**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Aumento da tolerância de *Saccharomyces cerevisiae* a fatores estressantes
da fermentação etanólica: linhagens modificadas e suplementação de
aminoácidos**

Camila de Souza Varize

Tese apresentada para obtenção do título de Doutora em
Ciências. Área de concentração: Microbiologia Agrícola

**Piracicaba
2018**

Camila de Souza Varize
Tecnóloga em Produção Sucroalcooleira

**Aumento da tolerância de *Saccharomyces cerevisiae* a fatores estressantes da
fermentação etanólica: linhagens modificadas e suplementação de aminoácidos**
versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador:
Prof. Dr. **LUIZ CARLOS BASSO**

Co-orientador:
Prof. Dr. **AUGUSTO BÜCKER**

Tese apresentada para obtenção do título de Doutora em
Ciências. Área de concentração: Microbiologia Agrícola

Piracicaba
2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA – DIBD/ESALQ/USP

Varize, Camila de Souza

Aumento da tolerância de *Saccharomyces cerevisiae* a fatores estressantes da fermentação etanólica: linhagens modificadas e suplementação de aminoácidos / Camila de Souza Varize. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2018.

113 p.

Tese (Doutorado) - - USP / Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”.

1. *S. cerevisiae* 2. Estresse osmótico 3. Alto teor alcoólico 4. Aminoácidos na fermentação 5. Fermentação alcoólica I. Título

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus, pelas bênçãos que tem me concedido;

Ao meu noivo, Lucas Dantas Lopes, pelo imenso amor e companheirismo;

À minha mãe, Eliane de S. Varize, por todo amor e por representar a minha principal fonte de apoio;

Às minhas irmãs Angélica e Caroline de S. Varize e ao meu pai Edinaldo Varize (*in memoriam*), por todo amor e carinho;

Aos demais componentes da minha família e à família do meu noivo, pelo carinho e bons momentos compartilhados;

Ao meu orientador, Prof. Dr. Luiz Carlos Basso, por todos os ensinamentos científicos, por estar sempre presente e pela boa convivência;

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Augusto Bücker, por ser sempre solícito e pelas contribuições para o aprimoramento do presente trabalho;

Ao Prof. Dr. Boris U. Stambuk, pela concessão das linhagens de levedura;

Ao Técnico de laboratório, Luis Lucatti (Cometa), pela amizade e pelos auxílios em bancada;

Ao Prof. Dr. Luiz Humberto Gomes (Beto), pela comunicação atenciosa e por disponibilizar o laboratório sempre que me foi necessário;

Aos amigos do laboratório, Renata, Mariane, Carolina, Cristiane, Osni, Ricardo, Thalita e todos os outros colegas que já estiveram no Laboratório de Bioquímica e Tecnologia de Leveduras da ESALQ/USP, pela ajuda e boa convivência. Em especial à Renata, Mariane e Carolina, pela amizade, e porque estiveram presentes até o último momento de ensaio em bancada, ajudando ativamente para a concretização do presente trabalho;

Ao programa de pós-graduação em Microbiologia Agrícola da ESALQ/USP;

À agência CNPq, pela concessão da bolsa durante o período de doutoramento.

Os homens são como os rios

Um dos preceitos mais enraizados e mais geralmente admitidos é o de acreditar que os homens possuem em si qualidades imutáveis: há homens bons ou maus, inteligentes ou estúpidos, enérgicos ou apáticos, e por aí adiante. Ora, os homens não são assim. Podemos, apenas dizer que um homem é mais vezes bom que mau, mais vezes inteligente que estúpido, mais vezes enérgico que apático, ou o contrário; mas classificar um homem, como sempre fazemos, de bom ou inteligente e um outro de mau ou estúpido é um erro. Também os rios, todos de água, são umas vezes mais estreitos, outros rápidos, outros largos ou calmos, transparentes ou frios, caudalosos ou tépidos. Ora, os homens são como os rios. Cada um traz consigo a semente de todas as qualidades humanas, de que revela, em certos passos, umas características, noutros, outras, chegando mesmo, em certas ocasiões, a mostrar-se sob uma forma completamente oposta à sua natureza íntima, que, não obstante, mantém.

(in Ressurreição)

Leon Tolstói

SUMÁRIO

RESUMO	7
ABSTRACT	8
1 INTRODUÇÃO	9
Referências	10
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
2.1 A Importância do bioetanol	13
2.2 A fermentação alcoólica e a levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	15
2.3 Processo industrial brasileiro e condições estressantes às leveduras	17
2.3.1 Fermentação com alto teor alcoólico	20
2.4 Fatores de transcrição Msn2 e Msn4 em <i>S. cerevisiae</i>	21
2.5 Biossíntese de triptofano e suplementação de aminoácidos na fermentação alcoólica	25
Referências	27
3 Potencialidade de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> com sobre-expressão do gene <i>MSN2</i> ou <i>TRP1</i> para fermentações com alto teor alcoólico simulando as condições industriais de destilarias brasileiras	39
Resumo	39
Abstract.....	40
3.1 Introdução	41
3.2 Material e métodos	43
3.2.1 Material biológico	43
3.2.2 Testes de crescimento em microescala em diferentes concentrações de ART ou de etanol	44
3.2.3 Preparação de substrato a partir de melaço de cana-de-açúcar	44
3.2.4 Propagação de biomassa de levedura para ensaios fermentativos	44
3.2.5 Ensaios fermentativos	45
3.2.6 Quantificação de açúcares residuais, glicerol e etanol	46
3.2.7 Estimativa da velocidade de fermentação e determinação de biomassa	46
3.2.8 Viabilidade celular de levedura e controle de contaminação bacteriana	46
3.2.9 Extração e quantificação de carboidratos de reserva	47
3.2.10 Análises estatísticas	48
3.3 Resultados e discussão	48
3.3.1 Crescimento e viabilidade em diferentes concentrações de ART em mosto de melaço de cana-de-açúcar	48
3.3.2 Crescimento e viabilidade em meio YEPD com diferentes concentrações de etanol	51
3.3.3 Primeiro experimento fermentativo com 15 ciclos de células	56
3.3.3.1 Produção de etanol, acúmulo de biomassa e viabilidade celular	56
3.3.4 Segundo experimento fermentativo com 7 ciclos de células	60
3.3.4.1 Produção de etanol, velocidade de fermentação e viabilidade celular	60
3.3.4.2 Açúcares residuais e produção de glicerol	64
3.3.4.3 Carboidratos de reserva	67
3.4 Conclusões	72
3.5 Figuras Suplementares.....	74
Referências	75
4 Suplementação de aminoácidos na fermentação alcoólica empregando CAT-1 em mostos de melaço e xarope de cana-de-açúcar	81
Resumo	81

Abstract	82
4.1 Introdução	83
4.2 Material e Métodos	85
4.2.1 Material biológico	85
4.2.2 Testes de crescimento em microescala	85
4.2.3 Determinação de N assimilável em melaço de cana-de-açúcar	86
4.2.4 Preparação de mostos a partir de melaço e xarope de cana-de-açúcar com suplementação de aminoácidos	87
4.2.5 Propagação de biomassa de levedura para experimentos fermentativos	87
4.2.6 Experimentos fermentativos com suplementação de aminoácidos e reciclo de células	88
4.2.7 Determinação de biomassa	88
4.2.8 Determinação de etanol	89
4.2.9 Determinação de viabilidade celular	89
4.2.10 Análises estatísticas	89
4.3 Resultados e Discussão	89
4.3.1 Testes de crescimento em meio YNB com etanol	89
4.3.2 Testes de crescimento e determinação de nitrogênio assimilável em mosto de melaço de cana-de-açúcar	93
4.3.3 Experimentos fermentativos com suplementação de aminoácidos e reciclo de células	97
4.3.3.1 Fermentações em mosto de melaço de cana-de-açúcar	97
4.3.3.2 Fermentações em mosto de xarope de cana-de-açúcar	102
4.4 Conclusões	105
4.5 Figuras suplementares	107
Referências	108
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	112

RESUMO

Aumento da tolerância de *Saccharomyces cerevisiae* a fatores estressantes da fermentação etanólica: linhagens modificadas e suplementação de aminoácidos

O aumento da participação dos biocombustíveis na matriz energética mundial pode ajudar a prolongar a existência das reservas de petróleo, mitigar as ameaças representadas pela mudança climática e permitir melhor segurança do fornecimento de energia em uma escala global. Neste cenário, o processo brasileiro da produção de etanol a partir da cana-de-açúcar tem ganhado papel de destaque, pelo alto rendimento e baixo custo da produção. Linhagens de *S. cerevisiae* são amplamente empregadas nas fermentações industriais e, embora sejam consideradas mais tolerantes em relação a outras, o processo brasileiro impõe uma variedade de fatores estressantes sob a mesma, afetando o seu metabolismo e crescimento. A fermentação com alto teor alcoólico, realizada a partir da utilização de mostos contendo altas concentrações de açúcares, é uma das maneiras mais eficientes de se obter elevados níveis de etanol. No entanto, tal tecnologia procede ocasionando efeitos deletérios adicionais à levedura. Neste contexto, aumentar a tolerância da levedura é de fundamental importância para alcançar um desempenho fermentativo satisfatório. Neste estudo foram avaliadas linhagens de *S. cerevisiae*, isogênicas a linhagem industrial CAT-1, com a sobre-expressão dos genes *TRP1* e *MSN2*, envolvidos na biossíntese de triptofano e na resposta geral ao estresse, respectivamente. Tais linhagens foram avaliadas quanto ao seu potencial para realizar fermentações com alto teor alcoólico, simulando as condições industriais brasileiras. Os resultados revelaram que o gene *MSN2*, na versão truncada, favoreceu a linhagem principalmente com relação ao estresse osmótico, aumentando a velocidade de fermentação e o consumo de açúcares. O gene *TRP1* promoveu maior crescimento da linhagem em meio YEPD com 8% de etanol, contudo, tornou a linhagem menos viável em concentrações acima deste nível. No presente trabalho também foi avaliado o efeito da suplementação de aminoácidos na fisiologia da linhagem CAT-1 em meio YNB e em mostos de melaço e xarope de cana-de-açúcar. A suplementação com histidina promoveu maior crescimento e viabilidade celular nos diferentes meios testados. Além de histidina, os aminoácidos lisina e alanina aumentaram o crescimento da CAT-1 em mosto de melaço. A suplementação de triptofano e asparagina também promoveu aumento da viabilidade celular em mosto de xarope. Por outro lado, nos testes em microplacas a suplementação com cisteína depreciou o crescimento da linhagem em meio YNB com 10 e 12% de etanol e em mosto de melaço com 20% de ART. Os resultados obtidos indicam que tanto a engenharia genética, quanto a suplementação de aminoácidos podem ser alternativas viáveis para aumentar a tolerância de *S. cerevisiae*, para suportar condições de múltiplo estresse, encontradas em destilarias brasileiras.

Palavras-chave: *S. cerevisiae*; Estresse osmótico; Alto teor alcoólico; Aminoácidos na fermentação; Fermentação alcoólica

ABSTRACT

Increasing *Saccharomyces cerevisiae* tolerance to stressing factors of ethanolic fermentation: modified strains and amino acid supplementation

The expansion biofuels participation in the world energy matrix would help to extend the existence of fossil fuel reservoirs, mitigate the threats of climate change, and enable a better security of energy supply. The Brazilian process of ethanol production from sugarcane has gained an important role in the global energy scenario, for the high yield and low production cost. *S. cerevisiae* species is widely used in industrial fermentations for being resistant, but the Brazilian process imposes a variety of stressing factors to the yeast, affecting its metabolism and growth. The Very High Gravity Fermentation is performed by the utilization of musts with high sugar concentration and is one of the most efficient ways for obtaining high ethanol levels. However, this technology causes additional deleterious effects to the yeast. In this context, increasing yeast tolerance is of fundamental importance for a satisfactory fermentative performance. In this study we assessed *S. cerevisiae* strains - isogenic to the industrial strain CAT-1 - with over expression of *TRP1* and *MSN2* genes involved to tryptophan biosynthesis and in general stress response, respectively. These strains were evaluated for their potential to perform fermentations with high ethanol content, simulating the conditions of Brazilian distilleries. The results showed that the *MSN2* gene in the truncated version improved strain mainly to respond to the osmotic stress, increasing in fermentation velocity and the consumption of sugars. The *TRP1* gene overexpression promoted higher growth in YEPD medium with 8% ethanol, however, decreased viability at concentrations above this level. The present work also evaluated the effect of amino acid supplementation on the physiology of the CAT-1 strain in YNB medium and in molasses and syrup of sugarcane. Histidine supplementation increased the growth and cell viability in the different media tested. In addition to histidine, the amino acids lysine and alanine increased the growth of CAT-1 in molasses. Supplementation of tryptophan and asparagine also promoted increased cell viability in sugarcane syrup. On the other hand, in microplate assays, cysteine supplementation decreased growth in YNB medium with 10 and 12% ethanol, and in molasses with 20% ART. The results indicate that both genetic engineering and amino acid supplementation may be viable alternatives to increase tolerance of *S. cerevisiae* to supporting multiple stress conditions typical in Brazilian distilleries.

Keywords: *S. cerevisiae*; Osmotic stress; High ethanol content; Amino acid supplementation; Alcoholic fermentation

1 INTRODUÇÃO

Em virtude do aquecimento global e o futuro esgotamento das reservas de petróleo, a importância atribuída aos biocombustíveis aumentou em demasia. Os impactos positivos causados pelo emprego dos biocombustíveis em substituição aos combustíveis fósseis, não se restringem apenas ao campo econômico, mas também envolvem questões políticas e ambientais. Além de reduzir a dependência do petróleo e os gastos com energia, o uso de biocombustíveis pode resultar em uma diminuição significativa das emissões dos gases causadores do efeito estufa. Neste cenário, o setor sucroalcooleiro brasileiro tem se destacado pelo alto rendimento e baixo custo da produção do etanol combustível, sendo a cana-de-açúcar a principal matéria-prima utilizada.

No Brasil e nos EUA, as tecnologias da produção de etanol já são consolidadas, o que torna este biocombustível um forte candidato a participar da matriz energética mundial em grande escala. O etanol é o biocombustível mais utilizado no mundo, tanto na forma pura, como na de aditivo à gasolina (Mckendry, 2002; Sánchez et al., 2008).

No processo brasileiro utiliza-se o caldo ou o melaço de cana como substrato para a produção de etanol pela levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Durante a fermentação industrial, vários fatores de estresse são impostos à levedura, promovendo efeitos deletérios sob a mesma, afetando o seu metabolismo e crescimento. Tais fatores incluem: alta concentração de açúcares, presença de sais no mosto, altas temperaturas, alta concentração de etanol, baixo pH extracelular, contaminação bacteriana, deficiência de nutrientes e presença de agentes inibidores no mosto. Além disso, neste processo a biomassa de levedura é reaproveitada em várias fermentações diariamente, o que pode contribuir para a diminuição significativa da viabilidade celular (Basso et al., 2011).

Tecnologias têm sido empregadas a fim de aumentar a eficiência fermentativa da produção de etanol. A fermentação com alto teor alcoólico, conhecida como *Very High Gravity Fermentation*, por exemplo, é uma das formas de se obter maiores índices de etanol, a partir de fermentação de mostos contendo acima de 25% (p/v) de açúcares totais (Thomas et al., 1994). Embora a levedura *S. cerevisiae* seja amplamente empregada no processo e seja considerada mais resistente a vários tipos de estresses, ainda são necessários esforços em pesquisas a fim de se obter avanços no tocante a sua tolerância ao processo fermentativo industrial. Estudos adotando a engenharia genética de leveduras tem pretendido aumentar a

resistência das células para suportar condições deletérias. De acordo com Bücker et al. (2014) a modificação da região promotora do gene *TRP1*, envolvido na biossíntese de triptofano, e do gene *MSN2*, que codifica um fator de transcrição (Msn2), envolvido na resposta geral ao estresse em *S. cerevisiae*, podem incrementar a tolerância de linhagens de *S. cerevisiae* frente ao alto teor alcoólico e aos outros diferentes tipos de estresses enfrentados no processo brasileiro. Também tem sido proposto que o uso de aminoácidos para a suplementação do mosto de fermentação pode promover maior tolerância e crescimento das células de levedura frente a diferentes condições de estresse, como por exemplo, o alto teor alcoólico e o estresse osmótico promovido pelas altas concentrações de açúcares no meio (Thomas & Ingledew, 1990; Pham & Wright, 2008; Hu et al., 2005; Blomqvist et al., 2012). Os aminoácidos, além de exercerem funções vitais para as células, como a síntese de enzimas e de componentes estruturais, ainda podem ser incorporados nas proteínas de membrana citoplasmática, promovendo maior rigidez da membrana e tolerância às células (Hu et al., 2005).

O presente estudo foi dividido em dois trabalhos. No primeiro, objetivou-se avaliar o potencial de linhagens *S. cerevisiae*, isogênicas à linhagem industrial CAT-1, com sobre-expressão dos genes *MSN2* ou *TRP1*, para fermentações com alto teor alcoólico e reciclo celular, simulando as condições industriais de destilarias brasileiras. No segundo, objetivou-se avaliar o efeito da suplementação de aminoácidos sobre o crescimento, viabilidade celular e produção de etanol da levedura CAT-1 em fermentações de mostos de melaço e xarope de cana-de-açúcar, empregando a reciclagem de células.

Referências

Mckendry, P. Energy production from biomass (part 2): conversion technologies. **Bioresource Technology**, v. 83, n. 1, p. 47-54, 2002.

Sánchez, O.J.; Cardona, C.A. Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 13, p. 5270-5295, 2008.

Basso, L.C.; Basso, T.O.; Rocha, S.N. Ethanol production in Brazil: the industrial process and its impact on yeast fermentation. In: SANTOS BERNARDES, M.A. (Ed.). **Biofuel Production - Recent Developments and Prospects**. InTech, 2011, chap. 5, p. 85-100.

Thomas, K.C.; Hynes, S.H.; Ingledew, W.M. Practical and theoretical considerations in the production of high concentration of alcohol by fermentation. **Process Biochemistry**, v. 31, n. 4, p. 321-331, 1996.

Thomas, K.C.; Ingledew, W.M. Fuel alcohol production: effects of free amino nitrogen on fermentation of very-high-gravity wheat mashes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 57, n. 7, p. 2046-2050, 1990.

Pham, T.K.; Wright, T.K. The proteomic response of *Saccharomyces cerevisiae* in very high glucose conditions with amino acid supplementation. **Journal of Proteome Research**, n. 7, p. 4766-4774, 2008.

Blomqvist, J.; Nogué, V.S.; Gorwa-Grauslund, M.; Passoth, V. Physiological requirements for growth and competitiveness of *Dekkera bruxellensis* under oxygen-limited or anaerobic conditions. **Yeast**, v. 29, n. 7, p. 265-274, 2012.

Hu, C.K.; Bai, F.W.; An, L.J. Protein amino acid composition of plasma membranes affects membrane fluidity and thereby ethanol tolerance in a self-flocculating fusant of *Schizosaccharomyces pombe* and *Saccharomyces cerevisiae*. **Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao**, v. 21, n. 5, p. 809-813, 2005.

Bücker, A. **Engenharia genômica de linhagem industrial de *Saccharomyces cerevisiae* visando melhorar a tolerância ao etanol**. 2014. 111p. Tese (Doutorado em Bioquímica) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2014.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A importância do bioetanol

Os combustíveis derivados de petróleo, como o óleo diesel e a gasolina, são muito utilizados em todo o mundo. No entanto, há uma recorrente preocupação por este recurso natural ser finito (Demirbas & Balat, 2006; Searchinger et al, 2008). Além disso, a queima dos combustíveis fósseis é responsável pela emissão de parte significativa dos gases causadores do efeito estufa (GEE). Neste cenário, o dióxido de carbono (CO₂) é o gás mais produzido, contribuindo para mudanças climáticas (Wuebbles & Jain, 2001; Gallo, 2011).

A utilização de energia renovável é uma das maneiras mais eficientes para se alcançar o desenvolvimento sustentável. Aumentar sua participação na matriz energética mundial ajudaria a prolongar a existência de reservas de combustíveis fósseis, mitigar as ameaças representadas pela mudança climática, e permitir uma melhor segurança do fornecimento de energia em escala global (Mckendry, 2002; Gray et al., 2006; Goldemberg, 2007; Nigam; Singh, 2011). A maioria das "novas fontes renováveis de energia" ainda está em fase de desenvolvimento comercial, mas algumas tecnologias já estão bem estabelecidas, como por exemplo, o etanol brasileiro de cana-de-açúcar, que depois de 40 anos de produção, tornou-se totalmente competitivo com a gasolina e apropriado para a utilização em muitos países, tornando-se uma mercadoria energética global (Goldemberg, 2007).

Segundo Balat et al. (2009), o etanol é o biocombustível mais utilizado em todo o mundo e pode ser produzido a partir de diferentes tipos de matérias-primas, classificadas em três categorias: açúcares simples, amido e lignocelulose. Também pode ser empregado de forma intensiva nos setores químicos e nas indústrias de bebida, farmacêutica e de limpeza (Penido-Filho, 1980).

O Brasil e o Estados Unidos são os maiores produtores de etanol no mundo (Gerbens-Leenes et al., 2012), sendo que a produção nos EUA é maior e baseada na utilização do milho, enquanto que no Brasil se utiliza quase que exclusivamente a cana-de-açúcar (Wheals et al., 1999; Walter et al., 2008; Gerbens-Leenes et al., 2012). No ano de 2016, um total de 100,7 milhões de m³ de etanol combustível foi produzido em todo o mundo. Neste mesmo ano, os EUA e o Brasil representaram 57,6% e 27,4% da produção total mundial de etanol, respectivamente (RFA, 2017).

O uso da cana-de-açúcar para produzir etanol, além de açúcar, foi uma decisão política e econômica que envolveu investimentos do governo brasileiro em 1975, quando o Governo Federal decidiu incentivar a produção de álcool em substituição à gasolina, com a ideia de reduzir as importações de petróleo devido à crise enfrentada. O surgimento do Programa Nacional do Álcool (Proálcool) apresentou aspectos ambientais, econômicos e sociais positivos, e tornou-se o programa de energia de biomassa mais importante no mundo (Goldemberg et al., 2004).

A cana-de-açúcar, sob a forma de caldo ou de melaço, pode ser utilizada em países tropicais para a produção de etanol. Esta matéria prima é composta principalmente de sacarose, fibras e água, geralmente em proporções de aproximadamente 12%, 15% e 70%, respectivamente. Os demais componentes são outros açúcares (glicose e frutose), materiais inorgânicos, substâncias nitrogenadas, gomas, ceras e ácidos orgânicos (Chen & Chou, 1993).

A conversão de sacarose, contida nesta planta, em etanol, é fácil em comparação com os materiais amiláceos e a lignocelulose, porque a hidrólise prévia da matéria-prima não é necessária, uma vez que esse dissacarídeo pode ser diretamente metabolizado por células de leveduras, principalmente pertencentes à espécie *Saccharomyces cerevisiae* (Waclawovsky et al., 2010). Em leveduras *S. cerevisiae*, a sacarose é metabolizada principalmente pela via extracelular (Gascón & Lampen, 1968). Nesta via, uma enzima produzida naturalmente por esta espécie de levedura, denominada invertase (β -D-fructosidase), realiza a hidrólise de sacarose no espaço periplasmático, ou seja, no espaço extracelular, formando os monossacarídeos glicose e frutose. Tais monossacarídeos são transportados para o espaço intracelular e posteriormente metabolizados na via glicolítica (Barnett, 1976; Barnett, 1981; Walker, 1998; Lagunas, 1993). O etanol produzido a partir da cana-de-açúcar além de possuir um balanço energético positivo, também tem sido beneficiado pelo apoio de políticas governamentais em vários países, inclusive no Brasil, que abastece aproximadamente 40% deste biocombustível para veículos de passageiros, isto é, um terço da sua demanda total de energia para transporte (Goldemberg, 2009).

Devido ao aumento das preocupações ambientais e às crises periódicas nos países exportadores de petróleo, o etanol se tornou uma alternativa viável e realista no mercado mundial de energia. Portanto, o desenvolvimento de tecnologias de baixo custo para a produção de etanol combustível é uma prioridade para muitos centros de pesquisa, universidades, empresas privadas, e até mesmo para as diferentes políticas públicas (Cardona & Sanchez, 2007). A necessidade de aumento da produção de etanol, a fim de atender um

mercado com potencial, aliado à dependência por combustíveis fósseis, traz desafios ao governo brasileiro (Duarte et al., 2013). Sabendo que o fornecimento de combustíveis fósseis não terá condições de suprir as necessidades crescentes por energia em nosso planeta de forma sustentável, as condições de mercado relacionadas à oferta e à demanda analisadas tornam a produção de etanol promissora (Cerqueira-Leite et al., 2009).

Tendo em vista esta realidade, o aumento da produção de energias renováveis irá crescer progressivamente. Questões ambientais, econômicas e políticas serão fundamentais para a sustentação do crescimento da produção de etanol (Gonçalves et al., 2011). Vários obstáculos no processo de fermentação alcoólica devem ser superados para alcançar um desempenho mais elevado e competitivo da produção de etanol pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* (Alfenore et al., 2002; Guardabassi & Goldemberg, 2014).

2.2 A fermentação alcoólica e a levedura *Saccharomyces cerevisiae*

A fermentação alcoólica é um processo biológico no qual ocorre a produção de etanol a partir da ação de leveduras, principalmente pertencentes à espécie *S. cerevisiae*, em meios contendo açúcares fermentescíveis (Bai et al., 2008).

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é um fungo unicelular, eucarioto, heterotrófico e pertencente ao filo Ascomycota. Sua reprodução normalmente é assexuada, mais especificamente por brotamento. Possui alto grau de organização celular, contendo núcleo celular com envoltório (envelope nuclear) e organelas (Madigan et al., 2010).

Além de ser utilizada para produção do etanol, a levedura *S. cerevisiae* pode ser empregada nas indústrias farmacêuticas, de panificação e de bebidas. Sabe-se também que a mesma é amplamente utilizada como organismo modelo em estudos de bioquímica, genética e biologia celular de seres eucariotos. Seu conhecimento biológico é bem desenvolvido, sendo considerada de fácil manutenção e manipulação em laboratório (Ostergaard et al., 2000; Zakrajšek et al., 2011).

No processo de produção de etanol, leveduras *S. cerevisiae* possuem várias características desejáveis e vantajosas, quando comparadas a outras espécies de leveduras. São exemplos destes atributos a alta e rápida capacidade de transformar açúcares fermentescíveis em etanol, a capacidade de sobrevivência em ambientes com uma acidez mais elevada, a osmotolerância, a capacidade de tolerar teores elevados de etanol e a capacidade de suportar variações de temperatura (Andrietta et al., 2007).

A via metabólica envolvida na fermentação alcoólica é a glicólise. Nesta via, uma molécula de glicose é metabolizada e duas moléculas de piruvato são produzidas. As moléculas de ácido pirúvico são convertidas em etanol, com a liberação de 2 moléculas de CO₂ e a formação de 2 moléculas de trifosfato de adenosina (ATP) (Walker, 1998). A fermentação alcoólica ocorre no citoplasma das células de leveduras, pela glicólise seguida da redução do piruvato, onde após 12 reações enzimáticas, são produzidos etanol e CO₂. Já a oxidação total do açúcar, pela cadeia respiratória, ocorre na mitocôndria das células e, neste caso, o saldo energético é maior (Castrillo & Ugalde, 1994; Lagunas, 1981).

As leveduras, como todos os outros micro-organismos, tem como seu principal objetivo a perpetuação da espécie, sendo o etanol um produto de descarte excretado por elas em anaerobiose (Lagunas, 1976). Uma explicação evolutiva para a preferência da via fermentativa – que resulta em menor rendimento energético – em contraposição à respiratória em determinadas condições, é dada no sentido de que o etanol seja excretado pelas células para evitar uma disputa por nutrientes. Este fenômeno é chamado de relação de antagonismo, pois o etanol é tóxico para vários outros micro-organismos (Golubev, 2006). Leveduras *Saccharomyces cerevisiae* são conceituadas como Crabtree positivas, pois mesmo na presença de oxigênio, realizam a fermentação quando há disponibilidade de glicose ou outros açúcares fermentescíveis no meio (Pronk et al., 1996; Lagunas, 1981).

De acordo com Lagunas (1976), o objetivo primordial das leveduras, quando em anaerobiose, é a utilização da fonte de carbono para geração de uma forma de energia química (ATP), energia que será utilizada para a realização da biossíntese de moléculas e também para a realização de trabalhos fisiológicos, ambos necessários para manutenção da vida: crescimento, multiplicação e perpetuação da espécie. Durante a fermentação alcoólica, uma parte da fonte de carbono é desviada para a síntese de proteínas, ácidos nucleicos, polissacarídeos e lipídios necessários para a produção de biomassa. Também ocorre a formação de outros produtos relacionados com a adaptação e sobrevivência, tais como o glicerol e ácidos orgânicos (Reed & Nagodawithana, 1990; Amorim et al., 1996). O glicerol, os ácidos orgânicos (ácidos succínico e acético) e a biomassa são subprodutos relacionados ao equilíbrio de óxido-redução em anaerobiose. A fermentação alcoólica é um processo não oxidativo e para manter o equilíbrio de óxido-redução, todo NADH formado em reações de oxidação, decorrentes da produção da biomassa e a formação de ácidos orgânicos deve ser consumido em reações de redução, acopladas à produção de etanol e glicerol (Blomberg & Adler, 1992; Van-Dijken & Scheffers, 1986). O glicerol também é um metabólito

osmorregulador, sendo o produto secundário formado em maior quantidade pelas leveduras, originado na mesma via em que o etanol é sintetizado. A formação do glicerol é aumentada quando há alta pressão osmótica no meio, protegendo as células na presença deste estresse (Guo et al., 2001; Cronwright et al., 2002).

2.3 Processo industrial brasileiro e condições estressantes às leveduras

A fermentação alcoólica é um processo que depende de diversos fatores, destacando-se, entre eles, a espécie de levedura utilizada, a temperatura, a taxa de fornecimento de oxigênio, o pH e a natureza química dos nutrientes fornecidos (Ceccato-Antonini, 2008; Querol et al., 2003).

No Brasil, o mosto que normalmente é utilizado para as fermentações industriais é proveniente do melaço resultante da cristalização final do açúcar, apresentando em sua composição: água, carboidratos fermentescíveis (glicose, frutose e sacarose), compostos de origem orgânica (aminoácidos, vitaminas, proteínas) e uma fração mineral (composta principalmente por cálcio, magnésio, sódio e potássio) (Basso et al., 2011).

