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

**Melhoramento de leveduras para fermentação com alto teor
alcoólico mediante hibridação e evolução adaptativa**

Natalia Alexandrino

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestre em Ciências. Área de concentração:
Microbiologia Agrícola

**Piracicaba
2012**

Natalia Alexandrino
Licenciada em Ciências Biológicas

**Melhoramento de leveduras para fermentação com alto teor alcoólico mediante
hibridação e evolução adaptativa**

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

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

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestre em Ciências. Área de concentração:
Microbiologia Agrícola

Piracicaba
2012

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - ESALQ/USP**

Alexandrino, Natalia

Melhoramento de leveduras para fermentação com alto teor alcoólico mediante hibridação e evolução adaptativa / Natalia Alexandrino.- - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2012.

101 p: il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2012.

1. Etanol 2. Evolução adaptativa 3. Fermentação alcoólica 4. Leveduras 5. Hibridação
I. Título

CDD 661.82
A382m

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

DEDICATÓRIA

Aos meus queridos pais, Rosângela e Pedro;

Aos meus irmãos Victor e Paloma;

E ao meu amor Marcos

DEDICO

*“Para que um grande sonho se torne realidade, você precisa primeiro de um grande sonho.”
(Hans Seyle).*

AGRADECIMENTOS

Gostaria primeiramente de agradecer a Deus pela minha família maravilhosa, pelos meus amigos, pelo meu namorado e por me iluminar e guiar meus caminhos. Por me fazer paciente nas horas que precisei e por me dar força para continuar nessa grande jornada da vida.

Obrigada pai e mãe pelo carinho, dedicação e confiança em mim, por tantas vezes dizerem se orgulhar, pois não há preço que pague esse grande incentivo e com certeza é o que me faz ser realizada e feliz.

Obrigada Pizinha, minha amigona, minha querida e minha especial e essencial irmã;

Obrigada Vi pelas risadas e pelos beijinhos na cabeça;

Obrigada amorZildo por tudo que faz por mim, pelo enorme esforço em querer me agradar sempre, por me fazer feliz e por fazer com que eu me sinta amada, por me apoiar e pela incrível companhia. TE AMO!

Gostaria também de agradecer:

Meu orientador Luiz Carlos Basso, pela confiança, dedicação, oportunidade e pelos grandes conhecimentos transmitidos;

O maior incentivador da minha vida profissional, Beto, obrigada por acreditar em mim, por confiar e fazer com que eu me sinta uma pessoa competente. Obrigada também pelos conselhos pessoais e profissionais e por ser meu grande amigo e eterno chefinho.

A minha pequena grande família: Minhas avós Paqueta e Elza, minhas tias Nívea, Roselayne e Sueli, meus tios Ricardo, Marcus e Mário e meus primos Letícia, Larissa, Kauê, Emely, Renan e Larissa.

As minhas queridas amigas de trabalho pelos longos cafés, longas conversas, fofocas, saídas, ajudas e pela companhia diária completamente

harmoniosa e deliciosa: Renata, Nara, Stefania, Camila, Elisa, Juliana, Thalita e Elisângela.

Ao amigo Cometa pela amizade, risadas, pelo bom humor diário, pela alegria contagiante e pela ajuda prestada.

A minha sogra Inês e sua linda família incluindo Regina, Gu, Jú, Marcela e Wagner.

Ao CNPq, na pessoa do Prof. Gonçalo Amarante Guimarães Pereira, Coordenador do Projeto intitulado “Rede Nacional de Pesquisa em Leveduras. Prospecção, Biologia de Sistemas, Domesticação e desenvolvimento de cepas para a fermentação industrial no Brasil”, Proc. 560696/2010-8, referente ao edital CNPq 27/2010, pelo auxílio financeiro.

Ao CNPq, na pessoa do Prof. Carlos Augusto Rosa, Coordenador do Projeto intitulado “Biodiversidade de Leveduras Brasileiras aplicada à produção de Biocombustíveis”, Proc. 560715/2010-2, referente ao edital CNPq 27/2010, pelo auxílio financeiro.

Ao CNPq, na pessoa do Dr. Daniel Ibraim Atalla, Coordenador do Projeto intitulado “Rede de Pesquisa em prospecção de leveduras de alta performance para a produção de bioetanol: estudos da biodiversidade, genotipagem, expressão gênica e caracterização industrial.”, Proc. 560747/2010-1, referente ao edital CNPq 27/2010, pela bolsa concedida.

Aos meus amigos e amigas e todas as pessoas que indiretamente ajudaram e muito para realização desse trabalho.

OBRIGADA!

“Embora ninguém possa voltar atrás e fazer um novo começo, qualquer um pode começar agora e fazer um novo fim.” (Chico Xavier)

EPIGRAFE

“Hoje levantei cedo pensando no que tenho a fazer antes que o relógio marque meia noite. É minha função escolher que tipo de dia vou ter hoje. Posso reclamar porque está chovendo ou agradecer às águas por lavarem a poluição. Posso ficar triste por não ter dinheiro ou me sentir encorajado para administrar minhas finanças, evitando o desperdício. Posso reclamar sobre minha saúde ou dar graças por estar vivo. Posso me queixar dos meus pais por não terem me dado tudo o que eu queria ou posso ser grato por ter nascido. Posso reclamar por ter que ir trabalhar ou agradecer por ter trabalho. Posso lamentar decepções com amigos ou me entusiasmar com a possibilidade de fazer novas amizades. Se as coisas não saíram como planejei posso ficar feliz por ter hoje para recomeçar. O dia está na minha frente esperando para ser o que eu quiser. E aqui estou eu, o escultor que pode dar forma. Tudo depende só de mim.” (Charles Chaplin)

SUMÁRIO

RESUMO.....	11
ABSTRACT	13
1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
2.1 Etanol no Brasil	17
2.2 Leveduras.....	18
2.3 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	19
2.3.1 Ciclo Celular	20
2.3.2 Esporulação	21
2.4 O processo fermentativo industrial brasileiro e as condições estressantes impostas às leveduras.....	22
2.5 Fermentação Alcoólica	24
2.5.1 Fermentação com alto teor alcoólico.....	24
2.6 Evolução adaptativa: como acelerar no laboratório um processo que estaria ocorrendo nas dornas de fermentação.....	27
2.7 Cariotipagem eletroforética e Rearranjo cromossômico.....	28
2.8 Melhoramento de leveduras	29
3 OBJETIVOS	31
4 MATERIAL E MÉTODOS	33
4.1 Material biológico	33
4.2 Meios de cultura	33
4.3 Dissecação de tétrades (n).....	35
4.4 Avaliação da reação sexual dos haplóides.....	36
4.5 Avaliação do crescimento celular para seleção dos haplóides.....	36
4.6 Cruzamentos Aleatórios ou Massais (Polycross) (2n).....	37
4.7 Cruzamento Direcionado e Micromanipulação de Zigotos (2n).....	37
4.8 Evolução adaptativa	38
4.9 Identificação das linhagens (Cariotipagem).....	38
4.10 Avaliação das linhagens em ensaios com ciclos fermentativos	39
4.10.1 Propagação das linhagens.....	39
4.10.2 Experimentos de Fermentações e análises.....	40
4.11 Análises químicas e microbiológicas	40
4.11.1 Análises de açúcares e glicerol	40

4.11.2 Determinação de Trealose.....	41
4.11.3 Extração e quantificação de glicogênio.....	41
4.11.4 Etanol e rendimento fermentativo	41
4.11.5 Determinação da viabilidade.....	42
4.12 Análise Estatística.....	42
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
5.1 Obtenção e seleção dos haplóides.....	45
5.2 Cruzamentos Direcionados.....	47
5.3 Cruzamentos Aleatórios ou Massais (Polycross).....	48
5.4 Evolução Adaptativa	49
5.5 Cariotipagem eletroforética dos produtos dos cruzamentos	50
5.6 Avaliação dos isolados cariotipados quanto à tolerância a múltiplos estresses .	59
5.7 EXPERIMENTO 1: Pré-Seleção mediante avaliação com ciclos fermentativos	68
5.8 EXPERIMENTO 2: Avaliação final dos isolados mediante fermentação com alta densidade de células e ciclos fermentativos.....	70
6 CONCLUSÕES	81
REFERÊNCIAS	83
ANEXOS	91

RESUMO

Melhoramento de leveduras para a fermentação com alto teor de etanol mediante hibridação e evolução adaptativa

O etanol contribui significativamente para que a matriz energética do país se apresente extremamente favorável quanto à participação da energia renovável. A demanda por este biocombustível é crescente e tecnologias que permitam a sua produção de forma sustentável é de suma importância, como a fermentação com alto teor de etanol, já empregada em alguns países. Linhagens de leveduras com tolerância a múltiplos estresses muito contribuíram para a implantação de tal tecnologia no Brasil. Neste contexto se insere o presente trabalho, o qual busca linhagens de leveduras capazes de suportar os estresses impostos por uma fermentação com alto teor alcoólico. Para tal, 3 entre as melhores linhagens industriais de *Saccharomyces cerevisiae* atualmente disponíveis (CAT-1, PE-2 e SA-1), foram utilizadas num programa para a seleção de híbridos para tolerância múltipla aos estresses etanólico, osmótico, ácido, além de outros, inerentes à fermentação com alto teor de etanol. Estas linhagens foram esporuladas e dissecadas para obtenção de células haplóides, as quais foram submetidas a cruzamentos entre- e intra-linhagens. Foram conduzidos cruzamentos massais (aleatórios) cujos produtos foram submetidos à evolução adaptativa em meios com os fatores estressantes em intensidades crescentes no transcorrer de 80 gerações. Ao final da evolução buscou-se variantes prevalentes na população de híbridos, os quais foram submetidos a novos procedimentos seletivos com imposições de várias condições estressantes. Igualmente foram conduzidos cruzamentos direcionados entre haplóides mediante micromanipulação, sendo tais híbridos submetidos ao mesmo procedimento seletivo nos meios estressantes. Assim, a partir de 230 haplóides das 3 linhagens, 174 isolados (120 oriundos dos cruzamentos massais e 54 dos cruzamentos direcionados) foram pré-selecionados pela maior tolerância aos meios seletivos, tendo os seus cariótipos estabelecidos mediante a cariotipagem eletroforética. Os isolados com maior tolerância (27) foram novamente avaliados em fermentações com reciclo de células e sob condições de elevado teor alcoólico (até 14,5% v/v) em mosto de melaço e água. Em todas as etapas da seleção os isolados foram comparados com as linhagens parentais (CAT-1, PE-2 e SA-1), sendo que ao final do processo seletivo destacou-se a linhagem 35B (híbrido entre CAT-1 e PE-2) com atributos fermentativos superiores aos exibidos pelos parentais. Tais atributos fermentativos contemplaram parâmetros bioquímicos, fisiológicos e tecnológicos (rendimento em etanol, viabilidade celular, crescimento em biomassa, formação de glicerol e teores celulares de carboidratos de reserva – glicogênio e trealose). Os resultados permitem sugerir que devido às características fermentativas desejáveis do híbrido 35B, o mesmo possa ser empregado no processo industrial para ser avaliado como uma promissora linhagem a conduzir a fermentação com alto teor alcoólico.

Palavras-chave: *Saccharomyces cerevisiae*; Híbridos; Evolução adaptativa; Fermentação com alto teor alcoólico; Eficiência fermentativa

ABSTRACT

Yeast improvement for high ethanol content fermentation by hybridization and adaptive evolution

Ethanol contributes significantly to the energy country matrix, which presents itself as extremely favorable to the share of renewable energy. The demand for this biofuel is increasing and technologies for its production in a sustainable way is of paramount importance such as fermentation with very high gravity, already used in some countries. Yeast strains tolerant to multiple stresses greatly contributed to the deployment of such technology in Brazil. In this context the present work is inserted, which seeks yeast strains capable of withstanding the stresses imposed by high ethanol content fermentation. In order that, three of the best industrial strains of *Saccharomyces cerevisiae* currently available (CAT-1, PE-2 and SA-1), were used in a program to select hybrids with tolerance towards multiples stresses: ethanolic, osmotic and acid, besides other factors involved in a high ethanol content fermentation. These strains were sporulated and dissected to obtain haploid cells, which were submitted to inter- and intra-strains crossings. Hybrids from polycrossings (random crossings) were subjected to an adaptative evolution in media with increasing stressing action over the course of 80 generations. At the end of evolution, prevalent variants were sought in the hybrids population, and submitted to new selective procedures with several stressing conditions. In the same way, directed crossings (between identified haploids) were performed by micromanipulation, and the resulting hybrids were subjected to the same selective procedure. Therefore, from 230 haploid from the 3 parent strains, 174 were isolated (120 from polycrossings and 54 from directed crossings) and pre-selected for higher tolerance in selective media; moreover their karyotypes were established by electrophoretic karyotyping. Strains showing greater tolerance (27) were again evaluated during cell recycling fermentations with high ethanol content (up to 14.5% v/v) using must formulated with water and molasses. At all stages, the isolates were compared with the parental strains (CAT-1, PE-2 and SA-1), and at the end of the selection process, the strain 35B (hybrid between CAT-1 and PE-2) stood out with fermentative attributes higher than the parentals. The fermentative performance was assessed by biochemical, physiological and technological parameters (ethanol efficiency, cell viability, biomass gain, glycerol formation and cellular levels of reserve carbohydrates - glycogen and trehalose). The results suggest that due to desirable fermentation traits, the hybrid 35B, could be used as starter in industrial fermentation process with high ethanol content.

Keywords: *Saccharomyces cerevisiae*; Hybrids; Adaptive evolution; High ethanol content fermentation; Ethanol yield

1 INTRODUÇÃO

O Brasil tem longo histórico na produção de álcool combustível. O Programa Nacional do Álcool (PRÓ-ÁLCOOL) desencadeado no final dos anos 70, decorrente da crise do petróleo, gerou uma série de tecnologias próprias, tornando o país um dos líderes mundial na produção de etanol (AZEVEDO, 1997). Para tal contribuíram muitas melhorias, tanto na área agrícola como no processo fermentativo em si. Quanto à fermentação, a utilização de linhagens selecionadas resultou em ganhos expressivos em produtividade e rendimento, devido às características de grande tolerância aos estresses da fermentação, capacidade de implantação na destilaria e estequiometria favorável à elevada produção de etanol (BASSO et al., 2008). No entanto o processo industrial brasileiro ainda pode ser beneficiado por outros avanços tecnológicos, como a fermentação com alto teor alcoólico, resultando em vantagens econômicas, sociais e ambientais (BASSO et al., 2011a). Assim este processo permite redução dos custos de capital, menor gasto energético na produção do etanol, menor consumo de água, menor produção de vinhaça e redução nos níveis de contaminação bacteriana nas fermentações (LAOPAIBOON, 2009).

Porém o fator limitante para a implantação desta tecnologia vem a ser a limitada tolerância das leveduras hoje disponíveis (mesmo as selecionadas) para suportar os estresses de uma fermentação industrial com elevado teor alcoólico (13 a 16% de etanol), quando atualmente o teor médio se mostra ao redor de 8,0-9,0% de etanol (BASSO et al., 2003, 2008).

O preço internacional do açúcar tem levado o setor sucro-alcooleiro a priorizar tal produto, desviando a maior parte do caldo de cana para a cristalização da sacarose, o que resultou em maiores proporções de melaço nos mostos industriais e consequente estresse adicional às leveduras. Portanto novas linhagens de leveduras serão necessárias, tanto para atender as tendências atuais do processo industrial, como para uma futura fermentação com alto teor alcoólico. Em ambos os casos, linhagens mais tolerantes ao etanol e igualmente capazes de suportar os estresses impostos pela elevada proporção de melaço serão exigidas.

A natureza poligênica de muitos atributos importantes requeridos numa levedura industrial, envolvendo genes pouco ou totalmente desconhecidos, com ampla distribuição pelo genoma, torna extremamente árdua uma abordagem

“racional” de manipulação genética na busca dos fenótipos desejáveis. A técnica de “genome shuffling” (mistura de genoma), assim como a recombinação sexual se mostram promissoras na seleção de fenótipos de grande complexidade gênica como tolerância ao etanol, vigor fermentativo, velocidade de fermentação, etc. (STEPHANOPOULOS, 2002; GIUDICI et al., 2005; ZHAO; BAI, 2009). Esta abordagem contemplaria também a possibilidade da otimização de mais de um fenótipo desejável na mesma linhagem (STEPHANOPOULOS, 2002).

A resistência a múltiplos estresses é uma característica desejada em leveduras industriais envolvidas em quaisquer processos biotecnológicos, pois que as células são expostas às combinações simultâneas ou sequenciais de diferentes tipos de estresses (ATTFIELD, 1997; RANDIZ-GIL, 1999). Uma alternativa promissora vem sendo a “engenharia evolutiva” ou “evolução adaptativa”, que consiste em uma evolução provocada pelo crescimento contínuo de uma cultura submetida a uma pressão seletiva apropriada, levando a fenótipos desejáveis (BUTLER; OLIVER, 1996; SAUER, 2001).

A técnica da evolução adaptativa já permitiu a obtenção de linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* com maior capacidade de fermentação de lactose (GUIMARÃES et al., 2008), maior eficiência na fermentação de pentose (LIU e HU, 2010; BASSO et al., 2011b) e tolerâncias a múltiplos estresses, como alta e baixa temperatura, etanol e estresse oxidativo (ÇAKAR, 2005).

Tais aspectos são de extrema importância no melhoramento de linhagens com expressão simultânea de vários atributos, como termo- e osmotolerância, juntamente com tolerâncias ao etanol, à acidez, ao sulfito, ao alumínio, à contaminação bacteriana e a muitos outros agentes estressantes ainda desconhecidos que operaram na fermentação industrial (BASSO et al., 2011a).

Dentro deste contexto, da disponibilidade de linhagens industriais com grande riqueza fenotípica e ainda pela urgente necessidade de linhagens com tolerâncias múltiplas, delineou-se o presente trabalho, empregando-se as técnicas de “genome-shuffling” mediante esporulação e recombinação, associadas com a “evolução adaptativa”, na busca de linhagens mais adequadas à fermentação industrial.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Etanol no Brasil

Considerado como o biocombustível mais consumido no mundo, sua maior produção se concentra no Brasil e nos EUA (BASSO et al 2011), responsáveis por mais de 80% da produção mundial de etanol (UNIÃO DA INDÚSTRIA DE CANA-DE AÇÚCAR – ÚNICA, 2012). No entanto considerado o maior exportador, o Brasil encontra-se em uma posição privilegiada por apresentar vantagens na tecnologia de produção, possibilidade de liderança na agricultura de energia e mercado de biocombustíveis, sem ampliar a área desmatada ou reduzir a área destinada à produção de alimentos. Além disso, a matriz energética brasileira já é um exemplo de sustentabilidade, pois enquanto a média mundial é o uso de apenas 14% de fontes renováveis, o Brasil utiliza 46,8% dessas fontes (PACHECO, 2011). A produção de etanol no Brasil deriva-se, em escala industrial, exclusivamente da cana-de-açúcar, cujo cultivo é favorecido pelo clima resultando em matéria prima de menor custo. A produtividade da cana-de-açúcar por hectare é maior que a do milho (nos EUA), sendo que os seus açúcares são mais rapidamente fermentados, gerando um rendimento de 80 litros de etanol por tonelada de cana (WHEALS et al., 1999; ANDRIETTA, STECKELBERG, ANDRIETTA, 2006; WEINGRILL, 2007).

A utilização do etanol como combustível possui diversas vantagens, dentre elas a menor dependência de combustíveis fósseis importados e as variações de preço destes; menor emissão de poluentes (grande parte dos poluentes resultantes da queima do etanol no motor é reabsorvida no ciclo de crescimento da cana-de-açúcar e os resíduos das usinas são totalmente reaproveitados como fertilizantes na lavoura); maior geração de empregos (sobretudo no campo, diminuindo o êxodo rural); autossuficiência energética (devido à utilização do bagaço na geração de vapor); fonte geradora de divisas internacionais; favorecimento da balança comercial do país e menor impacto ambiental (FIGUEIREDO, 2008).

Desde o advento do PROALCOOL, o Brasil vem desenvolvendo tecnologias nos diversos segmentos da indústria sucro-alcooleira, com ganhos expressivos em rendimento e em eficiência, contribuindo para que o país apresente o menor custo de produção do etanol, quando comparado com os demais produtores. Para tal contribuíram melhores variedades de cana, melhores práticas agrícolas, melhorias

na engenharia do processo, melhor assepsia na fermentação, entre outros. Menos visível tem sido a contribuição das leveduras selecionadas.

2.2 Leveduras

Leveduras são fungos unicelulares, não filamentosos, de formatos ovais ou esféricos, algumas encontradas também com pseudo-hifas, com tamanhos que variam entre 1 a 5 μm de largura por 5 a 30 μm de comprimento. São amplamente encontradas na natureza e atualmente, no caso de *Saccharomyces cerevisiae*, considera-se o microrganismo mais estudado do mundo. Sua célula consiste em parede celular, membrana citoplasmática, o núcleo, os vacúolos e a mitocôndria (PELCZAR, 1997).

