

Universidade Federal de São Carlos
Centro de Ciências Exatas e Tecnologia
Programa de Pós-graduação em Biotecnologia

“Seleção e evolução dirigida de leveduras para a utilização nas indústrias do bioetanol e cervejeiras”.

Aluno: Gustavo Patricio Lorca Mandujano

Orientador: Dr. Anderson Ferreira da Cunha

Co-Orientadora: Dra. Cristina Paiva de Sousa

Bolsista OEA-PAEC

São Carlos

2019

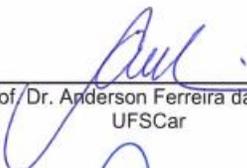


UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

Folha de Aprovação

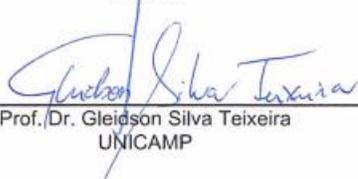
Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado do candidato Gustavo Patricio Lorca Mandujano, realizada em 20/02/2018:



Prof. Dr. Anderson Ferreira da Cunha
UFSCar



Prof. Dr. Euclides Matheucci Junior
UFSCar



Prof. Dr. Gleidson Silva Teixeira
UNICAMP

Agradecimentos

Ao orientador desta dissertação, Doutor Anderson Ferreira da Cunha, pela disponibilidade, apoio e interesse que demonstrou na pesquisa, também pela paciência.

À co-orientadora Doutora Cristina Paiva de Sousa, pela sua apoio em todo o decorrer do trabalho.

À todos os colegas do laboratório LGBA que de uma forma direta ou indireta, contribuíram, ou auxiliaram na elaboração do presente estudo, minha gratidão pela paciência em entender meu português (portunhol).

Agradeço aos professores envolvidos na avaliação deste trabalho pela disponibilidade, e aos professores que contribuíram e disponibilizaram seus equipes para dar continuidade a nosso trabalho.

Ao Departamento de Genética e Evolução e ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia.

À Universidade Federal de São Carlos por proporcionar meios para a realização desse trabalho.

À CAPES, OEA-PAEC, e FAPESP pelo apoio financeiro.

Resumo

As indústrias de produtos fermentados vêm demandando alternativas para o aumento de rendimentos produtivos e redução dos custos de fermentação. Neste contexto, a técnica conhecida como evolução adaptativa se torna uma excelente ferramenta para desenvolver diferentes fenótipos de leveduras para processos fermentativos. Nosso grupo de pesquisa vem desenvolvendo desde 2009 um projeto focado no isolamento de leveduras obtidas desde indústrias brasileiras de bioetanol, obtendo um banco que atinge 289 isolados. O desafio deste trabalho está focado na utilização deste banco para a identificação de cepas com características de interesse em duas indústrias: cerveja e bioetanol.

Com relação a produção de cerveja, conseguimos identificar até o momento 64 leveduras com a capacidade de crescimento em maltose, indicando um resultado promissor para a evolução destas linhagens com aplicação na produção industrial de cervejas. As duas linhagens, LGBA-287 e LGBA-288, com maior capacidade de consumo de maltose foram utilizadas em experimentos fermentativos e quando comparadas com uma linhagem industrial mostraram-se semelhantes quanto a capacidade fermentativa. As análises da rota de produção de 4-vinilguayacol (4-VG) dada pela expressão dos genes PAD1 e FDC1 e complementado com degustação de cerveja permitiram demonstrar que existem possibilidades de obter cervejas com complexidade aromática utilizando leveduras isoladas desde bioetanol. O desenvolvimento dessas linhagens poderá ter uma aplicação direta em processos fermentativos visando uma melhor qualidade do produto.

Já no caso do bioetanol, foram testadas: uma linhagem termotolerante isolada (LGBA-01); a levedura comercial CAT-1; um fenótipo evoluído de CAT-1 (CATEV, evoluída em condições multi-estresse). Estudo das vias metabólicas envolvidas na fermentação de açúcares redutores obtidos pela utilização de sacarose foram realizados e indicaram que a linhagem evoluída apresentou: (I) modificações significativas na expressão de genes tais como: produção de glicerol (GPD1 e GPD2) e etanol (ADH1); (II) Sinais de desvio de rotas metabólicas pela expressão de genes tais como: GPD1, GPD2, ADH1, ALD4, ADR1, AGT1, MAL31, ACS2, SUC2 e SNF1. A expressão desses genes revelou que CATEV apresentou compensações (*Trade-off*) associadas ao processo de evolução adaptativa em resposta a condições desfavoráveis. Nas análises de produção de etanol e produtos secundários de fermentação por HPLC, LGBA-01 e CATEV mostraram-se muito promissoras quando fermentadas em altas temperaturas. Finalmente, nossos resultados poderiam contribuir tanto na indústria quanto na comunidade científica.

Sumário

1	Introdução.....	1
1.1	Contexto histórico	1
1.2	Leveduras	2
1.2.1	Domesticação em leveduras.....	3
1.2.2	Técnicas de evolução em leveduras industriais	5
1.3	Bioquímica da fermentação alcoólica.....	7
1.4	Transporte de açúcares através da membrana plasmática	11
1.5	Relação dos desafios da indústria com as implicações biológicas em leveduras	14
1.5.1	Bioetanol	14
1.5.2	Cerveja.....	15
1.6	Desafios do trabalho.....	15
2	Objetivos do projeto	17
2.1	Objetivo geral	17
2.2	Objetivos específicos	17
3	Material e métodos.....	18
3.1	Identificação das linhagens de leveduras com potencial utilização para a indústria cervejeira.	18
3.1.1	Linhagens de leveduras	18
3.1.2	Identificação do gênero <i>Saccharomyces</i>	18
3.1.3	Crescimento em placas de Petri- <i>Dropout</i>	19
3.1.4	Testes de crescimento em maltose e extrato de malte em meio sólido.....	19
3.1.5	Processo de análises e seleção de leveduras	19
3.1.6	Identificação molecular para caracterização individual das linhagens isoladas e classificação quanto a espécie.....	20
3.1.7	Testes de crescimento e fermentativos comparativos utilizando maltose	21
3.1.8	Produção de cervejas e testes sensoriais.....	21
3.2	Utilização de leveduras na fermentação do bioetanol	22
3.2.1	Evolução adaptativa para fixação de características de interesse industrial para a produção de bioetanol.	22
3.2.2	Testes de fermentação em leveduras para bioetanol.....	23
3.2.3	Fermentação em altas temperaturas e altas concentrações de açúcares	26

3.3	Análise da expressão gênica por qPCR em linhagens de leveduras para a produção de cervejas e bioetanol.	26
3.3.1	Extração de RNA, síntese do cDNA e análise por PCR quantitativo (q-PCR)	30
3.3.2	Análise da expressão gênica.	30
4	Resultados e discussão.....	32
4.1	Identificação das linhagens de leveduras com potencial utilização para a indústria cervejeira.	32
4.1.1	Testes de crescimento em maltose e extrato de malte	34
4.1.2	Identificação molecular para caracterização individual das linhagens isoladas e classificação quanto a espécie.....	35
4.1.3	Testes de crescimento e fermentativos comparativos utilizando maltose	37
4.1.4	Produção de cervejas e testes sensoriais.....	39
4.1.5	Análise da expressão genética no processo de produção de cervejas.....	41
4.2	Testes de fermentação em Bioetanol.....	45
4.3	Produção de bioetanol em Biorreator	54
5	Conclusões	57
6	Perspectivas futuras	58
7	Referência bibliográfica.....	59

Listado de ilustrações

Figura 1. Representação gráfica do grupo <i>Saccharomyces sensu stricto</i>	3
Figura 2. Árvore filogenética de máxima verossimilhança de cepas de <i>S. cerevisiae</i> sequenciadas e usando <i>Saccharomyces paradoxus</i> como um grupo externo.	4
Figura 3. Exemplos de estratégias de evolução dirigida em leveduras para obtenção de fenótipos evoluídos com possíveis mudanças genéticas depois da estratégia usada	7
Figura 4. Rotas metabólicas alternativas após glicólise.....	8
Figura 5. Principais vias envolvidas no desvio de rotas metabólicas durante a utilização de glicose como fonte de carbono para a produção de etanol.....	9
Figura 6. Representação das vias de utilização de açúcares em <i>S. cerevisiae</i>	13
Figura 7. Detalhamento da metodologia a ser utilizada para a evolução adaptativa em leveduras para utilização na fabricação de bioetanol.....	25
Figura 8. Principais vias envolvidas no desvio de rotas metabólicas durante a utilização de glicose como fonte de Carbono	28
Figura 9. Exemplos de leveduras <i>Saccharomyces cerevisiae</i> comerciais usadas em cerveja e testadas em meio YCB acrescido de Lisina	32
Figura 10. <i>Heat map</i> gerado após processamento das imagens das leveduras cultivadas em placas YCB-Lisine.....	33
Figura 11. <i>Heat map</i> de leveduras cultivadas em maltose (YPM 2%) a 20 e 30°C	34
Figura 12. Testes em meio extrato de malte (YPEM 2%).....	35
Figura 13. Exemplo de eletroforese em gel de agarose obtido para conferir o gênero <i>Saccharomyces</i>	36
Figura 14. Exemplo de eletroforese em gel de agarose da reação enzimática com <i>HaeIII</i> para conferir espécies <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	37
Figura 15. Exemplo de crescimento de linhagens isolados em duas fontes de carbono diferentes .	38
Figura 16. Exemplo de leveduras que consomem maltose testadas em micro- fermentações (12% YPM).....	38
Figura 17. Fermentação para produção de cerveja em escala de laboratório.....	39
Figura 18. <i>Heat map</i> da expressão relativa de genes relacionados a eficiência fermentativa na produção de cerveja.....	42
Figura 19. Resultados de consumo de ART em micro-fermentações	46
Figura 20. Fermentações a 40°C em 20% YPD ou 20% YPS nos ciclos 1, 2, 3 e 4	47
Figura 21. Expressão do gene SUC2 na presença ou ausência de glicose.....	51
Figura 22. <i>Heat map</i> da expressão relativa de genes relacionados a eficiência fermentativa na produção de bioetanol	53
Figura 23. Análise da expressão gênica de OLE1 nas diferentes condições de fermentação	55
Figura 24. Análise da expressão gênica de genes relacionados a eficiência fermentativa nas diferentes condições de temperatura	56
Figura 25. Detalhamento da metodologia a ser utilizada para a evolução dirigida em leveduras para utilização na fabricação de cervejas	67
Figura 26. Fermentações a 30°C das leveduras termotolerantes LGBA-01 e CAT-1.	68
Figura 27. Fermentações a 40°C das leveduras termotolerantes LGBA-01 e CAT-1.	69
Figura 28. Densidade celular de LGBA-01 e CAT-1 a 30 e 40 °C.....	70
Figura 29. Testes comparativos de fermentações em bioetanol.....	72

Figura 30. Testes comparativos de fermentações em bioetanol.....	73
Figura 31. Biorreator após produção de biomassa.....	74

Listado de tabelas

Tabela 1. Aplicações de engenharia evolutiva.....	6
Tabela 2. Metabólitos secundários da fermentação alcoólica.	10
Tabela 3. Amostras de fermentações para análise da expressão gênica	27
Tabela 4. Lista dos genes utilizados no análise da expressão gênica.....	31
Tabela 5. Parâmetros físico-químicos obtidos na fermentação de cerveja	40
Tabela 6. Descrição de aromas e sabores nas cervejas geradas	41
Tabela 7. Fenótipos evoluídos para fermentação em bioetanol.	45
Tabela 8. Parâmetros físico-químicos obtidos na fermentação de bioetanol com a linhagem CAT-1 sem evoluir.....	48
Tabela 9. Parâmetros físico-químicos obtidos na fermentação de bioetanol com a linhagem LGBA-01	49
Tabela 10. Parâmetros físico-químicos obtidos na fermentação de bioetanol com a o fenótipo evoluído CATEV (CAT-1 evoluída).....	49
Tabela 11. Parâmetros físico-químicos obtidos no controle negativo da fermentação	49
Tabela 12. Análise das características fermentativas da linhagem LGBA-01 sob fermentações conduzidas a 30 e 40°C	54
Tabela 13. Expressão relativa de genes em fermentação de cerveja.	65
Tabela 14. Expressão relativa de genes em fermentação de bioetanol.	66
Tabela 15. Quantidade de biomassa húmida produzida	75

1 Introdução

1.1 Contexto histórico

Do ponto de vista histórico, há um relacionamento direto e muito antigo entre os seres humanos com o processo de fermentação e seu produto final, o álcool. De fato, essa história remonta-se a muito tempo antes da agricultura, de antigos rituais e das origens das culturas atuais. (DUDLEY, 2000).

Há milhões de anos, os primatas ancestrais comiam frutas fermentadas no chão da floresta, as quais teriam três características atraentes: (I) Cheiro forte e distinto que facilita a localização da fruta; (II) Facilidade para digerir, permitindo que os animais conseguissem mais calorias; (III) Qualidades antissépticas. Esses primatas desenvolveram então uma mutação genética crítica que ocorreu há pelo menos 10 milhões de anos atrás, essa mudança foi no gene *ADH4* criando uma enzima, chamada álcool desidrogenase classe IV, que tornou possível digerir álcool até 40 vezes mais rápido, tudo isso provavelmente fez a diferença em nossa evolução (CARRIGAN *et al.*, 2015; DUDLEY, 2000, 2002).

Mais tarde, uma vez que desenvolvemos a habilidade de controlar a produção em larga escala, as fermentações tornaram-se parte de nossa vida. Foi assim que os seres humanos exploraram a capacidade das leveduras de converter açúcares em etanol e compostos de sabor desejáveis para obter alimentos e bebidas com vida útil prolongada, características sensoriais diferentes, assim como provocar alguns efeitos no corpo humano através do consumo de álcool (STEENSELS; VERSTREPEN, 2014).

Com o passar do tempo, alguns cervejeiros, enólogos e padeiros, já tinham começado a reutilizar uma porção de fermento em matérias primas para o estabelecimento de fermentações rápidas e mais previsíveis. Depois, os trabalhos de Pasteur e Hansen no século XIX acrescentaram os conhecimentos no uso de cultivos puros de leveduras. O uso de cultivos era chamado "*backslopping*", e este termo pode ser equivalente à inoculação de uma biomassa de fermento reutilizado. Com o uso contínuo do fermento em ambientes controlados pelo homem e por estarem distantes de competição na natureza, criou-se um cenário perfeito para a domesticação de leveduras em diferentes setores industriais (GALLONE *et al.*, 2016).

Nesse sentido, considerando o anteriormente dito, é importante dar continuidade as pesquisas para aperfeiçoar ainda mais a obtenção de produtos fermentados e assim conseguir inovações usando como base as leveduras, microrganismos de grande importância nos processos fermentativos.

1.2 Leveduras

As leveduras são microrganismos eucarióticos, unicelulares, classificados como membros do reino dos fungos, as quais se reproduzem por brotamento ou fissão (fase assexual) e podem ou não formar esporos durante a fase sexual. Atualmente, mais de 1.500 espécies estão identificadas, essa diversidade filogenética de leveduras é demonstrada pela sua localização em dois filos distintos: Ascomycota e Basidiomycota. Dentro dessas classificação, as leveduras são reagrupadas em ordem: Subfilo, Classe, Ordem famílias, subfamílias (não em todos os casos), gêneros, espécies e linhagens (KURTZMAN; FELL; BOEKHOUT, 2011; MESAS; ALEGRE, 1999). Um dos gêneros mais estudados é *Saccharomyces*, do filo Ascomycota, especificamente os pesquisadores focaram seus esforços num grupo (clado) também chamado como *Saccharomyces sensu stricto* (BORNEMAN; PRETORIUS, 2015).

O grupo *Saccharomyces sensu stricto* engloba pelo menos sete espécies distintas com origens próximas, por volta de 10-20 milhões de anos atrás (KELLIS *et al.*, 2003). Deste grupo, os membros basais são as espécies *Saccharomyces uvarum* e *S. eubayanus*, enquanto a divisão entre *S. paradoxus* e *S. cerevisiae* são a mais recente (Figura 1).

Os membros deste grupo *S. sensu stricto* vão desde as espécies industriais e laboratoriais, chamadas *Saccharomyces cerevisiae*, até aquelas que, até hoje, são encontradas em áreas ambientais e geograficamente limitadas. No entanto, todos os membros compartilham os atributos comuns de facilidade de propagação de laboratório, tempos de geração curtos e tamanhos relativamente pequenos de genoma que os tornam atraentes para estudos genômicos evolutivos e funcionais. Isso resultou em uma riqueza de informações incomparável sobre os genomas dessas leveduras e uma estrutura para a investigação comparativa (BORNEMAN; PRETORIUS, 2015).

A espécie *S. cerevisiae* é uma das leveduras de maior importância, devido a sua associação história com atividades humanas tais como fabricação de cerveja, panificação e vinificação. Além de seu papel industrial, por meio de sua biologia eucariótica, facilidade de propagação e genética bem definida, *S. cerevisiae* representa um dos sistemas de modelo biológico mais intensamente estudados, e atualmente sua sequência genética está completamente disponível (GOFFEAU *et al.*, 1996). A riqueza desses dados genômicos estão fornecendo informações sem precedentes sobre os

processos no nível biológico que impulsionaram a especiação e a evolução, tanto no ambiente natural quanto em resposta a forças seletivas conduzidas pelo homem durante a domesticação histórica das leveduras levando a melhor compreensão de processos industriais tais como a produção de bioetanol usado como combustível.

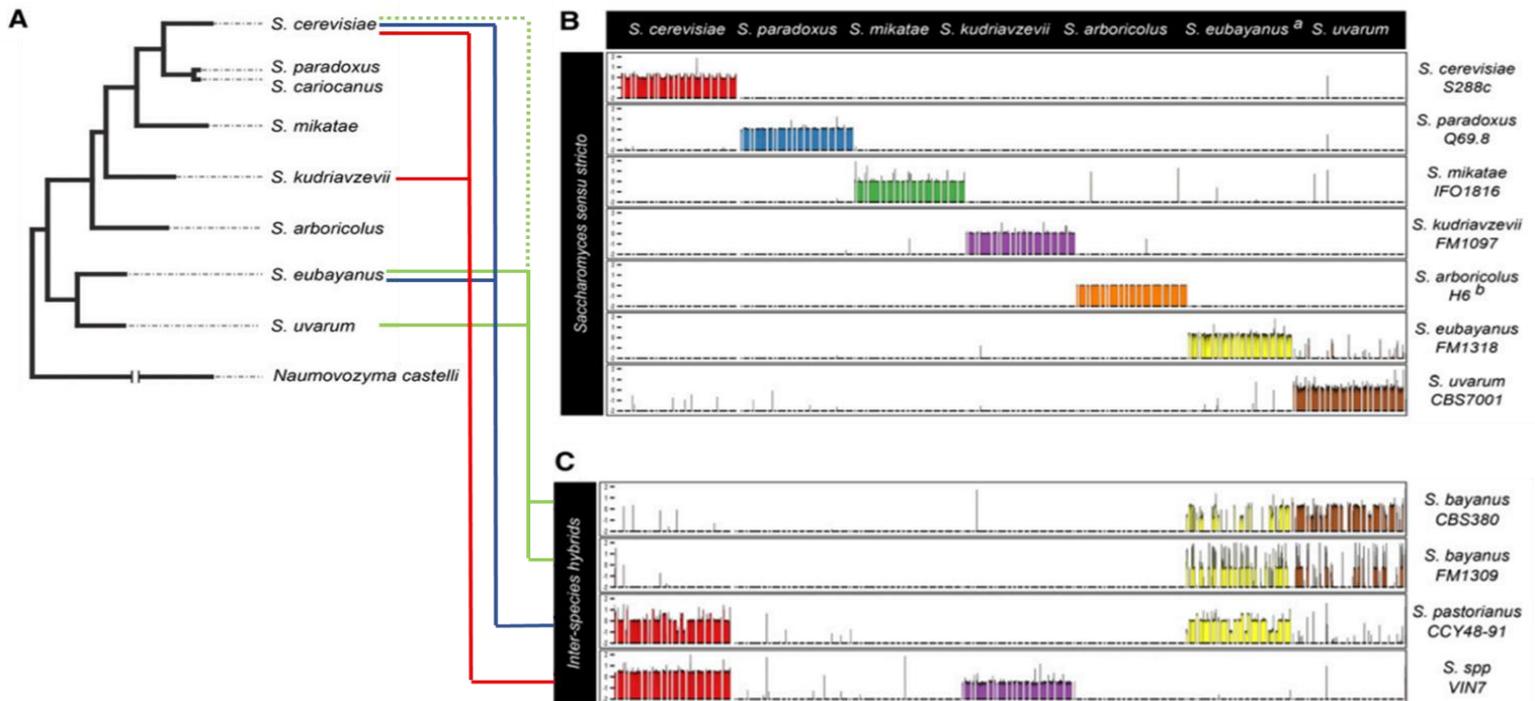


Figura 1. Representação gráfica do grupo *Saccharomyces sensu stricto*. A. Estrutura filogenética de *S. sensu stricto*; B. Representação genômica do grupo *S. sensu stricto*; C. Representação genômica dos híbridos inespecíficos formados. Fonte: BORNEMAN; PRETORIUS, 2015.

1.2.1 Domesticação em leveduras

A domesticação é definida como um processo de seleção de organismos vivos visando a obtenção de variantes, que quando cultivadas sob determinadas condições podem prosperar melhor que as não adaptadas. Alguns dos sinais moleculares de domesticação de leveduras são: (I) deleções no genoma; (II) poliploidia; (III) rearranjos cromossômicos; (IV) duplicações gênicas e (V) fenótipos específicos resultantes da seleção (DRISCOLL; MACDONALD; O'BRIEN, 2009).

Nos últimos anos, vários estudos vêm investigando os mecanismos moleculares que levam a evolução e adaptação de diversas cepas de leveduras da espécie *S. cerevisiae*, que indicaram um mecanismo bastante complexo. No entanto, a maioria destes estudos usaram variantes de leveduras haploides em vez de cepas naturais e também excluíram as cepas industriais, tais como

as leveduras de cerveja, bioetanol e de outros nichos industriais (ALMEIDA *et al.*, 2015; LITI *et al.*, 2009; STROPE *et al.*, 2015).

No ano 2016, Gallone e colaboradores, usando técnicas de sequenciamento de última geração e fenotipagem, estudaram 157 cepas de *S. cerevisiae* usadas para a produção industrial de cerveja, vinho, pão, destilados, saquê e bioetanol, em sua ploidia natural. Os resultados revelaram que as leveduras industriais são geneticamente e fenotipicamente distintas das linhagens selvagens e derivam apenas de um conjunto limitado de linhagens ancestrais adaptadas em ambientes criados pelo homem (Figura 2).

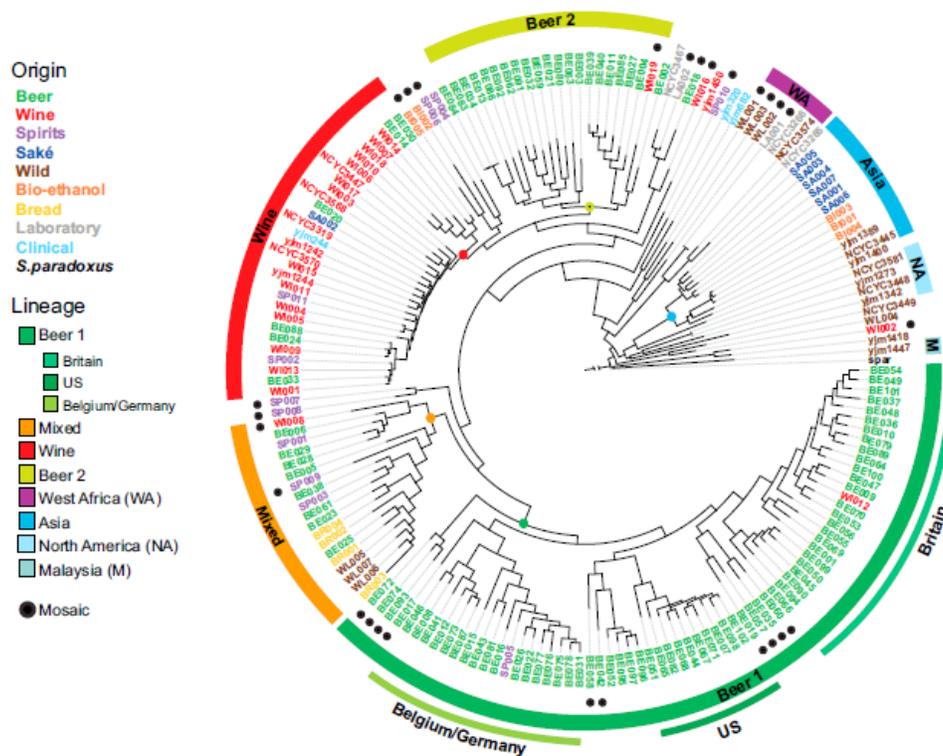


Figura 2. Árvore filogenética de máxima verossimilhança de cepas de *S. cerevisiae* sequenciadas e usando *Saccharomyces paradoxus* como um grupo externo. Fonte: GALLONE *et al.*, 2016.

Na Figura 2 é possível identificar cinco subgrupos principais: Leveduras asiáticas, leveduras de vinho, Subgrupo misto (pão e outras), e duas famílias separadas de leveduras de cerveja. Além disso, os estudos indicaram que a seleção específica da indústria favoreceu adaptações especializadas em leveduras de cerveja mas também levou a mudanças do seu genoma, aneuploidia e perda de um ciclo sexual funcional. Os autores discutem que a mudança para ambientes muito menos complexos e hostis que os encontrados em seu habitat natural e a disponibilidade facilitada

de nutrientes foram fatores fundamentais a esse processo. Um dado importante neste estudo foi a observação de que o estado de domesticação das linhagens produtoras de cerveja é bastante elevado, sugerindo que as modificações para melhoria das características destas cepas está próxima de seu limite máximo. No entanto, leveduras utilizadas na produção de bioetanol e bebidas destiladas, apresentaram poucas alterações genéticas relacionadas a domesticação, o que abre um importante horizonte para a evolução destas cepas para outras aplicações, como por exemplo, na indústria cervejeira (GALLONE *et al.*, 2016).

1.2.2 Técnicas de evolução em leveduras industriais

Para obtenção de novas linhagens, um grande número de estudos concentraram-se no melhoramento da capacidade de leveduras através da engenharia metabólica que foi definida como "a melhoria das atividades celulares pela manipulação das funções celulares com o uso de tecnologia de DNA recombinante" (BAILEY, 1991; BAILEY *et al.*, 1996).

Diversas aplicações da engenharia metabólica tem sido muito bem sucedidas, estabelecendo melhorias importantes em diversos organismos. Na área de desenvolvimento de microrganismos, estes trabalhos visam principalmente a obtenção de características que possam atender as diferentes demandas das indústrias. Usando esta estratégia, leveduras geneticamente modificadas vem sendo utilizadas com sucesso em diversos processos como: (I) Aumento do metabolismo de xilose em *S. cerevisiae* para a geração de etanol de segunda geração (DOS SANTOS *et al.*, 2016); (II) Aumento da produção de glicerol em leveduras para vinhos (DE BARROS LOPES *et al.*, 2000); (III) Engenharia metabólica em leveduras para produção de ácido láctico (ILMÉN *et al.*, 2013). No entanto, apesar de bem sucedida, esta técnica apresenta algumas limitações que estão intimamente associadas a: (I) Exigência de ampla informação bioquímica e genética sobre o metabolismo, fatores regulatórios, enzimas envolvidas e sua cinética nos organismos a serem modificados; (II) complexidade das respostas fisiológicas celulares destes microrganismos após estas modificações; (III) Dificuldades de clonagem e modificações em linhagens selvagens, principalmente decorrentes de sua complexidade genética, como a poliploidia e também por (IV) Questões regulatórias, como a restrição ao uso de organismos geneticamente modificados (OGMs) na indústria de alimentos (BAILEY, 1991; BAILEY *et al.*, 1996). Atualmente, as técnicas de seleção clonal, mutagênese aleatória, as hibridizações, e principalmente a engenharia evolutiva ou evolução adaptativa, vêm sendo consideradas boas alternativas para a geração de microrganismos com características melhoradas de interesse industrial (ÇAKAR *et al.*, 2012).