No processo de produção de etanol, assim que o mosto é adicionado às leveduras, as mesmas entram em um estágio de adaptação e começam a se multiplicar. Posteriormente, ocorrem a produção de etanol e o desprendimento de CO₂. A partir do esgotamento do açúcar presente no mosto, as leveduras passam a reduzir sua atividade fermentativa (Paschoalini & Alcarde, 2009).

Nas destilarias brasileiras, os processos de fermentação alcoólica são denominados: fermentações contínuas e fermentação em bateladas (com e sem centrifugação). São vários os tipos de processos de fermentações contínuas. Caracteriza-se por possuir uma alimentação contínua a uma vazão constante, sendo o volume da reação mantido constante através da retirada contínua de caldo fermentado. É um processo ininterrupto onde se pode operar por longos períodos. O mosto é misturado à levedura na primeira dorna e passa para as demais num processo contínuo até chegar à última dorna, onde a concentração de açúcares estará menor possível (Amorim et al., 1989; Teixeira et al., 2007).

O processo de produção de etanol mais antigo no Brasil é a fermentação em bateladas sem recirculação do fermento, utilizado para produção de aguardentes. Neste, utilizam-se várias dornas, onde são realizadas várias fermentações. As dornas são cheias, fermentadas e processadas uma a uma. Então, após o término da fermentação, espera-se a decantação do

fermento. No entanto, tal processo pode ser adequado para a produção de aguardente e desvantajoso para a produção de etanol, já que para que ocorra a decantação é necessário que aconteça uma contaminação bacteriana ou que haja a presença de leveduras contaminantes, a fim de que ocorra a floculação do fermento (biomassa de levedura). Devido ao menor rendimento obtido no processo de bateladas, avanços foram introduzidos. Tal avanço se deu na década de trinta com o surgimento do processo chamado Melle-Boinot (Fermentação em Bateladas com centrifugação), no qual foram inseridos no processo em bateladas: o tratamento do fermento com água e ácido, a centrifugação e a reinserção do fermento no processo (reciclo celular) (Amorim et al., 1996; Amorim et al., 1989). Desde então, este é o processo mais usado nas destilarias brasileiras, pois com o aproveitamento do fermento em várias fermentações, obtém-se um maior rendimento.

Teoricamente, nos diferentes processos fermentativos, para cada 100 Kg de ART (Açúcares Redutores Totais = sacarose, glicose e frutose), são produzidos no máximo 64,75 litros de álcool absoluto, a uma temperatura de 20°C (Ghose et al., 1979; Okolo et al., 1987).

De acordo com Basso et al. (2008), o reciclo de células pode ocasionar queda na viabilidade celular no decorrer de vários ciclos fermentativos. Por outro lado, pode contribuir positivamente para as células de leveduras, levando à evolução de linhagens multi-tolerantes, pois durante a reciclagem de células há maior pressão seletiva, conduzindo a uma maior tolerância das mesmas frente às condições estressantes da fermentação industrial.

Nas fermentações alcoólicas industriais, uma variedade de fatores estressantes impõem restrições às células de levedura, interferindo sobre o seu metabolismo e crescimento, das quais podemos listar: alta concentração de açúcar, presença de sais no mosto, temperatura elevada, alta concentração de etanol, baixo pH externo (devido ao tratamento ácido), contaminação bacteriana, reciclo de leveduras, deficiência de nutrientes e presença de agentes inibidores (sulfito) (Graves et al., 2007).

A temperatura pode afetar diretamente o metabolismo, crescimento e a viabilidade celular das leveduras. As leveduras em destilarias crescem bem em temperaturas de 30-33°C. As fermentações podem ocorrer com maior velocidade em temperaturas ainda mais elevadas, contudo, com o seu aumento as células se tornam mais sensíveis à toxidez exercida pelo etanol excretado, ocasionando queda na viabilidade celular (Amorim et al., 1989; Piper, 1995; Aldiguier et al., 2004).

O estresse etanólico inibe o crescimento e diminui a viabilidade celular das leveduras. O alto teor de etanol pode intervir desfavoravelmente sobre o sistema de transporte,

sinalização celular e atividade de enzimas-chave da via glicolítica. A toxidez do etanol atua diretamente na membrana citoplasmática das células, alterando o grau de polaridade e aumentando sua fluidez, ocasionando uma interrupção do crescimento celular, quando em concentrações elevadas (Ingran, 1976; Banat et al., 1998).

Nas fermentações industriais, o pH é um fator importante para o controle da contaminação bacteriana. Os valores de pH dos mostos em destilarias variam de 4,5 a 5,5, com uma boa capacidade tamponante. O pH intracelular se mantém na faixa de 5,8 a 6,9, isto quando o pH extracelular estiver na faixa de 2 a 7. Contudo, um pH extracelular mais baixo faz com que as leveduras gastem mais energia para a manutenção do pH interno, além de afetar as proteínas de transporte da membrana citoplasmática (Steckelberg, 2001).

A contaminação bacteriana é um dos fatores que ocasionam maior efeito deletério sobre a levedura. Quando ocorre a presença aumentada de bactérias, ocorrem formações significativas de ácidos láctico e acético produzidos pelas mesmas. O desenvolvimento das bactérias procede a partir de um desvio da fonte de carbono, diminuindo conseqüentemente a formação de etanol (Basso et al., 2008).

Condições de estresse osmótico, como as encontradas em fermentações com alto teor alcoólico, podem prejudicar o metabolismo da levedura. O aumento da pressão osmótica no mosto pode ocasionar uma diminuição concomitante da viabilidade, crescimento e desempenho fermentativo. Um choque hiperosmótico em *S. cerevisiae* pode resultar em perda de turgescência por perda de água citoplasmática. Em condições de estresse osmótico, mecanismos de osmorregulação ocorrem, e estes estão relacionados com a síntese celular de glicerol e trealose. Desta forma, as células podem se prevenir da desidratação e proteger suas estruturas (Mager & Siderius, 2002).

Os carboidratos de reserva trealose e glicogênio podem representar até 30% da matéria seca da levedura. A trealose é um dissacarídeo formado por duas moléculas de glicose, sendo responsável pela manutenção de células vegetativas e esporos viáveis. A função protetora da trealose é resultado da relação entre sua localização e mobilização celular. É acumulada no citoplasma, exercendo influência na atividade de água, contribuindo para a latência celular e aumentando a resistência ao estresse hídrico (Parrou et al., 1997; Singer & Lindquist, 1998; Zhao & Bai, 2009). A trealose mantém a integridade da membrana porque substitui as moléculas de água nos dois lados da camada fosfolipídica, em condições onde há baixa atividade de água. Ambos os carboidratos de reserva, a trealose e o glicogênio, sofrem

oscilações durante a fermentação, podendo terminar o processo com teores diferentes. Ao final da fermentação, tais reservas podem ser metabolizadas pelas células, produzindo mais etanol e enriquecendo a levedura com nitrogênio (Amorim et al., 1996).

No ano de 1989, a técnica da cariotipagem permitiu o resgate de linhagens dominantes e persistentes no processo industrial, sendo estas pertencentes à espécie *S. cerevisiae* e denominadas CAT-1, PE-2, BG-1, SA-1. Tais linhagens são atualmente amplamente utilizadas nas destilarias brasileiras e foram selecionadas para boas características fermentativas, como: alto rendimento em etanol, elevada viabilidade celular durante os ciclos, altos teores de trealose, não formadoras de espuma e não floculantes. Além de apresentarem características fermentativas desejáveis, também se destacaram com boa capacidade de implantação (60-70%) em processos industriais, com alta taxa de dominância, chegando ao final da safra representando quase a totalidade da biomassa da dorna (Basso et al., 2008).

2.3.1 Fermentação com alto teor alcoólico

Uma maneira de aumentar os níveis de etanol obtidos na fermentação industrial é por meio da intensificação do processo. A tecnologia denominada *Very High Gravity Fermentation* (*VHG Fermentation*) é um processo de melhoria destinado a obter altas concentrações de etanol, de até 15% (v/v), a partir de concentrações altas de açúcares totais ($>250 \text{ g.L}^{-1}$).

A tecnologia *VHG* permite a redução de água do processo, reduzindo assim o custo operacional da destilação e a geração da vinhaça, resultando em economias significativas de energia (Thomas et al., 1996). No entanto, ao longo da fermentação *VHG*, a levedura industrial encontra um estresse significativo induzido por pressão osmótica, o que leva a variações na cinética de fermentação. Linhagens tolerantes ao estresse osmótico e etanólico são pré-requisitos para uma produção de etanol mais eficiente em condições de *VHG fermentation*. O nível de etanol ao final da fermentação depende principalmente das condições nutricionais para a manutenção das células. Outra fonte comum de variações na cinética pode estar relacionada à qualidade da matéria-prima, sendo que, a qualidade do melaço e caldo da cana-de-açúcar pode mudar dependendo da espécie, período de colheita, condições climáticas e procedimento de extração (Wang et al., 2013).

Segundo Puligundla et al. (2011), uma economia de cerca de 40% do consumo de água pode ser alcançada pela fermentação com alto teor alcoólico. A partir da utilização de um

mosto com alta concentração de açúcares, consideráveis economias de energia podem ser obtidas, pelo fato de haver menos fluido nas etapas de aquecimento, resfriamento e destilação.

2.4 Fatores de transcrição Msn2 e Msn4 em *S. cerevisiae*

Todas as unidades estruturais e funcionais dos organismos vivos, isto é, todas as células, possuem a capacidade de responder a mudanças súbitas das condições ambientais que são capazes de ameaçar a viabilidade celular (Kültz, 2005).

Os mecanismos de resposta celulares incluem sensores ambientais e vias de transdução de sinais que podem ocasionar alterações significativas nos programas de expressão gênica. A indução ou repressão da expressão gênica sob condições de estresse permite uma rápida adaptação a diversas condições, resultando no aumento da aptidão e sobrevivência celular (Gasch et al., 2000).

Os fatores de transcrição promovem a expressão de diferentes genes em resposta a diversas condições de estresse. Enquanto alguns promovem a transcrição de conjuntos específicos de genes, assim permitindo a adaptação celular a estresses específicos, outros promovem a transcrição de muitos genes em resposta a uma grande variedade de tensões ambientais (Estruch, 2000). Mais detalhadamente, os fatores de transcrição são proteínas que se ligam a sequências específicas (promotores) do DNA de células eucarióticas para permitir que haja uma ligação entre a enzima RNA-polimerase e o DNA, permitindo assim a transcrição e a posterior tradução (Phillips, 2008).

Em leveduras *S. cerevisiae*, os fatores de transcrição Hsf1 e Msn2/Msn4 são os principais atuantes nos sistemas de transdução de sinais e realizam papéis importantes na resposta geral ao estresse (Estruch, 2000; Sadeh et al., 2011).

Quando as células de *S. cerevisiae* estão diante de condições estressantes, os fatores de transcrição são fosforilados e transportados para o núcleo. Deste modo, controlam a regulação da síntese dos genes de estresse, porque desencadeiam a transcrição de genes com sequências reguladoras em seus promotores (Estruch, 2000).

Por exemplo, em *S. cerevisiae* o fator de transcrição Hsf1 (*heat shock factor protein 1*) é relacionado à resposta ao choque térmico, visto que, em resposta a temperaturas elevadas, este fator de transcrição é fosforilado e transportado para o núcleo celular, desencadeando a transcrição de genes cuja sequência promotora apresenta o elemento de choque térmico (Mager & De-Kruijff, 1995). O gene *MSN2* e o seu homólogo *MSN4* também participam da

resposta ao choque térmico e são normalmente ativados por vários outros tipos de estresse (Martínez-Pastor et al., 1996). Os genes *MSN2* e *MSN4* se assemelham por apresentar 41% de identidade entre suas sequências. O fator de transcrição Msn2 é dominante e contém dois motivos de dedo de zinco (Cys₂His₂), próximo a cauda C-terminal (Estruch, 2000; Schmitt & Mcentee, 1996; Martínez-Pastor et al., 1996).

Os fatores de transcrição Msn2 e Msn4 ativam os genes que contêm STRE (*stress-responsive element*) (Smith et al., 1998). O Elemento de Resposta ao Estresse (STRE) é uma sequência funcional com 5 pares de bases (pb), capaz de ativar a expressão de genes em resposta a vários estímulos lesivos às células (Nicholls et al., 2004). De acordo com Toone & Jones (1998), vários genes envolvidos na resposta geral ao estresse têm sido descritos por conter os elementos de resposta ao estresse (STREs) em suas regiões promotoras. Genes *TPS1/2*, que codificam enzimas para síntese de trealose, ou o gene *GPD1*, que codifica uma enzima necessária para a síntese de glicerol, são exemplos de genes regulados pela STRE.

É importante destacar que os fatores Msn2 e Msn4 estão diretamente relacionados aos níveis de AMP cíclico (cAMP) e proteína quinase A (PKA), visto que, diante de condições estressantes ou de carência nutricional, os níveis intracelulares de AMP cíclico em *S. cerevisiae* diminuem, provocando consequentemente uma baixa atividade da proteína quinase A (PKA) (Görner et al., 1998). Nesta situação, os fatores de transcrição Msn2 e Msn4 são fosforilados e transportados para o núcleo de acordo com a baixa atividade dessa proteína (PKA) (Martínez-Pastor et al., 1996).

Na membrana plasmática das células de *S. cerevisiae* existem proteínas receptoras que realizam a sinalização da disponibilidade de nutrientes no ambiente extracelular. Tal sinalização celular poderá regular a transcrição de genes e a tradução de proteínas (Gancedo, 2008). Essas proteínas receptoras de membrana, por meio da interação com os carboidratos, originam mudanças em suas conformações estruturais e provocam uma cascata intracelular de sinalização, promovendo a ativação de uma ou mais proteínas no ambiente intracelular (Forsberg & Ljungdahl, 2001).

Um exemplo de proteínas receptoras da membrana plasmática é a proteína denominada Gpr1 (*G-protein-coupled receptor*). Na levedura *S. cerevisiae*, a ativação rápida da via do AMP cíclico por glicose e sacarose requer a presença de Gpr1 (Kraakman et al., 1999; Lorenz et al., 2000), sendo que, a afinidade dessa proteína receptora é maior para a sacarose (Lemaire et al., 2004). A sinalização pela Gpr1 ocorre por meio da interação dessa proteína receptora com o carboidrato, ocasionando deste modo uma mudança estrutural na

conformação das proteínas receptoras de membrana. A partir daí, a proteína Gpr1 ligada à proteína Gpa2 interage com uma enzima denominada adenilato ciclase (codificada pelo gene *CYR1*), formando o AMP cíclico (Lorenz et al., 2000; Colombo et al., 2004; Peeters et al., 2006; Tamaki, 2007). Quando o AMP cíclico está presente no interior da célula, realiza a ativação das proteínas quinases (dependentes de AMP cíclico). Tais proteínas são responsáveis por fosforilar uma série de outras proteínas, ativando-as ou inibindo-as (Sreenath et al., 1988). A proteína quinase A (PKA) é ativada com o aumento do AMP cíclico intracelular e realiza a fosforilação de proteínas que podem reprimir ou induzir a expressão de vários genes (Thevelein & Winder, 1999).

Segundo Reinders et al., (1998) e Tamaki (2007), a ativação da proteína quinase A (PKA) pelo AMP cíclico em leveduras *S. cerevisiae* é necessária para a regulação adequada do crescimento, progressão do ciclo celular e desenvolvimento em resposta a condições nutricionais. Além disso, a alta atividade de PKA também provoca a repressão dos genes *TPS1* e *TPS2* que codificam a enzima trealose sintase (Winderickx et al., 1996; Trevisol et al., 2014).

De acordo com Thevelein (1994) e Rolland et al. (2000), existem dois requisitos essenciais para a ativação do AMP cíclico induzido por glicose/sacarose: o primeiro requisito é a disponibilidade de glicose/sacarose no ambiente extracelular, sendo sinalizada pela proteína receptora Gpr1, e o segundo é a disponibilidade de glicose intracelular, exigindo as enzimas hexoquinases, posto que segundo os autores há uma exigência de fosforilação da glicose (primeira etapa da glicólise), promovendo a ativação do AMP cíclico.

A adição de glicose ou sacarose para as células de leveduras cultivadas em uma fonte de carbono não fermentescível ou na fase estacionária provoca uma explosão transitória dos níveis de AMP cíclico intracelular (Mbonyi et al., 1990; Kraakman et al., 1999). Outros açúcares, tais como frutose, maltose, maltotriose e galactose, não podem desencadear uma forte resposta do AMP cíclico e PKA (Rolland et al., 2000; Rolland et al., 2001). Por conseguinte, durante o crescimento de *S. cerevisiae* em meio rico contendo glicose/sacarose, a expressão dos genes sob o controle dos fatores de transcrição Msn2 e Msn4 é reprimida, sendo a expressão induzida somente na fase de transição para o metabolismo respiratório, em condições onde há limitação de nitrogênio, e também por vários outros tipos de estresses. Os fatores Msn2 e Msn4 podem modular a expressão de mais de 200 genes em resposta a estímulos nocivos, tais como alto teor de etanol, estresse oxidativo, falta de nutrientes, baixo

pH, elevadas temperaturas, pressão osmótica, entre outros (Martinez-Pastor et al., 1996). Segundo Trott & Morano (2003), os genes *MSN2* e *MSN4* podem ser regulados de acordo com o estado nutricional e com a fase de crescimento celular. A fase estacionária e de declínio podem ocasionar a indução desses genes.

Na figura abaixo (Figura 1), verifica-se os alvos das vias de sinalização de nutrientes cAMP e PKA. Os alvos incluem proteínas-chave envolvidas no controle de crescimento celular, metabolismo de glicose, resistência a alguns tipos de estresses (incluindo o metabolismo de trealose), floculação, crescimento filamentososo e síntese de ésteres voláteis (Verstrepen et al., 2004).

Figura 1 - Alvos das vias de sinalização de nutrientes cAMP e PKA (Verstrepen et al., 2004)

2.5 Biossíntese de triptofano e suplementação de aminoácidos na fermentação alcoólica

Estudos têm demonstrado que há relação entre a biossíntese de aminoácidos e a tolerância ao estresse etanólico em leveduras (Takagi et al., 2005; Hirasawa et al., 2007; Li et al., 2010). De acordo com Hirasawa et al. (2007), a sobre-expressão dos genes *TRP1* e *TRP5*, envolvidos na biossíntese de triptofano, proporcionaram um aumento da tolerância ao estresse de etanol (5% v/v) em leveduras *S. cerevisiae* cultivadas em laboratório. A tolerância a altas concentrações de etanol é uma das características mais desejáveis pela indústria, portanto, a seleção de mutantes tolerantes ao etanol poderia ter aplicação direta no processo fermentativo (Yazawa et al., 2007). Por meio de uma análise de *microarray* de DNA, foi relatado que o aumento da expressão de genes relacionados à biossíntese de triptofano confere maior tolerância ao estresse de etanol para as células de levedura, comprovando o fato de que linhagens de laboratório com sobre-expressão de genes da biossíntese de triptofano poderiam apresentar maior tolerância ao etanol (Hirasawa et al. 2007). No trabalho de Yoshikawa et al. (2009), foi verificado o comportamento de crescimento de linhagens de leveduras com deleção única no gene *TRP1* sob estresse de etanol, e constatou-se que as linhagens com deleção nos genes classificados na categoria de “metabolismo de triptofano” foram sensíveis a 8% (v/v) de etanol. Portanto, é possível que os genes de síntese de triptofano possam contribuir para maior tolerância da célula de levedura frente ao estresse etanólico.

A suplementação de aminoácidos também tem sido estudada por ocasionar uma melhoria significativa na tolerância e na formação de biomassa de *S. cerevisiae*, especialmente em condições de estresse, como por exemplo, ocasionada pelos altos níveis de etanol (Thomas & Ingledew, 1990; Thomas & Ingledew, 1992, Chen et al., 1993). Segundo Pham & Wright (2008), a suplementação de aminoácidos na fermentação pode levar a respostas celulares positivas, incluindo a redução da fase Lag e maior viabilidade celular em meios com alta concentração de açúcar. No estudo de Hu et al. (2005), os aminoácidos isoleucina, metionina e fenilalanina aumentaram a tolerância de *S. cerevisiae* em condição de estresse etanólico, sendo que a maior tolerância das células foi decorrente da incorporação dos aminoácidos suplementares na membrana citoplasmática, aumentando a capacidade de diminuição do efeito fluidizante exercido pelo etanol. Alguns autores reportaram que, para a levedura *S. cerevisiae*, a glutamina, a asparagina e o amônio são as fontes nitrogenadas preferenciais. Tais compostos nitrogenados são utilizados primordialmente, suportando taxas

de crescimento maiores do que a partir de outras fontes de nitrogênio, as quais a levedura apresenta uma preferência secundária (Ter-Schure et al., 2000; Dubois & Messenguy, 1997; Wiame et al., 1985; Cooper, 1982). Segundo Basso & Amorim (2001), a levedura *S. cerevisiae* utiliza o nitrogênio preferencialmente na forma amoniacal (NH_4^+) para sintetizar aminoácidos e bases nitrogenadas, necessários ao seu crescimento. Em condições de carência do íon amônio, a levedura realiza outras vias para a metabolização do N amídico ou amínico.

Em leveduras, os aminoácidos podem ser incorporados diretamente na biomassa durante o consumo (Albers et al., 1996), como também podem auxiliar na produção de proteínas e na formação de componentes estruturais. Portanto, os aminoácidos são referidos como “blocos de construção” de proteínas. Além disso, possuem um papel central no metabolismo geral de leveduras. Estudos relacionados à determinação de vias metabólicas da utilização de aminoácidos são considerados de grande complexidade. Isto porque envolvem a descrição das vias de utilização dos aminoácidos como fontes de carbono e nitrogênio, a biossíntese dos mesmos, e também a conversão em outros metabólitos, incluindo nucleotídeos (Ljungdahl & Daignan-Fornier, 2012).

Nas células, os sensores localizados na membrana citoplasmática respondem à disponibilidade de diversos conjuntos de nutrientes, incluindo diferentes fontes de nitrogênio. Tais sensores ambientais operam em conjunto com redes de sistemas de detecção intracelular. Além disso, as vias catabólicas e anabólicas geram múltiplos intermediários metabólicos que contribuem significativamente para a complexidade da composição química das células (Zaman et al., 2008).

A presença de aminoácidos externos induz a expressão de várias permeases de especificidade ampla. Esta resposta de transcrição é mediada pelo sensor Ssy1-Ptr3-Ssy5 (SPS) localizado na membrana plasmática (Ljungdahl, 2009). Uma vez internalizados, os aminoácidos podem ser utilizados em processos biossintéticos, ser desaminados para gerar amônio, ou servir como substratos de transaminases que transferem grupos amino para α -cetoglutarato, para formar o glutamato (Cooper, 1982; Magasanik & Kaiser, 2002). Em leveduras cultivadas em meio de glicose, o amônio pode ser assimilado por duas reações de anabolismo. Na primeira reação ocorre a síntese de glutamato proveniente de amônio e α -cetoglutarato catalisado (pela glutamato desidrogenase dependente de NADPH), e na segunda ocorre a síntese de glutamina a partir de amônio e glutamato (pela glutamina sintetase) (Avendano et al., 1997; De-Luna et al., 2001).

De acordo com Walker (1998), o nitrogênio compõe aproximadamente 10% do peso seco das células de levedura. Para suplementar o nitrogênio, o sulfato de amônio é comumente usado pela indústria. O fermento cresce melhor na presença de aminoácidos porque são os constituintes das proteínas. Se o substrato fornecido é deficiente de aminoácidos, ocorre uma série de problemas na fermentação. Mesmo quando o fermento pode produzir seus próprios aminoácidos, geralmente é melhor para a célula assimilá-los.

Referências

Albers, E.; Larsson, C.; Lidén, G.; Niklasson, C.; Gustafsson, L. Influence of nitrogen source on *Saccharomyces cerevisiae* anaerobic growth and product formation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, p. 3187-3195, 1996.

Alexandre, H.; Ansanay-Galeote, V.; Dequin, S.; Blondin, B. Global gene expression during short-term ethanol stress in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEBS Letters**, v. 498, n. 1, p. 98-103, 2001.

Aldiguier, A.S.; Alfenore, S.; Cameleyre, X.; Goma, G.; Uribe Larrea, J.L.; Guillouet, S.E.; Molina-Jouve, C. Synergistic temperature and ethanol effect on *Saccharomyces cerevisiae* dynamic behaviour in ethanol bio-fuel production. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 26, n. 4, p. 217-222, 2004.

Alfenore, S.; Molina-Jouve, C.; Guillouet, S.; Uribe Larrea, J.L.; Goma, G.; Benbadis, L. Improving ethanol production and viability of *Saccharomyces cerevisiae* by a vitamin feeding strategy during fed-batch process. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 60, n. 1-2, p. 67-72, 2002.

Amorim, H.V.; Basso, L.C.; Alves, D.M.G. **Processos de produção de álcool, controle e monitoramento**. Piracicaba: FERMENTEC/FEALQ/ESALQ-USP, 1996. 103p.

Amorim, H.V.; Oliveira, A.J.; Zago, E.A.; Basso, L.C.; Gallo, C.R. **Processos de fermentação alcoólica, seu controle e monitoramento**. Piracicaba: FERMENTEC/CEBTEC/ESALQ-USP, 1989. 145p.

Andrietta, M.G.S.; Andrietta, S.R.; Steckelberg, C.; Stupielo, E.N.A. Bioethanol - 30 years of proálcool. **International Sugar Journal**, v. 109, n. 1299, p. 195-200, 2007.

Avendano, A.; Deluna, A.; Olivera, H.; Valenzuela, L.; Gonzalez, A. GDH3 encodes a glutamate dehydrogenase isozyme, a previously unrecognized route for glutamate biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Bacteriology**, v. 179, p. 5594-5597, 1997.

Bai, F.W.; Anderson, W.A.; Moo-Young, M. Ethanol fermentation Technologies from sugar and starch feedstocks. **Biotechnology Advances**, v. 26, n. 1, p. 89-105, 2008.

Bakker, B.M.; Overkamp, K.M.; Van-Maris, A.J.A.; Kötter, P.; Luttik, M.A.H.; Van-Dijken, J.P.; Pronk, J.T. Stoichiometry and compartmentation of NADH metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 25, n. 1, p. 15-37, 2001.

Balat, M.; Balat, H. Recent trends in global production and utilization of bio-ethanol fuel. **Applied Energy**, London, v. 86, p. 2273-2282, 2009.

Banat, I.M.; Nigam, P.; Singh, D.; Marchant, R.; Mchale, A.P. Review: Ethanol production at elevated temperatures and alcohol concentrations: Part I - Yeasts in general. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 14, n. 6, p. 809-821, 1998.

Barnett, J. A. The utilization of sugars by yeasts. **Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry**, v. 32, p. 125-234, 1976.

Barnett, J.A. The utilization of disaccharides and some other sugars by yeasts. **Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry**, v. 39, p. 347-404, 1981.

Basso, L.C. Amorim, H.V.; Oliveira, A.J.; Lopes, M.L. Yeast selection for fuel ethanol in Brazil. **FEMS Yeast Research**, Amsterdam, v. 8, n. 7, p. 1155-1163, 2008.

Basso, L.C.; Basso, T.O.; Rocha, S.N. Ethanol production in Brazil: the industrial process and its impact on yeast fermentation. In: SANTOS BERNARDES, M.A. dos (Ed.). **Biofuel Production - Recent Developments and Prospects**. Croatia: INTECH, 2011a. chap. 5, p. 85-100.

Blomberg, A.; Adler, L. Physiology of osmotolerance in fungi. **Advances in Microbial Physiology**, v. 22, p. 145-212, 1992.

Bücker, A. **Engenharia genômica de linhagem industrial de *Saccharomyces cerevisiae* visando melhorar a tolerância ao etanol**. 2014. 111p. Tese (Doutorado em Bioquímica) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2014.

Cardona, C.A.; Sanchez, O.J. Fuel ethanol production: Process design trends and integration opportunities. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 12, p. 2415-2457, 2007.

Castrillo, J.I.; Ugalde, U.O. A general model of yeast energy metabolism in aerobic chemostat culture. **Yeast**, Chichester, v. 10, p. 185-197, 1994.

Ceccato-Antonini, S.R. Biotechnological implications of filamentation in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology Letters**, v. 30, n. 7, p. 1151-1161, 2008.

Cerqueira-Leite, R.C.; Leal, M.R.L.V.; Cortez, L.A.B.; Griffin W.M.; Scandiffio, M.I.G. Can Brazil replace 5% of the 2025 gasoline world demand with ethanol? **Energy**, v. 34, n. 5, p. 655-661, 2009.

Chen, J.C.P.; Chou, C.C. Cane Sugar Handbook - A Manual for Cane Sugar Manufacturers and Their Chemists. In: Chen, J.C.P.; Chou, C.C. (Eds.). **Sugars and nonsugars in sugarcane**. John Wiley & Sons Inc, 1993, cap. 2, p. 21-30.

Chen, Y.; Kirk, N.; Piper, P.W. Effects of medium composition on MF α 1 promoter-directed secretion of a small protease inhibitor in *Saccharomyces cerevisiae* batch fermentation. **Biotechnology Letters**, v. 15, p. 223–228, 1993.

Colombo, S.; Ronchetti, D.; Thevelein, J.M.; Winderickx, J.; Martegani, E. Activation state of the Ras2 protein and glucose-induced signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 45, p. 46715-46722, 2004.

Cooper, T.G. Nitrogen metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. In: Strathern, J.N.; Jones, E.W.; Broach, J.R. (Eds.). **The molecular and cellular biology of the yeast *Saccharomyces***. Cold Spring Harbour Laboratory, 1982, v. 11B, cap. 2, p. 39-99.

Cronwright, G.R.; Rohwer, J.M.; Prior, B.A. Metabolic control analysis of glycerol synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 9, p. 4448-4456, 2002.

DeLuna, A.; Avendano, A.; Riego, L.; Gonzalez, A. NADP-glutamate dehydrogenase isoenzymes of *Saccharomyces cerevisiae*. Purification, kinetic properties, and physiological roles. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, p. 43775-43783, 2001.

Demirbas, M.F.; Balat, M. Recent advances on the production and utilization trends of bio-fuels: A global perspective. **Energy Conversion and Management**, Oxford, v. 47, p. 2371-2381, 2006.

Dequin, S. The potential of genetic engineering for improving brewing, wine-making and baking yeasts. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 56, n. 5-6, p. 577-588, 2001.

Duarte, C.G.; Gaudreau, K.; Gibson, R.B.; Malheiros, T.F. Sustainability assessment of sugarcane-ethanol production in Brazil: A case study of a sugarcane mill in São Paulo state. **Ecological Indicators**, v. 30, p. 119-129, 2013.

Dubois, E.; Messenguy, F. Integration of the multiple controls regulating the expression of the arginase gene CAR1 of *Saccharomyces cerevisiae* in response to different nitrogen signals: role of Gln3p, ArgRp-Mcm1p, and Ume6p. **Molecular Genetics and Genomics**, v. 253, p. 568-580, 1997.

