento de cada linhagem.

**Figura 16 Determinação da viabilidade celular de leveduras termotolerantes em altas concentrações de açúcar.**



Perfil de crescimento em meio sólido YPD suplementado com 20% de glicose e crescimento a 30 e 40°C. Observa-se a capacidade resistência ao estresse osmótico de todas as linhagens na condição de 30°C e perda de viabilidade da linhagem CAT-1 a 40°C.

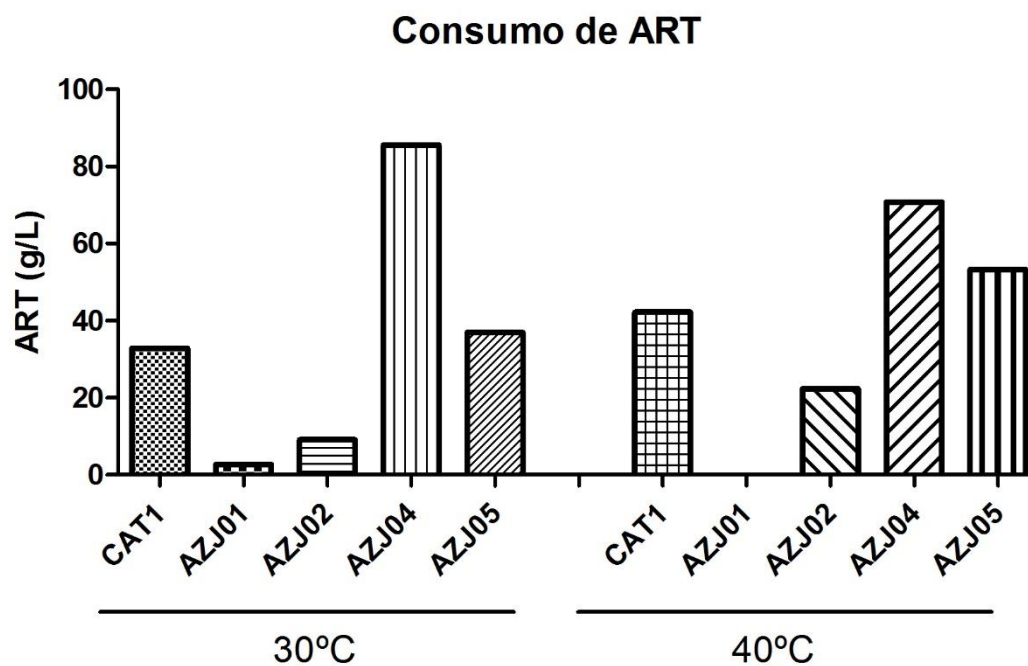
#### 4.6 Ensaio Fermentativo

As figuras 17 e 18 mostram o perfil fermentativo das linhagens AZJ01, AZJ02, AZJ04, AZJ05 e CAT-1 em 100ml de meio fermentativo acrescido de 100 g/L de sacarose com concentração celular de aproximadamente 4 g/L, a 30°C e 40°C respectivamente. A 30°C as linhagens consumiram açúcar de modo distinto entre si, assim o rendimento fermentativo foi diferente entre elas, tabela 7. Pode se observar na figura 17 que a linhagem AZJ01 foi a que apresentou maior consumo de ART (açúcar redutor total), produzindo 34,18 g/L de etanol, as linhagens AZJ02, AZJ04, AZJ05 e CAT produziram 32 g/L, 2,55 g/L, 19,08 g/L e 30,52 g/L de etanol respectivamente, figura 18.

A 40°C as leveduras apresentaram um comportamento bastante diferente. A linhagem AZJ01 foi capaz de consumir todo o ART e produziu 35,65 g/L de etanol, aumentando assim seu rendimento (tabela 8). A linhagem AZJ02 consumiu menos ART e produziu menos etanol, mantendo o rendimento bem próximo que a 30°C. A linhagem AZJ04 teve um aumento no consumo de ART (70,82 g/L final) e na produção de etanol (5,87 g/L final), aumentando assim seu rendimento. A linhagem AZJ05 diminuiu o etanol produzido (11,22 g/L) e o ART consumido também diminuiu (53,3g/L final). A linhagem CAT-1 produziu menos

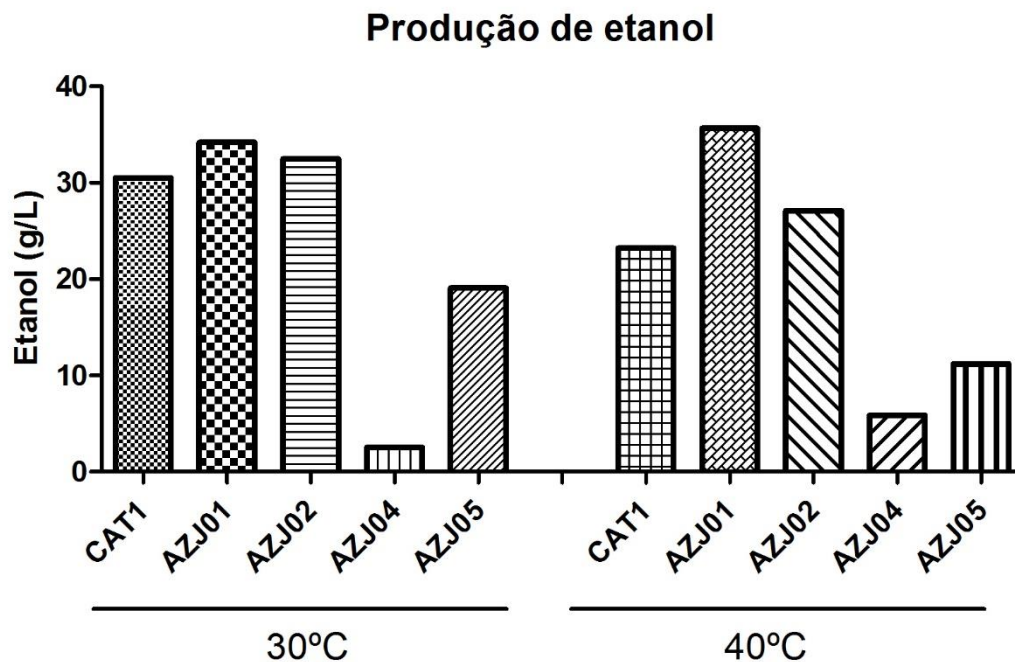
etanol (23,22 g/L) e consumiu menos ART (42,22 g/L final), consequentemente diminui seu rendimento.