São imóveis e se reproduzem por brotamento, onde a célula parental forma uma protuberância (broto) na sua superfície externa. À medida que o broto se desenvolve, o núcleo da célula parental se divide, e um dos núcleos migra para o broto. Assim, a parede celular do broto se desenvolve fazendo com que se desprenda da célula parental. Uma célula de levedura pode produzir mais de 24 brotos ao longo do seu ciclo de vida e o tempo de geração, ou seja, o tempo em que uma levedura se multiplica é de 2 horas. (TORTORA; FUNKE; CASE, 2008). A esporulação em leveduras, outro tipo menos comum de reprodução, é um fator importante por desempenhar uma função de produção de novos híbridos e por manter a viabilidade das espécies durante as variações do meio ambiente. (GUIMARÃES, 2005).

Possuem metabolismo anaeróbio facultativo crescendo tanto na presença como na ausência de oxigênio. Leveduras crescem melhor em um ambiente de pH neutro ou ligeiramente ácido (PELCZAR, 1997).

Alguns elementos são basicamente necessários para seu crescimento e reprodução, como água, fontes de carbono (açúcares, sais de ácidos orgânicos, glicerina ou etanol), nitrogênio, oxigênio e minerais (GUIMARÃES, 2005). Fonte de carbono orgânico é o principal para seu crescimento e obtenção de energia (OLIVEIRA, 2009). Seu metabolismo pode ser afetado por deficiência de certos nutrientes como fósforo, magnésio, manganês, zinco e vitaminas (biotina, niacina, ácido pantotênico e pirimidina). Estresses como de temperaturas tanto alta como baixa, pressão osmótica, etanol e acidez também afetam seu comportamento (WALKER, 1998).

São agentes biológicos ativos responsáveis pela fermentação alcoólica e, por isso, a escolha da linhagem apropriada é de importância fundamental para o êxito da fermentação (PACHECO, 2010).

2.3 *Saccharomyces cerevisiae*

Saccharomyces cerevisiae é a espécie de levedura mais investigada dos organismos eucarióticos, o que ajuda na compreensão da biologia celular. Por vários séculos, *S. cerevisiae* tem sido usada na produção de alimentos e bebidas alcoólicas e também dentro da indústria farmacêutica. É um organismo considerado não patogênico, e devido a seu longo histórico de aplicação na produção de produtos de consumo tais como etanol e fermento de padeiro, foi classificada como um organismo GRAS (geralmente considerados como seguros). Outra razão importante para a aplicabilidade de *S. cerevisiae* dentro do campo da biotecnologia é a sua susceptibilidade a modificações genéticas que foi ainda mais facilitado pela disponibilidade da sequência do genoma completo, publicado em 1996 (OSTERGAARD, 2000) por Goffeau envolvendo cerca de 600 cientistas.

Além disso, o que é de maior interesse dentro desse trabalho é a capacidade tecnológica dessa linhagem para fermentação industrial, envolvendo principalmente a produção de etanol pois é o gênero de levedura largamente utilizada na indústria produtora de fermentados que tem como produto final o álcool, seja para uso carburante ou para obtenção de bebidas alcoólicas. Os fatores que consagram esse microrganismo como o mais indicado para esse fim resultam do fato desse fungo reunir os atributos desejados para a condução de um processo de produção de álcool. Capacidade de rapidamente transformar açúcares em etanol, alta tolerância ao produto formado, osmotolerância, tolerância a grandes variações de temperatura, atividade celular em ambiente ácido são os principais atributos desejáveis para uma cepa de uso industrial. (ANDRIETTA; STECKELBERG; ANDRIETTA, 2006).

Basicamente, dentro dos objetivos dos organismos dessa espécie está a reprodução para perpetuação da espécie; em anaerobiose, a produção de etanol e gás carbônico serve para obtenção de energia para síntese de moléculas (manutenção e reprodução) (ANDRIETTA, 2010). A escolha do etanol foi fruto de bilhões de anos de evolução, permitindo à levedura maior competitividade frente a outros organismos (ação antisséptica). Transformando o açúcar em álcool a

levedura obtém energia (ATP) e material necessário à sobrevivência e crescimento. Álcool e gás carbônico são produtos de excreção, sem utilidade metabólica para essa levedura (BASSO; ALVES; AMORIM, 1996).

2.3.1 Ciclo Celular

O ciclo celular da levedura *Saccharomyces cerevisiae* (Figura 1) é caracterizado principalmente por uma base vegetativa diplóide, onde a meiose precede a esporulação, formando os quatro esporos haplóides, que permanecem encerrados numa estrutura denominada asco, até a fase de liberação para o meio (ESPOSITO E KLAPHOLZ, 1981).

A partir do momento em que se processa a liberação dos esporos, se as linhagens forem do tipo heterotáticas, a haplofase pode se estabelecer indefinidamente, multiplicando-se os esporos separadamente por mitoses sucessivas. Estes, quando confrontados com esporos de reação sexual contrária formam híbridos diplóides, dando início a diplofase. Tal fase pode se perpetuar através de divisões mitóticas, até que condições adversas se estabeleçam, induzindo os híbridos ($2n$) a entrarem em meiose, produzindo novos ascas e esporos (n) (ROMAN, 1981). No caso das linhagens homotáticas, as células da haplofase não são estáveis. Nas primeiras divisões, após a germinação, ocorre a modificação do tipo de reação sexual em uma das células, permitindo o cruzamento e restituindo a diplofase, que é estável e se estabelece por mitoses sucessivas. Como no heterotalismo, a diplofase pode ser interrompida a qualquer momento, induzindo os eventos meióticos e restaurando os ascas.

Figura 1 - Ciclo celular *Saccharomyces cerevisiae*

2.3.2 Esporulação

Esporulação de *Saccharomyces cerevisiae* é uma resposta à depleção de nutrientes permitindo que uma célula diplóide dê origem a esporos haplóides (NEIMAN, 2005, Figura 2).

Figura 2 - Visão geral da etapa de formação dos esporos e do asco (Neiman, A. M. 2005)

A formação dos esporos dentro de um asco é realizada por um processo meiótico. A habilidade de esporular, o número de esporos por asco, seu formato e o modo como os ascas e esporos são formados, são características importantes utilizadas na classificação e subdivisão das leveduras ascoporogêneas *Saccharomycetaceae* (FOWELL, 1969).

Já, em *Saccharomyces* o número de esporos por asco varia de um a quatro, e normalmente encontrado com três a quatro esporos que normalmente apresentam um formato esférico.

Tanto a meiose quanto a esporulação requerem a presença dos alelos (a e α) para a reação sexual, e ambas ocorrem quando há condições de escassez, principalmente de nitrogênio e na presença de uma fonte de carbono não fermentável, como o acetato (HARBER; HALVORSON, 1975).

Na grande maioria os caracteres de interesse econômico, tanto em organismos superiores quanto em microrganismos, são de base genética quantitativa. Entretanto, poucos trabalhos têm sido desenvolvidos em *Saccharomyces cerevisiae*, apesar da possibilidade de cruzamentos planejados e da facilidade na análise das tétrades, que individualiza a meiose e os seus produtos.

Assim é possível através dos ascos e seus esporos, estudar a variabilidade genética encontrada entre e dentre ascos e direcionar estes cruzamentos dentro de um programa de melhoramento de caracteres poligênicos.

2.4 O processo fermentativo industrial brasileiro e as condições estressantes impostas às leveduras

O processo industrial emprega como substrato o caldo de cana e melaço (sub-produto da fabricação do açúcar), misturados em diferentes proporções, em processo batelada-alimentada (mais utilizado) ou contínuo, ambos com reutilização das células de levedura. O processo batelada-alimentada (fed-batch), ou Melle-Boinot, opera com elevada concentração de levedura, necessitando de grande quantidade de inóculo para a partida (BASSO et al., 2008).

Assim, no processo industrial, a fermentação se inicia com a adição do mosto com 18 a 22% de ART sobre a suspensão de levedura. Teores alcoólicos de 8 a 10% (v/v) são atingidos em 6 a 10 horas de fermentação com temperaturas de 32 a 38°C. Ao término da fermentação a levedura é separada mediante centrifugação, diluída a uma concentração de 30-40% (m/v) e submetida a um tratamento com ácido sulfúrico (pH de 1,8 a 2,5 por 1 a 2 horas para a redução da contaminação bacteriana) e utilizada em um novo ciclo fermentativo. Desse modo a levedura pode frequentemente ser submetida a 2 ciclos fermentativos diários, durante um período de 200-250 dias, que compreende a safra anual. Percebe-se, assim, que uma levedura para a fermentação industrial deverá ser, simultaneamente, tolerante aos vários fatores estressantes impostos pelo processo (etanol, temperatura, ácido, pressão osmótica, além de outros) e especificamente, nas condições de reciclo de células (LALUCE, 1991; BASSO et al., 2008).

As leveduras de panificação, pelo fato de serem facilmente obtidas no mercado e nas grandes quantidades requeridas, são largamente empregadas pela indústria alcooleira. No entanto, essas leveduras não suportam os estresses da fermentação industrial (BASSO et al., 1993), sendo substituídas por linhagens selvagens (ou indígenas) que se mostram com as mais variadas habilidades fermentativas, dentre as quais algumas linhagens foram selecionadas pelas características de dominância e persistência no processo industrial, assim como para alto desempenho fermentativo (BASSO et al., 2008).

As leveduras, quando fermentando em condições estressantes, mostram queda da viabilidade celular, aumento na formação de glicerol, redução na formação de biomassa e diminuição nos conteúdos celulares de glicogênio e trealose, sendo que tais parâmetros são de extrema utilidade para a identificação de linhagens tolerantes a um único ou a um conjunto de fatores estressantes (ALVES, 1994; BASSO et al., 2000). Assim, glicogênio e trealose, os dois principais carboidratos de reserva em *S. cerevisiae*, representando até 25% da matéria seca da levedura (LILLE; PRINGLE, 1980), já foram envolvidos com a tolerância a diversos tipos de estresses (WIEMKEN, 1990; BASSO et al., 2000). Com relação ao glicerol, se observa maior produção em condição de estresse osmótico (BRUMM & HEBEDA, 1988; MYERS et al., 1997), bem como quando da imposição de várias outras situações estressantes (ALVES, 1994), sendo sugerido que aumento na formação do mesmo possa refletir condições gerais de estresse durante a fermentação.

O glicerol é o mais abundante dos produtos secundários da fermentação, desviando de 5 a 8% do açúcar metabolizado (OURA, 1977; ALVES, 1994), de sorte que redução na sua formação resulta em maior rendimento em etanol. Tal constatação pode ser observada em leveduras produzindo menores quantidades de glicerol com correspondentes elevações nos rendimentos fermentativos (BASSO et al., 2000).

Embora as linhagens selecionadas, com maior capacidade de implantação nos processos, venham contribuindo de maneira significativa para uma melhor eficiência fermentativa, em cerca de 40% das destilarias onde são introduzidas se observa a substituição das mesmas por outras indígenas, normalmente associadas com baixo desempenho fermentativo (BASSO et al., 2008).

Portanto linhagens mais robustas ainda são necessárias, não apenas para aquelas destilarias onde as linhagens selecionadas não conseguem se implantar (provavelmente devido às condições estressantes mais intensas), como para a fermentação com teor alcoólico mais elevado do que aquele atualmente praticado. Assim, os benefícios de uma fermentação com alto teor de etanol somente serão obtidos com novas linhagens.

2.5 Fermentação Alcoólica

O processo de fermentação alcoólica é realizado principalmente pela *Saccharomyces cerevisiae*, onde em condições anaeróbicas os açúcares como a glicose e a frutose (que são oriundos do caldo de cana-de-açúcar) são convertidos, através do processo denominado glicólise (Figura 3), em energia celular (ATP) produzindo simultaneamente etanol e dióxido de carbono como resíduos metabólicos a partir do ácido pirúvico formado neste processo (MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 2008).

Figura 3 - Reações químicas da fermentação alcoólica (Glicólise)

2.5.1 Fermentação com alto teor alcoólico

A fermentação com alto teor alcoólico foi inicialmente proposta para a indústria cervejeira em meados da década de 80 e logo após sugerida para a produção de álcool combustível a partir de cereais (THOMAS et al., 1996). Substratos com teores de glicose entre 25 e 30% (m/v) geram de 15 a 16,7% de etanol (v/v) (BAYROCK; INGLEDEW, 2001; LI et al., 2009). O próprio processo fermentativo de produção de bioetanol a partir do milho, nos Estados Unidos, atinge ao redor de 18% de etanol, porém exigindo tempos de fermentação de 40-60 horas.

O processo de fermentação com alto teor alcoólico visa não só o aumento da produção de etanol, como também possui vantagens técnica, econômica e ambiental. O grande interesse por essa tecnologia reside na redução dos custos de produção do etanol: menor investimento de capital, redução de custos de mão de obra e energia por litro de etanol produzido, redução no consumo de

água, facilidades de limpeza e sanitização, melhor assepsia, etc (THOMAS, et al 1996).

Segundo Bai et al. (2004), aumentando a concentração de etanol na fermentação se pode significativamente melhorar a eficiência energética, reduzindo o consumo de energia da destilação.

Não apenas o balanço energético seria beneficiado (menor gasto de energia na destilação e disponibilizando mais bagaço para um futuro etanol de segunda geração), como também a redução do volume da vinhaça, com impactos econômicos e ambientais positivos. Outros aspectos vantajosos seriam a redução no consumo de antibióticos (maior teor alcoólico exerceria maior efeito repressivo sobre a contaminação bacteriana no processo industrial) e o certamente menor consumo de água pela indústria. Tais aspectos têm grande relevância nos custos de produção do etanol brasileiro (SIMTEC, 2010).

No entanto, o fator limitante vem a ser a tolerância das leveduras hoje disponíveis para suportar o estresse de uma fermentação industrial com elevado teor alcoólico (13 a 16%), quando atualmente a média estaria ao redor de 8,0-9,0%. Embora a levedura *Saccharomyces cerevisiae* seja excelente produtora de etanol ela também é sensível a concentrações desse composto especialmente nas fermentações com alto teor alcoólico. A característica de tolerância ao etanol está associada a interações e complexidades do genoma (MENGGEN, 2010). O etanol em concentrações relativamente baixas é um inibidor do crescimento das leveduras, inibindo a divisão celular, diminuindo o volume celular e a taxa de crescimento. No entanto, altas concentrações de etanol reduzem a viabilidade da célula e aumentam a morte celular (STANLEY, 2009). O principal efeito do etanol nas leveduras é na membrana celular, nas proteínas hidrofóbicas e hidrofílicas e no retículo endoplasmático (WALKER, 1998).

Experimento realizado por Basso et al. (2003), demonstrou que a linhagem PE-2 fermentou, em escala laboratorial, mosto misto (caldo e melaço) atingindo teores alcoólicos de 14% de etanol a 33°C, porém, ao longo de 6 ciclos apresentou queda significativa da viabilidade celular de 99 para 90%. Embora estes dados mostrem a robustez da linhagem, a mesma não é adequada a uma fermentação alcoólica com tal teor alcoólico em condições industriais, devido às ações estressantes contínuas sobre a mesma população de células ao longo dos ciclos fermentativos.

Estes resultados vêm expor uma diferença crucial entre os processos de produção de bioetanol de milho (Estados Unidos) e aquele que emprega a cana-de-açúcar como matéria prima (Brasil). A reutilização da levedura, coletada ao final de uma fermentação e empregada numa fermentação subsequente (com até dois ciclos fermentativos diários, durante um período de safra de 200-250 dias e com tratamento ácido ao final de cada ciclo), impõe uma condição estressante peculiar, exigindo uma levedura mais robusta que aquela empregada no processo de produção de etanol a partir do milho (a despeito desta conduzir uma fermentação com maior teor alcoólico, porém sem reciclo). Leve-se em conta também as diferentes condições fisiológicas impostas pela fermentação mais rápida (cerca de 10 horas) no processo brasileiro quando comparada com o de milho (50-60 horas). Considere-se principalmente que enquanto no processo brasileiro se deseja levedura com alta viabilidade ao final da fermentação (pois a mesma vai ser empregada na fermentação seguinte), na produção de etanol de milho este aspecto é irrelevante, pois a levedura é descartada ao final da fermentação.

Portanto, o parque alcooleiro do Brasil exigirá novas linhagens, não apenas tolerantes ao etanol, mas igualmente tolerantes ao processo fermentativo com reciclo de células, especialmente empregando-se melaço como substrato e temperaturas economicamente praticáveis nas destilarias.

A viabilidade de uma espécie de levedura na presença de alta concentração de etanol é um pré-requisito para verificar eficiência na fermentação para a base de um bom rendimento com alto teor alcoólico. Assim, a seleção de leveduras com uma elevada resistência ao estresse etanólico é de importância para a investigação e compreensão da evolução desse organismo e do seu valor econômico para indústrias de biocombustíveis (HU et al., 2007). Tensões severas durante a fermentação com alto teor alcoólico, tais como a alta pressão osmótica do açúcar substrato no início e a forte inibição do etanol durante a fase de produção, podem causar a perda de viabilidade celular de levedura, aumentando o tempo de fermentação (LI et al., 2009).

2.6 Evolução adaptativa: como acelerar no laboratório um processo que estaria ocorrendo nas dornas de fermentação

A resistência a múltiplos estresses é uma característica desejada em leveduras industriais envolvidas em quaisquer processos biotecnológicos, pois que as células são expostas às combinações simultâneas ou sequenciais de diferentes tipos de estresses (ATTFIELD, 1997; RANDIZ-GIL, 1999). Uma alternativa promissora vem sendo a “engenharia evolutiva” ou “evolução adaptativa”, que consiste em uma evolução provocada pelo crescimento contínuo de uma cultura submetida a uma pressão seletiva apropriada, levando a fenótipos desejáveis (BUTLER E OLIVER, 1996; SAUER, 2001).

A evolução adaptativa aplicada juntamente com a engenharia genética permitiu a obtenção de *Saccharomyces cerevisiae* com maior capacidade de fermentação de lactose (GUIMARÃES et al., 2008), e acrescida da mutagênese química, resultou na evolução de uma linhagem de *S. cerevisiae* mais eficiente na fermentação de pentose (LIU; HU, 2010). Também, a evolução adaptativa permitiu a obtenção de mutantes com tolerância a múltiplos estresses, como alta e baixa temperatura, etanol e estresse oxidativo (ÇAKAR, 2005).

É bem plausível que as várias condições estressantes impostas à levedura na produção industrial do bioetanol, nas condições de reutilização das células de um ciclo para outro subsequente, e no período de uma safra (200-250 dias), igualmente estejam exercendo uma pressão seletiva sobre a população de linhagens selvagens (normalmente presentes nas dornas), levando à evolução de linhagens multi-tolerantes. O processo industrial pode, assim, selecionar variantes para tolerâncias múltiplas, mas pelo fato desta seleção não ser intencionalmente dirigida, necessariamente não resulta em variantes com outros atributos igualmente desejáveis (alto rendimento em etanol, baixa formação de espumas, ausência de floculação, baixa formação de glicerol entre outros) (BASSO et al., 2008).

Considerando-se um teor de biomassa na dorna de 10% (m/v), uma taxa de crescimento de 8,2% a cada ciclo fermentativo e uma safra com 240 dias com 2 ciclos diários (BASSO et al., 2008), tem-se que uma linhagem poderia se propagar no processo industrial por cerca de 40 gerações. Durante este período, linhagens selecionadas introduzidas evoluem mostrando rearranjos cromossômicos

vários (LOPES, 2000), dentre os quais variantes com melhores atributos fermentativos já foram resgatados (SIMTEC, 2010).

2.7 Cariotipagem eletroforética e Rearranjo cromossômico

A técnica de cariotipagem por eletroforese de campo pulsado possibilita a caracterização e a identificação de leveduras em diferentes processos industriais (LOPES, 2000). Esta técnica baseia-se na separação eletroforética do DNA cromossômico intacto (moléculas que se diferenciam tanto em número como em tamanho, contidas no núcleo da levedura e primordialmente relacionadas com suas características genéticas) e tem se mostrado como uma excelente ferramenta na diferenciação de gêneros, espécies, bem como de diferentes linhagens de uma mesma espécie (BASSO et al., 1996). Porém sua desvantagem está nos resultados obtidos apenas nas variações de tamanho e número de cromossomos não possibilitando obter informações sobre a composição de genes em cada cromossomo (LOPES, 2000).