Estruch, F. Stress-controlled transcription factors, stress-induced genes, and stress tolerance in budding yeast. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 24, p. 469–486, 2000.

Estruch, F. Stress-controlled transcription factors, stress-induced genes and stress tolerance in budding yeast. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 24, p. 469-486, 2000.

Van-Voorst, F.; Houghton-Larsen, J.; Jønson, L.; Kielland-Brandt, M.C.; Brandt, A. Genome-wide identification of genes required for growth of *Saccharomyces cerevisiae* under ethanol stress. **Yeast**, v. 23, n.5, p. 351-359, 2006.

Forsberg, H.; Ljungdahl, P.O. Sensors of extracellular nutrients in *Saccharomyces cerevisiae*. **Current Genetics**, v. 40, n. 2, p. 91-109, 2001.

Gallo, M. A fuel surcharge policy for reducing road traffic greenhouse gas emissions. **Transport Policy**, v. 18, n. 2, p. 413-424, 2011.

Gancedo, J.M. The early steps of glucose signalling in yeast. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 32, n. 4, p. 673-704, 2008.

Gasch, A.P.; Spellman, P.T.; Kao, C.M.; Carmel-Harel, O.; Eisen, M.B.; Storz, G.; Botstein, D.; Brown, P.O. Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. **Molecular Biology of the Cell**, v. 11, n. 12, p. 4241-4257, 2000.

Gascón, S.; Lampen, J.O. Purification of the Internal Invertase of Yeast. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 243, n. 7, p. 1567-1572, 1968.

Gerbens-Leenes, P.W.; Van Lienden; Hoekstra, A.Y.; Van Der Meer, T.H. Biofuel scenarios in a water perspective: The global blue and green water footprint of road transport in 2030. **Global Environmental Change**, v. 22, n. 3, p. 764-775, 2012.

Ghose, T.K.; Tyagi, R.D. Rapid ethanol fermentation of cellulose hydrolysate: batch versus continuous systems. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 21, p. 1387-1400, 1979.

Goldemberg, J. Biomassa e energia. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 3, p. 582-587, 2009.

Goldemberg, J. Ethanol for a Sustainable Energy Future. **Science**, v. 315, n. 5813, p. 808-810, 2007.

Goldemberg, J.; Coelho, S.T.; Lucon, O. How adequate policies can push renewables. **Energy Policy**, v. 32, n. 9, p. 1141-1146, 2004.

Golubev, W.I. Antagonistic interactions among yeasts. In: ROSA, C.A.; PETER, G. (Eds.). **The Yeast Handbook: Biodiversity and Ecophysiology of yeasts**. Heidelberg: Springer, 2006, cap. 10, p. 197-219

Gonçalves, R.C.; Siqueira, F.L.T.; Mata, J.F.; Vieira, G.E.G. Desafios e perspectivas da produção de etanol no Brasil – uma revisão. **Revista Liberato**, v. 12, n. 18, p. 107-206, 2011.

Görner, W.; Durchschlag, E.; Martinez-Pastor, M.T.; Estruch, F.; Ammerer, G.; Hamilton, B.; Ruis, H.; Schüller, C. Nuclear localization of the C2H2 zinc finger protein Msn2p is regulated by stress and protein kinase A activity. **Genes & Development**, v. 12, n. 4, p. 586-597, 1998.

Graves, T.; Narendranath, N.; Power, R. Development of a “Stress Model” Fermentation System for Fuel Ethanol Yeast Strains. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 113, n. 3, p. 263-271, 2007.

Gray, K.A.; Zhao, L.; Emptage, M. Bioethanol. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 10, n. 2, p. 141-146, 2006.

Guardabassi, P.; Goldemberg, J. The Prospects of first generation ethanol in developing countries. **Plants and BioEnergy**, v. 4, p 3-11, 2014.

Guo, Z.P.; Zhang, L.; Ding, Z.Y.; Shi, G.Y. Minimization of glycerol synthesis in industrial ethanol yeast without influencing its fermentation performance. **Metabolic Engineering**, v. 13, n. 1, p. 49-59, 2011.

Hirasawa, T; Yoshikawa, K.; Nakakura, Y.; Nagahisa, K.; Furusawa, C.; Katakura, Y.; Shimizu, H.; Shioya, S. Identification of target genes conferring ethanol stress tolerance to *Saccharomyces cerevisiae* based on DNA microarray data analysis. **Journal of Biotechnology**, v. 131, n. 1, p. 34-44, 2007.

Heux, S.; Cachon, R.; Dequin, S. Cofactor engineering in *Saccharomyces cerevisiae*: Expression of a H₂O-forming NADH oxidase and impact on redox metabolism. **Metabolic Engineering**, v. 8, n. 4, p. 303-314, 2006.

Hu, C.K.; Bai, F.W.; An, L.J. Protein amino acid composition of plasma membranes affects membrane fluidity and thereby ethanol tolerance in a self-flocculating fusant of *Schizosaccharomyces pombe* and *Saccharomyces cerevisiae*. **Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao**, v. 21, n. 5, p. 809-813, 2005.

Ingram, L.O. Adaptation of membrane lipids to alcohols. **Journal of Bacteriology**, v. 125, n. 2, p. 670-678, 1976.

Iwahashi, H.; Obuchi, K.; Fujii, S.; Komatsu, Y. The correlative evidence suggesting that trehalose stabilizes membrane structure in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Cellular and Molecular Biology**, v. 41, n. 6, p. 763-769, 1995.

Kraakman, L.; Lemaire, K.; Ma, P.; Teunissen, A.W.; Donaton, M.C.; Van-Dijck, P.; Winderickx, J, De-Winde, J.H.; Thevelein, J.M. A *Saccharomyces cerevisiae* G-protein coupled receptor, Gpr1, is specifically required for glucose activation of the cAMP pathway during the transition to growth on glucose. **Molecular Microbiology**, v. 32, n. 5, p. 1002-1012, 1999.

Kültz, D. Molecular and evolutionary basis of the cellular stress response. **Annual Review of Physiology**, v. 67, p. 225-257, 2005.

Lagunas, R. Energy metabolism of *Saccharomyces cerevisiae* discrepancy between ATP balance and known metabolic functions. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics**, v. 440, n. 3, p. 661-674, 1976.

Lagunas, R. Is *Saccharomyces cerevisiae* a typical facultative anaerobe? **Trends in Biochemical Sciences**, v. 6, p. 201-203, 1981.

Lagunas, R. Sugar transport in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 104, n. 3-4, p. 229-242, 1993.

Lemaire, K.; Van-De-Velde, S.; Van-Dijck, P.; Thevelein, J.M. Glucose and sucrose Act as agonist and mannose as antagonist ligands of the G protein-coupled receptor Gpr1 in the yeast *saccharomyces cerevisiae*. **Molecular Cell**, v. 16, n. 2, p. 293-299, 2004.

Lewis, J. G. Learmonth, R. P.; Watson, K. Induction of heat, freezing and salt tolerance by heat and salt shock in *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiology**, v. 141, p. 687-694, 1995.

Li, B.Z.; Cheng, J.S.; Ding, M.Z.; Yuan, Y.J. Transcriptome analysis of differential responses of diploid and haploid yeast to ethanol stress. **Journal of Biotechnology**, v. 148, n. 4, p. 194-203, 2010.

Ljungdahl, P.O. Amino-acid-induced signalling via the SPS-sensing pathway in yeast. **Biochemical Society Transactions**, v. 37, p. 242-247, 2009.

Ljungdahl, P.O.; Daignan-Fornier, B. Regulation of amino acid, nucleotide, and phosphate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. **Genetics**, v. 190, n. 3, p. 885-929, 2012.

Lorenz, M.C.; Pan, X.; Harashima, T.; Cardenas, M.E.; Xue, Y.; Hirsch, J.P.; Heitman, J. The G protein-coupled receptor gpr1 is a nutrient sensor that regulates pseudohyphal differentiation in *Saccharomyces cerevisiae*. **Genetics**, v. 154, n. 2, p. 609-622, 2000.

Macedo, I.C. Situação atual e perspectivas do etanol. **Estudos Avançados**, v. 21, n. 59, p. 157-165, 2007.

Madigan, M.T.; Martinko, J.M.; Stahl, D.; Clark, D.P. Eukaryotic cell biology and eukaryotic microorganisms. In: Madigan, M.T.; Martinko, J.M.; Stahl, D.; Clark, D.P. (Eds.). **Brock Biology of Microorganisms**. Benjamin Cummings, 2000, cap. 20, p. 584-612.

Magasanik, B.; Kaiser, C.A. Nitrogen regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. **Gene**, v. 290, n. 1-2, p. 1-18, 2002.

Mager, W.H.; Siderius, M. Novel insights into the osmotic stress response of yeast. **FEMS Yeast Research**, v. 2, n. 3, p. 251-257, 2002.

Mager, W.; De-Kruijff, A.J.J. Stress-induced transcriptional activation. **Microbiological Reviews**, v. 59, n. 3, p. 506-531, 1995.

Mayerhoff, Z. D. V. L. Patentes em bioetanol evidenciam desenvolvimento brasileiro. **Inovação Uniemp**, Campinas, v. 2, n. 2, p. 22-23, 2006.

Martínez-Pastor, M.T.; Marchler, G.; Schüller, C.; Marchler-Bauer, A.; Ruis, H.; Estruch, F. The *Saccharomyces cerevisiae* zinc finger proteins Msn2p and Msn4p are required for transcriptional induction through the stress response element (STRE). **The EMBO Journal**, v. 15, n. 9, p. 2227-2235, 1996.

Martínez-Pastor, M.T.; Marchler, G.; Schüller, C.; Marchler-Bauer, A.; Ruis, H.; Estruch, F. The *Saccharomyces cerevisiae* zinc finger proteins Msn2p and Msn4p are required for transcriptional induction through the stress response element (STRE). **The EMBO Journal**, v. 15, n. 9, p. 2227-2235, 1996.

Mbonyi, K.; Van-Aelst, L.; Argüelles, J.C.; Jans, A.W.; Thevelein, J.M. Glucose-induced hyperaccumulation of cyclic AMP and defective glucose repression in yeast strains with reduced activity of cyclic AMP-dependent protein kinase. **Molecular and Cellular Biology**, v. 10, n. 9, p. 4518-4523, 1990.

Mckendry, P. Energy production from biomass (part 2): conversion technologies. **Bioresource Technology**, v. 83, n. 1, p. 47-54, 2002.

Nicholls, S.; Straffon, M; Enjalbert, B.; Nantel, A.; Macaskill, S.; Whiteway, M.; Brown, A.J.P. Msn2- and Msn4-like transcription factors play no obvious roles in the stress responses of the fungal pathogen *Candida albicans*. **Eukaryot Cell**, v. 3, n. 5, p. 1111-1123, 2004.

Nigam, P.S.; Singh, A. Production of liquid biofuels from renewable resources. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 37, n. 1, p. 52-68, 2011.

Okolo, B.; Johnston, J.R.; Berry, D.R. Toxicity of ethanol, n-butanol and iso-amyl alcohol in *Saccharomyces cerevisiae* when supplied separately and in mixtures. **Biotechnology Letters**, v. 9, n. 6, p. 431-434, 1987.

Ostergaard, S.; Olsson, L.; Nielsen, J. Metabolic Engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 64, n. 1, p. 34-50, 2000.

Puligundla, P.; Smogrovicova, D.; Obulam, V.S.; Ko, S. Very high gravity (VHG) ethanolic brewing and fermentation: a research update. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 38, n. 9, p. 1133-1144, 2011.

Parrou, J.L.; Teste, M.A.; François, J. Effects of various types of stress on the metabolism of reserve carbohydrates in *Saccharomyces cerevisiae*: genetic evidence for a stress-induced recycling of glycogen and trehalose. **Microbiology**, v. 143, n. 6, p. 1891-1900, 1997.

Park, J.I.; Grant, C.M.; Attfield, P.V.; Dawes, I.W. The freeze-thaw stress response of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* is growth phase specific and is controlled by nutritional state via the RAS-cyclic AMP signal transduction pathway. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, p. 3818-3824, 1997.

Paschoalini, G.; Alcarde, V.E. Estudo do processo fermentativo de usina sucroalcooleira e proposta para sua otimização. **Revista de Ciência & Tecnologia**, v. 16, n. 32, p. 59-68, 2009.

Peeters, T.; Louwet, W.; Geladé, R.; Nauwelaers, D.; Thevelein, J.M.; Versele, M. Kelch-repeat proteins interacting with the Galpha protein Gpa2 bypass adenylate cyclase for

direct regulation of protein kinase A in yeast. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 103, n. 35, p. 13034-13039, 2006.

Penido-Filho, P. O álcool combustível. In: NOBEL (Ed.). **O álcool combustível: obtenção e aplicação nos motores**. São Paulo: Livraria Nobel S.A., 1980, cap. 3, p. 43-48.

Phillips, T. Transcription factors and transcriptional control in eukaryotic cells. **Nature Education**, v. 1, n. 1, p. 119, 2008.

Piper, P.W. Molecular events associated with acquisition of heat tolerance by the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 11, n. 4, p. 339-356, 1993.

Pronk, J.T.; Yde-Steensma, H.; Van-Dijken, J.P. Pyruvate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. **YEAST**, v. 12, p. 1607-1633, 1996.

Querol, A.; Fernández-Espinar, M.T.; Olmo, M.L.D.; Barrio, E. Adaptive evolution of wine yeast. **International Journal of Food Microbiology**, v. 86, n. 1-2, p. 3-10, 2003.

Reed, G.; Nagodawithana, T.W. Yeast-derived products. In: Reed, G.; Nagodawithana, T.W. (Eds.). **Yeast Technology**. New York: Van Nostrand Reinhold, 1990, cap. 8, p. 369-412.

Reinders, A.; Bürckert, N.; Boller, T.; Wiemken, A.; De-Virgilio, C. *Saccharomyces cerevisiae* cAMP-dependent protein kinase controls entry into stationary phase through the Rim15p protein kinase. **Genes & Development**, v. 12, n. 18, p. 2943-2955, 1998.

RFA, Renewable Fuels Association. **World Fuel Ethanol Production**. Disponível em: <<http://www.ethanolrfa.org/resources/industry/statistics>> Acesso em: 28 Set. 2017.

Rocha-Leão, M.H.M.; Panek, A.D.; Costa-Carvalho, V.L.A. Glycogen accumulation during growth of *Saccharomyces cerevisiae*: catabolite repression effects. **IRCS Medical Science-Biochemistry**, v. 12, n. 5, p. 411-412, 1984.

Rolland, F.; De-Winde, J.H.; Lemaire, K.; Boles, E.; Thevelein, J.M.; Winderickx, J. Glucose-induced cAMP signalling in yeast requires both a G-protein coupled receptor system for extracellular glucose detection and a separable hexose kinase-dependent sensing process. **Molecular Microbiology**, v. 38, n. 2, p. 348-358, 2000.

Rolland, F.; Wanke, V.; Cauwenberg, L.; Ma, P.; Boles, E.; Vanoni, M.; De-Winde, J.H.; Thevelein, J.M.; Winderickx, J. The role of hexose transport and phosphorylation in cAMP signalling in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Yeast Research**, v. 1, n. 1, p. 33-45, 2001.

Rosa, S.E.S.; Garcia, J.L.F. O etanol de segunda geração: limites e oportunidades. **Revista do BNDES**, v. 32, p. 117-156, 2009.

Sadeh, A.; Movshovich, N.; Volokh, M.; Gheber, L.; Aharoni, A. Fine-tuning of the Msn2/4-mediated yeast stress responses as revealed by systematic deletion of Msn2/4 partners. **Molecular Biology of the Cell**, v. 22, n. 7, p. 3127-3138, 2011.

Schmitt, A.P.; Mcentee, K. Msn2p, a zinc finger DNA-binding protein, is the transcriptional activator of the multistress response in *Saccharomyces cerevisiae*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 93, p. 5777-5782, 1996.

Searchinger, T.; Heimlich, R.; Houghton, R.A.; Dong, F.; Elobeid, A.; Fabiosa, J.; Tokgoz, S.; Hayes, D.; Yu, T. Use of U.S. croplands for biofuels increases greenhouse gases through emissions from land-use change. **Science**, v. 319, n. 5867, p. 1238-1240, 2008.

Singer, M.; Lindquist, S. Thermotolerance in *Saccharomyces cerevisiae*: the Yin and Yang of trehalose. **Trends in Biotechnology**, v. 16, n. 11, p. 460-468, 1998.

Smith, A.; Ward, M.P.; Garrett, S. Yeast PKA represses Msn2p/Msn4p-dependent gene expression to regulate growth, stress response and glycogen accumulation. **The EMBO Journal**, v. 17, n. 13, p. 3556-3564, 1998.

Sreenath, T.L.V.; Diego, B.; Nadera, A.; Ravi, D. Two different protein kinase activities phosphorylate RAS2 protein in *saccharomyces cerevisiae*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 157, n. 3, p. 1182-1189, 1988.

Steckelberg, C. **Caracterização de leveduras de processos de fermentação alcoólica utilizando atributos de composição celular e características cinéticas**. 2001. 202p. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2001.

Takagi, H.; Takaoka, M.; Kawaguchi, A.; Kubo, Y. Effect of L-proline on sake brewing and ethanol stress in *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, p. 8656-8662, 2005.

Tamaki, H. Glucose-stimulated cAMP-protein kinase a pathway in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 104, n. 4, p. 245-250, 2007.

Teixeira, J.A.; Fonseca, M.M.; Vicente, A.A. Geometrias e Modos de Operação. In: Fonseca, M.M. (Ed.). **Reactores Biológicos: Fundamentos e Aplicações**. Lisboa: LIDEL, 2007, cap. 2, p. 27-68.

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

Thevelein, J.M.; Winde, J.H. Novel sensing mechanisms and targets for the cAMP-protein kinase A pathway in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular Microbiology**, v. 33, n. 5, p. 904-918, 1999.

Thomas, K.C.; Hynes, S.H.; Ingledew, W.M. Practical and theoretical considerations in the production of high concentration of alcohol by fermentation. **Process Biochemistry**, London, v. 31, n. 4, p. 321-331, 1996.

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

Thomas, K.C.; Ingledew, W.M. Relationship of low lysine and high arginine concentrations to efficient ethanolic fermentation of wheat mashes. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 38, p. 626-634, 1992.

Toone, W.M.; Jones, N. Stress-activated signalling pathways in yeast. **Genes to Cells**, v. 3, p. 485-498, 1998.

Trevelyan, W.E.; Harrison, J.S. Studies on yeast metabolism. 5. The trehalose content of baker's yeast during anaerobic fermentation. **The Biochemical Journal**, London, v. 62, n. 2, p. 177-183, 1956.

Trevisol, E.T.V.; Panek, A.D.; De-Mesquita, J.F.; Eleutherio, E.C.A. Regulation of the yeast trehalose-synthase complex by cyclic AMP-dependent phosphorylation. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 1840, n. 6, p. 1646-1650, 2014.

Trott, A.; Morano, K.A. The yeast response to heat shock. In: HOHMANN, S.; MAGER, W.H. (Eds.). **Yeast Stress Responses**. Heidelberg: Springer, 2003, cap. 3, p. 71-119.

Van-Dijken, J.P.; Scheffers, W.A. Redox balances in the metabolism of sugars by yeasts. **FEMS Microbiology Letters**, v. 32, n. 3-4, 1986.

Verstrepen, K.J.; Iserentant, D.; Malcorps, P.; Derdelinckx, G.; Van-Dijck, P. Winderickx, J.; Pretorius, I.S.; Thevelein, J.M.; Delvaux, F.R. Glucose and sucrose: hazardous fast-food for industrial yeast? **Trends in Biotechnology**, v. 22, n. 10, p. 531-537, 2004.

Waclawovsky, A.J.; Sato, P.M.; Lembke, C.G.; Moore, P.H.; Souza, G.M. Sugarcane for bioenergy production: an assessment of yield and regulation of sucrose content. **Plant Biotechnology Journal**, v. 8, n. 3, p. 263-276, 2010.

Walker, G.M. Yeast metabolism. In: WALKER, G.M. (Ed.). **Yeast Physiology and Biotechnology**. West Sussex: John Wiley & Sons Ltd, 1998, cap. 5, p. 203-255.

Walker, G.M. Yeast Nutrition. In: Walker, G.M. (Ed.). **Yeast Physiology and Biotechnology**. John Wiley & Sons, 1998, cap. 3, p. 51-101.

Walter, A.; Rosillo-Calle, F.; Dolzan, P.; Piacente, E.; Cunha, K.B. Perspectives on fuel ethanol consumption and trade. **Biomass and Bioenergy**, v. 32, n. 8, p. 730-748, 2008.

Wang, L.; Zhao, X.Q.; Xue, C.; Bai, F.W. Impact of osmotic stress and ethanol inhibition in yeast cells on process oscillation associated with continuous very-high-gravity ethanol fermentation. **Biotechnology for Biofuels**, v. 6, n. 133, p. 1-10, 2013.

Wheals, A.E.; Basso, L.C.; Alves, D.M.G.; Amorim, H.V. Fuel ethanol after 25 years. **Trends in Biotechnology**, v. 17, n. 12, p. 482-487, 1999.

Wiame, J.M.; Grenson, M.; Arst, H.N. Nitrogen catabolite repression in yeasts and filamentous fungi. **Advances in Microbial Physiology**, v. 26, p. 1-88, 1985.

Winderickx, J.; De-Winde, J.H.; Crauwels, M.; Hino, A.; Hohmann, S.; Van-Dijck, P.; Thevelein, J.M. Regulation of genes encoding subunits of the trehalose synthase complex in *Saccharomyces cerevisiae*: novel variations of STRE-mediated transcription control? **Molecular Genetics and Genomics**, v. 252, n. 4, p. 470-482, 1996.

Wuebbles, D.J.; Jain, A.K. Concerns about climate change and the role of fossil fuel use. **Fuel Processing Technology**, v. 71, n. 1-3, p. 99-119, 2001.

Yazawa, H.; Iwahashi, H.; Uemura, H. Disruption of URA7 and GAL6 improves the ethanol tolerance and fermentation capacity of *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, v. 24, p. 551-560, 2007.

Yoshikawa, K.; Tanaka, T.; Furusawa, C.; Nagahisa, K.; Hirasawa, T.; Shimizu, H. Comprehensive phenotypic analysis for identification of genes affecting growth under ethanol stress in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Yeast Research**, v. 9, n. 1, p. 32-44, 2009.

Zago, E.A.; Silva, F.L.F.; Bernardino, C.D.; Amorim, H.V. **Métodos analíticos para o controle da produção de etanol**. Piracicaba: FERMENTEC/FEALQ/ESALQ-USP, 1996. 194p.

Zakrajšek, T.; Raspor, P.; Jamnik, P. *Saccharomyces cerevisiae* in the stationary phase as a model organism - characterization at cellular and proteome level. **Journal of Proteomics**, v. 74, n. 12, p. 2837-2845, 2011.

Zaman, S.; Lippman, S.I.; Zhao, X.; Broach, J.R. How *Saccharomyces* responds to nutrients. **Annual Review of Genetics**, v. 42, p. 27-81, 2008.

Zhao, X.Q.; Bai, F.W. Mechanisms of yeast stress tolerance and its manipulation for efficient fuel ethanol production. **Journal of Biotechnology**, v. 144, n. 1, p. 23-30, 2009.

3 Potencialidade de *Saccharomyces cerevisiae* com sobre-expressão do gene *MSN2* ou *TRP1* para fermentações com alto teor alcoólico simulando as condições industriais de destilarias brasileiras

Resumo

Durante a produção industrial de etanol, dentre os fatores limitantes no processo destacam-se os diferentes tipos de estresses impostos simultaneamente às leveduras. Principalmente o estresse causado pelas altas concentrações de açúcares presentes no mosto, e, após o processo fermentativo, pelos altos níveis de etanol produzidos pela levedura. A modificação da região promotora do gene *TRP1*, envolvido na síntese de triptofano, e do gene *MSN2*, que codifica um fator de transcrição (Msn2) que regula a resposta geral ao estresse em *S. cerevisiae*, têm sido apontadas como alternativas atraentes para o incremento da tolerância de linhagens frente ao alto teor alcoólico e demais estresses enfrentados no processo brasileiro. Neste contexto, o presente trabalho teve por objetivo avaliar o potencial de linhagens *S. cerevisiae* isogênicas à linhagem industrial CAT-1 com sobre-expressão dos genes *MSN2* ou *TRP1* para fermentações com alto teor alcoólico e reciclo celular, simulando as condições industriais de destilarias brasileiras. Testes de crescimento em microescala foram conduzidos variando as concentrações de açúcares e de etanol fornecidos. Os experimentos fermentativos com reciclo de células foram conduzidos variando as concentrações de açúcares e a temperatura de fermentação. A sobre-expressão do gene *TRP1* de síntese de triptofano favoreceu a linhagem NAB-1 para maior crescimento em meio YEPD com 8% de etanol (v/v), em relação a todas as outras linhagens testadas. Contudo, NAB-1 apresentou menor viabilidade nos testes de crescimento em meio YEPD com 16 e 18% de etanol (v/v), e em mostos de melaço com 27 e 33% de ART. NAB-1 também apresentou menor acúmulo de carboidratos de reserva (trealose e glicogênio) nas fermentações com reciclo. Os resultados obtidos revelaram que o nível de sobre-expressão do gene *MSN2*, ou sua forma truncada, contribui para comportamentos fisiológicos distintos entre as linhagens ANT-5 e ATT-6, uma vez que ANT-5 se demonstrou mais sensível, isto é, menos viável do que a linhagem CAT-1 e ATT-6 nos tratamentos com 16 e 18% de etanol (v/v). ANT-5 apresentou um comportamento similar ao da linhagem parental na maior parte dos parâmetros analisados nas fermentações com reciclos de células. A linhagem ATT-6, com o gene *MSN2* sobre-expresso na versão truncada apresentou maior viabilidade celular, em relação a parental CAT-1 e as outras linhagens, nos testes de crescimento em microescala em mostos contendo 27 e 33% de ART. A linhagem ATT-6 também apresentou maior produção de etanol, velocidade de fermentação e consumo de açúcares nas fermentações com reciclo de células onde se empregou aumentos drásticos na concentração de açúcares do mosto. Dentre as linhagens avaliadas, ATT-6 apresentou potencial biotecnológico para suportar múltiplos estresses encontrados em fermentações com alto teor alcoólico, em condições típicas de destilarias brasileiras.

Palavras-chave: Fermentação alcoólica; Estresse alcoólico; Estresse osmótico; *Saccharomyces cerevisiae*; Sobre-expressão de genes *TRP1* / *MSN2*; Resposta geral ao estresse

Abstract

Among the limiting factors of the industrial ethanol production, the different types of stress imposed simultaneously to the yeasts are the most important. The main stresses are caused by the high sugar concentration in the must and by the high ethanol levels produced by the yeasts after the fermentative process. The modification of the promoter region of *TRP1* gene, which is involved in tryptophan biosynthesis, and of *MSN2* gene, which codes for a transcription factor (Msn2) that regulates the general response to stress in *S. cerevisiae*, have been proposed as attractive alternatives for increase the tolerance of strains to the high ethanol content and other stresses faced in the Brazilian process. In this context, the aim of the present work was to assess the potential of *S. cerevisiae* strains isogenic to the industrial strain CAT-1, with overexpression of the *MSN2* or *TRP1* genes for fermentations with high ethanol content and cell recycle, simulating the industrial conditions of Brazilian distilleries. Growth tests in microscale were performed varying the concentrations of sugars and ethanol. The fermentative experiments with cell recycle were performed varying the concentrations of sugars and the temperature. The overexpression of *TRP1* gene (NAB-1 strain) caused higher growth in YEPD medium (8% ethanol) compared to all other strains tested. However, strain NAB-1 showed a lower viability in the growth tests using YEPD medium (16 and 18% ethanol), and in molasses musts (27 and 33% of total reducing sugars). This strain also showed a lower accumulation of storage carbohydrates (trehalose and glycogen) in the fermentations with cell recycle. The results showed that the level of overexpression of the *MSN2* gene contributes to a distinct physiological behavior between the strains, since ANT-5 (non-truncated version of *MSN2* overexpression) was more sensitive, *i.e.* less viable, than strains CAT-1 and ATT-6 in the experiments using 16 and 18% ethanol (v/v). Strain ANT-5 also showed a similar behavior compared to the wild type for most analyzed parameters in the fermentations with cell recycle. On the other hand, strain ATT-6 (truncated version of *MSN2* gene overexpressed) showed a higher cell viability compared to wild type CAT-1 and the other strains, in the microscale growth tests in musts containing 27 and 33% of total reducing sugars. Strain ATT-6 also showed higher ethanol production, fermentation velocity and sugar utilization in the fermentations with cell recycles where it was used drastic increases of sugar concentrations in the must. Among the assessed strains, ATT-6 showed biotechnological potential to resist the multiple stresses of fermentations with high alcohol content, typical of Brazilian distilleries.

Keywords: Alcoholic fermentation; Alcohol stress; Osmotic stress; *Saccharomyces cerevisiae*; Overexpression of *TRP1* / *MSN2* genes; General stress response

3.1 Introdução

Nos últimos anos, a importância atribuída aos biocombustíveis se expandiu mundialmente, principalmente em virtude do aquecimento global e o futuro esgotamento do petróleo (Demirbas, 2017). Além disso, a prospecção e utilização dos derivados de petróleo, como o óleo diesel e a gasolina, envolvem altos custos e preocupações climáticas (Marchal et al., 2006). As atuais condições de mercado tornam a produção de etanol uma atividade promissora. A disponibilidade de combustíveis fósseis não terá condições para atender a crescente demanda de energia em nosso planeta. Sendo assim, a produção de etanol passará por uma expansão gradativa (Debnath et al., 2017).

O etanol é produzido a partir de diferentes matérias-primas, classificadas em três categorias: açúcares simples, amido e lignocelulose (Balat & Balat, 2009). A cana-de-açúcar é uma cultura que pode ser utilizada em países tropicais para a produção de etanol, tanto na forma de suco quanto na forma de melaço para preparação de mostos. Esta matéria-prima é composta principalmente de sacarose, fibras e água, geralmente em proporções de aproximadamente 12, 15 e 70%, respectivamente (Chen & Chou, 1993). A conversão de melaço, ou suco de cana, em etanol é mais fácil em comparação com os compostos amiláceos e a biomassa lignocelulósica, já que uma hidrólise prévia da matéria-prima, antes da fermentação, é desnecessária, porque a sacarose pode ser metabolizada diretamente pelas leveduras (Waclawovsky et al., 2010).