**Figura 17. Ensaio Fermentativo das linhagens termotolerantes comparado com linhagem industrial CAT-1.**



Ensaio fermentativo a 30°C e 40°C com concentração celular de aproximadamente 4g/L em 100mL de meio fermentativo com 100g/L de sacarose. Consumo de açúcar redutor total (ART).

Figura 18. Ensaio fermentativo utilizando as linhagens termotolerantes em comparação com a linhagem industrial CAT-1



Ensaio fermentativo a 30°C com concentração célula de aproximadamente 4g/L em 100mL de meio fermentativo com 100g/L de sacarose. Produção de etanol.

**Tabela 7. Ensaio fermentativo das leveduras termotolerantes comparadas a linhagem industrial CAT-1 a 30°C**

Linhagem	Sacarose inicial (g.L <sup>-1</sup> )	Sacarose final (g.L <sup>-1</sup> )	Etanol inicial (g.L <sup>-1</sup> )	Etanol final (g.L <sup>-1</sup> )	Yps (g etanol/g sacarose)	Glicerol (g.L <sup>-1</sup> )	Rendimento (%)
AZJ01	114,87	2,73	0	34,18	0,3	6,86	59,65
AZJ02	102,72	9,1	0	32,47	0,35	7,50	67,87
AZJ04	100,64	85,54	0	2,55	0,17	1,01	33,04
AZJ05	104,37	36,95	0	19,08	0,28	5,46	55,38
CAT-1	106,95	32,84	0	30,52	0,41	2,28	80,59

Ensaio fermentativo a 30°C com concentração célula de aproximadamente 4g/L em 100mL de meio fermentativo com 100g/L de sacarose. Produção de etanol e consumo de açúcar redutor total (ART).

**Tabela 8. Ensaio fermentativo das leveduras termotolerantes comparadas a linhagem industrial CAT-1 a 40°C**

Linhagem de levedura	Sacarose inicial (g.L <sup>-1</sup> )	Sacarose final (g.L <sup>-1</sup> )	Etanol inicial (g.L <sup>-1</sup> )	Etanol final (g.L <sup>-1</sup> )	Yps (g etanol/g sacarose)	Glicerol (g.L <sup>-1</sup> )	Rendimento (%)
AZJ01	114,87	0	0	35,65	0,31	6,79	60,73
AZJ02	102,72	22,34	0	27,10	0,34	7,63	65,98
AZJ04	100,64	70,82	0	5,87	0,2	2,29	38,52
AZJ05	104,37	53,31	0	11,22	0,22	3,92	43
CAT-1	106,95	42,22	0	23,22	0,36	1,29	70,2

Ensaio fermentativo a 40°C com concentração célula de aproximadamente 4g/L em 100mL de meio fermentativo com 100g/L de sacarose. Produção de etanol e consumo de açúcar redutor total (ART).

#### 4.7 Análise de expressão dos genes *OLE1*, *YHR087W* e *HSP26*

Uma vez identificadas as linhagens termotolerantes e tendo visto que os resultados eram bastante promissores resolvemos avaliar a expressão de genes destacados na literatura por terem sua expressão regulada por diferentes tipos de estresses. Desse modo, avaliamos a expressão dos genes *HSP26*, *OLE1* e *YHR087W* nas linhagens termotolerantes durante a fermentação, utilizando meio YPD com 4% glicose. O experimento foi realizado a 40°C na condição teste e 30°C na situação controle, utilizando uma concentração inicial de inóculo correspondente a 1,5g/L. Durante a fermentação foram avaliados o consumo de glicose e o aumento da concentração celular.

Como pode ser observado o consumo de glicose foi semelhante entre todas as linhagens termotolerantes estudados, sendo que, conforme o esperado, todas consumiram toda a glicose no tempo de 6 horas (figura 19-D). O crescimento, assim como o consumo de glicose também foi semelhante em ambas as temperaturas (figura 19-E)

