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

**Melhoramento de *Saccharomyces cerevisiae* mediante cruzamento massal
para produção de etanol 2G em fermentações com reciclo de células**

Osni Florêncio Junior

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

**Piracicaba
2017**

Osni Florêncio Junior
Tecnólogo em Biocombustíveis

**Melhoramento de *Saccharomyces cerevisiae* mediante cruzamento massal para
produção de etanol 2G em fermentações com reciclo de células**
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
2017

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

Florêncio Junior, Osni

Melhoramento de *Saccharomyces cerevisiae* mediante cruzamento massal para produção de etanol 2G em fermentações com reciclo de células / Osni Florêncio Junior. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2017.

87 p.

Dissertação (Mestrado) - - USP / Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”.

1. *Saccharomyces cerevisiae* 2. Hidrolisado lignocelulósico 3. Hibridação 4. Evolução adaptativa I. Título

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por me guiar durante todo o meu caminho, me dando força e capacidade em mais esta etapa.

Agradeço aos meus pais Osni Florêncio e Susana A. A. Florêncio, assim como ao meu irmão Felipe Florêncio e a minha namorada Larissa A. B. Faria, por terem acreditado em mim, pela paciência, por todo apoio, incentivo e companheirismo em todos os momentos de minha vida.

A Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, pela oportunidade da realização do curso de Mestrado.

Agradeço ao Prof. Dr. Luiz Carlos Basso, por ter sido um grande orientador, pela confiança, e por todos os ensinamentos, os quais levarei pelo o resto de minha vida.

A banca examinadora pelas contribuições no trabalho.

Ao Técnico de laboratório, Luis Lucatti (Cometa), por compartilhar de suas experiências, por toda a ajuda e amizade.

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

À agência CNPq, pela concessão da bolsa de estudo durante o curso.

Agradeço à Renata por toda ajuda, ao Ricardo, Mariane, Caroline, Camila, Elisângela, Thalita, Otávio, Reinaldo, Eliane e a todos os outros colegas que passaram pelo laboratório de Bioquímica e Tecnologia de Leveduras da ESALQ/USP, os quais contribuíram ao longo destes anos tanto nas bancadas do laboratório, quanto nos momentos de conversas, risadas e apoio. Desejo sucesso a todos.

Muito obrigado

SUMÁRIO

RESUMO	6
ABSTRACT	7
1 INTRODUÇÃO	9
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	11
2.1 Etanol brasileiro	11
2.2 Biomassa lignocelulósica: matéria prima para a produção de etanol 2G	12
2.3 Composição da biomassa lignocelulósica	14
2.4 Origem dos inibidores e seus mecanismos de inibição	15
2.5 Produção do etanol lignocelulósico	18
2.5.1 Pré- tratamento	19
2.5.2 Hidrólise	21
2.6 Fermentação 2G no Brasil	22
2.7 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	23
2.8 Melhoramento genético	27
2.8.1 Hibridação	27
2.8.2 Cruzamento massal/ Genome shuffling	28
2.8.3 Evolução adaptativa	29
2.9 Esporulação	30
3 OBJETIVO	33
4 METODOLOGIA	35
4.1 Materiais utilizados	35
4.1.1 Material biológico	35
4.2 Reativação das linhagens	35
4.3 Propagação das linhagens	35
4.4 Estimativa de viabilidade	36
4.5 Avaliação do crescimento das linhagens progenitoras	36
4.6 Estimativa da eficiência de esporulação	36
4.7 Avaliação de diferentes protocolos de esporulação	36
4.8 Avaliação do comportamento das linhagens progenitoras quanto a esporulação	37
4.9 Otimização da purificação dos esporos	37
4.10 Determinação da viabilidade dos esporos/haploides	38

4.11 Avaliação quanto à capacidade de auto-diploidização para diferenciação entre linhagens heterotática/homotática.....	38
4.12 Cruzamento Massal/ genome shuffling.....	38
4.13 Evolução adaptativa / seleção	39
4.14 Cariotipagem Eletroforética.....	43
4.15 Avaliação de crescimento em microplacas	43
4.16 Avaliação mediante ensaios com ciclos fermentativos	43
4.17 Determinação do teor de etanol	44
4.18 Determinação de biomassa	44
4.19 Determinação de trealose.....	44
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	47
5.1 Avaliação do crescimento das linhagens progenitoras	47
5.2 Avaliação de diferentes protocolos de esporulação	48
5.3 Avaliação do comportamento das linhagens progenitoras quanto a esporulação.....	50
5.4 Purificação dos esporos	52
5.5 Determinação da viabilidade dos esporos/haploides	53
5.6 Avaliação quanto à capacidade de autodiploidização para diferenciação de linhagens heterotática/homotática.....	54
5.7 Cruzamento massal/ genome shuffling	54
5.8 Evolução adaptativa / seleção	55
5.9 Cariotipagem Eletroforética.....	55
5.10 Avaliação de crescimento em microplacas	58
5.11 Avaliação mediante ensaio com ciclos fermentativos	61
6 CONCLUSÕES	69
REFERÊNCIAS	71
ANEXOS	79

RESUMO

Melhoramento de *Saccharomyces cerevisiae* mediante cruzamento massal para produção de etanol 2G em fermentações com reciclo de células

É crescente a busca por fontes de energia renováveis em substituição a o uso dos combustíveis fósseis, devido a grande preocupação mundial com o aquecimento global e as mudanças climáticas. O Brasil é considerado o detentor do processo de produção de etanol mais economicamente viável. Estimativas apontam para o fato de que a produção de etanol de primeira geração não será suficiente para atender a futura demanda global pelo biocombustível. Diante disto, a produção de etanol a partir da biomassa lignocelulósica se mostra como uma potencial solução. No entanto, durante o pré-tratamento e a hidrólise da biomassa, há formação de vários compostos tóxicos tais como o furfural, HMF, ácido fracos, e compostos fenólicos, os quais exercem efeitos inibitórios sobre as leveduras, tendo como consequência queda no rendimento fermentativo. Além das vantagens tecnológicas que o processo industrial brasileiro apresenta quanto à incorporação da produção de etanol 2G nas plantas já existentes, soma-se a abundância de matéria prima proveniente da própria indústria sucroalcooleira. No entanto, é de extrema necessidade o desenvolvimento de leveduras capazes de resistir as diversas condições inibitórias provenientes do novo substrato, as quais são potencializadas pelo reciclo celular. Neste sentido, o presente trabalho objetivou o desenvolvimento de novas linhagens de leveduras através das técnicas de hibridação e evolução adaptativa/seleção. Para isto, foi realizado o cruzamento massal envolvendo 5 linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*, previamente selecionadas por demonstrar alta tolerância em fermentações em mosto misto a base de hidrolisado lignocelulósico e melão de cana-de-açúcar. Inicialmente estudos foram realizados com a intenção de se obter altas taxas de esporulação, a fim de se propiciar uma grande quantidade de cruzamentos aleatórios para consequente geração de uma ampla biodiversidade, aumentando assim a possibilidade de se obter indivíduos com fenótipos melhorados. A cultura resultante do cruzamento massal foi seguida de evolução adaptativa/seleção, buscando, após cerca de 51 gerações, um enriquecimento da cultura com as linhagens mais tolerantes. Por meio de avaliação de crescimento em microplacas (DO 600nm), foram selecionadas 10 isolados evoluídos, os quais foram submetidos a ensaio de fermentação em bancada, simulando tanto quanto possível as condições industriais. Ao final, foi possível destacar uma linhagem por apresentar teor de reserva de trealose significativamente maior que as demais linhagens avaliadas, demonstrando assim a geração de um fenótipo melhorado.