No Brasil, o processo mais antigo e mais utilizado nas destilarias é a Fermentação em Bateladas, onde basicamente uma suspensão de fermento é preparada no fundo da dorna, e em seguida as dornas recebem o melaço de cana-de-açúcar (mosto) por cima. Ao final do fornecimento do mosto, as leveduras constituem cerca de 10% da totalidade do conteúdo da dorna, realizando a fermentação com uma alta densidade de células (Godoy et al., 2008). Nos anos 30, adotou-se o procedimento Melle-Boinot, adicionando ao processo: o tratamento de fermento com água e ácido, a centrifugação e a reinserção das leveduras para uma fermentação sequencial (> 90% das células são reutilizadas no próximo ciclo fermentativo) (Boinot, 1939; Wheals et al., 1999; Basso et al., 2008).

Embora a Fermentação em Bateladas tenha contribuído para maiores rendimentos, devido ao reaproveitamento de células, neste procedimento as leveduras enfrentam uma série de fatores estressantes. Tais fatores impõem restrições às células, afetando seu crescimento e metabolismo (Basso et al., 2008). Entre os fatores de estresse, podemos listar: alta

concentração de açúcares, presença de sais no mosto, altas temperaturas, alta concentração de etanol, baixo pH extracelular, contaminação bacteriana, deficiência de nutrientes e a presença de agentes inibidores (Basso et al., 2011). Além disso, o reciclo celular pode causar a diminuição da viabilidade celular durante vários ciclos consecutivos. Por outro lado, esse processo tem um aspecto positivo: durante a reciclagem celular, as pressões seletivas impostas pelos fatores de estresse selecionam linhagens multi-tolerantes capazes de resistir a este processo na fermentação industrial (Basso et al., 2008).

O processo brasileiro, conjuntamente com a Fermentação com Alto Teor Alcoólico (*Very High Gravity Fermentation/VHG Fermentation*), pode contribuir para ainda maiores rendimentos de etanol. A Fermentação com Alto Teor Alcoólico é caracterizada pela obtenção de altos teores de álcool, a partir da utilização de mostos com mais de 25% (p/v) de ART. A *VHG fermentation* pode proporcionar a redução do uso de água no processo e por consequência diminuir a produção de vinhaça (Thomas et al., 1996). O uso desta tecnologia, além de poupar água em aproximadamente 40%, também reduz o uso de energia, porque menos fluido é enviado nas etapas de aquecimento, resfriamento e destilação (Puligundla et al., 2011). No entanto, o uso dessa tecnologia aliada ao processo brasileiro, pode causar efeitos deletérios adicionais em leveduras. Portanto, é de fundamental importância obter linhagens robustas e multi-tolerantes, para que possam sobreviver ao estresse etanólico, a custo de um prévio estresse osmótico, suportando todos os estresses acima listados por vários ciclos consecutivos.

Uma maneira promissora de obter leveduras multi-tolerantes seria selecionar linhagens industriais já adaptadas ao processo brasileiro e realizar modificações genéticas visando aumentar ainda mais a sua tolerância. Em *S. cerevisiae*, os fatores de transcrição Hsf1 e Msn2/Msn4 ativam genes que contêm elementos responsivos ao estresse (STRE) (Smith et al., 1998). A sequência funcional STRE contém 5 pb e é capaz de ativar a expressão de genes em resposta a vários estímulos prejudiciais às células (Nicholls et al., 2004), incluindo estresse oxidativo, baixa disponibilidade de nutrientes, baixo pH, exposição ao etanol e estresse osmótico (Kobayashi & Mcentee, 1991, 1993; Marchler et al., 1993; Schüller et al., 1994). Outros estudos demonstraram que existem correlações entre a biossíntese de aminoácidos e o estresse do etanol em leveduras (Takagi et al., 2005; Hirasawa et al., 2007; Li et al., 2010). A sobre-expressão dos genes *TRP1* e *TRP5*, que estão envolvidos na biossíntese de triptofano, pode resultar em maior tolerância ao estresse etanólico (Hirasawa et al., 2007). Portanto, a modificação genética da região promotora dos genes de biossíntese de

triptofano, ou do gene *MSN2*, que codifica um fator de transcrição (Msn2) que regula a resposta geral ao estresse em *S. cerevisiae*, poderia contribuir com o aumento da tolerância de linhagens frente aos diferentes tipos de estresse enfrentados na indústria e também na *VHG fermentation*.

Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial de linhagens de *S. cerevisiae* geneticamente modificadas para fermentações com alto teor alcoólico e reciclo de células. Para isso, linhagens com sobre-expressão dos genes *MSN2* e *TRP1* foram comparadas fisiologicamente com a linhagem parental CAT-1 em condições que simulam as condições de destilarias brasileiras.

3.2 Material e Métodos

3.2.1 Material biológico

As linhagens utilizadas no presente estudo foram concedidas pelo Prof. Dr. Boris U. Stambuk da Universidade Federal de Santa Catarina. Tais linhagens foram modificadas usando técnicas de engenharia genômica para inserir o promotor forte e constitutivo P_{ADH1} na região promotora do gene alvo (Tabela 1) (Bücker, 2014). O procedimento foi realizado utilizando técnicas de PCR e integração do módulo de sobre-expressão no genoma por recombinação homóloga. Estas técnicas permitiram modificar a expressão do gene inserindo uma sequência de nucleotídeos que codificam para uma região promotora constitutiva, o que permite a sobre-expressão do gene de interesse. Foram realizadas: a modificação da região promotora do gene *TRP1* envolvido na síntese de triptofano (linhagem NAB-1), a modificação do gene *MSN2*, que codifica um fator de transcrição (Msn2) que regula a resposta geral ao estresse em *S. cerevisiae* (ANT-5) e uma versão truncada do gene *MSN2-T*, sem os primeiros 48 aminoácidos (ATT-6).

As análises de expressão de genes foram realizadas por qRT-PCR. O RNA das linhagens recombinantes e da parental foi extraído e submetido à transcrição reversa (Bücker, 2014). As quantificações revelaram que o gene *TRP1*, sobre-expresso na linhagem NAB-1, é 20 vezes mais expresso em relação à linhagem parental CAT-1. O gene *MSN2* sobre-expresso (ANT-5) e sua versão truncada (ATT-6) são 7 e 8 vezes mais expressos do que na linhagem parental, respectivamente.

Tabela 1 - Genótipos das linhagens modificadas e da linhagem parental CAT-1

Linhagem	Genótipo	Referência
CAT-1	Industrial diploide	Basso et al. (2008)
NAB-1	Isogênica à CAT-1 mas, <i>loxP-KanMX-loxP-PADH1::TRP1</i>	Bücker (2014)
ANT-5	Isogênica à CAT-1 mas, <i>loxP-KanMX-loxP-PADH1::MSN2</i>	Bücker (2014)
ATT-6	Isogênica à CAT-1 mas, <i>loxP-KanMX-loxP-PADH1::MSN2-T</i>	Bücker (2014)

3.2.2 Testes de crescimento em microescala em diferentes concentrações de ART ou de etanol

Testes de crescimento foram realizados em triplicata em um espectrofotômetro TECAN (Densidade óptica/D.O. 600nm), por incubação de microplacas de 96 poços em condições microaeróbicas com leituras em intervalos de 2 horas a 30°C, durante o período de 72 horas. Agitações prévias de 5 minutos antes de cada leitura foram realizadas. Para a montagem da microplaca, foi adicionado em cada poço: 10 µL de inóculo pré-crescido durante 48 horas em meio YEPD (2% D-glicose, 1% de extrato de levedura e 1% de peptona bacteriológica) e 90 µL de mosto de melaço de cana com diferentes concentrações de ART (33, 30, 27, 25, 23 e 19%, p/v) ou de meio YEPD com diferentes níveis de etanol (18, 16, 14, 12 e 8%, v/v). Após 72 horas de crescimento, uma alíquota de 50 µL foi retirada de cada poço para análises de viabilidade, utilizando-se o microscópio óptico.

3.2.3 Preparação de substrato a partir de melaço de cana-de-açúcar

Os substratos/mostos oriundos do melaço de cana-de-açúcar foram preparados a partir de diluição do melaço com água, para obter a porcentagem (% p/v) de ART desejável. O substrato diluído foi centrifugado a 10.000 rpm, sob 20°C, durante 20 minutos, e colocado em frascos erlenmeyer, que foram esterilizados a 121°C por 25 minutos.

3.2.4 Propagação de biomassa de levedura para ensaios fermentativos

Para a propagação, 200 µL de cada cultura previamente armazenada em ultra-freezer (em solução com 20% de glicerol) foram transferidos para tubos contendo 5 mL de meio YEPD sob incubação a 28°C durante 48 horas. Após o crescimento, todo o conteúdo de cada tubo foi transferido para frascos erlenmeyer contendo 100 mL de mosto de melaço com 10% de ART e pH 4,5, incubados a 30°C, 150 rpm, durante 24 horas. Posteriormente, o conteúdo

total de cada erlenmeyer foi transferido para frascos erlenmeyer contendo 1 L do mesmo mosto acima mencionado. Os frascos foram incubados a 30°C, 100 rpm, durante 48 horas.

No primeiro ciclo fermentativo, a biomassa úmida de cada linhagem propagada foi coletada em tubos de fundo cônico (tubos *Falcon* com capacidade de 50 mL) por meio de centrifugação a 4000 rpm. As biomassas foram ajustadas para iniciar a primeira fermentação com o mesmo teor de fermento.

3.2.5 Ensaio fermentativos

Os ensaios fermentativos foram realizados em triplicata simulando as condições industriais de destilarias brasileiras com reciclo de células. Para o inóculo do primeiro ciclo fermentativo/ primeira fermentação, coletou-se por centrifugação 3,0-3,5 g de biomassa de cada linhagem. Em seguida, preparou-se o "pé-de-cuba", onde a biomassa de cada linhagem foi ressuspensa em 2 mL do conteúdo fermentado da etapa de propagação (vinho de levedurado) e diluída em 6 mL de água destilada. Posteriormente, adicionou-se 28 mL de substrato de melaço (mosto), divididos em 3 porções iguais, espaçadas por 2 horas. As fermentações foram conduzidas a 30 ou 32°C. Tal procedimento buscou uma simulação do que ocorre no processo industrial, ou seja: um pé-de-cuba com cerca de 33% de fermento suspenso em uma mistura de água e vinho, sendo que o pé-de-cuba representa cerca de 25-30% do volume final da fermentação. O mosto foi repartido em 3 porções para se evitar a alimentação em batelada pura, ou seja, numa única adição.

Ao final do primeiro ciclo fermentativo, a biomassa de levedura foi separada do substrato fermentado por centrifugação (4000 rpm) e pesada. A seguir, preparou-se um novo "pé-de-cuba", onde foram adicionados 2 mL do vinho de levedurado da fermentação anterior (simulando um "creme de levedura" com uma concentração de ~ 70% de um centrífuga industrial). O "creme de levedura" foi diluído com 6 mL de água destilada, acidificado com ácido sulfúrico até pH = 2.5-2.6, e mantido durante 1 hora nesta condição para simular o tratamento ácido da levedura, realizado na planta industrial. A partir daí, a "alimentação" com 28 mL de mosto foi dividida em três porções iguais, conforme as condições acima descritas. Todo o procedimento foi repetido sucessivamente, isto é, em 15 reciclos no primeiro experimento fermentativo e 7 reciclos no segundo. A concentração de ART (% p/v) do mosto foi aumentada gradualmente ao longo dos reciclos em ambos os experimentos fermentativos.

Em todos os ciclos, mediu-se o teor de etanol do vinho delevedurado. Também foi analisada a concentração de glicerol e açúcares residuais no primeiro e últimos ciclos. Além disso, foram estimados o conteúdo de biomassa úmida, viabilidade celular e contaminação bacteriana em todos os ciclos.

3.2.6 Quantificação de açúcares residuais, glicerol e etanol

A concentração de açúcares residuais (sacarose, glicose e frutose) e glicerol nos vinhos foram determinadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE, em inglês: High Performance Liquid Chromatography, HPLC), utilizando um cromatógrafo de troca iônica Dionex DX-300 (Sunnyvale, CA, EUA) equipado com uma coluna CarboPac PA-1 (4 x 250 mm) e detector de amperometria de pulso. A fase móvel utilizada foi NaOH (100 mM) a um fluxo de $0,9 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ (Basso et al., 2008).

Para a determinação do teor alcoólico dos vinhos delevedurados, foram transferidos 10 ou 25 mL do vinho para o interior de um microdestilador Kjeldahl (Piracicaba, Brasil). A partir da destilação por arraste de vapor, foi recolhido o material condensado em um balão volumétrico de 50 mL, até completar o volume. As amostras destiladas foram transferidas para um densímetro digital Anton-Paar DMA-48 (Graz, Áustria) para a estimativa do teor de etanol (% v/v). O valor gerado pelo densímetro foi multiplicado por 5 ou por 2, quando foi destilado 10 ou 25 mL de vinho, respectivamente, de modo a compensar a diluição ocorrida durante a etapa de destilação.

3.2.7 Estimativa da velocidade de fermentação e determinação de biomassa

Os tubos foram pesados em intervalos de duas horas durante cada ciclo. A velocidade de fermentação refere-se à liberação de CO_2 (g) ao longo das horas.

Antes de iniciar as fermentações, os tubos de fundo cônico vazios foram pesados. Ao final de cada ciclo, após a separação dos vinhos dos seus respectivos fermentos, a biomassa úmida precipitada foi pesada (g). A partir da obtenção dos valores das pesagens, por diferença de peso do tubo com e sem fermento, foi determinado o teor de biomassa úmida ao final de cada ciclo fermentativo.

3.2.8 Viabilidade celular de levedura e controle de contaminação bacteriana

A viabilidade celular foi estimada por microscopia óptica, em objetiva de 40x, por coloração celular diferencial utilizando-se uma solução de eritrosina em tampão de fosfato. As

células viáveis não coradas, e as células não viáveis coradas de rosa, foram contadas em uma câmara de *Neubauer*. A viabilidade foi expressa em porcentagem, em função da proporção de células viáveis sobre o total de células contadas (viáveis e não viáveis). A estimativa do número de bactérias (em forma de bastão) viáveis foi realizada por microscopia óptica, utilizando objetiva de 100x e uma lâmina de vidro. Uma alíquota de 100 µL da amostra foi previamente colocada em contato com 100 µL de uma solução de azul de metileno (0,2%) e sulfato de nilo (2%). Neste método, os bastonetes não viáveis coram-se de azul, enquanto os vivos permanecem incolores. Somente as bactérias vivas são contadas e a contaminação bacteriana é expressa em células.mL⁻¹ (Oliveira et al., 1996).

3.2.9 Extração e quantificação de carboidratos de reserva

Os teores de trealose na levedura foram estimados mediante extração diferencial com ácido tricloroacético seguida de dosagem cromatográfica conforme descrita anteriormente (item 3.2.6) (Christofoleti-Furlan, 2012).

Para a extração de trealose, 200 mg de biomassa úmida foi lavada com água destilada gelada e precipitada por centrifugação (3500 rpm, durante 6 minutos) em tubo de fundo cônico. A extração foi realizada a partir da adição de 2 mL de ácido tricloroacético 0,5 M em banho de gelo durante 20 minutos e agitações casuais. Em seguida, centrifugou-se novamente (3500 rpm, durante 6 minutos) e o extrato sobrenadante foi recolhido e armazenado a -20°C até a análise de quantificação em HPLC (Trevelyan & Harrison, 1956).

Para a extração do glicogênio, uma suspensão de 200 mg de biomassa úmida foi colocada em tubos de ensaio com tampa de rosca. O conteúdo dos tubos foi ressuspendido em 5 mL da água destilada gelada e os tubos foram centrifugados a 3500 rpm, durante 6 minutos. O sobrenadante foi descartado e adicionou-se 2 mL de carbonato de sódio 0,25 M. Os tubos foram armazenados a -20°C até a análise de quantificação. A quantificação do glicogênio foi realizada por hidrólise enzimática com amiloglicosidase e dosagem colorimétrica da glicose liberada após reação com glicose-oxidase e peroxidase. A quantificação foi determinada em espectrofotômetro (500 nm) (Becker, 1978).

3.2.10 Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas por meio de análises de variância (ANOVA) e testes de comparação de médias de Tukey, no software R. As médias referentes às triplicatas de cada linhagem foram consideradas diferentes ao nível de 5% de significância ($p < 0,05$).

3.3 Resultados e Discussão

O presente trabalho foi dividido em quatro etapas. Na primeira e segunda etapa, foram realizados testes em microescala em condições microaeróbicas para avaliar o crescimento e viabilidade das linhagens em mostos/meios contendo diferentes concentrações de açúcar (item 3.3.1) e de etanol (item 3.3.2), respectivamente. Na terceira etapa, realizou-se um experimento fermentativo, onde o conteúdo de biomassa de cada linhagem foi submetido a 15 fermentações consecutivas, nas quais a concentração de açúcar do mosto de melaço de cana-de-açúcar foi aumentada gradualmente em cada reciclo de células (item 3.3.3). Na quarta e última etapa, sete fermentações consecutivas foram realizadas, com aumentos mais drásticos nas concentrações de açúcar nos reciclos de células (item 3.3.4).

3.3.1 Crescimento e viabilidade em diferentes concentrações de ART em mosto de melaço de cana-de-açúcar

Na primeira etapa do presente trabalho, os testes de crescimento em condições microaeróbicas foram realizados em mostos contendo 33, 30, 27, 25, 23 e 19% de ART. Não foram observadas diferenças significativas nas curvas de crescimento obtidas pelas quatro linhagens nas diferentes concentrações. Todas as linhagens se comportaram igualmente, de acordo com o aumento da concentração de açúcar do mosto (Figura 1). Nas concentrações de 33, 30, 27 e 25% de ART, a fase estacionária foi atingida após 54, 48, 42 e 36 horas, respectivamente (Figura 1A, B, C e D). Conforme esperado, e também relatado no estudo de Munna et al. (2015), quanto maior a concentração de açúcar fornecido, mais tempo as linhagens levaram para alcançar a fase estacionária. Isto possivelmente ocorreu devido a maior quantidade de açúcar disponível no mosto e também devido a maior exposição das células ao estresse osmótico, permitindo um crescimento menor e mais lento. Acima de 27% de ART, observou-se claramente que o comportamento de crescimento mudou, aumentando o período da fase logarítmica e diminuindo consideravelmente o crescimento final (D.O.)

(Figura 1A, B, C). Em concentrações de 23 e 19% de ART, as linhagens atingiram a fase estacionária logo após o período de 36 e 30 horas, respectivamente (Figura 1E, F).

Figura 1. Curvas de crescimento medidas para as linhagens CAT-1, NAB-1, ANT-5 e ATT-6 em diferentes concentrações de ART. A) 33%; B) 30%; C) 27%; D) 25%; E) 23%; F) 19% de ART em mosto de melão de cana-de-açúcar

As médias referentes à D.O. final (72 horas) das quatro linhagens foram: 0,887; 0,838; 0,784; 0,736; 0,650; e 0,570 para as concentrações de 19, 23, 25, 27, 30 e 33% de ART, respectivamente (Figura 2A).

A viabilidade final (72 horas) foi analisada a partir da retirada de uma alíquota dos poços da microplaca referente aos tratamentos com 23, 27 e 33% de ART (Figura 2B). As linhagens não demonstraram diferenças na viabilidade em 23% de ART. Já nas concentrações de 27 e 33% de ART, a linhagem ATT-6 diferiu significativamente das outras, apresentando os maiores valores de viabilidade: 86,13 e 77,75%, respectivamente. A linhagem parental CAT-1 demonstrou valores de viabilidade de 77,24 e 69,78%, e não diferiu de ANT-5, que apresentou 79,21 e 68,49% nestas mesmas concentrações de ART (27 e 33%). A linhagem NAB-1 apresentou a menor viabilidade: 27,06 e 22,26%, nas concentrações de 27 e 33% de ART, respectivamente, diferindo das outras linhagens testadas (Figura 2B).

Figura 2. Dados de D.O. final (A), viabilidade (B) e análises estatísticas das linhagens CAT-1, NAB-1, ANT-5 e ATT-6 às 72 horas em mosto de melão de cana-de-açúcar com diferentes concentrações de ART (%). Para cada tratamento letras iguais não diferem ao nível de 5% de significância ($p < 0,05$), de acordo com o teste de Tukey

As modificações genéticas não afetaram o crescimento das linhagens, nas diferentes concentrações de açúcar (% de ART), pois as curvas de crescimento e os valores de D.O. final foram similares entre as linhagens (Figura 1 e 2A). Os ensaios de viabilidade celular se

mostraram importantes para complementar o resultado obtido a partir dos valores de D.O., onde não foi possível observar diferenças entre as linhagens.

Os resultados de viabilidade celular indicaram que ATT-6 (com fator de transcrição Msn2 sobre-expresso na versão truncada) apresentou valores significativamente maiores do que as demais linhagens, tanto em mosto com 27% de ART (86,13% de viabilidade), quanto em 33% de ART (77,75% de viabilidade) (Figura 2B).

A exposição das células em meios contendo a partir de 20% de ART desencadeia o mecanismo de resposta ao estresse em *S. cerevisiae* (Gomar-Alba et al., 2012). Sendo assim, em nossos experimentos, a sobre-expressão da versão truncada do gene *MSN2* apresentou aumento da tolerância das células frente ao estresse osmótico, acometido pelas altas concentrações de açúcar presentes no mosto (Figura 2B). Segundo Gasch et al. (2000), os fatores de transcrição Msn2 e Msn4 induzem a transcrição de genes cujos promotores contêm o elemento de resposta ao estresse (STRE) durante uma variedade de condições de estresse, incluindo o estresse osmótico. A via HOG1, a qual é ativada em resposta ao aumento da osmolaridade externa, e a via AMPc-PKA, envolvida na detecção do estado nutricional da célula, foram descritas como capazes de desempenhar funções reguladoras no controle de *MSN2/4* (Marchler et al., 1993; Schüller et al., 1994). De acordo com Alepuz et al. (2001), os fatores de transcrição Msn2 e/ou Msn4 recrutam Hog1 para o promotor do gene *CTT1* (síntese de catalase citosólica), sugerindo uma interação funcional entre a via HOG1, Msn2 e Msn4. O oposto foi observado para a linhagem NAB-1, que se comportou com menor viabilidade nesses mesmos tratamentos (27 e 33% de ART) em relação à parental, inferindo que a sobre-expressão do gene *TRP1*, envolvido na síntese de triptofano, não conferiu tolerância às células quando submetidas a um estresse osmótico. A linhagem ANT-5 mostrou uma viabilidade semelhante à parental, demonstrando que possivelmente o nível de sobre-expressão do gene *MSN2* não foi suficiente para resultar em diferenças significativas nos tratamentos com mostos de melão de cana-de-açúcar com concentrações de 27 e 33% de ART.

3.3.2 Crescimento e viabilidade em meio YEPD com diferentes concentrações de etanol

Na segunda etapa, testes foram realizados para avaliar o crescimento das linhagens em meio YEPD contendo 18, 16, 14, 12, 8 e 0% de etanol (v/v). Nesta etapa verificaram-se comportamentos diferentes de crescimento entre as linhagens (Figura 3). Na maior

concentração - 18% de etanol (v/v) - a linhagem parental CAT-1 obteve maior crescimento e alcançou a fase estacionária após 36 horas (Figura 2A). Com 16% de etanol (v/v), as linhagens CAT-1 e ATT-6 atingiram a fase estacionária após 36 e 30 horas (Figura 3B), respectivamente. O mesmo padrão foi observado em 14% (v/v), onde as linhagens CAT-1 e ATT-6 apresentaram um perfil de crescimento similar e atingiram a fase estacionária após 18 horas, ao contrário de NAB-1 e ANT-5, que atingiram a fase estacionária depois de 24 horas (Figura 3C). Sob uma concentração de etanol de 12% (v/v), as linhagens não diferiram significativamente e a fase estacionária ocorreu após o período de 18 horas (Figura 3D). Na concentração de 8% (v/v) de etanol, as linhagens atingiram a fase estacionária após 12 horas, e NAB-1 teve um crescimento significativamente maior em comparação com os demais (Figura 3E). Em meio YEPD sem etanol, utilizado como controle, NAB-1 e ATT-5 apresentaram perfil de crescimento similar, com maior crescimento em relação às outras linhagens (Figura 3F). Por outro lado, CAT-1 e ATT-6 mostraram um perfil de crescimento similar, apresentando menor crescimento no meio controle (Figura 3F). Sem a adição de etanol no meio, todas as cepas atingiram a fase estacionária rapidamente, após 6 horas de crescimento (Figura 3F).

Figura 3. Curvas de crescimento medidas para as linhagens CAT-1, NAB-1, ANT-5 e ATT-6 em diferentes concentrações de etanol (% v/v). A) 18%; B) 16%; C) 14%; D) 12%; E) 8%; F) 0% de etanol (v/v) em meio YEPD

Os resultados de D.O. final, verificados após 72 horas, revelaram que as linhagens CAT-1 e ATT-6 apresentaram crescimento similar em todos os tratamentos com etanol (Figura 4A). No meio controle, sem a adição de etanol, NAB-1 e ANT-5 (0,463 e 0,472)

apresentaram valores de D.O. similares, e maiores do que CAT-1 e ATT-6 (0,408 e 0,391). Com 8% de etanol (v/v), a linhagem NAB-1 apresentou crescimento maior (0,524) em relação às outras linhagens testadas, no período de 72 horas. Nas concentrações 12 e 14% de etanol (v/v), as linhagens CAT-1 (0,352 e 0,278), NAB-1 (0,382 e 0,318) e ATT-6 (0,337 e 0,282) não foram significativamente diferentes entre si, e tiveram um crescimento significativamente maior do que ANT-5 (0,256 e 0,194). Nos meios com maiores teores, com 16 e 18% de etanol (v/v), somente as linhagens CAT-1 (0,197 e 0,137) e ATT-6 (0,119 e 0,040) apresentaram crescimento (Figura 4A).

Em relação à viabilidade final, as linhagens não diferiram em meio YEPD sem adição de etanol, e apresentaram aproximadamente 95% de viabilidade (Figura 4B). A linhagem NAB-1, apesar de ter obtido um maior crescimento no tratamento com 8% de etanol (v/v), apresentou menor viabilidade (90,85%). Nos tratamentos com 8 e 12% de etanol (v/v), CAT-1, ANT-5 e ATT-6 não foram diferentes, com aproximadamente 95% de viabilidade. Com 16% de etanol (v/v), a linhagem CAT-1 apresentou uma viabilidade de 92,39% e não foi significativamente diferente de ATT-6 (88,62%), sendo que ambas mostraram valores de viabilidade significativamente maiores em relação às outras. Na mesma concentração de etanol (16%), NAB-1 apresentou uma viabilidade significativamente menor em relação a linhagem ANT-5 (22,21 e 49,40%, respectivamente). No tratamento com maior concentração de etanol (18% v/v), CAT-1 (84,62% viabilidade) e ATT-6 (67,32% viabilidade) obtiveram os maiores valores de viabilidade, sendo que CAT-1 apresentou o maior valor. Neste tratamento mais concentrado (18%, v/v), NAB-1 (20,47% de viabilidade) e ANT-5 (30,69% de viabilidade) não diferiram entre si (Figura 4B).

Nossos dados corroboram os resultados demonstrados por Sasano et al. (2012), que indicam que a sobre-expressão do gene *MSN2* poderia aumentar a sensibilidade das células em altas concentrações de etanol, visto que no presente trabalho as linhagens ANT-5 e ATT-6 apresentaram menor viabilidade em relação a parental (CAT-1) no tratamento com maior concentração de etanol, 18% (v/v). Por outro lado, com 16% de etanol (v/v), dentre as duas linhagens com o gene *MSN2* sobre-expresso, somente ANT-5 (com nível de sobre-expressão menor do que ATT-6) apresentou menor viabilidade em relação a parental. Isto pode indicar que o nível de sobre-expressão poderia estar relacionado com a maior tolerância das células, uma vez que a linhagem ATT-6, com fator de transcrição Msn2 sobre-expresso na forma truncada, apresentou viabilidade igual a parental neste teor de etanol. Para uma resposta mais acurada, um estudo sobre o nível de sobre-expressão do gene *MSN2* é necessário, testando

diferentes promotores de expressão gênica. Bem como testar a expressão do gene *MSN2* em sua forma truncada com o seu promotor natural. Tal estudo poderia responder se o aumento do nível de sobre-expressão poderia propiciar uma mudança na tolerância das células frente a teores de etanol elevados.

Figura 4. Dados de D.O. final (A), viabilidade (B) e análises estatísticas das linhagens CAT-1, NAB-1, ANT-5 e ATT-6 às 72 horas em meio YEPD com diferentes concentrações de etanol (% v/v). Para cada tratamento letras iguais não diferem ao nível de 5% de significância ($p < 0,05$), de acordo com o teste de Tukey

Em síntese, os tratamentos com diferentes concentrações de etanol afetaram o crescimento das linhagens de forma bastante diferente (Figura 3 e 4A). A linhagem NAB-1 mostrou um crescimento significativamente maior (às 72 horas) em relação às outras três linhagens, em mosto contendo 8% de etanol (v/v) (Figura 4A). No entanto, NAB-1 não apresentou crescimento quando as concentrações de etanol foram maiores, 16 e 18% (v/v). A linhagem ATT-6 não diferiu da linhagem parental CAT-1 quanto ao crescimento nos diferentes tratamentos com etanol. As análises de viabilidade revelaram que a linhagem ATT-6 e CAT-1 apresentaram os maiores valores (Figura 4B). A linhagem ATT-6 apenas diferiu da parental no tratamento com 18% (v/v) de etanol, porque apresentou uma viabilidade significativamente menor. Portanto, quanto ao crescimento e viabilidade nos tratamentos com etanol, a linhagem ATT-6 foi similar à parental CAT-1, onde a única diferença foi observada na viabilidade com 18% (v/v) de etanol (84,63 e 67,33% de viabilidade para CAT-1 e ATT-6, respectivamente) (Figura 4A, B). No que diz respeito às quatro linhagens testadas, os valores

menores de viabilidade foram observados nos tratamentos com 16 e 18% (v/v), onde o NAB-1 apresentou os valores menores, seguido de ANT-5. Levando em consideração que as linhagens NAB-1 e ANT-5 não obtiveram crescimento nos tratamentos com 16 e 18% de etanol (v/v), justifica-se a menor viabilidade obtida por elas, uma vez que o mesmo conteúdo de células inoculado suportou as altas concentrações de etanol durante o período de 72 horas, diferente de CAT-1 e ATT-6, que resistiram a esses tratamentos e mostraram crescimento. Os dados indicam que a sobre-expressão da forma truncada do gene *MSN2* (ATT-6) não apresentou maior tolerância ao etanol nos testes em microescala. Contudo, também não demonstrou afetar o crescimento e viabilidade celular, como foi observado na linhagem ANT-5 (sobre-expressando a forma normal do gene *MSN2*), a qual teve crescimento e viabilidade prejudicados em relação à linhagem parental (CAT-1). Sendo assim, sugere-se um papel importante não apenas na capacidade de sobre-expressão do gene *MSN2*, mas também da forma expressa do fator de transcrição Msn2p.