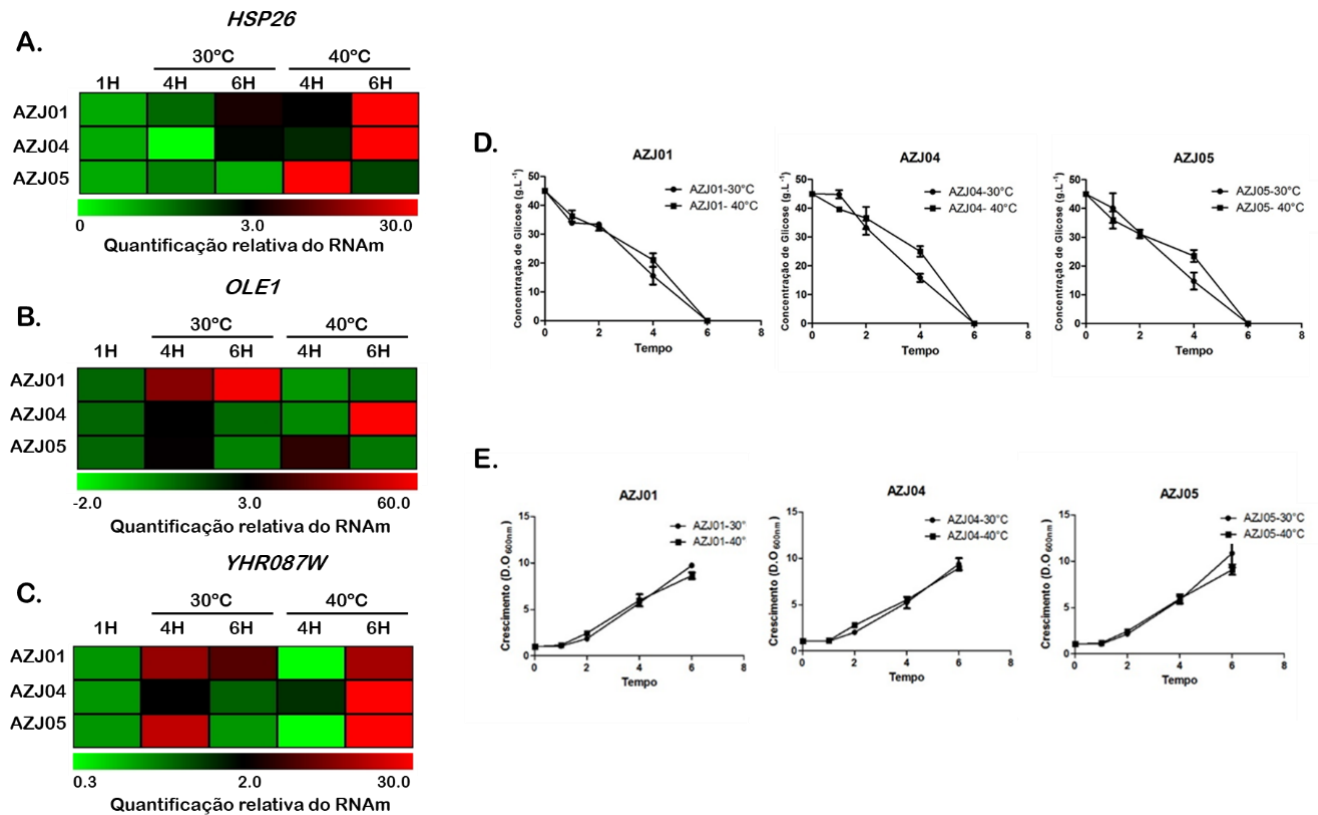
Os resultados de expressão gênica mostraram um aumento gradativo na expressão de *HSP26* para as linhagens termotolerantes AZJ01 e AZJ04 quando crescidas a 30°C. Já a linhagem AZJ05 apresentou um pico na expressão deste

gene no meio do processo fermentativo. Quando a fermentação ocorreu a 40°C percebe-se que o perfil de expressão se mantém, no entanto com uma quantidade relativa muito maior da produção do RNA mensageiro que codifica para esta proteína (figura 19-A).

Para o gene *OLE1*, observa-se um aumento importante e gradativo de sua expressão apenas na linhagem termotolerante AZJ01, enquanto que para as outras duas ocorre um pico de expressão no meio do processo fermentativo a 30°C. Quando a fermentação ocorre a 40°C nota-se uma redução importante na expressão deste gene para a linhagem AZJ01, enquanto a linhagem AZJ04 apresenta um aumento gradativo da expressão deste gene e ao final do processo fermentativo apresenta um nível elevado de expressão. A linhagem AZJ05 apresentou um perfil de expressão semelhante ao observado a 30°C com um pequeno aumento de quantidade (figura 19-B).

O gene *YHR087W* apresentou o mesmo perfil transcricional ao longo da fermentação a 30°C em todas as linhagens termotolerantes, com um pico de expressão no meio do processo. Vale notar que para as linhagens AZJ01 e AZJ05 o nível de expressão foi superior ao encontrado para a linhagem AZJ04. Quando a fermentação ocorreu a 40°C, a expressão deste gene foi muito aumentada no final do processo fermentativo em todas as linhagens analisadas (figura 19-C).

Figura 19 – Análise da expressão gênica, consumo de glicose e crescimento de linhagens termotolerantes.



A expressão gênica foi realizada por qRT-PCR e a expressão relativa foi calculada de acordo com a fórmula  $2^{-\Delta\Delta CT}$ . A quantificação da concentração de glicose foi realizada através do método enzimático da glicose oxidase e o crescimento medido através de medida em espectrofotômetro no comprimento de onda de 600nm ( $DO_{600}$ ).



## 5. DISCUSSÃO

O processo de fermentação industrial não apresenta um ambiente favorável para as leveduras, que estão sujeitas a diferentes condições de estresse, sendo a competição com outros microorganismos, principalmente leveduras selvagens, um dos mais bem estudados na literatura. Entender o processo da dinâmica de sucessão de linhagens tem sido os esforços de vários pesquisadores ao longo dos anos. Ao investigar a dinâmica de sucessão de leveduras em várias usinas do estado de São Paulo, Basso e colaboradores isolaram 4 linhagens denominadas PE-2 (isolada na usina da Pedra), CAT-1 (isolada na usina Catanduva), SA-1 (isolada na usina Santa Adélia) e BG-1 (isolada na usina de Barra Grande) (5) . Efetivamente as duas primeiras se estabeleceram em aproximadamente 60% das usinas do estado de São Paulo, sendo responsáveis por quase 15% da produção mundial de etanol (3). No entanto com a modificação da matéria prima e dos processos para a obtenção de etanol, fica evidente a necessidade de isolamento de novas linhagens.

Nosso grupo vem estudando a dinâmica de população de leveduras desde 2009. Como mostra a figura 6, existe uma prevalência de linhagens específicas em cada usina. Em nossos resultados encontramos a prevalência de uma linhagem (LBGA87) que se mostrou muito bem adaptada ao processo da usina estudada. Ela vem sendo prevalente nas amostragens dos últimos 8 anos e por isso vem sendo estudada pela usina em colaboração com nosso laboratório, para uma possível implantação desta linhagem na safra.

Apesar da identificação de leveduras personalizadas ser muito importante para a melhora do processo de produção, alterações como o aumento de temperatura podem influenciar negativamente neste processo. As fermentações nas usinas de produção de etanol ocorrem em temperaturas que variam entre 30 e 35°C. No entanto, em usinas localizadas em regiões mais quentes a fermentação pode facilmente exceder essa faixa de temperatura. Isso ocorre, devido as maiores dificuldades no resfriamento do processo. Como consequência, pode causar quedas na produção devido à perda de viabilidade de leveduras sensíveis a temperatura.

A utilização de levedura termotolerantes pode ser uma estratégia para contornar esta problemática. Diversos estudos têm sido realizados no sentido de se isolar leveduras com tais características, tanto, para o processo de etanol de primeira quanto de segunda geração (47).