A evolução dirigida (ou adaptativa) é uma estratégia complementar de melhoria de linhagens, que explora a plasticidade dos genomas sob diferentes condições de interesse visando selecionar características industrialmente relevantes (MANS; DARAN; PRONK, 2018; DRAGOSITS; MATTANOVICH, 2013; SAUER, 2001). Na Tabela 1 apresentam-se alguns exemplos de engenharia evolutiva aplicada especificamente a adaptação de linhagens de leveduras a diferentes condições ambientais e substratos.

Tabela 1. Aplicações de engenharia evolutiva

Aplicação	Referencias
Produção de Etanol usando xilose	KUYPER <i>et al.</i> , 2005; LIU; HU, 2010.
Melhoramento da resistência de compostos inibitórios da biomassa de lignocelulose.	TOMÁS-PEJÓ <i>et al.</i> , 2010; WRIGHT <i>et al.</i> , 2011.
Melhoramento da resistência multi-estresse.	ÇAKAR <i>et al.</i> , 2005.
Rápida utilização de glicerol.	HO <i>et al.</i> , 2017
Tolerância a altas temperaturas.	CASPETA <i>et al.</i> , 2014

Para leveduras, diferentes tipos de metodologias são utilizadas para que uma evolução eficiente seja alcançada. No entanto, todas elas trabalham com inoculação de leveduras com transferências seriadas em frascos de agitação simples, tubos, ou biorreatores automatizados em cultivos de batelada (*batch*), Batelada alimentada (*fed-batch*) ou batelada contínua. Essas abordagens são efetivas especialmente quando em cada novo ciclo de transferência se inoculam leveduras provindas de um cultivo em crescimento exponencial, enquanto se mantem uma pressão seletiva constante ou continuamente crescente. Esta transferência tende a selecionar linhagens com alterações em seu genótipo que promovem uma elevação da taxa de crescimento específico máxima (μ_{max}) e com isto gerar um melhoramento do *fitness* fermentativo da levedura para a condição de interesse (Figura 3) (MANS; DARAN; PRONK, 2018).

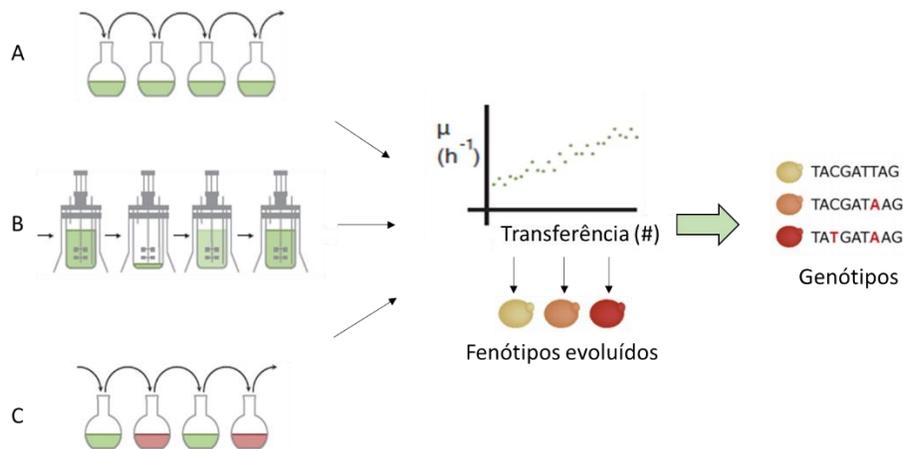


Figura 3. Exemplos de estratégias de evolução dirigida em leveduras para obtenção de fenótipos evoluídos com possíveis mudanças genéticas depois da estratégia usada. A. Transferência seriada; B. Transferência sequencial em biorreator; C. Transferência dinâmica de pressão seletiva. Fonte: MANS; DARAN; PRONK, 2018; TILLOY et al., 2015 (figura modificada).

1.3 Bioquímica da fermentação alcoólica

Como foi dito, para conseguir evoluir leveduras é preciso ter um amplo conhecimento das funções fisiológicas e bioquímica das leveduras, de fato, é importante compreender melhor a fermentação alcoólica e voltar a conceitos biológicos associados à decomposição de açúcares, também chamada glicólise. Essa via metabólica provavelmente se desenvolveu há cerca de 3,5 bilhões de anos, quando não havia oxigênio disponível no meio ambiente (NELSON, D. L. & COX, 2008).

Devido à sua importância, a glicólise foi a primeira via metabólica resolvida pelos bioquímicos elucidada por volta de 1940. Os cientistas que estudaram essa via enfrentaram um enorme desafio, pois descobriram quantas reações bioquímicas estavam envolvidas e a ordem em que essas reações ocorreram. Neste processo, uma única molécula de glicose (com seis átomos de carbono) é transformada em duas moléculas de ácido pirúvico (cada uma com três átomos de carbono), o primeiro grande passo da fermentação (ALBA-LOIS, L. & SEGAL-KISCHINEVZKY, C., 2010).

A via glicolítica completa, envolve uma sequência de reações químicas na qual duas moléculas de ATP e duas de NADH são produzidas como saldo energético final para cada molécula quebrada de glicose. O NADH, formado por uma reação redox é de extrema importância e age como portador de elétrons na glicólise. Essa molécula deve ser reconstituída para garantir a continuidade da via glicolítica. Quando o oxigênio está disponível (aerobiose), o ácido pirúvico entra em uma série de reações químicas, conhecidas como ciclo do ácido tricarboxílico, e prossegue para a cadeia

respiratória na mitocôndria, como resultado da respiração, as células produzem 38 moléculas de ATP para cada molécula de glicose oxidada. Na ausência de oxigênio (Anaerobiose), o ácido pirúvico pode seguir duas rotas diferentes no citoplasma, dependendo do tipo de célula, pode ser convertido em etanol (álcool) e dióxido de carbono (CO₂) através da fermentação alcoólica (Figura 3), ou pode ser convertido em lactato através da via de fermentação do ácido láctico (ALBA-LOIS, L. & SEGAL-KISCHINEVZKY, 2010; BARNETT, 2003).

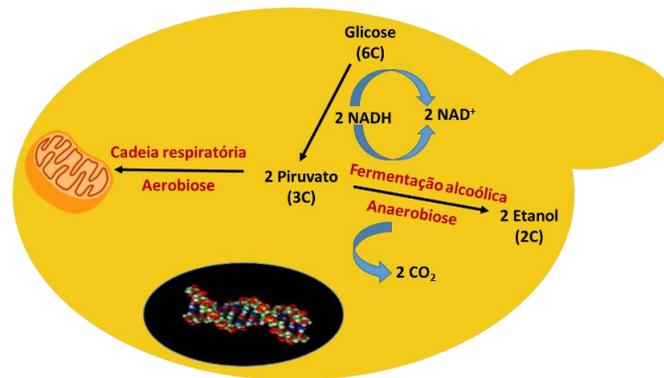


Figura 4. Rotas metabólicas alternativas após glicólise. Uma célula de levedura de brotamento é mostrada com as vias metabólicas aeróbicas e anaeróbicas após a glicólise. Fonte: (ALBA-LOIS, L. & SEGAL-KISCHINEVZKY, C., 2010)

Na fermentação há uma tendência para a atuação das enzimas piruvato descarboxilase e álcool desidrogenase. Porém na presença de oxigênio há um deslocamento reacional de parte do ácido pirúvico para o ciclo de Krebs. Quando as leveduras são crescidas na presença de oxigênio, com baixa concentração de açúcar, ou quando a captação de açúcar pelas células é lenta, o complexo da enzima piruvato desidrogenase direciona o fluxo glicolítico à respiração. Já em anaerobiose ou em altas concentrações de açúcar a fermentação é favorecida, pois o carbono excedente não direcionado para respiração é metabolizado pela enzima piruvato descarboxilase, favorecendo a fermentação (FEREA *et al.*, 1999).

Em termos energéticos, a respiração é muito mais favorável para a levedura que a fermentação. Quando as células de leveduras crescem aerobiamente na presença de glicose, as moléculas de NADH + H⁺ (NADH₂) produzidas durante a glicólise podem doar seus elétrons para o sistema de transporte de elétrons que tem o oxigênio como aceptor final de elétrons. Isso resulta não somente na regeneração do NAD, mas também pode conduzir a síntese de moléculas adicionais de ATP (SALVATO, 2010).

A levedura como entidade viva independente, realiza a fermentação do açúcar com o objetivo de conseguir a energia química necessária à sua sobrevivência. Nesse sentido, em condições industriais, a levedura utiliza de maneira anaeróbia seu substrato por meio da glicose. Tal processo bioquímico envolve 12 reações em sequência ordenada, cada qual catalisada por uma enzima específica no citoplasma celular, sendo por tanto, nessa região que se processa a fermentação alcoólica (Figura 5).

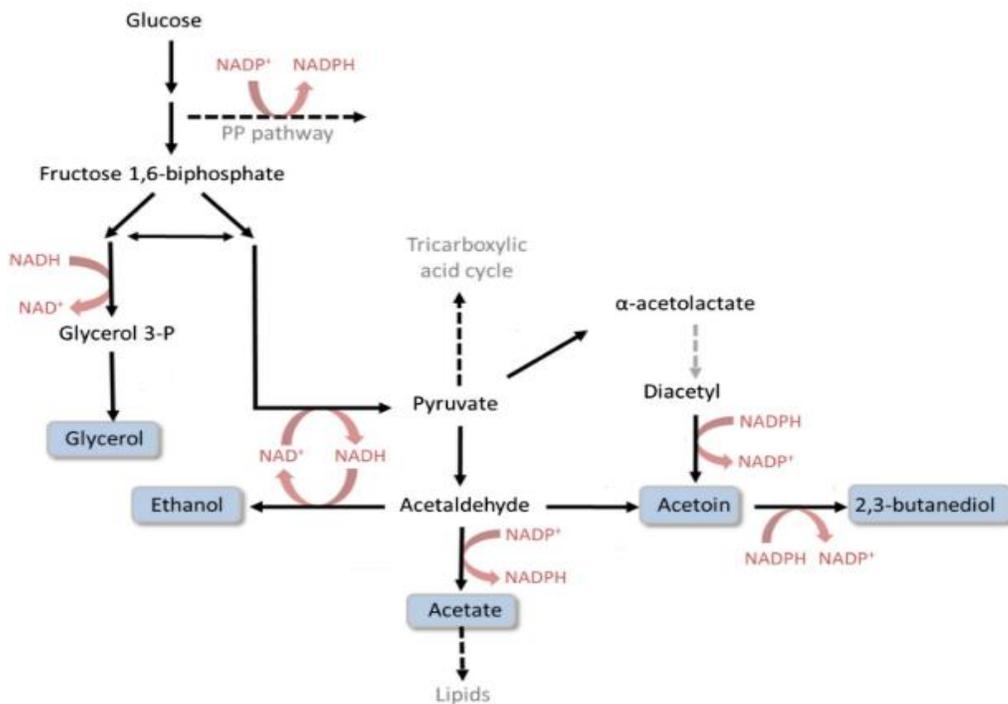


Figura 5. Principais vias envolvidas no desvio de rotas metabólicas durante a utilização de glicose como fonte de carbono para a produção de etanol. Fonte: (TILLOY *et al.*, 2015).

As leveduras envolvidas no processo de fermentação sofrem a ação de diversos fatores (nutrientes, minerais, vitaminas, inibidores, substâncias do próprio metabolismo, pH, temperatura, e outros) alguns que estimulam, outros que reprimem a ação enzimática, afetando assim o desempenho do processo. O objetivo primordial da levedura ao metabolizar o açúcar, é gerar uma forma de energia química (ATP) que será empregada na realização dos diversos trabalhos fisiológicos e biossínteses necessários à manutenção da vida, crescimento e multiplicação, perpetuando desta forma a espécie. O etanol e CO₂ resultantes se constituem em produtos de excreção, sem utilidade

metabólica para a célula em anaerobiose, sendo apenas subprodutos deste processo (SALVATO, 2010).

Durante a fermentação, na sequência de reações de produção de ATP, rotas metabólicas alternativas aparecem para propiciar a formação de materiais necessários a produção de biomassa (polissacarídeos, proteínas, ácidos nucleicos) bem como para a formação de outros produtos de interesse metabólico, relacionados direta ou indiretamente como a adaptação e sobrevivência, o que pode reduzir a produção de etanol, esses compostos são chamados metabolitos secundários e podem dar certas características nos produtos fermentados como são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Metabolitos secundários da fermentação alcoólica. Fonte: (WALKER; STEWART, 2016)

Metabolito	Exemplos de compostos	Descrição
Álcoois superiores	Álcool isoamílico, Álcool fenílico, Isopropanol	Em certas concentrações limites, os álcoois superiores podem dar aromas e sabores desejáveis nas bebidas fermentadas. No processo do Bioetanol esse álcoois não são desejáveis
Ésteres	Acetato de etila	Esses compostos entregam aromas e sabores frutais em vinhos e cervejas.
Compostos do grupo carbonila	Acetaldeído (etanal)	Em cervejas, o acetaldeído pode dar um sabor a maçã verde.
Ácidos orgânicos	Ácido succínico, ácido cítrico, ácido acético	Os ácidos orgânicos contribuem na adstringência do produto.
Poliol	Glicerol	O glicerol é produzido normalmente pelo metabolismo normal das leveduras, ou quando há um estresse osmótico. O glicerol pode contribuir na viscosidade geral dos fermentados, especialmente no vinho.
Dicetonas	Diacetila	Diacetila é um dos compostos mais indesejáveis, confere ao fermentado aromas e sabores similares à “manteiga rançosa”.
Compostos sulfurosos	Sulfeto de hidrogênio, dimetilsulfureto, anidrido sulfuroso, tióis	Dependendo de suas concentrações podem ser compostos desejáveis ou indesejáveis, geralmente em altas concentrações conferem os chamados “ <i>off flavors</i> ”
Compostos fenólicos	4-Vinilguaiacol	Aquelas leveduras que produzem compostos fenólicos são chamadas POF+, geralmente são indesejáveis no vinho, porém na cerveja podem conferir aromas característicos em alguns tipos de cerveja como as cervejas <i>Hefeweizen</i> .

O glicerol e o ácido succínico são quantitativamente os principais subprodutos metabolicamente relacionados ao equilíbrio redox celular em anaerobiose. O glicerol pode ser produzido em reações de balanceamento redox, ou como um soluto compatível em resposta ao estresse osmótico (BOULTON; QUAIN, 2001). A fermentação alcoólica é um processo de oxidação incompleta, sem a

participação do oxigênio molecular e portanto, para se manter o equilíbrio do redox celular, todo o NADH formado (em reações de oxidação) deve ser consumido (em reações de redução) acopladas à produção de etanol e glicerol (TILLOY *et al.*, 2015)

1.4 Transporte de açúcares através da membrana plasmática

Além da glicose, dependendo do tipo de processo e disponibilidade, as leveduras podem metabolizar diferentes fontes de carbono, por exemplo: frutose e sacarose (Bioetanol), maltose e maltotriose (cerveja). A utilização dos açúcares pelas leveduras envolve inicialmente o seu transporte para o interior da célula (LAGUNAS, 1993). A barreira entre o exterior e o interior da célula de levedura consiste na parede celular, na membrana plasmática e no espaço periplasmático, localizado entre esses dois. A parede celular da célula de levedura é porosa e os açúcares são capazes de passar por ela. Assim, na maioria das vezes, é a membrana plasmática que forma uma barreira entre o interior e o exterior da célula.

O transporte através da membrana plasmática é essencial para manutenção da vida, comunicação entre as células e adaptação às mudanças do meio ambiente. Os sistemas de transporte permitem a entrada de nutrientes para o interior da célula, possibilitando a metabolização de fontes exógenas de carbono, fósforo e nitrogênio. Esses sistemas são responsáveis pela excreção de produtos das vias metabólicas e de substâncias nocivas, e regulam o fluxo de íons que podem ser mantidos em concentrações intracelulares muito diferenciadas daquelas do ambiente externo (PAO *et al.*, 1998). Os solutos podem atravessar a membrana plasmática por difusão simples ou pelo transporte mediado por proteínas através de canais ou carreadores. Moléculas como CO₂, O₂ e C₂H₅OH (etanol), podem atravessar a membrana por difusão simples. Além disso, há difusão facilitada mediada por carregadores e canais para que o soluto passe de um lado ao outro da membrana sem gasto de energia metabólica e a favor de um gradiente de concentração (SAIER, 2000).

Quando o gasto de energia é acoplado à translocação do soluto, o transporte é denominado ativo. Transportadores ativos primários bombeiam H⁺ ou outros íons para fora da célula, convertendo a energia química em um gradiente eletroquímico através da membrana (exemplo: H⁺-ATPase). Este gradiente eletroquímico pode ser usado pelos transportadores ativos secundários para o transporte de outras moléculas (LAGUNAS, 1993; SAIER, 2000)

Os açúcares não penetram livremente nas membranas biológicas e a absorção celular de açúcares requer a ação das proteínas transportadoras. Os transportadores de açúcar ligam especificamente seu açúcar de substrato e, subsequentemente, o levam para a célula de levedura. Alguns dos

transportadores de açúcar são altamente específicos, enquanto alguns têm uma ampla gama de substratos. Os transportadores de açúcar mediam dois tipos de processos de transporte nas células de levedura: difusão facilitada independente de energia e transporte dependente de energia via mecanismo simporte de prótons, onde solutos podem ser acumulados também contra o gradiente de concentração (BISSON *et al.*, 1993).

De maneira geral, as leveduras podem utilizar uma ampla variedade de açúcares, mas quando vários açúcares estão presentes simultaneamente, a levedura tende a usá-los de maneira sequencial. Açúcares facilmente assimilados, isto é, monossacarídeos são usados primeiro, tanto a glicose quanto a frutose são transportadas para a célula de levedura por membros da família do transportador de hexose (Hxt) que consiste em 18 transportadores de difusão facilitada independente de energia (WIECZORKE *et al.*, 1999). A absorção de glicose e frutose é iniciada em uma fase inicial da fermentação. Os transportadores Hxt são portadores mais eficientes de glicose em comparação com a frutose e, devido a isso a glicose é transportada mais rapidamente que a frutose, mesmo se a concentração inicial de frutose fosse maior (D'AMORE; RUSSELL; STEWART, 1989; MENESES; HENSCHKE; JIRANEK, 2002). A glicose é o substrato preferido sobre todos os outros hidratos de carbono pela levedura, quando há glicose e outros açúcares menos preferidos, como a maltose e a maltotriose, o consumo dessas fontes de carbono é retardado. Os mecanismos mais importantes pelos quais a glicose provoca esse atraso são a repressão catabólica e a inibição catabólica. Geralmente, a absorção de maltose começa apenas quando aproximadamente 60% da glicose foi utilizada (D'AMORE; RUSSELL; STEWART, 1989)

Maltose e maltotriose são transportadas para a célula de levedura por transporte dependente de energia através de um mecanismo simporte, no qual um próton é co-transportado com cada molécula de maltose ou maltotriose (SERRANO, 1977; VAN LEEUWEN *et al.*, 1992). A força motriz para este transporte é um gradiente eletroquímico de prótons gerado em grande parte pela ATPase da membrana plasmática, que bombeia prótons para fora da célula com uma estequiometria de 1 próton / ATP hidrolisado. A maltotriose não possui seus próprios transportadores específicos, mas é transportada pelos transportadores de maltose (Mal31, Mtt, Mphx). A maioria dos transportadores capazes de transportar esses dois açúcares carrega a maltose mais eficientemente do que a maltotriose e, portanto, sua absorção é mais rápida (DAY *et al.*, 2002; HAN *et al.*, 1995; SALEMA-OOM *et al.*, 2005).

Diferentemente de outros açúcares, a sacarose geralmente não é transportada diretamente para a célula de levedura, mas é hidrolisada no espaço periplasmático pela enzima invertase secretada codificada pelos genes SUC (HOHMANN; ZIMMERMANN, 1986; MARQUES *et al.*, 2016). Uma análise da captação direta da sacarose por *S. cerevisiae* revelou que existe um co-transporte de sacarose H⁺ que é mediado pela permease Agt1 (SANTOS *et al.*, 1982; STAMBUK, BORIS U.; ARAUJO, 2001). Desta forma, as linhagens não necessitam hidrolisar a sacarose extracelularmente para metabolizá-la, ou seja, a sacarose é levada para o interior da célula através de um co-transporte com prótons H⁺ (Figura 6), onde são hidrolisadas pela invertase intracelular, liberando moléculas de glicose e frutose que serão posteriormente metabolizados pela via glicolítica (BARFORD; PHILLIPS; ORLOWSKI, 1992).

Portanto, duas vias de utilização de sacarose são conhecidas nas levedura da espécie *S. cerevisiae*: (I) pela ação da invertase extracelular a sacarose é hidrolisada em glicose e frutose, sendo seus produtos de hidrólise transportados para o interior da célula através da difusão facilitada via transportadores de hexoses e fermentados; (II) ou alternativamente por transporte ativo onde a sacarose pode ser captada diretamente através do co-transporte com H⁺ e hidrolisada internamente pela invertase intracelular ou maltase (BARFORD; PHILLIPS; ORLOWSKI, 1992; STAMBUK, BORIS U.; ARAUJO, 2001).

Além disso, quando se analisa a Figura 6, é possível observar que duas vias de utilização de sacarose são conhecidas em *S. cerevisiae*: (I) invertase extracelular; (II) ou alternativamente por transporte ativo usando os mesmos transportadores de maltose e maltotriose (STAMBUK; ARAUJO, 2001; STAMBUK, B.U. *et al.*, 2006).

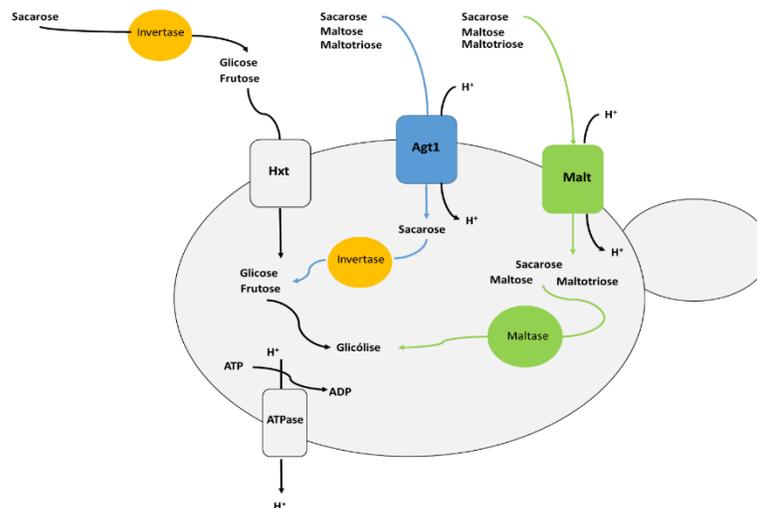


Figura 6. Representação das vias de utilização de açúcares em *S. cerevisiae*.

1.5 Relação dos desafios da indústria com as implicações biológicas em leveduras

As indústrias dos produtos fermentados precisam de maiores rendimentos produtivos, e geralmente é possível focar os esforços na redução dos tempos de fermentação, em consequência reduzir os custos produtivos. Nesse sentido, um dos principais interesses de cientistas e da indústria é melhorar as características tecnológicas das leveduras, pois elas são elementos fundamentais nos processos fermentativos como na produção de bioetanol e cerveja.

1.5.1 Bioetanol

Nessa indústria, a maior parte da produção é tipicamente realizada em fermentações em maior escala que utilizam altas concentrações de glicose e de leveduras da espécie *S. cerevisiae*. No caso do Brasil, a cana de açúcar é a principal matéria prima usada, por conter uma alta concentração de sacarose que quando hidrolisada gera glicose e frutose (LOPES *et al.*, 2016). Além das altas concentrações de fontes de carbono, o processo é realizado em condições de alto teor de etanol e muitas vezes em temperaturas superiores às ideais, causando estresse para as leveduras (ABDEL-BANAT *et al.*, 2010; ABREU-CAVALHEIRO; MONTEIRO, 2013; CASPETA ; NIELSEN, 2015). A implementação da operação em temperaturas mais elevadas reduziria os custos de resfriamento e permitiriam reduções significativas dos custos de produção. No entanto, como dito anteriormente, a temperatura é um fator limitante para a maioria das leveduras atualmente utilizadas, uma vez que em temperaturas superiores a 34°C o metabolismo das células é alterado prejudicando seu crescimento (CASPETA; NIELSEN, 2015).

O aumento da temperatura provoca por exemplo mudanças no programa de expressão gênica consistindo em uma modificação imediata na transcrição de genes de resposta ao estresse global, seguida por mudanças na expressão de genes especificamente associados à resposta ao estresse térmico (ABDEL-BANAT *et al.*, 2010). Como consequência, existem muitas mudanças nos fluxos metabólicos que ocorrem simultaneamente devido a variações na carga de energia e nos potenciais de redução/ oxidação, com uma diminuição na taxa de crescimento e baixo consumo de açúcar (CASPETA; CHEN; NIELSEN, 2016; GASCH; WERNER-WASHBURNE, 2002; POSTMUS *et al.*, 2008).

Estudos indicaram que leveduras termotolerantes, isoladas de dornas de processo de produção, cresceram e consumiram glicose mais rapidamente que as linhagens controle utilizadas. No entanto, ainda há pouca informação disponível sobre as mudanças genéticas e como elas afetam a adaptação da levedura. Contudo, outras pesquisas revelaram que podem existir alterações no

genes ATP2/3, ERG3, os quais estão relacionados com a metabolismo do esteroide e por conseguinte na composição lipídica da membrana celular, essas novas composições afetariam a expressão de famílias de *Heat shock proteins* (HSP) modificando o limiar da resposta ao choque térmico (CARRATÙ *et al.*, 1996; CURRAN; KHALAWAN; CHATTERJEE, 2000). Nesse ponto, leva-se ao questionamento sobre a possibilidade da termotolerância poder ser estimulada usando estratégias de evolução dirigida em mistura com vários estressores tais como alta osmolaridade, altas concentrações de etanol e temperaturas não letais elevadas.

1.5.2 Cerveja

Por outro lado, na indústria das cervejas, o açúcar fermentável mais abundante é a maltose (60-70%), seguido de maltotriose (15-20%) e glicose (10-15%). Destes açúcares, a glicose é a fonte preferida e é prontamente utilizadas pelas leveduras. No entanto, a eficiência do processo de fermentação requer o consumo total de maltose e maltotriose. A maltose, apesar de ser um açúcar fermentável pelas leveduras, não é a fonte preferida, o mesmo acontece com a maltotriose. A dificuldade de algumas cepas de *S. cerevisiae* para consumir estes dois açúcares leva a alguns dos problemas mais frequentemente relatados em muitas fábricas de cerveja: (I) Níveis elevados de açúcares em cervejas prontas para consumir; (II) Rendimentos de produção de etanol baixo e perfis de sabor atípico (JANSEN *et al.*, 2004; STAMBUK *et al.*, 2006).

A utilização de maltose e maltotriose requer que seus transportes sejam através da membrana do plasma e em seguida são hidrolisadas por glicosidases citoplasmáticas, mais conhecido como maltases (Figura 6). Estudos sobre a utilização destes açúcares em levedura revelaram que a maltose e maltotriose são transportados por diferentes permeases, Atg1 para maltotriose, e Malt para maltose, enquanto as maltases intracelulares são capazes de hidrolisar ambos açúcares (RAUTIO; LONDESBOROUGH, 2003; STAMBUK, BORIS U.; ARAUJO, 2001). No entanto, esses transportadores são inibidos na presença de glicose, o que aumenta a fase *lag* quando a glicose é consumida e o microrganismo inicia o consumo de outro tipo de fonte de carbono, por exemplo, maltose (JANSEN *et al.*, 2004).