3.3.3 Primeiro experimento fermentativo com 15 reciclos de células

Na terceira etapa do trabalho, foram realizados 15 ciclos fermentativos. Neste, as concentrações de ART (% p/v) dos mostos foram gradualmente aumentadas. A concentração de ART do mosto utilizado no primeiro ciclo foi consideravelmente baixa (14,60%), no intuito de ambientar as linhagens e iniciar a fermentação com um bom desempenho, principalmente com alta viabilidade (Tabela 2). A concentração de ART do mosto foi aumentada aos poucos para uma maior adaptação das linhagens em cada reciclagem, evitando um choque osmótico e favorecendo-as quando submetidas a concentrações de açúcares maiores e mais estressantes. Além disso, para diferenciar o desempenho fermentativo entre as linhagens, foi necessário realizar um aumento lento e gradual das concentrações de açúcares. Os dados de tempo e velocidade de fermentação são apresentados pela figura suplementar 1.

3.3.3.1 Produção de etanol, acúmulo de biomassa e viabilidade celular

Os primeiros 10 ciclos foram conduzidos utilizando o melaço da Usina São Manoel (Açucareira São Manoel S/A, São Manoel - SP) para a preparação dos mostos. Nos últimos 5 ciclos empregou-se o melaço da Usina Furlan (Usina Açucareira Furlan S/A, Santa Bárbara D'Oeste – SP). De acordo com os resultados apresentados na Tabela 2, ao longo dos ciclos, o etanol foi produzido conforme esperado, à medida que o conteúdo de ART foi aumentado. Após a mudança do mosto, no décimo primeiro ciclo, constatou-se diminuição na produção de

etanol, possivelmente relacionada à menor concentração de açúcar fornecida neste ciclo. O objetivo de mudar o melaço foi induzir condições que causassem disparidade entre as linhagens, uma vez que nos ciclos anteriores até o décimo primeiro, diferenças apenas foram observadas nos ciclos 5 e 10. Além disso, o melaço proveniente da Usina Furlan é mais impuro em relação ao melaço da Usina São Manoel.

No ciclo 5, a concentração de ART fornecido foi de 25%, e a linhagem NAB-1 foi significativamente diferente da linhagem parental CAT-1, com menor produção de etanol (Tabela 2). No ciclo 10 (31,57% de ART), a linhagem NAB-1 diferiu de todas as linhagens com menor produção de etanol. No ciclo 14, com uma concentração de 30% de ART, a linhagem ANT-5 demonstrou uma produção de etanol significativamente maior (13,33% v/v) do que a parental CAT-1 (13,15%). Por outro lado, no último ciclo, com uma concentração de açúcar de 33,33%, a produção de etanol da linhagem parental CAT-1 foi significativamente maior (15,13% v/v) em relação à ANT-5 (14,68% v/v) e ATT-6 (14,65% v/v), mas não diferiu de NAB-1 (14,80% v/v) (Tabela 2).

Tabela 2 - Concentração de ART fornecido, etanol produzido e temperatura de fermentação nos 15 ciclos

Ciclo	ART (%) do mosto	Etanol (% v/v) media final ¹				Temperatura
		CAT-1	NAB-1	ANT-5	ATT-6	
1	14	7,03 ^a	7,00 ^a	7,00 ^a	7,00 ^a	30°C
2	18	8,92 ^a	8,82 ^a	8,88 ^a	8,87 ^a	30°C
3	20	9,95 ^a	9,92 ^a	9,98 ^a	10,05 ^a	30°C
4	22	10,95 ^a	10,93 ^a	11,12 ^a	10,98 ^a	30°C
5	25	12,17 ^a	12,02 ^b	12,05 ^{ab}	12,03 ^{ab}	30°C
6	27	13,32 ^a	13,32 ^a	13,35 ^a	13,23 ^a	30°C
7	29	13,75 ^a	13,67 ^a	13,70 ^a	13,68 ^a	30°C
8	31	15,07 ^a	14,97 ^a	15,17 ^a	15,13 ^a	30°C
9	31	15,03 ^a	14,87 ^a	15,03 ^a	15,05 ^a	32°C
10	31	14,17 ^a	12,57 ^b	14,35 ^a	14,90 ^a	32°C
11	20	10,85 ^a	10,57 ^a	10,57 ^a	10,77 ^a	32°C
12	20	9,40 ^a	9,47 ^a	9,45 ^a	9,47 ^a	32°C
13	25	11,07 ^a	11,04 ^a	11,23 ^a	11,23 ^a	32°C
14	30	13,15 ^b	13,33 ^{ab}	13,58 ^a	13,50 ^{ab}	32°C
15	33	15,13 ^a	14,80 ^{ab}	14,68 ^b	14,65 ^b	32°C

¹ Letras iguais dentro do mesmo ciclo não diferem ao nível de 5% de significância ($p < 0,05$)

As leveduras foram ajustadas para iniciar a primeira fermentação com o mesmo conteúdo celular (3,5 g). Até o quarto ciclo, ATT-6 apresentou valores de biomassa

significativamente mais baixos (Figura 5). Nos ciclos seguintes, ATT-6 não foi diferente em comparação com as demais linhagens. No entanto, no ciclo 14 esta mudou seu comportamento e diferiu de todas as outras, demonstrando uma produção de biomassa significativamente maior (5,77 g) (Figura 5). No ciclo 15, a linhagem ATT-6 não apresentou diferenças em relação à parental CAT-1, mas ambas apresentaram acúmulos significativamente maiores de biomassa em relação às outras duas linhagens avaliadas. Os valores do conteúdo de biomassa, calculados pela subtração do valor total da biomassa obtida no ciclo 15 pelo valor do conteúdo do primeiro ciclo (3,5 g), não foram similares entre as linhagens: CAT-1 (1,44 g), NAB-1 (0,99 g), ANT-5 (1,02 g) e ATT-6 (2,12 g). Ou seja, ao final de todas as fermentações, ATT-6 apresentou maior acúmulo de células, seguido pela parental CAT-1.

Figura 5. Produção de biomassa úmida (g) e análises estatísticas das linhagens CAT-1, NAB-1, ANT-5 e ATT-6 em 15 ciclos de fermentativos. Letras iguais dentro do mesmo ciclo não diferem ao nível de 5% de significância, de acordo com o teste de Tukey

Não houve detecção de contaminação bacteriana nas fermentações, uma vez que foi realizado o tratamento ácido do fermento a partir do segundo ciclo. Durante os ciclos, os mostos utilizados tiveram uma pequena variação de pH (5,3-5,5). Para todas as linhagens avaliadas, a viabilidade celular permaneceu estável com aproximadamente 100% até o oitavo ciclo. Mesmo após este ciclo, observou-se que a viabilidade diminuiu minimamente (Figura 6). Esperava-se maior diminuição na viabilidade celular, considerando que as concentrações

de ART utilizadas nos ciclos foram altas, especialmente nos ciclos 7, 8, 9, 10, 14 e 15 (Tabela 2). Além disso, o efeito estressante causado pelos níveis de etanol produzidos pelas linhagens, ainda intensificado quando a temperatura foi aumentada de 30 para 32°C (Tabela 2), poderia surtir maior redução na viabilidade celular. No entanto, essas condições não foram suficientes para causar uma diminuição considerável na viabilidade, já que, mesmo após o último ciclo, as linhagens permaneceram viáveis, apresentando cerca de 80-90% de células viáveis. Uma explicação para este comportamento poderia ser dada no sentido de que o aumento da concentração de açúcar (ART) de um ciclo para o outro foi sutil, permitindo maior adaptação das linhagens, favorecendo-as na situação de estresse encontrada a cada ciclo subsequente. Alguns estudos relatam que, em leveduras a capacidade de lidar com um choque mais grave, de um tipo diferente de estresse, pode ser significativamente aumentada quando houver a exposição das células em uma forma leve de estresse (Lewis et al., 1995; Park et al., 1997). No último ciclo analisado, a linhagem NAB-1, com gene *TRP1* de síntese de triptofano sobre-expresso, e a linhagem parental CAT-1, apresentaram viabilidade igual e foram mais viáveis do que as outras linhagens testadas (Figura 6). Contudo, estes dados não permitiram afirmar se as linhagens aqui testadas poderiam ser candidatas ao processo, uma vez que na maioria dos ciclos analisados, as mesmas apresentaram um padrão de comportamento similar. Por conseguinte, nesta etapa do trabalho, não encontramos diferenças substanciais entre as linhagens nos principais parâmetros da fermentação analisados: etanol, biomassa e viabilidade. Por este motivo, hipotetizamos que não houve diferenças entre as linhagens modificadas e a parental devido à forma com que o experimento foi conduzido.

Figura 6. Viabilidade celular (%) e análises estatísticas das linhagens CAT-1, NAB-1, ANT-5 e ATT-6 nos 15 ciclos fermentativos. Letras iguais dentro do mesmo ciclo não diferem ao nível de 5% de significância, de acordo com o teste de Tukey

3.3.4 Segundo experimento fermentativo com 7 ciclos de células

No último passo deste trabalho, foram realizadas sete fermentações utilizando o melaço da Usina São Manoel (Açucareira São Manoel S/A, São Manoel - SP). Neste caso, ao contrário da etapa anterior, a concentração de açúcar (ART) foi drasticamente aumentada de um ciclo para o outro (Tabela 3). O objetivo foi impor condições estressantes mais radicais, causando em teoria um efeito deletério maior nas linhagens e, conseqüentemente, aumentar a possibilidade de detectar diferenças fisiológicas nos parâmetros de fermentação analisados. Não houve detecção de contaminação bacteriana durante as fermentações e os mostos utilizados tiveram uma variação de pH de 5,1-5,4 durante os ciclos.

Tabela 3 - Concentração de ART fornecido e temperatura de fermentação nos 7 ciclos

Ciclo	ART (%) do mosto	Temperatura
1	18	30°C
2	22	30°C
3	28	30°C
4	33	30°C
5	33	32°C
6	35	32°C
7	35	32°C

Nesta etapa do trabalho, as linhagens foram novamente ajustadas para uma biomassa similar (3 g), com o objetivo de iniciar o primeiro ciclo com condições semelhantes. Neste experimento, as linhagens CAT-1, NAB-1, ANT-5 e ATT-6 demonstraram pouco crescimento, terminando todos os ciclos com 3,39; 3,05; 3,12; e 3,17 g de biomassa úmida, respectivamente. O menor crescimento celular obtido pelas linhagens talvez seja explicado pelo número de ciclos, que foi menor do que o experimento anterior (terceira etapa).

3.3.4.1 Produção de etanol, velocidade de fermentação e viabilidade celular

Em relação à produção de etanol (% v/v), diferenças já foram observadas desde o primeiro ciclo, no qual a biomassa contida no meio de propagação com 10% de ART foi inoculada no primeiro ciclo fermentativo com mosto de fermentação a uma concentração de

18% ART. A partir desta mudança radical na concentração de açúcar desde a primeira fermentação, a linhagem ATT-6 foi a maior produtora de etanol (% v/v) nos ciclos 1 (8,83), 2 (11,13), 3 (13,97), 4 (15,87) e 5 (15,08) ($p < 0,05$) (Figura 7). No ciclo 5, mesmo após a temperatura ter sido alterada para 32°C (Tabela 3) para causar uma condição ainda mais estressante, ATT-6 apresentou maior produção de etanol. Nos ciclos 6 e 7, ATT-6 produziu 13,00 e 12,42% de etanol (v/v) e não diferiu das linhagens CAT-1 (13,57 e 12,00%) e ANT-5 (13,07 e 11,97%). A linhagem ANT-5 mostrou um comportamento semelhante ao da parental CAT-1 em relação à produção de etanol em todos os 7 ciclos. Por outro lado, NAB-1 mostrou valores significativamente menores de produção de etanol em comparação a todas as outras linhagens, até o sétimo ciclo (Figura 7).

Foi possível correlacionar os dados de produção de etanol com resultados de liberação de CO₂, pois do ciclo 1 ao 5 a linhagem ATT-6 apresentou maior produção de etanol (Figura 7) e também maior desprendimento de CO₂ (Figura 8). Com isso, ATT-6 também apresentou maior velocidade de fermentação nos ciclos 1, 2, 4 e 5, isto é, na maioria dos ciclos realizados (Figura 8).

Figura 7. Produção de etanol (% v/v) e análises estatísticas das linhagens CAT-1, NAB-1, ANT-5 e ATT-6 nos sete ciclos fermentativos. Letras iguais dentro do mesmo ciclo não diferem ao nível de 5% de significância, de acordo com o teste de Tukey

Figura 8. Velocidade de fermentação das linhagens CAT-1, NAB-1, ANT-5 e ATT-6, calculada pelo CO₂ liberado (g) ao longo das horas, nos sete ciclos fermentativos

A mudança comportamental no desprendimento de CO₂, observada na linhagem ATT-6 a partir do ciclo 6, pode ser explicada ao observar os dados de viabilidade (Figura 9). A linhagem ATT-6 demonstrou uma diminuição considerável na viabilidade ao final ciclo 5 (de 93,56% no quarto ciclo para 72,89% no quinto), possivelmente devido às altas concentrações de etanol produzidas por esta linhagem nos ciclos anteriores (Figura 7). Além disso, o estresse causado pelo etanol pode ter sido intensificado pelo aumento da temperatura no ciclo 5, de 30°C para 32°C (Tabela 3). Quanto maior a temperatura, maior será a concentração máxima de álcool intracelular e, conseqüentemente, mais profundo será o efeito inibitório do etanol (Navarro & Durand, 1978). Portanto, ATT-6 iniciou a fermentação no ciclo 6 com menor viabilidade, o que pode ter contribuído para a diminuição da velocidade da fermentação, verificada neste ciclo (Figura 8).

Até o ciclo 3, todas as linhagens permaneceram viáveis com cerca de 98-99%. Nos ciclos 4 e 5, para a linhagem ATT-6, os dados de viabilidade se correlacionam com a produção de etanol (% v/v), uma vez que ATT-6 (93,56% e 72,89%) apresentou valores de viabilidade significativamente menores em comparação com a linhagem parental CAT-1 (99,08% e 84,60%), sendo que, nos mesmos ciclos (4 e 5), ATT-6 apresentou os maiores valores de etanol produzidos (Figura 7 e 9). Vale ressaltar que nos últimos dois ciclos, onde a concentração de açúcares (% de ART) foi aumentada para 35%, a linhagem ATT-6 manteve uma viabilidade estável, diferente da linhagem parental CAT-1, que apresentou uma queda considerável na viabilidade no ciclo 7 (de 76,11% no ciclo 6 para 65,33 no ciclo 7) (Figura 9). A circunstância em que a linhagem ATT-6 manteve a viabilidade estável na maior concentração de ART fornecida neste experimento (35%) pode reforçar a hipótese de que o gene *MSN2* na versão truncada pode ter favorecido a linhagem ATT-6 em situação de estresse osmótico.

Não foram verificadas diferenças significativas na viabilidade entre as linhagens no sétimo ciclo. A linhagem parental CAT-1 destacou-se em relação à viabilidade celular no ciclo 6, onde obteve viabilidade significativamente maior (76,11%) em comparação com as outras 3 linhagens analisadas. Contudo, os resultados de viabilidade não sugerem que a linhagem CAT-1 seja mais tolerante ao etanol do que ATT-6, porque a linhagem parental produziu menores teores de etanol em relação à ATT-6 na maior parte dos ciclos (ciclos 1, 2, 3, 4, 5 e 7). Deste modo, provavelmente o conteúdo celular de CAT-1 pode ter sido menos afetado do que a linhagem ATT-6. Portanto, a partir dos resultados obtidos neste experimento,

não podemos concluir que a linhagem CAT-1 é mais tolerante ao etanol do que a linhagem ATT-6, pois as concentrações produzidas pelas linhagens não foram equivalentes.

Por outro lado, em comparação com a linhagem NAB-1, a linhagem parental se destacou com maior viabilidade neste mesmo ciclo (ciclo 6). Isto sugere que a linhagem NAB-1, com o gene de síntese de triptofano sobre-expresso, seja menos tolerante ao efeito do etanol em relação à linhagem parental CAT-1, uma vez que embora tenha produzido menor teor de etanol no ciclo 6 (Figura 7), apresentou menor viabilidade (65,06%) (Figura 9). O mesmo é verificado para a linhagem ANT-5, pois teve produção de etanol igual ao da linhagem parental no ciclo 6, e também apresentou menor viabilidade (63,53) (Figura 7 e 9).

Figura 9. Viabilidade celular (%) e análises estatísticas das linhagens CAT-1, NAB-1, ANT-5 e ATT-6 nos 7 ciclos fermentativos. Letras iguais dentro do mesmo ciclo não diferem ao nível de 5% de significância, de acordo com o teste de Tukey

3.3.4.2 Açúcares residuais e produção de glicerol

Os dados de açúcares residuais quantificados nos ciclos 2, 3, 4 e 7 demonstraram que ATT-6 foi significativamente diferente das outras linhagens avaliadas porque apresentou os valores mais baixos de açúcares no final de todos os ciclos analisados (Figura 10). Este resultado mostra que ATT-6 consumiu mais açúcar, o que se correlaciona com os resultados da produção de etanol (Figura 7).

Em geral, a quarta etapa deste trabalho revelou que ATT-6 apresentou os maiores valores de etanol na maioria dos ciclos e também apresentou maior velocidade de fermentação. Esses dados estão correlacionados com o maior consumo de açúcar, sugerindo que essa linhagem desviou preferencialmente a fonte de carbono para obter etanol. Nos ciclos 4 e 7, NAB-1 apresentou os maiores valores de açúcares residuais e diferiu da linhagem parental CAT-1 (Figura 10).

Figura 10. Açúcar residual total (%) e análises estatísticas das linhagens CAT-1, NAB-1, ANT-5 e ATT-6, ao final dos ciclos 2, 3, 4 e 7. Letras iguais dentro do mesmo ciclo não diferem ao nível de 5% de significância, de acordo com o teste de Tukey

O glicerol foi quantificado nos ciclos 2, 3, 4 e 7 (Figura 11). Nos ciclos 2 e 3, a produção de glicerol obtida pela linhagem CAT-1 (0,50 e 0,68%) e ATT-6 (0,59 e 0,78%) não foi diferente e ambas produziram mais glicerol do que NAB-1 (0,42 e 0,63%) e ANT-5 (0,56 e 0,63%). No quarto ciclo, no qual a concentração do mosto foi de 33%, a linhagem ATT-6 demonstrou maior produção de glicerol (0,78%) e, neste mesmo ciclo, esta linhagem demonstrou uma produção de etanol significativamente maior do que as outras linhagens testadas (Figura 7). O glicerol e os ácidos orgânicos, conjuntamente com a biomassa, são subprodutos relacionados ao equilíbrio de óxido-redução em condições anaeróbicas, pois a fermentação alcoólica é um processo não oxidativo, e para manter o equilíbrio de óxido-redução, todo NADH formado em reações de oxidação deve ser consumido em reações de

redução (acopladas à produção de etanol e glicerol) (Van-Dijken & Scheffers, 1986). Portanto, o glicerol é o produto secundário formado na mesma via em que o etanol é sintetizado. É um metabólito osmoregulador e sua formação aumenta quando há uma alta pressão osmótica no meio, protegendo as células na presença desse estresse (Guo et al., 2001, Cronwright et al., 2002). Leveduras *S. cerevisiae*, quando em situação de estresse osmótico, podem desencadear a via HOG (*high osmolarity glycerol*). Nesta via metabólica, receptores de membrana provocam uma cascata de sinalização, envolvendo proteínas que são transportadas para o núcleo e se ligam a promotores que podem ativar fatores de transcrição envolvidos na biossíntese de glicerol. Por meio da síntese de glicerol, a via HOG é conhecida por conferir impermeabilidade às células (Hersen et al., 2008; Hohmann, 2002; Tatebayashi et al., 2006). Quando em condições com altas concentrações de açúcar, as células naturalmente perdem água para que ocorra a regulação osmótica. A perda de água ocasiona o aumento das concentrações de íons e biomoléculas intracelulares, resultando em diminuição da atividade celular. A habilidade da levedura em suportar o estresse osmótico está diretamente relacionada à produção e retenção de glicerol (Saito & Posas, 2012).

De acordo com Rep et al. (2000), a atividade nuclear dos fatores de transcrição Msn2 e Msn4 podem ser controlados pela proteína Hog1 após uma situação de choque osmótico. A análise global de expressão gênica demonstrou correlação aparente entre Msn2/Msn4 e Hog1. Levando em conta esta informação, pode-se inferir que no ciclo 4, a linhagem ATT-6 reagiu melhor ao estresse osmótico, pois além de ter demonstrado menor quantidade de açúcar residual neste ciclo (Figura 10), ou seja, obteve maior consumo de açúcar, também apresentou maior acúmulo de etanol (Figura 7) e de glicerol (Figura 11). No ciclo 7, CAT-1 produziu 0,85% de glicerol e não foi diferente de NAB-1 (0,87%) e ATT-6 (0,77%), mas foi significativamente diferente de ANT-5 (0,74%).

Os dados aqui obtidos corroboram a informação de que o glicerol pode atuar como regulador de estresse osmótico em leveduras, porque conforme a concentração de açúcar (ART) foi aumentada nos ciclos 2 (22%), 3 (28%), 4 (33%) e 7 (35%) (Tabela 3), houve também o aumento correspondente da biossíntese de glicerol obtida pelas quatro linhagens avaliadas (Figura 11). Neste sentido, a sobre-expressão do gene *MSN2* truncado sugere o favorecimento da via HOG1 para a formação de glicerol, e consequentemente melhor controle osmótico na condição de estresse imposta pelos experimentos com acréscimos substanciais na concentração de açúcar (ART).

Figura 11. Biossíntese de glicerol (%) e análises estatísticas das linhagens CAT-1, NAB-1, ANT-5 e ATT-6, ao final dos ciclos 2, 3, 4 e 7. Letras iguais dentro do mesmo ciclo não diferem ao nível de 5% de significância, de acordo com o teste de Tukey

3.3.4.3 Carboidratos de reserva

Em relação aos carboidratos de reserva, analisados no final do último ciclo (% , mg/100mg de biomassa seca), os valores de trealose revelaram que CAT-1 (4,82), ANT-5 (4,72) e ATT-6 (4,05) não se diferenciaram, mas apresentaram valores significativamente maiores de acúmulo de trealose em relação a linhagem NAB-1 (2,91) (Figura 12).

A linhagem NAB-1 também apresentou menor acúmulo de glicogênio e se diferenciou significativamente das outras linhagens. As linhagens CAT-1, ANT-5 e ATT-6 não diferiram em relação à produção de glicogênio (Figura 13). Em leveduras, o estresse osmótico e a consequente perda de água podem ocasionar diferentes mecanismos relacionados com a síntese de glicerol e trealose. Desta forma, as células podem se prevenir da desidratação e proteger suas estruturas (Mager & Siderius, 2002).

Os carboidratos de reserva, trealose e glicogênio, podem representar até 30% da matéria seca da levedura. A trealose, dissacarídeo formado por duas moléculas de glicose, é responsável pela manutenção de células vegetativas e esporos viáveis. A função protetora da trealose é resultado da relação entre sua localização e mobilização celular. É acumulada no citoplasma, exercendo influência na atividade de água do citosol contribuindo para a latência celular e aumentando a resistência ao estresse hídrico (Parrou et al., 1997; Singer & Lindquist, 1998; Zhao & Bai, 2009). Em condições onde há baixa atividade de água, a trealose substitui as moléculas de água na membrana, nos dois lados da camada fosfolipídica, mantendo a sua

integridade. Os teores de trealose e glicogênio sofrem oscilações durante a fermentação, podendo terminar o processo com teores diferentes. Tais reservas podem ser metabolizadas pelas células ao término da fermentação, produzindo mais etanol e enriquecendo a levedura com nitrogênio (Amorim et al., 1996). O acúmulo de trealose está relacionado com a viabilidade celular e a tolerância ao estresse etanólico, durante a fermentação (Mansure et al., 1997). De acordo com Parrou et al. (1999), o glicogênio é o principal carboidrato de reserva em leveduras. Em condições onde há limitação de nitrogênio, o glicogênio começa a se acumular nas células, imediatamente no momento em que a fonte de nitrogênio é exaurida. É possível hipotetizar que a linhagem NAB-1 tenha demonstrado menor acúmulo de glicogênio pelo fato de sobre-expressar o triptofano constitutivamente. A sobre-expressão do gene *TRP1* na linhagem NAB-1 conferiu menor capacidade de acumular ambos os carboidratos de reserva, em relação às outras linhagens analisadas.

Figura 12. Trealose (% , mg/100mg de biomassa seca) e análise estatística das linhagens CAT-1, NAB-1, ANT-5 e ATT-6 no final do sétimo ciclo. Letras iguais não diferem ao nível de 5% de significância, de acordo com o teste de Tukey

Figura 13. Glicogênio (% , mg/100mg de biomassa seca) e análise estatística das linhagens CAT-1, NAB-1, ANT-5 e ATT-6 no final do sétimo ciclo. Letras iguais não diferem ao nível de 5% de significância, de acordo com o teste de Tukey

O presente estudo demonstrou que a linhagem ATT-6, com o fator de transcrição Msn2 (versão truncada), pode ser uma potencial candidata ao processo brasileiro com reciclo celular, empregando principalmente fermentações com alta concentração de açúcares.

Na quarta etapa deste trabalho, quando as concentrações do melaço de cana-de-açúcar foram drasticamente aumentadas nos reciclos celulares, a linhagem ATT-6 mostrou maior produção de etanol (Figura 7) e desprendimento de CO₂ (em mostos com 18, 22, 28 e 33% de ART), e, também, maior velocidade de fermentação nos ciclos 1, 2, 4 e 5 (Figura 8), em relação à linhagem parental. Além disso, nesta linhagem, também se verificou menor quantidade de ART residual (%) ao final dos ciclos 2,3,4 e 7, sugerindo que ATT-6 teve maior utilização de açúcar nestes ciclos (Figura 10). A linhagem ATT-6 manteve sua viabilidade estável nos dois últimos ciclos, onde foram utilizados mostos com a maior concentração de açúcar, 35% de ART, diferente da linhagem parental que apresentou uma queda de 10,78% na viabilidade no último ciclo analisado (Figura 9). No último ciclo, ATT-6 não diferiu da parental quanto a sua viabilidade celular (Figura 9). Todos esses resultados permitem sugerir que a sobre-expressão do gene *MSN2*, na versão truncada, favoreceu a

linhagem ATT-6 quando em condições de estresse simultâneo, conforme encontrado nas destilarias brasileiras.

A linhagem ATT-6 também se destacou quanto a sua viabilidade nos testes em microplacas onde se empregou diferentes concentrações de ART em mosto de melaço de cana, demonstrando maior viabilidade em relação à parental CAT-1 em 27 e 33% de ART (Figura 2). Isto mostra que ATT-6 pode ter sido melhorada para maior tolerância em uma situação de estresse osmótico.

Quando os testes em microescala foram realizados com diferentes níveis de etanol (em meios YEPD), a viabilidade de ATT-6 foi igual a parental CAT-1, nas concentrações de 8, 12, 14 e 16% (de etanol v/v). Por outro lado, ATT-6 demonstrou menor viabilidade em relação à linhagem parental quando o teor de etanol no meio YEPD foi de 18% (v/v) (Figura 4). Este resultado sugere que possivelmente o gene *MSN2* na versão truncada pode ter influenciado a linhagem ATT-6 a responder principalmente ao estresse osmótico, pois quando o estresse foi etanólico, a uma concentração muito elevada (18% v/v), esta linhagem se demonstrou mais sensível em comparação com a parental. Sugerindo que os experimentos delineados conseguiram atingir o seu propósito, de apresentar os limites de estresse de cada linhagem após os ciclos celulares, apresentando as melhores condições de fermentação em cada experimento.

Em síntese, ATT-6 poderia ser empregada em condições de maior estresse osmótico, favorecendo principalmente a velocidade de fermentação. No ciclo 4, onde se utilizou mosto contendo 33% de ART a 30°C, a linhagem ATT-6 apresentou os dados de maior interesse para o propósito do presente estudo, isto é, maior produção de etanol, velocidade de fermentação, desprendimento de CO₂ e consumo de açúcares, sugerindo que esta seria a concentração do mosto e a condição mais adequada para uma possível fermentação industrial empregando esta levedura.

A linhagem ANT-5, com a versão não truncada do gene *MSN2* sobre-expresso, foi semelhante à parental CAT-1 em muitos parâmetros aqui avaliados, não demonstrando diferenças significativas quanto ao crescimento e viabilidade nos testes com diferentes concentrações de ART (Figura 2) e na maior parte dos parâmetros dos experimentos fermentativos com reciclo de células analisados (itens 3.3.4 e 3.3.5). No entanto, para os testes com diferentes níveis de etanol (Figura 4) a linhagem ANT-5 apresentou menor viabilidade do que a CAT-1 parental. Desta forma, é possível hipotetizar que o nível da sobre-expressão do gene *MSN2* nesta versão não tenha sido suficiente para resultar em efeitos

positivos nos testes e nas fermentações com ciclos, realizadas no presente trabalho. Também é importante ressaltar que os resultados obtidos neste trabalho levam a inferir que o nível de sobre-expressão e a forma do gene *MSN2*, pode influenciar as linhagens de maneira diferente, uma vez que, verificaram-se comportamentos fisiológicos distintos pelas linhagens ANT-5 e ATT-6. De acordo com Bucker (2014), a sobre-expressão do gene *MSN2* e *MSN2-T* (versão truncada do gene) desempenham papéis diferentes na resposta geral ao estresse, principalmente por atuação na regulação de genes relacionados ao controle da via PKA, inibindo (ANT-5) ou promovendo (ATT-6) uma maior proliferação celular nas leveduras de *S. cerevisiae* em resposta ao estresse de etanol.