Nesse trabalho, apresentamos oito linhagens de leveduras isoladas do processo produtivo capazes de crescerem a 40°C, mostrando viabilidade superior a linhagem industrial CAT-1 quando incubadas nessa condição em meio sólido (figura 7). Isso sugere que essas linhagens apresentam mecanismos de resistência celular à temperatura mais elevada. Há trabalho na literatura que confirmando que a temperatura limite de crescimento para a linhagem de referência CAT-1 é de 39°C, temperatura na qual seu crescimento já é bastante prejudicado (48). Isso impossibilita o uso desta linhagem em processos de fermentação em altas temperaturas.

A capacidade de fermentar em temperatura mais elevada e de fermentar em período de tempo menor, são características desejadas em processos industriais, uma vez que em temperatura mais elevada a competição dessas leveduras com outros microrganismos que invadem o processo de produção seria bastante diminuída. Nossos resultados mostraram que dentre as 8 linhagens selecionadas, 4 apresentaram um consumo de glicose superior ao da linhagem industrial CAT-1 (figura 8) evidenciando um potencial de aplicação industrial interessante.

Possuir maior consumo de glicose em menor tempo, apesar de ser uma característica interessante, pode não estar diretamente relacionada com um aumento na produção de etanol. Isto porque o metabolismo deste açúcar pode estar sendo direcionado para a produção de outros metabolitos, como por exemplo o glicerol ou até mesmo para a produção de biomassa (14). Além disso, é importante que a levedura a ser utilizada seja da espécie *S. cerevisiae*, pois esta linhagem é extremamente adaptada ao processo de produção brasileiro. Sabe-se que existe a possibilidade de outras espécies se estabelecerem nas dornas de fermentação, sendo algumas delas com um perfil de termotolerancia conhecido, como é o caso da levedura da espécie *kluveromyces marxianus*.(49). As linhagens termotolerantes isoladas neste trabalho foram identificadas como *S. cerevisiae* e portanto de interesse para aplicação industrial.

Em relação a produção de etanol, nossos resultados mostraram que as linhagens AZJ01 e AZJ02 foram as mais promissoras, produzindo níveis próximos ao da levedura industrial CAT-1. Vale salientar que o rendimento destas linhagens não foi alterado quando comparadas as diferentes temperaturas (tabela 7 e 8).

Além da necessidade de leveduras com excelente capacidade fermentativa, também é necessário que sejam capazes de suportar as diversas condições de estresse existentes no processo produtivo, tais como estresse por etanol, estresse osmótico e de pH entre outros. Antes de avaliar o perfil de resistência desses isolados, essas linhagens foram expostas continuamente na temperatura de 40°C por várias gerações, afim de se obter gerações com o fenótipo da termotolerancia fixado. De forma interessante, após diversos ciclos fermentativos as leveduras termotolerantes passaram a crescer mais rapidamente na temperatura elevada (figura 10), evidenciando sua possível aplicação em processos de produção industrial de etanol. Além disso, para a produção destas linhagens faz-se necessário seu cultivo antes do início da safra e por isso a proliferação celular é de suma importância. Mais uma vez as linhagens termotolerantes se destacaram, pois apresentam uma maior produção de biomassa que a levedura CAT-1 tanto a 30 quanto a 40°C (figura 12).

Em resposta as condições de estresses o perfil morfológico da levedura pode ser alterado. Diversos relatos de literatura, evidenciam que linhagens de levedura, quando colocadas em condições estressantes, diminuem de tamanho e/ou diminuem sua proliferação (50). Os resultados apresentados na figura 11 mostraram não ser esse o caso das linhagens isoladas neste trabalho, uma vez que os isolados apresentaram o mesmo perfil morfológico tanto a 30 quanto a 40°C. Além disso, não foi verificado a formação de pseudohifas que é uma ocorrência frequente e relacionada a resposta ao estresse ambiental. Além disso, essa característica morfológica é indesejável para a produção industrial, uma vez que está associada a floculação e como consequência perdas de produção (5).

O aumento da concentração de glicose pode causar estresse osmótico nas leveduras, sendo um limitante do processo (5). Nas condições testadas neste trabalho, não foi verificado efeito do estresse osmótico nos isolados (figura 16). Com o aumento da concentração inicial de açúcar, quantidades maiores de

etanol poderiam ser produzidas no mesmo intervalo de tempo. No entanto, para que isso seja possível, é necessário também que as linhagens sejam resistentes a concentrações maiores de etanol. Linhagens industriais são resistentes até concentrações na faixa de 8-11% (v/v) que é a concentração limite atualmente utilizada nas usinas brasileiras (5). Os isolados termotolerantes apresentaram resistência a concentrações de 14% de etanol (figura 15), sendo portanto possível sua aplicação em condições industriais com maiores concentrações de ART iniciais.

O pH é outro importante fator de estresse que ocorre ao longo da fermentação industrial uma vez que no Brasil ocorre o reciclo de linhagens e para minimizar as contaminações são realizados tratamento ácido em pH entre 2,5 e 3,5 utilizando para isso o ácido sulfúrico. A exposição das leveduras ao pH baixo afeta o metabolismo da célula e poderia implicar em um aumento da morte celular (30). Assim é importante que a viabilidade seja mantida após este tratamento, possibilitando a fermentação após o reciclo. Os resultados mostraram que todas as linhagens apresentaram alta viabilidade após o tratamento ácido, mantendo as características fermentativas (figuras 13 e 14).

Nos ensaios fermentativos realizados, os resultados mostraram que as leveduras termotolerantes, direcionaram uma parte do consumo de substrato tanto para a produção de glicerol quanto para a produção de biomassa. É conhecido na literatura que níveis aumentados de glicerol estão relacionados com a proteção da célula a diferentes tipos de estresse (51). Essa proteção pode ser benéfica, uma vez que, a instalação de processos fermentativos em altas temperaturas, a competição com outros microrganismos seria reduzida. Isto tornaria o processo muito mais estável gerando, ao longo da safra, ganho significativo no volume total de etanol produzido. Além disso, nossos ensaios foram realizados com concentrações celulares inferiores ( $4 \text{ g.L}^{-1}$ ) às utilizadas pelas usinas ( $10 \text{ g.L}^{-1}$ ). Ensaios com maior concentração celular inicial poderão indicar um desvio menor de ART para estes processos, uma vez que as linhagens já estariam adaptadas e em concentrações limitantes para sua proliferação.