A ocorrência de rearranjos cromossômicos é constante nas avaliações pela cariotipagem eletroforética. Como pôde ser observado por Lopes (2000), a avaliação da linhagem PE-2 ao longo das safras por um período de 3 anos consecutivos permitiu obter diversos polimorfismos cromossômicos, sendo maior no final da safra em relação ao início. Isto justifica que a PE-2 possui uma variabilidade atuando sobre características estruturais e numéricas dos cromossomos o que faz com que ela seja mais seletiva. Isto pode resultar em um mecanismo de adaptação evolutiva da linhagem.

Nadal et al. (1999) relatam que as leveduras de vinho possuem uma característica marcante que é a variabilidade natural dos seus cariótipos. Sugerem então que essa característica pode resultar rearranjos cromossômicos durante o crescimento vegetativo.

A variabilidade dos perfis eletroforéticos pode ser mecanismos de recombinação entre cromossomos homólogos de diferentes tamanhos (NADAL et al., 1999). Pode se dizer que a diferença no tamanho dos cromossomos é devido a rearranjos de DNA onde grandes fragmentos cromossômicos foram deletados, translocados e duplicados por diferentes processos (FIERRO; MARTIN, 1999).

O genoma da levedura *Saccharomyces cerevisiae* pode ser remodelado após uma forte pressão seletiva principalmente nos processos fermentativos. Características fenotípicas importantes tais como crescimento rápido em alta concentração de açúcar, produção de álcool bem como a alta tolerância aos estresses por milhões de gerações tiveram fortes influências sobre o genoma desta levedura (PEREZ-ORTIN, 2002).

2.8 Melhoramento de leveduras

A produção de etanol no Brasil dispõe de poucas, porém excelentes leveduras quanto aos atributos fermentativos exigidos pelo processo industrial de produção de etanol. Algumas destas linhagens (CAT-1 e PE-2) apresentam históricos de 14 a 19 anos com capacidade de implantação em processos industriais, abrangendo diferentes destilarias, diferentes processos, diferentes regiões e diferentes safras. Além de alto rendimento em etanol, baixa formação de glicerol, manutenção de alta viabilidade durante ciclos fermentativos e elevados teores celulares de glicogênio e trealose, também apresentam pouca formação de espuma e ausência de floculação (BASSO et al., 2008). Inegavelmente se constituem em excelente material genético para a compreensão das bases moleculares das tolerâncias aos vários estresses impostos pelo processo industrial, como também para a obtenção de novas linhagens, inclusive para outros processos biotecnológicos (ARGUESO et al., 2009).

O melhoramento genético de um organismo consiste na habilidade de atingir uma característica específica ou uma função determinada (GIUDICI et al., 2005). O conhecimento do caráter desejado é essencial para a escolha da técnica de melhoramento apropriada.

A natureza poligênica de muitos atributos importantes requeridos numa levedura industrial, envolvendo genes pouco ou totalmente desconhecidos, com ampla distribuição pelo genoma, torna extremamente árdua uma abordagem “racional” de manipulação genética na busca dos fenótipos desejáveis. A técnica de “genome shuffling” (mistura de genoma) assim como a recombinação sexual se mostram promissoras na seleção de fenótipos de grande complexidade gênica como tolerância ao etanol, vigor fermentativo, velocidade de fermentação, etc. (STEPHANOPOULOS, 2002; GIUDICI et al., 2005). O sucesso de tal procedimento depende da escolha inicial dos parentais, da eficiência do processo de

recombinação gênica e do poder discriminatório do método seletivo. Esta abordagem contemplaria também a possibilidade da otimização de mais de um fenótipo desejável na mesma linhagem (STEPHANOPOULOS, 2002).

Segundo Giudici et al. (2005) a técnica do “genome shuffling” consiste em misturar todo o genoma para melhorar fenótipos industrialmente desejáveis sem o conhecimento dos determinantes genéticos. Usando esta técnica, é possível obter linhagens valiosas que podem tolerar condições ambientais severas, tais como alta concentração de açúcar, temperatura elevada e produtos tóxicos incluindo o etanol. (ZHAO, 2009)

Tais aspectos são de extrema importância no melhoramento de linhagens com expressão simultânea de vários atributos, como termo- e osmotolerância, juntamente com tolerâncias ao etanol, à acidez, ao sulfito, ao alumínio, à contaminação bacteriana e outros agentes estressantes da fermentação industrial (BASSO et al., 2011).

Tanto assim que para melhorar a tolerância ao etanol, a termotolerância e produtividade de etanol, Shi. D. (2009) empregou a técnica do “genome shuffling”, submetendo protoplastos à radiação UV e fusão de protoplastos recursiva para gerar novos genótipos. Assim foi selecionada uma linhagem capaz de fermentar com 20% de glicose a 45-48 ° C, produzindo 9,95% de etanol e tolerando etanol a 25%.

A recombinação sexual é um mecanismo efetivo para combinação de características desejáveis e expande a biodiversidade genética de forma mais eficiente que métodos de mutagênese assexuado. De acordo com Zang et al. (2002), a recombinação sexual recursiva melhora a performance e é mais rápida que a mutagênese assexuado pois permite o compartilhamento de informações genéticas dentro de uma população, eliminando o risco do aparecimento de genes deletérios.

Em função de tais resultados animadores, da disponibilidade de linhagens industriais com grande riqueza fenotípica e ainda pela urgente necessidade de linhagens com tolerância múltipla para atender às necessidades do processo industrial brasileiro, a escolha do método de melhoramento mediante a técnica do “genome shuffling”, associada à evolução adaptativa poderiam possibilitar a obtenção de linhagens com características de destaque para o processo industrial de produção de etanol com alto teor alcoólico.

3 OBJETIVOS

Obtenção de linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* com as habilidades de conduzi-rem fermentações com elevados teores alcoólicos em condições próximas daquelas operantes nas destilarias do país. Para tal, o potencial genético de linhagens industriais seria explorado mediante as técnicas de esporulação, hibridação e evolução adaptativa.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material biológico

Foram utilizadas 3 linhagens de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* amplamente empregadas no processo industrial de produção de etanol, PE-2, CAT-1 e SA-1.

As culturas foram obtidas da coleção do Laboratório de Bioquímica e Tecnologia de Leveduras, do Departamento de Ciências Biológicas ESALQ/USP, as quais são mantidas com glicerol 15% em ultra-freezer a -80 °C.

O resgate dessas culturas consiste na inoculação de 100 µl da suspensão de leveduras em glicerol em 3,0 ml de meio de cultura YEPD e incubação a 30 °C por 24 horas.

4.2 Meios de cultura

YEPD para crescimento das leveduras

1% de extrato de levedura

1% de peptona bacteriológica

2% de glicose.

Para compor o YEPD sólido acrescentou-se 2% de ágar.

Meio RA para esporulação das leveduras

1 mL da Solução A (1% rafinose)

1 mL da solução B (2% acetato de potássio),

2% de ágar

Completar para 100 mL e corrigir o pH para 6,8

Meio para micromanipulação

Consiste no meio YEPD com redução dos componentes para melhorar a transparência.

0,3% de extrato de levedura

0,3% de peptona bacteriológica

2% de glicose

2% de ágar.

Tampão de micromanipulação

1 M Sorbitol

10 mM TRIS pH 7,5

10 mM Na₂PO₄

10 mM EDTA

Esterilizado por filtração em filtro de 0,22µm mantido a – 20°C.

Solução Zimoliase

Zimoliase 100T USB Biological diluída 100 vezes (1U mg⁻¹ de célula) em água purificada esterilizada e mantida a – 20°C.

Meio para evolução adaptativa

Mosto misto (50% do açúcar oriundo de melaço e 50% oriundo de caldo)

Diluído nas concentrações de 12 a 15% de ART (açúcares redutores totais).

Meio 1

27% de ART (mosto misto)

Meio 2

YEPD acrescido de etanol para resultar em teor alcoólico 10% (v/v)

Meio 8

15% ART (oriundo de mosto misto)

Ácido láctico 3000 mg L⁻¹

Ácido acético 667 mg L⁻¹

Etanol 6,7% (v/v)

Ajustar o pH 3,5 com ácido sulfúrico.

Para multiplicação das linhagens e para os ensaios de fermentação (Experimento 1 e 2), utilizou-se melaço da usina Iracema (62,21% ART) diluído com água para resultar nas concentrações desejadas de 10 a 31,5% ao longo dos ciclos.

Todos os meios foram esterilizados em autoclave por 20 minutos a 121 °C.

O etanol dos meios fora acrescido após esterilização sob assepsia devido à sua volatilidade.

4.3 Dissecação de tétrades (n)

As culturas de leveduras de PE-2, CAT-1 e SA-1 foram individualmente estriadas em meio de esporulação (RA) e incubadas a 30°C por 5 dias para a formação de esporos,

Em um tubo de microcentrífuga de 1,5 mL, colocou-se 400 µL de tampão de micromanipulação, 2 µL de Solução de Zymoliase 100T, 4 µL de beta-mercaptoetanol e uma porção de célula em fase de esporulação, que foram raspadas do meio RA com ajuda de um palito tipo português, sendo que a mistura foi agitada e deixada a temperatura ambiente. Após 5 minutos, tempo exato para a parede do asco se tornar frágil, um novo palito tipo português foi mergulhado no tubo de microcentrífuga de 1,5 mL e utilizado para fazer uma estria em placa de petri contendo meio de micromanipulação. A placa então foi levada para micromanipulador para dissecação dos ascos e os ascósporos (esporos) ordenados na placa conforme Figura 4. Foram dissecados 30 ascos de cada linhagem. Cada esporo foi individualmente cultivado em 3,0ml de YEPD. Para melhor identificação dos haplóides, para cada asco foi dado um número e para cada ascósporo deste asco uma letra (a, b, c, d) (ZANG et al., 2002).

Figura 4 - Dissecação das tétrades

4.4 Avaliação da reação sexual dos haplóides

Após a dissecação dos ascos os ascósporos foram tipificados quanto ao “mating type” com a utilização de linhagens (n) testadoras de reação sexual definidas como a ou α .

Para realização do teste de “mating type” as linhagens haplóides isoladas na dissecação de tétrades foram transferidas para placa de Petri com YEPD e incubadas por 15 horas. Após este período uma pequena porção de células foi retiradas com o auxílio de um palito tipo português, e transferidas para outra placa de Petri com YEPD e misturada com a linhagem testadora (a ou α) em proporções iguais. Após quatro horas de mistura a amostra foi observada quanto à formação do zigoto (2n) em lâminas ao microscópio ocular. A reação sexual da linhagem haplóide é sempre contrária a reação sexual da linhagem testadora onde foi observada a formação do zigoto (MORTIMER, 1969).

Treze haplóides foram selecionados e o mating type foi avaliado para verificar a reação sexual. Segundo Haber (1998), em *Saccharomyces cerevisiae*, o mating type é determinada por dois diferentes alelos. Portanto pôde-se verificar a reação sexual a ou α de cada haplóide escolhido.

4.5 Avaliação do crescimento celular para seleção dos haplóides

Os haplóides gerados foram selecionados previamente mediante visualização do crescimento das colônias, sendo escolhidos os haplóides de maiores crescimento.

Para verificação do crescimento celular, tolerância ao estresse do meio bem como o consumo de açúcar, os isolados foram previamente crescidos (durante 48 horas) em meio YEPD a 30 °C. Após, as linhagens escolhidas foram submetidas a testes de crescimento medido por absorbância (DO₅₇₀) em um espectrofotômetro TECAN Reader, mediante incubação a 30 °C por 24 horas. O crescimento foi avaliado em microplacas de 96 poços com leituras a cada 2 horas e agitações prévias de 10 minutos antes das leituras. Os haplóides que apresentaram melhor crescimento após 24 horas foram selecionados para os testes de maior relevância deste trabalho. Foram testados 230 haplóides, 91 derivados da linhagem PE-2, 89 de CAT-1, e 50 de SA-1. Esses haplóides foram submetidos à duas diferentes modalidades de cruzamentos para obtenção das células diploides: cruzamento

massal (polycross – sem identificação dos haplóides) e cruzamento direcionado (com identificação dos respectivos haplóides).

Posteriormente, as células foram inoculadas (10µl) em placas de 96 poços com 90 µl do meio a ser testado por poço e incubadas em um Tecan GENios microplate reader a 30°C, com agitações lineares de 10 minutos a cada 1 hora e 50 minutos. No Tecan, a densidade óptica (DO₅₇₀) foi medida a cada 2 horas totalizando em 24 horas de crescimento. A seleção dos híbridos foi mediante o maior ou igual valor de absorbância após 24 horas em comparação com os parentais.

4.6 Cruzamentos Aleatórios ou Massais (Polycross) (2n)

Em um erlenmeyer de 250 mL com 100 mL de YEPD, as linhagens haplóides foram misturadas para gerar possíveis cruzamentos intra e entre linhagens. Os 91 haplóides de PE-2 foram inoculados em apenas um erlenmeyer denominado como amostra P, os 89 de CAT-1 foram inoculados em um outro erlenmeyer denominado amostra C e os 50 haplóides de SA-1, foram inoculados em um outro erlenmeyer denominado amostra S. Tais cruzamentos corresponderam aos cruzamentos intra-linhagem. Os demais cruzamentos massais corresponderam às misturas de haplóides de diferentes linhagens (enter-linhagens). Assim o cruzamento PC consistiu na mistura em um erlenmeyer de todos os haplóides das linhagens PE-2 e CAT-1. Da mesma forma foram obtidos os cruzamentos PS (PE-2 com SA-1), CS (CAT-1 com SA-1) e PCS (PE-2 com CAT-1 e com SA-1), totalizando 7 cruzamentos, os quais foram propagados a 30°C por 48 horas.

4.7 Cruzamento Direcionado e Micromanipulação de Zigotos (2n)

Haplóides, previamente selecionados em ensaio de crescimento por 24 horas, foram cruzados e os zigotos individualizados, segundo o protocolo de Mortimer et al. (1994). Para tal as linhagens haplóides (n) com diferentes reações sexuais foram estriadas em placas de petri 12 horas antes da realização dos cruzamentos, os quais consistiram na mistura de partes iguais de pequena quantidade de células frescas das leveduras sobre o meio YEPD sólido. Após 4 horas de mistura observou-se em lâmina ao microscópio, a formação de zigotos. Com o auxílio de um palito tipo português uma parte do material misturado foi estriado em outra placa contendo meio de micromanipulação. Mediante o uso de

microscópio micromanipulador (Carl Zeiss, Scope A1, AXIO), foram separados os zigotos e alocados em posições distintas na placa.

4.8 Evolução adaptativa

Neste experimento buscou-se submeter os produtos dos 7 cruzamentos massais (P, C .S, PS, PC, SC e PSC) a uma evolução adaptativa. Pretendeu-se impor uma condição estressante sobre a população de híbridos durante gerações sucessivas, na expectativa de que algumas linhagens evoluíssem para uma maior tolerância à fermentação alcoólica com elevado teor de etanol.

Para tal cada um dos 7 cruzamentos massais foram submetidos à fermentações em bateladas em erlenmeyer, de 250 mL mediante inoculação com 1 ml de cada cultura em 100ml de mosto misto com concentrações crescentes de 12 a 15% ART ao longo de ciclos fermentativos. Foram realizados 12 ciclos, sendo os 1º e 2º ciclos com 12% de ART, os 3º e 4º com 14% e do 5º em diante com 15% de ART, todos a 30°C,. A utilização de teores crescentes de açúcar no meio de evolução, não apenas permitiria maior tolerância ao etanol, como também frente a outros fatores estressantes associados à uma fermentação com alto teor alcoólico (estresse osmótico, acidez e outros agentes estressantes encontrados no melaço). A adaptação evolutiva se processou por cerca de 80 gerações (estimadas pela biomassa do inóculo inicial e ao final de cada ciclo de crescimento anaeróbio – fermentação). Os tempos de cada batelada variaram em função da concentração de açúcar de cada ciclo, com média de 2 a 5 dias, ou seja, até o esgotamento total do açúcar. As biomassas foram estimadas pela densidade ótica a 600nm, tanto do inóculo como ao final de cada transferência, permitindo estimar cerca de 6,64 gerações por transferência, totalizando cerca de 80 gerações nas 12 transferências.

4.9 Identificação das linhagens (Cariotipagem)

Com a expectativa de que linhagens foram evoluídas e aquelas mais adaptadas teriam a possibilidade de prevalecerem sobre os demais indivíduos da população, buscou-se a presença de linhagens dominantes ou prevalentes após as 12 transferências de evolução. Para tal, 0,1 mL de amostras de cada uma das 7 evoluções foram inoculadas em 5 ml de YEPD, incubadas por 48 horas à 30°C, diluídas convenientemente e semeadas em placas com o mesmo meio. As placas

foram incubadas por 72 horas a 30°C, obtendo-se colônias com tamanhos adequados à cariotipagem

A identificação de linhagens dominantes foi feita mediante a cariotipagem eletroforética conforme descrito por Basso et al. (1993), utilizando o protocolo desenvolvido por Blondin e Vézinhét (1988), com algumas modificações descritas por Basso et al. (2008). Para tal, de cada amostra do cruzamento massal foram tomadas, ao acaso, 15 colônias e isoladamente processadas (total de 105 colônias/isolados). Quanto aos cruzamentos direcionados foram tomadas 3 colônias de cada híbrido (total de 54 híbridos). Uma porção de 2 a 4 mg de biomassa úmida de cada colônia foi diretamente suspensa em 30 µl de solução de enzima lítica e 40 µl de agarose 1,3% a 60°C contidos em molde. Os blocos obtidos após gelificação da agarose foram incubados como recomendado (BLONDIN; VÉZINHET, 1988) e submetidos à eletroforese de campo pulsado, a 14°C, modalidade CHEF, empregando-se equipamento BioRad, modelo DR III, programado para 6V/cm por 9 horas com pulsos de 5s, seguido de 6v/cm por 8 horas com pulsos de 60 segundos, ambos os blocos com configuração angular de 120°. Após coloração com brometo de etídio o gel foi fotografado pela iluminação ao UV, obtendo-se assim perfis de bandejamento dos cromossomos intactos. Linhagens distintas apresentariam perfis eletroforéticos diferentes, enquanto perfis idênticos corresponderiam à mesma linhagem.

4.10 Avaliação das linhagens em ensaios com ciclos fermentativos

4.10.1 Propagação das linhagens

As linhagens previamente selecionadas foram propagadas anaerobicamente a 30°C, em meio de melaço de cana diluído com água para 10% de ART e suplementado (g/L) com KH_2PO_4 (0,87), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (0,66), uréia (0,30), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,49), $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,03), $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (0,02) e ácido linolêico (0,03). Para tal o meio (pH = 5,5) esterilizado (120°C por 20 minutos) foi adicionado ao inóculo inicial (100 mL de suspensão da linhagem previamente crescida em YEPD por 48 horas), duplicando-se o volume da suspensão a cada 24 horas, pelas adições de meio. A biomassa necessária foi coletada por centrifugação (800 x g, por 20 minutos).

4.10.2 Experimentos de Fermentações e análises.

Os ensaios de fermentação foram conduzidos a 30°C em tubos de centrífuga com capacidade de 50 mL previamente identificados e tarados. O pé-de-cuba conteve, 10 mL de uma suspensão da levedura (4 g, para o primeiro ciclo fermentativo) em 6 mL de água esterilizada e 2 mL de vinho da fermentação anterior (simulando assim uma situação industrial de concentração na centrífuga de 65% de levedura). As alimentações se iniciaram pela adição de 28 mL de mosto constituído de melaço previamente esterilizado. Essa alimentação foi gradativa sendo dividida em 3 porções iguais e adicionadas com intervalo de 2 horas, terminando a alimentação com 4 horas. As velocidades de fermentação foram estimadas mediante perda de peso (evolução do CO₂) a cada 2 horas. Após 8 horas de fermentação os tubos foram removidos da estufa e mantidos à temperatura ambiente (27-28°C) e processados no dia seguinte, após cerca de 21 horas de fermentação.

Os mostos foram preparados para conter açúcares suficientes para resultar em teores crescentes de etanol de 8 a 15% (v/v) no final dos ciclos. Ao término de cada fermentação foram removidas amostras (0,2 ml) para as análises de viabilidade celular das leveduras mediante microscopia ótica. A levedura foi separada do vinho (meio fermentado) mediante centrifugação a 800 x g por 20 minutos, pesada e ressuspensa novamente em 8 mL de água e vinho (conforme mencionado acima), sendo em seguida novamente alimentada com mosto, perfazendo-se assim por todos os ciclos fermentativos. Nos vinhos delevurados de cada ciclo fermentativo foram determinados os teores de etanol, densidade, glicerol, sacarose, glicose e frutose. No final do último ciclo foram dosados os teores celulares de trealose e glicogênio.

4.11 Análises químicas e microbiológicas

4.11.1 Análises de açúcares e glicerol

A quantificação de glicose, frutose, sacarose e glicerol nos vinhos foram realizadas através de cromatografia líquida de alta eficiência utilizando o cromatógrafo iônico DIONEX, modelo DX300 (Sunnyvale, CA, USA) equipado com coluna Carbopack PA1 e detector de amperometria de pulso com eletrodo de ouro,

utilizando como fase móvel NaOH (100 mmol.L^{-1}) sob fluxo de 1 ml.min^{-1} (BASSO et al., 2008).