1.6 Desafios do trabalho

Conforme discutido, utilizando a evolução dirigida surge a possibilidade de adaptar leveduras que consigam ativar rapidamente os transportadores de maltose e maltotriose, e assim aumentar o influxo destas fontes carbono para a melhoria do processo industrial de cerveja. Adicionalmente esta ativação poderia também ser utilizada na produção de bioetanol, uma vez que

também aumentaria o influxo de sacarose para o interior das leveduras que assim metabolizariam esta fonte de carbono mais rapidamente (Figura 3). Além disso, esta metodologia também pode ser empregada para a seleção das mais diversas características, como a termotolerância por exemplo.

Com base nesse cenário, o grupo de pesquisa no Laboratório de Bioquímica e Genética Aplicada (LBGA) no DGE/UFSCar vem desenvolvendo um projeto baseado no isolamento de leveduras obtidas nos processos das indústrias brasileiras de bioetanol desde o ano 2010, obtendo um banco com 289 isolados. A caracterização dessas leveduras foi realizada com técnicas moleculares de DNA, no entanto, ainda não foram testados os potenciais usos dessas leveduras em outros processos, tais como na produção de cerveja. Além disso, o grupo de pesquisa de LBGA, conseguiu isolar leveduras termotolerantes que crescem acima de 40°C, no entanto essas leveduras não são comparadas com outras leveduras comerciais no desempenho fermentativo.

Assim, o desafio colocado neste trabalho foi focado no desenvolvimento de um sistema de seleção e adaptação de leveduras que consomem açúcares diferentes da glicose, como maltose e maltotriose para a melhora do processo fermentativo. Portanto, é importante estudar a *fitness* das leveduras isoladas tanto no crescimento quanto na fermentação. Posteriormente, por meio da técnica de evolução adaptativa, ciclos repetidos sob pressões seletivas com o objetivo de forçar esta adaptação serão aplicados. Uma vez finalizada a evolução adaptativa, possivelmente serão geradas leveduras de fenótipos variantes com diferentes características, obtendo cepas de maior interesse de acordo com seu perfil fermentativo tanto para bioetanol quanto para cervejas.

2 Objetivos do projeto

2.1 Objetivo geral

Seleção e adaptação de leveduras obtidas a partir de processos de bioetanol, por evolução adaptativa utilizando como critério de seleção a capacidade de consumo e fermentação de fontes de carbono em sistemas de produção de bioetanol e cerveja.

2.2 Objetivos específicos

- I) Identificar linhagens que consumam adequadamente e com rapidez açúcares diferentes da glicose, como maltose e maltotriose para a melhora do processo fermentativo para a produção de cervejas.
- II) Obter leveduras *S. cerevisiae* evoluídas usando sistemas de evolução dirigida para produção de bioetanol.
- III) Avaliar por PCR em tempo real a expressão gênica dos transportadores de maltose e maltotriose bem como de rotas metabólicas alternativas nas cepas micro- evoluídas no crescimento e na fermentação em mosto sintéticos e industriais utilizados na fabricação de cerveja e bioetanol.

3 Material e métodos

O projeto foi desenvolvido no Laboratório de Bioquímica e Genética Aplicada no Departamento de Genética e Evolução (DGE) da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar). O trabalho foi dividido em três áreas: (I) Cerveja; (II) Bioetanol; (III) Expressão gênica. No tópico final da metodologia (3.3), explica-se a obtenção de dados para expressão gênica em cada processo fermentativo estudado, além de seus genes analisados para cada um deles.

3.1 Identificação das linhagens de leveduras com potencial utilização para a indústria cervejeira.

3.1.1 Linhagens de leveduras

As linhagens da levedura *S. cerevisiae* foram isoladas de usinas produtoras de etanol. Atualmente há 289 cepas armazenadas a -80 °C no banco de linhagens do laboratório de Bioquímica e Genética Aplicada, e que foram analisadas neste estudo. Também foram usadas leveduras comerciais de *S. cerevisiae* utilizadas na produção de bioetanol (n=2), cerveja (n=14) e vinho (n=2) que foram obtidas de cultivos puros em formato líquido ou seco. Além disso, a levedura *Candida albicans* foi utilizada como controle nos testes de placas com lisina e a levedura de panificação (*Fleischmann*) como controle de fermentação.

3.1.2 Identificação do gênero *Saccharomyces*

Inicialmente, esta técnica foi usada como uma forma rápida de identificação de gêneros de leveduras. Como pré-inóculo, todas as leveduras foram crescidas em YPD (extrato de levedura 1%, peptone 1%, Dextrose 2%), nas condições de 30°C e com agitação de 180 rpm por 24 horas. Após o crescimento dos pré-inóculo, em cada cultura foi ajustada a densidade celular até D.O₆₀₀ 0,1 para começar com a metodologia de cultivo dos isolados usando crescimento em placa petri- *Drop out* (seção 3.1.3).

Antes de usar a técnica *drop-out*, preparam-se placas em meio de cultura YCB-L-agar (“*Yeast Carbon Base*” – Difco™ - com adição de Lisina e agar). O preparo do meio foi feito de acordo com as recomendações do fabricante. Para facilitar a filtração, foi preparada uma solução 10x, dissolvendo 11,7 g de base e uma fonte de nitrogênio (1 g/L de Lisina) em 100 mL de água. A solução, após homogeneizada, foi esterilizada e filtrada. Para o meio final, foi necessário pipetar 0,5 mL da solução 10x, em 4,5 mL de solução agar 2% e misturar bem. O meio foi então distribuído nas placas e armazenado para uso. Usando a técnica *Dropout*, aquelas leveduras que não cresceram em meio agar-lisine foram consideradas pertencentes ao gênero *Saccharomyces* (FOWELL, 1965).

3.1.3 Crescimento em placas de Petri- Dropout

Essa metodologia de cultivo foi utilizada como base para todos os testes de seleção (lisine-agar, maltose-agar, extrato de malte-agar). Os pré-inóculos ajustados até densidade celular D.O₆₀₀ 0,1 foram usados para fazer diluições seriadas (1:1, 1:10, 1:100 e 1:1000). Cada diluição tinha um volume de 5µl aplicado nas placas de em meio sólido (*Dropout*: gotejamento). Os resultados e o registro das imagens foram obtidos após um período de 2 dias de incubação (a 30°C no caso do teste agar- lisine), deste resultado, foram selecionadas as melhores cepas resistentes a concentrações de maltose.

3.1.4 Testes de crescimento em maltose e extrato de malte em meio sólido

Após a identificação de gênero, cento e vinte e quatro (124) leveduras do banco foram caracterizadas fisiologicamente como *Saccharomyces*. Como controle principal, foi utilizada a levedura CER002 (nome comercial S04) que conseguiu os resultados mais estáveis em testes de crescimentos anteriores. Os pré-inóculos foram feitos em meio líquido YPM 2% (extrato de levedura 1%, peptone 1%, Maltose 2%). Em seguida os pré-inóculos foram ajustados até uma densidade celular de D.O₆₀₀ 0,1. Esses cultivos foram usados tanto para *Dropout* (seção 3.1.3) em maltose quanto para extrato de malte.

Para o cultivo em placa *Dropout*, para cada teste, placas *petri* foram preparadas com meio YPM-agar 2% (extrato de levedura 1%, peptone 1%, Maltose 2%, agar 2%) e YPEM-agar 2% (extrato de levedura 1%, peptone 1%, Extrato de Malte 2%, agar 2%). Os cultivos de *Drop-out* foram feitos da mesma forma descrita na seção 2.3. Após inoculação das diluições seriadas, as placas foram incubadas a 20°C e 30°C durante 2 dias.

3.1.5 Processo de análises e seleção de leveduras

Todas as placas foram digitalizadas usando um scanner de alta definição (Biorad). As imagens digitalizadas foram processadas usando o *software* ImageJ. O processamento das imagens foi realizado com utilização de ferramentas de quantificação de intensidade de pixels do *software* ImageJ (DITTMAR; REID; ROTHSTEIN, 2010). Os dados foram processados calculando o crescimento relativo em termos de intensidade dos pixels de cada diluição, esses valores foram comparados com as linhagens de controle descritas em cada processo. Após o cálculo dos valores relativos, foi realizada uma normalização dos dados por conversão em pontuações Z, também chamadas Z-score. Finalmente, *Heat maps* foram obtidos usando o *software online* Morpheus (<https://software.broadinstitute.org/morpheus>, *Broad Institute*). As linhagens foram agrupadas

hierarquicamente com base no comportamento fenotípico usando uma métrica de correlação baseada em distâncias Euclidianas e um mapeamento ordenado com respeito ao crescimento.

3.1.6 Identificação molecular para caracterização individual das linhagens isoladas e classificação quanto a espécie.

Com os testes mencionados, foi possível identificar 60 linhagens pertencentes ao gênero *Saccharomyces* e que consomem maltose. No entanto, para uma identificação da espécie foram realizados experimentos de PCR para a amplificação do fragmento de DNA (extraído pela técnica de fenol clorofórmio) compreendidos entre a região intergênica ITS-1 e ITS4, utilizando iniciadores específicos cujas sequências são:

ITS-F 5'ACGGTGAGAGATTCTGTGC3'

ITS-R 5'AGCTGGCAGTATCCCACAG3'

As condições da PCR foram: desnaturação inicial a 95 °C por 5 min; 35 ciclos de desnaturação a 94 °C por 1 min, alinhamento a 55,5 °C por 2 min e extensão a 72 °C por 2 min e 72 °C por 10 min para finalizar a extensão. Os produtos desta amplificação foram submetidos a digestão com a enzima *HaeIII* para identificação da espécie *Saccharomyces cerevisiae*. Os produtos de PCR, assim como os produtos da digestão, foram detectados utilizando uma eletroforese em gel de agarose a 1% e 2%, respectivamente. O gel foi corado com solução de brometo de etídio (0,5 µg/mL) durante 20 minutos e visualizado em um transiluminador UV (ESTEVE-ZARZOSO *et al.*, 1999).

O produto de amplificação (PCR) foi enviado para sequenciamento e seu resultado foi comparado utilizando a ferramenta BLASTN (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), além de conferir com os resultados dos tamanhos dos fragmentos amplificados.

Todas as linhagens do banco (n=289) já tinham sido genotipadas em trabalhos anteriores de bioetanol e foram comparadas as linhagens industriais atualmente utilizadas (CAT-1 e PE-2). Para a genotipagem destas linhagens, foram utilizados iniciadores específicos que amplificam regiões polimórficas de DNA específicas de *Saccharomyces cerevisiae*. Estes marcadores mostraram-se capazes de identificar diferencialmente todas as linhagens atualmente utilizadas na produção de etanol (CARVALHO-NETTO *et al.*, 2015).

3.1.7 Testes de crescimento e fermentativos comparativos utilizando maltose

Após a identificação de espécie, aquelas leveduras pertencentes a espécie *S. cerevisiae* foram levadas a testes comparativos com uma levedura industrial produtoras de cerveja (*S-04 Fermentis*) e foram confrontadas quanto ao crescimento e capacidade fermentativa. Para as análises de crescimento, as amostras isoladas foram crescidas durante 12 horas e então diluídas, em poços de uma microplaca, para uma D.O₆₀₀ de 0,1 em 250 µL de meio de cultura 12% YPPD e 12% YPM, a densidade ótica de cada isolado foi acompanhada a cada 2 horas (sob agitação a 180 rpm e 20°C) até atingir a fase de platô de crescimento, cada levedura foi testada em triplicata. Gráficos de crescimento foram traçados para a avaliação daquelas que tiveram crescimento acelerado na presença desta fonte de Carbono quando comparadas a linhagem industrial.

Para os testes fermentativos, cada isolado foi levado a crescimento exponencial em meio de cultura YPM (1% de Extrato de Levedura 2% de peptona e 2% de Maltose). Em seguida, cada isolado foi testado quanto a sua capacidade fermentativa em meio YPM com 12% de maltose utilizando microplacas, para uma D.O₆₀₀ de 1 em 250 µL de YPM, em condições de temperatura a 20°C durante 7 dias. Para conseguir uma melhor *performance* de fermentação foi utilizada *Antimycin A* (3 mg/L; *Sigma Aldrich*), cada levedura foi testada em triplicata (GALLONE *et al.*, 2016). Os resíduos de maltose foram determinados pela técnica com o reagente DNS, seguindo as modificações propostas por Santos e colaboradores (ALVES DOS SANTOS *et al.*, 2017).

3.1.8 Produção de cervejas e testes sensoriais

As linhagens que se mostraram promissoras nos testes crescimento e fermentação em maltose foram avaliadas quanto a sua capacidade de produção de cerveja em escala de laboratório e comparando com uma linhagem comercial (*S-04*). Para isso, as fermentações foram realizadas com extrato de malte (*Kasvi*) 12%, colocadas em tubos Falcon de 50 mL, com um volume final de 40 mL. Em cada tubo foi inoculado $1 \cdot 10^9$ células/mL correspondente a cada linhagem, em sextuplicata. Os tubos foram incubados a 20 °C sem agitação. O acompanhamento da fermentação foi feito diariamente através da pesagem de cada tubo para avaliar a produção de CO₂, durante um período de 7 dias.

Ao final dos 7 dias, os tubos foram centrifugados a 4000 rpm durante 5 minutos, onde foi obtido a separação do precipitado e do sobrenadante para análise posterior. As amostras do sobrenadante foram analisadas utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (*High Performance Liquid Chromatography*, HPLC) e assim conseguir valores de concentrações de parâmetros físico-químicos

(alguns podem ser metabolitos) na fermentação tais como: Etanol, resíduos de açúcar (Glicose, Maltose e Maltotriose), ácidos orgânicos e glicerol. Como dito anteriormente, os isolados que obtiveram resultados satisfatórios, foram avaliados quanto a expressão gênica de vias metabólicas importantes, para isso foram retiradas amostras em 2 pontos da fermentação: início e fim (veja tópico 3.3). O produto final, cerveja, foi avaliada sensorialmente com uma descrição quanto de sabores tanto de aromas.

3.2 Utilização de leveduras na fermentação do bioetanol

3.2.1 Evolução adaptativa para fixação de características de interesse industrial para a produção de bioetanol.

Para o trabalho com bioetanol, uma metodologia de evolução adaptativa foi proposta para que os linhagens do banco do laboratório consigam ser testados em condições limites no processo. No caso do bioetanol, uma evolução multi-estresse foi desenvolvida para que o linhagem testado adquira características fermentativas melhoradas, assim a levedura poderia fermentar em altas temperaturas e altas concentrações de açúcar. O critério de evolução foi o seguinte: (I) visar a seleção de leveduras osmotolerantes dado pelo crescimento em altas concentrações de glicose ou extrato de malte; (II) Atuar na ativação dos transportadores Agt1 e Malt utilizando extrato de malte, mesmo na presença de glicose, e como dito anteriormente aumentaria também o influxo de sacarose; (III) Aumentar a temperatura progressivamente para conseguir novos fenótipos termotolerantes (para compreender melhor o processo de evolução e fermentação (ver Figura 7).

Desta forma, para testar a metodologia proposta foi escolhida para ser evoluída a levedura industrial CAT-1, que apresenta uma excelente performance fermentativa a 30 °C, mas que não consegue crescer nem ter uma *performance* fermentativa estável em temperaturas superiores a 40°C e em concentrações superiores a 20% de Açúcares Redutores Totais (ART). A levedura testada foi levada a crescimento exponencial em meio de cultura YEPD (1% de Extrato de Levedura, 2% de peptona e 8% de Dextrose) e então diluídas a DO₆₀₀ 0,1. Em seguida, CAT-1 foi evoluída em 3 diferentes condições paralelas: (A) aeróbica, promovendo a proliferação celular; (AN) anaeróbica, promovendo a fermentação; e (M) mista, 2 dias em anaerobiose e outros 2 em aerobiose. Cada ciclo de evolução considera 4 dias, o processo foi conduzido inicialmente com uma concentração definida de glicose e/ou extrato de malte, começando no Ciclo 1 com CAT-1 cultivada sob 8% de açúcar. Além disso, no dia 1 de cada ciclo a temperatura iniciava em 40 °C e foi acrescentada em 0,5 °C/dia, de maneira que o último dia (4) o processo fosse realizado a 41,5 °C, visando aumentar a

termotolerância desta linhagem evoluída. No final de cada ciclo, as culturas foram levadas a um tratamento ácido a um pH de 2,2 utilizando ácido sulfúrico durante duas (2) horas. Após o tratamento ácido, foram realizadas diluições seriadas, as quais foram semeadas em placas de petri para isolamento de colônias, as quais eram utilizadas para o pré-inoculo de um novo ciclo de evolução. No seguinte ciclo a concentração de fonte carbono era acrescentada até chegar ao Ciclo 4 com uma concentração final de 20% de açúcar. No final deste processo, foram obtidos seis (6) fenótipos evoluídos de CAT-1, os quais foram estocados a -80 °C, para continuar com testes de seleção em micro-fermentações.

3.2.2 Testes de fermentação em leveduras para bioetanol

Com esses seis fenótipos evoluídos de CAT-1 foram realizadas, em triplicatas, fermentações em microplacas foram conduzidas, simulando as condições de trabalho na usina: (I) Meio fermentativo concentrando com 20% YPS (Sacarose); (II) Dosagem do meio de fermentativo YPS em três porções iguais até completar o volume final (início, após 2 horas e logo às 4 horas de processo); (III) Pé de cuba (inóculo preparado) equivalente em um 30% do volume final; (IV) Tempo de fermentação: 8 horas; (V) Após fermentação, 2 horas tratamento ácido a um pH de 2,2 (RAGHAVENDRAN *et al.*, 2017); (VI) Temperaturas trabalho testadas: 30 e 40 °C. No final das micro-fermentações atingiam-se 250 µL, os ART foram quantificadas com o método de hidrólise ácida e DNS, assim foi escolhido só um fenótipo para a próxima etapa e realizar fermentações a escala de laboratório com 40 mL de volume final.

Para realizar as fermentações de laboratório (40 mL), utilizou-se as mesmas condições de trabalho da usina (mencionadas acima), a diferença foi o maior volume de trabalho, e as leveduras testadas. Como referido anteriormente, o grupo de pesquisa LGBA isolou leveduras termotolerantes no processo de bioetanol, uma delas foi usada neste estudo, nomeada como LGBA-01, identificada como *S. cerevisiae* em testes anteriores no processo de criação do banco. Uma outra *S. cerevisiae* de etanol foi usada, CAT-1 sem evoluir, e também foi testado só um (1) dos fenótipos evoluídos de CAT-1 selecionado da micro fermentação (nomeada CATEV). Previamente, as três linhagens LGBA-01, CAT-1 e CATEV foram crescidas em um biorreator (fornecido por Usina São Luiz S.A) com um sistema de produção de biomassa de leveduras utilizando bateladas alimentadas (*fed-batch*), isto para conseguir os níveis de pé de cuba requeridos (30% do volume final em biomassa líquida; para testes de produção veja Anexo A.5. As três leveduras foram submetidas a ensaios de fermentação utilizando como substrato fermentativo dois tipos de meio líquido 20% YPD e 20% YPS em duas

temperaturas diferentes de 30°e 40°C durante 8 horas por 4 ciclos fermentativos. Depois do tratamento ácido as leveduras foram lavadas e centrifugadas (4000 RPM x 5 min) 3 vezes usando buffer PBS 1X para eliminar o ácido da solução, assim até o quarto ciclo. O controle usado foi meio YPD 8% sem inocular. Durante a fermentação com mosto de laboratório, a quantificação de produção de CO₂ foi feita determinando a perda de massa de cada fermentação, foram utilizadas triplicatas. Paralelamente, em cada ciclo fermentativo foi usado um tubo cônico de 40 mL de volume total (inoculado com na mesma relação matemática) para coletas de 1 mL a cada 2 horas com a finalidade de determinar o crescimento celular (D.O₆₀₀). Para futuras medidas de níveis de açúcares, etanol e extração de RNA. Para isso, cada coleta foi centrifugada a 4000 rpm por 5 minutos a uma temperatura de 4° C. O sobrenadante foi utilizado para determinação dos níveis de glicose, sacarose, etanol e outros metabolitos utilizando HPLC, e o precipitado para a extração de RNA para análise da expressão gênica. Na Figura 7 apresenta-se um desenho do processo completo desde a evolução até a fermentação em escala de laboratório e seus analises.

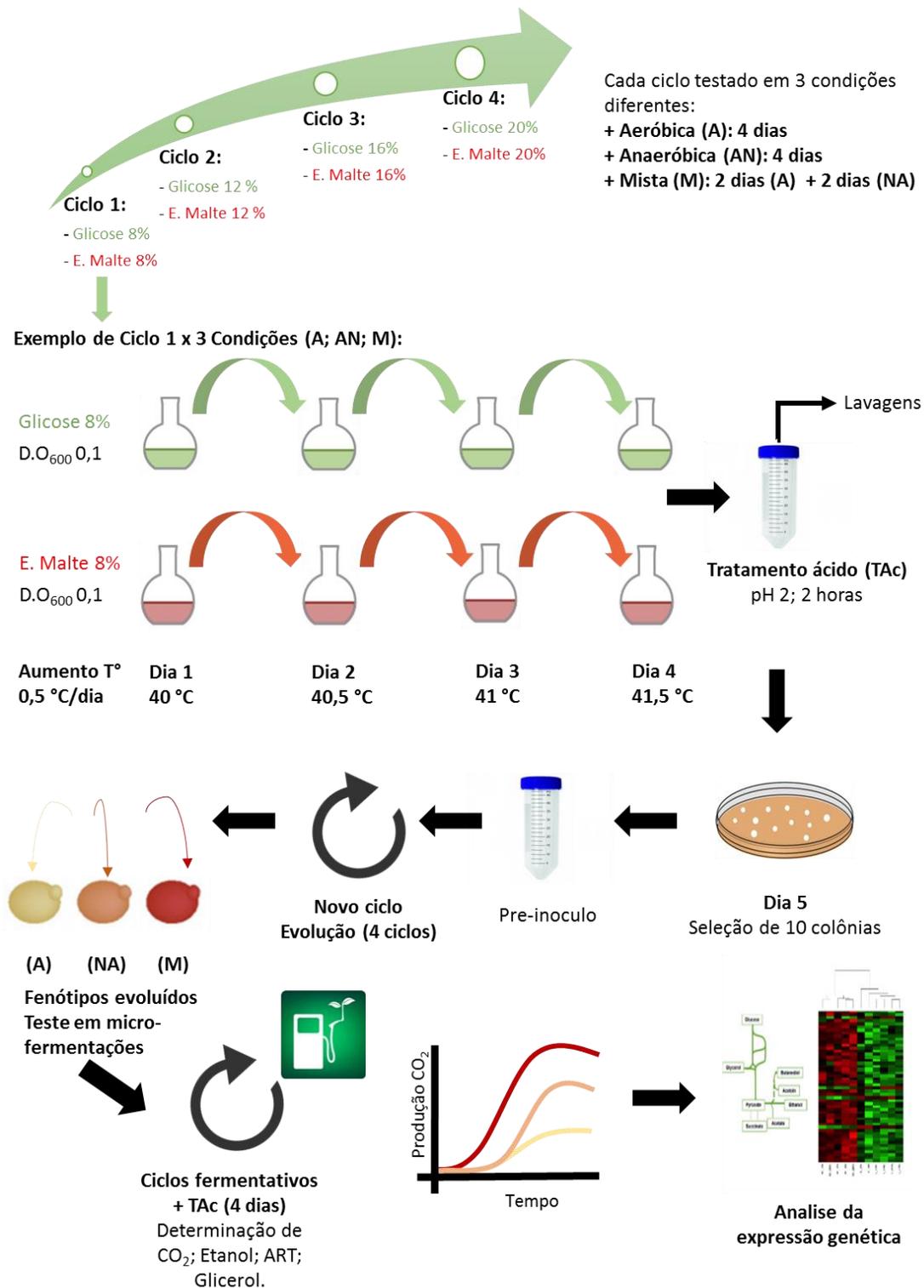


Figura 7. Detalhamento da metodologia a ser utilizada para a evolução adaptativa em leveduras para utilização na fabricação de bioetanol. A. Foram realizados 4 ciclos de evolução nos quais as concentrações de glicose e/ou extrato de malte foram gradativamente aumentadas. B. Cada ciclo foi conduzido sob 3 diferentes condições (A) aeróbica, (AN) anaeróbica e (M) mista em temperaturas crescentes de 40 a 41,5 °C, aumentando 0,5 °C cada dia.

3.2.3 Fermentação em altas temperaturas e altas concentrações de açúcares

Paralelamente, a linhagem LBGA01 termotolerante, isolada pelo grupo de pesquisa, foi testada quanto a suas características fermentativas em experimentos realizados em fermentadores simulando a produção industrial de etanol. Estes experimentos foram conduzidos no Instituto de Engenharia Química da Universidade de São Paulo, em colaboração com o Prof. Dr. Thiago Basso.

Os experimentos foram realizados em um fermentador de 2,0 L modelo *Labfors 5* (Infors AG, Suíça) com 1,0 L de volume de trabalho mantido constante. A composição do meio de cultura para todos os cultivos foi preparada utilizando glicose como fonte de carbono e sulfato de amônio como fonte de nitrogênio (VERDUYN *et al.*, 1992). Para cultivo anaeróbico, utilizou-se a injeção de Nitrogênio gasoso no recipiente de cultura ($0,5 \text{ Lmin}^{-1}$). A frequência de agitação foi ajustada para 800 rpm, a temperatura foi controlada a 30°C (ou 40°C no caso da condição de estresse) e o pH foi controlado a 5,0 via solução de KOH 2M. Os pré-inóculos foram cultivados durante a noite em um agitador orbital a 30°C e agitação de 200 rpm em frascos de 500 mL contendo 100 mL do meio definido com 20 g/L de glicose inicial. Após a exaustão da fonte de carbono (que foi monitorada por uma queda acentuada na concentração de CO_2 no efluente gasoso), o cultivo em batelada foi alternado para o modo contínuo com um novo meio de cultura em uma alimentação de 100 mL/h, que corresponde a uma taxa de diluição de $0,10 \text{ h}^{-1}$, assumindo um volume de trabalho de 1,0 L. Assim, foram obtidas culturas em estado estacionário, que foi considerado quando as alterações no peso seco da cultura e a taxa de produção específica de dióxido de carbono não variaram mais de 2% após 2 novas adições de meio. As fermentações foram feitas em triplicata e analisadas quanto aos diversos aspectos importantes no processo industrial de etanol. As características (alta temperatura e alta concentração de açúcares) foram testadas de maneira independente e conjunta, também foi feito um análise em HPLC. A expressão de genes de vias metabólicas chaves (descritas no tópico 3.3) foram analisadas por qPCR em amostras retiradas durante cada processo fermentativo.

3.3 Análise da expressão gênica por qPCR em linhagens de leveduras para a produção de cervejas e bioetanol.

Nesta etapa do trabalho foram analisadas todas as amostras obtidas das diferentes fermentações realizadas tanto da cerveja e bioetanol. Na tabela 3 apresenta-se um resumo das amostras analisadas e as condições de cada uma.

Tabela 3. Amostras de fermentações para análise da expressão gênica

Fermentação	Código linhagem	Condições de fermentação analisadas	Genes analisados
Cerveja	LBGA-287	20 °C; 12% YPEM inicial; Amostras em início (Dia 1; D 1) e final (Dia 7; D 7).	<i>GPD1; GPD2; ADH1; PDC1; ALD6; ALD4; ACS2; BDH1; AGT1; MAL31; PAD1; FDC1; HXT1; ADR1.</i>
	LGBA-288		
	CATEV (CAT-1 evoluída) *		
	S-04		
Bioetanol	CAT-1 (Sem evoluir)	30 e 40°C; 20% YPS e 20% YPD inicial; Amostras em início (t= 0 horas; t 0), médio (t= 4 horas; t 4) e final (t= 8 horas; t8).	<i>GPD1; GPD2; ADH1; PDC1; ALD6; ALD4; ACS2; BDH1; AGT1; MAL31; SUC2; SNF1; HXT1; ADR1.</i>
	LGBA-01		
	CATEV (CAT-1 evoluída)		
Bioetanol, Biorreator USP	LGBA-01	30 e 40°C; Final do processo.	<i>GPD2; ADH1; PDC1; ALD6; ALD4; ACS2; OLE1.</i>

* A linhagem CATEV foi evoluída para bioetanol, mas também foi testada na elaboração de cerveja.