Entender os processos metabólicos que levam a aquisição de resistência aos diferentes fatores de estresse durante o processo fermentativo vem sendo foco de diferentes estudos. Experimentos que identificam a expressão diferencial

de genes em resposta ao estresse por etanol, já é descrito na literatura. (52). Adicionalmente, experimentos mostrando a expressão em diversas leveduras de genes relacionados a osmotolerância, estresse oxidativo, metabolismo de trealose e temperatura também já foram descritos na literatura (53). No-entanto, com relação ao processo fermentativo utilizando leveduras termotolerantes para a obtenção do etanol, são poucos os dados descritos, principalmente porque a obtenção de isolados com potenciais características de aplicação são difíceis. Uma vez que os isolados deste estudo apresentaram características importantes para a aplicação industrial, investimos esforços na caracterização da expressão de 3 genes já descritos na literatura como relacionados a diferentes tipos de estresse. O gene HSP26 já foi descrito como sendo responsável por proteger a célula de estresse causado pelo aumento da temperatura (44). Além disso, já foi relatado que sua expressão pode não estar relacionada com a via de biossíntese de glicerol quando as células de *Saccharomyces cerevisiae* são expostas em condições de estresse osmótico (38). Corroborando os dados da literatura, nossos resultados mostraram um aumento importante da expressão deste gene na fase final do processo fermentativo nas leveduras termotolerantes em condições fermentativas de 40°C. A expressão aumentada desse gene também pode estar relacionada em resposta ao estresse por etanol (52).

O mesmo aumento de expressão foi observado para o gene *YHR087W*. A expressão deste gene ocorre em resposta ao estresse osmótico, também já foi descrito como sendo um alvo importante na via de biossíntese de glicerol (39). Como níveis aumentados de glicerol foram observados nas linhagens termotolerantes no processo de fermentação, esse aumento poderia estar relacionado com a expressão do gene. A supressão deste gene poderia inibir a produção de glicerol e talvez contribuir para um aumento na produção de etanol.

Já o gene *OLE1* que é responsável por adicionar ácido oleico nas membranas lipídicas em resposta ao estresse por etanol, mostrou uma redução de sua expressão em 2 das 3 linhagens analisadas neste trabalho quando a fermentação foi conduzida a 40°C. Experimentos realizados em outras leveduras mostram um aumento deste gene quando em condições de estresse ao etanol. Ao contrário disso, em análises realizadas em leveduras da espécie *Saccharomyces cerevisiae* e *Candida albicans* mostrou uma relação negativa deste gene em temperaturas elevadas (54). A diminuição da expressão deste

gene nas linhagens termotolerantes isoladas, pode estar relacionada a uma diminuição da insaturação da membrana nas fases finais de fermentação, no qual além do estresse de temperatura têm-se aliado ao estresse por etanol. Dessa forma, seria um mecanismo de proteção celular para manter a viabilidade destas linhagens. Assim, como se trata de uma expressão relativa, apesar dos níveis de expressão diminuírem na fase final da fermentação, é possível que os níveis iniciais de produção desta proteína já fossem suficientes para a proteção da célula. Sabe-se que a deleção deste gene é letal para a levedura, o que dificulta experimentos de identificação de função. No entanto se mutantes condicionais fossem produzidos de modo que a expressão do gene fosse inativada após o processo inicial de fermentação, seria possível estabelecer melhor esta relação. Para isso, seriam necessários experimentos com promotores específicos ativados apenas no início do processo fermentativo.

## 6. CONCLUSÕES

- Foi possível a obtenção de 4 linhagens termotolerantes isoladas do processo de produção industrial de etanol.
- Essas linhagens mostraram-se superiores em consumo de glicose em relação a linhagem industrial CAT-1.
- As linhagens termotolerantes mostraram uma resistência superior a concentrações de etanol elevadas quando comparadas a linhagem industrial CAT-1.
- A resistência ao tratamento ácido e osmotolerância das linhagens termotolerantes foi similar a linhagem industrial CAT-1.
- Duas linhagens apresentaram rendimento fermentativo similares ao apresentado pela linhagem industrial.
- O acúmulo de glicerol foi maior nas linhagens termotolerantes.
- O padrão de expressão gênica dos genes *HSP26*, *OLE1* e *YHR087W* foi alterado em relação a temperatura, sendo aumentado para os genes *HSP26* e *YHR087W* e reduzido para o gene *OLE1* em fermentações em alta temperatura.
- Portanto, os resultados do presente trabalho contribuíram para uma melhor caracterização de leveduras termotolerantes da espécie *Saccharomyces cerevisiae* isoladas da produção industrial de etanol, visando sua potencial utilização na produção de etanol nas indústrias sucroalcooleiras.
- Outros experimentos poderão ser realizados para entendimento dos mecanismos moleculares envolvidos na aquisição de tolerância a altas temperaturas, e assim indicar genes de interesse para o melhoramento das linhagens a serem utilizadas no processo de produção industrial.
- A implantação de processos fermentativos em altas temperaturas poderá trazer ganhos significativos na produção de etanol, contribuindo para que o Brasil volte a ocupar o primeiro lugar neste segmento.