Palavras-chave: *Saccharomyces cerevisiae*; Hidrolisado lignocelulósico; Hibridação; Evolução adaptativa

ABSTRACT

***Saccharomyces cerevisiae* improvement by mass mating for production of 2G ethanol in fermentation with cell recycle**

Searching for renewable energy sources to substitute the fossil fuels use is growing, due to a great concern worldwide for global warming and climate change. Brazil is considered the holder of the most economically viable process of ethanol production. Estimates indicate that ethanol production of first generation will not be enough to supply future global demand for biofuel. Therefore, an ethanol production from the lignocellulosic biomass show up as a potential solution; however, during biomass pretreatment and hydrolysis, several toxic compounds such as furfural, HMF, weak acid, and phenolic compounds are formed, which exert inhibitory effects on yeasts, resulting in a fermentative yield decrease. Besides the technological advantages, presents in Brazilian industrial processes to incorporation of 2G ethanol production in existing factories, add up the abundance of feedstock comes from the own sugar and alcohol industry. However, the development of yeasts strains, resisting to inhibitory conditions from the new substrate which are potentiated by the cellular recycle, is extremely necessary. In this sense, the present work aimed the development of new yeasts strains by hybridization and adaptive evolution techniques. Mass mating was carried out involving 5 strains of *Saccharomyces cerevisiae*, previously selected by demonstrating high tolerance to fermentation from mixed-must composed by lignocellulosic hydrolyzate and sugarcane molasses. Previous studies were carried out to get high rates of sporulation that promote random crosses and broad biodiversity, in order to obtain individuals with improved phenotypes. The culture resulting from the mass mating was followed by an adaptation/selection, during 51 generations, generating enrichment of more tolerant strains. By means of microplate growth evaluation (DO 600nm), 10 evolved isolates were selected, which were submitted to lab scale fermentation, simulating as much as possible as industrial conditions. At the end, it was possible to highlight a lineage demonstrating significantly higher trehalose reserve content than the other lineages evaluated, thus demonstrating a generation of an improved phenotype.

Keywords: *Saccharomyces cerevisiae*; Lignocellulosic hydrolysate; Hybridization; Adaptive evolution

1 INTRODUÇÃO

A crescente preocupação com o aquecimento global e as mudanças climáticas tem despertado o interesse mundial pelo desenvolvimento de fontes energéticas renováveis em substituição aos recursos fósseis. Neste sentido o etanol se destaca, sendo um biocombustível cada vez mais consumido em todo o mundo (ÚNICA, 2016).

O Brasil, que por décadas foi o principal produtor de etanol, atualmente superado pelos Estados Unidos, é considerado o país pioneiro na introdução deste combustível renovável em sua matriz energética, e atualmente é o detentor do mais economicamente viável processo de produção (BASSO; BASSO; ROCHA, 2011).

As atuais tecnologias empregadas para a produção de etanol dependem da cana-de-açúcar, do amido de milho e de tubérculos devido, em parte, à facilidade do manuseio e do processamento de seus respectivos substratos. Entretanto, para que se possa atender à crescente demanda por energia, bem como mitigar as emissões de gases do efeito estufa, a produção de etanol a partir da biomassa lignocelulósica demonstra notável potencial (JOSHI et al., 2011).

Materiais lignocelulósicos contêm açúcares polimerizados em celulose e hemicelulose, os quais podem ser libertados pela hidrólise e posteriormente fermentados em etanol por microrganismos como *Saccharomyces cerevisiae*. No entanto, a produção de etanol é afetada devido à presença de compostos inibidores como ácidos fracos, derivados de furano e compostos fenólicos que são gerados durante o pré-tratamento e a hidrólise do material lignocelulósico (PALMQVIST; HAHN-HAGERDAL, 2000).

Leveduras *Saccharomyces cerevisiae* são amplamente utilizadas em diversos processos industriais. Tais microrganismos são tradicionalmente associados à indústria de alimentos e mais recentemente à indústria de etanol, fato que se deve a sua robustez e tolerância aos variados estresses encontrados nos processos industriais, como: alta concentração de etanol, alta pressão osmótica, baixo pH e elevadas temperaturas, todos intensificados pela prática do reciclo celular (BASSO et al., 2008; BASSO; BASSO; ROCHA, 2011).

Tais fatores, somados à presença dos inibidores característicos do hidrolisado lignocelulósico, levam à formação de um ambiente fermentativo altamente inibitório às leveduras, afetando severamente a viabilidade celular e consequentemente o desempenho fermentativo.

Entre os microrganismos avaliados para a fermentação do hidrolisado lignocelulósico, as leveduras *S. cerevisiae* são as que demonstram menor sensibilidade. Contudo, a seleção e o desenvolvimento de cepas com maior tolerância é de fundamental importância para viabilizar a produção de etanol de segunda geração em larga escala (ALMEIDA et al., 2007).

A diversidade natural pode ser explorada para selecionar linhagens com um fenótipo adequado para aplicações industriais específicas. Porém, o exigente aumento da produtividade e a utilização de uma ampla gama de substratos não convencionais, como o caso do hidrolisado lignocelulósico, levam a necessidade de melhorar as linhagens industriais atualmente utilizadas. Diferentes estratégias como mutagênese, métodos de hibridização e/ou evolução adaptativa podem ser utilizadas para gerar aumento artificial de biodiversidade, assim como cepas com propriedades melhoradas (STEENSELS et al., 2014).

Neste sentido, o presente trabalho teve como objetivo o melhoramento e a seleção de linhagens *Saccharomyces cerevisiae* com características de multitolerância aos inibidores presentes no hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar a partir de cruzamento massal e evolução adaptativa, para a produção de etanol de segunda geração em fermentações com ciclos de células.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Etanol brasileiro

A criação do Programa Nacional do Álcool (Proálcool) em meados de 1970, surgiu como uma resposta à crise do óleo, bem como uma solução para o problema de flutuação no preço do açúcar no mercado internacional. Desta maneira, seria reduzida a dependência quanto à importação do petróleo, além da motivação quanto ao uso do combustível renovável, o qual entre outras vantagens apresenta menores emissões de gás carbônico (CO₂) em comparação ao uso de combustíveis fósseis (MOREIRA; GOLDEMBERG, 1999).

O etanol, ou álcool etílico, substância com fórmula molecular C₂H₆O, é um biocombustível líquido que pode ser produzido com base em qualquer biomassa que contenha quantidades significativas de amido ou açúcares (BNDES; CGEE, 2008).

No Brasil, a produção de etanol foi acoplada às indústrias de açúcar, no qual a partir da moagem da cana-de-açúcar (ou difusão), é extraído o caldo açucarado e o bagaço de cana. O processo conhecido como Melle-Boinot (Figura 1) opera em batelada alimentada, onde após o final da fermentação (6 à 10h), por centrifugação obtém-se o vinho de levedura e a biomassa de levedura. O vinho é enviado para a destilação, obtendo-se de 8 a 12% (v/v) de etanol, já as células de levedura são reutilizadas no ciclo fermentativo seguinte. A densidade de células de levedura dentro do fermentador é de 10 a 14% (peso úmido/v). O creme de levedura obtido pela centrifugação é diluído com água (1:1) e tratado com ácido sulfúrico (pH 1.8-2,5) durante 2h, a fim de se reduzir a contaminação bacteriana. O substrato para fermentação contém de 18 a 22% de açúcares redutores totais (ART), sendo composto predominantemente por melaço, que apresenta valores em torno de 45 a 60% de sacarose e 5 a 20% de frutose e glicose, no entanto sua composição mineral pode variar de acordo com a variedade e maturidade da cana-de-açúcar, forma e tempo de colheita (BASSO et al., 2008; BASSO; ROCHA, 2011).

Figura 1 – Fluxograma do processo fermentativo tipo batelada alimentada com tratamento ácido e recirculação do fermento (Melle-Boinot) (BASSO et al., 2015, no prelo)

O processo de fermentação industrial tradicionalmente realizado nas destilarias brasileiras impõe às leveduras uma diversidade de estresses que agem de forma sinérgica e/ou sequenciais como: alta concentração de etanol, pressão osmótica, alta temperatura, acidez, contaminação por bactérias e leveduras selvagens, tornando o ambiente fermentativo altamente desfavorável. Todos estes estresses são ainda intensificados pela prática do reciclo celular (BASSO et al., 2008; BASSO; BASSO; ROCHA, 2011).

2.2 Biomassa lignocelulósica: matéria prima para a produção de etanol 2G

Biomassa lignocelulósica compreende o material lenhoso responsável pela estrutura e rigidez das plantas. Composta principalmente por três tipos de polímeros à base de carbono, celulose, hemicelulose e lignina, quando separados produzem componentes que podem ser usados para produção de biocombustíveis como o etanol (SANDERSON, 2011).

Estimativas apontam para o fato de que a produção de etanol de primeira geração pode não ser suficiente para atender a futura necessidade energética global. Sendo assim, a produção de etanol a partir da biomassa lignocelulósica (segunda geração) como palha de milho, palha de trigo, palha de cana, palha de arroz, cascas de arroz, cascas de aveia, lacas de

árvore, sabugo de milho, bagaço de cana, além das culturas energéticas e até mesmo plantas daninhas, vem a ser a melhor alternativa, já que tais materiais se encontram disponíveis em abundância e ainda com custos relativamente baratos (JOSHI et al., 2011).