4.11.2 Determinação de Trealose

Os conteúdos celulares de trealose foram dosados mediante extração seletiva com ácido tricloroacético a $0,5 \text{ M}$ em banho de gelo por 20 minutos (200mg massa úmida de levedura para 2ml de extrator), seguido de quantificação da trelose no sobrenadante (3.000 rpm por 10 minutos) mediante cromatografia iônica como citado na determinação de açúcares (BASSO et al., 2008)

4.11.3 Extração e quantificação de glicogênio

A dosagem de glicogênio na levedura foi feita pelo método de Becker modificado de acordo com Rocha-Leão et al. (1984). Para a extração, preparou-se uma suspensão de cada levedura contendo 200 mg de biomassa e transferiu-se para tubos de ensaio com tampa de rosca. Em todos os tubos adicionou-se 5 mL de água destilada gelada, seguida de agitação em vórtex. Posteriormente, os tubos foram centrifugados a 3500 r.p.m. durante 6 minutos, e o sobrenadante foi descartado. Em cada tubo contendo a biomassa precipitada, foram adicionados $2,0 \text{ mL}$ de Na_2CO_3 $0,25 \text{ M}$ recém preparado, e os tubos foram estocados a -20°C até o momento da análise. Após, os tubos foram fervidos por 90 minutos, resfriados e assim foram analisados. A quantificação do glicogênio foi realizada mediante hidrólise enzimática com amiloglicosidase e dosagem colorimétrica da glicose liberada após reação com glicose-oxidase e peroxidase, efetuando-se as leituras a 500nm .

4.11.4 Etanol e rendimento fermentativo

O etanol foi dosado nos vinhos delevedurados, mediante destilação da amostra em microdestilador Kjeldahl seguida de densimetria eletrônica em densímetro digital (marca Anton Paar, modelo DMA 48), segundo protocolo descrito por Zago et al. (1996). O rendimento da fermentação foi calculado como a fração do açúcar fornecida que se transformou em etanol, baseando-se na estequiometria de que 100g de ART (hexose) resultam na formação $51,11 \text{ g}$ de etanol (ou $64,75 \text{ ml}$ a 20°C) para uma eficiência de 100% de conversão.

4.11.5 Determinação da viabilidade

A viabilidade celular das linhagens de levedura foi determinada através de microscopia óptica, em objetiva de 40X, considerando a contagem de células viáveis, não viáveis e brotos viáveis presentes em retículos da câmara de Neubauer espelhada. Tal análise foi mediante coloração diferencial das células pela solução de eritrosina em tampão fosfato, onde células com alta atividade fisiológica não se coram, enquanto células mortas apresentam-se na coloração rósea. Após o final da fermentação, uma alíquota de 0,2ml foi retirada do vinho bruto e diluída com água esterilizada (1,8ml). Da amostra diluída utilizou-se 1 ml, juntamente com 1ml do corante (diluição final 20x), homogeneizou, e dessa mistura uma alíquota foi submetida à contagem (OLIVEIRA et al., 1996).

4.12 Análise Estatística

Para comparação das médias das análises realizadas nos ciclos fermentativos realizou-se análise estatística utilizando-se o software ESTAT (Sistema para análise estatística, versão 2.0, Departamento de Ciências Exatas – UNESP, Jaboticabal, 1992). As comparações das médias foram feitas pelo teste de comparações múltiplas de Tukey, ao nível de 5% de significância ($p < 0,05$).

A Figura 5 ilustra a estratégia utilizada neste trabalho bem como as sequências metodológicas utilizadas.

Figura 5 - Etapas da estratégia de seleção de linhagens para tolerância à fermentação com alto teor alcoólico em condições de ciclos fermentativos

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Como mencionado, no presente trabalho buscou-se explorar o material genético de 3 linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* (CAT-1, PE-2 e SA-1), selecionadas de ambiente industrial de produção de etanol, e com grande capacidade de implantação nas destilarias. Estas linhagens se mostram extremamente tolerantes a estresses quando comparadas com outras igualmente empregadas pela indústria. Coincidentemente a capacidade de sobrevivência e implantação nas destilarias é marcadamente mais elevada para as linhagens CAT-1, PE-2 e SA-1 (BASSO et al., 2008). Dessa forma tais linhagens foram esporuladas e os haplóides resultantes foram empregados para gerar uma diversidade genética, a partir da qual se pretendeu selecionar variantes com tolerância para a fermentação alcoólica com alto teor de etanol.

5.1 Obtenção e seleção dos haplóides

Após esporulação das linhagens parentais diplóides (PE-2, CAT-1 e SA-1), esporos de cada tétrade foram micromanipulados e separados em meio YEPD sólido, com o auxílio do microscópio micromanipulador, permitindo uma primeira seleção de haplóides que se apresentaram como colônias “grandes”, conforme se observa na Figura 6.

Figura 6 - Crescimento e isolamento dos haplóides na placa (colônias grandes e pequenas) após dissecação e segregação das tétrades. Estria (E) da cultura esporulada e colônias dos 4 esporos (a, b, c, d) isolados de um mesmo asco dispostos em coluna (1)

Tais colônias grandes se diferenciavam em muito daquelas pequenas, cujas proporções foram variáveis para cada asco em particular. Alguns esporos se mostraram inviáveis (não germinaram), não sendo possível o seu cultivo. A literatura

relata que perdas de cópias de um dado cromossoma durante a meiose pode ser letal para células haplóides, sendo que a inviabilidade de alguns esporos poderia ser explicada por este fato (LITI; LOUIS, 2005). Um número desequilibrado (cópia extra ou perda da cópia) de um subconjunto de cromossomos é conhecido como aneuploidia e tal situação é melhor tolerada à medida que aumenta o número de ploidia. No entanto, a aneuploidia surge pela segregação dos cromossomos tanto durante a meiose como mitose. (LITI; LOUIS, 2005).

No presente trabalho a escolha dos haplóides de colônias grandes foi empírica, apenas baseada no fato de que maior crescimento deve refletir maior atividade metabólica. Como o crescimento é suportado por ATP (adenosina-trifosfato) gerado pela via glicolítica com produção concomitante de etanol (BASSO et al., 1996), tal parâmetro poderia refletir um genótipo desejável para a fermentação industrial.

Assim, 91 haplóides dentre os 230 que se apresentaram como colônias grandes, foram submetidos a um “screening” buscando aqueles com maior taxa de crescimento após 24 horas, empregando-se microplacas de 96 poços com meio YEPD e comparados com os parentais. O crescimento, estimado pela Densidade Ótica (DO_{570nm}), permitiu a seleção de 13 haplóides, que posteriormente tiveram o “mating type” definido segundo a reação sexual (MATa e MAT α). Os haplóides selecionados, com crescimentos comparáveis aos parentais, corresponderam às colunas de tonalidade mais escura nas Figuras 7, 8 e 9.

Figura 7 – Crescimentos avaliados pela DO_{570nm} após 24 horas em microplacas com meio YEPD das linhagens haplóides derivadas da levedura PE-2, tendo os parentais (PE-2, CAT-1 e SA-1) como referências. Cada número se refere a um asco e cada letra a um ascósporo (esporo) do mesmo asco. As linhagens em destaque (barras mais escuras) foram escolhidas para a próxima etapa de seleção

Figura 8 – Crescimentos avaliados pela DO_{570nm} após 24 horas em microplacas com meio YEPD das linhagens haplóides derivadas da linhagem CAT-1, tendo os parentais (PE-2, CAT-1 e SA-1) como referências. Cada número se refere a um asco e cada letra a um ascósporo (esporó) do mesmo asco. As linhagens em destaque (barras mais escuras) foram selecionadas para a próxima etapa de seleção

Figura 9 – Crescimentos avaliados pela DO_{570nm} após 24 horas em microplacas com meio YEPD das linhagens haplóides derivadas da linhagem SA-1, tendo os parentais (PE-2, CAT-1 e SA-1) como referências. Cada número se refere a um asco e cada letra a um ascósporo (esporó) do mesmo asco. As linhagens em destaque (barras mais escuras) foram selecionadas para a próxima etapa de seleção

5.2 Cruzamentos Direcionados

Como muitos outros fungos, as leveduras são capazes de se modificar geneticamente a partir do cruzamento entre haplóides de diferentes “mating type”. Portanto, o estado diplóide parece fornecer aos fungos uma série de estratégias evolutivamente vantajosas indisponíveis nos haplóides, como por exemplo, a capacidade de sofrer meiose e formação de esporos sob condições nutricionais limitantes (HABER, 1998). Assim as culturas haplóides selecionadas foram diretamente combinadas tanto intra- como inter-linhagens, mediante

micromanipulação dos zigotos, obtendo-se assim as células diplóides. Aos produtos desta hibridação denominou-se “cruzamentos direcionados”, os quais resultaram em 18 híbridos (Tabela 1).

Tabela 1 – Relação e identificação dos híbridos obtidos mediante cruzamentos direcionados (inter- e intra- linhagens parentais), indicando a origem dos haplóides e as especificações dos cruzamentos

Identificação	Haplóides PE-2	Haplóides CAT-1	Haplóides SA-1	Cruzamentos
1B a 3B	2a (a) x 2d (α)			PHI-1
4B a 6B	2a (a) x 3a (α)			PHI-4
7B a 9B	8d (a) x 2d (α)			PHI-5
10B a 12B	8d (a) x 3a (α)			PHI-6
13B a 15B	2a (a) x 5b (α)			PHI-11
16B a 18B	2a (a) x 3c (α)			PHI-13
19B a 21B			4a (α) x 7a (a)	SHI-1
22B a 24B			4a (α) x 15a (a)	SHI-3
25B a 27B		26c (α) x 7a (a)		CHI-1
28B a 30B		26c (α) x 22c (a)		CHI-2
31B a 33B	2a (α)	26c (a)		PC-1
34B a 36B	3a (α)	22c (a)		PC-5
37B a 39B	2d (α)	7a (a)		PC-8
40B a 42B	3c (α)	22c (a)		PC-9
43B a 45B	8d (a)		4a (α)	PS-1
46B a 48B	2d (α)		7a (a)	PS-4
49B a 51B	3a (α)		15a (a)	PS-8
52B a 54B		22a (a)	4a (α)	CS-1

5.3 Cruzamentos Aleatórios ou Massais (Polycross)

Os 230 haplóides que apresentaram colônias grandes também foram submetidos a um protocolo que permitisse a possibilidade de cruzamentos aleatórios, tanto intra- como inter-linhagens, e foi aqui definido como “cruzamentos massais” ou “polycross”. Nestes tratamentos os cruzamentos poderiam ocorrer, mas

também seria possível a coexistência com linhagens haplóides (sem cruzamentos) na cultura bruta resultante. Para o propósito do presente trabalho este fato não seria impeditivo, pois que a busca de linhagens com maior tolerância poderia ser conduzida independentemente da ploidia das mesmas. No total foram gerados 7 tipos de cruzamentos (Tabela 2).

Tabela 2 – Relação e identificação das linhagens derivadas dos cruzamentos massais

Identificação das linhagens	Haplóides	Cruzamentos
46 a 60	CAT-1 x CAT-1	C
61 a 75	PE-2 x CAT-1	PC
76 a 90	PE-2 x SA-1	PS
91 a 105	CAT-1 x SA-1	CS
106 a 120	PE-2 x PE-2	P
121 a 150	PE-2 x CAT-1 x SA-1	PCS
151 a 165	SA-1 x SA-1	S

5.4 Evolução Adaptativa

Supondo uma maior variabilidade genética na população resultante dos cruzamentos massais, optou-se por aplicar a chamada “Evolução Adaptativa”, forçando a população a destacar fenótipos desejáveis para uma fermentação próxima das condições industriais. Pretendeu-se impor uma condição estressante sobre as populações dos cruzamentos massais durante gerações sucessivas, na expectativa de que algumas linhagens evoluíssem para uma maior tolerância à fermentação alcoólica. Para tal empregou-se mostos constituídos de uma mistura de melaço e caldo, resultando em teores de etanol atingidos nas fermentações industriais. A utilização de teores crescentes de açúcar no meio de evolução, não apenas permitiria tolerância ao etanol, como também frente a outros fatores estressantes associados à uma fermentação industrial (estresse osmótico, acidez e outros agentes estressantes encontrados no melaço). A adaptação evolutiva se processou por cerca de 80 gerações, obtidas mediante 12 transferências sucessivas de 1 ml de inóculo em 100 ml de meio. O crescimento anaeróbico (fermentativo)

ocorreu até a completa exaustão do substrato, sendo a biomassa estimada tanto no inóculo como ao final de cada ciclo de crescimento, mediante absorbância a 600nm.

A recombinação gênica entre haplóides de uma mesma linhagem e entre haplóides de linhagens diferentes é mencionada como uma excelente ferramenta quando associada a uma evolução adaptativa, onde uma pressão de seleção é imposta para selecionar leveduras com melhores combinações gênicas para a característica desejada (ZHANG, 2002). No caso pretendeu-se a obtenção de linhagens com capacidade de tolerância a um mosto com 50% de melaço e teores alcoólicos praticados no processo industrial (8 a 9% v/v).

5.5 Cariotipagem eletroforética dos produtos dos cruzamentos

Na tentativa de identificar linhagens evoluídas ao final da adaptação evolutiva, amostras dos cruzamentos massais (P, C, S, PC, PS, CS e PCS, referentes à Tabela 2), foram submetidas à cariotipagem eletroforética. A cariotipagem igualmente foi conduzida em 3 colônias isoladas de cada um dos 18 híbridos obtidos mediante os cruzamentos direcionados. (descritos na Tabela 1), sendo que os cariótipos de todas estas linhagens estão apresentados nas Figuras 10 a 14.

Na figura 10 se observa que a cultura da linhagem PE-2 parental empregada neste trabalho se apresentou com um cariótipo dominante (colônias 17, 18, 19, 26, 28, 29 e 30), dois subdominantes – (colônias 16, 20, 24 e 27) e (colônias 22 e 25) – além de mais 2 diferentes rearranjos cromossômicos em menores proporções (colônias 21 e 23).

À semelhança do que ocorre com leveduras de vinho (LONGO; VÊZINHET, 1993), rearranjos cromossômicos igualmente foram demonstrados ocorrer com a linhagem PE-2 durante ciclos fermentativos em indústrias produtoras de bioetanol no Brasil (LOPES, 2000; BASSO et al., 2008).

A literatura vem acumulando evidências de que tais rearranjos cromossômicos se relacionam com a adaptação das linhagens às mudanças ambientais onde as leveduras se encontram. Assim as pressões seletivas sobre uma população de levedura nos processos de produção de vinho, panificação, produção de sakê, entre outros, resultam em fenótipos mais apropriados às condições fisiológicas impostas por tais processos (CODÓN et al., 1998; INFANTE et al., 2004; SPICZKI, 2011). Tal processo seletivo foi igualmente sugerido pela

dinâmica populacional de leveduras no processo industrial de produção de etanol no Brasil, onde linhagens mais tolerantes aos estresses desta fermentação foram isoladas (BASSO et al., 2008).

Figura 10 - Perfis eletroforéticos de 15 colônias amostradas após a evolução adaptativa dos cruzamentos massais, entre a linhagem parental PE-2 (gel P, perfis 106 a 120), entre as linhagens PE-2 e CAT-1 (gel PC, perfis 61 a 75), entre as linhagens PE-2 e SA-1 (gel PS, perfis 76 a 90) e 15 colônias da linhagem parental PE-2 antes da evolução (gel PE-2, perfis 16 a 30)

Assim o gel P (figura 10) mostra o desaparecimento da maioria dos cariótipos originais apresentados pela parental PE-2 e a dominância de dois variantes após a evolução adaptativa (colônias 108, 110-120 e colônias 106, 107 e 109). O variante dominante evoluído (perfis 108, 110-120, do gel P) apresenta perfil eletroforético idêntico aos perfis 22 e 25 da população original (gel PE-2), onde não se mostrou dominante. Assim, parece que a evolução adaptativa favoreceu o referido variante, porém, não se exclui a possibilidade de que tal variante ainda seja um híbrido mantendo a integridade do perfil eletroforético.

Ainda na figura 10 se observa polimorfismos cromossômicos variados oriundos dos cruzamentos massais entre as linhagens PE-2 x CAT-1 (gel PC) e PE-2 x SA-1 (gel PS), porém em nenhuma dessas amostras se encontrou os perfis da linhagem PE-2, tanto parental como as evoluídas a partir desta parental.

Figura 11 - Perfis eletroforéticos de 15 colônias amostradas após a evolução adaptativa dos cruzamentos massais, entre a linhagem parental CAT-1 (gel C, perfis 46 a 60), entre as linhagens CAT-1 e SA-1 (gel CS, perfis 91 a 105), entre as linhagens CAT-1 e PE-2 (gel PC, perfis 61 a 75) e 15 colônias da linhagem parental CAT-1 antes da evolução (gel CAT-1, perfis 1 a 15)

A figura 11 mostra a evolução da linhagem CAT-1, tanto isoladamente (gel C) como em cruzamentos com as linhagens SA-1 (gel CS) e PE-2 (gel PC). Aqui igualmente se observa rearranjos cromossômicos dominantes da linhagem parental (gel CAT-1 - perfis 2, 4, 5, 6, 7, 11, 12, 13, 14 e 15; perfis 3 e 9), mas diferentes dos cariótipos dominantes na mesma linhagem evoluída (gel C – perfis 47, 53 e 56 e perfis 51, 54, 55, 58 e 59). Tais resultados mostram que também no caso da linhagem CAT-1 a evolução adaptativa utilizada no presente trabalho levou ao surgimento de uma população diferente em relação à original.

Por outro lado a figura 11 mostra cariótipos muito próximos ao se comparar variantes evoluídos da CAT-1 (gel C – perfil 47) com variantes evoluídos do cruzamento massal CAT-1 X PE-2 (com gel PC – perfis 61, 69, 70, 73 e 75). Tais resultados sugerem produtos de evolução da CAT-1 sem o cruzamento com a linhagem PE-2. O mesmo pode ser inferido para a linhagem de perfil 62 (gel PC) que tem cariótipo próximo ao da linhagem dominante evoluída unicamente a partir da CAT-1 (gel C – perfis 51, 54, 55, 58 e 59). Para estes dois casos estes produtos seriam cruzamentos entre haplóides da CAT-1 ou os próprios haplóides da CAT-1, sem cruzamentos (tais comprovações seriam obtidas mediante comprovação da capacidade de esporulação destes isolados).

Figura 12 - Perfis eletroforéticos de 15 colônias amostradas após a evolução adaptativa dos cruzamentos massais, entre a linhagem parental SA-1 (gel S, perfis 151 a 165), entre as linhagens PE-2 e SA-1 (gel PS, perfis 76 a 90), entre as linhagens CAT-1 e SA-1 (gel CS, perfis 91 a 105) e 15 colônias da linhagem parental SA-1 antes da evolução (gel SA-1, perfis 31 a 45)

A figura 12 mostra uma população bem homogênea para a linhagem parental SA-1, praticamente sem rearranjos cromossômicos (exceto o perfil 40 do gel SA-1). Da mesma forma a evolução adaptativa desta linhagem resultou também em menor polimorfismo cromossômico quando comparada com as linhagens PE-2 e CAT-1, conforme se observa no gel S. A relação entre estas pequenas alterações no tamanho físico dos cromossomos durante a evolução desta linhagem ainda é bastante obscura, sugerindo menor frequência de recombinações e translocações. No entanto, uma avaliação dos atributos de tolerância destes variantes em relação ao parental poderia destacar se houve algum benefício nesta evolução.

Ainda no gel CS da figura 12 se observa que o cariótipo 103 é semelhante àquele dominante nos produtos da evolução da linhagem SA-1 e, portanto, não seria um híbrido entre as linhagens CAT-1 e SA-1. No entanto, os demais perfis refletem uma mistura entre os cromossomos médios da SA-1 e os cromossomos mais leves (na parte inferior do gel e de maior mobilidade eletroforética) da linhagem CAT-1. Tais semelhanças sugerem que tais cariótipos representam híbridos entre as duas linhagens.

A figura 12 mostra ainda um conjunto de 4 cromossomos (bandas) médios na região mediana no gel que é bem preservado tanto na linhagem parental como nos produtos da evolução da mesma (gel SA-1 e S). Este conjunto persiste com poucas alterações nos cruzamentos com a PE-2 e CAT-1 (géis PS e CS). Se observa também no gel PS que o perfil 76 (igual ao 82) é semelhante ao perfil dominante no gel S (perfis 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 160, 161, 162, 163 e 165), evidenciando que a população evoluída do cruzamento PS não contemplou os produtos oriundos da linhagem SA-1, quando esta evoluiu isoladamente. Até pelo contrário, pois o perfil dominante na população evoluída a partir do cruzamento PS (perfis 77, 78, 85, 87, 88 e 90), não corresponde, a rigor, a nenhum dos cariótipos do gel S, onde o mais próximo seria o perfil 151. Tais resultados poderiam sugerir que a população evoluída do cruzamento PE-2 x SA-1, corresponderam em grande medida, a híbridos entre as duas linhagens.