## 7. REFERENCIAS

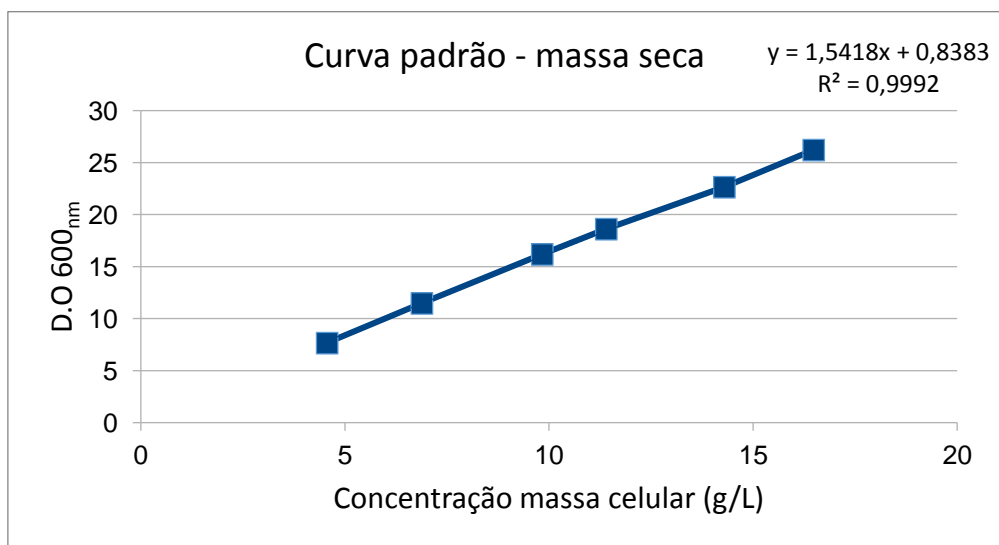
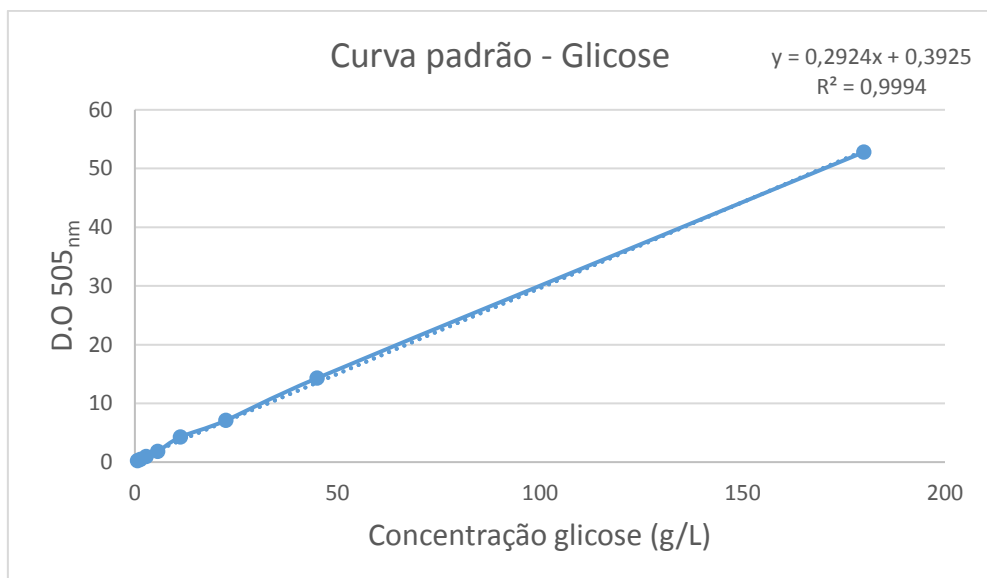
1. CONAB. *ACOMPANHAMENTO DA SAFRA BRASILEIRA: Cana-de-açúcar*. 2016 abr. 2016 [cited 2016; Available from: [http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/16\\_04\\_18\\_14\\_27\\_15\\_boletim\\_cana\\_portugues\\_-\\_1o\\_lev\\_-\\_16.pdf](http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/16_04_18_14_27_15_boletim_cana_portugues_-_1o_lev_-_16.pdf).
2. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, P.E.A. *Produção Brasileira de Cana-de-açúcar, Açúcar e Etanol*. 2017 [cited 2017; Available from: <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/sustentabilidade/agroenergia/arquivos-precos/producao-brasileira-de-cana-de-acucar-acucar-e-etanol.pdf>.
3. Paulino de Souza, J., 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, 2017.
4. Abreu-Cavalheiro, A. and G. Monteiro, *Solving ethanol production problems with genetically modified yeast strains*. Braz J Microbiol, 2013. **44**(3): p. 665-71.
5. Basso, L.C., et al., *Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil*. FEMS Yeast Res, 2008. **8**(7): p. 1155-63.
6. Wheals, A.E., et al., *Fuel ethanol after 25 years*. Trends Biotechnol, 1999. **17**(12): p. 482-7.
7. Amorim, H.V., et al., *Scientific challenges of bioethanol production in Brazil*. Appl Microbiol Biotechnol, 2011. **91**(5): p. 1267-75.
8. Goffeau, A., et al., *Life with 6000 genes*. Science, 1996. **274**(5287): p. 546, 563-7.
9. Montes de Oca, R., Salem, A.Z.M., 2Kholif, A.E., Monroy, H., Pérez, and Z. L.S., J.L. and Gutiérrez, A., *YEAST: DESCRIPTION AND STRUCTURE*, in *YEAST ADDITIVE AND ANIMAL PRODUCTION*. 2016, Publisher: PubBioMed
10. FLEET, G.H., *The yeasts: yeast organelles, in Cell Walls*. 1991, Academic Press: London.
11. Kogan, G. and A. Kocher, *Role of yeast cell wall polysaccharides in pig nutrition and health protection*. Livestock Science, 2007. **109**(1): p. 161-165.
12. LODISH, H.e.a., *Biologia celular e molecular*. Vol. 7. ed. 2014.
13. Mohammed, I., *Gene expression profile of ethanol-stressed yeast in the presence of acetaldehyde*. 2007, Victoria University Australia.
14. Lima, U.d.A., L.C. Basso, and H.V.d. Amorim, *Produção de Etanol*, in *Biotecnologia industrial*. 2001, EDGARD BLUCHER: São Paulo, SP.
15. Albers, E., et al., *Selective suppression of bacterial contaminants by process conditions during lignocellulose based yeast fermentations*. Biotechnology for Biofuels, 2011. **4**: p. 59-59.
16. Cabrini, K.T. and C.R. Gallo, *IDENTIFICAÇÃO DE LEVEDURAS NO PROCESSO DE FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA EM USINA DO ESTADO DE SÃO PAULO, BRASIL*. Scientia Agricola, 1999. **56**: p. 207-216.
17. Brexo, R.P. and A.S. Sant'Ana, *Microbial interactions during sugar cane must fermentation for bioethanol production: does quorum sensing play a role?* Crit Rev Biotechnol, 2018. **38**(2): p. 231-244.
18. Schuller, D., et al., *Survey of molecular methods for the typing of wine yeast strains*. FEMS Microbiology Letters, 2004. **231**(1): p. 19-26.
19. Stewart, G.G. and I. Russell, *Biochemistry and genetics of carbohydrate utilization by industrial yeast strains*, in *Pure and Applied Chemistry*. 1987. p. 1493.
20. Argueso, J.L., et al., *Genome structure of a Saccharomyces cerevisiae strain widely used in bioethanol production*. Genome Res, 2009. **19**(12): p. 2258-70.
21. Dias, M.O.d.S., et al., *Sugarcane processing for ethanol and sugar in Brazil*. Environmental Development, 2015. **Volume 15**: p. Pages 35-51.