As linhagens da Tabela 3 foram avaliadas utilizando a técnica de qPCR. Para este trabalho, selecionamos alguns genes de interesse relacionados às seguintes características: genes chaves importantes na fermentação; genes relacionados ao transporte de açúcares, repressão catabólica e produção de aromas indesejáveis na cerveja. Abaixo descrevemos sucintamente, os genes e sua função na fermentação/produção do bioetanol e da cerveja:

a) Genes chaves associados a fermentação (para detalhes veja figura 8):

GPD1 e *GPD2* (*NAD-dependent glycerol-3-phosphate dehydrogenase*): enzimas chaves na síntese de glicerol sendo importante no crescimento sob estresse osmótico. Ativação desta via é importante na produção de cervejas, mas não pode estar aumentada, pois seu desvio diminui a produção de etanol (SAINT-PRIX; BÖNQUIST; DEQUIN, 2004).

ADH1 (*Alcohol DeHydrogenase*): enzima importante na geração e consumo de etanol respectivamente. A ativação de *ADH1* indica um desvio da rota metabólica para a produção de etanol enquanto *ADH2* indica que o etanol, produzido está sendo utilizado como fonte de carbono pela levedura (DICKINSON; SALGADO; HEWLINS, 2003).

PDC1 (Pyruvate DeCarboxylase): Principal enzima envolvida na descarboxilação do piruvato e diretamente envolvida com a eficiência da fermentação alcoólica (PRONK; YDE STEENSMA; VAN DIJKEN, 1996; SCHMITT; ZIMMERMANN, 1982)

ALD6 (Cytosolic aldehyde dehydrogenase) e *ALD4 (Mitochondrial aldehyde dehydrogenase)*: Ativação destas enzimas está relacionada ao desvio de rota do acetaldeído produzido para a produção de acetato (ARANDA; DEL OLMO, 2003; MEADEN *et al.*, 1997).

ACS2 (Acetyl CoA Synthetase) – Enzima envolvida na sínteses de AcetilCoA e essencial para o crescimento em glicose sob condições anaeróbicas. Um aumento da expressão deste gene estaria relacionado a utilização do etanol como fonte de carbono ou a um desvio de rota para a formação de AcetilCoA e entrada no ciclo de Krebs (BERG; STEENSMA, 1995; DE VIRGILIO *et al.*, 1992)

BDH1 (Butanediol DeHydrogenase) – Enzima dependente de NAD, atua catalisando a oxidação de (R,R)-2,3-butanodiol (3R) para produzir acetoina, participa na oxidação de mesobutanodiol para (3S) acetoina e também reduz acetoina; aumenta o uso de 2,3-butanodiol como fonte de carbono nos processo aeróbico (GONZÁLEZ *et al.*, 2000).

ADR1 (Alcohol Dehydrogenase II synthesis Regulator): necessária para a transcrição do gene *ADH2 (Alcohol DeHydrogenase)*, envolvida na produção de etanol glicerol e utilização de ácidos graxos (YOUNG *et al.*, 2003).

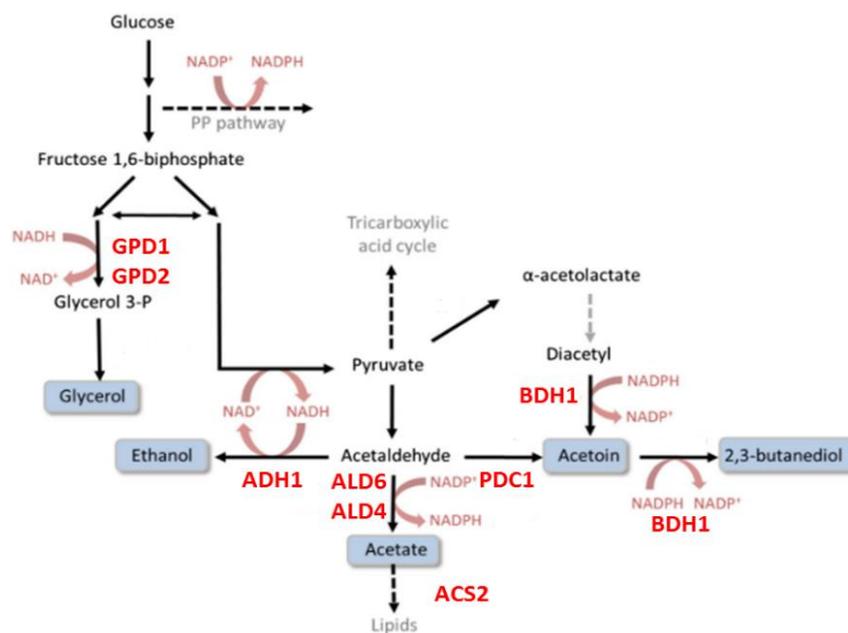


Figura 8. Principais vias envolvidas no desvio de rotas metabólicas durante a utilização de glicose como fonte de Carbono. Os genes que serão estudados neste projeto estão destacados em vermelho.

b) Genes associados ao transporte de açúcares, repressão catabólica e produção de aromas indesejáveis:

HXT1 (Low-affinity glucose transporter): Enzima envolvida no transporte de hexoses, principalmente de glicose e frutose (LEWIS; BISSON, 1991).

AGT1 (alpha-glucoside transporter): Esta enzima faz parte do complexo MAL1 e está diretamente envolvida no transporte de Maltotriose, sacarose e maltose em *S. cerevisiae*. O aumento da expressão desse gene estaria diretamente relacionado com um nível aumentado no consumo de maltose nas leveduras evoluídas (HAN *et al.*, 1995).

MAL31 (MALTose fermentation 31): Enzima responsável pela permeabilidade da maltose e identificada em leveduras industriais produtoras de etanol. É capaz também de transportar sacarose e por isso sua ativação na presença de glicose atuaria melhorando a capacidade fermentativa e aumentando a produção de etanol (CHOW; SOLLITTI; MARMUR, 1989).

PAD1 (Phenylacrylic Acid Decarboxylase) e *FDC1 (Ferulic acid DeCarboxylase)*: Enzimas associadas a formação do composto 4 Vinilguayacol (4-VG) que envolve a formação de sabores e aromas indesejáveis na cerveja. É esperado que as leveduras evoluídas tenham baixa expressão destes genes para que sejam aplicadas no processo industrial (RICHARD; VILJANEN; PENTTILÄ, 2015).

SUC2 (Invertase) – Enzima que hidrolisa a sacarose formando glicose e frutose. É inibida pela concentração de glicose e sua atividade está diretamente relacionada a eficiência da reação. Leveduras com maior atividade desta enzima precisam metabolizar o composto formado rapidamente e com isso a produção de etanol poderia ser acelerada. Apresenta uma forma intracelular e outra aderida a membrana. A ativação da enzima intracelular poderia ser aumentada pelo aumento de transporte de sacarose pelos receptores de maltose (veja figura 5) (MARQUES *et al.*, 2016)

SNF1 (Sucrose NonFermenting 1): Enzima associada a repressão catabólica pela presença de glicose) e associada ao estresse hiperosmótico e choque térmico. Atua como repressora da enzima invertase (*SUC2*) e também dos receptores de maltose e maltotriose. Uma redução na expressão deste gene é esperado nas leveduras evoluídas que sejam capazes de transportar ao mesmo tempo glicose e maltose (LESAGE; YANG; CARLSON, 1996).

OLE1 (OLEic acid requiring): É uma enzima que modifica ácidos graxos antes da sua integração na bicamada lipídica de membrana através de seu produto gênico único Δ -9 dessaturase de ácido graxo (Ole1p). *OLE1* superexpresso aumentou a quantidade de ácidos graxos insaturados na membrana de *S. cerevisiae* e foi capaz de exibir uma melhor tolerância ao etanol. A análise da expressão deste gene pode trazer informações importantes sobre esta resistência. (STUKEY; MCDONOUGH; MARTIN, 1990).

3.3.1 Extração de RNA, síntese do cDNA e análise por PCR quantitativo (q-PCR)

As amostras de leveduras testadas em fermentação foram processadas para obter o RNA de cada uma (extraídas pela metodologia do *Trizol-Thermo Scientific*). A integridade do RNA foi verificada por eletroforese em gel desnaturante de agarose 1,2%, sendo posteriormente quantificadas e tratadas com *DNAseI (Invitrogen)*. Após tratamento, foi realizada a síntese de cDNA usando o kit comercial *High capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems)* de acordo com as recomendações do fabricante. A reação de síntese seguiu uma etapa de 10 minutos a 25 °C, seguida de 120 minutos a 37 °C e 5 minutos a 85 °C.

3.3.2 Análise da expressão gênica.

As reações de PCR em tempo real foram realizadas no equipamento *StepOne Plus (Applied Biosystems)*. O kit *SYBR Green Master Mix (GoTaq Promega)* foi utilizado para detecção. Para cada reação, de 12 μ L finais, foram utilizados 6 μ L de 2X *SYBR Green Master Mix*, 5 μ L de *Mix* com os *primers* dos respectivos genes (FW/RV; diluídos em de água HLPC) e 1 μ L de cDNA. A reação foi submetida às seguintes condições: 50°C por 2 minutos, 95°C por 10 minutos, 40 ciclos de 95°C por 15 minutos e 60°C por 1 minuto. Os dados foram avaliados com o software do equipamento. O nível de expressão dos genes alvo foi normalizado de acordo com o gene endógeno utilizado *Beta Actina*, obtendo valores de expressão relativa ou quantidade relativa dada por $2^{-\Delta\Delta C_t}$ de acordo com um condição controle (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). Os *primers* utilizados para q-PCR estão listados na Tabela 4.

Tabela 4. Lista dos genes utilizados no análise da expressão gênica

Gene	Sequência primers	Relação Concentração FW/RV (nM/nM)	Threshold	Eficiência %
GPD1	FW: CATTGCCACCGAAGTCGCTC	150/150	0,1	98
	RV: GCCCTCGCTCTGAAATCCT			
GPD2	FW: TTCGAGTTGGGCTCCAAGGG	150/150	0,1	100
	RV: ACCAATGCTCCTGGCCACT			
ADH1	FW: CGGTGCTGTTCTAAAGGCCAC	100/100	0,111	96
	RV: GCATACCGACAAAACGGTGG			
PDC1	FW: CGCCGCTAAGGGTTACAAGC	150/150	0,22	104
	RV: TAGAAGCTGGGACAGCAGCG			
ALD6	FW: CCTTAGCCCGTGGGGATGTT	300/300	0,097	95
	RV: GCCGTCACCGGTGTTGATTG			
ALD4	FW: GCGGACGCCGAGTTGAAAAA	150/150	0,109	98
	RV: TGAACCCGCACAACAGACCT			
ACS2	FW: TGGTTCTGCTACCGTGCCAT	150/150	0,099	96
	RV: ACGGTCGTGGTGGTTCCAAA			
BDH1	FW: GGGGTCCAAAACCTGTCCCA	150/150	0,26	103
	RV: TGTCTCCGTTGTGGATGGCA			
AGT1	FW: AGGTATGGCCACCGACAAGG	150/150	0,078	99
	RV: GCGCTGCTTCCAGAACCAAA			
MAL31	FW: TGGGACAGGCATTGTGTGGT	150/150	0,2	103
	RV: GTTGACCGAACGCCAACAT			
SUC2	FW: GGGGCCATGCTACTTCCGAT	150/150	0,1	95
	RV: TCGTTACGCTTGGGAGCGAT			
SNF1	FW: CACAGCACCTGCCAATGCAA	150/150	0,08	99
	RV: CCCCTCTCCAGCGTTTTGA			
PAD1	FW: TCCTCCGGTACCTGCGTTTT	150/150	0,072	99
	RV: AGTGTGAGCGTGGATGCCAA			
FDC1	FW: TTAGGTTGCCAGCCGGTTT	150/150	0,07	100
	RV: GAGCCCCAGATGATGGGCAA			
HTX1	FW: GCTGGCAGAATCGACGAAGC	150/150	0,7	100
	RV: GCAGTACCAGCGGCTCTCAT			
ADR1	FW: ACGAGAGCGTTCGCAAGACA	150/150	0,072	100
	RV: GTTGCAGAGGCCACAGGGAT			
BACT	-	100/300	0,1	99
	-			
OLE1	-	150/150	0,086	97
	-			

4 Resultados e discussão

4.1 Identificação das linhagens de leveduras com potencial utilização para a indústria cervejeira.

Para uma rápida identificação de gênero de leveduras, foi utilizado um método de cultivo em placas com meio YCB acrescido de L-Lisina. Este é um meio de cultura para classificação de leveduras através da assimilação de nitrogênio. Neste cultivo, a Lisina é a única fonte de Nitrogênio e isto faz com que seja possível a classificação das linhagens, pois apenas crescem ali as leveduras consideradas como Não-*Saccharomyces*, assim as leveduras do gênero *Saccharomyces* tem pouco ou nulo crescimento quando utilizam a L-Lisina como fonte de nitrogênio (FOWELL, 1965). Utilizando *C. albicans* como levedura controle Não-*Saccharomyces*, foi possível identificar que só 124 leveduras foram consideradas *Saccharomyces* das 289 leveduras isoladas no banco. Um exemplo disso, apresenta-se na Figura 9, onde só observa-se apenas o crescimento da levedura controle. As imagens das placas foram processadas com o programa ImageJ e analisados usando o *software* Morpheus para gerar um *Heat map* (Figura 10), onde é possível a visualização de quais leveduras cresceram ou não (DITTMAR; REID; ROTHSTEIN, 2010).

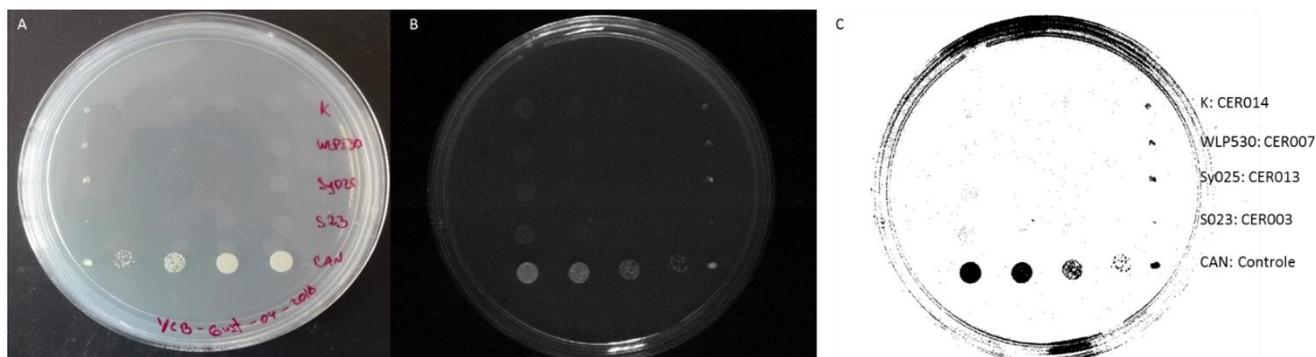


Figura 9. Exemplos de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* comerciais usadas em cerveja e testadas em meio YCB acrescido de Lisina. A. Fotografia tomada pelo inverso da placa; B. Imagem digitalizada da placa; C. Imagem processada com o *software* ImageJ. Todas as leveduras *Saccharomyces* não conseguiram crescer no meio sólido YCB-L-Lisine.

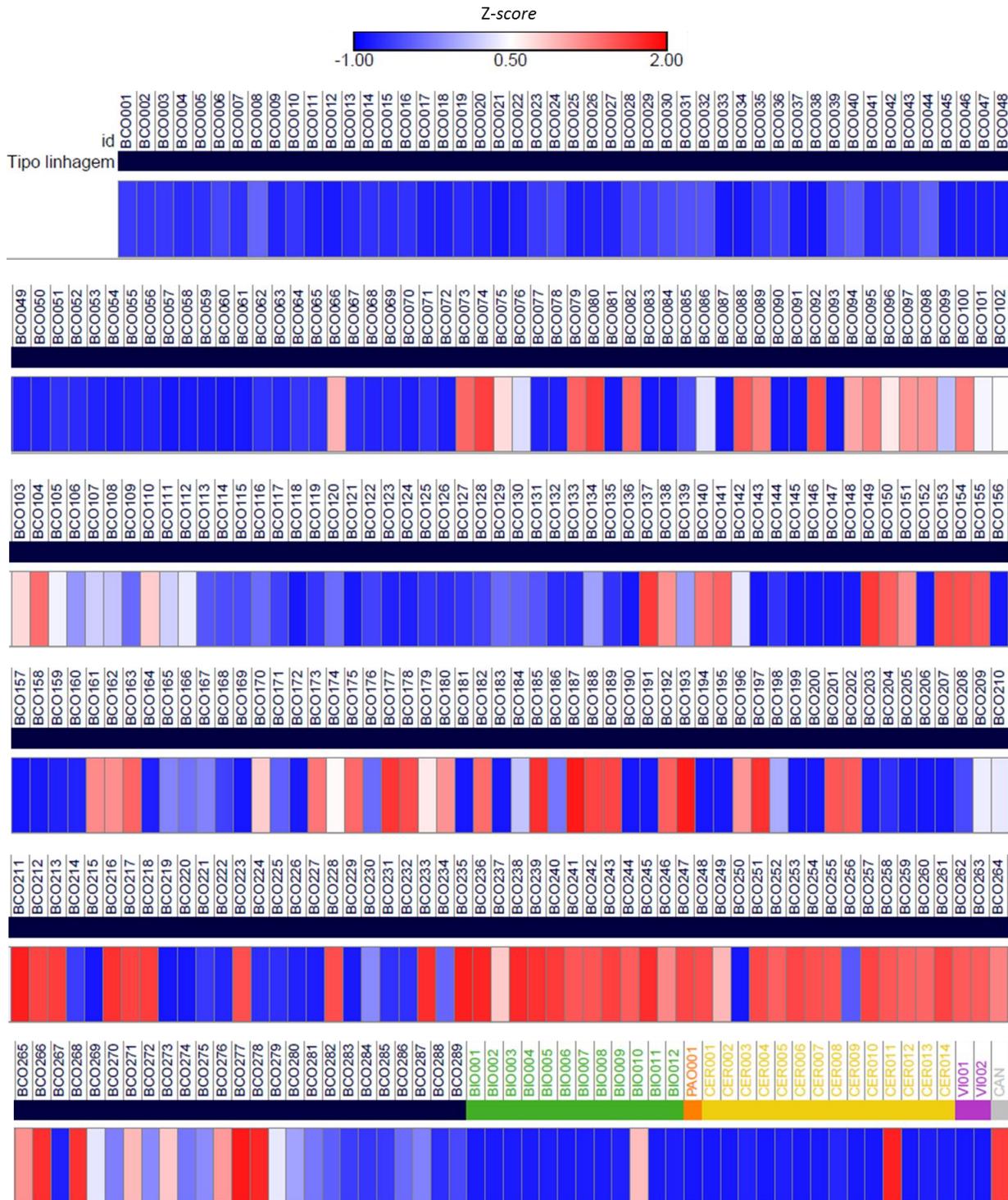


Figura 10. Heat map gerado após processamento das imagens das leveduras cultivadas em placas YCB-Lisine. Os tipos de linhagens estão apresentados com as cores: ■ Leveduras do Banco LGBA (isolados de usinas); ■ Leveduras *S. cerevisiae* de bioetanol; ■ Levedura *S. cerevisiae* de pão; ■ Leveduras *S. cerevisiae* de cerveja; ■ Leveduras *S. cerevisiae* de vinho; ■ Levedura *C. albicans* usada como controle. As cores do Z-score indicam: ■ As leveduras Não cresceram (possivelmente do gênero *Saccharomyces*); ■ As leveduras cresceram (possivelmente Não-*Saccharomyces*, outros gêneros de leveduras).

A análise em YCB-Lisina permitiu uma identificação rápida de 124 linhagens (Figura 10) que provavelmente pertencem ao gênero *Saccharomyces* (GALLONE *et al.*, 2016; LORCA *et al.*, 2018). Para dar continuidade ao processo de seleção de leveduras para cerveja, as 124 linhagens foram testadas fisiologicamente em meios que contêm como fonte de carbono maltose, principal açúcar na fermentação nas indústrias cervejeiras.

4.1.1 Testes de crescimento em maltose e extrato de malte

Nesta etapa, a técnica *Dropout* também foi utilizada, a diferença foi que as leveduras pré-selecionadas foram cultivadas em meio maltose (YPM 2%) e extrato de malte (YPEM 2%; seção 3.3 da metodologia) e as placas foram incubadas em duas temperaturas diferentes, sendo 20°C e 30°C durante 2 dias. As imagens foram analisadas e processadas, onde as diluições 1:1 e 1:10 do *dropout* de maltose (YPM2%) foram usadas para a construção de um novo *heat map* (Figura 11). Os testes realizados têm o objetivo de identificar aquelas leveduras que consomem fontes de carbono diferentes da glicose, como maltose, ou uma mistura de açúcares, como extrato de malte.

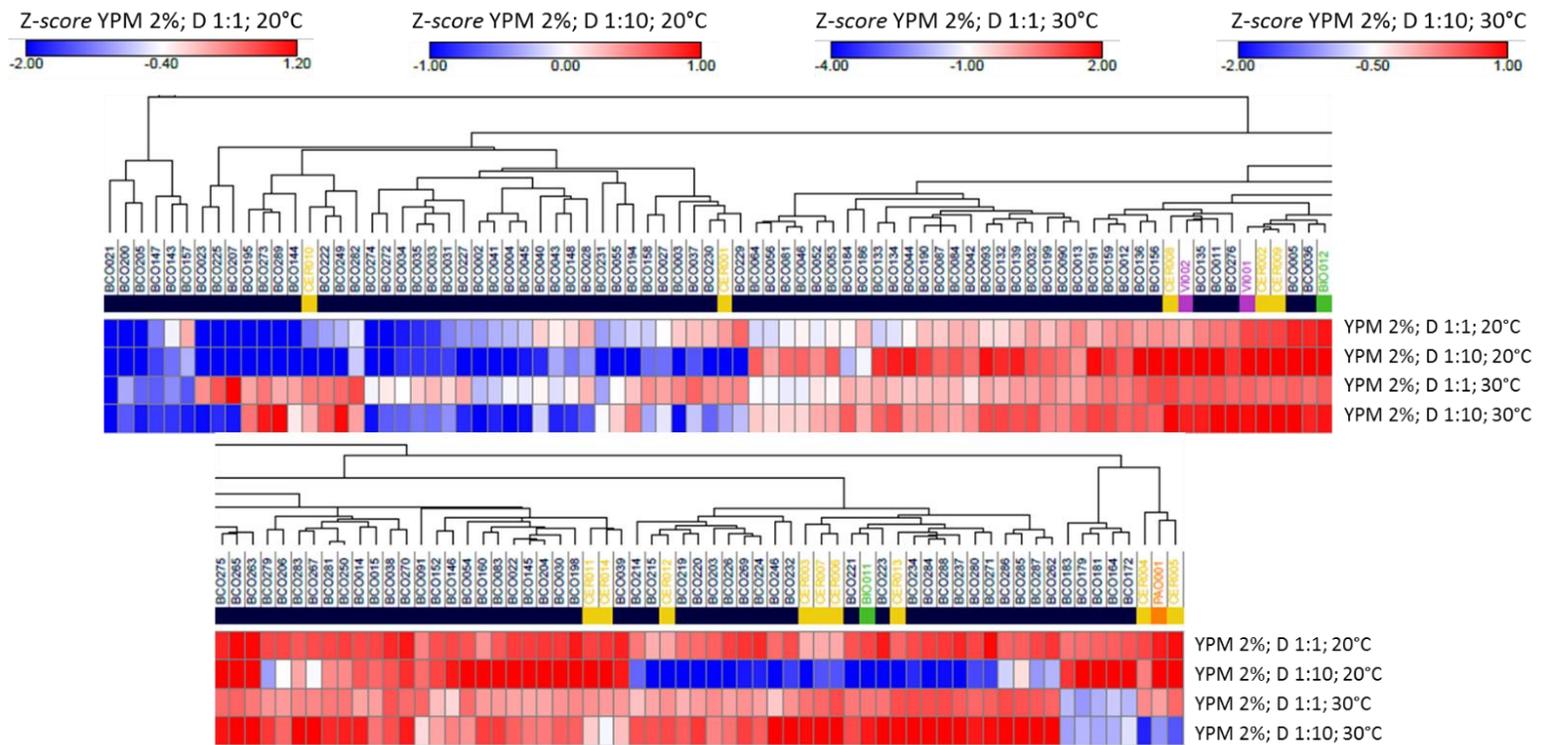


Figura 11. *Heat map* de leveduras cultivadas em maltose (YPM 2%) a 20 e 30°C. A figura foi segmentada em duas partes para simplificar a visualização. As cores das linhagens são as mesmas da figura 8, assim como as cores de cada Z-score.

A caracterização fenotípica realizada nesta etapa ajudou na identificação de 64 leveduras que conseguiram consumir maltose a 20 e 30° C. Essas linhagens poderiam ser as escolhidas para a evolução dirigida em cervejas, porém o número de cepas continua sendo alto. Mesmo assim, foi sugerido continuar fazendo teste de caracterização fenotípica tais como osmotolerância em quantidades altas de extrato de malte ou nas condições de fermentação. Infelizmente não conseguimos quantificar este crescimento devido à alta concentração de extrato de malte o gotejamento não foi bem sucedido, afetando os resultados (Figura 12). Nesta etapa foi necessário mudar a estratégia.

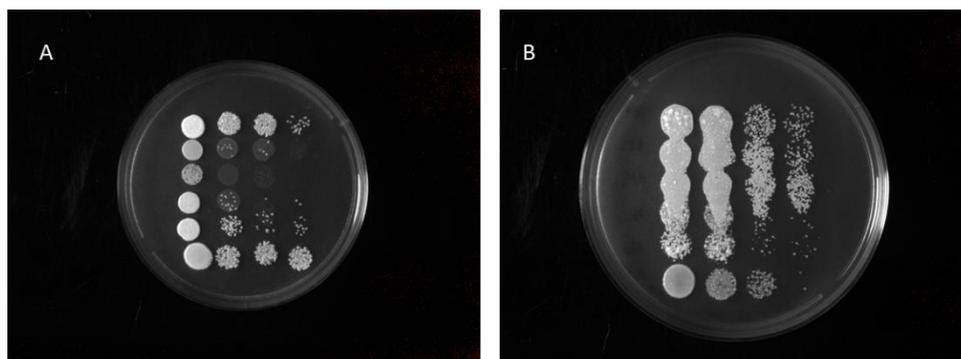


Figura 12. Testes em meio extrato de malte (YEM 2%). A. Teste correto; B. Teste incorreto por espalhamento da gota.

4.1.2 Identificação molecular para caracterização individual das linhagens isoladas e classificação quanto a espécie.

As 64 linhagens selecionadas foram submetidas a técnica de PCR-RFLP da região 5.8S-ITS do complexo gênico nuclear que codifica para a região 5.8S do RNA ribossômico. O produto PCR obtido foi analisado de duas maneiras diferentes: (I) Submetido a eletroforese em gel de agarose; (II) Sequenciamento do produto PCR. Os resultados de eletroforese (Figura 13) indicaram que a maioria dos amplificados têm um tamanho de amplicon de aproximadamente 900 pares de bases (pb), isto revelou que uma grande parte das linhagens pode ser considerada do gênero *Saccharomyces* de acordo com o reportado em literatura (ESTEVE-ZARZOSO *et al.*, 1999). Mesmo assim, houveram alguns isolados que apresentaram outros tamanhos de amplicons e foram associadas outros gêneros de leveduras ou até mesmo uma provável mistura de diferentes leveduras (Figura 13, poços 9, 10, 12, 13). Os produtos de PCR foram sequenciados e seu resultado foi comparado utilizando a ferramenta BLASTN (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Finalmente, do total de isolados foram obtidas 47

leveduras *Saccharomyces* e 17 leveduras Não-*Saccharomyces*, vale salientar que o percentagem de erro da técnica fisiológica utilizando L-Lisina foi de 26,6%, mostrando que esta técnica é importante quando é necessário processar grandes quantidades de isolados como um *screening* inicial, mas que deve ser validada por outra técnica molecular.