A linhagem NAB-1, com o gene *TRP1* de síntese triptofano sobre-expresso, se mostrou menos viável nos testes em que foram testadas diferentes concentrações de ART (%) e etanol (% v/v) (primeira e segunda etapa, Figuras 2 e 4), em comparação com as outras três linhagens. Nos experimentos com ciclos de células (itens 3.3.4 e 3.3.5), a linhagem NAB-1 não diferiu da parental na maior parte dos ciclos, na maioria dos parâmetros analisados. No entanto, um dado interessante e específico foi que esta mostrou um crescimento significativamente maior no meio YEPD com 8% de etanol (v/v) (Figura 4A). Este dado corrobora o estudo de Yoshikawa et al. (2009), no qual comprovou-se a importância do gene *TRP1* na tolerância das linhagens frente ao estresse ocasionado pelo etanol. Neste estudo, o comportamento de crescimento de linhagens com deleção única no gene (*TRP1*) sob estresse de etanol foi avaliado e quantificado. Foi constatado que: as linhagens com deleção nos genes de “metabolismo de triptofano” foram sensíveis a 8% (v/v) de etanol. Em outro estudo, realizado por Hirasawa et al. (2007), o aumento da expressão de genes relacionados à biossíntese de triptofano conferiu maior tolerância ao estresse de etanol para as células de levedura (15% de etanol v/v), comprovando em seus resultados que linhagens com sobre-expressão desses genes poderiam apresentar maior tolerância ao etanol. Nos estudos acima citados, referente ao gene *TRP1*, a exposição das células foi realizada em meios onde o único estresse foi ocasionado especificamente pelo etanol em diferentes concentrações, sendo o etanol adicionado ao meio no tempo zero de crescimento, conforme também realizado na segunda etapa do presente trabalho. É importante destacar que em destilarias, as células suportam os efeitos dos níveis de etanol produzidos por elas, a custo de uma anterior exposição celular a elevadas concentrações de ART, isto é, primeiro o estresse osmótico seguido de estresse etanólico. Esta condição é totalmente diferente dos trabalhos onde fora

comprovada a eficiência deste gene, para o aumento da tolerância ao estresse alcoólico. Sendo assim, é provável que a linhagem NAB-1, com sobre-expressão do gene *TRP1* responsável pela síntese de triptofano, não tenha demonstrado diferenças significativas nos diferentes parâmetros aqui avaliados, nos dois experimentos com reciclo de células (onde se empregou a fermentação com alto teor alcoólico), porque o processo empregado no presente estudo foi muito diferente daquele realizado nos trabalhos acima citados, onde fora comprovada a eficiência deste gene para a maior tolerância da levedura.

3.4 Conclusões

O presente estudo revelou que a linhagem NAB-1, com o gene *TRP1* de síntese de triptofano sobre-expresso, apresentou maior crescimento em meio YEPD contendo 8% de etanol (v/v). No entanto, a sobre-expressão do gene *TRP1* não favoreceu a linhagem NAB-1 para maior viabilidade quando os tratamentos foram concentrações maiores que 8% de etanol (v/v) e mostos de melão contendo 27 e 33% de ART. Nestes tratamentos, a linhagem NAB-1 diferiu das outras linhagens testadas, inclusive da parental CAT-1, com valores de viabilidade significativamente menores. A sobre-expressão do gene *TRP1* também ocasionou menor acúmulo dos carboidratos de reserva trealose e glicogênio. A linhagem ANT-5 apresentou comportamento similar à linhagem CAT-1 na maior parte dos parâmetros analisados. Contudo, nos testes de crescimento em microescala, em meio YEPD com adição de 16 e 18% de etanol, ANT-5 se apresentou menos viável em relação à ATT-6 e a parental CAT-1. Os resultados mostram que a sobre-expressão do gene *MSN2* na versão truncada favoreceu a linhagem ATT-6 principalmente em relação à maior produção de etanol, velocidade de fermentação e maior consumo de açúcares nos experimentos fermentativos com reciclos de células, conduzidos com aumentos drásticos da concentração de ART do mosto (última etapa deste trabalho). A linhagem ATT-6 apresentou os dados mais interessantes para o propósito do presente estudo no quarto ciclo fermentativo do experimento com 7 reciclos, onde se empregou mosto de melão a uma concentração de 33% de ART a 30°C. ATT-6 também apresentou viabilidade significativamente maior em relação a parental CAT-1 nos testes de crescimento em microescala onde os mostos de melão apresentavam concentrações de 27 e 33% de ART. O nível de sobre-expressão do gene *MSN2* pode contribuir para comportamentos fisiológicos diferentes, uma vez que a linhagem ANT-5, com gene *MSN2* sobre-expresso na versão não truncada, diferiu da linhagem ATT-6 nos testes de crescimento em microescala e nas fermentações com reciclo de células. ATT-6 poderia ter emprego em

condições de maior estresse osmótico, favorecendo a fermentação principalmente no quesito velocidade. O presente estudo demonstrou que, dentre as linhagens geneticamente modificadas estudadas, a linhagem ATT-6 tem potencial biotecnológico para processos fermentativos empregando ciclos de células e altos teores de açúcares em mosto de melaço de cana-de-açúcar.

3.5 Figuras Suplementares

Figura suplementar 1. Velocidade de fermentação das linhagens CAT-1, NAB-1, ANT-5 e ATT-6, calculada pelo CO₂ liberado (g) ao longo das horas, nos quinze ciclos fermentativos

Referências

- Alepuz, P.M.; Jovanovic, A.; Reiser, V.; Ammerer, G. stress-induced map kinase hog1 is part of transcription activation complexes. **Molecular Cell**, v. 7, n. 4, p. 767-777, 2001.
- Amorim, H.V.; Basso, L.C.; Alves, D.M.G. **Processos de produção de álcool: controle e monitoramento**. Piracicaba, FERMENTEC, 1996. 103p.
- Balat, M.; Balat, H. Recent trends in global production and utilization of bio-ethanol fuel. **Applied Energy**, v. 86, n. 11, p. 2273-2282, 2009.
- Basso, L.C.; Amorim, H.V.; Oliveira, A.J.; Lopes, M.L. Yeast selection for fuel ethanol in Brazil. **FEMS Yeast Research**, v. 8, n. 7, p. 1155-1163, 2008.
- Basso, L.C.; Basso, T.O.; Rocha, S.N. Ethanol production in Brazil: the industrial process and its impact on yeast fermentation. In: SANTOS BERNARDES, M.A. (Ed.). **Biofuel Production - Recent Developments and Prospects**. InTech, 2011, chap. 5, p. 85-100.
- Becker, J.U. A method for glycogen determination in whole yeast cells. **Analytical Biochemistry**, v. 86, n. 1, p. 56-64, 1978.
- Boinot, F. Melle process of alcoholic fermentation. **The International Sugar Journal**, 1939.
- Bücker, A. **Engenharia genômica de linhagem industrial de *Saccharomyces cerevisiae* visando melhorar a tolerância ao etanol**. 2014. 111p. Tese (Doutorado em Bioquímica) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2014.
- Chen, J.C.P.; Chou, C.C. Cane Sugar Handbook - A Manual for Cane Sugar Manufacturers and Their Chemists. In: CHEN, J.C.P.; CHOU, C.C. (Eds.). **Sugars and nonsugars in sugarcane**. Edison: John Wiley & Sons Inc, 1993, cap. 2, p. 21-30.
- Christofoleti-furlan, R.M. Seleção de leveduras para a fermentação com alto teor alcoólico a partir da biodiversidade encontrada em destilarias brasileiras. 2012. 126p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2012.
- Cronwright, G.R.; Rohwer, J.M.; Prior, B.A. Metabolic control analysis of glycerol synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 9, p. 4448-4456, 2002.
- Debnath, D.; Whistance J.; Thompson, W.; Binfield, J. Complement or substitute: Ethanol's uncertain relationship with gasoline under alternative petroleum price and policy scenarios. **Applied Energy**, v. 191, n.1, p. 385-397, 2017.

Demirbas, A. The social, economic, and environmental importance of biofuels in the future. **Energy Sources, Part B: Economics, Planning, and Policy**, v. 12, n. 1, p. 47-55, 2017.

Estruch, F. Stress-controlled transcription factors, stress-induced genes, and stress tolerance in budding yeast. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 24, n.1, p. 469–486, 2000.

Gasch, A.P.; Spellman, P.T.; Kao, C.M.; Carmel-Harel, O.; Eisen, M.B.; Storz, G.; Botstein, D.; Brown, P.O. Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. **Molecular Biology of the Cell**, v. 11, n. 12, p. 4241-4257, 2000.

Godoy, A.; Amorim, H. V.; Lopes M. L.; Oliveira A. J. Continuous and batch fermentation processes: Advantages and disadvantages of these processes in the Brazilian ethanol production. **International sugar journal**, v. 110, n. 1311, p. 175-181, 2008.

Gomar-Alba, M.; Jiménez-Martí, E.; Del-Olmo, M. The *Saccharomyces cerevisiae* Hot1p regulated gene YHR087W (HGI1) has a role in translation upon high glucose concentration stress. **BMC Molecular Biology**, v. 21, n. 13, p. 1-19, 2012.

Görner, W.; Durchschlag, E.; Martinez-Pastor, M.T.; Estruch, F.; Ammerer, G.; Hamilton, B.; Ruis, H.; Schüller, C. Nuclear localization of the C₂H₂ zinc finger protein Msn2p is regulated by stress and protein kinase A activity. **Genes & Development**, v. 12, n. 4, p. 586-597, 1998.

Graves, T.; Narendranath, N.; Power, R. Development of a “stress model” fermentation system for fuel ethanol yeast strains. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 113, n. 3, p. 263-271, 2007.

Guo, Z.P.; Zhang, L.; Ding, Z.Y.; Shi, G.Y. Minimization of glycerol synthesis in industrial ethanol yeast without influencing its fermentation performance. **Metabolic Engineering**, v. 13, n. 1, p. 49-59, 2011.

Hersen, P.; McClean, M.N.; Mahadevan, L.; Ramanathan, S. Signal processing by the HOG MAP kinase pathway. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 20, p. 7165-7170, 2008.

Hirasawa, T; Yoshikawa, K.; Nakakura, Y.; Nagahisa, K.; Furusawa, C.; Katakura, Y.; Shimizu, H.; Shioya, S. Identification of target genes conferring ethanol stress tolerance to *Saccharomyces cerevisiae* based on DNA microarray data analysis. **Journal of Biotechnology**, v. 131, n. 1, p. 34-44, 2007.

Hohmann, S. Osmotic stress signaling and osmoadaptation in yeasts. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 66, n. 2, p. 300-372, 2002.

Iwahashi, H.; Obuchi, K.; Fujii, S.; Komatsu, Y. The correlative evidence suggesting that trehalose stabilizes membrane structure in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Cellular and Molecular Biology**, v. 41, n. 6, p. 763-769, 1995.

Kobayashi, N.; Mcentee, K. Evidence for a heat shock transcription factor-independent mechanism for heat shock induction of transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 87, p. 6550-6554, 1991.

Kobayashi, N.; Mcentee, K. Identification of cis and trans components of a novel heat shock stress regulatory pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular and Cellular Biology**, v. 13, p. 248-256, 1993.

Lewis, J. G. Learmonth, R. P.; Watson, K. Induction of heat, freezing and salt tolerance by heat and salt shock in *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiology**, v. 141, p. 687-694, 1995.

Mager, W.H.; Siderius, M. Novel insights into the osmotic stress response of yeast. **FEMS Yeast Research**, v. 2, n. 3, p. 251-257, 2002.

Mansure, J.J.; Souza, R.C.; Panek, A.D. Trehalose metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* during alcoholic fermentation. **Biotechnology Letters**, v. 19, n. 12, p. 1201-1203, 1997.

Marchal, R.; Penet, S.; Solano-Serena, F.; Vandecasteele, J.P. Gasoline and diesel oil biodegradation. **Oil & Gas Science and Technology**, v. 58, n. 4, p. 441-448, 2006.

Marchler, G.; Schüller, C.; Adam, G.; Ruis, H.A. *Saccharomyces cerevisiae* UAS element controlled by protein kinase A activates transcription in response to a variety of stress conditions. **The EMBO Journal**, v. 12, n. 5, p. 1997-2003, 1993.

Munna, M.S.; Humayun, S.; Noor, R. Influence of heat shock and osmotic stresses on the growth and viability of *Saccharomyces cerevisiae* SUBSC01. **BMC Research Notes**, v. 8, p. 1-8, 2015.

Navarro, J.M.; Durand, G. Alcohol fermentation: effect of temperature on ethanol accumulation within yeast cells. **Annals of Microbiology**, v. 129B, n. 2, p. 215-224, 1978.

Nicholls, S.; Straffon, M.; Enjalbert, B.; Nantel, A.; Macaskill, S.; Whiteway, M.; Brown, A.J.P. Msn2- and Msn4-like transcription factors play no obvious roles in the stress responses of the fungal pathogen *Candida albicans*. **Eukaryot Cell**, v. 3, n. 5, p. 1111-1123, 2004.

Oliveira, A.J.; Gallo, C.R.; Alcarde, V.E.; Godoy, A.; Amorim, H.V. **Métodos para o controle microbiológico na produção de álcool e açúcar**. Piracicaba: FERMENTEC/FEALQ/ESALQ-USP, 1996. 89p.

Park, J.I.; Grant, C.M.; Attfield, P.V.; Dawes, I.W. The freeze-thaw stress response of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* is growth phase specific and is controlled by nutritional state via the RAS-cyclic AMP signal transduction pathway. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, p. 3818-3824, 1997.

Parrou, J.L.; Enjalbert, B.; Plourde, L.; Bauche, A.; Gonzalez, B.; François, J. Dynamic responses of reserve carbohydrate metabolism under carbon and nitrogen limitations in *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast Journal**, v. 15, n. 3, p. 191-203, 1999.

Parrou, J.L.; Teste, M.A.; François, J. Effects of various types of stress on the metabolism of reserve carbohydrates in *Saccharomyces cerevisiae*: genetic evidence for a stress-induced recycling of glycogen and trehalose. **Microbiology**, v. 143, n. 6, p. 1891-1900, 1997.

Pham, T.K.; Wright, T.K. The proteomic response of *Saccharomyces cerevisiae* in very high glucose conditions with amino acid supplementation. **Journal of Proteome Research**, n. 7, p. 4766-4774, 2008.

Puligundla, P.; Smogrovicova, D.; Obulam, V.S.; Ko, S. Very high gravity (VHG) ethanolic brewing and fermentation: a research update. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 38, n. 9, p. 1133-1144, 2011.

Rep, M.; Krantz, M.; Thevelein, J.M.; Hohmann, S. The transcriptional response of *Saccharomyces cerevisiae* to osmotic shock. Hot1p and Msn2p/Msn4p are required for the induction of subsets of high osmolarity glycerol pathway-dependent genes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 12, p. 8290-8300, 2000.

Sadeh, A.; Movshovich, N.; Volokh, M.; Gheber, L.; Aharoni, A. Fine-tuning of the Msn2/4-mediated yeast stress responses as revealed by systematic deletion of Msn2/4 partners. **Molecular Biology of the Cell**, v. 22, n. 7, p. 3127-3138, 2011.

Saito, H.; Posas, F. Response to Hyperosmotic Stress. **Genetics**, v. 192, n. 2, p. 289-318, 2012.

Sasano, Y.; Watanabe, D.; Ukibe, K.; Inai, T.; Ohtsu, I.; Shimoi, H.; Takagi, H. Overexpression of the yeast transcription activator Msn2 confers furfural resistance and increases the initial fermentation rate in ethanol production. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 113, n. 4, p. 451-455, 2012.

Schüller, C.; Brewster, J.L.; Alexander, M.R.; Gustin, M.C.; Ruis, H. The HOG pathway controls osmotic regulation of transcription via the stress response element (STRE) of the *Saccharomyces cerevisiae* *CTT1* gene. **The EMBO Journal**, v. 13, n.18, p. 4382-4389, 1994.

Singer, M.; Lindquist, S. Thermotolerance in *Saccharomyces cerevisiae*: the Yin and Yang of trehalose. **Trends in Biotechnology**, v. 16, n. 11, p. 460-468, 1998.

Smith, A.; Ward, M.P.; Garrett, S. Yeast PKA represses Msn2p/Msn4p-dependent gene expression to regulate growth, stress response and glycogen accumulation. **The EMBO Journal**, v. 17, n. 13, p. 3556-3564, 1998.

Takagi, H.; Takaoka M, Kawaguchi A, Kubo Y. Effect of L-proline on sake brewing and ethanol stress in *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, p. 8656-8662, 2005.

Tatebayashi, K.; Yamamoto, K.; Tanaka, K.; Tomida, T.; Maruoka, T.; Kasukawa, E.; Saito, H. Adaptor functions of Cdc42, Ste50, and Sho1 in the yeast osmoregulatory HOG MAPK pathway. **EMBO Journal**, v. 25, n. 13, p. 3033-3044, 2006.

Ter-Schure, E.G.; Van-Riel, N.A.W.; Verrips, C.T. The role of ammonia metabolism in nitrogen catabolite repression in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiology**, v. 24, p. 67-83, 2000.

Thomas, K.C.; Hynes, S.H.; Ingledew, W.M. Practical and theoretical considerations in the production of high concentration of alcohol by fermentation. **Process Biochemistry**, v. 31, n. 4, p. 321-331, 1996.

Trevelyan, W.E.; Harrison, J.S. Studies on yeast metabolism. 5. The trehalose content of baker's yeast during anaerobic fermentation. **Biochemical Journal**, v. 62, n. 2, p. 177-183, 1956.

Van-Dijken, J.P.; Scheffers, W.A. Redox balances in the metabolism of sugars by yeasts. **FEMS Microbiology Letters**, v. 32, n. 3-4, p. 199-224, 1986.

Waclawovsky, A.J.; Sato, P.M.; Lembke, C.G.; Moore, P.H.; Souza, G.M. Sugarcane for bioenergy production: an assessment of yield and regulation of sucrose content. **Plant Biotechnology Journal**, v. 8, n. 3, p. 263-276, 2010.

Wheals, A.E.; Basso, L.C.; Alves, D.M.; Amorim, H.V. Fuel ethanol after 25 years. **Trends in Biotechnology**, v. 17, n. 12, p. 482-487, 1999.

Yoshikawa, K.; Tanaka, T.; Furusawa, C.; Nagahisa, K.; Hirasawa, T.; Shimizu, H. Comprehensive phenotypic analysis for identification of genes affecting growth under ethanol stress in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Yeast Research**, v. 9, n. 1, p. 32-44, 2009.

Zhao, X.Q.; Bai, F.W. Mechanisms of yeast stress tolerance and its manipulation for efficient fuel ethanol production. **Journal of Biotechnology**, v. 144, n. 1, p. 23-30, 2009.

4 Suplementação de aminoácidos na fermentação alcoólica empregando CAT-1 em mostos de melaço e xarope de cana-de-açúcar

Resumo

A produção de álcool combustível a partir de recursos renováveis tem sido alvo de interesse considerável nos últimos anos. A produção de etanol poderia ser melhorada pela disponibilidade de linhagens *Saccharomyces cerevisiae* tolerantes. Estudos têm investigado o efeito de suplementações, no substrato a ser fermentado, sob o crescimento e a viabilidade das células, incluindo extrato de levedura, sulfato de amônio, ureia, etc. A suplementação de aminoácidos pode contribuir para maior tolerância das células frente às diferentes condições de estresse enfrentadas no processo fermentativo. No entanto, a presença dos aminoácidos em substratos utilizados em processos brasileiros ainda não foi estudada. Neste contexto, o presente estudo objetivou avaliar a influência da suplementação de aminoácidos sob o crescimento da linhagem industrial CAT-1 em condições de estresse etanólico e osmótico (meio YNB com 10 e 12% v/v de etanol e mosto de melaço com 15, 20, 25 e 30% de ART). Além disso, a suplementação de aminoácidos também foi testada em fermentações de melaço e xarope de cana-de-açúcar, empregando o reciclo de células da linhagem CAT-1. Os resultados revelaram que em meio YNB com 12% de etanol (v/v), a suplementação com glicina e fenilalanina incrementou o crescimento da linhagem. Por outro lado, a suplementação com valina e cisteína no meio YNB com 10 e 12% de etanol (v/v) causou depreciação no crescimento da linhagem CAT-1. A presença de cisteína também depreciou o crescimento em mosto de melaço de cana com 20% de ART. A suplementação com histidina, alanina ou com lisina aumentou a produção de biomassa em relação ao controle nas fermentações de melaço com reciclo de células. Triptofano, asparagina e histidina conferiram os maiores valores de viabilidade em xarope de cana, sendo que asparagina e histidina também promoveram maior acúmulo de biomassa neste substrato. A concentração de 200 mg.L⁻¹ de nitrogênio amínico, utilizada nos diferentes tratamentos com aminoácidos, em meio YNB, e em mostos de melaço e xarope de cana, foi eficaz para o intuito de diferenciar comportamentos fisiológicos da linhagem CAT-1. A suplementação com aminoácidos ocasionou efeitos distintos no comportamento fisiológico da levedura CAT-1 de acordo com o meio/mosto fornecido. A suplementação com histidina favoreceu a linhagem CAT-1 para maior crescimento e viabilidade em mostos provenientes tanto de melaço quanto de xarope de cana-de-açúcar. Os resultados revelaram que a suplementação de 200 mg.L⁻¹ de N amínico proveniente de aminoácidos, em mostos de melaço e xarope de cana, pode favorecer ou depreciar o crescimento e viabilidade da linhagem CAT-1 em fermentações simulando as condições industriais brasileiras, com reciclo de células. A suplementação com histidina se mostrou a mais promissora para o aumento da tolerância da linhagem industrial nas condições aqui avaliadas.

Palavras-chave: Histidina; Suplementação de aminoácidos; Fermentação alcoólica; *S. cerevisiae*; Xarope e melaço de cana-de-açúcar

Abstract

The production of alcohol fuel from renewable resources has been a target of considerable interest in the last years. Ethanol production could be improved with the availability of tolerant *S. cerevisiae* strains. Many studies have investigated the effects of supplementation in the fermenting substrate on the growth and viability of cells, including yeast extract, ammonium sulfate, urea, etc. Some works found that amino acid supplementation can contribute to a higher cell tolerance to the different stress conditions faced in the fermentative process. However, the presence of amino acids in substrates used in the Brazilian process was not yet fully studied. In this context, the aim of the present study was to assess the influence of amino acid supplementation on the growth of the industrial strain CAT-1 in conditions of ethanolic and osmotic stresses (YNB medium with 10 and 12% ethanol v/v and molasse must with 15, 20, 25 and 30% TRS). In addition, amino acids supplementation was also analyzed in fermentations of sugarcane molasses and syrup musts, using CAT-1 cell recycle. The results revealed that in YNB medium with 12% ethanol (v/v), the supplementation with Gly and Phe increased the yeast growth. On the other hand, the supplementation with Val and Cys in YNB medium with 10 and 12% ethanol (v/v) caused a growth decrease in the yeast. The presence of Cys also decreased the growth of CAT-1 in sugarcane molasses must with 20% of TRS. His, Ala, Lys increased biomass production compared to the control in the molasses fermentation with cell recycle. The presence of Trp, Asn and His showed the higher viability values in sugarcane syrup. Asn and His also resulted in higher biomass accumulation in this substrate. The concentration of 200 mg.L⁻¹ of aminic nitrogen used in the different amino acid treatments was efficient for separating the physiological behavior of strain CAT-1. The supplementation with amino acids caused distinct effects in the physiological behavior of CAT-1 yeast according to the media/musts used. Supplementation with His caused a higher growth and viability in musts from molasses as well as from sugarcane syrup. The results revealed that supplementation of 200 mg.L⁻¹ of aminic N from amino acids in musts of molasses or sugarcane syrup, can increase or decrease the cell growth and viability of CAT-1, in fermentations simulating the industrial Brazilian conditions with cell recycle. His supplementation was the most promising for improving yeast tolerance in the assessed conditions.

Keywords: Histidine; Amino acid supplementation; Alcoholic fermentation; *S. cerevisiae*; Syrup and molasses of sugarcane

4.1 Introdução

Compreender os fatores que interferem o processo de produção de etanol é de fundamental importância para contemplar uma fermentação com alta taxa de sobrevivência celular e desempenho fermentativo satisfatório (Basso et al., 2011; Lopes, et al., 2016). Uma condição nutricional adequada pode favorecer as células de levedura, tornando-as aptas a sobreviver aos efeitos deletérios, encontrados durante a fermentação (Tropea et al., 2016). Além de açúcares fermentescíveis e compostos inorgânicos, o nitrogênio é um componente essencial para as células (Albers et al., 1996). Nesta conjuntura, a fonte de nitrogênio disponível no substrato durante o processo fermentativo tem influência direta sob o metabolismo e a fisiologia da levedura (Kalmokoff & Ingledew et al., 1985; Thomas & Ingledew, 1990). A tolerância, o crescimento, a multiplicação celular, e, por conseguinte, o rendimento fermentativo do processo são exemplos de fatores influenciados pela disponibilidade de nitrogênio no meio (Thomas & Ingledew, 1990). Também é proposto que em *S. cerevisiae* a limitação de nitrogênio nas fermentações pode ocasionar a inativação de proteínas transportadoras de sacarose (Badotti et al., 2008), sendo este o açúcar mais abundante no substrato empregado no processo brasileiro (Peters, 2006).

As várias fontes de nitrogênio usadas por leveduras são qualitativamente referidas como sendo preferidas ou não preferidas. Esta classificação foi empiricamente baseada em dois critérios: o primeiro é o quão bem os compostos individuais suportam o crescimento quando presentes como única fonte de nitrogênio, e o segundo critério reflete a descoberta de que as fontes preferenciais de nitrogênio geralmente provocam a repressão dos processos necessários para a utilização de fontes de nitrogênio não preferidas (Magasanik & Kaiser, 2002).

Leveduras *S. cerevisiae* preferencialmente utilizam o nitrogênio na forma amoniacal (NH_4^+) e, a partir do íon amônio, sintetizam todos os aminoácidos e bases nitrogenadas, necessários ao seu crescimento. Em condições de carência do íon amônio, o N amídico (na forma de ureia, por exemplo) ou amínico (na forma de aminoácidos) podem ser metabolizados por outras vias de utilização em *S. cerevisiae* (Basso; Amorim, 2001). O nitrogênio contido no caldo de cana puro está majoritariamente disponível na forma assimilável, no entanto, é insuficiente para suprir a nutrição celular da levedura (Chen, 1993; Jeronimo et al., 2008). A suplementação com o sulfato de amônio ou com a ureia tem sido requerida pela indústria alcooleira por representarem fontes de N mais econômicas. Contudo, apesar da

suplementação com a ureia pouco afetar o pH do meio, a utilização do sulfato de amônio pode acarretar em acidez do meio externo, diminuindo a viabilidade e a multiplicação das células (Amorim et al., 1996). Estudar possíveis fontes de N e suas respectivas concentrações adequadas ao processo é de extrema relevância para aumentar as opções de suplementação atualmente disponíveis para a indústria. Ademais, alguns resíduos agroindustriais contêm altas concentrações de nitrogênio, torna-los um subproduto seria uma proposta promissora para o desenvolvimento sustentável (Woiciechowski et al., 2013). Para isso, seria preciso estudos extensivos sobre a ação das diferentes fontes de N assimiláveis pela levedura em substratos atualmente empregados nos diferentes processos da produção do etanol.

A capacidade de usar aminoácidos e outros compostos nitrogenados requer sua internalização e, conseqüentemente, as células de leveduras possuem múltiplas permeases para facilitar seu transporte através da membrana citoplasmática. A presença de aminoácidos no meio induz a expressão de várias permeases de especificidade ampla; portanto, os aminoácidos induzem sua própria absorção. Esta resposta da transcrição é mediada pelo sensor Ssy1-Ptr3-Ssy5 (SPS) localizado na membrana citoplasmática (Ljungdahl, 2009).

Os aminoácidos podem ser referidos como unidades de construção, uma vez que desempenham funções vitais para a célula, como a síntese de enzimas e de componentes estruturais (Takagi et al., 1997; Morita et al., 2002). Segundo Hu et al. (2005) os aminoácidos isoleucina, metionina e fenilalanina podem aumentar a tolerância de *S. cerevisiae* em condição de estresse etanólico. De acordo com o autor, a maior tolerância das células foi decorrente da incorporação dos aminoácidos suplementares na membrana citoplasmática, o que possivelmente levou à maior capacidade de neutralizar o efeito de fluidização exercido pelo etanol.

Outro estudo identificou que uma linhagem sobre-expressando a prolina também apresentou maior viabilidade em condições de estresse alcoólico e, além disso, maior resistência ao congelamento, dessecação e estresse oxidativo foi observada (Takagi, 2008). A suplementação com o ácido glutâmico também tem sido apontada por gerar benefícios às células de *S. cerevisiae*, uma vez que promoveu um crescimento maior e mais acelerado em substrato derivado de trigo (Thomas & Ingledew, 1990). Sendo assim, é possível hipotetizar que alguns aminoácidos podem atuar não somente como fonte de N, mas também como um constituinte protetor de membrana, aumentando a viabilidade celular da levedura em situações adversas, como as que são encontradas no processo industrial da produção de etanol. Embora existam estudos relatando a influência dos aminoácidos na fisiologia de *S. cerevisiae*,

submetida a diferentes condições de estresse, estudos destacando a ação dos mesmos atuando individualmente em fermentações de mostos derivados de cana-de-açúcar ainda são escassos.

Neste contexto, o presente estudo teve por objetivo avaliar a suplementação de nitrogênio amínico proveniente de aminoácidos no crescimento e viabilidade celular da levedura industrial CAT-1 em mostos de melaço e xarope de cana-de-açúcar.

4.2 Material e Métodos

4.2.1 Material biológico

A linhagem industrial CAT-1 foi empregada no decorrer de todo o presente estudo (Basso et al., 2008), no qual realizaram-se testes de crescimento em microescala e experimentos fermentativos com reciclo de células, no intuito de avaliar a suplementação de 200 mg.L^{-1} de N amínico proveniente de aminoácidos.

4.2.2 Testes de crescimento em microescala

Testes de crescimento em microescala foram realizados em triplicata em um espectrofotômetro TECAN (Densidade óptica/D.O. 600nm), por incubação de microplacas de 96 poços em condições microaeróbicas com leituras em intervalos de 2 horas a 30°C , durante o período de 48 horas. Agitações prévias de 5 minutos antes de cada leitura foram realizadas. Para a montagem da microplaca, foi adicionado em cada poço:

20 μL de solução de cada aminoácido (com 1200 mg.L^{-1} de N amínico), diluído com água e esterilizado em autoclave a 121°C por 20 minutos (Tabela 1);

10 μL de inóculo pré-crescido durante 48 horas em meio YEPD (2% D-glicose, 1% de extrato de levedura e 1% de peptona bacteriológica);

90 μL de mosto de melaço de cana com diferentes concentrações de ART (% , p/v) e pH 5,0, ou 90 μL de meio YNB (0,93% YNB sem sulfato de amônio e aminoácidos, 2,70% D-glicose, 0,1% sulfato de amônio e 0,05% uréia) com diferentes níveis de etanol (% , v/v) e pH 5,0.

A concentração de cada aminoácido foi calculada para contribuir com 200 mg.L^{-1} de N amínico em 120 μL , sendo este o volume final de cada poço de microplaca (Tabela 1). As concentrações de uréia e sulfato de amônio foram calculadas para contribuir juntas com um total de 200 mg.L^{-1} de N amínico em um volume final de 120 μL . Os aminoácidos nas

moléculas proteicas são sempre L-estereoisômeros, portanto, somente foram utilizados L-aminoácidos.