Segundo Ernandes e Garci-Cruz (2012), a matéria prima na obtenção de um produto biotecnológico como o caso do etanol, pode representar até 75% do custo total de produção, o que incentiva o crescente interesse pelo aproveitamento de resíduos agroindustriais e seus subprodutos.

O etanol brasileiro é produzido a partir da cana-de-açúcar. Nesta cultura, cerca de um terço da energia solar absorvida é fixada como açúcar, enquanto o restante corresponde à fibra vegetal (celulose, hemicelulose e lignina), que constituem a palha e o bagaço de cana (BNDES; CGEE, 2008). Neste sentido a produção do etanol de segunda geração no Brasil vem a ser ainda mais promissora, já que potenciais matérias primas lignocelulósicas para sua produção são subprodutos gerados em larga escala pela própria indústria sucroalcooleira.

O bagaço é um material fibroso resultante da prensagem da cana para a extração do caldo. Produzido na ordem de 125 kg por tonelada de cana processada (BNDES; CGEE, 2008), sua composição varia de 9-10% de umidade, 2-2,7% de cinzas, 32-35% de celulose, 16-25% de hemicelulose, 23-32% de lignina, dependendo da variedade de cana e das condições climáticas durante o cultivo. Nas destilarias, parte deste material é empregada na produção de energia elétrica e/ou aquecimento das caldeiras, porém, há ainda uma parcela excedente a qual se encontra depositada nos pátios (GOMES et al., 2012).

Segundo Alves et al. (2012), o bagaço apresenta potencial para contribuir com o aumento de cerca de 50% do etanol produzido por meio do uso da lignocelulose, sem a necessidade de expansão de áreas cultiváveis de cana-de-açúcar.

A palha, produzida em quantidades superiores a 10t ha⁻¹ de biomassa seca (140 kg por tonelada de cana) é o subproduto mais recente da cultura, sendo que a sua acumulação só foi desencadeada pela implantação do novo sistema de produção denominado cana crua, o qual consiste na colheita mecanizada da cana-de-açúcar, sem a queima da palha (CARBONARI; VELINI; ANTUNIASSI, 2012). Estudos quanto à utilização da palha consideram que 50% do material permaneçam no campo, o que significa uma disponibilidade efetiva de 70 kg desse biocombustível por tonelada de cana colhida (BNDES; CGEE, 2008).

2.3 Composição da biomassa lignocelulósica

A celulose representa de 36 a 61% da biomassa seca, e é formada por um polímero linear cristalino de β -D-glicose, a qual devido a rigidez de sua estrutura, necessita de um forte tratamento para ser quebrada (OLSSON; HAHN-HAGERDAL, 1996) (Figura 2). Segundo Almeida et al. (2007), através da hidrólise da celulose é onde se obtém a maior fonte de glicose da biomassa lignocelulósica.

A hemicelulose, que constitui de 13 a 39% da biomassa seca, é composta por heteropolímeros lineares e ramificados de D-glicose, D-galactose, D-manose (hexoses), D-xilose e L-arabinose (pentoses), além de grupos Metil e Acetil, ligados às cadeias de carbono. Pelo fato de não apresentar uma estrutura cristalina, a hidrólise da hemicelulose vem a ser mais fácil (OLSSON; HAHN-HAGERDAL, 1996).

A lignina é um polímero aromático não solúvel em água formado por grupos fenólicos (fenilpropano). As unidades de fenilpropano são unidas entre si por diferentes tipos de ligações, dentre as quais as ligações de éter são as mais comuns. Tal estrutura que envolve a celulose e a hemicelulose, devido às fortes ligações que mantêm seus polímeros em conjunto, torna a sua quebra muito difícil de ser realizada (SANDERSON, 2011; JÖNSSON; ALRIKSSON; NILVEBRANT, 2013).

Figura 2 – Estrutura da biomassa lignocelulósica (YARRIS, 2009)

2.4 Origem dos inibidores e seus mecanismos de inibição

Para que se possa produzir o etanol lignocelulósico, é necessário que a biomassa seja hidrolisada a fim de gerar monômeros de açúcares fermentescíveis. A hidrólise da lignocelulose é normalmente conseguida por meio de um pré-tratamento ácido, o que resulta principalmente na hidrólise de hemicelulose, seguido da hidrólise da celulose que pode ser enzimática ou química. Como demonstrado na Figura 3, a liberação dos monômeros de açúcar durante o pré-tratamento é acompanhada pela geração de inibidores que afetam fortemente a fermentação pelos microrganismos (PALMQVIST; HAHN-HAGERDAL, 2000; ALMEIDA et al., 2007). A composição dos compostos inibidores depende do tipo de material lignocelulósico utilizado e da natureza química do processo de pré-tratamento (OLSSON; HAHN-HAGERDAL, 1996).

Figura 3 - Esquema indicando as principais vias de formação de inibidores durante o pré-tratamento da biomassa lignocelulósica (JÖNSSON; ALRIKSSON; NILVEBRANT, 2013)

Segundo Almeida et al. (2007), os tratamentos de hidrólise podem resultar em maior degradação da lignina e dos monômeros de açúcares em três principais grupos de compostos inibidores: derivados de furano (2-furaldeído e 5-hidroximetil-2-furaldeído), ácidos fracos (principalmente ácido acético, ácido fórmico e levulínico) e compostos fenólicos.

Derivados de furano, HMF e furfural são compostos comumente encontrados nos hidrolisados lignocelulósicos e são formados pela desidratação dos açúcares hexoses e pentoses, respectivamente (JÖNSSON; ALRIKSSON; NILVEBRANT, 2013; OLSSON; HAHN-HAGERDAL, 1996).

Em geral, os efeitos dos furanos podem ser explicados pelo redirecionamento da energia da levedura para reparar os danos causados pelo inibidor, assim como pela redução do ATP intracelular e dos níveis de NAD(P)H, como pela inibição enzimática ou consumo/regeneração de cofatores, resultando na diminuição da produtividade de etanol, inibição do crescimento da levedura ou dando origem a uma maior lag fase (ALMEIDA et al., 2007).

A conversão da D-glicose em 5-hidroximetilfurfural (HMF) durante o pré-tratamento está diretamente relacionada à elevação do pH do meio hidrolisado. Segundo Joshi et al. (2011), em pH 11, cerca de 30% da glicose é convertida em HMF.

Estudos quanto aos efeitos fisiológicos do HMF em *S. cerevisiae* relatam que durante ambas as condições aeróbias e anaeróbias, o produto principal da conversão do HMF pela

levedura é o 2,5-bis-hidroximetilfurano, sendo que a sua redução está associada ao consumo de NAD(P)H. Quando adicionados em conjunto, o HMF mostrou um efeito inibidor menos grave do que o furfural, sendo eficientemente consumido apenas ao término do consumo do furfural presente no meio. Além disso, a total inibição do crescimento da levedura se mostra muito mais propensa quando os dois componentes estão em sinergia (TAHERZADEH et al., 2000).

Horváth et al. (2003), em estudos quanto os efeitos do furfural no metabolismo de *S. cerevisiae*, constatou que em aerobiose o inibidor é exclusivamente convertido em ácido furóico. Com o aumento da concentração de furfural é aumentada a sua taxa de conversão através da ativação do metabolismo respiratório fermentativo, resultando na diminuição da produção de biomassa e formação de álcool furfurílico, além do ácido furóico. Em condições anaeróbicas, a redução de furfural substitui parcialmente a formação de glicerol como um caminho para regenerar NAD. O aumento da concentração de furfural resulta na completa substituição do glicerol pela formação de álcool furfurílico, ocorrendo a lavagem do inibidor no meio, ficando sugerido que a capacidade da levedura de tolerar o furfural parece ser diretamente acoplada à capacidade de convertê-lo em compostos menos inibitórios.

Tal recurso utilizado pelo microrganismo é conhecido como detoxificação, este se refere à capacidade de reduzir furanos em componentes menos tóxicos (correspondentes álcoois) durante a fermentação.

O hidrolisado lignocelulósico contém ácidos fracos (alifáticos), tais como ácido acético, ácido fórmico e ácido levulínico. O ácido fórmico e levulínico surgem a partir da degradação térmica ácido-catalisada de produtos originados de polissacarídeos (furfural e HMF), enquanto o ácido acético é formado principalmente pela hidrólise de grupos acetil da hemicelulose (de-acetilação da hemicelulose) (JÖNSSON; ALRIKSSON; NILVEBRANT, 2013).