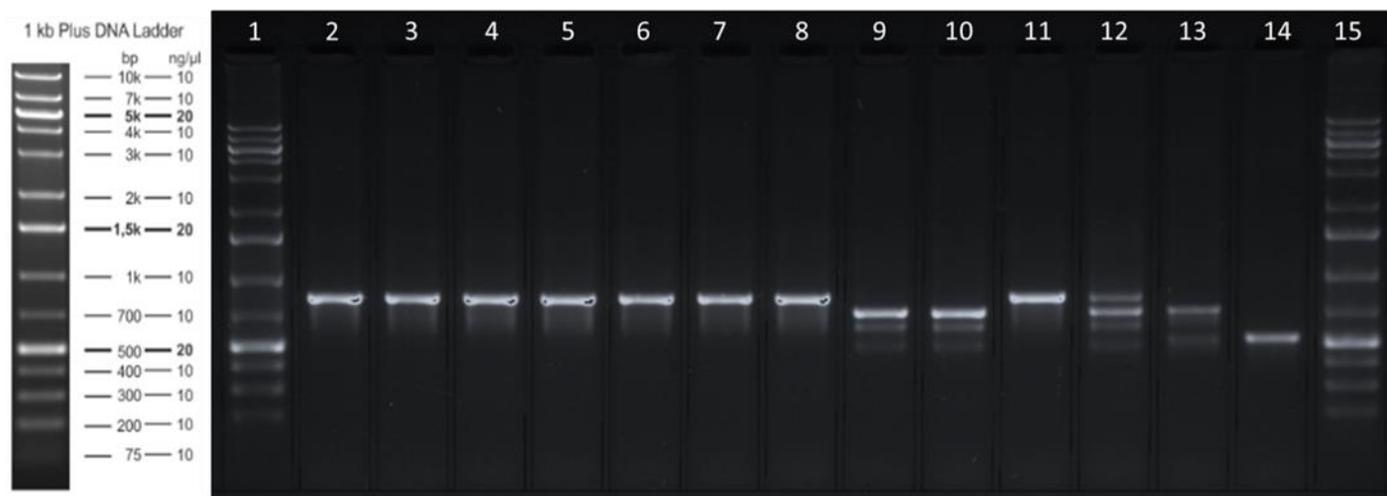


Figura 13. Exemplo de eletroforese em gel de agarose obtido para conferir o gênero *Saccharomyces*. Esquerda: Marcador de tamanho molecular de 1Kb plus (*Cellco*). 1 e 15: Marcador tamanho molecular. 2: Produto amplificado de DNA da linhagem CAT-1, controle positivo. 3 até 13: Produto amplificado de DNA das leveduras estudadas. 14: Produto amplificado de DNA da levedura *Candida albicans* (não-*Saccharomyces*).

Para conseguir melhor identificar a espécie, foi necessário um experimento de digestão do produto de PCR utilizando a enzima *HaeIII*. Esta técnica permitiria a separação de fragmentos com um padrão definido para a espécie *S. cerevisiae*, para assim obter um polimorfismo característico com bandas dos seguintes tamanhos: 320, 230, 180 y 150 pb (ESTEVE-ZARZOSO *et al.*, 1999). Infelizmente, neste trabalho não conseguimos identificar o padrão reportado no trabalho anteriormente citado. Nossos resultados apresentaram um perfil diferente inclusive para a linhagem que é identificada como *S. cerevisiae* (CAT-1) utilizada como controle positivo (Figura 14). Estamos tentando aperfeiçoar a técnica de modo a obter os resultados esperados. Por isso, o trabalho continuou com os 47 isolados *Saccharomyces* determinados por sequenciamento do ITS-PCR confirmando que estas leveduras pertencem ao clado *Saccharomyces sensu stricto*.

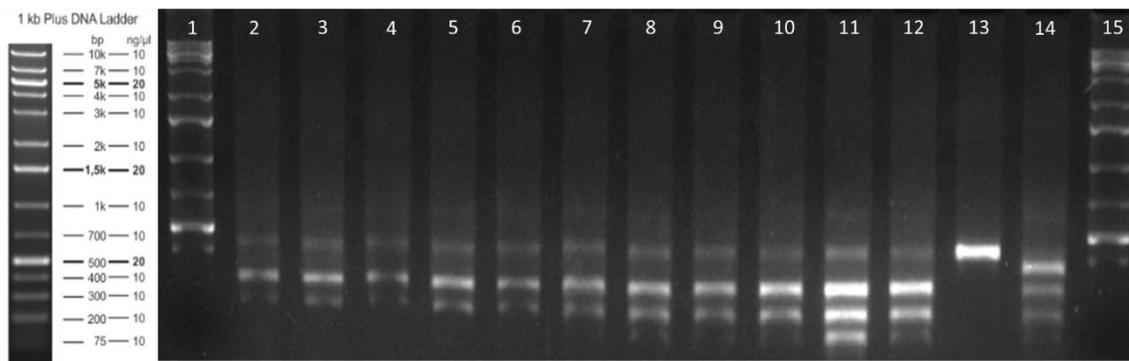


Figura 14. Exemplo de eletroforese em gel de agarose da reação enzimática com *HaeIII* para conferir espécies *Saccharomyces cerevisiae*. Esquerda: Marcador de tamanho molecular de 1Kb plus (*Cellco*). 1 e 15: Marcador tamanho molecular. 2-12: Digestão enzimática do produto amplificado de DNA das leveduras estudadas. 13: Digestão enzimática do produto amplificado de DNA da levedura *Candida albicans* (não-*Saccharomyces*). 14: Digestão enzimática do produto amplificado de DNA da linhagem CAT-1, controle positivo. No gel é possível observar padrões degradados nos poços 2,3,4,5,6,7.

4.1.3 Testes de crescimento e fermentativos comparativos utilizando maltose

Para dar continuidade à seleção de leveduras, os 47 isolados selecionados foram testados em microplacas tanto em crescimento quanto na fermentação, utilizando 12% YPD ou 12% YPM (Maltose) e só uma condição de temperatura (20 °C). Na figura 15 se apresenta só um exemplo de curvas de crescimento obtidas em duas fontes de carbono diferentes (no total foram 47 linhagens testados), devido à quantidade de linhagens testados se apresentam resultados que conseguem explicar diferenças e motivos da seleção de leveduras para os próximos testes. No crescimento em YPD observou-se que não houveram diferenças entre linhagens. No entanto, quando as leveduras foram crescidas num outro tipo de fonte de carbono, neste caso maltose, foi possível evidenciar uma queda no crescimento em alguns linhagens tais como LGBA-005 e LGBA-203 (Figura 15 B), mesmo que elas conseguiram crescer em meio sólido 2% YPM-ágar (veja tópico anterior 3.1.2), esses resultados foram exatamente os esperados, pois a maltose não é a açúcar preferida pelas leveduras, portanto o estresse osmótico foi maior para estas cepas. Já as linhagens LGBA-093, LGBA-287 e LGBA-288 apresentaram uma melhor capacidade de crescimento em maltose. Porém nas micro fermentações, a levedura LGBA-093 não conseguiu consumir as mesmas quantidades de maltose em comparação ao controle S-04 (Figura 16).

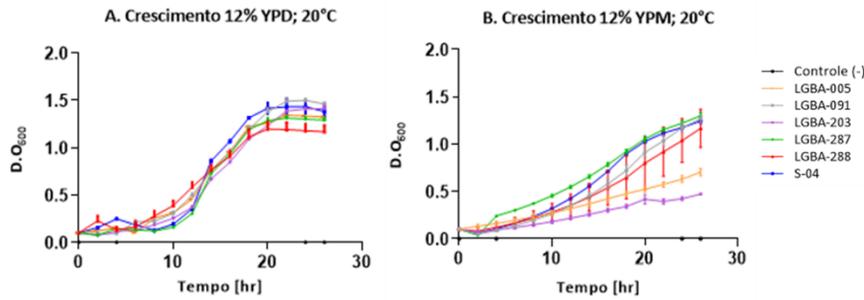


Figura 15. Exemplo de crescimento de linhagens isolados em duas fontes de carbono diferentes. A. crescimento em 12% YPD. Crescimento em 12% YPM.

Neste sentido, LGBA-287 e LGBA-288 foram as únicas leveduras selecionadas para fermentações em escala de laboratório porque elas consumiram maiores quantidades de maltose na mesma proporção que o controle, vale salientar que a decisão foi tomada em virtude do crescimento em maltose e do consumo deste açúcar nas micro- fermentações. Os testes comparativos de *Turkey* indicaram que houveram diferenças estatisticamente significativas quando foram analisadas as 47 linhagens, mesmo assim, isto demonstrou a grande potencialidade destas leveduras para fermentar em maltose e muito provavelmente em extrato de malte, as linhagens selecionadas também poderiam ser evoluídas em futuras experiências de laboratório para conseguir adaptações ao processo de elaboração de cerveja.

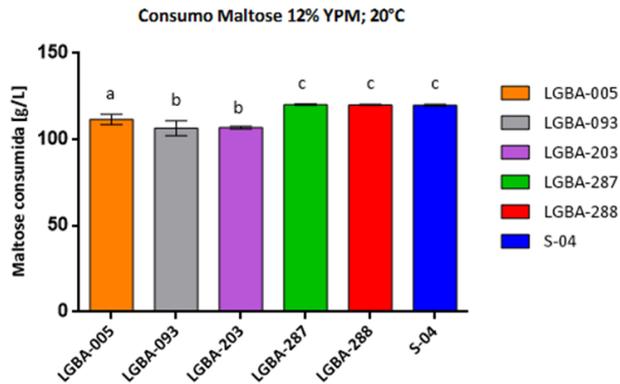


Figura 16. Exemplo de leveduras que consomem maltose testadas em micro- fermentações (12% YPM).

4.1.4 Produção de cervejas e testes sensoriais

Como dito anteriormente, com os resultados das micro-fermentações foram selecionadas duas linhagens do banco do grupo de pesquisa (LGBA-287 e LGBA-288), como controle foi utilizada a cepa comercial S-04 (*Fermentis*), e para avaliar futuras evoluções foi testada a levedura CAT-1 evoluída para o processo de bioetanol (nomeada como CATEV). A fermentação foi realizada com 12% YPEM (Extrato de Malte), durante 7 dias a 20 °C, o processo foi acompanhado diariamente através da pesagem de cada tubo para avaliar a produção de CO₂ (Figura 17 A e B). Uma vez quantificada a produção de CO₂ foi possível determinar que não houveram diferenças estatisticamente significativas entre cada linhagem testado. Mesmo assim, a levedura evoluída CATEV apresentou uma maior produção de CO₂, esse resultado sugere que existem oportunidades de evoluções para as linhagens isoladas pelo grupo de pesquisa, pois esses linhagens foram isoladas desde dornas de bioetanol.

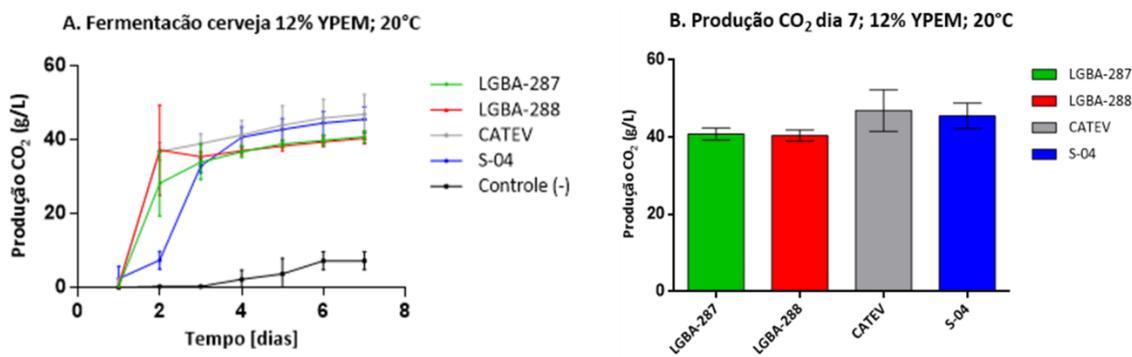


Figura 17. Fermentação para produção de cerveja em escala de laboratório. A. Acompanhamento diário da produção de CO₂. B. Produção de CO₂ no final do processo. Não houveram diferenças estatísticas.

Para conseguir uma melhor compreensão dos resultados da fermentação foi necessário obter parâmetros físico-químicos mediante análise das amostras no final da fermentação (dia 7) utilizando HPLC (Tabela 5). Esses parâmetros indicaram valores de concentrações dos metabolitos produzidos, tais como etanol, ácidos orgânicos, glicerol e também indicou valores para maltose, glicose e frutose residual. Os resultados mostraram que as leveduras testadas consumiram maltose mesmo num meio complexo como o extrato de malte, infelizmente o teor de etanol foram baixas respeito a consumo teórico de maltose e em comparação à produção de CO₂, isto pode ser explicado por vários motivos, entre eles surge a possibilidade que o extrato de malte utilizado não apresente as quantidades de maltose especificadas pelo fornecedor (geralmente 60-70% de maltose). Uma outra explicação pode ser que houve um efeito osmótico associada à complexidade do meio extrato de malte, que contém 10-20% de Glicose, 60-70% maltose, 10-20% maltotriose e outros açúcares não fermentáveis. Neste caso, não foram observadas diferenças significativas entre as amostras de cada

linhagem em maltose, glicose, frutose ácidos orgânicos, piruvato e glicerol, só foi possível identificar diferenças no etanol respeito à levedura controle S-04, onde a produção de etanol foi levemente maior nesta cepa industrial.

Tabela 5. Parâmetros físico-químicos obtidos na fermentação de cerveja

	LGBA-287	LGBA-288	CATEV	S-04	Controle (-)
Maltose [g/L]	0,132 ± 0,014 ^a	0,113 ± 0,005 ^a	0,120 ± 0,002 ^a	0,110 ± 0,151 ^a	N.D
Glicose [g/L]	0,030 ± 0,001 ^a	0,029 ± 0,001 ^a	0,03 ± 0,002 ^a	0,033 ± 0,068 ^a	N.D
Frutose [g/L]	0,029 ± 0,001 ^a	0,028 ± 0,0004 ^a	0,029 ± 0,002 ^a	0,031 ± 0,070 ^a	N.D
Ác, Succínico [g/L]	1,095 ± 0,039 ^a	1,117 ± 0,0329 ^a	1,035 ± 0,139 ^a	0,914 ± 1,336 ^a	1,109 ± 0,010 ^a
Ác, Láctico [g/L]	0,199 ± 0,012 ^a	0,198 ± 0,008 ^a	0,217 ± 0,006 ^a	1,3705 ± 2,056 ^a	0,182 ± 0,009 ^a
Ác, acético [g/L]	0,3 ± 0,033 ^a	0,286 ± 0,022 ^a	0,308 ± 0,007 ^a	0,886 ± 1,355 ^a	0,251 ± 0,038 ^a
Glicerol [g/L]	0,207 ± 0,018 ^a	0,221 ± 0,001 ^a	0,192 ± 0,005 ^a	0,471 ± 0,681 ^a	0,019 ± 0,000 ^a
Piruvato [g/L]	0,074 ± 0,003 ^a	0,073 ± 0,001 ^a	0,073 ± 0,007 ^a	0,163 ± 0,192 ^a	0,0615 ± 0,0007 ^a
Etanol [g/L]	3,735 ± 0,066 ^a	3,803 ± 0,023 ^{ab}	3,807 ± 0,037 ^{ab}	4,070 ± 0,035 ^c	0 ± 0 ^d

ND: Não houve dados para o composto. As diferenças estatísticas são apresentadas por cada letra analisadas por linha e comparando linhagens. Estatística: ANOVA e testes comparativos de *Turkey*.

Uma vez finalizada a fermentação, os protótipos de cervejas obtidas a escala de laboratório foram degustadas, e suas principais características foram descritas na Tabela 6. Mesmo que os valores de etanol não foram os esperados, foi possível identificar aromas e sabores que as leveduras produziram. Vale salientar que as leveduras isoladas de bioetanol são descritas na literatura como produtoras de aromas e sabores indesejáveis também nomeados como *off-flavors*, esses aromas estão associados à produção de diacetila e fenóis voláteis tais como o 4-vinilguayacol (4-VG). Na produção de 4-VG estão envolvidos dois genes chaves, PAD1 e FDC1, eles são importantes na descarboxilação do precursor ácido ferúlico (GALLONE *et al.*, 2016; WHITE *et al.*, 2015). Neste trabalho, os genes PAD1 e FDC1 foram analisados para a produção de cerveja (Tópico 4.1.5, figura 18), assim foi possível observar de maneira geral o seguinte:

(I) Linhagem 2887: ocorreu a ativação dos genes PAD1 e FDC1 só no primeiro dia da fermentação, no último dia não houve evidencia de expressão.

(II) Linhagem 288: apresentou ativação dos genes chaves para a produção de 4-VG no primeiro e último dia da fermentação. Esse efeito combinado eventualmente pode ser uma explicação da obtenção de uma cerveja que não foi conseguida corretamente em sabores (com gosto ruim), como foi descrita na Tabela 6.

(III) Linhagem CATEV: apresentou uma complexidade aromática interessante. Os dados da expressão gênica indicaram que só o gene FDC1 permaneceu expresso.

(IV) Linhagem comercial S-04: a descrição da degustação de cerveja indicou há complexidade aromática (cerveja neutra). Enquanto que houve uma baixa expressão dos genes PAD1 e FDC1, uma característica já descrita em cepas comerciais de cervejas

Por tanto, a expressão dos genes PAD1 e FDC1 é complementar, se essa expressão fosse mantida no tempo a complexidade aromática aumenta, isto deve ser conferido em futuros testes quantificando as concentrações de 4-VG. Neste trabalho a obtenção de aromas, mais que uma desvantagem, foi pensada como uma oportunidade para desenvolver cervejas com novas características assim como são produzidas as cervejas alemãs do estilo *Hefeweizen* (GALLONE *et al.*, 2016). Com os resultados obtidos, também é possível sugerir a possibilidade de desenvolver novas linhagens utilizando técnicas de hibridação é assim conseguir diferentes perfis aromáticos.

Tabela 6. Descrição de aromas e sabores nas cervejas geradas

Linhagem	Descrição
LGBA-287	O primer aroma em nariz é forte, boa mistura entre mosto e levedura, a cerveja têm sabor agradável sem doce.
LGBA-288	Aroma neutro, mas o sabor foi ácido e um pouco de amargo no paladar, a cerveja não foi conseguida corretamente.
CATEV	Aroma neutro em nariz e um leve aroma de finas ervas, têm uma complexidade de aromas interessantes, a cerveja obtida tem sabor semelhante a banana.
S-04	Neutra tanto em aromas quanto em sabores.
Controle (-)	Evidentemente não fermentada, mas têm aroma o característico do mosto.

4.1.5 Análise da expressão genética no processo de produção de cervejas

Na secção anterior descrevemos como foi possível correlacionar os aromas descritos numa degustação com os dados da expressão gênica, porém para complementar essa informação de maneira mais robusta precisam-se da quantificação de compostos químicos. Neste sentido, na Tabela 5 de parâmetros físico-químicos houveram dados de etanol e maltose que podem ser interessantes de estudar junto com a expressão gênica (Figura 18) Os resultados da expressão relativa de genes foram analisadas a partir de amostras obtidas no início (dia 1; t_i) e fim da fermentação (dia 7; t_f) utilizando a técnica de PCR em tempo real em cada um dos linhagens testados, sendo o controle a levedura comercial S-04.



Figura 18. *Heat map* da expressão relativa de genes relacionados a eficiência fermentativa na produção de cerveja. Em vermelho a expressão gênica é maior e a escala de cores diminui até atingir a cor azul (menor expressão gênica), em cinza não houve dado para essa amostras. As amostras foram analisadas em diferentes tempos. t_i: tempo inicial da fermentação. t_f: final do processo após 7 dias de fermentação.

Para começar, foram quantificados os valores da expressão relativa de genes utilizando o sistema de normalização $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (veja dados em Anexos A.1) (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). Logo, com esses valores foi gerado um *Heat map* (software *Morpheus*, *BroadInstitute*) que apresentou uma visão geral da expressão relativa de genes.

O estudo gene por gene revelou que houve um evidente desvio das rotas metabólicas no final (t_f) da fermentação principalmente nas linhagens LGBA-288 e CATEV, ou seja, essas cepas no último dia

de processo já deixam de produzir etanol e começaria a produção de outros metabolitos. Primeiro, foram estudados os genes relacionados à produção de glicerol, onde o gene GPD1 não apresentou uma níveis de expressão altos no primeiro dia, só houve evidencia da expressão no sétimo dia (t_f) na levedura LGBA-288, nesse mesmo tempo o gene GPD2 apresentou níveis elevados de expressão em três cepas (LGBA-288, CATEV, S-04) (SAINT-PRIX; BÖNQUIST; DEQUIN, 2004). Em segundo lugar, foi analisado o gene ADH1 envolvido diretamente na produção de etanol, e novamente LGBA-288 expressou este gene, mas também o gene ADR1 foi altamente expresso.

Por sua parte, a expressão do gene ADR1 revelou que houve um desvio da rota metabólica à produção de acetaldeído, impedindo a produção de etanol, isto é devido a que ADR1 codifica para o fator de transcrição Adr1, envolvido na capacidade de regular a expressão ADH2 (YOUNG *et al.*, 2003). No entanto, Adr1 pode participar ativando diferentes genes tais como ALD6 e ALD4 (importantes na formação de acetato), isto foi observado no fim da fermentação em LGBA-288. O gene ALD4 é reprimido na presença de glicose, por isso sua expressão foi alta em t_f , pois a glicose é a fonte de carbono preferida pelas leveduras e há fatores de transcrição envolvidos na repressão de genes por glicose (ARANDA; DEL OLMO, 2003; MEADEN *et al.*, 1997). Além disso, o gene ACS2 atingiu altos níveis de expressão, envolvido na sínteses de esteróis de AcetilCoA, de acordo com a literatura ACS2 sempre é ativado no processo de fermentação (BERG; STEENSMA, 1995). Finalmente, BDH1 foi expresso em LGBA-288, revelando que a via metabólica pode-se desviar para a produção de acetoina e diacetila (GONZÁLEZ *et al.*, 2000), este último composto é considerado *off-flavor* (aroma indesejável) e confere amaras similares a “manteiga” como foi dito na tabela 4 (WALKER; STEWART, 2016).

Não foi possível obter uma maior quantidade de informação de acordo com os metabolitos quantificados com HPLC, devido as baixas concentrações destes em relação ao controle negativo (Tabela 5). Curiosamente, quando existem desvios nas rotas metabólicas, essas sinais podem ser consideradas como compensações (*Trade-off*), ou seja, possivelmente as leveduras com maior desvio de rotas, LGBA-288 e CATEV, estavam passando por um processo de adaptação natural na fermentação em extrato de malte, isto também é uma sinal para conferir em um futuro que CATEV (CAT-1 evoluída para bioetanol) continúa com o processo de evolução adaptativa já iniciado (veja tópico 4.2).

No que diz respeito ao transporte de açúcares, o gene HXT1 foi expresso no início da fermentação principalmente em LGBA-287 e CATEV. Conforme descrito anteriormente, esperava-se que a glicose

seja transportada antes que outros açúcares ao interior da célula. Enquanto ao gene AGT1, só S-04 (levedura controle) conseguiu expressar esse gene no primeiro dia, e CATEV só no tempo final (t_f), talvez a expressão de AGT1 no primeiro dia faz uma diferença no consumo eficiente de açúcares na fermentação, por isto vale salientar que S-04 produziu a maior quantidade de etanol. Por sua parte, o gene MAL31 foi expresso nas linhagens LGBA-287, LGBA288 e CATEV revelando que ainda as leveduras estavam transportando açúcares e possivelmente o processo de fermentações não foi finalizado. Conforme o discutido, podemos sugerir o desenvolvimento de estratégias de evolução adaptativa para o processo de fermentação em cerveja visando estudar aquelas sinais que indicaram *trade-off* e o uso eficiente de transportadores em maltose. Na figura 26 do Anexo A.2 apresenta-se uma estratégia pensada para a evolução em cervejas, estas metodologias foram baseadas na evolução adaptativa feita para a produção do bioetanol.

4.2 Testes de fermentação em Bioetanol

No caso do bioetanol, após o processo de evolução adaptativa foram obtidos seis (6) fenótipos evoluídos nas diferentes condições já descritas (Tabela 7). Em seguida, os fenótipos foram testados micro-fermentações em 20% YPD ou 20% YPS (Sacarose) durante 8 horas simulando os dosagens de meio de cultivo feitos nas usinas, o objetivo destes testes foi selecionar aquele fenótipo com melhor consumo de açúcares (veja Figura 19).

Tabela 7. Fenótipos evoluídos para fermentação em bioetanol.

Código fenótipo evoluído	Linhagem	Descrição
CAT-1	CAT-1	Sem evoluir, controle.
CAT AG	CAT-1	Evoluída em condições aeróbicas (A), em concentrações crescentes de glicose (G).
CAT MG	CAT-1	Evoluída em condições aeróbicas e anaeróbicas (Mista, M), em concentrações crescentes de glicose (G).
CAT ANG	CAT-1	Evoluída em condições anaeróbicas (AN), em concentrações crescentes de glicose (G)
CAT AEM	CAT-1	Evoluída em condições aeróbicas (A), em concentrações crescentes de extrato de malte (EM).
CAT MEM	CAT-1	Evoluída em condições aeróbicas e anaeróbicas (Mista, M), em concentrações crescentes de extrato de malte (EM).
CAT ANEM	CAT-1	Evoluída em condições anaeróbicas (AN), em concentrações crescentes de extrato de malte (EM).

Os resultados das micro-fermentações indicaram que não houveram diferenças estatisticamente significativas no consumo de ART em 20% YPD. Por tanto, a seleção do fenótipo para as seguintes fermentações em escala de laboratório foi baseada nos dados de consumo de ART em 20% YPS. O fenótipo selecionado foi CAT MEM: CAT-1 evoluída em condições mistas (M) de aerobiose e anaerobiose adaptada em extrato de malte (EM)

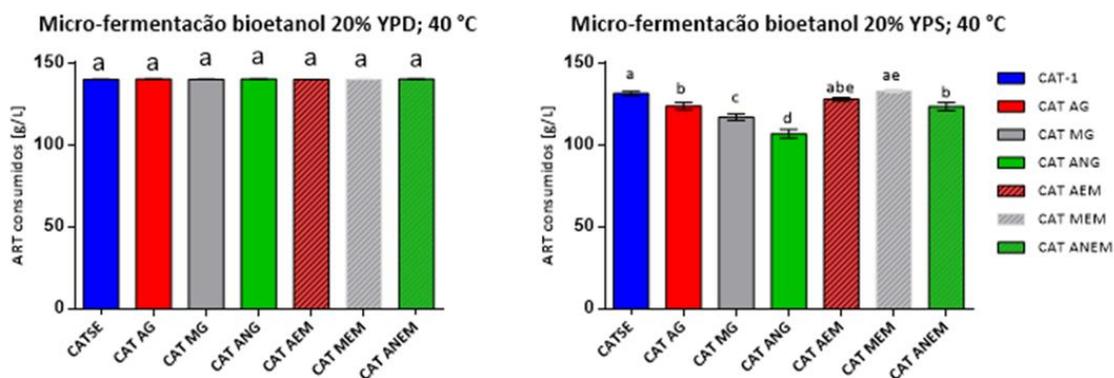


Figura 19. Resultados de consumo de ART em micro-fermentações. A. ART consumidos [g/L] para o meio de fermentação 20% YPD. B. ART consumidos [g/L] para o meio de fermentação 20% YPS.