Figura 13 - Perfis eletroforéticos de 15 colônias amostradas após a evolução adaptativa dos cruzamentos massais, entre a linhagem parental CAT-1 (perfis 1 a 15), PE-2 (perfis 16 a 30), SA-1 (31 a 45) e da mistura de haplóides das 3 linhagens parentais (PCS, perfis 121 a 150)

A figura 13 mostra que os produtos evoluídos do cruzamento massal pela mistura de haplóides obtidos das 3 linhagens parentais (PE-2, CAT-1 e SA-1), mostram mais semelhanças com as linhagens evoluídas a partir da linhagem SA-1,

considerando os perfis eletroforéticos. Igualmente ao se comparar com os cruzamentos massais entre linhagens, se nota mais semelhanças com aqueles envolvendo a linhagem SA-1, destacando a região de cromossomos médios destas linhagens, onde se observa uma maior conservação quanto ao polimorfismo cromossômico. Estes resultados sugerem que neste tipo de cruzamento (com todas as linhagens), a contribuição da linhagem SA-1 foi bastante intensa. No entanto esta análise visual ainda peca pela subjetividade devido à dificuldade de destacar diferenças entre as bandas eletroforéticas.

Figura 14 - Perfis eletroforéticos dos híbridos obtidos mediante os cruzamentos direcionados entre haplóides das linhagens PE-2 (1B a 18B), SA-1 (19B a 24B), CAT-1 (25B a 30B), PE-2 x CAT-1 (31B a 42B), PE-2 x SA-1 (43B a 51B) e CAT-1 x SA-1 (52B a 54B)

As informações da figura 14 permitem deduzir que os híbridos obtidos a partir da PE-2 (cariótipos 1B a 18B) apresentam perfis eletroforéticos únicos, diferentes daqueles observados tanto na linhagem parental como na população evoluída da mesma. A semelhança dos perfis de 3 colônias da mesma linhagem

(conduzida para todos os híbridos) mostra a segurança e a potencialidade da técnica de cariotipagem na tipificação de diferentes linhagens de *Saccharomyces*. No entanto se nota rearranjos cromossômicos discretos entre as colônias do mesmo híbrido (45B, da figura 14).

Os haplóides obtidos de cruzamentos unicamente com a linhagem SA-1 (19B a 24 B) mostraram cariótipos bem próximos daqueles encontrados nos produtos da evolução desta linhagem, mostrando novamente a estabilidade maior dos cromossomos da região mediana do gel desta linhagem quanto aos polimorfismos.

Os cariótipos 25B a 30B, oriundos de cruzamentos entre haplóides de CAT-1, apresentam alguma semelhança com aqueles oriundos da evolução desta linhagem. Os híbridos entre PE-2 e CAT-1 (perfis 31B a 42B) não mostraram semelhanças de cariótipos com os produtos dos cruzamentos massais entre estas linhagens, evidenciando variantes distintos dos observados na amostra anterior. Tais resultados se mostram interessantes, pois que sugerem geração de diversidade na evolução adaptativa mesmo a partir do mesmo material genético. A mesma figura 14 fornece a informação de que dentre os cariótipos dos híbridos entre PE-2 e SA-1 (cariótipos 43B a 51B), os perfis 43B a 45B são muito próximos ao perfil 87 da amostra PS (cruzamento massal entre PE-2 e SA-1). O mesmo ocorre com os perfis dos híbridos 49B a 51B e o cariótipo dominante do mesmo cruzamento massal (perfis 77, 78, 85, 85, 87, 88 e 90). Estes resultados sugerem que ocorreu hibridação nos cruzamentos massais envolvendo linhagens distintas.

Rearranjos cromossômicos podem ser gerados em linhagens industriais por eventos tanto mitóticos (LONGO; VÉZINHET, 1992) como meióticos (LOPES, 2000). No presente estudo intensos rearranjos cromossômicos foram observados, igualmente gerados por eventos meióticos (esporulação) e mitóticos (evolução adaptativa), e igualmente com grande possibilidade de resultar em maior diversidade genética.

As informações permitidas pelas análises de cariotipagem foram até certo ponto dificultadas pelos rearranjos cromossômicos já presentes nas linhagens parentais, notadamente a CAT-1, somadas à limitação das observações visuais das bandas e distúrbios no bandeamento dos cromossomos em função das variabilidades de cada gel. Mesmo assim, resumindo as informações obtidas, se pode presumir que os cruzamentos massais resultaram em híbridos intra- e inter-linhagens. Alguns híbridos, tipificados pela cariotipagem, foram gerados tanto no

cruzamento direcionado como no massal e no geral houve um aumento na variabilidade genética dos isolados, propiciada pelos rearranjos cromossômicos observados. Os resultados aqui apresentados vêm fortalecer a suposição da evolução de linhagens no processo industrial com reciclo de células (BASSO et al., 2008). Assim, a grande capacidade de esporulação dessas linhagens, as condições favoráveis para esporulação (ou início da mesma) em várias ocasiões do processo industrial (LOPES, 2000) e a pressão seletiva exercida pela fermentação industrial com reciclos, poderiam resultar em linhagens altamente adaptadas ao processo de produção de etanol.

5.6 Avaliação dos isolados cariotipados quanto à tolerância a múltiplos estresses

Todos os isolados cariotipados, num total de 174, incluindo redundâncias de linhagens (mesmo perfil eletroforético), foram avaliados em dois diferentes meios estressantes, mediante observação da biomassa formada (DO_{570nm}) em 24 horas empregando-se microplacas de 96 poços a 30°C. Nas avaliações no Meio 1 (mosto misto com 27% de ART) estiveram presentes os estresses osmótico (sais e açúcar), etanólico e a acidez do melaço, onde as linhagens mostraram diferentes graus de tolerância como apresentado nas figuras 15 a 21. As linhagens com DO próximas ou superiores em relação aos parentais (destacadas com tonalidade mais escura nas barras das figuras) foram selecionadas para o teste com o meio 8.

Figura 15 - Crescimentos dos isolados cariotipados avaliados após 24 horas em microplacas com Meio 1 (Mosto Misto 27% ART), provenientes dos cruzamentos massais entre haplóides da CAT-1 (isolados 46 a 60) e haplóides de PE-2 x CAT-1 (isolados 61 a 73), em comparação com as linhagens parentais (PE-2, CAT-1 e SA-1)

Figura 16 - Crescimentos dos isolados cariotipados avaliados após 24 horas em microplacas com Meio 1 (Mosto Misto 27% ART), provenientes dos cruzamentos massais entre haplóides de PE-2 x CAT-1 (isolados 74 e 75), haplóides de PE-2 x SA-1 (isolados 76 a 90) e haplóides de CAT-1 x SA-1 (isolados 91 a 101), em comparação com as linhagens parentais (PE-2, CAT-1 e SA-1)

Figura 17 - Crescimentos dos isolados cariotipados avaliados após 24 horas em microplacas com Meio 1 (Mosto Misto 27% ART), provenientes dos cruzamentos massais entre haplóides de CAT-1 x SA-1 (isolados 102 a 105), entre haplóides de PE-2 (isolados 106 a 120) e haplóides de PE-2 x CAT-1 x SA-1 (isolados 121 a 129), em comparação com as linhagens parentais (PE-2, CAT-1 e SA-1)

Figura 18 – Crescimentos dos isolados cariotipados avaliados após 24 horas em microplacas com Meio 1 (Mosto Misto 27% ART), provenientes dos cruzamentos massais entre haplóides de PE-2 x CAT-1 x SA-1 (isolados 130 a 150) e entre haplóides de SA-1 (isolados 150 a 157), em comparação com as linhagens parentais (PE-2, CAT-1 e SA-1)

Figura 19 - Crescimentos dos isolados cariotipados avaliados após 24 horas em microplacas com Meio 1 (Mosto Misto 27% ART), provenientes dos cruzamentos massais entre haplóides de SA-1 (isolados 158 a 165), em comparação com as linhagens parentais (PE-2, CAT-1 e SA-1)

Figura 20 - Crescimentos dos híbridos avaliados após 24 horas em microplacas com Meio 1 (Mosto Misto 27% ART), provenientes dos cruzamentos direcionados entre haplóides da PE-2 (1B a 18B), da SA-1 (19B a 24B) e da CAT-1 (25B a 28B), em comparação com as linhagens parentais (PE-2, CAT-1 e SA-1)

Figura 21 - Crescimentos dos híbridos avaliados após 24 horas em microplacas com Meio 1 (Mosto Misto 27% ART), provenientes dos cruzamentos direcionados entre haplóides da CAT-1 (29B e 30B), de PE-2 x CAT-1 (31B a 42B), de PE-2 x SA-1 (43B a 51B) e CAT-1 x SA-1 (52B a 54B), em comparação com as linhagens parentais (PE-2, CAT-1 e SA-1)

Da mesma forma os mesmos 174 isolados cariotipados foram avaliados no Meio 2 (YEPD acrescido de 10% de etanol). Em tal meio procurou-se linhagens com capacidade de crescimento em meio já com elevado teor de etanol, pois que tal situação fisiológica estará presente em fermentações com alto teor alcoólico. Tais dados, dispostos nas Figuras 22 a 28, mostram grandes variabilidades neste parâmetro, evidenciando muitas linhagens com grande sensibilidade a esse nível de etanol presente no meio. Como no Meio 1, as linhagens com crescimentos iguais ou superiores aos parentais (barras destacadas pela coloração mais escura) foram selecionadas para a etapa seguinte. Em alguns casos (figuras 22 e 28), mesmo linhagens com menores crescimentos que as parentais foram consideradas, pelo fato do baixo crescimento exibido pelas linhagens do lote avaliado. Comparando-se os dois meios (1 e 2), percebe-se uma ação muito mais estressante exercida pelo Meio 2 sobre as linhagens testadas, o que se conclui pelos menores valores de DO_{570nm} apresentados neste meio (menores que a metade, como igualmente observado para as linhagens parentais). Portanto, as avaliações nos dois diferentes meios fornecem resultados complementares quanto às tolerâncias das linhagens testadas.

Figura 22 - Crescimentos dos isolados cariotipados avaliados após 24 horas em microplacas com Meio 2 (YEPD + 10% etanol), provenientes dos cruzamentos massais entre haplóides da CAT-1 (isolados 46 a 60) e haplóides de PE-2 x CAT-1 (isolados 61 a 73), em comparação com as linhagens parentais (PE-2, CAT-1 e SA-1)

Figura 23 - Crescimentos dos isolados cariotipados avaliados após 24 horas em microplacas com Meio 2 (YEPD + 10% etanol), provenientes dos cruzamentos massais entre haplóides de PE-2 x CAT-1 (isolados 74 e 75), haplóides de PE-2 x SA-1 (isolados 76 a 90) e haplóides de CAT-1 x SA-1 (isolados 91 a 101), em comparação com as linhagens parentais (PE-2, CAT-1 e SA-1)

Figura 24 - Crescimentos dos isolados cariotipados avaliados após 24 horas em microplacas com Meio 2 (YEPD + 10% etanol), provenientes dos cruzamentos massais entre haplóides de CAT-1 x SA-1 (isolados 102 a 105), entre haplóides de PE-2 (isolados 106 a 120) e haplóides de PE-2 x CAT-1 x SA-1 (isolados 121 a 129), em comparação com as linhagens parentais (PE-2, CAT-1 e SA-1)

Figura 25 - Crescimentos dos isolados cariotipados avaliados após 24 horas em microplacas com Meio 2 (YEPD + 10% etanol), provenientes dos cruzamentos massais entre haplóides de PE-2 x CAT-1 x SA-1 (isolados 130 a 150) e entre haplóides de SA-1 (isolados 150 a 157), em comparação com as linhagens parentais (PE-2, CAT-1 e SA-1)

Figura 26 - Crescimentos dos isolados cariotipados avaliados após 24 horas em microplacas com Meio 2 (YEPD + 10% etanol), provenientes dos cruzamentos massais entre haplóides de SA-1 (isolados 158 a 165), em comparação com as linhagens parentais (PE-2, CAT-1 e SA-1)

Figura 27 - Crescimentos dos híbridos avaliados após 24 horas em microplacas com Meio 2 (YEPD + 10% etanol), provenientes dos cruzamentos direcionados entre haplóides da PE-2 (1B a 18B), da SA-1 (19B a 24B) e da CAT-1 (25B a 28B), em comparação com as linhagens parentais (PE-2, CAT-1 e SA-1)

Figura 28 - Crescimentos dos híbridos avaliados após 24 horas em microplacas com Meio 2 (YEPD + 10% etanol), provenientes dos cruzamentos direcionados entre haplóides da CAT-1 (29B e 30B), de PE-2 x CAT-1 (31B a 42B), de PE-2 x SA-1 (43B a 51B) e CAT-1 x SA-1 (52B a 54B), em comparação com as linhagens parentais (PE-2, CAT-1 e SA-1)

A seleção através dos Meios 1 e 2 permitiu destacar 84 linhagens com tolerância a alguns estresses presentes na fermentação industrial. No entanto os isolados selecionados não se mostraram muitos superiores aos parentais, razão pela qual os mesmos foram submetidos a uma nova avaliação, meio com múltiplos estresses (Meio 8). Tal meio foi formulado com 15% ART, 6,7% de etanol, pH 3,5 e adições dos ácidos acético e láctico, fatores estressantes estes presentes numa fermentação com alto teor alcoólico. Em tal meio estresses múltiplos foram aplicados, dando-se a oportunidade de avaliar os efeitos sinérgicos (DORTA et al., 2006) dos estresses sobre os isolados. Tal meio se mostrou capaz de discriminar ainda mais os isolados oriundos das etapas anteriores, evidenciando linhagens com

maiores e menores tolerâncias em relação aos parentais (figuras 29, 30 e 31), sendo selecionados 27 isolados, destacados pelas colunas em coloração mais escura.

Os ácidos orgânicos fracos (como o acético), quando em meio com valores de pH abaixo do pK (4,47), como acontece na fermentação industrial, se mostram predominantemente na forma protonizada ($\text{CH}_3\text{-COOH}$), forma esta que atravessa a membrana plasmática, se dissocia e promove a acidificação do citoplasma celular (WALKER, 1998). Na dissociação destes ácidos, no interior da célula, são gerados prótons (H^+) que devem ser translocados para o exterior mediante a denominada bomba de prótons (H^+ - ATPase da membrana plasmática) com consumo de ATP. Em condições de limitação de fonte de carbono (como no tratamento ácido) as reservas de carboidratos (glicogênio e trealose) sofrem “fermentação endógena” propiciando este ATP necessário à expulsão dos H^+ , porém, a exaustão das reservas (especialmente a trealose), causa a morte celular (GUTIERREZ et al., 1991; BASSO et al., 1996; WALKER, 1998; GARRAY-ARROYO et al., 2004).

Figura 29 – Crescimentos dos isolados após seleção no meio 1 e 2 avaliados após 24 horas em microplacas com Meio 8 (Estresse etanólico, osmótico e ácido), provenientes dos cruzamentos massais entre haplóides de CAT-1 (isolados 46, 55, 56 e 60), haplóides de PE-2 x CAT-1 (isolados 63, 64, 65, 72 e 73), haplóides de PE-2 x SA-1 (isolados 77, 78, 81, 83, 85, 86, 87 e 88), haplóides de CAT-1 x SA-1 (isolados 99, 100 e 103), haplóides de PE-2 (isolados 107, 109 e 110) e haplóides de PE-2 x CAT-1 x SA-1 (isolados 121, 123, 124 e 125), em comparação com as linhagens parentais (PE-2, CAT-1 e SA-1)

Figura 30 – Crescimentos dos isolados após seleção no meio 1 e 2 avaliados após 24 horas em microplacas com Meio 8 (Estresse etanólico, osmótico e ácido), provenientes dos cruzamentos massais entre haplóides de CAT-1 (isolados 48, 50 e 52), haplóides de PE-2 x SA-1 (isolado 84), haplóides de CAT-1 x SA-1 (isolados 91, 93, 96, 98, 102 e 105), haplóides de PE-2 x CAT-1 x SA-1 (isolados 122, 127, 128, 129, 130, 132, 133, 134, 136, 137 e 149), haplóides de SA-1 (isolado 164), haplóides de PE-2 x CAT-1 x SA-1 (isolados 121, 123, 124 e 125) e provenientes do cruzamento direcionado entre haplóides de PE-2 (1B, 3B, 4B e 6B), em comparação com as linhagens parentais (PE-2, CAT-1 e SA-1)

Figura 31 – Crescimentos dos isolados após seleção no meio 1 e 2 avaliados após 24 horas em microplacas com Meio 8 (Estresse etanólico, osmótico e ácido), provenientes dos cruzamentos direcionados entre haplóides de PE-2 (isolados 13B a 18B), haplóides de SA-1 (isolados 19B a 23B), haplóides de PE-2 x CAT-1 (isolados 31B a 42B), haplóides de PE-2 x SA-1 (isolados 45B a 51B) e haplóides de CAT-1 x SA-1 (isolados 52 a 54B), em comparação com as linhagens parentais (PE-2, CAT-1 e SA-1)

Particularmente interessante vem a ser a observação de que 3 colônias oriundas do mesmo híbrido (19B, 20B e 21B, da figura 31) apresentaram diferentes desempenhos no meio 8, evidenciando o surgimento de variantes com diferentes fenótipos, porém mantendo o mesmo perfil eletroforético. O mesmo pode ser notado em relação aos isolados 152 a 157 da Figura 25, que mesmo mostrando perfis eletroforéticos idênticos, teve um deles (isolado 155), menor crescimento no meio YEPD acrescido de etanol. Tais resultados sugerem que a análise de cariotipagem é bem segura para a determinação da origem genética do variante, mas não prevê os atributos fisiológicos do mesmo.

5.7 EXPERIMENTO 1: Pré-Seleção mediante avaliação com ciclos fermentativos

Os 27 isolados da etapa anterior foram submetidos a novo procedimento seletivo, agora com ciclos fermentativos. Assim foram conduzidos 11 ciclos fermentativos com incrementos graduais nos teores de açúcares dos mostos (de 12 a 31,5% de ART), resultando em incrementos nos teores finais de etanol e impondo situações estressantes igualmente graduais. Assumiu-se que os efeitos estressantes foram repetidos e crescentes, sendo que ao final do último ciclo as linhagens mais tolerantes poderiam se destacar. Assim, dentre os vários parâmetros avaliados no final do último ciclo, se observa diferentes teores de biomassa acumulada (figura 32) e pequenas variações nos teores de etanol (figura 33) e viabilidade celular (figura 33) entre os diferentes isolados. Nesta pré-seleção com ciclos, os estresses osmótico e etanólico foram exacerbados, sendo que a biomassa o parâmetro mais alterado (figura 32).

O estresse etanólico interfere no metabolismo e biossíntese de macromoléculas, na estrutura e funções da membrana plasmática (especialmente na permeabilidade da mesma), resultando em perda de biomassa e viabilidade (WALKER, 1998).

É importante salientar o efeito sinérgico entre os vários estresses (DORTA et al., 2006) e o resultante aumento na energia de manutenção da levedura sob condições desfavoráveis. Tal aumento na energia de manutenção promoveria um desvio de ATP em detrimento da formação de biomassa (ALVES, 1994).

Todos estes fatores levariam a uma queda da viabilidade da levedura, porém, no período de 11 ciclos fermentativos não foi possível notar grandes diferenças entre as linhagens (figura 34). Optou-se por priorizar os isolados com as maiores viabilidades (77, 85, 91, 17B e 35B), os quais ainda manifestaram valores adequados de acúmulo de biomassa, exceto o isolado 91. A rigor, a maior parte dos isolados deveriam ser avaliados, mas as limitações do tempo exigido para tal, restringiram para um lote de 5 isolados, os quais foram submetidos ao último teste para a comprovação de suas características fermentativas.