Verduyn et al. (1990), relata que o aumento na adição de acetato no meio a ser fermentado por *S. cerevisiae* resultou, em uma progressiva queda na concentração de biomassa, além do aumento no teor de glicose residual. Segundo o autor, em meio fermentativo com um pH igual ou inferior ao seu pKa (4.7), o ácido acético se apresenta em sua forma não dissociada (RCOOH). Devido ao fato de que a membrana plasmática dos microrganismos é permeável aos ácidos orgânicos na forma não dissociada (por difusão simples), uma vez no citosol, grande parte desses ácidos é dissociada, resultando na acumulação de prótons no interior celular o qual tem pH ao redor de 7. Para combater a acidificação, os prótons são bombeados para fora da célula pela membrana plasmática pela

atividade da ATPase, à custa do ATP. Desta maneira, fica evidente o envolvimento do pH intracelular com o efeito inibitório dos ácidos fracos como o ácido acético em *S. cerevisiae*.

Outro grupo de inibidores presentes no hidrolisado lignocelulósico são os compostos fenólicos. Este grupo inclui uma vasta gama de compostos aromático e poliaromáticos, gerados principalmente pela degradação da lignina durante o pré-tratamento e a hidrólise (OLSSON; HAHN-HAGERDAL, 1996). Outra possibilidade da formação dos compostos fenólicos é através da degradação dos carboidratos, como descrito por Popoff e Theander (1976).

Na fermentação do hidrolisado, a presença dos compostos fenólicos, assim como dos furanos, está relacionada com queda na produção de biomassa, queda na taxa de crescimento e queda na produtividade de etanol, esta última, no entanto, vem a ser menos rigorosa que as demais (ALMEIDA et al., 2007).

O mecanismo de inibição dos compostos fenólicos sobre os microrganismos envolve lesões na integridade da membrana celular, afetando sua capacidade de servir como barreiras seletivas. É observada que a toxicidade dos compostos fenólicos se correlaciona com a sua hidrofobicidade, possíveis de causar modificações nas lipo-proteínas da membrana celular. A composição dos fosfolipídios e a interação dos lipídios com as proteínas da membrana são determinantes nas propriedades de permeabilidade das células. Neste sentido, o efluxo de ATP e outros nucleotídeos, assim como a permeabilidade de prótons, são induzidos pela presença de fenóis (HEIPIEPER; KEWELOH; REHM, 1991).

2.5 Produção do etanol lignocelulósico

O complexo de lignina-hemicelulose-pectina forma uma rigorosa barreira ao redor de celulose. Sendo assim, o primeiro passo no processo global de fermentação da biomassa lignocelulósica é a quebra desta barreira (pré-tratamento). Outros passos envolvem o isolamento das frações líquidas e sólidas e a hidrólise da celulose para gerar açúcares fermentescíveis (sacarificação), seguida pela fermentação e destilação (JOSHI et al., 2011), como demonstrado na Figura 4.

Figura 4 – Esquema geral do processo de produção de etanol a partir de biomassa lignocelulósica Adaptação (JOSHI et al., 2011).

2.5.1 Pré- tratamento

Além de remover a lignina e a hemicelulose e reduzir a cristalinidade de celulose, o pré-tratamento tem de cumprir os seguintes requisitos: melhorar a capacidade de formação de açúcares pela posterior hidrólise enzimática; evitar a degradação ou perda dos carboidratos; evitar a formação de subprodutos inibidores para os subsequentes processos de hidrólise e fermentação; ser rentável. Processos físicos, físico-químicos, químicos e biológicos tem sido usado no pré-tratamento da biomassa lignocelulósica (SUN; CHENG, 2002).

No pré-tratamento, apenas uma pequena fração da celulose é hidrolisada, no entanto, a maior parte da hemicelulose é convertida em monômeros de açúcares, principalmente D-xilose e arabinose. A biomassa pré-tratada pode então ser submetida a um processo de

filtração onde é separada a fase líquida, composta predominantemente por pentoses, a qual é enviada para fermentação da xilose, da fase sólida composta por lignina e celulose, na sequência enviada para hidrólise (JOSHI et al., 2011).

O processo de pré-tratamento mais maduro do ponto de vista tecnológico, sendo assim implementado nos principais projetos em escala industrial no Brasil e no exterior, é o chamado “explosão a vapor” (TOMÉ, 2015). Este consiste em um método físico-químico com a utilização de vapor saturado de alta pressão, a qual em seguida é rapidamente reduzida, fazendo com que os materiais sejam submetidos a uma descompressão explosiva. Neste processo, a biomassa é submetida a temperaturas de 160-260 °C e pressão correspondendo a 0,69-4,83 MPa e mantida assim por alguns minutos, em seguida é realizada uma rápida descompressão para condições atmosféricas, provocando assim a degradação da hemicelulose e transformação da lignina devido às altas temperaturas, aumentando o potencial de hidrólise da celulose (SUN; CHENG, 2002).

Segundo Morjanoff e Gray (1987), a adição de H_2SO_4 no pré-tratamento de explosão a vapor pode efetivamente melhorar a hidrólise enzimática, diminuindo a produção de compostos inibidores e levando a maior remoção da hemicelulose. Foi ainda verificado pelo autor que as ótimas condições de pré-tratamento para o bagaço de cana-de-açúcar são: 30s de tratamento, vapor saturado a 220 °C, proporção de água-para-sólidos de 2 e a adição de 1 g de H_2SO_4 /100g de bagaço seco. Tais condições apresentaram diversas vantagens como alto rendimento em açúcares totais, exigência moderada de enzimas e menores perdas relacionadas à decomposição do açúcar.

Entre os processos químicos de pré-tratamento, os mais comumente utilizados são ácido e base (H_2SO_4 e NaOH , respectivamente), promovendo assim a quebra da biomassa, melhorando o rendimento de recuperação da glicose a partir da celulose através da remoção da hemicelulose e da lignina (MOSIER et al., 2005).

Ácidos concentrados, como HCl , HNO_3 e principalmente H_2SO_4 tem sido aplicado no pré-tratamento ácido. Este pode ser realizado tanto em alta temperatura e baixa concentração de ácido (pré-tratamento ácido diluído), quanto em baixa temperatura e alta concentração de ácido (pré-tratamento ácido concentrado). Apesar da baixa temperatura de operação (40°C), o pré-tratamento ácido concentrado tem apresentado desvantagens em relação ao pré-tratamento ácido diluído, já que a alta concentração de ácido (30-70%) torna o processo muito corrosivo e perigoso, além da alta exigência energética quanto à recuperação do ácido que por razões econômicas se mostra necessária. Neste sentido, a hidrólise com ácido diluído é provavelmente o método de pré-tratamento mais aplicado entre os produtos químicos,

podendo ser usada tanto como um pré-tratamento da biomassa lignocelulósica para posterior hidrólise enzimática, ou como o método efetivo de se hidrolisar em açúcares fermentescíveis (TAHERZADEH; KARIMI, 2008).

No entanto, o pré-tratamento ácido tem demonstrado resultar na formação de subprodutos indesejados como: furfural (degradação da pentose) e HMF (degradação da hexose), ácido fenólico (subproduto lignina) e acetato (deacetilação da hemicelulose) (JOSHI et al., 2011).

O pré-tratamento alcalino refere-se à aplicação de soluções alcalinas, como NaOH, Ca(OH)_2 (cal) ou amônia para remover lignina, parte da hemicelulose e aumentar a acessibilidade das enzimas à celulose, resultando em um aumento acentuado na sacarificação (TAHERZADEH; KARIMI, 2008).

Os processos de pré-tratamento alcalino utilizam temperaturas e pressões mais baixas em comparação com outras tecnologias de pré-tratamento. No entanto, ao contrário do pré-tratamento ácido, ocorre uma limitação, já que as bases podem ser convertidas em sais irre recuperáveis ou incorporadas como sais na biomassa durante as reações de pré-tratamento. Entre as bases utilizadas no pré-tratamento alcalino o Cal (hidróxido de cálcio) apresenta vantagens como baixo custo de reagente, maior segurança, além de ser recuperável através de reação com dióxido de carbono (MOSIER et al., 2005).

2.5.2 Hidrólise

O objetivo deste processo é gerar monômeros de açúcares fermentescíveis a partir da hemicelulose e principalmente da celulose contida na biomassa lignocelulósica, podendo ser realizado por dois diferentes métodos: hidrólise ácida e hidrólise enzimática (JOSHI et al., 2011).