Com a finalidade de verificar a capacidade fermentativa das leveduras *S. cerevisiae* CAT-1 sem evoluir (utilizada em usinas), CATEV (CAT-1 evoluída) e a levedura LGBA-01 (termotolerante, isolada pelo grupo LGBA), foram realizados ensaios de fermentação em diferentes condições: 20% YPS (Sacarose; S); 20% YPD (Glicose, G); durante 4 ciclos em duas temperaturas diferentes de 30 e 40°C, simulando as condições de dosagem de meio fermentativo da usina e usando um tratamento ácido entre cada ciclo. O objetivo principal destes testes foi avaliar se essas leveduras apresentam diferenças no processo visando indicadores indiretos (como produção de CO₂), parâmetros físico-químicos obtidos em HPLC (Etanol, açúcares, piruvato, ácidos orgânicos, glicerol) e indicadores de expressão gênica para estudar o desvio das rotas metabólicas. Na figuras 20 se apresenta os resultados de produção de CO₂ em todos os ciclos da fermentação.

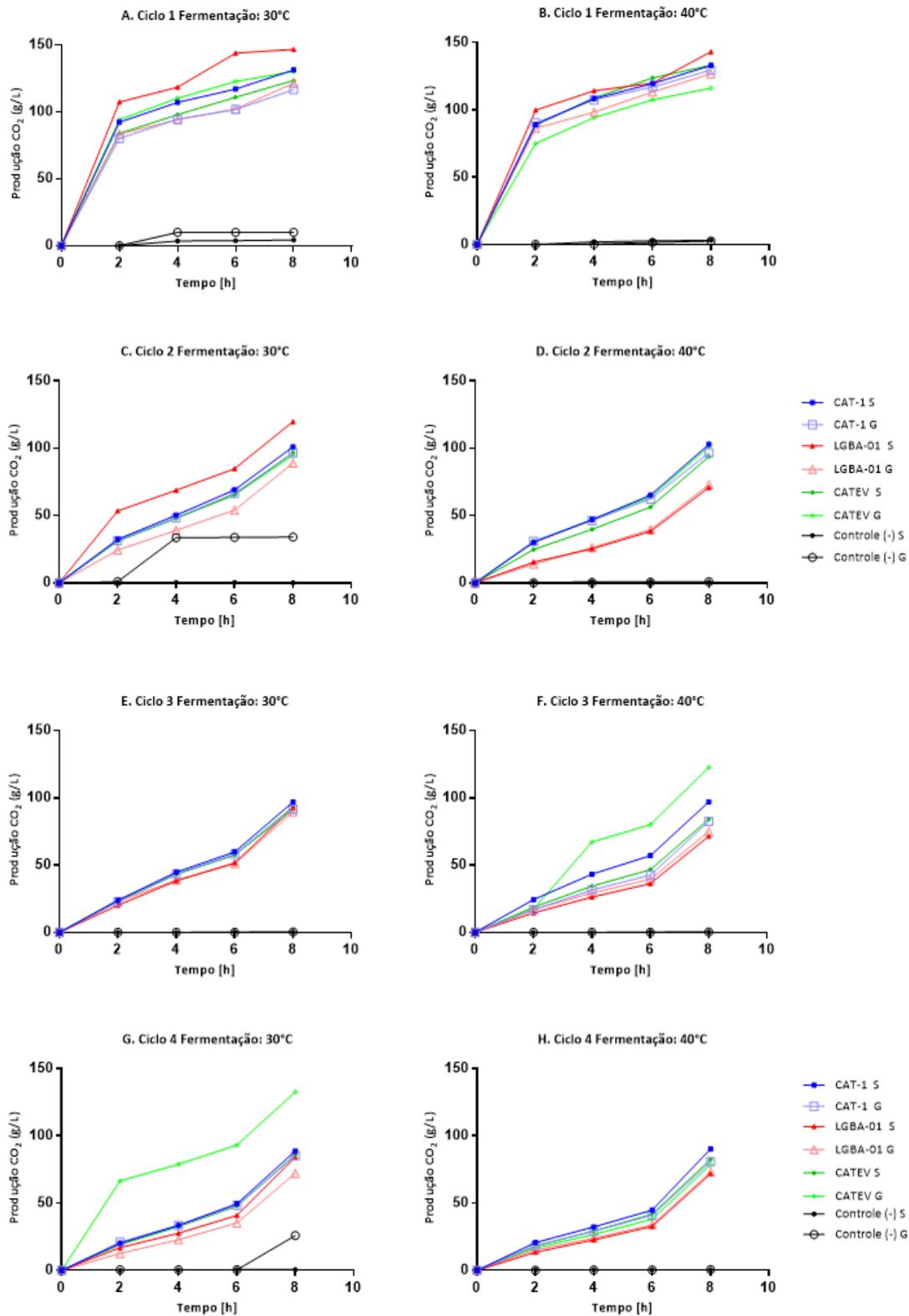


Figura 200. Fermentações a 40°C em 20% YPD ou 20% YPS nos ciclos 1, 2, 3 e 4.

Os resultados indicaram que não houveram diferenças devido à grande quantidade de leveduras inoculada utilizando o pé de cuba. Para confirmar o dito anteriormente, os resultados da figura 20 foram comparados com experimentos preliminares de fermentação em YPD 8% utilizando uma concentração inicial em D.O₆₀₀ 1 (veja Anexo A.3). Nestes testes preliminares observou-se que houveram diferenças na fermentação e no rendimento da fermentação, por tanto a comparação destes experimentos indicou que a medida indireta da capacidade fermentativa (Produção de CO₂) depende em grande parte da concentração do inoculo utilizado. A produção de CO₂ mais destacada foi quando CATEV foi fermentada no ciclo 3 a 40°C e no ciclo 4 a 30°C, mesmo assim no ciclo 4 em 40 essa diferença já não foi percebida, com certeza o fenótipo evoluído CATEV ainda precisa continuar o processo de evolução adaptativa para conseguir resultados diferentes. Além disso, a viabilidade das leveduras vai diminuindo na medida que acontece cada ciclo de fermentação, por tanto a capacidade fermentativa da biomassa utilizada decresce no tempo (RAGHAVENDRAN *et al.*, 2017).

Como foi mencionado anteriormente, a produção de CO₂ foi uma medida indireta da fermentação, para complementar a informação foi necessário obter a maior quantidade de dados tanto do metabolitos produzidos ou açúcares consumidos em HPLC (Tabelas 8, 9, 10 e 11, para exemplos dos análises estatísticos veja Figuras 32 e 33 em Anexos A.4) quanto das análises da expressão gênica (Figura 22).

Tabela 8. Parâmetros físico-químicos obtidos na fermentação de bioetanol com a linhagem CAT-1 sem evoluir

	CAT-1			
	30 °C S	40 °C S	30 °C G	40 °C G
Glicose [g/L]	0,0385 ± 0,001	2,176 ± 0,001	1,1285 ± 0,019	7,56 ± 0,006
Frutose [g/L]	1,0505 ± 0,004	16,5365 ± 0,009	0,5305 ± 0,008	0,838 ± 0
Ác, Succínico [g/L]	0,334 ± 0	0,6675 ± 0,001	1,435 ± 0,033	1,4985 ± 0,004
Glicerol [g/L]	4,071 ± 0,001	5,239 ± 0,001	4,8145 ± 0,002	4,8905 ± 0,016
Piruvato [g/L]	N.D	0,631 ± 0,006	N.D	0,5835 ± 0,001
Etanol [g/L]	82,4125 ± 0,122	75,1235 ± 0,986	77,258 ± 0,035	67,236 ± 0,003

Tabela 9. Parâmetros físico-químicos obtidos na fermentação de bioetanol com a linhagem LGPLA-01

	LGPLA-01			
	30 °C S	40 °C S	30 °C G	40 °C G
Glicose [g/L]	1,9695 ± 0,013	2,252 ± 0,078	7,087 ± 0,151	24,599 ± 0,095
Frutose [g/L]	15,7565 ± 0,043	37,138 ± 1,342	1,04 ± 0,003	1,5195 ± 0,006
Ác, Succínico [g/L]	0,4325 ± 0,006	1,148 ± 1,202	2,154 ± 0,031	2,37 ± 0,008
Glicerol [g/L]	4,553 ± 0,059	4,1185 ± 0,001	4,8395 ± 0,004	4,1935 ± 0,001
Piruvato [g/L]	0,4595 ± 0,006	N.D	0,619 ± 0,001	0,4755 ± 0,001
Etanol [g/L]	80,1 ± 0,444	82,524 ± 0,018	76,7795 ± 0,036	71,275 ± 0,095

Tabela 10. Parâmetros físico-químicos obtidos na fermentação de bioetanol com a o fenótipo evoluído CATEV (CAT-1 evoluída)

	CATEV			
	30 °C S	40 °C S	30 °C G	40 °C G
Glicose [g/L]	0,023 ± 0	5,3215 ± 0,002	0,153 ± 0	17,696 ± 0,034
Frutose [g/L]	0,261 ± 0	23,2645 ± 0,006	0,5215 ± 0,001	1,1375 ± 0,002
Ác, Succínico [g/L]	0,5425 ± 0,002	1,079 ± 0,013	1,376 ± 0,001	4,1355 ± 0,018
Glicerol [g/L]	4,8005 ± 0,019	4,554 ± 0,008	5,293 ± 0,26	4,197 ± 0,008
Piruvato [g/L]	N.D	0,4395 ± 0,001	0,38 ± 0	0,608 ± 0,001
Etanol [g/L]	74,808 ± 0,192	80,3015 ± 0,206	64,6605 ± 1,46	71,649 ± 0,144

Tabela 11. Parâmetros físico-químicos obtidos no controle negativo da fermentação

	Controle (-)			
	30 °C S	40 °C S	30 °C G	40 °C G
Glicose [g/L]	N.D	N.D	N.D	N.D
Frutose [g/L]	2,1245 ± 1,708	0,5925 ± 0,006	0,9165 ± 0,001	0,5895 ± 0,001
Ác, Succínico [g/L]	0,7545 ± 0,091	0,2575 ± 0,012	0,84 ± 0,006	0,2885 ± 0,032
Glicerol [g/L]	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
Piruvato [g/L]	0,3735 ± 0,018	0,151 ± 0,003	0,3905 ± 0,002	0,1555 ± 0,005
Etanol [g/L]	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0

Considerando todos esses resultados foi realizado um estudo gene por gene tentando correlacionar os dados obtidos em HPC para identificar desvio de rotas metabólicas. Vale salientar que algumas discussões geradas neste tópico foram baseadas nos valores da expressão gênica apresentadas na tabela 14 (Anexo A.1).

Um dos resultados mais interessantes foi a alta produção de glicerol em uma faixa de 4 – 5 g/L, porém em CAT-1 (sem evoluir) e CATEV (evoluída) os genes GPD1 e GPD2 não apresentaram expressões altas quando foram comparadas com o início de cada fermentação. Embora que a visão geral do *heat map* seja que baixou a expressão de GPD1, os valores de normalização indicaram que para cada linhagem houve um comportamento diferente quando foi feita a comparação entre leveduras. Por exemplo, na linhagem CAT-1 o gene GPD1 aumentou progressivamente no médio da fermentação (t_m) e logo diminuiu no fim (t_f) em 40° C tanto em sacarose quanto em glicose, na linhagem LGBA-01 a expressão de GPD1 baixou progressivamente ao longo tempo em 40 °C em glicose e sacarose, e CATEV aumentou a expressão de GPD1 em 40°C nesses açúcares. Esse comportamento foi observado em vários dos genes estudados, alguns aumentavam sua expressão na hora 4 (t_m) de fermentação e depois a expressão chegava a níveis mais baixos na hora 8 (t_f). De modo geral, a expressão gênica de vários genes aumentaram sucessivamente com o tempo no fenótipo CATEV em 40°C utilizando sacarose como fonte de carbono na fermentação, os genes foram: GPD1, GPD2, ADH1, ALD4, ADR1, AGT1, MAL31, SUC2 e SNF1. Esse resultado revelou que a estratégia de evolução adaptativa conseguiu um efeito positivo aumentando a produção de etanol (veja tabela 10 CATEV 40 S). Neste sentido, a expressão dos genes mencionados em CATEV foi comparada com os resultados de CAT-1 sem evoluir, e foi possível evidenciar que o fenótipo CATEV possivelmente evoluiu, para dizer com certeza que a evolução aconteceu é preciso sequenciar o genoma de ambas leveduras e assim identificar a diferenças num nível genético e não fenotípico (TILLOY *et al.*, 2015).

Por outro lado, os resultados de HPLC indicaram que houve uma acumulação de piruvato numa faixa de 0,1 – 0,5 [g/l] principalmente na condição de temperatura a 40°C. Isto revelou que houve um desvio das rotas metabólicas, dada a disponibilidade de piruvato houve um aumento da expressão do gene PDC1 observada principalmente em CATEV a 40°C em glicose, nesse gene houve variabilidade de dados. Além disso, nas três leveduras testadas as expressões de ALD6, ALD4 e BDH1 foram variáveis, mas a expressão de BDH1 baixou de maneira geral, isto indicou que o desvio da rota metabólica foi à produção de acetato e refletido no aumento da expressão de ACS2 em CAT-1

e CATEV no médio da fermentação (t_m), ou seja, a rota é direcionada à produção de lipídeos (principalmente ergosterol) como uma resposta ao estresse por temperatura ou como uma sinal de compensação (*trade-off*) (CASPETA, L. *et al.*, 2014; CASPETA, LUIS; CASTILLO; NIELSEN, 2015; CASPETA, LUIS; CHEN; NIELSEN, 2016). Por sua parte, os níveis de ACS2 baixaram em LGBA-01, esta levedura é considerada resistente ao estresse térmico e por tanto esperava-se esse comportamento devido à tolerância nessa condição.

Quando foi analisada a produção de etanol, a maioria das leveduras consignou produzir quantidades entre 64 e 82 [g/L], observou-se que a expressão do gene ADH1 aumentou no tempo em CAT-1 e CATEV, curiosamente em estas duas leveduras a produção de etanol foi maior condições de 40°C e utilizando YPS como meio.

Enquanto ao transporte de açúcares, o gene HXT1 foi expresso de maneira variada ao longo do tempo em cada levedura e condição testada. Um caso interessante foi o aumento da expressão de HXT1 em CAT-1 e CATEV às 4 horas de fermentação (t_m) a 40 °C, indicando que houve um transporte de glicose nesse tempo. Nos genes AGT1 e MAL31, também houve uma expressão variada em cada leveduras, novamente, em CATEV a 40°C aumentou a expressão de MAL 31 no final da fermentação, e paralelamente a expressão de SUC2 e SNF1 aumentaram ao longo do tempo. É evidente que a expressão de SUC2 foi alta pois em meio sem glicose a o transporte de sacarose não é reprimida (Figura 21).

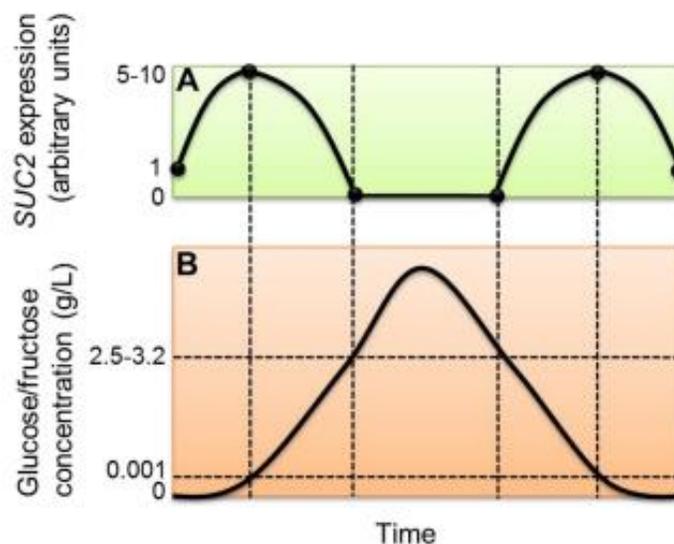


Figura 21. Expressão do gene SUC2 na presença ou ausência de glicose. Fonte: (MARQUES et al., 2016)

Considerando a condição de fermentação a 40° C em meio YPS (Sacarose), neste ponto da discussão a seguinte pergunta aparece: “Como foi possível que SNF1 e SUC2 apresentaram níveis de expressão altos ao mesmo tempo sendo que SNF1 é repressora de SUC2 e se inativa em baixa concentração de glicose?” A resposta é que a condição de multi-estresse, osmótico e térmico promove a expressão do gene SNF1 que codifica para o fator de transcrição *Snf1p (kinase complex)*, envolvido em vários tipos de regulação do metabolismo, entre eles, o controle de fonte de carbono (KAYIKCI; NIELSEN, 2015). Infelizmente, não foi possível obter maior quantidade de informação no estudo de SUC2 associado ao consumo de sacarose, pois os resultados em HPLC de sacarose não foram obtidos ainda.

Conforme o discutido, foi possível observar que a estratégia de evolução foi conseguida no fenótipo CATEV: CAT-1 evoluída em condições de aerobiose e anaerobiose (condição Mista; M) utilizando meio extrato de malte (EM). Neste caso, é necessário visar as mudanças ao nível do genoma. A expressão gênica e os compostos analisados indicaram que houveram sinais de evolução. Por sua parte, a linhagem termotolerante LGBA-01 também poderia ser evoluído usando as estratégias desenvolvidas neste trabalho.

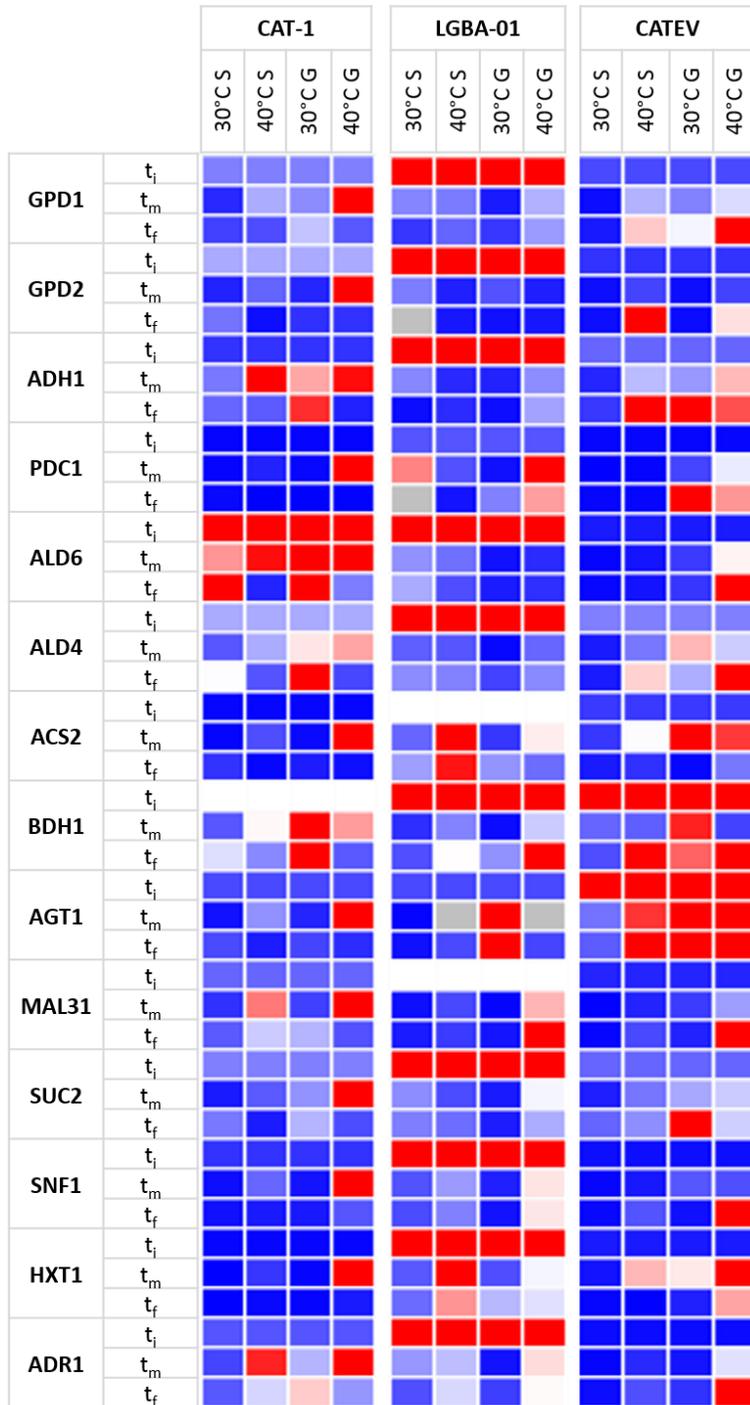


Figura 22. Heat map da expressão relativa de genes relacionados a eficiência fermentativa na produção de bioetanol. Em vermelho a expressão gênica é maior e a escala de cores diminui até atingir a cor azul (menor expressão gênica), em cinza não houve dado para essa amostra em questão. Amostras analisada em diferentes tempos. t_i: tempo inicial, 0 horas da fermentação. t_m: tempo no médio da fermentação, às 4 horas após início do processo. T_f: final do processo às 8 horas após início do processo.

4.3 Produção de bioetanol em Biorreator

Além dos testes fermentativos em escala de laboratório, a levedura termotolerante LGBA-01 foi submetida a fermentação em um biorreator com um volume de trabalho de 1L utilizando a estratégia de quimiostato simples. A tabela 12 descreve todos os resultados observados quando as fermentações foram realizadas a 30 e 40 °C, observa-se que a produção de etanol foi semelhante em ambas as temperaturas, mesmo com um maior residual de glicose ser encontrado nas fermentações realizadas a 40 °C. Um dado importante observado refere-se ao aumento de glicerol nas linhagens utilizadas nas fermentações a 40 °C. O glicerol vem sendo descrito como um importante fator relacionado a proteção ao estresse em levedura, mas recentemente vem sendo demonstrado que o acúmulo de glicerol também estaria atuando na alteração de expressão de diversos genes relacionados a mudanças de fase fermentativa para o metabolismo respiratório como proteínas de membrana para o transporte de solutos e íons (MATTENBERGER *et al.*, 2017). Dessa forma, um estudo mais aprofundado desta via na linhagem LGBA-01 poderá contribuir para elucidar melhor esta importante via de desvio metabólico.

Tabela 12. Análise das características fermentativas da linhagem LGBA-01 sob fermentações conduzidas a 30 e 40 °C

	30°C	40°C
μ (batelada)	0.431 \pm 0.008	0.332 \pm 0.003
q glucose (mmol/g/h)	-5.28 \pm 0.23	-7.22 \pm 0.93
q CO2 (mmol/g/h)	7.98 \pm 0.69	12.02 \pm 0.93
q Ethanol (mmol/g/h)	8.79 \pm 1.03	11.50 \pm 1.72
q Glycerol (mmol/g/h)	0.89 \pm 0.22	1,38 \pm 0.32
q Lactate (mmol/g/h)	0.05 \pm 0.03	0.11 \pm 0.02
q Pyruvate (mmol/g/h)	0.01 \pm 0.00	0.08 \pm 0.03
q Acetate (mmol/g/h)	0.00 \pm 0.00	0.01 \pm 0.01
X (g DWL ⁻¹)	2.81 \pm 0.30	2.09 \pm 0.26
Y _{X/S} (g DW g glucose ⁻¹)	0.11 \pm 0.01	0.09 \pm 0.01
Y _{ETH/S} (g ethanol g glucose ⁻¹)	0.426 \pm 0.029	0.407 \pm 0.010
Y _{G/S} (g glycerol g glucose ⁻¹)	0.085 \pm 0.014	0.097 \pm 0.007
Residual glucose (mM)	0.17 \pm 0.23	2.40 \pm 1.19
C recovery (%)	101.97 \pm 1.73	101.28 \pm 1.35

Enquanto a expressão gênica, estudos mostraram que aumentando a quantidade de ácidos graxos insaturados na membrana e a suplementação dos meios de crescimento com ácidos graxos insaturados, vitaminas e proteínas, observou-se aumento da tolerância ao etanol. Nesse sentido, o gene OLE1, torna-se um alvo interessante, uma vez que codifica para uma proteína denominada Δ -9 dessaturase de ácido graxo (Ole1p), cuja função está relacionada a síntese de ácidos graxos insaturados em *S. cerevisiae*. Além disso, estudos revelaram que OLE1 superexpresso aumentou a

quantidade de ácidos graxos insaturados na membrana de *S. cerevisiae* e foi capaz de exibir uma melhor tolerância ao etanol (DONG; YI; LI, 2015; STUKEY; MCDONOUGH; MARTIN, 1990).

Curiosamente, testes de fermentação anteriores revelaram que houve uma queda neste gene quando a linhagem LBGA-01 foi cultivada a 40 °C. Neste sentido, resolvemos testar se o padrão de expressão deste gene por PCR em tempo Real (qPCR) se mantinha em condições similares às industriais. Os resultados se mostraram similares aos anteriores com um decréscimo estatisticamente significativo na expressão de OLE1 nas fermentações cultivadas a 40 °C (Figura 23).

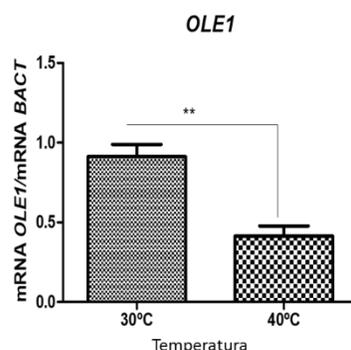


Figura 23. Análise da expressão gênica de OLE1 nas diferentes condições de fermentação. A expressão gênica foi realizada por qRT-PCR e a expressão relativa foi calculada de acordo com a fórmula $2^{-\Delta\Delta CT}$ utilizando a expressão do gene beta actina (BACT) como controle endógeno.

O processo de insaturação de cadeias está diretamente relacionado com a fluidez da membrana, a diminuição de expressão deste gene poderia tornar a membrana mais fluida e por isso mais resistente a temperaturas mais elevadas. No entanto, como evidenciado na Tabela 12, as concentrações de etanol após a fermentação foram altas, o que influenciaria positivamente este gene. Para avaliar melhor o papel deste gene na termotolerância, iremos realizar fermentações em diferentes concentrações de etanol a 40 °C, avaliando a expressão deste gene ao longo da fermentação e comparando com fermentações realizadas na condição controle (30 °C). Esperamos com isso encontrar uma relação temporal que indique a possível razão da repressão deste gene ao final do processo fermentativo em condições de estresse térmico.

Apenas o gene PDC1 (Figura 24 A), não apresentou diferença de expressão entre as temperaturas. Todos os outros genes analisados apresentaram uma redução em sua expressão (Figura 24 B-F). No entanto, apesar disso, nas fermentações conduzidas não houveram evidências de alterações na produção de etanol, apesar de resíduos de glicose ainda serem encontrados nas fermentações conduzidas a 40 °C. Adicionalmente, esperava-se um aumento na produção de mRNA para as enzimas relacionadas ao aumento de glicerol, uma vez que o aumento deste composto foi

encontrado por HPLC após as fermentações (veja Tabela 12), no entanto quando foi analisado o RNAm que codifica para a enzima GPD2, uma diminuição significativa em sua expressão foi encontrada nas fermentações a 40 °C. No entanto, como já descrito anteriormente, o acúmulo de glicerol, além de proteger as células, parece regular outras vias ativando e reprimindo genes, principalmente relacionados a transporte de íons e mecanismos de transcrição nestas leveduras (MATTENBERGER *et al.*, 2017).