Figura 32 – Valores de biomassas das linhagens ao final do 11º ciclo. Leveduras derivadas dos cruzamentos massais entre PE-2 x SA-1 (isolados 77 a 86), CAT-1 x SA-1 (isolado 91 a 103) e PE-2 x CAT-1 x SA-1 (isolados 122 a 137) e derivadas dos cruzamentos direcionados entre haplóides de PE-2 (isolado 4B a 17B), haplóides de SA-1 (isolados 19B a 23B), haplóides de PE-2 x CAT-1 (isolado 35B), haplóides de PE-2 x SA-1 (isolados 46B e 51B) e haplóides de CAT-1 x SA-1 (isolados 51B e 54B), em comparação com as linhagens parentais (FT134L, PE-2 e CAT-1)

Figura 33 – Concentrações de etanol no vinho ao final do 11º ciclo. Leveduras derivadas dos cruzamentos massais entre PE-2 x SA-1 (isolados 77 a 86), CAT-1 x SA-1 (isolado 91 a 103) e PE-2 x CAT-1 x SA-1 (isolados 122 a 137) e derivadas dos cruzamentos direcionados entre haplóides de PE-2 (isolado 4B a 17B), haplóides de SA-1 (isolados 19B a 23B), haplóides de PE-2 x CAT-1 (isolado 35B), haplóides de PE-2 x SA-1 (isolados 46B e 51B) e haplóides de CAT-1 x SA-1 (isolados 51B e 54B), em comparação com as linhagens parentais (FT134L, PE-2 e CAT-1)

Figura 34 – Valores percentuais de viabilidade das linhagens ao final do 11º ciclo. Leveduras derivadas dos cruzamentos massais entre PE-2 x SA-1 (isolados 77 a 86), CAT-1 x SA-1 (isolado 91 a 103) e PE-2 x CAT-1 x SA-1 (isolados 122 a 137) e derivadas dos cruzamentos direcionados entre haplóides de PE-2 (isolado 4B a 17B), haplóides de SA-1 (isolados 19B a 23B), haplóides de PE-2 x CAT-1 (isolado 35B), haplóides de PE-2 x SA-1 (isolados 46B e 51B) e haplóides de CAT-1 x SA-1 (isolados 51B e 54B), em comparação com as linhagens parentais (FT134L, PE-2 e CAT-1)

5.8 EXPERIMENTO 2: Avaliação final dos isolados mediante fermentação com alta densidade de células e ciclos fermentativos

Nesta última avaliação, o experimento foi desenhado para simular, tanto quanto possível, as condições de uma fermentação com alto teor alcoólico e com ciclos fermentativos. Para tal os teores de açúcares foram aumentados gradativamente para resultar em teores alcoólicos que variaram de cerca de 8 a 14% (v/v) de etanol ao longo dos ciclos. Como no ensaio anterior, os estresses osmótico e etanólico estiveram presentes, assim como outros fatores associados aos mostos industriais (melaço). As fermentações igualmente foram conduzidas com teores de biomassa encontrados nas fermentações industriais, na faixa de 8 a 11% de biomassa úmida no transcorrer dos ciclos fermentativos. Tal condição de densidade celular impõe também um estresse nutricional: deficiências de alguns nutrientes minerais e orgânicos, incluindo as vitaminas.

Os dados de viabilidade celular (figura 35) mostram o híbrido 35B com valores comparáveis aos da linhagem PE-2 ao longo dos 8 ciclos, enquanto as demais linhagens se mostraram mais sensíveis. Tal híbrido apresenta valores de viabilidades superiores ao do parental CAT-1.

Curiosamente os ganhos em biomassa ao longo dos ciclos foram semelhantes para todas as linhagens, exceto para a CAT-1 e o isolado 85 (figura 36).

Os teores de etanol foram iguais para todas as linhagens durante todos os ciclos, exceto para a linhagem 17B, que apresentou menores valores deste parâmetro nos dois últimos ciclos (Figura 37). Os menores valores de etanol observados no híbrido 17B decorrem da incapacidade desta linhagem em metabolizar eficientemente os açúcares do mosto, resultando em maiores teores de açúcares residuais nos vinhos (Figura 38). Os teores de açúcares residuais foram baixos ao longo dos ciclos, se elevando a partir do ciclo 7 e atingindo valores comprometedores no ciclo 8 (Figura 38). Entre os açúcares residuais os teores de frutose se mostraram mais elevados (Figura 44), demonstrando que a limitação no consumo dos açúcares do mosto se restringe principalmente a possível comprometimento do transporte desta hexose.

Tais elevações nos níveis de açúcares residuais mostram os efeitos deletérios da fermentação com alto teor alcoólico para a maior parte das linhagens. Mesmo assim o híbrido 35B apresentou valores de açúcares residuais inferiores, inclusive em relação aos valores das linhagens parentais (PE-2 e CA-1), demonstrando uma grande vantagem desta nova linhagem para as fermentações industriais. Para destacar este benefício, a diferença entre os teores de açúcares residuais da PE-2 e do híbrido 35B (0,20%), permitiria que o híbrido produzisse 1% a mais de etanol com a mesma quantidade de açúcar presente no mosto. Este adicional de rendimento alcoólico é muito difícil de ser estimado, tanto na destilaria como no ensaio de laboratório (o erro experimental em laboratório é, no mínimo, maior que 2-3%). Porém, como a metodologia para a dosagem de açúcares residuais é mais apurada, supõe-se que este álcool adicional poderia ser produzido, embora difícil de ser mensurado. Para uma destilaria com capacidade de produção de 1 milhão de litros de etanol diários, o ganho seria de 10.000 litros/dia.

O rendimento fermentativo (figura 39) é calculado com base no teor alcoólico ao final de cada ciclo, e igualmente se mostra inferior para a linhagem 17B, sendo possível verificar que tal parâmetro se mostra afetado, em relação às demais linhagens, já a partir do ciclo 5. Por outro lado tal parâmetro apresentado pelo híbrido 35B se mostra igual ou superior àqueles dos parentais em todos os ciclos (exceto o primeiro ciclo).

Os teores de glicerol gerados pelo híbrido 35B foram menores quando comparados com as demais linhagens, inclusive os parentais (figura 40). Esta tendência é observada ao longo dos 8 ciclos fermentativos. A alta concentração de açúcar e sais no melaço exerce um efeito osmótico estressante para células de leveduras principalmente em fermentações com alto teor alcoólico, provocando a saída de água das células e afetando seu crescimento possivelmente através do bloqueio no ciclo celular. Como resposta a esta condição a levedura acumula glicerol que opera como um osmólito compatível, buscando minimizar o efeito desidratante do meio (ALVES, 1994; BAI; ZHAO, 2012). Assim se pode especular que as linhagens que mais produziram glicerol foram aquelas que sentiram mais intensamente o estresse osmótico.

O glicerol é o subproduto mais abundantemente produzido na fermentação alcoólica, sendo responsável pelo desvio de 5 a 8% do açúcar metabolizado pela levedura, razão pela qual a sua redução é considerada como uma interessante estratégia para aumentar o rendimento em etanol (BASSO et al., 2011).

Este composto é produzido pela mesma via de síntese do etanol, como um desvio, competindo com este pela utilização do poder redutor (NADH), motivo pelo qual sua produção é inversamente proporcional a do etanol (BASSO et al., 1996). Por outro lado elevações nas formações de glicerol estão também associadas a diversas condições inadequadas à fermentação (contaminação bacteriana, alta pressão osmótica, excesso de potássio no mosto, presença do sulfito, etc.) sendo que a sua produção em excesso geralmente reflete condições gerais de estresse para as leveduras (BASSO et al., 2011).

Assim se pode inferir que as menores formações de glicerol pelo híbrido 35B podem estar refletindo uma maior tolerância do mesmo aos estresses impostos neste experimento. Igualmente esta menor formação de glicerol poderia estar contribuindo para possíveis incrementos na eficiência fermentativa desta linhagem.

Os teores mais elevados dos carboidratos de reserva observados no híbrido 35B (figuras 41 e 42) reforçam a sua capacidade de melhor suportar os estresses impostos neste experimento. A trealose está envolvida com a tolerância a vários estresses (térmico, etanólico, osmótico, ácido, etc.), todos presentes no presente experimento. O efeito protetor da trealose já foi evidenciado em diversas linhagens e em várias condições fisiológicas de diferentes processos industriais,

enquanto o glicogênio se mostra como fonte de energia em condições de limitação de açúcar (ALVES, 1994). O efeito protetor da trealose está associado tanto à proteção das enzimas glicolíticas contra a desnaturação em situação de estresses, como também mantendo a integridade e a permeabilidade da membrana plasmática, igualmente afetada por vários estresses, inclusive aqueles impostos no presente experimento (PANEK, 1995). A observação que o total de reservas (glicogênio e trealose) se apresentam maiores no híbrido 35B (Figura 43) vem a ser uma garantia de que esta linhagem venha a melhor suportar os estresses da fermentação.

Nas condições mais estressantes do experimento (ciclo 8) se verifica que o híbrido 35B também apresenta uma maior velocidade de fermentação, avaliada pela liberação de CO₂ ao longo dos ciclos (Figura 45), e tal constatação sugere um maior vigor fermentativo para esta linhagem.

Belloch et al. (2007) igualmente utilizaram da hibridação para aumentar tolerância de linhagens quanto aos estresses da fermentação do vinho. Tais pesquisadores produziram híbridos de *Saccharomyces bayanus*, *S. kudriavzevii* e *S. cerevisiae* que se mostraram mais adaptados ao crescimento, resistindo a altas concentrações de glicose, baixo pH em elevadas concentrações de etanol (12% e 15%), quando comparados com os parentais *S. bayanus* e *S. kudriavzevii*. Porém, a tolerância não foi maior que a parental *S. cerevisiae*, sugerindo que os híbridos herdaram a característica dessa linhagem.

Para certificar que ocorreu a hibridação das linhagens isoladas no presente trabalho, realizou-se avaliação e confirmação da ploidia de todas elas mediante teste de esporulação em meio RA. Constatou-se que todos os isolados apresentaram esporos sendo, portanto leveduras diplóides (2n).

Aqui o híbrido 35B apresenta diversas vantagens sobre as demais linhagens avaliadas e mesmo sobre os seus parentais, as cepas PE-2 e CAT-1. Estas cepas parentais (PE-2 e CAT-1) apresentam grande capacidade de implantação em fermentações industriais, sendo a PE-2 ligeiramente superior à CAT-1 (BASSO et al., 2008). Neste experimento foi possível diferenciar o desempenho destas duas linhagens em fermentações com ciclos e alto teor alcoólico. Esta constatação é de particular interesse, pois que esta superioridade do híbrido 35B aqui demonstrada, o coloca como um excelente candidato a ser introduzido nas fermentações industriais, aumentando assim a oferta de novas linhagens tolerantes aos ciclos. Tal resultado se reveste de grande significado

prático, pois que atualmente os mostos são formulados unicamente com melaço e consequentemente mais estressantes às leveduras.

Digno de menção é o fato de que as linhagens parentais (PE-2 e CAT-1) vem sendo empregadas nas destilarias brasileiras há mais de 15 anos (safras), onde são submetidas a cerca de 2 ciclos diários durante 200-250 dias que compreende o período de safra (BASSO et al., 2008). Com os dados da Figura 36 é possível estimar que o crescimento de biomassa a cada ciclo é cerca de 10% da biomassa inicial, tomando-se uma média entre as linhagens avaliadas (considerando-se a partir do primeiro para o quarto ciclo, onde os teores de etanol estão ao redor daqueles praticados na indústria). Dados da indústria, mais grosseiros, apontam uma recirculação do fermento na ordem de 95%, ou seja, se perde apenas 5% da biomassa a cada ciclo, perda esta estimada na etapa de centrifugação. No entanto existem outras perdas, como descarte de fundo de dorna e sangrias de fermento, sendo plausível uma remoção de no máximo cerca de 10% da biomassa da dorna ao final de cada ciclo fermentativo. Com este valor estima-se, grosso modo, que a biomassa praticamente duplica a cada 10 ciclos (1 geração), e portanto em 250 dias de ciclo teria 25 gerações. Neste trabalho foram conduzidas cerca de 80 gerações na evolução adaptativa das linhagens, que igualmente permitiram o surgimento de vários rearranjos cromossômicos, assim como observados nas destilarias. (LOPES, 2000; BASSO et al., 2008).

Pode-se especular que estas linhagens, e aqui um destaque para as linhagens PE-2 e CAT-1, vem, desde há muito (antes do seu isolamento em 1993 e 1998, respectivamente) se adaptando aos processos industriais (BASSO et al., 2008). Em função da plasticidade de seus genomas (ARGUESO et al., 2009; STAMBUK et al., 2012) tais linhagens evoluíram na fermentação industrial após testarem muitas possibilidades de combinações gênicas, propiciadas por eventos meióticos e mitóticos. Assim se pode entender porque o híbrido 35B, embora com atributos favoráveis, se apresenta com ganhos modestos em relação aos parentais. Em outras palavras, é pouca a margem para a melhoria destas linhagens, porém, mesmo pequenos ganhos como demonstrado no presente trabalho seriam de grande impacto no processo industrial.

VIABILIDADE

Figura 35 – Valores percentuais de viabilidade das linhagens ao longo dos 8 ciclos fermentativos. Leveduras derivadas dos cruzamentos massais entre PE-2 x SA-1 (isolados 77 e 85), CAT-1 x SA-1 (isolado 91) e derivadas dos cruzamentos direcionados entre haplóides de PE-2 (isolado 17B) e PE-2 x CAT-1 (isolado 35B), em comparação com as linhagens parentais (PE-2 e CAT-1). Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si, ao nível de 5% de significância, dentro de cada ciclo

BIOMASSA

Figura 36 – Valores de biomassa das linhagens ao longo dos 8 ciclos fermentativos. Leveduras derivadas dos cruzamentos massais entre PE-2 x SA-1 (isolados 77 e 85), CAT-1 x SA-1 (isolado 91) e derivadas dos cruzamentos direcionados entre haplóides de PE-2 (isolado 17B) e PE-2 x CAT-1 (isolado 35B), em comparação com as linhagens parentais (PE-2 e CAT-1). Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si, ao nível de 5% de significância, dentro de cada ciclo

Figura 37 – Concentração de etanol no vinho durante os 8 ciclos fermentativos. Leveduras derivadas dos cruzamentos massais entre PE-2 x SA-1 (isolados 77 e 85), CAT-1 x SA-1 (isolado 91) e derivadas dos cruzamentos direcionados entre haplóides de PE-2 (isolado 17B) e PE-2 x CAT-1 (isolado 35B), em comparação com as linhagens parentais (PE-2 e CAT-1). Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si, ao nível de 5% de significância, dentro de cada ciclo

Figura 38 – Teores de açúcares residuais (%) no vinho durante os 8 ciclos fermentativos. Leveduras derivadas dos cruzamentos massais entre PE-2 x SA-1 (isolados 77 e 85), CAT-1 x SA-1 (isolado 91) e derivadas dos cruzamentos direcionados entre haplóides de PE-2 (isolado 17B) e PE-2 x CAT-1 (isolado 35B), em comparação com as linhagens parentais (PE-2 e CAT-1). Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si, ao nível de 5% de significância, dentro de cada ciclo

RENDIMENTO FERMENTATIVO

Figura 39 – Porcentagem do rendimento fermentativo durante os 8 ciclos. Leveduras derivadas dos cruzamentos massais entre PE-2 x SA-1 (isolados 77 e 85), CAT-1 x SA-1 (isolado 91) e derivadas dos cruzamentos direcionados entre haplóides de PE-2 (isolado 17B) e PE-2 x CAT-1 (isolado 35B), em comparação com as linhagens parentais (PE-2 e CAT-1). Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si, ao nível de 5% de significância, dentro de cada ciclo

GLICEROL

Figura 40 – Concentrações de glicerol (%) no vinho ao longo dos 8 ciclos fermentativos. Leveduras derivadas dos cruzamentos massais entre PE-2 x SA-1 (isolados 77 e 85), CAT-1 x SA-1 (isolado 91) e derivadas dos cruzamentos direcionados entre haplóides de PE-2 (isolado 17B) e PE-2 x CAT-1 (isolado 35B), em comparação com as linhagens parentais (PE-2 e CAT-1). Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si, ao nível de 5% de significância, dentro de cada ciclo

Figura 41 – Teores de trealose (%) no vinho durante os 8 ciclos fermentativos. Leveduras derivadas dos cruzamentos massais entre PE-2 x SA-1 (isolados 77 e 85), CAT-1 x SA-1 (isolado 91) e derivadas dos cruzamentos direcionados entre haplóides de PE-2 (isolado 17B) e PE-2 x CAT-1 (isolado 35B), em comparação com as linhagens parentais (PE-2 e CAT-1). Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si, ao nível de 5% de significância, dentro de cada ciclo

Figura 42 – Teores de glicogênio (%) no vinho durante os 8 ciclos fermentativos. Leveduras derivadas dos cruzamentos massais entre PE-2 x SA-1 (isolados 77 e 85), CAT-1 x SA-1 (isolado 91) e derivadas dos cruzamentos direcionados entre haplóides de PE-2 (isolado 17B) e PE-2 x CAT-1 (isolado 35B), em comparação com as linhagens parentais (PE-2 e CAT-1). Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si, ao nível de 5% de significância, dentro de cada ciclo

RESERVAS TOTAIS (CICLO 8)

Figura 43 – Teores de reservas totais (glicogênio mais trealose) (%) no vinho do último ciclo fermentativo (8). Leveduras derivadas dos cruzamentos massais entre PE-2 x SA-1 (isolados 77 e 85), CAT-1 x SA-1 (isolado 91) e derivadas dos cruzamentos direcionados entre haplóides de PE-2 (isolado 17B) e PE-2 x CAT-1 (isolado 35B), em comparação com as linhagens parentais (PE-2 e CAT-1). Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si, ao nível de 5% de significância, dentro de cada ciclo

AÇUCARES RESIDUAIS (CICLO 8)

Figura 44 – Teores de frutose, glicose e sacarose residuais (%) no vinho do último ciclo fermentativo (8). Leveduras derivadas dos cruzamentos massais entre PE-2 x SA-1 (isolados 77 e 85), CAT-1 x SA-1 (isolado 91) e derivadas dos cruzamentos direcionados entre haplóides de PE-2 (isolado 17B) e PE-2 x CAT-1 (isolado 35B), em comparação com as linhagens parentais (PE-2 e CAT-1). Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si, ao nível de 5% de significância, dentro de cada ciclo

Figura 45 – Velocidade de fermentação pelo desprendimento de CO₂ ao longo das 23 horas do ciclo 8. Leveduras derivadas dos cruzamentos massais entre PE-2 x SA-1 (isolados 77 e 85), CAT-1 x SA-1 (isolado 91) e derivadas dos cruzamentos direcionados entre haplóides de PE-2 (isolado 17B) e PE-2 x CAT-1 (isolado 35B), em comparação com as linhagens parentais (PE-2 e CAT-1)

6 CONCLUSÕES

As leveduras industriais utilizadas como parentais apresentam alta taxa de esporulação, esporos viáveis, facilitando a obtenção de haplóides para geração de uma maior diversidade de linhagens

A evolução adaptativa em meios com intensidades graduais de estresses levou às linhagens com melhor perfil de tolerância a estresses encontrados no ambiente industrial de produção de etanol

Vários parâmetros fisiológicos devem ser considerados para a seleção da linhagem com as características desejadas, devido às inter-relações fisiológicas e bioquímicas entre tais parâmetros.

A técnica da cariotipagem eletroforética é de grande valia para a identificação da origem genética da linhagem, porém não se presta para prever o desempenho fisiológico ou tecnológico dos isolados, mesmo com idênticos perfis de bandejamento cromossômico.

A superioridade do híbrido gerado, embora evidente, é modesta. Tal fato possivelmente se deva às muitas combinações gênicas já naturalmente testadas durante safras, nas quais um processo de evolução adaptativa estaria ocorrendo.

O híbrido resultante se mostrou superior aos parentais em relação a vários parâmetros fisiológicos, bioquímicos e tecnológicos, conferindo ao mesmo o privilégio de ser um candidato para experimentar as condições estressantes da fermentação industrial na atualidade (alta proporção de melaço e o desejável elevado teor alcoólico).

Os atributos apresentados pelo híbrido selecionado poderiam contribuir para uma melhora na eficiência da fermentação industrial.

REFERÊNCIAS

ALVES, D.M.G. **Fatores que afetam a formação de ácidos orgânicos, bem como outros parâmetros de fermentação alcoólica.** 1994. 251 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1994.

_____. **Respostas fisiológicas de duas linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* frente ao potássio durante a fermentação alcoólica.** 2000. 118 p. Tese (Doutorado em Microbiologia Aplicada) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Rio Claro, 2000.

AMORIM, H.V.; LEÃO, R.M. **Fermentação alcoólica: ciência e tecnologia.** Piracicaba: Fermentec, 2005. 448 p.

AMORIM, H.V.; LOPES, M.L.; OLIVEIRA, J.V.C.; BUCKERIDGE, M.S.; GOLDMAN, G.H. Scientific challenges of bioethanol production in Brazil. **Applied Microbiology Biotechnology**, Oxford, v. 91, p. 1267-1275, 2011.

ANDRIETTA, M.G.S.; STECKELBERG, C.; ANDRIETTA, S.R. Bioetanol – Brasil, 30 anos na vanguarda. **MultiCiência: Construindo a história dos produtos naturais**, São Carlos, v. 7, p. 1-16, 2006.