Tabela 1 - Dados de peso molecular e concentração dos aminoácidos testados

Aminoácidos		Peso molecular	mg de N amínico.L ⁻¹ (por milimol.L ⁻¹)	milimoles.L ⁻¹ para 1200 mg de N amínico.L ⁻¹ (1200*14)	mg.L ⁻¹ para 1200 mg de N amínico.L ⁻¹ (85,71*peso molecular)	g.L ⁻¹ para 1200 mg de N amínico.L ⁻¹
1	Alanina	Ala	89,1	14	85,71	7637,14
2	Arginina	Arg	210,7	14	85,71	18060,00
3	Asparagina	Asn	132,1	14	85,71	11322,86
4	Aspartato ou ácido aspártico	Asp	133,1	14	85,71	11408,57
5	Cisteína	Cys	175,6	14	85,71	15051,43
6	Fenilalanina	Phe	165	14	85,71	14142,86
7	Glicina ou Glicocola	Gly	75,1	14	85,71	6437,14
8	Glutamato ou ácido glutâmico	Glu	147,1	14	85,71	12608,57
9	Glutamina	Gln	146	14	85,71	12514,29
10	Histidina	His	155	14	85,71	13285,71
11	Isoleucina	Ile	131,2	14	85,71	11245,71
12	Leucina	Leu	131,2	14	85,71	11245,71
13	Lisina	Lys	182,7	14	85,71	15660,00
14	Metionina	Met	149,21	14	85,71	12789,43
15	Prolina	Pro	115,13	14	85,71	9868,29
16	Serina	Ser	105,1	14	85,71	9008,57
17	Tirosina	Tyr	181,2	14	85,71	15531,43
18	Treonina	Thr	119,1	14	85,71	10208,57
19	Triptofano	Trp	204,2	14	85,71	17502,86
20	Valina	Val	117,2	14	85,71	10045,71

4.2.3 Determinação de N assimilável em melaço de cana-de-açúcar

A dosagem de N assimilável (N amínico + N amoniacal) pela levedura foi determinada em mosto de melaço de cana com 10% de ART. Inicialmente, o pH do mosto foi ajustado para 8,0 com NaOH (1,0 mol.L⁻¹), e adicionou-se 10 mL de BaCl₂ (1,0 mol.L⁻¹). Após 15 minutos, todo o volume foi adicionado em balão volumétrico de 200 mL, onde se completou o volume com água desmineralizada. Todo o conteúdo do balão foi filtrado com papel filtro, desprezando os primeiros 10 mL. Do filtrado transferiu-se 100 mL para um béquer, o pH foi novamente ajustado para 8,0 (NaOH, 1,0 mol.L⁻¹) e adicionou-se 25 mL de formaldeído com pH também ajustado para 8,0. Por meio de titulação de NaOH (1,0 mol.L⁻¹),

e anotação do volume gasto, calculou-se a concentração de N assimilável (Filipe-Ribeiro & Mendes-Faia, 2007).

4.2.4 Preparação de mostos a partir de melaço e xarope de cana-de-açúcar com suplementação de aminoácidos

Os mostos oriundos do melaço ou xarope de cana-de-açúcar, utilizados nos experimentos fermentativos com reciclo de células, foram preparados a partir de diluição do melaço/xarope com água, para obter a porcentagem (% p/v) de ART desejada. Os mostos diluídos foram centrifugados a 10.000 rpm, sob 20°C, durante 20 minutos e distribuídos em frascos *erlenmeyer*, os quais foram esterilizados a 121°C por 25 minutos. Paralelamente, preparou-se em frascos *erlenmeyer* de 50 mL, uma solução de cada aminoácido contendo 2000 mg.L⁻¹ de N amínico em 15 mL de água destilada, esterilizados a 121°C por 25 minutos.

Em câmara de fluxo, toda a solução estéril de cada L-aminoácido foi adicionada separadamente em garrafas *pet* com capacidade de 350 mL (previamente esterilizadas com água sanitária 10% e enxaguadas com água destilada), adicionando-se em seguida 135 mL de mosto de melaço ou xarope. A concentração dos aminoácidos foi calculada para 200 mg.L⁻¹ de N amínico, obtendo-se 150 mL de volume final de mosto em cada garrafa *pet*. Os mostos foram estocados em congelador, e degelados diariamente para a utilização em cada ciclo.

4.2.5 Propagação de biomassa de levedura para experimentos fermentativos

Para a propagação de biomassa, 150 µL da cultura previamente armazenada em ultra-freezer (em solução com 20% de glicerol) foram transferidos para 2 tubos contendo 5 mL de meio YEPD (2% D-glicose, 1% de extrato de levedura e 1% de peptona bacteriológica) sob incubação a 28°C, durante 48 horas. Após o crescimento, todo o conteúdo dos tubos foram transferidos para 2 frascos *erlenmeyer* contendo 150 mL de mosto de melaço de cana da Usina São Manoel com 10% de ART, pH 4,5, incubação a 30°C, durante 48 horas. Posteriormente, o conteúdo total de cada *erlenmeyer* foi transferido para 2 frascos *erlenmeyer* contendo 1,2 L do mesmo mosto acima mencionado. Os frascos foram incubados a 30°C, durante o período de 72 horas. Em seguida, a biomassa úmida foi resgatada por centrifugação (4000 rpm) para a condução do primeiro ciclo de fermentação. Todo o procedimento de propagação e resgate de biomassa úmida foi repetido para os experimentos fermentativos com reciclo de células.

4.2.6 Experimentos fermentativos com suplementação de aminoácidos e reciclo de células

Foram conduzidos dois experimentos fermentativos com reciclo de células, nos quais se empregou tubos de fundo cônico (Falcon) com capacidade de 15 mL. No primeiro experimento, com duas repetições para cada tratamento com aminoácido (200 mg.L^{-1} de N amínico), empregou-se mosto de melão da Usina Açucareira São Manoel. No segundo, com três repetições para cada tratamento (200 mg.L^{-1} de N amínico de aminoácido), empregou-se xarope de cana-de-açúcar da Usina São Martinho.

Em ambos os experimentos, para o inóculo do primeiro ciclo fermentativo, coletou-se por centrifugação (4000 rpm) a biomassa da linhagem CAT-1 da etapa de propagação, de modo que todos os tratamentos iniciassem o primeiro ciclo com o mesmo teor (g) de fermento (0,85 g no primeiro experimento e 0,76 g no segundo). Posteriormente, adicionou-se 8 mL de mosto de melão, no caso do primeiro experimento e xarope de cana, no caso do segundo. As fermentações foram conduzidas a 30°C . Os tubos foram mantidos em incubação a 30°C pelo período de 8 horas, e posteriormente foram mantidos na bancada em temperatura ambiente, até a realização do ciclo subsequente, no dia posterior. Ao final de cada ciclo fermentativo, a biomassa de levedura foi separada do substrato fermentado por centrifugação (4000 rpm) e pesada. Então, adicionou-se 8 mL de mosto, conforme as condições acima descritas. Todo o procedimento foi repetido sucessivamente em 7 reciclos no primeiro experimento fermentativo, e em 3 reciclos no segundo. A concentração de ART (% p/v) do mosto foi aumentada gradualmente ao longo do primeiro experimento, onde os mostos tinham concentrações de 12, 15 e 20% de ART. No segundo experimento, no qual se utilizou xarope de cana, a concentração de ART foi de 20%. Ao final de todos os ciclos mediu-se: o teor de etanol (% v/v) do vinho delevedurado, o peso da biomassa (g) e a viabilidade celular (%).

4.2.7 Determinação de biomassa

Os tubos de fundo cônico vazios foram pesados antes de iniciar os experimentos de fermentação com reciclo de células. Ao final de cada ciclo, após a separação dos vinhos, a biomassa úmida precipitada foi pesada (g), e por diferença de peso do tubo com e sem fermento, foi determinado o teor de biomassa úmida ao final de cada ciclo fermentativo.

4.2.8 Determinação de etanol

Foram transferidos 5 mL do vinho delevedurado para o interior de um microdestilador Kjeldahl (Piracicaba, Brasil). A partir da destilação por arraste de vapor, foi recolhido o material condensado em um balão volumétrico de 50 mL, até completar o volume. As amostras destiladas foram transferidas para um densímetro digital Anton-Paar DMA-48 (Graz, Áustria) para a estimativa do teor de etanol (% v/v). O valor gerado pelo densímetro foi multiplicado por 10 de modo a compensar a diluição ocorrida na etapa de destilação.

4.2.9 Determinação de viabilidade celular

A viabilidade celular foi estimada em porcentagem por microscopia óptica, em objetiva de 40x, por coloração diferencial de células, utilizando-se uma solução de eritrosina em tampão de fosfato. As células viáveis (não coradas) e as células não viáveis (coradas de rosa) foram contadas com auxílio de uma câmara de Neubauer. A viabilidade foi expressa em função da proporção de células viáveis sobre o total de células contadas (viáveis e não viáveis) (Oliveira et al., 1996).

4.2.10 Análises estatísticas

Foram realizadas análises de variância (ANOVA) e testes de comparação de médias de Tukey no software R. As médias referentes às repetições de cada tratamento foram consideradas diferentes ao nível de 5% de significância ($p < 0,05$).

4.3 Resultados e Discussão

4.3.1 Testes de crescimento em meio YNB com etanol

O principal objetivo dos testes, nos quais se empregou meio YNB contendo 10 e 12% de etanol (v/v), foi avaliar a influência da suplementação dos aminoácidos no crescimento da linhagem CAT-1 quando exposta aos níveis de etanol encontrados na indústria. De acordo com Basso et al. (2008) na indústria do etanol, o caldo ou o melaço de cana de açúcar, utilizados como substratos no processo, resultam em produções nas concentrações de etanol de 8-11% (v/v) dentro de um período de 6-11 horas a 32-35°C.

Os testes de crescimento (D.O. 600nm) em meio YNB suplementado com 200 mg.L⁻¹ de N amínico proveniente de aminoácido revelou que, quando o tratamento foi de 10% de

etanol (v/v), no período de 48 horas somente o ácido aspártico (0,760) conferiu maior crescimento em relação ao controle (0,713) sem a suplementação de aminoácido (controle 1) (Figura 1). No entanto, a análise estatística revelou que estes valores de D.O. final (Asp e controle 1) não representam diferenças significativas. Sendo assim, no teste com 10% de etanol, nenhum aminoácido conferiu maior crescimento em relação ao controle 1, sem a suplementação.

Neste mesmo meio, YNB, sem a adição de aminoácido e de etanol (controle 2), a linhagem CAT-1 apresentou uma D.O. de 0,881 no período de 48 horas (Figura 1). No que se refere a depreciação do crescimento, 11 aminoácidos conferiram menor crescimento em relação ao controle 1, sendo estes: Leu, Pro, His, Ile, Val, Tyr, Met, Lys, Thr, Gln e Cys. A suplementação com Cys causou um crescimento significativamente menor em relação a todos os outros aminoácidos e controles 1 e 2, sugerindo que possivelmente este aminoácido pode ter sido tóxico para a levedura nestas condições, uma vez que quase não houve crescimento após 48 horas (D.O. 0,012) (Figura 1).

Figura 1. Dados de D.O. (600nm) final e análises estatísticas da linhagem CAT-1 às 48 horas em meio YNB com 10% de etanol (v/v) e suplementação de aminoácidos (200 mg.L⁻¹ de N amínico). O Controle 1 refere-se a D.O. em meio YNB com 10% de etanol (v/v) sem a adição de aminoácido no mesmo período. O Controle 2 refere-se a D.O. em meio YNB sem a adição de etanol e aminoácido no mesmo período. Letras iguais não diferem ao nível de 5% de significância ($p < 0,05$), de acordo com o teste de Tukey. Análises estatísticas só foram calculadas para os tratamentos com etanol.

Por outro lado, quando o teor de etanol foi de 12% (v/v) no meio YNB, a suplementação de glicina (0,636) e de fenilalanina (0,588) incrementaram significativamente o crescimento em relação ao controle 1 (0,430) após 48 horas (Figura 2). A glicina é um aminoácido aquiral pequeno que desempenha um papel importante no metabolismo de carbono das células de levedura (Piper et al., 2000). Portanto, desempenha um papel importante no suporte a divisão celular (Wu 2009). As três rotas primárias de glicina são o metabolismo e a formação de serina via serina hidroximetiltransferase, a descarboxilação oxidativa através do sistema de clivagem da glicina (glicina sintase), e a formação de bases de nucleotídeos (Sinclair & Dawes, 1995). Tem sido proposto que a fenilalanina é necessária para o crescimento ótimo de *S. cerevisiae* em meios sintéticos (Hanscho et al., 2012; Crépin et al., 2012). Leveduras *S. cerevisiae* sintetizam fenilalanina e tirosina através do intermediário 4-hidroxifenilpiruvato e fenilpiruvato, respectivamente. A fenilalanina normalmente tem apenas três destinos metabólicos: incorporação em cadeias de polipéptidos; produção de tirosina através da hidroxilase de fenilalanina, que requer a tetrahidrobiopterina; e conversão para um álcool fusel. *S. cerevisiae* degrada os aminoácidos aromáticos (triptofano, fenilalanina e tirosina) e os aminoácidos de cadeia ramificada (valina, leucina e isoleucina) através da via de Ehrlich. Esta via consiste em 3 etapas: 1) desaminação do aminoácido para o ácido alfaceto correspondente; 2) descarboxilação do ácido alfaceto resultante do aldeído; e 3) redução do aldeído para formar o álcool de cadeia longa ou complexo correspondente, conhecido como álcool fusel ou óleo fusel (Braus, 1991). O óleo fúsel pode ser empregado como solvente na indústria de cosméticos e medicamentos, sendo sua principal aplicação na obtenção do álcool isoamílico para a síntese de acetato de amila ou isoamila (fixador para perfumes) (Güvenç et al., 2007).

Um estudo relatou que quando as células de uma linhagem pertencente à espécie *S. cerevisiae* foram expostas a 20% de etanol (v/v), durante 9 horas a 30°C, todas as células morreram. No entanto, 57% das células permaneceram viáveis quando a solução de etanol continha três aminoácidos: isoleucina, metionina e fenilalanina (Hu et al., 2005). Com base nas análises de composição de aminoácidos e fluidez de membrana citoplasmática, por meio de anisotropia de fluorescência, usando difenil-hexatrieno como sonda, revelou-se que o aumento da tolerância ao etanol nas células de levedura foi devido à incorporação dos aminoácidos suplementares nas membranas citoplasmáticas, o que possivelmente levou à maior capacidade de neutralizar o efeito de fluidização exercido pelo etanol.

Sem a adição de etanol e aminoácido, CAT-1 apresentou uma D.O. de 0,924 neste mesmo período. A suplementação com cisteína causou o mesmo padrão de comportamento encontrado no teste anterior com 10% de etanol (Figura 1), pois com 12% de etanol (v/v), a linhagem apresentou uma D.O. de 0,003 (Figura 2). Isto ressalta a possibilidade de que a cisteína pode ter sido tóxica para a linhagem nestas condições. De acordo com Ono et al. (1999), linhagens de *S. cerevisiae* possuem vários mecanismos regulatórios para evitar a sobreprodução de cisteína e é provável que esta seja tóxica para a célula por conter um grupo -SH (composto organossulfurado) altamente reativo. Segundo o autor, a adição de cisteína a uma concentração de 50 μM , isto é 0,700 mg.L^{-1} de N amínico, provocou retardo e diminuição no crescimento, comportamento este atribuível à baixa atividade de transporte e assimilação de sulfato.

A adição de valina no meio YNB com 12% de etanol também causou depreciação no crescimento, sendo que não houve diferenças entre valina (0,147) e cisteína no período de 48 horas. Derrick & Large (1993) sugerem que uma quantidade significativa de valina pode ser metabolizada por rotas diferentes da via de Ehrlich, possivelmente por meio da ação de desidrogenase de cetoácidos de cadeia ramificada. Tais autores sugerem que a quebra de valina requer mais energia, sendo que no estudo dos mesmos foi obtido um rendimento de crescimento significativamente menor de *S. cerevisiae* em meio com valina como única fonte de N. Vale ressaltar que nem todas as enzimas envolvidas no metabolismo de aminoácidos de cadeia ramificada em leveduras ainda foram identificadas, nem suas interações foram adequadamente compreendidas.

Em síntese, a adição dos aminoácidos Lys, His, Thr, Met, Ile, Val e Cys no meio YNB com 12% de etanol ocasionou uma diminuição significativa da D.O. (48 horas), em relação ao controle 1 (Figura 2). Ao verificar os dados revelados pelos testes com 10 e 12% de etanol (v/v), é possível sugerir que a suplementação com os diferentes aminoácidos pode causar comportamentos distintos, aumentando ou depreciando o crescimento, inclusive sob influência da concentração de etanol encontrada no meio YNB. Vale ressaltar que os aminoácidos não foram adicionados como única fonte de N no meio YNB. Sendo assim, os dados de crescimento aqui obtidos sofreram influência não somente da concentração de etanol fornecido, mas também do sulfato de amônio e ureia adicionados ao meio (0,1% e 0,05%, respectivamente).

Figura 2. Dados de D.O. (600nm) final e análises estatísticas da linhagem CAT-1 às 48 horas em meio YNB com 12% de etanol (v/v) e suplementação de aminoácidos (200 mg.L⁻¹ de N amínico). O Controle 1 refere-se a D.O. em meio YNB com 12% de etanol (v/v) sem a adição de aminoácido no mesmo período. O Controle 2 refere-se a D.O. em meio YNB sem a adição de etanol e aminoácido no mesmo período. Letras iguais não diferem ao nível de 5% de significância ($p < 0,05$), de acordo com o teste de Tukey. Análises estatísticas só foram calculadas para os tratamentos com etanol.

4.3.2 Testes de crescimento e determinação de nitrogênio assimilável em mosto de melaço de cana-de-açúcar

Os testes nos quais se empregou o mosto de melaço de cana-de-açúcar foram realizados para avaliar tanto a influência dos aminoácidos no crescimento da linhagem CAT-1 em mostos com diferentes concentrações, quanto selecionar uma concentração adequada para os ensaios fermentativos subsequentes. No entanto, foi necessário verificar a dosagem de nitrogênio assimilável, isto é, N amínico mais N amoniacal, a fim de determinar uma concentração adequada para a suplementação dos aminoácidos nos testes de crescimento em melaço. A determinação de N assimilável revelou uma concentração de 227 mg.L⁻¹ em mosto proveniente do melaço da usina São Manoel, com 10% de ART.

De acordo com Amorim et al. (1996), leveduras *S. cerevisiae* possuem um teor de N de 8%, com base na matéria seca, constituindo as moléculas de aminoácidos, proteínas, enzimas, ácidos nucleicos, purinas, pirimidinas, pigmentos respiratórios (citocromos), vitaminas, etc. Em meio YEPD (2% D-glicose, 1% de extrato de levedura e 1% de peptona bacteriológica) a levedura atinge uma biomassa úmida de cerca de 2%, isto significa que é

possível obter 20 g.L⁻¹ de biomassa úmida, ou 5 g.L⁻¹ de biomassa seca (25% da massa úmida). Portanto, 0,4 g.L⁻¹ de N correspondem a 5 g.L⁻¹ de biomassa seca, isto ao considerar que a levedura possui o teor de 8% de N, conforme descrito acima.

No crescimento aqui realizado, optamos por utilizar mostos de melaço de cana visando uma aproximação das condições encontradas nas destilarias brasileiras. Consideramos um teor final de 3% de biomassa úmida, e que para tal seria necessário 0,6 g.L⁻¹ de N. Sabendo que o mosto da usina São Manoel (10% de ART) possui 227 mg.L⁻¹ de N assimilável, e que a levedura precisa de 600 mg.L⁻¹ de N para crescer 3%, optamos por suplementar os mostos de melaço nos testes de crescimento com 200 mg.L⁻¹ de N amínico proveniente dos diferentes aminoácidos. Desta forma, seria possível concentrar o mosto, levando em consideração que se aumentarmos a concentração do mosto, também estaríamos aumentando a concentração de N. Além disso, segundo Amorim & Leão (2005), a utilização da concentração de N assimilável (NH₄⁺ e R-NH₂) recomendada em mostos no processo fermentativo é de 100-300 mg.L⁻¹.

O teste de crescimento empregando o mosto de melaço de cana com 15% de ART revelou que a suplementação com Val (1,323) promoveu crescimento significativamente maior em relação ao controle (D.O. 1,059), após 48 horas de crescimento. Embora a presença da cisteína também tenha ocasionado depreciação no crescimento (0,909) no mosto de melaço, os dados não revelaram diferenças estatísticas em relação ao controle no mesmo período (48h) (Figura 3A). Estes resultados permitem compreender que o meio utilizado pode alterar totalmente o efeito da suplementação, aumentando ou diminuindo o crescimento da linhagem testada. Ou seja, o efeito no crescimento promovido por um aminoácido pode ser alterado, isto porque tal efeito pode ter influência do meio. É importante destacar que, em *S. cerevisiae*, as vias metabólicas envolvidas na síntese e utilização dos aminoácidos envolvem muitas vezes a presença de outros aminoácidos, revelando um mecanismo complexo e intrincado (Ljungdahl & Daignan-Fornier, 2012). Segundo Clement et al. (2013), alterações metabólicas particulares podem ser desencadeadas de acordo com a natureza do aminoácido fornecido, além da resposta comum. A presença de alguns aminoácidos específicos pode favorecer a utilização de outros. Por exemplo, no presente estudo a suplementação com valina depreciou o crescimento em YNB com 10 e 12% de etanol (Figuras 1 e 2), e por outro lado, promoveu maior crescimento em mosto de melaço de cana com 15% de ART (Figura 3A).

Portanto, descrever os diferentes efeitos no crescimento, promovidos pelos aminoácidos em mosto de melaço, possivelmente ajudaria a responder quais aminoácidos poderiam surtir efeitos positivos ou até mesmo negativos para a fermentação. O crescimento

não é um fator primordial no tocante ao processo biotecnológico onde se emprega grande densidade de células, no entanto, é um indicativo de estresse em condições onde há pouca disponibilidade de oxigênio. Em condições microaeróbicas tais quais foram empregadas no presente trabalho (ensaios em microplacas), a linhagem pode apresentar menor crescimento, ou até mesmo nenhum, uma vez que o meio esteja promovendo efeitos deletérios para as células, como foi observado a partir da suplementação com Cys.

O teste de crescimento em mosto de melaço com 20% de ART revelou que a presença da cisteína depreciou significativamente o crescimento (D.O. 0,797) da linhagem CAT-1 no que se concerne ao controle sem a suplementação de aminoácido (D.O. 1,001) (Figura 3B). Os dados obtidos por todos os testes de crescimento aqui realizados apresentaram uma correlação no que diz respeito a suplementação com Cys. Tanto no meio YNB com 10 e 12% de etanol (% v/v) (Figuras 1 e 2), quanto em mosto de melaço com 20% de ART (Figura 3B), a linhagem CAT-1 apresentou crescimento significativamente menor quando suplementada com 200 mg.L⁻¹ de N amínico proveniente de Cys. Estes resultados enfatizam o trabalho de Ono et al. (1999), onde o mesmo ressaltou que é provável que a cisteína seja tóxica para a célula de *S. cerevisiae* devido à sua posse de um grupo -SH altamente reativo.

Em mosto com 20% de ART, nenhuma outra suplementação, além de Cys, revelou diferença significativa em relação ao controle. Possivelmente o aumento da concentração do mosto levou a uma maior concentração de N total assimilável pela levedura. Este aumento pode ter contribuído para a disponibilidade máxima de N assimilável necessária. Sendo assim, pode-se inferir que por este motivo não foram observadas diferenças significativas, no que se refere ao propósito de maior crescimento da linhagem CAT-1 em relação ao controle sem a suplementação de aminoácido. Foram avaliadas concentrações ainda maiores, de 25 e 30% de ART no mosto de melaço. Os resultados não revelaram diferenças significativas referente ao crescimento de CAT-1 sem e com a suplementação de 200 mg.L⁻¹ de N amínico proveniente de aminoácido (Figuras suplementares 1 e 2). Portanto, o aumento da concentração do mosto de melaço, a partir de 15% de ART, possivelmente pode propiciar menor influência da suplementação de aminoácidos no crescimento da linhagem CAT-1 nas condições aqui empregadas. Entretanto, além do crescimento, outros parâmetros podem ser avaliados para a verificação da interferência da presença dos aminoácidos durante a fermentação alcoólica, e até mesmo validar o seu possível emprego no processo. Os parâmetros produção de etanol e viabilidade celular, por exemplo, também são fundamentais para avaliar o efeito dos

diferentes aminoácidos na linhagem testada. Além disso, o teor de N da levedura com base na matéria seca é de 8%, porém em leveduras durante a fermentação alcoólica este teor é mais baixo, de 5-6% (Amorim et al., 1996). Portanto, nas fermentações posteriores com reciclo de células optamos por continuar a utilizar a concentração de 200 mg.L⁻¹ de N proveniente de aminoácidos, com a finalidade de avaliar os parâmetros de viabilidade celular e produções de biomassa e etanol.

A

B

Figura 3. Dados de D.O. (600nm) final e análises estatísticas da linhagem CAT-1 às 48 horas em mosto de melaço com 15% (A) e 20% (B) de ART e suplementação de aminoácidos (200 mg.L⁻¹ de N amínico). O controle refere-se a D.O. sem a adição de aminoácido no mesmo período. Letras iguais não diferem ao nível de 5% de significância (p<0,05)

4.3.3 Experimentos fermentativos com suplementação de aminoácidos e reciclo de células

4.3.3.1 Fermentações em mosto de melaço de cana-de-açúcar

A partir dos dados de D.O. obtidos pelos testes de crescimento em mosto de melaço (item 4.3.2), seis aminoácidos foram selecionados aleatoriamente dentre todos os que promoveram maior crescimento em relação ao controle, sem a suplementação de aminoácido, sendo eles: Ala, Arg, His, Lys, Ser e Val. Sete fermentações consecutivas foram realizadas a fim de verificar a influência da suplementação dos aminoácidos selecionados na viabilidade celular (%), produção de biomassa (g) e produção de etanol (% v/v), ao final de cada ciclo. A suplementação dos aminoácidos foi de 200 mg.L⁻¹ de N amínico, sendo que para todos os tratamentos com os diferentes aminoácidos, a biomassa inicial foi de 0,85 g (Figura 4).

Com relação à produção de biomassa úmida (g), não houve diferenças significativas nos dois primeiros ciclos, pois para todos os tratamentos, com e sem a suplementação, a linhagem CAT-1 apresentou uma média de 1,06 g nos ciclos 1 e 2 (Figura 4). Nos ciclos posteriores, 3, 4, 5, 6 e 7, a suplementação com Ala (1,17, 1,17, 1,19, 1,22 e 1,29 g) e His (1,17, 1,17, 1,17, 1,22 e 1,25 g) ocasionou crescimento significativamente maior em relação ao controle (1,03, 1,04, 1,04, 1,08 e 1,09 g) (Figura 4). A suplementação com Lys (1,15 e 1,19 g) também promoveu maior crescimento em relação ao controle nos ciclos 5 e 7. A presença de Arg, Ser e Val causou um crescimento significativamente igual ao controle em todos os ciclos fermentativos (Figura 4). Os dados de biomassa (g) demonstraram que a suplementação com Ala, His, e Lys estimulou maior crescimento da linhagem CAT-1 submetida em mosto de melaço de cana-de-açúcar.

Blomqvist et al. (2012) investigaram o efeito de diferentes aminoácidos sobre o número de gerações de uma espécie não-*Saccharomyces* (*Dekkera bruxellensis*) em meio sintético sob condições anaeróbicas. Neste estudo, corroborando os dados aqui obtidos, a suplementação com Ala (3,06), His (3,29) e Lys (3,51), também adicionada individualmente ao meio, aumentou significativamente o número de gerações da levedura em comparação com

Figura 4. Dados de produção de biomassa úmida (g) e análises estatísticas da linhagem CAT-1 em mosto de melaço de cana-de-açúcar com a suplementação de aminoácidos (200 mg.L⁻¹ de N amínico) ao final dos 7 ciclos fermentativos. O controle refere-se à biomassa (g) em mosto de melaço de cana-de-açúcar sem a suplementação de aminoácido. Letras iguais dentro do mesmo ciclo não diferem ao nível de 5% de significância ($p < 0,05$).

A produção de etanol (% v/v) foi igual para todos os tratamentos, com e sem aminoácidos. À medida que se adicionou sacarose, a partir do ciclo 4, o etanol também aumentou. Nos ciclos 1, 2 e 3, onde foram utilizados mostos com 12% de ART, para todas as suplementações e controle, observaram-se médias de produção de 6,34, 6,86 e 6,55% de etanol (v/v), respectivamente. Com o intuito de aumentar o estresse etanólico sem que ocorresse a concentração do melaço, foi adicionado 3% de sacarose no ciclo 4, e 5% de sacarose nos ciclos posteriores (5, 6 e 7). O objetivo de aumentar a produção de etanol foi ocasionar a diminuição do número de células viáveis e, deste modo, verificar se as diferentes suplementações de aminoácidos poderiam surtir efeitos na viabilidade da levedura. No ciclo 4, onde se empregou mosto com 15% de ART, a produção de etanol foi de 8,09% (v/v). Nos ciclos 5, 6 e 7, em mostos com 20% de ART, os diferentes tratamentos e controle apresentaram médias de produção de 10,31, 10,43 e 10,46% de etanol (v/v), respectivamente. Os dados de produção de etanol revelaram que nas condições em que o experimento foi conduzido, as diferentes suplementações não alteraram a produção de etanol em relação ao controle.