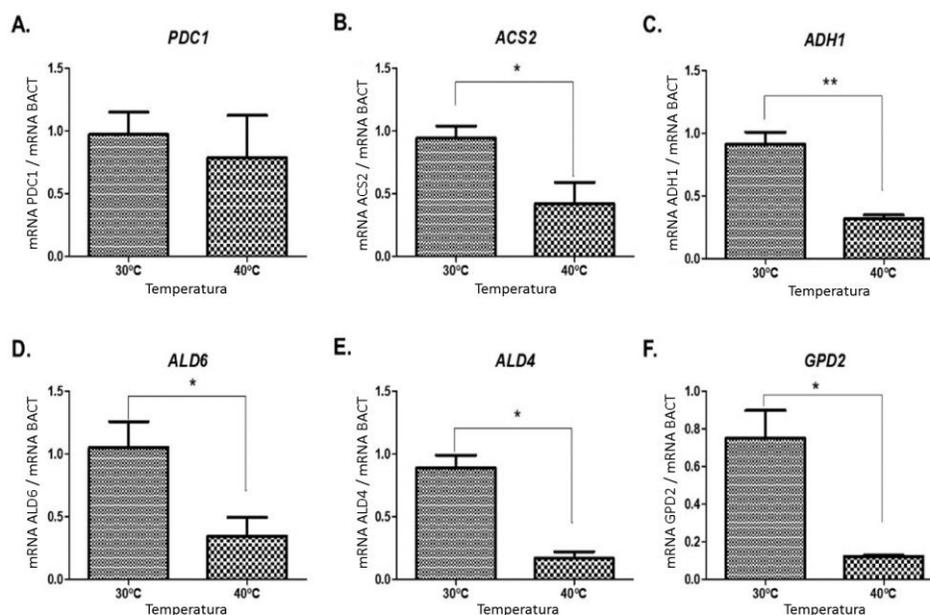


Figura 24. Análise da expressão gênica de genes relacionados a eficiência fermentativa nas diferentes condições de temperatura. A expressão gênica foi realizada por qRT-PCR e a expressão relativa foi calculada de acordo com a fórmula $2^{-\Delta\Delta CT}$ utilizando a expressão do gene beta actina (BACT) como controle endógeno.

O gene *ADH2*, responsável pelo consumo de etanol, apresentaram problemas nas análises eficiência nas reações de qPCR e tiveram que ter seus iniciadores redesenhados. As análises estão em curso no laboratório e poderão ajudar a explicar tais resultados.

Os resultados encontrados sugerem que apesar de a baixa quantidade estas vias podem estar sendo reguladas de outras formas, ou que esta diminuição na quantidade de RNAm não reflita em diminuição do conteúdo proteico nestas linhagens levando aos fenótipos observados na fermentação. Possivelmente o desvio de rotas metabólicas está dada pela expressão dos genes *ALD6*, *ALD4* e *ACS2* que curiosamente foi maior em fermentações a 30 °C. Uma similitude foi observada com os dados do tópico anterior, em comparação com as fermentações em ciclos, os níveis de expressão de *GPD2* e *ACS2* baixaram em condições de temperatura 40 °C (glicose), isto indica que a levedura termotolerante *LGBA-01* manteve a características de resistência ao estresse térmico.

5 Conclusões

A metodologia de seleção de leveduras *Saccharomyces* em YCB-lisina que foi aplicada neste trabalho demonstrou ser uma boa ferramenta para a identificação do gênero *Saccharomyces*. Esta técnica consegue diminuir os custos de fazer genotipagem numa primeira etapa considerando o alto número de leveduras isoladas. Neste trabalho, utilizando esta metodologia foi possível identificar 124 leveduras possivelmente pertencentes ao gênero *Saccharomyces* com um percentagem de erro de 26,6%.

O método de cultivo *dropout* combinado com ferramentas de processamento de imagens, métodos de normalização, e algoritmos permitiu a criação de *heat maps* para identificar características fenotípicas de interesse, sem a necessidade de usar métodos sofisticados de cultivo. Com o cultivo *dropout* e o processamento de imagens se conseguiu visualizar os resultados analisando só uma imagem, o que também permitiu obter dados semi-quantitativos. Além disso, obteve-se diversas leveduras isoladas de usinas com potencial para utilizar as estratégias de evolução.

No caso da seleção de leveduras para produção de cervejas, a complexidade aromática de cada protótipo de cerveja gerada foi associada à expressão de genes PAD1 e FDC1 em cada linhagem. Os resultados dessa fermentação foram analisados em HPLC, onde os valores de etanol foram baixos, sugerindo que houve um desvio de rotas metabólicas, por exemplo à produção de diacetila, composto que confere aromas indesejáveis. As relação estabelecida entre descrições de degustação e análise da expressão de genes PAD1, FDC1 e BDH1 resultou ser uma boa ferramenta para estudar o desenvolvimento de novas linhagens de leveduras para a produção de cerveja.

Enquanto à evolução de leveduras e produção de bioetanol, os resultados revelaram que possivelmente o fenótipo CATEV apresentou sinais de uma evolução adaptativa as quais foram conferidas utilizando a análise de expressão gênica como ferramenta de estudo nesta pesquisa. Os genes que indicaram essas sinais foram: GPD1, GPD2, ADH1, ALD4, ADR1, AGT1, MAL31, SUC2 e SNF1.

Finalmente, as estratégias de evolução adaptativas desenvolvidas neste trabalho poderiam ser utilizadas tanto para cerveja quanto para bioetanol assim como foi demonstrado nas fermentações em meios de maltose (cerveja), glicose e sacarose (bioetanol) utilizando o fenótipo CATEV nos dois tipos de processos. Por tudo isto, estas estratégias são promissórias para futuras pesquisas.

6 Perspectivas futuras

As estratégias planejadas para evolução de leveduras em bioetanol serão utilizadas para a evolução em cerveja, e portanto podem ser desenvolvidos novos projetos de evolução em diversas áreas de produção de fermentados. Vale salientar que as estratégias multi-estresse foram desenvolvidas neste trabalho, isto confere uma vantagem para continuar com pesquisas inovadoras e com um grau de complexidade alto, visando sempre ter características de pesquisa aplicada.

Por sua parte, uma vez identificadas linhagens com melhor performance industrial tanto na produção de cervejas quanto etanol, experimentos de genoma e transcriptoma poderão ser realizados visando entender de maneira global as modificações realizadas com a técnica de evolução adaptativa. Além disso, foi desenvolvido um projeto que já foi apresentado e aprovado pela FAPESP, assim será possível dar continuidade à pesquisa,

As próximas etapas deste trabalho compreendem diversos testes em níveis sensoriais e de melhor caracterização das cepas selecionadas. O teste de análise molecular das cepas (descrito neste trabalho) está sendo realizado para a determinação de gênero e espécie das cepas selecionadas.

Este projeto já foi apresentado a alguns produtores industriais de bioetanol, cervejas e mesmo de vinhos que se mostraram bastante interessados nos resultados. Alguns convênios também estão sendo firmados para que haja a continuação do trabalho, dentre eles estão o convênio com duas vinícolas que estão dispostas a fornecer mosto natural para teste de fermentação mais específico de modo a complementar os resultados obtidos com o experimento da fermentação em suco de uva integral e firmar parcerias para o desenvolvimento de novos projetos no laboratório. E também há o convênio com uma Universidade de Santiago de Chile, para os mesmos fins. Assim, com resultados promissores poderão ser realizados testes com mosto natural em escala piloto de produção.

7 Referência bibliográfica

- ABDEL-BANAT, Babiker 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? *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 85, n. 4, p. 861–867, 10 jan. 2010.
- ABREU-CAVALHEIRO, A.; MONTEIRO, G. Solving ethanol production problems with genetically modified yeast strains. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 44, n. 3, p. 665–671, set. 2013.
- ALBA-LOIS, L. and SEGAL-KISCHINEVZKY, L. Yeast Fermentation and the Making of Beer and Wine. *Nature Education*, v. 3, n. 9, p. 17, 2010.
- ALMEIDA, Pedro *et al.* A population genomics insight into the Mediterranean origins of wine yeast domestication. *Molecular Ecology*, v. 24, p. 5412–5427, 2015.
- ALVES DOS SANTOS, Angela *et al.* Original Article Campinas, v. 20, e2015113. *J. Food Technol*, 2017.
- ARANDA, Agustín; DEL OLMO, Marcel. Response to acetaldehyde stress in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* involves a strain-dependent regulation of several ALD genes and is mediated by the general stress response pathway. *Yeast*, v. 20, n. 8, p. 747–759, 1 jun. 2003..
- BAILEY, James E *et al.* Inverse Metabolic Engineering: A Strategy for Directed Genetic Engineering of Useful Phenotypes. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 52, n. 1, p. 109–121, 1996.
- BAILEY, James E. Toward a science of metabolic engineering. *Science*, v. 252, p. 1668–1675, 1991.
- BARFORD, J. P.; PHILLIPS, P. J.; ORLOWSKI, J. H. A new model of uptake of multiple sugars by *S. cerevisiae*. *Bioprocess Engineering*, v. 7, n. 7, p. 297–302, 1992.
- BARNETT, James A. A history of research on yeasts 5: the fermentation pathway. *Yeast*, v. 20, p. 509–543, 2003.
- BERG, Marco A.; STEENSMA, H. Yde. ACS2, a *Saccharomyces Cerevisiae* Gene Encoding Acetyl-Coenzyme A Synthetase, Essential for Growth on Glucose. *European Journal of Biochemistry*, v. 231, n. 3, p. 704–713, 1 ago. 1995.
- BISSON, Linda F. *et al.* Yeast Sugar Transporters. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, v. 28, n. 4, p. 259–308, 26 jan. 1993.
- BORNEMAN, Anthony R; PRETORIUS, Isak S. Genomic Insights into the *Saccharomyces sensu stricto* Complex. 2015.
- BOULTON, Chris.; QUAIN, David. *Brewing yeast and fermentation*. [S.l.]: Blackwell Science, 2001.
- ÇAKAR, Z. Petek *et al.* Evolutionary engineering of multiple-stress resistant *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Research*, v. 5, n. 6–7, p. 569–578, 2005.
- ÇAKAR, Z. Petek *et al.* Evolutionary engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for improved industrially important properties. *FEMS Yeast Research*, Review de sus trabajos, v. 2, n. 2, p. 171–182, mar. 2012.
- CARRATÙ, L *et al.* Membrane lipid perturbation modifies the set point of the temperature of heat shock response in yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 93, n. 9, p. 3870–5, 30 abr. 1996.

CARVALHO-NETTO, Osmar V *et al.* *Saccharomyces cerevisiae* transcriptional reprogramming due to bacterial contamination during industrial scale bioethanol production. *Microbial Cell Factories*, v. 14, n. 1, p. 13, 30 dez. 2015.

CASPETA, L. *et al.* Altered sterol composition renders yeast thermotolerant. *Science*, v. 346, n. 6205, p. 75–78, 3 out. 2014.

CASPETA, Luis; CASTILLO, Tania; NIELSEN, Jens. Modifying Yeast Tolerance to Inhibitory Conditions of Ethanol Production Processes. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, v. 3, p. 184, 11 nov. 2015.

CASPETA, Luis; CHEN, Yun; NIELSEN, Jens. Thermotolerant yeasts selected by adaptive evolution express heat stress response at 30 °C. *Scientific Reports*, v. 6, n. 1, p. 27003, 27 jul. 2016.

CASPETA, Luis; NIELSEN, Jens. Thermotolerant yeast strains adapted by laboratory evolution show trade-off at ancestral temperatures and preadaptation to other stresses. *mBio*, v. 6, n. 4, p. 1–9, 2015.

CHOW, T H; SOLLITTI, P; MARMUR, J. Structure of the multigene family of MAL loci in *Saccharomyces*. *Molecular & general genetics : MGG*, v. 217, n. 1, p. 60–9, maio 1989.

CURRAN, Brendan P. G.; KHALAWAN, Seunath A.; CHATTERJEE, Mahua T. Cellular lipid composition influences stress activation of the yeast general stress response element (STRE). *Microbiology*, v. 146, n. 4, p. 877–884, 1 abr. 2000.

D'AMORE, Tony; RUSSELL, Inge; STEWART, Graham G. Sugar utilization by yeast during fermentation. *Journal of Industrial Microbiology*, v. 4, n. 4, p. 315–323, jul. 1989.

DAY, Rachel E. *et al.* Characterization of the putative maltose transporters encoded by YDL247w and YJR160c. *Yeast*, v. 19, n. 12, p. 1015–1027, 15 set. 2002.

DE VIRGILIO, Claudio *et al.* Cloning and disruption of a gene required for growth on acetate but not on ethanol: The acetyl-coenzyme a synthetase gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, v. 8, n. 12, p. 1043–1051, dez. 1992.

DICKINSON, J Richard; SALGADO, L Eshantha J; HEWLINS, Michael J E. The catabolism of amino acids to long chain and complex alcohols in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of biological chemistry*, v. 278, n. 10, p. 8028–34, 7 mar. 2003.

DITTMAR, John C; REID, Robert JD; ROTHSTEIN, Rodney. ScreenMill: A freely available software suite for growth measurement, analysis and visualization of high-throughput screen data. *BMC Bioinformatics*, v. 11, n. 1, p. 353, 28 jun. 2010.

DONG, Shi-Jun; YI, Chen-Feng; LI, Hao. Changes of *Saccharomyces cerevisiae* cell membrane components and promotion to ethanol tolerance during the bioethanol fermentation. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, v. 69, p. 196–203, 1 dez. 2015.

DRAGOSITS, Martin; MATTANOVICH, Diethard. Adaptive laboratory evolution – principles and applications for biotechnology. *Microbial Cell Factories 2013 12:1*, v. 12, n. 1, p. 64, 1 jul. 2013.

DRISCOLL, C. A.; MACDONALD, D. W.; O'BRIEN, S. J. From wild animals to domestic pets, an evolutionary view of domestication. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 106, n. Supplement_1, p. 9971–9978, 2009.

DUDLEY, Robert. Evolutionary origins of human alcoholism in primate frugivory. *The Quarterly Review of Biology*, v. 75, n. 1, p. 3–15, 2000.

ESTEVE-ZARZOSO, B. *et al.* Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. *International Journal of Systematic Bacteriology*, v. 49, n. 1, p. 329–337, 1 jan. 1999.

FEREA, T L *et al.* Systematic changes in gene expression patterns following adaptive evolution in yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 96, n. 17, p. 9721–6, 17 ago. 1999.

FOWELL, R. R. The Identification of Wild Yeast Colonies on Lysine Agar. *Journal of Applied Bacteriology*, v. 28, n. 3, p. 373–383, dez. 1965.

GALLONE, Brigida *et al.* Domestication and Divergence of *Saccharomyces cerevisiae* Beer Yeasts. *Cell*, Para hablar acerca de la evolución de levaduras y que hay más posibilidades de incrementar el intake de maltosa con la evolución, v. 166, n. 6, p. 1397–1410.e16, 2016.

GASCH, Audrey P.; WERNER-WASHBURNE, Margaret. The genomics of yeast responses to environmental stress and starvation. *Functional & Integrative Genomics*, v. 2, n. 4–5, p. 181–192, 3 set. 2002.

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

GONZÁLEZ, E *et al.* Characterization of a (2R,3R)-2,3-butanediol dehydrogenase as the *Saccharomyces cerevisiae* YAL060W gene product. Disruption and induction of the gene. *The Journal of biological chemistry*, v. 275, n. 46, p. 35876–85, 17 nov. 2000.

HAN, Eun-Kyoung *et al.* Characterization of AGT1 encoding a general alpha-glucoside transporter from *Saccharomyces*. *Molecular Microbiology*, v. 17, n. 6, p. 1093–1107, 15 set. 1995.

HO, Ping-Wei *et al.* The sole introduction of two single-point mutations establishes glycerol utilization in *Saccharomyces cerevisiae* CEN.PK derivatives. *Biotechnology for biofuels*, v. 10, p. 10, 2017.

HOHMANN, Stefan; ZIMMERMANN, Friedrich K. Cloning and expression on a multicopy vector of five invertase genes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Current Genetics*, v. 11, n. 3, p. 217–225, dez. 1986.

JANSEN, Mickel L A *et al.* Prolonged maltose-limited cultivation of *Saccharomyces cerevisiae* selects for cells with improved maltose affinity and hypersensitivity. *Applied and environmental microbiology*, v. 70, n. 4, p. 1956–63, abr. 2004.

KAYIKCI, Ömur; NIELSEN, Jens. Glucose repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS yeast research*, v. 15, n. 6, set. 2015.

KELLIS, Manolis *et al.* Sequencing and comparison of yeast species to identify genes and regulatory elements. *Nature*, v. 423, n. 6937, p. 241–254, 15 maio 2003.

KURTZMAN, C. P.; FELL, Jack W.; BOEKHOUT, T. *The yeasts: a taxonomic study*. [S.l.]: Elsevier Science, 2011.

KUYPER, M *et al.* Evolutionary engineering of mixed-sugar utilization by a xylose-fermenting strain. *FEMS Yeast Research*, v. 5, n. 10, p. 925–934, jul. 2005.

LAGUNAS, Rosario. Sugar transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Letters*, v. 104, n. 3–4, p. 229–242, 1 abr. 1993.

LESAGE, P; YANG, X; CARLSON, M. Yeast SNF1 protein kinase interacts with SIP4, a C6 zinc cluster transcriptional activator: a new role for SNF1 in the glucose response. *Molecular and cellular biology*, v. 16, n. 5, p. 1921–8, maio 1996.

LEWIS, D A; BISSON, L F. The HXT1 gene product of *Saccharomyces cerevisiae* is a new member of the family of hexose transporters. *Molecular and cellular biology*, v. 11, n. 7, p. 3804–13, 1 jul. 1991.

LITI, Gianni *et al.* Europe PMC Funders Group Population genomics of domestic and wild yeasts. *Nature*, v. 458, n. 7236, p. 337–341, 2009.

LIU, Enkai; HU, Yun. Construction of a xylose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae* strain by combined approaches of genetic engineering, chemical mutagenesis and evolutionary adaptation. *Biochemical Engineering Journal*, v. 48, n. 2, p. 204–210, 15 jan. 2010.

LIVAK, Kenneth J.; SCHMITTGEN, Thomas D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method. *Methods*, v. 25, n. 4, p. 402–408, 1 dez. 2001.

LOPES, Mario Lucio *et al.* Ethanol production in Brazil: a bridge between science and industry. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 47, p. 64–76, 1 dez. 2016.

LORCA, Gustavo *et al.* Screening of native *S. cerevisiae* strains in the production of *Pajarete* wine: a tradition of Atacama Region, Chile. *Journal of Wine Research*, v. 29, n. 2, p. 130–142, 3 abr. 2018.

MANS, Robert; DARAN, Jean-Marc G; PRONK, Jack T. Under pressure: evolutionary engineering of yeast strains for improved performance in fuels and chemicals production. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 50, p. 47–56, 1 abr. 2018.

MARQUES, Wesley Leoricy *et al.* Sucrose and *Saccharomyces cerevisiae* : a relationship most sweet. *FEMS Yeast Research*, v. 16, n. 1, p. fov107, 1 fev. 2016.

MATTENBERGER, Florian *et al.* Glycerol stress in *Saccharomyces cerevisiae* : Cellular responses and evolved adaptations. *Environmental Microbiology*, v. 19, n. 3, p. 990–1007, 1 mar. 2017.

MEADEN, Philip G. *et al.* The ALD6 gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes a cytosolic, Mg²⁺-activated acetaldehyde dehydrogenase. *Yeast*, v. 13, n. 14, p. 1319–1327, 1 nov. 1997.

MENESES, F. Jon; HENSCHKE, Paul A.; JIRANEK, Vladimir. A Survey of Industrial Strains of *Saccharomyces cerevisiae* Reveals Numerous Altered Patterns of Maltose and Sucrose Utilisation. *Journal of the Institute of Brewing*, v. 108, n. 3, p. 310–321, 1 jan. 2002.

MESAS, J. M.; ALEGRE, M. T. The role of the microorganisms in winemaking. *Ciencia y Tecnología Alimentaria*, v. 2, n. 4, p. 174–183, dez. 1999.

NELSON, D. L. & COX, M. M. *Lehninger Principles of Biochemistry*. 5th. ed. New York: [s.n.], 2008.

PAO, S S *et al.* Major facilitator superfamily. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, v. 62, n. 1, p. 1–34, mar. 1998.

POSTMUS, Jarne *et al.* Quantitative analysis of the high temperature-induced glycolytic flux increase in *Saccharomyces cerevisiae* reveals dominant metabolic regulation. *The Journal of biological chemistry*, v. 283, n. 35, p. 23524–32, 29 ago. 2008.

PRONK, JACK T.; YDE STEENSMA, H.; VAN DIJKEN, JOHANNES P. Pyruvate Metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, v. 12, n. 16, p. 1607–1633, 1 dez. 1996.

RAGHAVENDRAN, Vijayendran *et al.* A simple scaled down system to mimic the industrial production of first generation fuel ethanol in Brazil. *Antonie van Leeuwenhoek*, v. 110, n. 7, p. 971–983, 3 jul. 2017.

RAUTIO, Jari; LONDESBOROUGH, John. Maltose Transport by Brewer's Yeasts in Brewer's Wort. *Journal of the Institute of Brewing*, v. 109, n. 3, p. 251–261, 2003.

RICHARD, Peter; VILJANEN, Kaarina; PENTTILÄ, Merja. Overexpression of PAD1 and FDC1 results in significant cinnamic acid decarboxylase activity in *Saccharomyces cerevisiae*. *AMB Express*, v. 5, n. 1, p. 12, 18 dez. 2015.

SAIER, Milton H. Vectorial Metabolism and the Evolution of Transport Systems. *Journal of Bacteriology*, v. 182, n. 18, p. 5029–5035, 15 set. 2000.

SAINT-PRIX, F.; BÖNQUIST, Linda; DEQUIN, Sylvie. Functional analysis of the ALD gene family of *Saccharomyces cerevisiae* during anaerobic growth on glucose: the NADP⁺-dependent Ald6p and Ald5p isoforms play a major role in acetate formation. *Microbiology*, v. 150, n. 7, p. 2209–2220, 1 jul. 2004.

SALEMA-OOM, Madalena *et al.* Maltotriose utilization by industrial *Saccharomyces* strains: characterization of a new member of the alpha-glucoside transporter family. *Applied and environmental microbiology*, v. 71, n. 9, p. 5044–9, set. 2005.

SALVATO, Flavia. Fermentação de mosto industrial por linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* com transportador de sacarose e sobreexpressão de invertase interna: estudo comparativo com linhagens com alta e baixa atividade de invertase externa. p. 94, 2010.

SANTOS, Eugenio *et al.* Uptake of sucrose by *Saccharomyces cerevisiae*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 216, n. 2, p. 652–660, 1 jul. 1982.

SAUER, Uwe. Evolutionary Engineering of Industrially Important Microbial Phenotypes. *Advances in Biochemical Engineering Biotechnology*, v. 73, p. 129–169, 2001.

SCHMITT, H D; ZIMMERMANN, F K. Genetic analysis of the pyruvate decarboxylase reaction in yeast glycolysis. *Journal of bacteriology*, v. 151, n. 3, p. 1146–52, set. 1982.

SERRANO, Ramon. Energy Requirements for Maltose Transport in Yeast. *European Journal of Biochemistry*, v. 80, n. 1, p. 97–102, 1 out. 1977.

STAMBUK, B.U. *et al.* Improvement of maltotriose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Letters in Applied Microbiology*, v. 43, n. 4, p. 370–376, out. 2006.

STAMBUK, Boris U.; ARAUJO, Pedro S. Kinetics of active alpha-glucoside transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Research*, v. 1, n. 1, p. 73–78, 1 abr. 2001.

STEENSELS, Jan; VERSTREPEN, Kevin J. Taming Wild Yeast: Potential of Conventional and Nonconventional Yeasts in Industrial Fermentations. *Annual Review of Microbiology*, v. 68, n. 1, p. 61–80, 2014.

STROPE, Pooja K *et al.* The 100-genomes strains , an *S. cerevisiae* resource that illuminates its natural phenotypic and genotypic variation and emergence as an opportunistic pathogen. *Genome*

Research, v. 25, p. 762–774, 2015.

STUKEY, J E; MCDONOUGH, V M; MARTIN, C E. The OLE1 gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes the delta 9 fatty acid desaturase and can be functionally replaced by the rat stearyl-CoA desaturase gene. *The Journal of biological chemistry*, v. 265, n. 33, p. 20144–9, 25 nov. 1990.

TILLOY, Valentin *et al.* Reducing alcohol levels in wines through rational and evolutionary engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. *International Journal of Food Microbiology*, v. 213, p. 49–58, 2015.

TOMÁS-PEJÓ, E. *et al.* Adaptation of the xylose fermenting yeast *Saccharomyces cerevisiae* F12 for improving ethanol production in different fed-batch SSF processes. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, v. 37, n. 11, p. 1211–1220, 29 nov. 2010.

VAN LEEUWEN, C C *et al.* Maltose/proton co-transport in *Saccharomyces cerevisiae*. Comparative study with cells and plasma membrane vesicles. *The Biochemical journal*, v. 284 (Pt 2), n. Pt 2, p. 441–5, 1 jun. 1992.

VERDUYN, Cornelis *et al.* Effect of benzoic acid on metabolic fluxes in yeasts: A continuous-culture study on the regulation of respiration and alcoholic fermentation. *Yeast*, v. 8, n. 7, p. 501–517, jul. 1992.

WALKER, Graeme; STEWART, Graham. *Saccharomyces cerevisiae* in the Production of Fermented Beverages. *Beverages*, v. 2, n. 4, p. 30, 17 nov. 2016.

WHITE, Mark D. *et al.* UbiX is a flavin prenyltransferase required for bacterial ubiquinone biosynthesis. *Nature*, v. 522, n. 7557, p. 502–506, 17 jun. 2015.

WIECZORKE, Roman *et al.* Concurrent knock-out of at least 20 transporter genes is required to block uptake of hexoses in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letters*, v. 464, n. 3, p. 123–128, 31 dez. 1999.

WRIGHT, Jeremiah *et al.* Batch and continuous culture-based selection strategies for acetic acid tolerance in xylose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Research*, v. 11, n. 3, p. 299–306, 1 maio 2011.

YOUNG, Elton T *et al.* Multiple pathways are co-regulated by the protein kinase Snf1 and the transcription factors Adr1 and Cat8. *The Journal of biological chemistry*, v. 278, n. 28, p. 26146–58, 11 jul. 2003.

Anexos

A.1 Dados de expressão gênica

Nas Tabelas 13 e 14 se apresentam os dados que foram utilizados para a obtenção de *Heat maps* para análise da expressão gênica tanto em cerveja quanto em bioetanol.

Tabela 13. Expressão relativa de genes em fermentação de cerveja.

		LGBA-287	LGBA-288	CATEV	S-04
GPD1	t _i	2,956	2,676	2,354	1,000
	t _f	1,249	5,695	0,349	0,883
GPD2	t _i	0,121	0,029	0,281	1,000
	t _f	0,871	3,819	4,454	2,958
ADH1	t _i	1,291	1,051	1,682	1,000
	t _f	1,247	5,977	2,234	0,691
PDC1	t _i	0,278	0,173	0,024	1,000
	t _f	0,143	0,422	0,388	0,536
ALD6	t _i	1,341	0,373	5,555	1,000
	t _f	1,673	21,427	44,699	0,627
ALD4	t _i	0,872	0,674	1,988	1,000
	t _f	3,245	6,352	1,594	0,579
ACS2	t _i	1,110	0,966	1,253	1,000
	t _f	1,287	23,873	15,444	0,436
BDH1	t _i	11,718	6,136	2,674	1,000
	t _f	15,502	114,821	1,220	1,530
AGT1	t _i	N.D	0,000	0,121	1,000
	t _f	N.D	N.D	1,451	0,374
MAL31	t _i	1,383	2,667	1,625	1,000
	t _f	11,273	31,751	25,009	0,870
SUC2	t _i	2054,663	1362,398	10,944	1,000
	t _f	151,376	1641,897	3,926	40,995
SNF1	t _i	3,961	2,789	3,383	1,000
	t _f	0,835	2,366	3,284	1,432
HXT1	t _i	7,932	3,330	9,703	1,000
	t _f	0,577	5,527	3,350	0,695
ADR1	t _i	16,766	18,373	20,276	1,000
	t _f	7,764	71,710	4,514	1,424

Amostras analisada em diferentes tempos. t_i: tempo inicial da fermentação. t_f: final do processo após 7 dias de fermentação. N.D: não houve dado para essa amostra em questão.