Segundo Tomé (2015), apesar dos grandes esforços no desenvolvimento tecnológico de produção de etanol de segunda geração baseado na hidrólise ácida, limitações técnicas como a geração de compostos inibidores para a fermentação mostraram-se presentes, não se alcançando viabilidade econômica. Sendo assim nos últimos anos houve o surgimento da rota biotecnológica, na qual a biomassa é submetida à ação de enzimas em condições de processo mais amenas, apresentando diversas vantagens.

Os três grandes grupos de enzimas envolvidas no hidrólise da celulose são: 1,4- β -D-glucano glucanohidrolase, 1,4- β -D-glucano celobiohidrolase e β -glucosidase. Estas enzimas são normalmente referidas como endoglucanase, exoglucanase e celobiase, respectivamente.

O sistema de ação de tais enzimas pode ser descrito da seguinte forma: as endoglucanases atacam aleatoriamente clivando as cadeias de celulose formando glicose, celobiose e celotriose. As exoglucanases atacam a celulose, para formar unidades de celobiose. Finalmente a celobiase hidrolisa a celobiose em glicose (LADISCH et al., 1983).

Enzimas glucanases (celulases) podem ser produzidas tanto por bactérias quanto por fungos. Estes microrganismos podem ser aeróbios ou anaeróbios e mesófilos ou termofílicos. No entanto, maiores atenções são voltadas para o fungo *Trichoderma spp.* e em particular *T. reesei*, por serem grandes fornecedores de enzimas extracelulares sendo responsáveis pela produção da maioria das celulases comerciais (GRITZALI; BROWN JR., 1979; JOSHI et al., 2011). As ótimas condições destas enzimas (para *Trichoderma*) são: pH em torno de 4,8 e temperatura de 40 a 50°C (LADISCH et al., 1983).

Ácidos minerais, como ácido sulfúrico, ácido clorídrico, ácido fluorídrico e ácido nítrico são utilizados na hidrólise da biomassa lignocelulósica. Dentre esses, os processos com a utilização do ácido sulfúrico são os mais antigos e bem compreendidos (JOSHI et al., 2011).

A fim de otimizar o rendimento em glicose, a hidrólise ácida pode ser realizada em dois estágios. O primeiro envolve o contato com ácido diluído (1% sulfúrico) a temperaturas relativamente baixas (80-120°C) e curto tempo de exposição (30-240 min.). O objetivo deste estágio é a extração e hidrólise da fração hemicelulose em pentoses. O segundo estágio é realizado com ácido concentrado (a partir de 5-20% sulfúrico) e altas temperaturas (aproximadamente 180°C). O objetivo do segundo estágio é a hidrólise da celulose em glicose (HUMPHREY, 1979). Contudo, quando a biomassa lignocelulósica é ácida hidrolisada, juntamente com os açúcares ocorre a formação de inúmeros compostos inibidores, principalmente relacionados com a hemicelulose.

2.6 Fermentação 2G no Brasil

A inibição da fermentação pelas leveduras quando na presença de componentes furanos, fenólicos e ácidos fracos é claramente um obstáculo significativo para a produção do etanol lignocelulósico em larga escala. Sendo assim, o processo de fermentação a base de hidrolisado lignocelulósico apenas pode proceder se a concentração dos compostos inibidores não exceder a capacidade de detoxicação das células de levedura. Neste sentido, alta densidade de células na fermentação gera, conseqüentemente, o aumento na capacidade de conversão dos inibidores, aumentando assim a fermentabilidade do hidrolisado (ALMEIDA et al., 2007).

O Brasil apresenta um grande potencial em viabilizar a tecnologia de produção do etanol 2G em comparação a outros países. Segundo Tomé (2015), além do custo reduzido da biomassa, existe a possibilidade de se integrar a nova tecnologia ao parque industrial já existente, obtendo assim redução nos investimentos em equipamentos e uso compartilhado de insumos e utilidades.

Com a mistura do caldo de cana e/ou melaço, proveniente do processo de primeira geração, com a corrente de açúcar proveniente da biomassa lignocelulósica, é possível ajustar a ideal concentração dos açúcares do mosto (18 a 22%) para ser enviado para a fermentação. Tal integração mostra-se extremamente viável, uma vez que o melaço proveniente da tecnologia 1G necessita ser diluído, e existe dificuldade para se obter altas concentrações de açúcares a partir de tecnologia 2G (ANDRADE et al., 2013). Contudo, a adição de melaço no hidrolisado, além de permitir uma fermentação com maior teor alcoólico que contribui para o balanço energético favorável da destilação, proporciona nutrientes minerais e orgânicos para a levedura.

Apesar do inconveniente quanto à alta concentração inicial de inibidores no processo fermentativo em batelada alimentada, o que pode resultar em uma fase de latência longa ou até mesmo uma falha da fermentação, este processo tem demonstrado ser vantajoso em muitos estudos, já que no processo contínuo os inibidores, ao diminuir a taxa de crescimento das células, resulta na lavagem do fermentador. No entanto, o processo de fermentação em batelada deve ser alimentado a níveis que não inibam severamente as células de leveduras (TAHERZADEH; MILLATI; NIKLASSON, 2001).

Tal característica pode ser considerada como mais uma vantagem no sentido de se viabilizar a produção do etanol 2G no Brasil, já que a tecnologia de fermentação em batelada alimentada com reciclo de células (Melle-Boinot) vem sendo utilizada em cerca de 75% das destilarias brasileiras (BASSO; BASSO; ROCHA, 2011).

2.7 *Saccharomyces cerevisiae*

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é o organismo mais amplamente utilizado para a produção de etanol em larga escala a partir de matérias-primas a base de carboidratos (KUYPER et al., 2005).

Leveduras são comumente definidas como fungo unicelular Ascomiceta, com forma ovalada, cerca de 3 μm de diâmetro e se reproduzem assexuadamente (Brotamento) ou sexualmente (formação de ascósporos) (PRETORIUS; WESTHUIZEN, 1991).

A reprodução sexuada de *S. cerevisiae*, (cruzamento) envolve a conjugação de duas células haploides de tipos sexuais opostos (a e α). Os ciclos celulares de tais células são sincronizados em resposta aos peptídeos feromônios de cruzamento, conhecidos como fator a e fator α . A conjugação das células ocorre pelo contato da superfície das paredes celulares seguida pela fusão da membrana plasmática para assim formar um citoplasma comum. Segue então a cariogamia (fusão dos núcleos), resultando em um núcleo diploide. O estável zigoto diploide continua o ciclo celular mitótico em elevado crescimento, porém, na falta de nutrientes, as células diploides são induzidas a meiose e esporulação, formando quatro esporos haploides (tétrades). A germinação resulta no brotamento dos esporos haploides, os quais podem cruzar para restaurar o estado diploide (WALKER, 2009) (Figura 5).

Figura 5 – Ciclo de vida de *S. cerevisiae* (STEENSELS et al., 2014)

Leveduras são denominadas heterotáticas quando possuem esporos de um tipo sexual estável, a ou α , e as culturas provenientes destes esporos se mantêm haploides, conseqüentemente não é possível a conjugação entre esporos pertencentes à mesma cultura, pelo fato das células pertencerem ao mesmo tipo sexual. Leveduras são denominadas homotáticas quando seus esporos podem modificar o seu tipo sexual. Neste caso, uma única cultura contém esporos de tipos sexuais opostos, podendo conjugar, dando origem a uma cepa diplóide (auto diploidização) (RAINIERI; PRETORIUS, 2000; SCHNEITER, 2004).

Segundo Schneiter (2004), ambas as cepas diploides, heterotáticas e homotáticas esporulam em condições de deficiência nutricional, especialmente em meio de acetato de potássio. Durante a esporulação, as células diploides sofrem meiose produzindo até quatro células haploides, que ficam encapsuladas como esporos (ou ascósporos). Cepas heterotáticas podem ser mantidas estáveis tanto na forma diploide quanto na forma haploide, no entanto, cepas homotáticas são estáveis apenas como diploides, já que as células haploides podem mudar o seu mating type e cruzar. Quando expostas a condições com nutrientes, os esporos germinam, inicia-se o crescimento vegetativo ocorre o cruzamento entre células de tipos sexuais opostos (MATa x MAT α), demonstrando haplofase transitória em cepas homotáticas, como demonstrado na Figura 6.