Em relação à viabilidade, a linhagem CAT-1 iniciou o primeiro ciclo com 100% de viabilidade para todas as suplementações e controle. Conforme esperado e acima mencionado, a adição de açúcar a partir do ciclo 3 ocasionou queda no número de células viáveis (Figura 5). Não houve diferenças significativas na viabilidade celular nos ciclos 1, 2 e 3, para todos os tratamentos as médias de viabilidade foram de 99,75, 99,53 e 98,80% (Figura 5). A suplementação com 200 mg.L⁻¹ de N amínico proveniente de Val apresentou valores de viabilidade de 93,14, 86,31, 75,51 e 61,01% nos ciclos 4, 5, 6 e 7, respectivamente, sendo estes valores significativamente menores em relação ao controle (99,64, 97,29, 90,81 e 78,82%) (Figura 5). A suplementação com Ser também ocasionou queda na viabilidade a partir do ciclo 3. No entanto, diferenças estatísticas somente foram observadas no último ciclo, onde este tratamento apresentou uma viabilidade de 64,83%, significativamente menor em comparação com o controle 78,82% (Figura 5). As suplementações com Ala (98,89 e

86,80%), His (99,41 e 99,10%) e Lys (98,18 e 86,94%) promoveram os maiores valores de viabilidade nos ciclos 6 e 7, em relação ao controle (90,81 e 78,82%) e aos outros tratamentos (Figura 5). O tratamento com His promoveu viabilidade significativamente maior em relação ao controle no ciclo 7, sendo que esta suplementação promoveu os maiores valores de viabilidade em relação a todos os outros tratamentos e controle nos dois últimos ciclos (6 e 7) (Figura 5). Em síntese, os dados obtidos pelo presente experimento de fermentação revelaram que a presença de 200 mg.L⁻¹ de N amínico proveniente de Ala, His e Lys promoveram maior acúmulo de biomassa de CAT-1 em melaço de cana-de-açúcar (Figuras 4 e 5). A suplementação com Arg se mostrou igual ao controle no que se refere aos parâmetros de viabilidade (%), produção de etanol (% v/v) e biomassa úmida (g) ao final de todos os sete ciclos (Figura 4 e 5). Isto sugere que a presença de Arg na concentração de 200 mg.L⁻¹ de N amínico, em meio proveniente de mosto de melaço da usina São Manoel, não surtiu efeitos nos principais parâmetros fermentativos analisados.

Figura 5. Dados de viabilidade (%) e análises estatísticas da linhagem CAT-1 em mosto de melaço de cana-de-açúcar com a suplementação de aminoácidos (200 mg.L⁻¹ de N amínico) ao final dos 7 ciclos fermentativos. O controle refere-se à viabilidade (%) em mosto de melaço de cana-de-açúcar sem a suplementação de aminoácido. Letras iguais dentro do mesmo ciclo não diferem ao nível de 5% de significância ($p < 0,05$)

Segundo Jones & Fink (1982), em condições apropriadas, com carbono e NH_4^+ suficientemente disponíveis, leveduras podem sintetizar todos os L-aminoácidos. As famílias de aminoácidos derivados de uma molécula comum são facilmente identificáveis e incluem a família glutamato (glutamato, glutamina, arginina, prolina e lisina); a família aromática (fenilalanina, tirosina e triptofano); a família serina (serina, glicina, cisteína e metionina); a família aspartato (aspartato, asparagina, treonina e os aminoácidos que contêm enxofre cisteína e metionina); e a família dos piruvatos (alanina e aminoácidos ramificados valina, leucina e isoleucina). As vias de biossíntese de histidina e nucleotídeos estão conectadas. A importância do glutamato e da glutamina nas reações do núcleo central no metabolismo do nitrogênio é evidente, destacando seu envolvimento nas reações de transaminação necessárias na síntese de cada aminoácido (Magasanik & Kaiser, 2002; Ljungdahl & Daignan-Fornier, 2012).

Com relação à suplementação de aminoácidos na fermentação alcoólica, leveduras tendem a acumular o aminoácido fornecido e aqueles intimamente relacionados com ele metabolicamente, sendo que, uma concentração relativamente alta de ácido glutâmico é mantida na célula, independentemente da fonte de nitrogênio fornecida, refletindo o papel central do ácido glutâmico no metabolismo do nitrogênio (Watson, 1976). No estudo de Pham & Wright (2008), a suplementação com uma mistura completa de aminoácidos (*Complete Supplement Mixture of Sunrise Science Products*) levou a respostas celulares positivas de *S. cerevisiae*, incluindo a redução do tempo de latência e maior viabilidade celular, em meios contendo alta concentração de açúcar ($>200 \text{ g.L}^{-1}$ de glicose). Além disso, verificou-se rendimentos de etanol aumentados (0,43 e 0,45 g de etanol por g de glicose) a partir da suplementação. Neste mesmo estudo, por meio de análise proteômica quantitativa, utilizada para entender como *S. cerevisiae* suplementada com aminoácidos responde a condições de estresse osmótico, a maioria das proteínas envolvidas nas rotas da glicólise e pentoses fosfato tiveram suprarregulação (*upregulation*) em alta concentração de açúcar. A ativação do metabolismo de aminoácidos foi observada no final da fase Lag. A abundância relativa das proteínas mais identificadas, incluindo proteínas de biossíntese de aminoacil-tRNA (RNA transportador ligado a um aminoácido) e proteínas de choque térmico, permaneceu inalterada nas horas imediatamente após a adição da glicose. No entanto, a expressão dessas proteínas aumentou significativamente no final da fase Lag. Além disso, também se verificou a suprarregulação das proteínas de biossíntese de trealose e glicogênio. Esses dados,

combinados com as medições relevantes dos metabólitos, demonstram que a partir da suplementação de aminoácidos é possível obter melhoria na fermentação alcoólica de meios com alta concentração de glicose por *S. cerevisiae*.

4.3.3.2 Fermentações em mosto de xarope de cana-de-açúcar

O xarope de cana-de-açúcar também pode ser utilizado em destilarias brasileiras e é constituído de menor quantidade de nutrientes e fonte de nitrogênio em comparação com o melaço. Mais frequentemente vem a ser a concentração do caldo de cana para se aumentar o teor de ART, sendo que tal substrato se assemelha ao xarope convenientemente diluído para a fermentação. Por este motivo, também foram realizadas fermentações em mosto de xarope a fim de avaliar a influência da suplementação de aminoácidos (200 mg.L⁻¹ de N amínico) nos principais parâmetros da fermentação: biomassa (g), etanol (% v/v) e viabilidade celular (%). Neste ensaio fermentativo, em apenas três ciclos já foram verificadas diferenças significativas em relação à produção de biomassa e viabilidade nos diferentes tratamentos com aminoácidos. Tais diferenças possivelmente foram observadas por ter sido empregado mosto de xarope a uma concentração de 20% desde o primeiro ciclo, para que fosse possível obter teores mais elevados de etanol e, por conseguinte, ocasionar uma diminuição do número de células viáveis. A partir dos dados obtidos pelo experimento fermentativo anterior, no qual se empregou mosto de melaço de cana-de-açúcar, foram selecionados os aminoácidos Ala, Lys e His, por terem favorecido a linhagem CAT-1 em relação ao crescimento e a viabilidade (item 4.3.3.1). Os aminoácidos Asn, Glu e o Trp também foram selecionados para a fermentação em xarope de cana, pois a presença dos mesmos aumentou o crescimento de CAT-1 nos ensaios em microplacas, tanto em meio YNB com 12% (v/v) de etanol (Figura 2), quando em mosto de melaço com 15% de ART (Figura 3A). Além disso, o Trp e o Glu são aminoácidos bastante citados na literatura por promoverem crescimento e resistência a diferentes tipos de estresse em *S. cerevisiae* (Hirasawa et al., 2007; Yoshikawa, et al., 2009; Godin et al., 2016; Thomas & Ingledew, 1990; Ter-Schure et al., 1998; Wu et al., 2013).

Em todos os tratamentos a linhagem CAT-1 iniciou a primeira fermentação com 0,76 g de biomassa úmida, coletada da etapa de propagação. Já no primeiro ciclo, a suplementação com His (1,04 g) ocasionou um crescimento significativamente maior do que o controle (0,92 g) e os demais tratamentos analisados (Figura 6). A presença de Lys (0,98 g) também promoveu crescimento significativamente maior do que o controle e não diferiu em relação a

Ala (0,94) e Trp (0,95). No primeiro ciclo, Asn, Glu, Ala e Trp não diferiram do controle, sem a suplementação, em relação à produção de biomassa em mosto de xarope de cana (Figura 6).

No segundo e terceiro ciclo a presença de His no xarope também promoveu maior crescimento (1,14 e 1,18 g) em comparação com o controle (1,06 e 1,06 g) e os demais tratamentos (Figura 6). Embora o glutamato tenha sido descrito na literatura como provedor de crescimento em leveduras *S. cerevisiae*, em mosto de xarope nas condições aqui descritas, o mesmo não ocasionou maior crescimento em relação ao controle em nenhum dos ciclos.

No ciclo 2, as suplementações com Glu, Ala, Asn e Trp apresentaram 0,97, 0,99, 1,03 e 1,03 g de biomassa, respectivamente, sendo estes valores significativamente menores do que o controle. A suplementação com Lys (1,05 g) não diferiu do controle com relação à produção de biomassa no segundo ciclo fermentativo (Figura 6).

No terceiro e último ciclo, além da His ter promovido maior crescimento significativamente, a presença de Asn (1,11 g) também demonstrou maior produção significativa de biomassa úmida em relação ao controle. A suplementação com o Glu (0,97 g) apresentou menor acúmulo de biomassa em relação a todos os outros tratamentos no último ciclo. Os aminoácidos Lys (1,04 g), Ala (1,01) e Trp (1,08) demonstraram acúmulos de biomassa similares ao controle, no ciclo 3 (Figura 6).

Em síntese, a presença de His e Asn, em fermentações de xarope de cana, promoveu maior crescimento da linhagem CAT-1. Os dados de produção de biomassa sugerem que embora His também tenha favorecido CAT-1 em fermentações de mosto de melaço, não há um padrão para o efeito dos tratamentos com os aminoácidos testados. Isto porque, outros aminoácidos (Ala e Lys) apresentaram maior produção de biomassa em mosto de melaço em comparação com o controle, e por outro lado, apresentaram resultados similares ao controle no mosto de xarope de cana. Ou seja, ao alterar o mosto, com fonte de minerais e N diferentes, possivelmente também se modifica o efeito dos aminoácidos, alterando o perfil fisiológico da levedura. Não obstante, His promoveu maior crescimento da linhagem CAT-1 em ambos os mostos aqui testados.

Figura 6. Dados de produção de biomassa úmida (g) e análises estatísticas da linhagem CAT-1 em mosto de xarope de cana-de-açúcar com a suplementação de aminoácidos (200 mg.L⁻¹ de N amínico) ao final dos 3 ciclos fermentativos. O controle refere-se à biomassa (g) em mosto de melaço de cana-de-açúcar sem a suplementação de aminoácido. Letras iguais dentro do mesmo ciclo não diferem ao nível de 5% de significância ($p < 0,05$).

As análises de produção de etanol (% v/v) não revelaram diferenças significativas para os diferentes tratamentos com aminoácidos e o controle sem a suplementação. As médias de produção, considerando todos os aminoácidos e controle, para os ciclos 1, 2 e 3 são de 11,61, 13,38 e 13,71% de etanol (v/v).

Com relação à viabilidade celular, todos os tratamentos, com e sem aminoácido, iniciaram a primeira fermentação em xarope com 100% de viabilidade. Ao contrário das fermentações em mosto de melaço de cana, a suplementação com Ala em xarope diminuiu a viabilidade celular de CAT-1 em todos os três ciclos: 90,67% no primeiro, 78,67% no segundo e 77,00% no terceiro (Figura 7). Este dado enfatiza a possibilidade de que os aminoácidos possam atuar de maneiras distintas de acordo com o mosto/meio utilizado.

No terceiro ciclo, a presença dos aminoácidos Trp (98,50), Asn (98,50) e His (95,00) apresentaram valores de viabilidade significativamente maiores em relação ao controle (86,00%) (Figura 7). A presença de Glu, mesmo que tenha apresentado menor acúmulo de biomassa (Figura 6), apresentou o valor de viabilidade de 85,50%, similar ao controle no

último ciclo (Figura 7). A suplementação com Lys (88,40%) também não diferiu do controle no quesito viabilidade de células.

Em mosto de xarope, a suplementação com His e Asn favoreceu a linhagem em relação ao crescimento e viabilidade. No último ciclo, mesmo que a presença de Trp não tenha aumentado a produção de biomassa, favoreceu a linhagem para a maior viabilidade em fermentações de xarope nas condições aqui empregadas.

Figura 7. Dados de viabilidade (%) e análises estatísticas da linhagem CAT-1 em mosto de xarope de cana-de-açúcar com a suplementação de aminoácidos (200 mg.L^{-1} de N amínico) ao final dos 3 ciclos fermentativos. O controle refere-se à viabilidade (%) em mosto de melaço de cana-de-açúcar sem a suplementação de aminoácido. Letras iguais dentro do mesmo ciclo não diferem ao nível de 5% de significância ($p < 0,05$)

4.4 Conclusões

A concentração de 200 mg.L^{-1} de nitrogênio amínico, utilizada nos diferentes tratamentos com aminoácidos, em meio YNB e em mostos de melaço e xarope de cana, foi eficaz para o intuito de diferenciar comportamentos fisiológicos da linhagem CAT-1. A partir dos dados obtidos - tanto pelos testes de crescimento em microplacas, quanto pelas fermentações com reciclo de células - é possível afirmar que a suplementação com aminoácidos pode ocasionar efeitos distintos no comportamento fisiológico da levedura CAT-1

de acordo com o meio/mosto empregado. Isto porque, alterando o meio verificou-se uma mudança comportamental em relação ao crescimento e viabilidade da linhagem para a maioria dos aminoácidos testados. Possivelmente, isto se deve ao fato de que os aminoácidos possuem vias metabólicas complexas, compreendendo um mecanismo intrincado, muitas vezes dependendo da presença de outros para que ocorra a sua assimilação/metabolização. Embora este comportamento tenha sido observado para a maior parte dos aminoácidos aqui testados, a suplementação com His apresentou um padrão de comportamento, favorecendo a linhagem CAT-1 para maior crescimento e viabilidade em mostos provenientes tanto de melaço quanto de xarope de cana-de-açúcar. Todos estes dados sugerem que a suplementação com His poderia ser uma potencial fonte de N ou uma molécula protetora aos estresses encontrados em fermentações de mostos de melaço e xarope de cana. Em síntese, os dados revelados pelo presente estudo revelaram que: em meio YNB com 12% de etanol (v/v), a suplementação com Gly e Phe incrementou o crescimento da linhagem em relação ao controle. Por outro lado, a suplementação de Val e Cys no meio YNB com 10 e 12% de etanol (v/v) causou depreciação no crescimento da linhagem CAT-1. A presença de Cys também depreciou o crescimento de CAT-1 em mosto de melaço de cana com 20% de ART, nos ensaios em microplacas. Nas fermentações com reciclo em mosto de melaço, além de His, os aminoácidos Ala e Lys aumentaram o acúmulo de biomassa em relação ao controle. A suplementação com Val e Ser apresentaram os menores resultados de viabilidade em mosto de melaço, nas fermentações com reciclo. Em mosto de xarope, o Glu promoveu menor crescimento em relação ao controle, no entanto, apresentou viabilidade similar. A presença de Trp e Asn, além de His, também apresentou os maiores valores de viabilidade em xarope de cana. Neste mesmo mosto (xarope), Asn e His também promoveram valores de produção de biomassa maiores em relação a todos os outros tratamentos, com e sem aminoácido. Os resultados revelados pelo presente estudo apontam que a suplementação de 200 mg.L⁻¹ de N amínico proveniente de alguns aminoácidos, em mostos de melaço e xarope de cana, pode favorecer ou depreciar o crescimento e viabilidade da linhagem CAT-1 em fermentações simulando as condições industriais brasileiras, com reciclo de células.

4.5 Figuras suplementares

Figura suplementar 1. Dados de D.O. final da linhagem CAT-1 às 72 horas em mosto de melão com 25% de ART e suplementação de aminoácidos (200 mg.L⁻¹ de N amínico). O controle refere-se a D.O. sem a adição de aminoácido no mesmo período. A análise de comparação de médias de Tukey (p<0,05) revelou que não há diferenças significativas entre os diferentes tratamentos com aminoácidos e o controle

Figura suplementar 2. Dados de D.O. final da linhagem CAT-1 às 72 horas em mosto de melão com 30% de ART e suplementação de aminoácidos (200 mg.L⁻¹ de N amínico). O controle refere-se a D.O. sem a adição de aminoácido no mesmo período. A análise de comparação de médias de Tukey (p<0,05) revelou que não há diferenças significativas entre os diferentes tratamentos com aminoácidos e o controle

Referências

- Albers, E.; Larsson, C.; Lidén, G.; Niklasson, C.; Gustafsson, L. Influence of the nitrogen source on *Saccharomyces cerevisiae* anaerobic growth and product formation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n. 9, p. 3187-3195, 1996.
- Amorim, H.V.; Basso, L.C.; Alves, D.M.G. **Processos de produção de álcool: controle e monitoramento**. Piracicaba, FERMENTEC, 1996. 103p.
- Amorim, H.V.; Leão, R.M. **Fermentação alcoólica: ciência e tecnologia**. Piracicaba, FERMENTEC, 2005. 448p.
- Badotti, F.; Dário, M.G.; Alves, S.L.Jr.; Cordioli, M.L.; Miletto, L.C.; de Araujo, P.S.; Stambuk, B.U. Switching the mode of sucrose utilization by *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbial Cell Factories**, v. 7, n. 4, p. 1-11, 2008.
- Barton-Wright, E.C.; Thorne, R.S.W. Utilization of amino acids during yeast growth in wort. **Journal of The Institute of Brewing**, v. 55, n. 6, p. 383-386, 1949.
- Basso, L.C.; Amorim, H.V. Produção de etanol. In: Lima, U.A. (Ed.). **Biotecnologia industrial: processos fermentativos e enzimáticos**. Edgard Blucher, 2001, cap. 1, p. 1-43.
- Basso, L.C.; Amorim, H.V.; Oliveira, A.J.; Lopes, M.L. Yeast selection for fuel ethanol in Brazil. **FEMS Yeast Research**, v. 8, n. 7, p. 1155-1163, 2008.
- Basso, L.C.; Basso, T.O.; Rocha, S.N. Ethanol production in Brazil: the industrial process and its impact on yeast fermentation. In: SANTOS BERNARDES, M.A. (Ed.). **Biofuel Production - Recent Developments and Prospects**. InTech, 2011, chap. 5, p. 85-100.
- Blomqvist, J.; Nogué, V.S.; Gorwa-Grauslund, M.; Passoth, V. Physiological requirements for growth and competitiveness of *Dekkera bruxellensis* under oxygen-limited or anaerobic conditions. **Yeast**, v. 29, n. 7, p. 265-274, 2012.
- Braus, G.H. Aromatic amino acid biosynthesis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: a model system for the regulation of a eukaryotic biosynthetic pathway. **Microbiological Reviews**, v. 55, n. 3, p. 349-370, 1991.
- Chen, J.C.P. Analysis of juice. In: Chen, J.C.P.; Chou, C.C. (Eds.). **Cane Sugar Handbook - A Manual for Cane Sugar Manufacturers and Their Chemists**. John Wiley & Sons Inc, 1993, cap. 42, p. 931-940.
- Clement, T.; Perez, M.; Mouret, J.R.; Sanchez, I.; Sablayrolles, J.M.; Camarasa, C. Metabolic responses of *Saccharomyces cerevisiae* to valine and ammonium pulses during four-stage continuous wine fermentations. **Applied Environmental Microbiology**, v. 79, n. 8, p. 2749-2758, 2013.
- Crépin, L.; Nidelet, T.; Sanchez, I.; Dequin, S.; Camarasa, C. Sequential use of nitrogen compounds by *saccharomyces cerevisiae* during wine fermentation: a model based

on kinetic and regulation characteristics of nitrogen permeases. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 22, p. 8102-8111, 2012.

Dawson, P.S.S. The Intracellular amino acid pool of *Candida utilis* during growth in batch and continuous flow cultures. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 3, p. 51-66, 1965.

Derrick, S.; Large, P.J. Activities of the enzymes of the Ehrlich pathway and formation of branched-chain alcohols in *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida utilis* grown in continuous culture on valine or ammonium as sole nitrogen source. **Journal of General Microbiology**, v. 139, n. 11, p. 2783-2792, 1993.

Filipe-Ribeiro, L.; Mendes-Faia, A. Validation and comparison of analytical methods used to evaluate the nitrogen status of grape juice. **Food Chemistry**, v. 100, n. 3, p. 1272-1277, 2007.

García-Campusano, F.; Anaya, V.H.; Robledo-Arratia, L.; Quezada, H.; Hernández, H.; Riego, L.; González, A. ALT1-encoded alanine aminotransferase plays a central role in the metabolism of alanine in *Saccharomyces cerevisiae*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 55, n. 4, p. 368-374, 2009.

Godin, S.K.; Lee, A.G.; Baird J.M.; Herken, B.W.; Bernstein, K.A. Tryptophan biosynthesis is important for resistance to replicative stress in *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, v. 35, n. 5, p. 183-189, 2016.

Güvenç, A.; Kapucu, N.; Kapucu, H.; Aydoğan, Ö.; Mehmetoğlu, Ü. Enzymatic esterification of isoamyl alcohol obtained from fusel oil: Optimization by response surface methodology. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, n. 4, p. 778-785, 2007.

Hansch, M.; Ruckerbauer, D.E.; Chauhan, N.; Hofbauer, H.F.; Krahulec, S.; Nidetzky, B.; Kohlwein, S.D.; Zanghellini J.; Natter, K. Nutritional requirements of the BY series of *Saccharomyces cerevisiae* strains for optimum growth. **FEMS Yeast Research**, v. 12, n. 7, p. 796-808, 2012.

Hirasawa, T; Yoshikawa, K.; Nakakura, Y.; Nagahisa, K.; Furusawa, C.; Katakura, Y.; Shimizu, H.; Shioya, S. Identification of target genes conferring ethanol stress tolerance to *Saccharomyces cerevisiae* based on DNA microarray data analysis. **Journal of Biotechnology**, v. 131, n. 1, p. 34-44, 2007.

Hu, C.K.; Bai, F.W.; An, L.J. Protein amino acid composition of plasma membranes affects membrane fluidity and thereby ethanol tolerance in a self-flocculating fusant of *Schizosaccharomyces pombe* and *Saccharomyces cerevisiae*. **Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao**, v. 21, n. 5, p. 809-813, 2005.

Jeronimo, E.M.; Souza, E.L.R.; Silva, M.A.; Cruz, J.C.S.; Gava, G.J.C.; Serra, G.E. Isolado protéico de soja como fonte de nitrogênio na fermentação alcoólica. **Boletim Ceppa**, v.26, n.1, p. 21-28, 2008.

Jones, E.W.; Fink G.R. Regulation of amino acid and nucleotide biosynthesis in yeast. In: Strathern, J.N.; Jones, E.W.; Broach, J.R. (Eds.). **The Molecular Biology of the Yeast *Saccharomyces*: Metabolism and Gene Expression**. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1982, cap. 5, p. 181-299.

Kalmokoff, M.L; Ingledew, W.M. Evaluation of ethanol tolerance in selected *Saccharomyces* strains. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, v. 43, p. 190-196, 1985.

Ljungdahl, P.O. Amino-acid-induced signalling via the SPS-sensing pathway in yeast. **Biochemical Society Transactions**, v. 37, p. 242-247, 2009.

Ljungdahl, P.O.; Daignan-Fornier, B. Regulation of amino acid, nucleotide, and phosphate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. **Genetics**, v. 190, n. 3, p. 885-929, 2012.

Lopes, M.L.; Paulillo, S.C.L.; Godoy, A.; Cherubin, R.A.; Lorenzi, M.S.; Giometti, F.H.C.; Bernardino, C.D.; Amorim-Neto, H.B.; Amorim, H.V. Ethanol production in Brazil: a bridge between science and industry. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47S, p. 64-76, 2016.

Magasanik, B.; Kaiser, C.A. Nitrogen regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. **Gene**, v. 290, n. 1-2, p. 1-18, 2002.

Morita, Y.; Nakamori, S.; Takagi, H. Effect of proline and arginine metabolism on freezing stress of *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 94, n. 5, p. 390-394, 2002.

Oliveira, A.J.; Gallo, C.R.; Alcarde, V.E.; Godoy, A.; Amorim, H.V. **Métodos para o controle microbiológico na produção de álcool e açúcar**. Piracicaba: FERMENTEC/FEALQ/ESALQ-USP, 1996. 89p.

Ono, B.I.; Hazu, T.; Yoshida, S.; Kawato, T.; Shinoda, S.; Brzvwczy, J.; Paszewski, A. Cysteine biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*: a new outlook on pathway and regulation. **Yeast**, v. 15, n. 13, p. 1365-1375, 1999.

Peters, D. Carbohydrates for fermentation. **Biotechnology Journal**, v. 1, n. 7-8, p. 806-814, 2006.

Pham, T.K.; Wright, T.K. The proteomic response of *Saccharomyces cerevisiae* in very high glucose conditions with amino acid supplementation. **Journal of Proteome Research**, n. 7, p. 4766-4774, 2008.

Piper, M.; Hong, S.; Ball, G.; Dawes, I. Regulation of the balance of one-carbon metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 40, p. 30987–30995, 2000.

Schlösser, T.; Gätgens, C.; Weber, U.; Stahmann, K.P. Alanine: glyoxylate aminotransferase of *Saccharomyces cerevisiae*-encoding gene AGX1 and metabolic significance. **Yeast**, v. 21, n. 1, p. 63-73, 2004.

Sinclair, D.; Dawes, I. Genetics of the synthesis of serine from glycine and the utilization of glycine as sole nitrogen source by *Saccharomyces cerevisiae*. **Genetics**, v. 140, n. 4, p. 1213–1222, 1995.

Takagi, H.; Iwamoto, F.; Nakamori, S. Isolation of freeze-tolerant laboratory strains of *Saccharomyces cerevisiae* from proline-analogue-resistant mutants. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 47, n. 4, p. 405-411, 1997.

Takagi, H. Proline as a stress protectant in yeast: physiological functions, metabolic regulations, and biotechnological applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 81, n. 2, p. 211-223, 2008.

Ter-Schure, E.G.; Silljé, H.H.; Vermeulen, E.E.; Kalhorn, J.W.; Verkleij, A.J.; Boonstra, J.; Verrips, C.T. Repression of nitrogen catabolic genes by ammonia and glutamine in nitrogen-limited continuous cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiology**, v. 144, n. 5, p. 1451-1462, 1998.

Thomas, K.C.; Ingledew, W.M. Fuel alcohol production: effects of free amino nitrogen on fermentation of very-high-gravity wheat mashes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 57, n. 7, p. 2046-2050, 1990.

Tropea, A.; Wilson, D.; Cicero, N.; Potorti, A.G.; La Torre, G.L.; Dugo, G.; Richardson, D.; Waldron, K.W. Development of minimal fermentation media supplementation for ethanol production using two *Saccharomyces cerevisiae* strains. **Natural Product Research**, v. 30, n. 9, p. 1009-1016, 2016.

Watson, T.G. Amino-acid pool composition of *Saccharomyces cerevisiae* as a function of growth rate and amino-acid nitrogen source. **Journal of General Microbiology**, v. 96, n. 2, p. 263-268, 1976.

Woiciechowski, A.L.; Carvalho, J.C.; Spier, M.R.; Soccol, C. Emprego de resíduos agroindustriais em bioprocessos alimentares. In: Bicas, J.L.; Maróstica, M.R.; Pastore, G.M. (Eds.). **Biotecnologia de alimentos**. Atheneu Editora, 2013, cap. 6, p. 143-171.

Wu, G. Amino acids: metabolism, functions, and nutrition. **Amino Acids**, v. 37, n. 1, p. 1–17, 2009.

Wu, Z.; Song, L.; Liu, S.Q.; Huang, D. Independent and additive effects of glutamic acid and methionine on yeast longevity. **PLoS One**, v. 8, n. 11, p. 1-13, 2013.

Yoshikawa, K.; Tanaka, T.; Furusawa, C.; Nagahisa, K.; Hirasawa, T.; Shimizu, H. Comprehensive phenotypic analysis for identification of genes affecting growth under ethanol stress in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Yeast Research**, v. 9, n. 1, p. 32-44, 2009.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Ambos os trabalhos aqui realizados tiveram um objetivo em comum: por meio de abordagens diferentes buscou-se aumentar a tolerância da linhagem CAT-1 para suportar os fatores de estresse encontrados no processo industrial brasileiro.

Com relação ao primeiro trabalho, onde foram avaliadas linhagens de *S. cerevisiae* com modificação genética, somente a linhagem ATT-6, com o gene *MSN2* sobre-expresso (na versão truncada) dentre as três analisadas, apresentou parâmetros favoráveis para o objetivo proposto no presente estudo. O nível de sobre-expressão ou o método de modificação genética pôde promover comportamentos fisiológicos diferentes nas linhagens em relação à linhagem parental, nas condições aqui empregadas. A linhagem ATT-6 apresentou maior velocidade de fermentação, consumo de açúcares e produção de etanol, nos ciclos fermentativos com aumentos drásticos da concentração de ART do mosto de melaço. ATT-6 também apresentou viabilidade maior que a parental CAT-1 nos testes de crescimento em microescala em mosto de melaço com concentrações de ART elevadas (27 e 33%, p/v). É possível inferir que ATT-6 foi melhorada principalmente para responder situações de estresse osmótico, uma vez que apresentou viabilidade maior ou estável nas maiores concentrações de ART em mosto de melaço testadas. A linhagem ANT-5 se mostrou similar a parental na maior parte dos parâmetros fermentativos analisados, o que leva a hipotetizar que o nível de sobre-expressão não tenha sido suficiente para surtir efeitos fisiológicos nas fermentações com reciclo de células. Além disso, ANT-5 se mostrou mais sensível ao estresse etanólico em meio YEPD. A linhagem NAB-1, com o gene *TRP1* sobre-expresso, se mostrou mais sensível nos testes em que foram analisadas diferentes concentrações de ART e etanol, em comparação com as outras linhagens avaliadas. Nos experimentos com ciclos de células, NAB-1 foi similar a parental na maioria dos parâmetros, e em meio YEPD com 8% (v/v) de etanol, mostrou um crescimento significativamente maior. Isto indica que a biossíntese de triptofano pode ter favorecido a linhagem a crescer mais em meio YEPD com este nível de etanol. Entretanto, em concentrações de ART elevadas e de etanol maiores que 8%, a linhagem (NAB-1) se mostrou mais sensível, sugerindo que tal modificação genética não foi eficiente para o objetivo proposto.

No segundo trabalho, onde se avaliou a presença dos aminoácidos na fermentação, foi possível afirmar que a influência dos mesmos sob a linhagem CAT-1 pode ser totalmente modificada de acordo com o meio fornecido. Além disso, a concentração de 200 mg.L⁻¹ de N

amínico foi eficiente para selecionar os aminoácidos que promoveram maior crescimento e viabilidade para a levedura. A suplementação com histidina se mostrou a mais promissora para o aumento da tolerância da linhagem industrial CAT-1 em fermentação de mosto de melaço e xarope de cana-de-açúcar, empregando a reciclagem de células.

Os resultados obtidos pelos experimentos referentes aos dois trabalhos revelaram que é possível aumentar a tolerância da linhagem industrial CAT-1 frente aos fatores estressantes da fermentação de mostos derivados de cana-de-açúcar por meio dos métodos aqui empregados.