ANDRIETTA, S.R. 25 Anos de fermentação: o que aprendemos? In: SEMANA DE FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA, 25., 2010, Piracicaba. Piracicaba: STAB, 2010. v. 5, p. 1-44.

ARGUESO, J.L.; CARAZZOLLE, M.F.; MIECZKOWSKI, P.A.; DUARTE, F.M.; NETTO, O.V.C.; MISSAWA, S.K.; GALZERANI, F.; COSTA, G.G.L.; VIDAL, R.O.; NORONHA, M.F.; DOMINSKA, M.; ANDRIETTA, M.G.S.; ANDRIETTA, S.R.; CUNHA, A.F.; GOMES, L.H.; TAVARES, F.C.A.; ALCARDE, A.R.; DIETRICH, F.S.; MCCUSKER, J.H.; PETES, T.D.; PEREIRA, G.A.G. Genome structure of a *Saccharomyces cerevisiae* strain widely used in bioethanol production. **Genome Research**, Cold Spring Harbor, v. 19, p. 2271-2278, 2009.

ATTFIELD, P.V. Stress tolerance: the key to effective strains of industrial baker's yeast. **Nature Biotechnology**, New York, v. 15, p. 1351-1357, 1997.

AZEVEDO, J.L. Fungos. **Biotechnologia Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, n. 1, p. 12-15, 1997.

BAI, F.W.; ZHAO, X.Q. High gravity ethanol fermentation and yeast tolerance. **Microbial Stress Tolerance for Biofuels.** Microbiology Monographs, Peoria, v. 22, p. 117-135, 2012.

BAI, F.W.; CHEN, L.J.; ZHANG, Z.; ANDERSON, W.A.; MOO-YOUNG, M. Continuous ethanol production and evaluation of yeast cell lysis and viability loss under very high gravity medium conditions. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 110, p. 287-293, 2004.

BAJWA, P.K.; PINEL, D.; MANTIN, V.J.J.; TREVORS, J. T.; LEE, H. Strain improvement of the pentose-fermenting yeast *Pichia stipitis* by genome shuffling. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 81, p. 179-186, 2010.

BASSO, L.C.; PAULILLO, S.C.L. Estudo comparativo entre a levedura “turbo” e a PE-2 para fermentações com elevados teores alcoólicos. In: ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA “LUIZ DE QUEIROZ”. **Relatório anual de pesquisas em fermentação alcoólica**. Piracicaba, 2003. p. 12-25.

BASSO, L.C.; ALVES, D.M.G.; AMORIM, H.V. Fermentação alcoólica e alguns fatores que afetam o desempenho fermentativo. In: ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA “LUIZ DE QUEIROZ”. **Processo de produção de álcool: controle e monitoramento**. 2. ed. Piracicaba: FERMENTEC; FEALQ; ESALQ, 1996. p. 38-84.

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.

BASSO, L.C.; AMORIM, H.V.; OLIVEIRA, A.J.; LOPES, M.L. Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil. **FEMS Yeast Research**, Amsterdam, v.8, p. 1155-1163, 2008.

BASSO, L.C.; OLIVEIRA, A.J.; ORELLI, V.F.D.M.; CAMPOS, A.A.; GALLO, C.R.; AMORIM, H.V. Dominância das leveduras contaminantes sobre as linhagens industriais avaliada pela técnica da cariotipagem. In: CONGRESSO NACIONAL DA STAB, 5., 1993, Águas de São Pedro. **Anais...** Piracicaba: STAB, 1993. v. 1, p. 246-250.

BASSO, T.O.; KOK, S.; DARIO, M.; ESPIRITO-SANTO, J.C.A.; MÜLLER, G.; SCHLÖG, P.S.; SILVA, C.P.; TONSO, A.; DARAN, J.; GOMBERT, A.K.; VAN MARIS, A.J.A.; PRONK J.T.; STAMBUK, B.U. Engineering topology and kinetics of sucrose metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* for improved ethanol yield. **Metabolic Engineering**. Amsterdam, v. 13, p. 694-703, 2011b.

BAYROCK, D.P.; INGLEDEW, W.M. Application of multistage continuous fermentation for production of fuel alcohol by very-high-gravity fermentation technology. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Hampshire, v. 27, p. 87-93. 2001.

BELLOCH, C.; ORLIC, S.; BARRIO, E.; QUEROL, A. Fermentative stress adaptation of hybrids within the *Saccharomyces sensu stricto* complex. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 122, p. 188-195, 2008.

BLONDIN, B.; VÉZINHET, F. Identification de souches de levure oenologiques par leur caryotypes obtenus en electrophorese en champ pulse. **Revue Française d'Oenologie**, Paris, v. 28, p. 7-11, 1988.

BRUMM, P.J.; HEBEDA, R.E. Glycerol production in industrial alcohol fermentations. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 10, p. 677-682, 1988.

BUTLER, P.R.; BROWN, M.; OLIVER, S.G. Improvement of antibiotic titers from *Streptomyces* bacteria by interactive continuous selection. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 49, p. 185–196, 1996.

ÇAKAR, Z.P.; SEKER, U.O.S.; TAMERLER, C.; SONDEREGGER, M.; SAUER, U. Evolutionary engineering of multiple-stress resistant *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Yeast Research**, Malden, v. 5, p. 569-578, 2005.

CODÓN, A.C.; BENÍTEZ, T.; KORHOLA, M. Chromosomal reorganization during meiosis of *Saccharomyces cerevisiae* baker's yeasts. **Current Genetics**, New York, v. 32, p. 247-259, 1997.

DORTA, C.; OLIVA-NETO, P.; ABREU-NETO, M.S.; NICOLAU-JUNIOR, N.; NAGASHIMA, A.I. Synergism among lactic acid, sulfite, pH and ethanol in alcoholic fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* (PE-2 and M-26). **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Oxford, v. 22, p. 177-182, 2006.

ESPÓSITO, R.E.; KLAPHOLZ, S. Meioses and ascospore development. In: STRATHERN, J.N.; JONES, E.W.; BROACH, J.R.; (Ed.). **The molecular biology of the yeast *Saccharomyces cerevisiae***. New York: CSH Laboratory, 1981. v. 69, p. 211-287.

FIERRO, F.; MARTIN, J.F. Molecular mechanisms of chromosomal rearrangement in fungi. **Critical Reviews in Microbiology**, Boca Raton, v. 25, p. 1-17, 1999.

FIGUEIREDO, R. **Principais combustíveis**. Disponível em: <http://www.ebah.com.br/content/ABAAAAH_kAD/principais-combustiveis>. Acesso em: 26 fev. 2012.

FOWELL, R.R. Sporulation and hybridization of yeast. **The Yeast**, New York, v. 1, p. 303-384, 1969.

GARAY-ARROYO, A.; COVARRUBIAS, A.A.; CLARK, I.; NIÑO, I.; GOSSET, G.; MARTINEZ, A. Response to different environmental stress conditions of industrial and laboratory *Saccharomyces cerevisiae* strains. **Applied Microbiology Biotechnology**, Oxford, v. 63, p. 734–741, 2004.

GIUDICI, P.; SOLIERI, L.; PULVIRENTI, A.M.; CASSANELLI, S. Strategies and perspectives for genetic improvement of wine yeasts. **Applied Microbiology Biotechnology**, Oxford, v. 66, p. 622-628, 2005.

GONG, J.; ZHENG, H.; WU, Z.; CHEN, T.; ZHAO, X. Genome shuffling: progress and applications for phenotype improvement. **Biotechnology Advances**. New York, v. 27, p. 996-1005, 2009.

GRAZZIOTIN, D.; ANDREAZZA, A.C.; SALVADOR, M. Avaliação de compostos com atividade antioxidante em células da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 41, p. 95-100, 2005.

GUIMARÃES, P.M.R.; FRANCOIS, J., PARROU, J.L., TEIXEIRA, J.A.; DOMINGUES, L. Adaptive evolution of a lactose-consuming *Saccharomyces cerevisiae* recombinant. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 74, p. 1748-1756, 2008.

GUIMARÃES, T.M. **Identificação e seleção de cepas de levedura *Saccharomyces cerevisiae* para elaboração de vinho**. 2005. 101 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

GUTIERREZ, L.E.; BASSO, L.C.; AMORIM, H.V. Inibidores da fermentação alcoólica. **STAB. Açúcar, Álcool e Subprodutos**, Piracicaba, v. 9, p. 24-30, 1991.

HABER, J.E. Mating-type gene switching in *Saccharomyces cerevisiae*. **Annual Review of Genetics**, Palo Alto, v. 32, p. 561-599, 1998.

HARBER, J.E.; HALVORSON, H.O. Methods in sporulation and germination of yeast. **Methods in Cell Biology**, New York, v. 6, p. 46-47. 1975

HOU, L. Novel methods of genome shuffling in *Saccharomyces Cerevisiae*. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 31, p. 671-677, 2009.

_____. Improved production of ethanol by novel genome shuffling in *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v.160, p. 1084-1093, 2010.

HU, X.H.; WANG, M.H.; TAN, T.; LI, J.R.; YANG, H.; LEACH, L.; ZHANG, R.M.; LUO, Z.W. Genetic dissection of ethanol tolerance in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Genetics Society of America**. Bethesda, v. 175, p. 1479-1487, 2007.

IBETO, C.N.; OFOEFULE, A.U.; AGBO, K.E. A global overview of biomass potentials for bioethanol production: a renewable alternative fuel. **Trends in Applied Sciences Research**, New York, v. 6, p. 410-425, 2011.

INFANTE, J.J. Genome-wide amplifications caused by chromosomal rearrangements play a major role in the adaptive evolution of natural yeast. **Genetics Society of America**, Bethesda, v. 165, p. 1745-1759, 2003.

LALUCE, C. Current aspects of fuel ethanol production in Brazil. **Critical Reviews in Biotechnology**, Boca Raton, v. 11, p. 149-161, 1991.

LAOPAIBOON, L.; NUANPENG, S.; SRINOPHAKUN, P.; PREEKAMOL, K.; LAOPAIBOON, P. Ethanol production from sweet sorghum juice using very high gravity technology: Effects of carbon and nitrogen supplementations. **Bioresource Technology**, Essex, v. 100, p. 4176-4182, 2009.

LI, F.; ZHAO, X.Q.; GE, X.M.; BAI, F.W. An innovative consecutive batch fermentation process for very-high-gravity ethanol fermentation with self-flocculating yeast. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 84, p. 1079-1086, 2009.

LILLIE, S.H.; PRINGLE, J.R. Reserve carbohydrate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*: response to nutrient limitation. **Journal of Bacteriology**. Washington, v. 143, p. 1384-1394, 1980.

LITI, G.; LOUIS, E.J. Yeast evolution and comparative genomics. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 59, p. 135-153, 2005.

LIU, E.; HU, Y. Construction of a xylose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae* strain by combined approaches of genetic engineering, chemical mutagenesis and evolutionary adaptation. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, v. 48, p. 204-210, 2010.

LONGO, E.; VEZINHET, F. Chromosomal rearrangements during vegetative growth of a wild strain of *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 59, p. 322–326, 1993.

LOPES, M.L. **Estudo do polimorfismo cromossômico em *Saccharomyces cerevisiae* (linhagem PE-2) utilizada no processo industrial de produção de etanol**. 2000. 118 p. Tese (Doutorado em Microbiologia Aplicada) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Rio Claro, 2000.

MA, M.; LIU, Z.L. Mechanisms of ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**. Oxford, v. 87, p. 829-845, 2010.

MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; PARKER, J. **Microbiologia de Brock**. São Paulo: Prentice-Hall, 2004. 624 p.

MORTIMER, R.K.; HAWTHORNE, D.C. Yeast genetics. In: ROSE, A.H.; HARRISON, J.S. (Ed.). **The yeast**. New York: Academic Press, 1969. v. 1, p. 386-460.

MYERS, D.K.; LAWLOR, D.T.; ATTFIELD, P.V. Influence of invertase activity and glycerol synthesis and retention on fermentation of media with high sugar concentration by *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied and Environmental Microbiology**. Washington, v. 63, p. 145-150, 1997.

NADAL, D.; CARRO, D.; FERNÁNDEZ-LARREA, J.; PIÑA, B. Analysis and dynamics of the chromosomal complements of wild sparkling-wine yeast strains. **Applied and Environmental Microbiology**. Washington, v. 65, p. 1688-1695, 1999.

NEIMAN, A.M. Ascospore formation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, New York, v. 69, p. 565-584, 2005.

OLIVEIRA, A.A.C. **Estudo fisiológico e morfológico da aplicação de estresse eletroquímico em cultivos de levedura**. 2009. 89 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.

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. 89 p.

OSTERGAARD, S.; OLSSON, L.; NIELSEN, J. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, New York, v. 64, p. 34-50, 2000.

OURA, E. Reaction products of yeast fermentations. **Process Biochemistry**, London, v. 12, p. 19-35, 1977.

PACHECO, T.F. **Fermentação alcoólica com leveduras de características floculantes em reator tipo torre com escoamento ascendente**. 2010. 94 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2010.

PACHECO, T.F. **Produção de etanol: primeira ou segunda geração?** Disponível em: <<http://www.embrapa.br/imprensa/artigos/2011/producao-de-etanol-primeira-ou-segunda-geracao/>> Acesso em: 23 mar. 2012.

PANEK, A.D. Trehalose metabolism: new horizons in technological applications. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 28, p. 169-181, 2005.

PATNAIK, R.; LOUIE, S.; GAVRILOVIC, V.; PERRY, K.; STEMMER, W.P.C.; RYAN, C.M.; DEL CARDAYRÉ, S. Genome shuffling of lactobacillus for improved acid tolerance. **Nature Biotechnology**, New York, v. 20, p. 707-712, 2002.

PELCZAR, J.R.; M.J.; CHAN, E.C.S.; KRIEG, N.R. **Microbiologia: conceitos e aplicações**. 2. ed. São Paulo: Makron Books, 1997. v. 1.

PÉREZ-ORTÍN, J.E.; QUEROL, A.; PUIG, S.; BARRIO, E. Molecular characterization of a chromosomal rearrangement involved in the adaptive evolution of yeast strains. **Genome Research**, Cold Spring Harbor, v. 12, p. 1533-1539, 2002.

RANDEZ-GIL, F.; SANZ, P.; PRIETO, J.A. Engineering baker's yeast: room for improvement. **Trends in Biotechnology**, Amsterdam, v. 17, p. 237-244, 1999.

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**, Lancaster, v. 12, n. 5, p. 411-412, 1984.

ROMAN, H. Development of yeast as an experimental organisms. In: STRATHERN, J.N.; JONES, E.W.; BROACH, J.R. (Ed.). **The molecular biology of the yeast *Saccharomyces cerevisiae***. New York: CSH Laboratory, 1981. v. 1, p. 1-9.

ROMANO, P.; SOLI, M.G.; SUZZI, G. ; GRAZIA, L.; ZAMBONELLI, C. Improvment of a wine *Saccharomyces cerevisiae* strain by a breeding program. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 50, p. 1064-1087, 1985.

SANTOS, C.A. **Álcool gel: a revolução**. Disponível em: <http://www.freedom.inf.br/artigos_tecnicos/20020409/89_90.asp>. Acesso em: 20 mar. 2012.

SAUER, U. Evolutionary engineering of industrially important microbial phenotypes. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, Berlin, v. 73, p. 130-166, 2001.

SHI, D.; WANG, C.; WANG, K. Genome shuffling to improve thermotolerance, ethanol tolerance and ethanol productivity of *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Hampshire, v. 36, p. 139-147, 2009.

SIMPÓSIO INTERNACIONAL E MOSTRA DE TECNOLOGIA E ENERGIA CANAVIEIRA. **Painel Fermentec**, Piracicaba, 2010.

SIPICZKI, M. Diversity, variability and fast adaptive evolution of the wine yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) genome: a review. **Annual Review of Microbiology**. Palo Alto, v. 61, p. 85-93, 2011.

SOUZA, C.S. **Avaliação da produção de etanol em temperaturas elevadas por uma linhagem de *S. cerevisiae***. 2009. 136 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto Butantã, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

STAMBUK, B.U.; AMORIM, H.V.; OLIVEIRA, A.J.; BASSO, L.C.; SHAFER, R.W.; NYREN, P.; BABRZADEH, F.; JALILI, C.; WANG, S.; SHOKRALLA, S.; PIERCE, S.; ROBINSON-MOSHER, A.; DAVIS, W.; RONAGH, M.; GHARIZADEH, B. Whole-genome sequencing of the efficient industrial fuel-ethanol fermentative *Saccharomyces cerevisiae* strain CAT-1. **Molecular Genetics and Genomics**, Berlin, 2012. In Press.

STANLEY, D.; BANDARA, A.; FRASER, S.; CHAMBERS, P.J.; STANLEY, G.A. The ethanol stress response and ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 109, p. 13-24, 2010.

STEPHANOPOULOS, G. Metabolic engineering by genome shuffling. **Nature Biotechnology**, New York, v. 20, p. 666-668, 2002.

THOMAS, K.C.; HYNES, S.H.; INGLEDEW, W.M. Practical and theoretical considerations in the production of high concentrations of alcohol by fermentation. **Process Biochemistry**, London, v 31, p. 321-331, 1996.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. **Microbiology**. 8th ed. Berkeley: Artmed, 2008. 920 p.

UNIÃO DA INDÚSTRIA DE CANA-DE-AÇÚCAR. **Fortalecer parceria Brasil-EUA: caminho para o mercado global de etanol**. Disponível em: <<http://www.unica.com.br/noticias/show.asp?nwsCode=%7B3931AA62-76B6-41E7-A214-039D3E977E6E%7D>>. Acesso em: 04 abr. 2012.

WALKER, G.M. **Yeast physiology and biotechnology**. Chichester: John-Wiley, 1998. 350 p.

WEINGRILL, N. **Quais as diferenças entre o álcool de cana e o de milho?** Disponível em: <<http://super.abril.com.br/alimentacao/quais-diferencas-alcool-cana-milho-446893.shtml>>. Acesso em: 15 fev. 2012.

WHEALS, A.E.; BASSO, L.C.; ALVES, D.M.G.; AMORIM, H.V. Fuel ethanol after 25 years. **Trends in Biotechnology**, Amsterdam, v. 17 p. 461-506, 1999.

WIENKEM, A. Trehalose in yeast, stress protectant rather than reserve carbohydrate. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 58, p. 209-217, 1990.

ZAGO, E.A.; SILVA, F.L.F.; BERNARDINO, C.D.; AMORIM, H.V. **Métodos analíticos para o controle da produção de álcool**. Piracicaba: FERMENTEC; FEALQ, ESALQ, 1996. 194 p.

ZANG, Y.X.; PERRY, K.; VINCI, V.A.; POWELL, K.; STEMMER, W.P.C.; CARDAYRÉ, S.B. Genome shuffling leads to rapid phenotypic improvement in bacteria. **Nature**, London, v. 415, p. 644-646, 2002.

ZHAO, X.Q., BAI, F. W. Mechanisms of yeast stress tolerance and its manipulation for efficient fuel ethanol production. **Journal of Biotechnology**. Amsterdam, v. 144, p. 23-30, 2009.