Figura 6 – Ciclos de vida de *S. cerevisiae* heterotáticas e homotática (SCHNEITER, 2004)

Leveduras são microrganismos capazes de mudar seu metabolismo entre respiração e fermentação. Um fato importante é que a levedura, mesmo na presença de oxigênio sempre vai utilizar a via fermentativa para degradar a glicose, se esta estiver presente em elevada concentração (efeito Crabtree). No entanto, não se pode considerar *Saccharomyces* como um verdadeiro anaeróbio facultativo, já que o efeito Crabtree prevalece, pois mesmo em condições bem arejadas, em meio com concentrações de açúcares fermentescíveis acima de 1%, o açúcar é sempre consumido a partir do metabolismo anaeróbio (RUSSELL, 2003).

Em *S. cerevisiae*, o etanol é produzido pela fermentação dos açúcares, tal como glicose, pela via denominada Embden-Meyerhof, que pode ser dividida em três estágios. O primeiro envolve as reações preparatórias, que não são reações de redox e não liberam

energia, mas levam à produção de duas moléculas de um intermediário chave, o gliceraldeído 3-fosfato, a partir da glicose.

No segundo estágio ocorre as reações de redox e a energia é conservada na forma de ATP. Duas moléculas de piruvato são formadas.

No terceiro estágio novamente ocorrem reações de redox havendo a formação dos produtos da fermentação (etanol e CO₂) (MADIGAN et al., 2010).

A parede celular de leveduras entre outros constituintes essenciais é formada por polissacarídeos. Além disso, as células frequentemente armazenam carbono e reservas energéticas sob a forma de glicogênio. As unidades monoméricas desses polissacarídeos são hexoses, principalmente a glicose e seus derivados. Quando a célula está crescendo na presença de compostos contendo carbono que não hexoses, a glicose deve ser sintetizada. Este processo denominado gliconeogênese, utiliza o fosfoenolpiruvato, um dos intermediários da glicólise como composto inicial. O fosfoenolpiruvato pode ser sintetizado a partir do oxalacetato um intermediário do ciclo do ácido cítrico (MADIGAN et al., 2010).

Compostos como citrato, malato, fumarato e succinato podem ser utilizados pela levedura como fonte de energia através do ciclo do ácido cítrico para seu catabolismo. No entanto, compostos de 2 carbonos como o acetato, não podem ser utilizados como substrato de crescimento utilizando apenas o ciclo do ácido cítrico. Isso acontece porque o ciclo do ácido cítrico só pode continuar operando se o oxalacetato for regenerado a cada volta do ciclo. Sendo assim, quando o oxalacetato é utilizado como um doador de elétrons, uma variação do ciclo do ácido cítrico é empregada, denominado ciclo do glioxalato. O ciclo do glioxalato é composto pela maioria das reações do ciclo do ácido cítrico com duas enzimas adicionais: isocitrato liase, que quebra o isocitrato em succinato (que pode ser usado para biossíntese), e glioxalato e malato sintase, que convertem o glioxalato e o acetil-CoA em malato. A partir do malato, a molécula aceptora do oxalacetato é produzida e pode entrar em uma nova rodada de oxidação do acetil-CoA no ciclo do ácido cítrico (MADIGAN et al., 2016).

A trealose é um carboidrato de reserva que se acumula em *S. cerevisiae* podendo alcançar níveis de até 20% do peso seco da célula. Este se trata de um dissacarídeo não redutor composto de duas moléculas de glicose ligadas aos seus carbonos, e tem implicação na sobrevivência de *S. cerevisiae* sob várias condições de estresse, podendo atuar como um protetor de membrana e como um soluto suplementar compatível. A biossíntese de trealose é mediada pela trealose 6-fosfato sintetase e trealose-6-fosfato fosfatase (THEVELEIN, 1984; SINGER; LINDQUIST, 1998; HOUNSA et al., 1998), e há evidências de que linhagens com

grande capacidade de armazenamento de trealose se apresentam mais tolerantes á vários estresses (Basso et al, 2008).

2.8 Melhoramento genético

2.8.1 Hibridação

Apesar da riqueza de diversidade natural de levedura, as condições extremamente seletivas e específicas impostas pelos processos fermentativos industriais exigem uma combinação de características fenotípicas que não podem ser comumente encontradas naturalmente. Sendo assim, várias técnicas foram desenvolvidas para aumentar artificialmente a diversidade de leveduras, gerando variantes que podem executar com maior eficiência as configurações industriais. A hibridação sexual também conhecido como cruzamento, vem a ser a forma mais intuitiva para se gerar diversidade artificial (RAINIERI; PRETORIUS, 2000; STEENSELS et al., 2014).

Hibridação é considerada um potencial método para se obter a formação rápida de novas espécies, no entanto, o grau de isolamento reprodutivo entre potenciais novas espécies híbridas, assim como das espécies parentais vem a ser um dos principais fatores limitantes, já que os híbridos devem ser auto férteis e suficientemente capazes de se reproduzir isoladamente e se manter como linhagem distinta, e as barreiras reprodutivas entre espécies parentais não poderá impedir a hibridação inicial (GREIG et al., 2002).

Devido ao fato de leveduras serem organismos eucariontes com padrão genético mendeliano, estratégias que tem sido usada com sucesso no desenvolvimento de plantas e animais podem ser aplicadas em leveduras. Através de análises das progênie e cruzamentos , podem-se obter genótipos melhorados, pela acumulação de propriedades gerais e específicas em uma cepa (MARULLO et al., 2004).

Fenótipos desejáveis em leveduras como tolerância a estresse osmótico e etanólico, alta taxa de conversão de açúcares em etanol e velocidade de fermentação são controlados por múltiplos genes (STEINMETZ et al., 2002; WANG; HOU, 2010).

Recentemente foram identificados aproximadamente 650 genes como determinantes na tolerância ao ácido acético em *S. cerevisiae* (MIRA et al., 2010).

Traços poligênicos não são facilmente recuperáveis dos genomas parentais, já que todos os genes responsáveis pelo complexo fenótipo devem ser herdados e presentes nos híbridos resultantes. Além disso, o fenótipo desejado pode não ser sempre expresso em

cultura de único esporo, pois os agrupamentos de genes podem estar em diferentes complementos do genoma. Duas diferentes estratégias podem ser aplicadas para a obtenção de novas cepas de leveduras por recombinação sexual: com gametas obtidos por cultura de um único esporo, sendo muito precisa e adequada para a combinação de traços monogênicos. E com gametas obtidos diretamente por esporos de diferentes cepas, que apesar de casual é muito eficaz para fenótipos quantitativos complexos controlados por múltiplos loci (QTLs) (GIUDICI et al., 2005).

2.8.2 Cruzamento massal/ Genome shuffling

Diferente da maioria dos outros microrganismos, cepas de *S. cerevisiae* apresentam ambos os estados haploide e diploide estáveis. Sendo assim, seu genoma pode ser “misturado” através da meiose e conjugação (HOU, 2010; WANG; HOU, 2010).

Genome shuffling consiste na recombinação de todo o genoma para acelerar a acumulação de várias mutações úteis em um genoma, ou para fornecer a capacidade de cruzamentos, diminuindo drasticamente o tempo necessário para a engenharia de traços fenotípicos complexos (PATNAIK et al., 2002).

Melhoria das vias metabólicas para obtenção do fenótipo desejado, tanto em mutantes artificiais quanto naturais, dependem não apenas de alterações de genes individuais, mas também de interações complexas entre produtos de genes, uns com os outros e com o ambiente celular. A forma mais eficiente de se melhorar toda uma célula é através da evolução de todo o seu genoma. Em procariontes e eucariontes inferiores como leveduras, isto pode ser conseguido por genome shuffling, o que proporciona os meios para recombinar informações genômicas de várias cepas progenitoras, de modo que todos os seus alelos úteis podem ser combinados em um único organismo mostrando o fenótipo desejado (GIUDICI et al., 2005).

Como demonstrado na Figura 7, o cruzamento massal tem a vantagem de explorar todas as diversidades genéticas de uma população, fazendo com que seja possível combinar mutações úteis de vários indivíduos diferentes, enquanto que outros métodos de hibridização, como cruzamento direcionado, envolvem apenas um número limitado de células haploides. Além disso, enquanto outros métodos de melhoramento selecionam apenas o mutante de melhor desempenho para a próxima rodada, o cruzamento massal explora uma maior proporção da diversidade presente na população (STEENSELS et al., 2014).