22. O.Basso, T., et al., *Engineering topology and kinetics of sucrose metabolism in Saccharomyces cerevisiae for improved ethanol yield*. Metabolic Engineering, 2011. **Volume 13**(Issue 6): p. 694-703.
23. 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, 2005. **22**(2): p. 177.
24. Cartwright, C.P., et al., *Ethanol Dissipates the Proton-motive Force across the Plasma Membrane of Saccharomyces cerevisiae*. Microbiology, 1986. **132**(2): p. 369-377.
25. Miki, B.L., et al., *Possible mechanism for flocculation interactions governed by gene FLO1 in Saccharomyces cerevisiae*. Journal of Bacteriology, 1982. **150**(2): p. 878-889.
26. Nonklang, S., et al., *Construction of Flocculent Kluyveromyces marxianus Strains Suitable for High-Temperature Ethanol Fermentation*. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2009. **73**(5): p. 1090-1095.
27. Claro, F.B., K. Rijsbrack, and E.V. Soares, *Flocculation onset in Saccharomyces cerevisiae: effect of ethanol, heat and osmotic stress*. Journal of Applied Microbiology, 2006. **102**(3): p. 693-700.
28. Gibbons William, R. and A. Westby Carl, *Effects of sodium meta bisulfite on diffusion fermentation of fodder beets for fuel ethanol production*. Biotechnology and Bioengineering, 1987. **30**(7): p. 909-916.
29. Izawa, S., et al., *Vacuolar morphology of Saccharomyces cerevisiae during the process of wine making and Japanese sake brewing*. Applied Microbiology and Biotechnology, 2010(Issue 1): p. 277-282.
30. Martini, S., et al., *In vivo 13C-NMR and modelling study of metabolic yield response to ethanol stress in a wild-type strain of Saccharomyces cerevisiae*. FEBS Letters, 2004. **564**(1-2): p. 63-68.
31. Hallsworth, J.E., *Ethanol-induced water stress in yeast*. Journal of Fermentation and Bioengineering, 1998. **85**(2): p. 125-137.
32. Atfield, P.V., *Stress tolerance: The key to effective strains of industrial baker's yeast*. Nature Biotechnology, 1997. **15**: p. 1351.
33. Lafon-Lafourcade, S., E. Carre, and P. Ribéreau-Gayon, *Occurrence of Lactic Acid Bacteria During the Different Stages of Vinification and Conservation of Wines*. Applied and Environmental Microbiology, 1983. **46**(4): p. 874-880.
34. Nagodawithana, T.W., C. Castellano, and K.H. Steinkraus, *Effect of Dissolved Oxygen, Temperature, Initial Cell Count, and Sugar Concentration on the Viability of Saccharomyces cerevisiae in Rapid Fermentations*. Applied Microbiology, 1974. **28**(3): p. 383-391.
35. Abdel-Banat, B.M.A., et al., *High-temperature fermentation: how can processes for ethanol production at high temperatures become superior to the traditional process using mesophilic yeast?* Appl Microbiol Biotechnol, 2010. **85**(4).
36. Estruch, F., *Stress-controlled transcription factors, stress-induced genes and stress tolerance in budding yeast*. FEMS Microbiology Reviews 2000. **24**(4).
37. Laluece, C., C. Palmieri Mauricio, and C. Lopes da Cruz Rose, *Growth and fermentation characteristics of new selected strains of Saccharomyces at high temperatures and high cell densities*. Biotechnology and Bioengineering, 1991. **37**(6): p. 528-536.
38. Rep, M., et al., *The Transcriptional Response of Saccharomyces cerevisiae to Osmotic Shock*. THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, 2000. **275**.
39. Gomar-Alba, M., E. Jiménez-Martí, and M. del Olmo, *The Saccharomyces cerevisiae Hot1p regulated gene YHR087W (HGI1) has a role in translation upon high glucose concentration stress*. BMC Molecular Biology, 2012. **13**(1): p. 19.
40. Lei, J., et al., *Ethanol tolerance and the variation of plasma membrane composition of yeast floc populations with different size distribution*. Journal of Biotechnology, 2007. **131**(3): p. 270-275.