ANEXOS

ANEXO A

Tabela 3 – Resultados de viabilidade celular (%) do experimento 2 ao final dos 8 ciclos fermentativos. Leveduras derivadas dos cruzamentos massais entre PE-2 x SA-1 (isolados 77 e 85), CAT-1 x SA-1 (isolado 91) e derivadas dos cruzamentos direcionados entre haplóides de PE-2 (isolado 17B) e PE-2 x CAT-1 (isolado 35B), em comparação com as linhagens parentais (PE-2 e CAT-1)

Linhagens	VIABILIDADE (%)							
	1	2	3	4	5	6	7	8
PE-2	93,45	87,8	91,6	92,46	93,31	88,92	88,51	90,25
	92,49	90,1	92,1	90,32	88,54	90,36	90,04	88,4
	92,06	92,5	91,6	88,93	86,26	90,09	86,46	85,9
Média	92,67	90,13	91,77	90,57	89,37	89,79	88,34	88,18
CAT-1	92,92	89,3	92,1	89,26	86,41	80,57	81,22	83,81
	95,19	86,7	91,1	89,15	87,2	85,91	80,46	81,46
	85,25	87,3	89,9	86,91	83,91	85,15	80,9	79,67
Média	91,12	87,77	91,03	88,44	85,84	83,88	80,86	81,65
77	94,81	91,4	94,7	92,44	90,17	85,6	75,7	83,88
	90,02	87	89,7	90,15	90,59	86,98	79,41	75,5
	91,12	91,2	90,5	88,29	86,08	83,07	80,28	80,63
Média	91,98	89,87	91,63	90,29	88,95	85,22	78,46	80,00
85	82,11	83,2	87,4	87,10	86,79	81,86	79,19	83,33
	92,65	83	87,3	87,49	87,68	79,57	76,64	80
	75	75,4	76,2	78,44	80,67	80,6	82,35	81,15
Média	83,25	80,53	83,63	84,34	85,05	80,68	79,39	81,49
91	85,12	82,6	86,3	85,02	83,73	84,83	77,57	82,27
	85,27	87,6	86,4	84,96	83,52	81,12	76,9	79,15
	86,79	85,5	88,2	85,67	83,13	81,51	81,84	81,32
Média	85,73	85,23	86,97	85,21	83,46	82,49	78,77	80,91
17B	84,93	80,5	87,2	87,83	88,45	80,61	78,76	81,85
	75,61	87,6	79,9	80,32	80,74	76,6	82,09	79,89
	82,44	76,4	86,8	83,97	81,13	80,72	81,71	76,14
Média	80,99	81,50	84,63	84,04	83,44	79,31	80,85	79,29
35B	91,84	87,6	82,2	85,77	89,33	90,16	91,26	89,8
	88,52	91,4	88,6	88,75	88,89	91,49	87,77	83,2
	87,68	88,6	92	90,92	89,83	87,67	88,66	84,81
Média	89,35	89,20	87,60	88,48	89,35	89,77	89,23	85,94

ANEXO B

Tabela 4 – Resultados de biomassa celular (%) do experimento 2 ao final dos 8 ciclos fermentativos. Leveduras derivadas dos cruzamentos massais entre PE-2 x SA-1 (isolados 77 e 85), CAT-1 x SA-1 (isolado 91) e derivadas dos cruzamentos direcionados entre haplóides de PE-2 (isolado 17B) e PE-2 x CAT-1 (isolado 35B), em comparação com as linhagens parentais (PE-2 e CAT-1)

Linhagens	BIOMASSA (g)							
	1	2	3	4	5	6	7	8
PE-2	3,75	4,23	4,88	5,18	5,21	5,27	5,15	5,09
	3,52	4,02	4,78	5,16	5,23	5,27	5,24	5,15
	3,69	4,18	4,86	5,20	5,26	5,35	5,26	5,20
	3,65	4,14	4,84	5,18	5,23	5,30	5,22	5,15
CAT-1	3,64	3,88	4,46	4,80	4,85	4,92	4,92	4,92
	3,57	3,75	4,36	4,69	4,78	4,85	4,83	4,82
	3,60	3,87	4,47	4,85	4,91	5,01	4,97	4,97
	3,60	3,83	4,43	4,78	4,85	4,93	4,91	4,90
77	3,76	4,20	4,72	5,05	5,07	5,17	5,10	5,04
	3,54	3,91	4,50	4,95	5,01	5,08	5,06	5,04
	3,64	4,00	4,56	4,93	5,00	5,10	5,02	4,97
	3,65	4,04	4,59	4,98	5,03	5,12	5,06	5,02
85	3,74	4,12	4,55	4,75	4,70	4,77	4,76	4,79
	3,53	3,77	4,19	4,61	4,58	4,73	4,65	4,73
	3,49	3,68	4,06	4,57	4,62	4,73	4,70	4,74
	3,59	3,86	4,27	4,64	4,63	4,74	4,70	4,75
91	3,57	4,06	4,59	4,93	4,97	5,03	4,95	4,94
	3,60	3,99	4,49	4,92	5,00	5,04	5,04	5,05
	3,46	3,93	4,60	5,00	5,06	5,12	5,11	5,09
	3,54	3,99	4,56	4,95	5,01	5,06	5,03	5,03
17B	3,45	3,93	4,48	4,89	4,95	5,00	5,00	4,95
	3,41	3,82	4,41	4,84	4,92	5,01	5,01	4,95
	3,13	3,55	4,20	4,70	4,90	4,99	5,00	5,18
	3,33	3,77	4,36	4,81	4,92	5,00	5,00	5,03
35B	3,70	4,17	4,74	5,15	5,17	5,24	5,24	5,07
	3,60	3,99	4,60	5,04	5,05	5,15	5,14	5,11
	3,61	4,11	4,59	4,97	4,97	5,04	5,02	4,92
	3,64	4,09	4,64	5,05	5,06	5,14	5,13	5,03

ANEXO C

Tabela 5 – Resultados de teores de etanol (%) do experimento 2 ao final dos 8 ciclos fermentativos. Leveduras derivadas dos cruzamentos massais entre PE-2 x SA-1 (isolados 77 e 85), CAT-1 x SA-1 (isolado 91) e derivadas dos cruzamentos direcionados entre haplóides de PE-2 (isolado 17B) e PE-2 x CAT-1 (isolado 35B), em comparação com as linhagens parentais (PE-2 e CAT-1)

Linhagens	ETANOL (%)							
	1	2	3	4	5	6	7	8
PE-2	7,10	7,46	9,02	9,92	11,36	12,44	13,62	14,44
	7,22	7,52	9,00	9,96	11,44	12,46	13,68	14,56
	7,16	7,50	8,96	10,02	11,38	12,54	13,94	14,54
Média	7,16	7,49	8,99	9,97	11,39	12,48	13,75	14,51
CAT-1	7,34	7,50	8,88	9,98	11,28	12,36	13,46	14,22
	7,32	7,50	9,08	9,96	11,32	12,40	13,56	14,26
	7,42	7,52	8,84	9,98	11,38	12,36	13,56	13,96
Média	7,36	7,51	8,93	9,97	11,33	12,37	13,53	14,15
77	7,12	7,44	9,16	10,08	11,48	12,44	13,70	14,34
	7,18	7,52	8,44	10,08	11,38	12,44	13,68	14,40
	7,22	7,50	9,08	10,10	11,40	12,60	13,76	14,10
Média	7,17	7,49	8,89	10,09	11,42	12,49	13,71	14,28
85	7,04	7,50	9,24	10,04	11,42	12,52	13,60	14,22
	7,10	7,40	9,10	10,08	11,52	12,44	13,50	13,84
	7,10	7,54	9,22	10,04	11,36	12,36	13,54	13,86
Média	7,08	7,48	9,19	10,05	11,43	12,44	13,55	13,97
91	7,12	7,32	8,92	10,02	11,50	12,46	13,46	14,34
	7,16	7,42	8,90	10,00	11,40	12,38	13,52	14,50
	7,14	7,40	8,90	9,88	11,42	12,44	13,56	14,52
Média	7,14	7,38	8,91	9,97	11,44	12,43	13,51	14,45
17B	6,80	7,28	9,04	9,92	11,28	12,30	13,16	12,88
	6,78	7,32	9,00	9,90	11,22	12,24	13,12	13,20
	6,80	7,30	9,00	10,02	11,22	12,20	13,22	14,04
Média	6,79	7,30	9,01	9,95	11,24	12,25	13,17	13,37
35B	7,10	7,52	9,04	10,08	11,54	12,46	13,68	14,56
	7,04	7,68	8,80	10,02	11,50	12,50	13,60	14,70
	7,12	7,60	9,28	10,10	11,54	12,66	13,94	14,12
Média	7,09	7,60	9,04	10,07	11,53	12,54	13,74	14,46

ANEXO D

Tabela 6 – Resultados de açúcares residuais (% ART) do experimento 2 no vinho final dos 8 ciclos fermentativos. Leveduras derivadas dos cruzamentos massais entre PE-2 x SA-1 (isolados 77 e 85), CAT-1 x SA-1 (isolado 91) e derivadas dos cruzamentos direcionados entre haplóides de PE-2 (isolado 17B) e PE-2 x CAT-1 (isolado 35B), em comparação com as linhagens parentais (PE-2 e CAT-1)

Linhagens	ART (%)							
	1	2	3	4	5	6	7	8
PE-2	0,001	0,033	0,044	0,023	0,038	0,036	0,105	0,410
	0,021	0,018	0,077	0,068	0,038	0,047	0,174	0,471
	0,000	0,000	0,063	0,045	0,055	0,035	0,091	0,443
	0,007	0,017	0,061	0,045	0,044	0,039	0,123	0,441
CAT-1	0,013	0,013	0,149	0,068	0,090	0,031	0,000	0,534
	0,073	0,016	0,019	0,044	0,038	0,034	0,048	0,540
	0,012	0,000	0,015	0,048	0,038	0,067	0,065	0,540
	0,033	0,010	0,061	0,053	0,055	0,044	0,038	0,538
77	0,025	0,092	0,035	0,001	0,045	0,062	0,088	0,819
	0,023	0,047	0,048	0,035	0,046	0,078	0,084	0,547
	0,039	0,004	0,021	0,047	0,041	0,048	0,121	0,696
	0,029	0,048	0,034	0,027	0,044	0,063	0,098	0,687
85	0,069	0,033	0,034	0,085	0,038	0,088	0,049	1,058
	0,020	0,043	0,037	0,100	0,040	0,094	0,082	0,994
	0,018	0,047	0,039	0,000	0,039	0,109	0,103	1,106
	0,036	0,041	0,037	0,062	0,039	0,097	0,078	1,053
91	0,029	0,079	0,028	0,055	0,058	0,071	0,094	0,323
	0,015	0,039	0,074	0,042	0,034	0,053	0,056	0,295
	0,030	0,043	0,046	0,023	0,041	0,049	0,062	0,175
	0,025	0,054	0,049	0,040	0,045	0,057	0,070	0,264
17B	0,029	0,036	0,024	0,103	0,034	0,061	0,381	1,936
	0,000	0,074	0,027	0,037	0,043	0,082	0,418	1,921
	0,020	0,072	0,075	0,049	0,045	0,066	0,338	1,817
	0,016	0,061	0,042	0,063	0,041	0,070	0,379	1,891
35B	0,013	0,006	0,039	0,058	0,037	0,052	0,052	0,332
	0,108	0,037	0,059	0,042	0,036	0,075	0,173	0,375
	0,045	0,085	0,052	0,076	0,000	0,067	0,000	0,321
	0,055	0,043	0,050	0,059	0,024	0,065	0,075	0,343

ANEXO E

Tabela 7 – Resultados de rendimento fermentativo (%) do experimento 2 ao final dos 8 ciclos fermentativos. Leveduras derivadas dos cruzamentos massais entre PE-2 x SA-1 (isolados 77 e 85), CAT-1 x SA-1 (isolado 91) e derivadas dos cruzamentos direcionados entre haplóides de PE-2 (isolado 17B) e PE-2 x CAT-1 (isolado 35B), em comparação com as linhagens parentais (PE-2 e CAT-1)

Linhagens	RENDIMENTO FERMENTATIVO (%)							
	1	2	3	4	5	6	7	8
PE-2	81,28	80,46	89,72	89,49	92,77	92,12	93,45	91,12
	81,87	84,91	92,89	95,85	97,72	97,80	97,86	97,36
	82,45	84,69	92,66	95,91	97,53	97,50	100,64	97,63
Média	81,86	83,35	91,76	93,75	96,01	95,81	97,32	95,37
CAT-1	85,15	84,81	92,03	95,86	95,94	96,47	96,38	95,38
	85,07	85,10	93,43	95,11	96,63	96,74	97,05	95,27
	86,11	84,78	91,34	96,02	97,10	96,96	97,02	93,73
Média	85,44	84,90	92,27	95,66	96,55	96,72	96,81	94,79
77	81,81	83,72	95,45	95,68	97,89	97,77	98,15	95,26
	82,45	85,20	86,93	96,70	97,25	97,44	98,07	96,56
	82,95	85,08	94,00	96,28	97,42	97,44	98,68	94,28
Média	82,40	84,66	92,13	96,22	97,52	97,55	98,30	95,37
85	80,92	84,35	94,45	94,13	97,39	96,90	96,83	93,43
	81,50	83,80	94,87	95,87	97,93	96,66	96,90	92,34
	81,15	85,09	96,08	95,34	97,26	96,64	97,21	91,91
Média	81,19	84,41	95,13	95,12	97,53	96,73	96,98	92,56
91	80,66	82,85	92,88	95,43	97,83	96,93	95,59	95,54
	81,73	84,14	92,16	95,18	97,69	96,37	96,87	96,75
	81,05	83,99	93,39	93,92	98,29	96,95	97,73	96,76
Média	81,14	83,66	92,81	94,84	97,94	96,75	96,73	96,35
17B	77,90	82,85	93,44	93,94	96,01	95,83	94,30	85,65
	78,07	82,97	93,42	94,36	95,40	95,64	93,99	88,14
	71,78	82,94	93,97	94,39	96,09	95,81	95,22	94,31
Média	75,91	82,92	93,61	94,23	95,83	95,76	94,51	89,37
35B	82,36	85,18	93,42	95,54	98,54	96,92	97,77	94,76
	81,37	86,43	90,26	93,78	98,67	98,11	97,28	98,56
	82,29	86,10	93,64	95,09	98,96	98,35	100,24	93,87
Média	82,01	85,91	92,44	94,80	98,72	97,79	98,43	95,73

ANEXO F

Tabela 8 – Resultados da concentração de glicerol (%) do experimento 2 ao final dos 8 ciclos fermentativos. Leveduras derivadas dos cruzamentos massais entre PE-2 x SA-1 (isolados 77 e 85), CAT-1 x SA-1 (isolado 91) e derivadas dos cruzamentos direcionados entre haplóides de PE-2 (isolado 17B) e PE-2 x CAT-1 (isolado 35B), em comparação com as linhagens parentais (PE-2 e CAT-1)

Linhagens	GLICEROL (%)							
	1	2	3	4	5	6	7	8
PE-2	0,340	0,348	0,503	0,548	0,572	0,443	0,619	0,721
	0,331	0,429	0,420	0,575	0,465	0,700	0,723	0,693
	0,364	0,466	0,574	0,581	0,564	0,664	0,706	0,693
	Média	0,345	0,414	0,499	0,568	0,534	0,602	0,703
CAT-1	0,288	0,414	0,496	0,611	0,616	0,714	0,689	0,735
	0,291	0,387	0,573	0,543	0,535	0,688	0,754	0,765
	0,286	0,440	0,533	0,554	0,640	0,702	0,550	0,731
	Média	0,288	0,414	0,534	0,569	0,597	0,702	0,744
77	0,380	0,509	0,479	0,523	0,534	0,635	0,549	0,711
	0,369	0,428	0,528	0,556	0,508	0,665	0,737	0,682
	0,335	0,445	0,518	0,562	0,516	0,632	0,675	0,690
	Média	0,361	0,461	0,508	0,547	0,519	0,644	0,694
85	0,476	0,477	0,641	0,601	0,651	0,688	0,696	0,704
	0,364	0,499	0,600	0,579	0,631	0,727	0,710	0,705
	0,364	0,476	0,569	0,655	0,623	0,750	0,704	0,710
	Média	0,401	0,484	0,603	0,612	0,635	0,722	0,706
91	0,457	0,495	0,658	0,504	0,670	0,717	0,288	0,720
	0,410	0,451	0,569	0,619	0,654	0,704	0,755	0,696
	0,361	0,376	0,602	0,564	0,547	0,688	0,536	0,766
	Média	0,409	0,441	0,610	0,562	0,624	0,703	0,727
17B	0,359	0,489	0,578	0,565	0,527	0,664	0,696	0,719
	0,423	0,517	0,588	0,607	0,487	0,672	0,710	0,703
	0,426	0,546	0,608	0,599	0,505	0,629	0,704	0,723
	Média	0,403	0,517	0,591	0,590	0,506	0,655	0,715
35B	0,319	0,409	0,483	0,492	0,447	0,517	0,619	0,738
	0,298	0,419	0,506	0,486	0,461	0,583	0,515	0,685
	0,337	0,425	0,452	0,479	0,366	0,624	0,565	0,566
	Média	0,318	0,418	0,480	0,486	0,424	0,575	0,663

ANEXO G

Tabela 9 – Resultados dos teores de trealose, glicogênio e reservas totais (trelose + glicogênio) expressos em porcentagem ao final do último ciclo (8º) do experimento 2. Leveduras derivadas dos cruzamentos massais entre PE-2 x SA-1 (isolados 77 e 85), CAT-1 x SA-1 (isolado 91) e derivadas dos cruzamentos direcionados entre haplóides de PE-2 (isolado 17B) e PE-2 x CAT-1 (isolado 35B), em comparação com as linhagens parentais (PE-2 e CAT-1)

Linhagens	Trealose	Glicogênio	Reservas Totais
PE-2	7,49	6,99	14,48
	6,78	7,84	14,62
	6,60	7,97	14,57
Média	6,96	7,60	14,56
CAT-1	5,53	15,75	21,27
	5,78	14,31	20,08
	6,05	14,94	20,99
Média	5,79	15,00	20,78
77	8,80	12,19	20,99
	7,60	11,96	19,56
	8,09	11,45	19,54
Média	8,16	11,87	20,03
85	7,50	9,47	16,97
	5,54	7,03	12,57
	6,69	7,44	14,14
Média	6,58	7,98	14,56
91	7,32	12,34	19,67
	8,11	12,03	20,14
	8,49	12,50	21,00
Média	7,97	12,29	20,27
17B	6,12	8,88	15,00
	6,28	8,30	14,57
	4,99	8,02	13,01
Média	5,80	8,40	14,19
35B	9,90	16,92	26,82
	10,14	17,51	27,64
	9,39	17,82	27,20
Média	9,81	17,42	27,22

ANEXO H

Tabela 10 – Resultados da concentração dos açúcares residuais glicose, frutose e sacarose (%) no vinho ao final do último ciclo fermentativo (8^o) do experimento 2. Leveduras derivadas dos cruzamentos massais entre PE-2 x SA-1 (isolados 77 e 85), CAT-1 x SA-1 (isolado 91) e derivadas dos cruzamentos direcionados entre haplóides de PE-2 (isolado 17B) e PE-2 x CAT-1 (isolado 35B), em comparação com as linhagens parentais (PE-2 e CAT-1)

Linhagens	Frutose	Glicose	Sacarose
PE-2	0,406	<0,010	0,016
	0,397	0,074	<0,010
	0,372	0,072	<0,010
Média	0,392	0,073	0,016
CAT-1	0,456	0,070	0,035
	0,467	0,072	0,007
	0,464	0,076	<0,010
Média	0,462	0,073	0,021
77	0,735	0,073	0,056
	0,540	<0,010	0,032
	0,621	0,076	<0,010
Média	0,632	0,074	0,044
85	1,043	<0,010	0,075
	0,921	0,067	0,028
	1,016	0,075	0,070
Média	0,993	0,071	0,058
91	0,238	0,072	0,064
	0,215	0,072	0,035
	0,109	0,057	0,044
Média	0,188	0,067	0,048
17B	1,749	0,187	<0,010
	1,738	0,183	<0,010
	1,649	0,168	0,000
Média	1,712	0,179	0,000
35B	0,243	0,080	0,044
	0,292	0,073	0,052
	0,271	0,050	<0,010
Média	0,269	0,068	0,048

ANEXO I

Tabela 11 – Resultados do desprendimento de CO₂ (g) (%) ao longo das 23 horas do último ciclo fermentativo (8^o) do experimento 2. Leveduras derivadas dos cruzamentos massais entre PE-2 x SA-1 (isolados 77 e 85), CAT-1 x SA-1 (isolado 91) e derivadas dos cruzamentos direcionados entre haplóides de PE-2 (isolado 17B) e PE-2 x CAT-1 (isolado 35B), em comparação com as linhagens parentais (PE-2 e CAT-1)

Linhagens	CO ₂ (g)				
	2h	4h	6h	8h	23h
PE-2	1,00	1,68	2,35	2,92	4,14
	0,99	1,66	2,33	2,91	4,22
	0,98	1,65	2,33	2,92	4,16
Média	0,99	1,66	2,34	2,92	4,17
CAT-1	0,86	1,50	2,15	2,76	4,05
	0,89	1,53	2,18	2,80	4,07
	0,87	1,52	2,17	2,80	4,06
Média	0,87	1,52	2,17	2,79	4,06
77	0,90	1,55	2,20	2,79	4,05
	0,91	1,57	2,24	2,82	4,11
	0,89	1,52	2,17	2,77	4,05
Média	0,90	1,55	2,20	2,79	4,07
85	0,82	1,45	2,05	2,64	3,90
	0,84	1,46	2,07	2,66	3,96
	0,85	1,48	2,07	2,66	3,93
Média	0,84	1,46	2,06	2,65	3,93
91	0,96	1,64	2,28	2,92	4,14
	0,97	1,65	2,32	2,99	4,19
	0,97	1,67	2,33	2,97	4,18
Média	0,97	1,65	2,31	2,96	4,17
17B	0,80	1,40	1,98	2,52	3,69
	0,80	1,41	2,00	2,54	3,67
	0,80	1,41	2,06	2,65	3,74
Média	0,80	1,41	2,01	2,57	3,70
35B	0,96	1,63	3,57	4,18	5,40
	0,92	1,57	2,24	2,85	4,13
	1,01	1,66	2,31	2,92	4,21
Média	0,96	1,62	2,71	3,32	4,58