Figura 7 – Representação das diferentes técnicas de hibridação (cruzamento massal / cruzamento direcionado adaptação (STEENSELS et al., 2014)

2.8.3 Evolução adaptativa

Engenharia evolutiva, também referida como evolução adaptativa e/ou dirigida, se baseia nos princípios básicos da variação genética (natural e/ou induzida), com posterior atuação da seleção nesta variação. De forma geral, uma população de células é cultivada sobre seleção contínua para o fenótipo de interesse por muitas gerações, onde ao longo do tempo ocorre o surgimento de mutantes aleatórios. Tal abordagem de melhoramento pode ser combinada com a utilização de agentes mutagênicos e/ou hibridação sexual a fim de se aumentar a variabilidade genética e fenotípica na qual a seleção atuará (SAUER, 2001; STEENSELS et al., 2014).

Evolução adaptativa tem sido também relatada por vários autores como uma abordagem eficiente no melhoramento de *S. cerevisiae* geneticamente modificadas

(SONDEREGGER; SAUER, 2003; KUYPER et al., 2005; GUIMARÃES et al., 2008; LEE; JELLISON; ALPER, 2014).

No entanto, uma das principais vantagens de se usar a engenharia evolutiva para melhorar as propriedades de leveduras é o fato de que a introdução de um gene estranho vem a ser desnecessária para a evolução de características naturalmente já existentes no microrganismo. Tal abordagem de melhoramento simplesmente imita a natureza, por mutação aleatória dos próprios genes dos microrganismos, seguida da seleção em condições adequadas para favorecer o fenótipo desejado (enriquecimento) (ÇAKAR et al., 2005).

Segundo Çakar et al. (2012), a produção de etanol com base na biomassa lignocelulósica vem a ser uma das principais áreas de pesquisas envolvendo engenharia evolutiva com leveduras.

2.9 Esporulação

Devido ao fato de o cruzamento de leveduras ocorrer entre células no estado haploide, a eficiente taxa de esporulação em que as culturas são submetidas vem a ser indispensável para o sucesso na obtenção de cepas melhoradas pela técnica de cruzamento massal, pois com a maior geração de biodiversidade há maior possibilidade de se obter indivíduos com fenótipos desejáveis.

É documentado que a taxa de esporulação é variável de acordo com a cepa, podendo apresentar de pouca ou nenhuma esporulação, até a taxa de 100%. Muitas cepas de laboratório apresentam taxa de esporulações maiores que 50%. A maioria dos ascos contém quatro ascósporos haplóides, embora ascos com três esporos ou menos também são observados (SCHNEITER, 2004).

De modo geral quando uma cultura de células diploides de *Saccharomyces* é transferida de um meio rico para um meio desprovido de nitrogênio e contendo fonte de carbono não fermentescível, é induzida a saída do crescimento celular vegetativo para entrada em meiose e esporulação. Este complicado processo de desenvolvimento requer mais de 200 genes (TREININ; SIMCHEN, 1993; PARK et al., 1996; LUNDBLAD; STRUHL, 2003; SCHNEITER, 2004).

A literatura tem demonstrado uma ampla quantidade de trabalhos envolvendo esporulação de *S. cerevisiae* para seu posterior cruzamento. Sendo assim, diversas metodologias têm sido utilizadas para que se obtenham esporulações com alta eficiência. Dentre os variados parâmetros que envolvem os diferentes protocolos pode-se citar a

utilização ou não de meio de pré-esporulação, assim como diferentes composições dos meios (pré-esporulação e esporulação), seus respectivos estados físicos (sólido ou líquido), diferentes temperaturas de crescimento além da fase de crescimento do microrganismo. No entanto, a esporulação em meio líquido tem sido documentada por vários autores como parâmetro de maior eficiência na frequência de esporulação (BILINSKI; RUSSELL; STEWART, 1986; CODÓN; GASENT-RAMIREZ; BENÍTEZ, 1995).

3 OBJETIVO

O presente trabalho teve como objetivo o melhoramento de linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* para fenótipos de multitolerância aos inibidores presentes no hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar, a partir do cruzamento massal e evolução adaptativa para a produção de etanol de segunda geração em fermentações com reciclo de células.

4 METODOLOGIA

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Bioquímica e Tecnologia de Leveduras do Departamento de Ciências Biológicas na Escola Superior de Agricultura ‘Luiz de Queiroz’ da Universidade de São Paulo.

4.1 Materiais utilizados

Para realização do presente trabalho foram utilizados melaço de cana-de-açúcar com 62,6% de açúcares redutores totais, e hidrolisado lignocelulósico (glicose: 59,92 g/l; xilose: 34,64 g/l; arabinose: 1,4 g/l; ácido fórmico: 0,86 g/l; ácido acético: 8,88 g/l; HMF: 0,1 g/l; furfural 0,54 g/l), obtido por pré-tratamento a explosão a vapor, seguido por hidrólise enzimática.

4.1.1 Material biológico

Foram utilizadas 5 linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* (365, 430, CD68, CD132 e D10), todas selecionadas por demonstrar maior tolerância em fermentações a base de hidrolisado lignocelulósico e melaço de cana-de-açúcar, em comparação com a linhagem industrial SA-1 (MIRANDA, 2016; SILVELLO, 2016).

4.2 Reativação das linhagens

As linhagens foram reativadas pela transferência de 100 µL das culturas em estoque (ultrafreezer a -80°C em glicerol 20%) em 5 ml de meio YEPD líquido estéril (2% de glicose; 2% de peptona; 1% de extrato de levedura), e incubadas a 30°C por 48 horas.

4.3 Propagação das linhagens

As propagações foram conduzidas transferindo os 5 ml das culturas anteriormente reativadas em 100 ml de meio YEPD líquido estéril e incubadas a 30°C por 48 horas, sendo 24 horas sem agitação e mais 24 horas com agitação (100rpm) (adaptação de LOPES, 2000).

4.4 Estimativa de viabilidade

A viabilidade celular foi determinada através de microscopia óptica, em objetiva de 40x, utilizando câmara de Neubauer, através de coloração diferencial (corante de eritrosina). Células viáveis, não são coradas devido a sua atividade fisiológica alta, e não viáveis são coradas de rosa (OLIVEIRA et al., 1996). A viabilidade foi expressa em porcentagem, em função da proporção de células vivas pelo total de células (viáveis e não viáveis).

4.5 Avaliação do crescimento das linhagens progenitoras

A avaliação do crescimento das linhagens progenitoras foi realizada através da construção de suas respectivas curvas de crescimento, a partir do acompanhamento do protocolo de propagação conforme o subitem 4.3. Sendo assim, durante o período de 48 horas, foi verificada a cada 8 horas a concentração celular de cada cultura por microscopia óptica.

4.6 Estimativa da eficiência de esporulação

A eficiência (taxa) de esporulação foi calculada a partir do percentual de formação de ascos contendo números variados de ascósporos em câmara de Neubauer através da equação abaixo: (Lopes, 2000).

$$Ee = \left[\frac{Tasc}{Tasc + Tcel} \right] * 100$$

Onde:

Ee = eficiência de esporulação (%);

Tasc = total de ascos;

Tcel = total de células que não esporularam.

4.7 Avaliação de diferentes protocolos de esporulação

Foram formulados meios líquidos de esporulação com diferentes concentrações de acetato de potássio (0,25; 0,5 e 1,0%). Para os meios com concentração de 1,0% de acetato de

potássio, foi verificado a reposta de esporulação a diferentes agitações (80 e 120 rpm), assim como para diferentes pH (5,5 e 7,8). Sendo assim, após a reativação e propagação em meio YEPD até fase estacionaria (concentração celular ao redor de 9×10^7 cel/ml), a cepa CD68 foi centrifugada (4000 rpm por 15 minutos), e o meio sobrenadante foi substituído pelos deferentes meios de esporulação, mantendo-se a mesma proporção entre a biomassa úmida e o meio de crescimento. As suspensões foram incubadas a 30°C por 144 horas (todas em triplicata). A cada 24 horas foram avaliadas a viabilidade celular e a taxa de esporulação através de microscopia óptica.

4.8 Avaliação do comportamento das linhagens progenitoras quanto a esporulação

As 5 linhagens progenitoras foram submetidas a esporulação segundo o protocolo D previamente selecionado (subitem 5.2). Nas primeiras 72 horas, foram realizadas a cada 24 horas a verificação da taxa de esporulação e a viabilidade celular de cada linhagem (todas em triplicata) por microscopia óptica, em objetiva de 40x, utilizando câmara de Neubauer, assim como ao tempo de 144 horas.

4.9 Otimização da purificação dos esporos

No intuito de maximizar a eficiência do sucessivo cruzamento massal, o protocolo de purificação abaixo descrito, foi elaborado através de adaptações das metodologias descritas por diversos autores, (TRECO; WINSTON, 2003; HOU, 2009; HOU, 2010; PINEL et al., 2011).