Tabela 14. Expressão relativa de genes em fermentação de bioetanol.

		CAT-1				LGBA-01				CATEV			
		30 °C S	40 °C S	30 °C G	40 °C G	30 °C S	40 °C S	30 °C G	40 °C G	30 °C S	40 °C S	30 °C G	40 °C G
GPD1	t _i	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
	t _m	0,320	1,351	1,097	4,179	0,260	0,241	0,051	0,348	0,159	2,438	1,778	3,006
	t _f	0,511	0,603	1,531	0,688	0,106	0,196	0,108	0,305	0,339	4,240	3,361	7,371
GPD2	t _i	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
	t _m	0,199	0,588	0,218	3,513	0,245	0,064	0,162	0,059	0,274	1,326	0,280	1,307
	t _f	0,685	0,078	0,290	0,295	N.D	0,045	0,031	0,046	0,284	10,944	0,215	5,611
ADH1	t _i	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
	t _m	2,364	10,508	6,719	9,781	0,265	0,081	0,067	0,277	0,363	1,831	1,488	3,186
	t _f	2,024	1,785	9,108	0,640	0,023	0,085	0,025	0,319	0,545	5,182	5,358	4,214
PDC1	t _i	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
	t _m	1,099	7,911	1,585	117,331	4,455	0,956	0,186	6,059	0,219	0,756	11,696	40,114
	t _f	1,944	0,071	0,280	0,458	N.D	0,222	1,519	4,139	0,949	1,066	87,549	61,393
ALD6	t _i	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
	t _m	0,709	0,974	1,746	1,384	0,284	0,220	0,034	0,084	0,166	0,787	2,322	10,478
	t _f	1,611	0,069	1,293	0,244	0,333	0,152	0,054	0,093	0,269	0,751	2,136	20,505
ALD4	t _i	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
	t _m	0,514	1,008	1,653	2,032	0,185	0,169	0,013	0,202	0,204	0,935	2,564	1,603
	t _f	1,488	0,494	3,500	0,420	0,274	0,254	0,128	0,271	0,205	2,362	1,363	4,837
ACS2	t _i	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
	t _m	0,649	13,873	1,617	91,562	0,401	2,667	0,210	1,072	0,976	4,441	9,177	7,986
	t _f	9,182	1,159	5,036	2,635	0,624	1,925	0,579	0,423	0,456	0,852	0,118	2,119
BDH1	t _i	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
	t _m	0,339	1,027	2,568	1,387	0,090	0,257	0,021	0,398	0,199	0,186	0,938	0,131
	t _f	0,871	0,537	2,478	0,348	0,155	0,504	0,287	1,448	0,153	0,998	0,806	1,402
AGT1	t _i	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
	t _m	0,228	1,996	0,489	7,163	0,050	N.D	729,798	N.D	0,226	0,898	1,229	1,296
	t _f	1,020	0,379	0,944	0,599	0,223	1,002	8,927	0,946	0,181	1,386	1,991	1,966
MAL31	t _i	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
	t _m	0,481	3,818	0,625	5,511	0,058	0,283	0,019	1,291	0,051	0,958	1,638	4,350
	t _f	0,879	1,993	1,760	0,801	0,107	0,229	0,079	2,424	0,155	2,012	0,935	14,419
SUC2	t _i	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
	t _m	0,205	0,706	1,154	4,740	0,277	0,147	0,050	0,480	0,295	1,159	1,648	1,990
	t _f	0,947	0,210	1,411	0,606	0,248	0,213	0,054	0,340	0,992	1,393	5,213	2,033
SNF1	t _i	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
	t _m	0,271	2,027	0,364	10,706	0,162	0,305	0,063	0,553	0,441	1,720	6,116	5,598
	t _f	0,340	0,518	0,492	1,688	0,147	0,252	0,035	0,549	0,532	5,857	1,111	36,013
HXT1	t _i	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
	t _m	0,194	9,090	0,809	86,406	0,172	1,024	0,154	0,481	0,749	12,835	10,902	20,066
	t _f	0,188	1,377	0,750	4,315	0,211	0,710	0,360	0,442	0,235	0,048	1,252	13,581
ADR1	t _i	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
	t _m	0,814	5,599	2,131	6,000	0,295	0,373	0,035	0,568	0,346	3,633	1,787	19,838
	t _f	1,040	2,500	3,617	1,759	0,155	0,424	0,121	0,511	1,086	6,928	4,399	45,984

Amostras analisada em diferentes tempos. t_i: tempo inicial, 0 horas da fermentação. t_m: tempo no médio da fermentação, às 4 horas após início do processo. T_f: final do processo às 8 horas após início do processo. N.D: não houve dado para essa amostra em questão.

A.2 Estratégia de evolução adaptativa de leveduras para cerveja

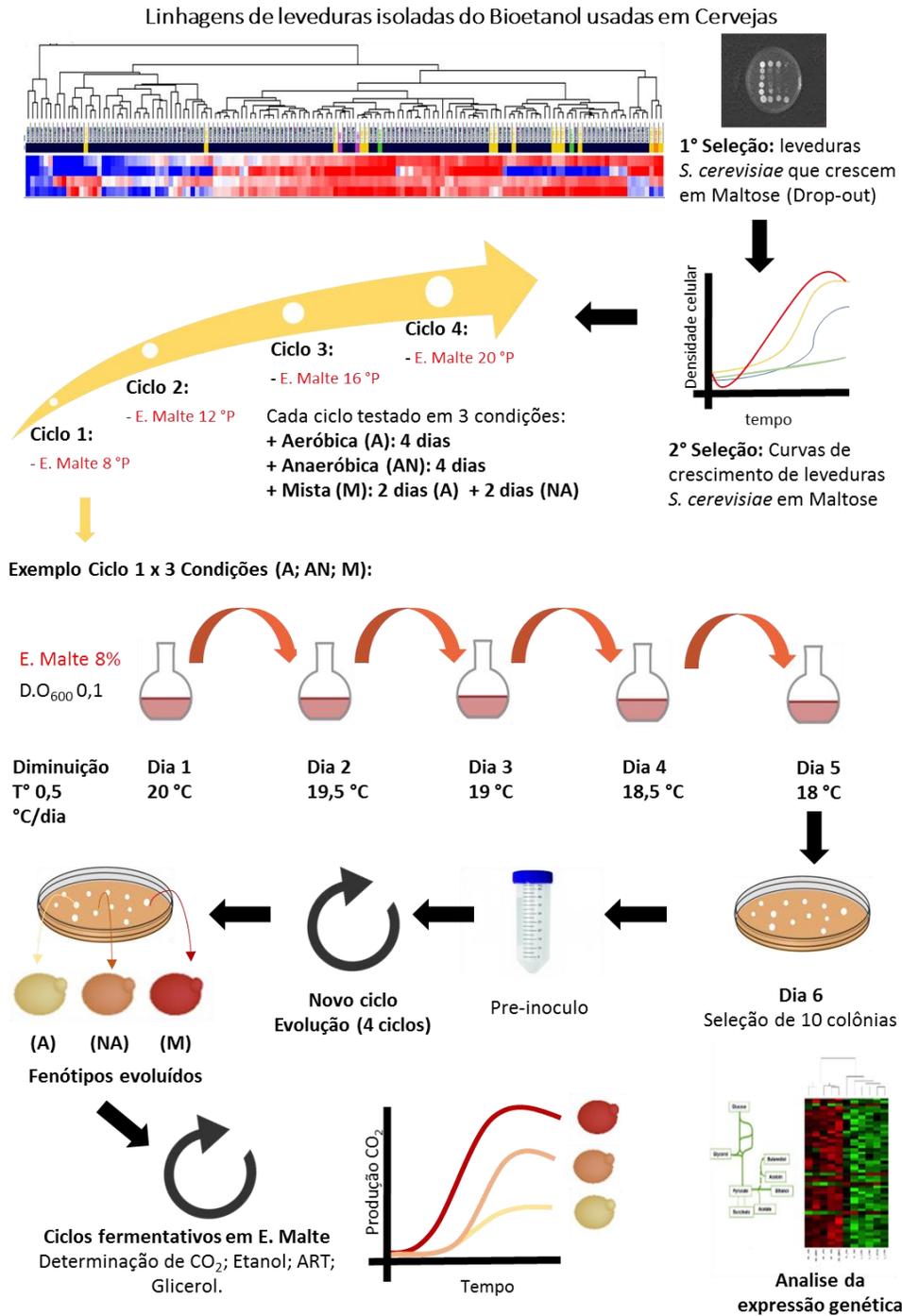


Figura 25. Detalhamento da metodologia a ser utilizada para a evolução dirigida em leveduras para utilização na fabricação de cervejas. Serão realizados 4 ciclos de evolução nos quais as concentrações de maltose serão gradativamente aumentadas. Cada ciclo será conduzido sob 3 diferentes condições (A) aeróbica, (AN) anaeróbica e (M) mista em temperaturas decrescentes de 20 a 18°C.

A.3 Resultados preliminares de fermentações em bioetanol

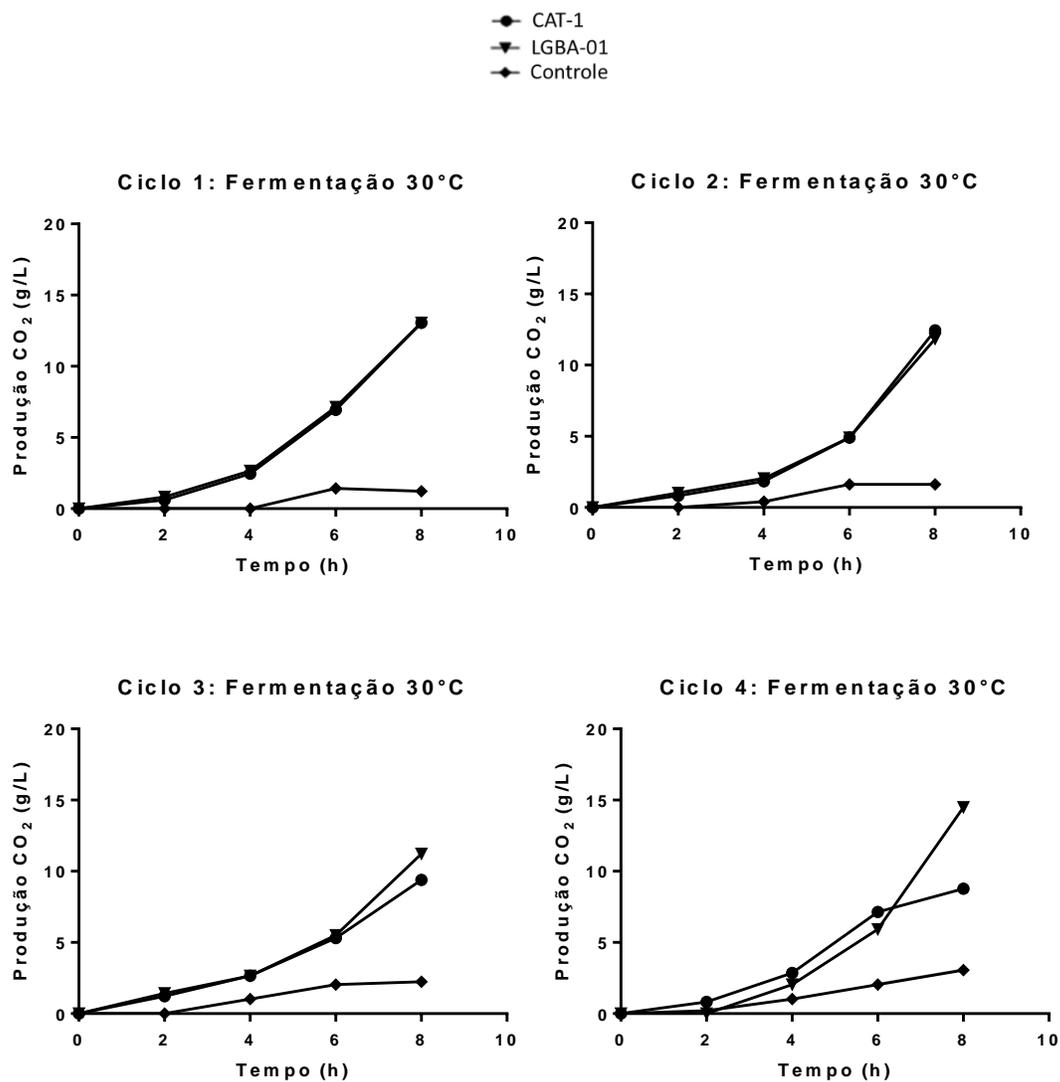


Figura 26. Fermentações a 30°C das leveduras termotolerantes LGBA-01 e CAT-1.

● CAT-1
 ▼ LGBA-01
 ◆ Controle

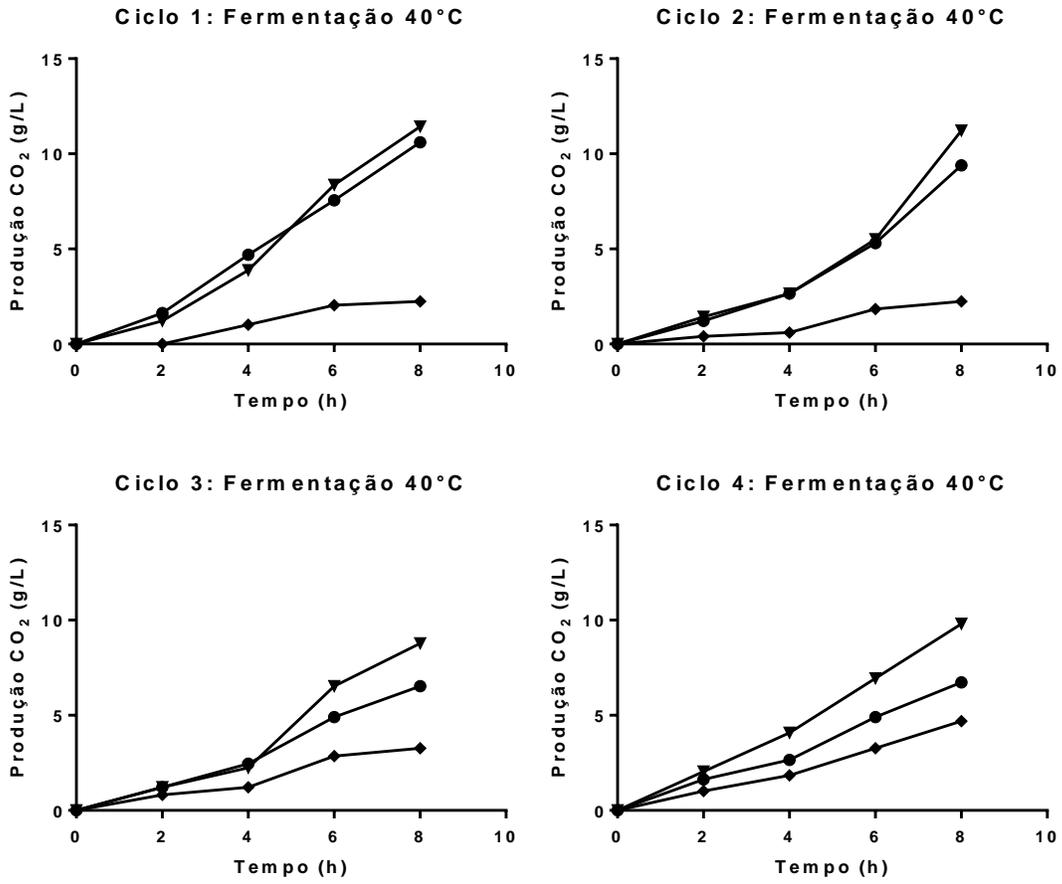


Figura 27. Fermentações a 40°C das leveduras termotolerantes LGBA-01 e CAT-1.

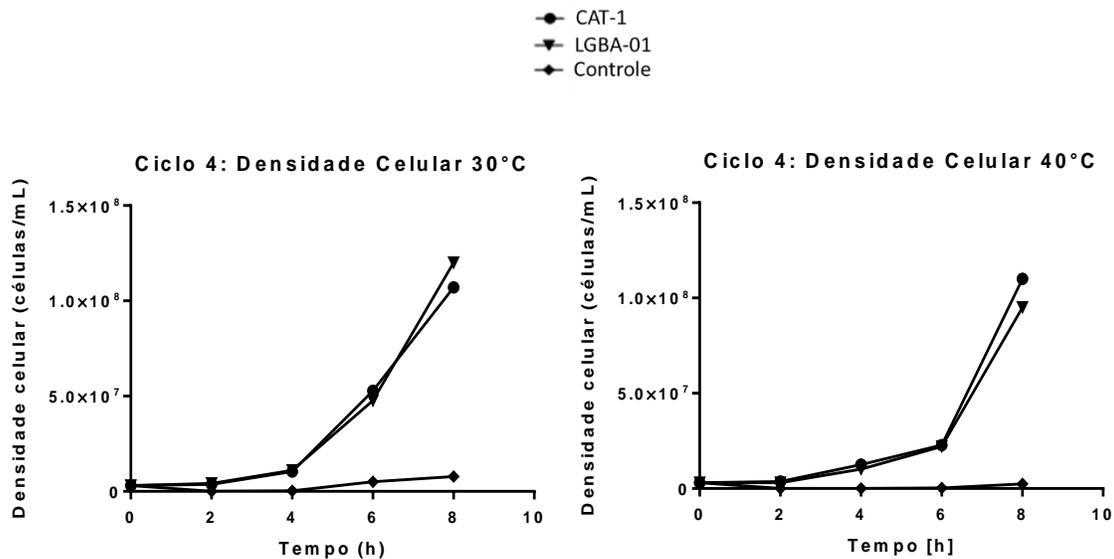


Figura 28. Densidade celular de LGBA-01 e CAT-1 a 30 e 40 °C.

Os resultados das figuras 26 e 27 indicaram que houve um decaimento geral da capacidade fermentativa de ambas leveduras nos tubos incubados a 40 °C, mesmo assim a levedura LGBA-01 (isolada pelo grupo de pesquisa LGBA) conseguiu um melhor *fitness* fermentativo a 40 °C em comparação com a levedura CAT-1. A linhagem CAT-1 já foi descrita como uma boa fermentadora, mas quando as temperaturas se elevam acima de 40 °C, ocorre diminuição dos rendimentos. Quando as fermentações foram analisadas comparando os ciclos, observou-se que LGBA-01 conseguiu se pré-adaptar as condições de estresse em 30 °C, lembrando que após cada ciclo os tubos foram tratado com ácido. No entanto, a levedura CAT-1 diminuiu ao longo de cada ciclo nas duas temperaturas testadas.

Além disso, no quarto ciclo, a densidade celular também foi determinada nas duas temperaturas (Figura 28). Os resultados revelaram que não houveram grandes diferenças de crescimento quando as cepas foram comparadas em cada temperaturas, mas inesperadamente a levedura CAT-1 também cresceu a 40 °C. Isto pode indicar que esta levedura realiza compensações (*Trade-off*) no seu metabolismo para aumentar de biomassa em condições anaeróbicas a 40 °C, o que explicaria os baixos rendimentos na fermentação nessa temperatura. Os chamados *Trade-off* já foram estudados e são considerados uma sinal de evolução em condições de estresse (CASPETA; NIELSEN, 2015). Por sua parte, AZ01 apresentou um pequena diminuição no crescimento em 40 °C, mas sua fermentação foi melhor com uma produção de CO₂ que atingiu até 10 gr/L. Outra observação foi que ambas cepas

demoraram mais tempo em alcançar maior densidade celular em 40 °C, mesmo assim o crescimento foi mais rápido que em 30 °C.

Conforme discutido, as leveduras LGBA-01 e CAT-1 podem ser evoluídas para aumentar rendimentos na fermentação a 40 °C, pois elas apresentam sinais de adaptação, isto é, rápido aumento de biomassa ou fermentações sub-ótimas a 40 °C. Assim, a evolução para essas leveduras será focada na adaptação a altas temperaturas e em volumes maiores.

A.4. Análises estatísticas de parâmetros físico-químicos (HPLC) em Bioetanol

Os análises ANOVA e testes comparativos de *Turkey* foram feitos utilizando o programa computacional *GraphPad*. Como exemplo se apresentam as seguintes duas figuras dos análises feitos no *sowftware*.

Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff.	95% CI of diff.	Significant?	Summary
CATEV 30°C S vs. CATEV 40°C S	7.289	5.435 to 9.143	Yes	****
CATEV 30°C S vs. CATEV 30°C G	5.154	3.301 to 7.008	Yes	****
CATEV 30°C S vs. CATEV 40°C G	15.18	13.32 to 17.03	Yes	****
CATEV 30°C S vs. CATEV 30°C S	2.312	0.4590 to 4.166	Yes	**
CATEV 30°C S vs. CATEV 40°C S	-0.1115	-1.965 to 1.742	No	ns
CATEV 30°C S vs. CATEV 30°C G	5.633	3.779 to 7.487	Yes	****
CATEV 30°C S vs. CATEV 40°C G	11.14	9.284 to 12.99	Yes	****
CATEV 30°C S vs. CATEV 30°C S	7.605	5.751 to 9.458	Yes	****
CATEV 30°C S vs. CATEV 40°C S	2.111	0.2575 to 3.965	Yes	*
CATEV 30°C S vs. CATEV 30°C G	17.75	15.90 to 19.61	Yes	****
CATEV 30°C S vs. CATEV 40°C G	10.76	8.910 to 12.62	Yes	****
CATEV 30°C S vs. Controle 30°C S C4	82.41	80.56 to 84.27	Yes	****
CATEV 30°C S vs. Controle 40°C S C4	82.41	80.56 to 84.27	Yes	****
CATEV 30°C S vs. Controle 30°C G C4	82.41	80.56 to 84.27	Yes	****
CATEV 30°C S vs. Controle 40°C G C4	82.41	80.56 to 84.27	Yes	****
CATEV 40°C S vs. CATEV 30°C G	-2.134	-3.988 to -0.2810	Yes	*
CATEV 40°C S vs. CATEV 40°C G	7.888	6.034 to 9.741	Yes	****
CATEV 40°C S vs. CATEV 30°C S	-4.977	-6.830 to -3.123	Yes	****
CATEV 40°C S vs. CATEV 40°C S	-7.401	-9.254 to -5.547	Yes	****
CATEV 40°C S vs. CATEV 30°C G	-1.656	-3.510 to 0.1975	No	ns
CATEV 40°C S vs. CATEV 40°C G	3.848	1.995 to 5.702	Yes	****
CATEV 40°C S vs. CATEV 30°C S	0.3155	-1.538 to 2.169	No	ns
CATEV 40°C S vs. CATEV 40°C S	-5.178	-7.032 to -3.324	Yes	****
CATEV 40°C S vs. CATEV 30°C G	10.46	8.609 to 12.32	Yes	****

Figura 29. Testes comparativos de fermentações em bioetanol

CATEV 40°C S vs. CATEV 40°C G	3.475	1.621 to 5.328	Yes	****
CATEV 40°C S vs. Controle 30°C S C4	75.12	73.27 to 76.98	Yes	****
CATEV 40°C S vs. Controle 40°C S C4	75.12	73.27 to 76.98	Yes	****
CATEV 40°C S vs. Controle 30°C G C4	75.12	73.27 to 76.98	Yes	****
CATEV 40°C S vs. Controle40°C G C4	75.12	73.27 to 76.98	Yes	****
CATEV 30°C G vs. CATEV 40°C G	10.02	8.168 to 11.88	Yes	****
CATEV 30°C G vs. CATEV 30°C S	-2.842	-4.696 to -0.9885	Yes	***
CATEV 30°C G vs. CATEV 40°C S	-5.266	-7.120 to -3.412	Yes	****
CATEV 30°C G vs. CATEV 30°C G	0.4785	-1.375 to 2.332	No	ns
CATEV 30°C G vs. CATEV 40°C G	5.983	4.129 to 7.837	Yes	****
CATEV 30°C G vs. CATEV 30°C S	2.450	0.5965 to 4.304	Yes	**
CATEV 30°C G vs. CATEV 40°C S	-3.043	-4.897 to -1.190	Yes	***
CATEV 30°C G vs. CATEV 30°C G	12.60	10.74 to 14.45	Yes	****
CATEV 30°C G vs. CATEV 40°C G	5.609	3.755 to 7.463	Yes	****
CATEV 30°C G vs. Controle 30°C S C4	77.26	75.40 to 79.11	Yes	****
CATEV 30°C G vs. Controle 40°C S C4	77.26	75.40 to 79.11	Yes	****
CATEV 30°C G vs. Controle 30°C G C4	77.26	75.40 to 79.11	Yes	****
CATEV 30°C G vs. Controle40°C G C4	77.26	75.40 to 79.11	Yes	****
CATEV 40°C G vs. CATEV 30°C S	-12.86	-14.72 to -11.01	Yes	****
CATEV 40°C G vs. CATEV 40°C S	-15.29	-17.14 to -13.43	Yes	****
CATEV 40°C G vs. CATEV 30°C G	-9.543	-11.40 to -7.690	Yes	****
CATEV 40°C G vs. CATEV 40°C G	-4.039	-5.893 to -2.185	Yes	****
CATEV 40°C G vs. CATEV 30°C S	-7.572	-9.426 to -5.718	Yes	****
CATEV 40°C G vs. CATEV 40°C S	-13.07	-14.92 to -11.21	Yes	****
CATEV 40°C G vs. CATEV 30°C G	2.576	0.7220 to 4.429	Yes	**
CATEV 40°C G vs. CATEV 40°C G	-4.413	-6.267 to -2.559	Yes	****
CATEV 40°C G vs. Controle 30°C S C4	67.24	65.38 to 69.09	Yes	****
CATEV 40°C G vs. Controle 40°C S C4	67.24	65.38 to 69.09	Yes	****
CATEV 40°C G vs. Controle 30°C G C4	67.24	65.38 to 69.09	Yes	****
CATEV 40°C G vs. Controle40°C G C4	67.24	65.38 to 69.09	Yes	****

Figura 30. Testes comparativos de fermentações em bioetanol

A.5 Testes de aumento de biomassa usando um Biorreator

Para a realização dos testes fermentativos, uma grande quantidade de levedura precisou ser utilizada. Por isso para aumentar os volumes de trabalho foi preciso assegurar uma produção de biomassa adequada. Assim, o crescimento das leveduras foi feito em biorreator usando um sistema *fed-batch* a 30°C. Na figura 31 se apresenta o biorreator após crescimento.



Figura 31. Biorreator após produção de biomassa.

Embora os resultados de biomassa da Tabela 15 não sejam ótimos, o fato de começar a funcionar o sistema de produção é um bom ponto de partida para realizar testes em maiores volumes tanto para crescimento, adaptação, sistemas de evolução dirigida ou as mesmas fermentações. Para otimizar o sistema, serão realizados outros testes, acompanhando o processo ao longo do tempo para calcular as taxas de crescimento e a quantificação de glicose.

Tabela 15. Quantidade de biomassa húmida produzida

Tubo	LGBA-01			CAT-1		
	Peso tubo (gr)	Peso T+B (gr)	Peso Biomassa (gr)	Peso tubo (gr)	Peso T+B (gr)	Peso Biomassa (gr)
1	13,17	20,69	7,52	13,45	20,43	6,98
2	13,3	20,82	7,52	13,43	20,44	7,01
3	13,34	20,73	7,39	13,53	20,70	7,17
4	13,08	20,76	7,68	13,44	20,54	7,10
5	13,19	20,82	7,63	13,23	20,31	7,08
6	13,31	20,85	7,54	13,22	20,35	7,14
7	13,39	21,11	7,72	13,54	20,65	7,11
8	13,47	21,14	7,67	13,35	20,44	7,08
	TOTAL		60,67	TOTAL		56,67