41. Gonzalez, C.I. and C.E. Martin, *Fatty Acid-responsive Control of mRNA Stability: UNSATURATED FATTY ACID-INDUCED DEGRADATION OF THE SACCHAROMYCES OLE1 TRANSCRIPT*. Journal of Biological Chemistry, 1996. **271**(42): p. 25801-25809.
42. GENOME, Y. *Saccharomyces genome data base*. 2016 [cited 2016 01 maio ]; Available from: <http://www.yeastgenome.org>.
43. Stukey, J.E., V.M. McDonough, and C.E. Martin, *Isolation and characterization of OLE1, a gene affecting fatty acid desaturation from Saccharomyces cerevisiae*. Journal of Biological Chemistry, 1989. **264**(28): p. 16537-16544.
44. Haslbeck, M., et al., *Hsp26: a temperature-regulated chaperone*. The EMBO Journal, 1999. **18**(23): p. 6744-6751.
45. Xue, Y., et al., *Yeast heat-shock protein gene HSP26 enhances freezing tolerance in Arabidopsis*. Journal of Plant Physiology, 2009. **166**(8): p. 844-850.
46. Carvalho-Netto, O.V., et al., *A simple and effective set of PCR-based molecular markers for the monitoring of the Saccharomyces cerevisiae cell population during bioethanol fermentation*. J Biotechnol, 2013. **168**(4): p. 701-9.
47. Barros, E.M., et al., *A yeast isolated from cashew apple juice and its ability to produce first- and second-generation ethanol*. Appl Biochem Biotechnol, 2014. **174**(8): p. 2762-76.
48. Mukherjee, V., et al., *Phenotypic landscape of non-conventional yeast species for different stress tolerance traits desirable in bioethanol fermentation*. Biotechnology for Biofuels, 2017. **10**: p. 216.
49. Limtong, S., C. Sringiew, and W. Yongmanitchai, *Production of fuel ethanol at high temperature from sugar cane juice by a newly isolated Kluyveromyces marxianus*. Biore-source Technology, 2007.
50. Reis, V.R., et al., *Characteristics of Saccharomyces cerevisiae yeasts exhibiting rough colonies and pseudohyphal morphology with respect to alcoholic fermentation*. Brazilian Journal of Microbiology, 2013. **44**(4): p. 1121-1131.
51. Yalcin, S.K. and Z. Yesim Ozbas, *Effects of pH and temperature on growth and glycerol production kinetics of two indigenous wine strains of Saccharomyces cerevisiae from Turkey*. Brazilian Journal of Microbiology, 2008. **39**(2): p. 325-332.
52. Alexandre, H., V. Ansanay-Galeote, and S.D.B. Blondin, *Global gene expression during short-term ethanol stress in Saccharomyces cerevisiae*. FEBS Letters, 2001. **498**(1).
53. Abdel-Banat, B.M., et al., *High-temperature fermentation: how can processes for ethanol production at high temperatures become superior to the traditional process using mesophilic yeast?* Appl Microbiol Biotechnol, 2010. **85**(4): p. 861-7.
54. Leach, M.D. and L.E. Cowen, *Membrane Fluidity and Temperature Sensing Are Coupled via Circuitry Comprised of Ole1, Rsp5, and Hsf1 in Candida albicans*. Eukaryotic Cell, 2014. **13**(8): p. 1077-1084.

## 8. ANEXOS

**Anexo 1. Curva de calibração – massa seca****Anexo 2. Curva de calibração glicose**

**Anexo 3.** Artigo publicado - 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.

ARTICLE IN PRESS

Fungal Biology xxx (2018) 1–9



Contents lists available at ScienceDirect

Fungal Biology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/funbio](http://www.elsevier.com/locate/funbio)



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>

<sup>a</sup> Department of Genetics and Evolution, Health and Biological Sciences Center, Federal University of São Carlos, Brazil

<sup>b</sup> Department of Biochemistry, Chemistry Institute, Federal University of Rio de Janeiro, Brazil

<sup>c</sup> Department of Molecular Biology and Biotechnology, Center for Biotechnology of Federal University of Rio Grande do Sul, Federal University of Rio Grande do Sul, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 28 October 2017

Received in revised form

7 December 2017

Accepted 9 December 2017

Available online xxx

Corresponding Editor: Drauzio E.N Rangel

Keywords:

Ethanol production

Genetic modification

*Saccharomyces cerevisiae*

Thermotolerant yeast

ABSTRACT

In Brazil, bioethanol is produced by sucrose fermentation from sugarcane by *Saccharomyces cerevisiae* in a fed-batch process that uses high density of yeast cells (15–25 % of wet weight/v) and high sugar concentration (18–22 % of total sugars). Several research efforts have been employed to improve the efficiency of this process through the isolation of yeasts better adapted to the Brazilian fermentation conditions. Two important wild strains named CAT-1 and PE-2 were isolated during the fermentation process and were responsible for almost 60 % of the total ethanol production in Brazil. However, in the last decade the fermentative substrate composition was much modified, since new sugar cane crops were developed, the use of molasses instead of sugar cane juice increase and with the prohibition of burning of sugarcane prior harvest. As consequence, these previously isolated strains are being replaced by new wild yeasts in most of ethanol plants. In this new scenario the isolation of novel better adapted yeasts with improved fermentative characteristics is still a big challenge. Here, we discuss the main aspects of Brazilian ethanol production and the efforts for the selection, characterization and genetic modifications of new strains with important phenotypic traits such as thermotolerance.

© 2017 British Mycological Society. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

1.1. A history of Brazilian ethanol production

The independence on petroleum-based fossil fuel is a big challenge to be overcome, since the continuous increase in demand of oil in the last decades is making it increasingly scarce. Besides, fossil fuel is one of the main sources of greenhouse gases since its use for energy implicates the release of massive amounts of CO<sub>2</sub>, being damaging to the environment and to life. For this reason, bioethanol

became very important for worldwide economy, since it emerged as a renewable and environmentally friendly source of energy (Cunha, Missawa et al. 2006; Solomon 2010; Basso, Basso et al. 2011; Della-Bianca & Gombert 2013) with steadily rising production that will probably reach 26 billion of liters in 2017 (source: [www.novacana.com](http://www.novacana.com)).

In 1905, ethanol was first tested as fuel for vehicles; however, governmental investments in technology were necessary to make its production viable and competitive over gasoline. In Brazil, when oil crisis tripled oil import costs at the beginning of 70's, Brazilian government launched the Brazilian Program for Alcohol Fuel (Proalcool), that offered a financial plan in which an increase in area for sugarcane plantations and the construction of new mills for its processing. This program encouraged the production of ethanol from sugarcane and established a law that demanded the blend of 20 % of ethanol content with gasoline in Brazil (Wheals, Basso et al.

\* Corresponding author. Laboratório de Bioquímica e Genética Aplicada Departamento de Genética e Evolução, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos, Rodovia Washington Luis, km 235 - SP-310, São Carlos, São Paulo, CEP 13565-905, Brazil.  
E-mail address: [anderf2611@gmail.com](mailto:anderf2611@gmail.com) (A. Ferreira da Cunha).

<https://doi.org/10.1016/j.funbio.2017.12.006>

1878-6146/© 2017 British Mycological Society. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

Please cite this article in press as: Paulino de Souza, J., 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 (2018), <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2017.12.006>