Neste uma alíquota de 2 ml de cada cultura esporulada foi centrifugada (5000 rpm/10 minutos), substitui-se o sobrenadante por 800µL de tampão de micromanipulação (1M sorbitol; 10mM TRIS- HCl pH 7,5; 10mM NaH₂PO₄; 10mM EDTA pH 8,0); 8µL de β-mercaptanol e 100 unidades de enzima Liticase de *Arthrobacter luteus* Sigma Aldridch. A digestão dos ascos procedeu pelo período de 12 horas a 37°C, desta forma, além da liberação dos esporos pela quebra da parede dos ascos, a ação da enzima vem a resultar na morte das células não esporuladas. Passado este período as células foram novamente recolhidas por centrifugação, descartou-se o sobrenadante, seguido pela adição de 2 ml de Triton X-100 (1%). As suspensões foram submetidas a sonicação por 30 minutos em Cuba Ultrassônica Cristófoli, seguido pela agitação em vortex por 60 segundos com auxílio de esferas de vidros. Após a agitação as culturas foram lavadas com agua destilada.

4.10 Determinação da viabilidade dos esporos/haploides

Uma alíquota de cada cultura purificada foi estriada em placa de petri contendo meio YEPD sólido, onde por meio de micromanipulação (micromanipulador Carl Zeiss, Scope A1, AXIO), isolou-se 20 esporos de cada cultura. Após 72 horas de crescimento a 30°C foi possível determinar a viabilidade nas quais as células se encontravam no momento do cruzamento massal, através da relação entre o número total de esporos resgatado (unidade formadora de colônia), pelo número de colônias formadas.

4.11 Avaliação quanto à capacidade de auto-diploidização para diferenciação entre linhagens heterotática/homotática

Com base em Schneiter (2004), foi realizado um ensaio onde a partir das culturas progenitoras devidamente esporuladas e tratadas com enzima lyticase, através da dissecação das tétrades por meio de micromanipulador (Carl Zeiss, Scope A1, AXIO), foram isolados os esporos das cepas 365, 430, CD68, CD132 e D10 em placas de Petri contendo meio YEPD, as quais foram incubadas a 30°C por 5 dias. Passado este período foram resgatadas duas colônias de cada linhagem, as quais foram crescidas individualmente em meio YEPD líquido e novamente induzidas a esporulação pelo período de 144 horas.

4.12 Cruzamento Massal/ genome shuffling

O volume de 2 ml a concentração média de $9,2 \times 10^7$ cel/ml de cada cultura progenitora devidamente esporulada e purificada foi transferido para um erlenmeyer contendo 100 ml de meio YEPD líquido. A germinação e os respectivos cruzamentos aleatórios foram conduzido a 30°C com agitação (110 rpm), por de 72 horas. Após este período por microscópica óptica foi verificado a concentração celular e a viabilidade da cultura resultante do cruzamento massal. O volume corresponde a 60 ml da cultura foi destinado a evolução adaptativa (30 ml para cada linha de evolução), os demais 30 ml foram estocados (ultrafreezer a -80°C em glicerol 20%).

4.13 Evolução adaptativa / seleção

Apesar da eficácia e relativa simplicidade da aplicação de evolução adaptativa para melhoramento de fenótipos desejados, não existem métodos padronizados para um eficaz processo de adaptação (LEE; JELLISON; ALPER, 2014).

A cultura resultante do cruzamento massal, foi submetida a consecutivos crescimentos em batelada em mosto misto a base de melaço e hidrolisado lignocelulósico, o qual teve sua composição diversas vezes alterada pelas diferentes proporções da mistura, assim como pela adição de furfural, e etanol no decorrer das transferências, como demonstrado nas tabelas 1 e 2. Tais crescimentos foram conduzidos em erlenmeyers a 30°C, mediante a duas linhas paralelas de evolução adaptativa / seleção (E1 e E2).

A linha de evolução 1 (E1), foi desenhada para priorizar o estresse etanólico, contribuindo para uma rigorosa seleção da biodiversidade gerada no cruzamento massal logo ao início da evolução. A concentração de etanol final variou de 9,0 para 7,0%, e se deu pela variação na concentração de etanol previamente adicionado ao mosto, a qual decresceu de 5 para 3% a partir da 6ª transferência, para evitar queda na viabilidade na cultura em evolução. O ART fornecido foi de 8,6% em todas as transferências. Ao longo da evolução foi acrescida quantidade de hidrolisado, assim como a quantidade de inibidores (ac. acético e furfural) tornando o meio fermentativo progressivamente mais inibitório, e conseqüentemente mais seletivo.

Na segunda linha de evolução (E2), foram priorizados os estresses provenientes dos principais inibidores constituintes do hidrolisado lignocelulósico (ácido acético e furfural), os quais logo na primeira transferência, já se encontravam na ordem de 2,5 e 1,4g/l respectivamente, contribuindo para rigorosa seleção da biodiversidade. No transcorrer das transferências a pressão seletiva foi acentuada pelo aumento da concentração de hidrolisado no mosto fermentativo, assim como pelo crescente estresse etanólico, tanto pela crescente adição prévia de etanol no mosto, quanto pelo aumento do etanol produzido pelas leveduras, devido ao crescente aumento de ART em paralelo aos inibidores.

Com a intenção de envolver uma grande quantidade de indivíduos gerados no cruzamento massal a seleção por meio da evolução adaptativa, as transferências iniciais em ambos os casos foram realizadas com alta quantidade de inoculo ($2,9 \times 10^7$ cel/ml). No entanto, no transcorrer das transferências a concentração de inoculo inicial foi diminuída ao passo que se aumentou a pressão seletiva. A partir da 8ª transferência da E1 e 6ª transferência E2, a concentração de inibidores para as 2 linhas de evolução foi mantida constante. No

entanto, a partir da 13^o transferência E1 e 11^o transferência E2, para que se fosse possível obter maior número de gerações por transferência a fim de proporcionar o maior enriquecimento das linhagens resistentes nas culturas em evolução, foi realizada uma acentuada diminuição na concentração de inoculo, assim como o aumento do tempo de fermentação, as quais tiveram o seu termino determinado pela diferença de desprendimento de CO₂,

Ao final de cada transferência foram determinados o teor de etanol, além da concentração e viabilidade celular.

As tabelas 1 e 2, descrevem os parâmetros aplicados para o acompanhamento da evolução adaptativa, assim como as crescentes doses de inibidores no transcorrer das transferências.

Tabela 1 – Parâmetros de acompanhamento da evolução 1 (E1), contendo: concentração de inibidores, teor de ART, teor de etanol inicial e final, concentração celular inicial e final, viabilidade celular, número de gerações e rendimento em cada transferência

Transf.	Ac. Acético (g/l)	Furfural (g/l)	Etanol i (%)	ART (%)	Conc. Celular i (cel/ml)	Conc. Celular f (cel/ml)	n° gerações	Viabilidade (%)	Etanol f (%)	Rendimento (%)
1	0,88	0,63	5,0	8,6	2,9E+07	9,9E+07	1,8	93,8	8,7	66,4
2	1,10	0,78	5,0	8,6	3,0E+07	8,8E+07	1,4	92,6	9,0	71,8
3	1,47	1,05	5,0	8,6	2,2E+07	8,7E+07	2,0	93,0	9,0	71,8
4	2,20	1,57	5,0	8,6	2,2E+07	6,3E+07	1,5	94,9	8,9	70,0
5	2,20	1,57	5,0	8,6	2,2E+07	8,4E+07	2,0	96,3	9,0	71,8
6	2,93	2,10	3,0	8,6	8,4E+06	6,1E+07	2,9	93,1	7,0	71,8
7	2,93	2,10	3,0	8,6	8,4E+06	8,0E+07	3,3	97,1	7,1	73,6
8	3,52	2,52	3,0	8,6	8,0E+06	4,7E+07	2,6	94,8	6,5	62,9
9	3,52	2,52	3,0	8,6	8,0E+06	5,9E+07	2,9	98,3	6,9	70,0
10	3,52	2,52	3,0	8,6	8,0E+06	5,0E+07	2,6	98,4	6,8	68,2
11	3,52	2,52	3,0	8,6	4,0E+06	4,7E+07	3,6	97,8	6,7	66,4
12	3,52	2,52	3,0	8,6	4,0E+06	4,3E+07	3,4	98,1	6,3	59,3
13	3,52	2,52	3,0	8,6	4,0E+06	7,0E+07	4,1	98,5	7,1	73,6
14	3,52	2,52	3,0	8,6	2,0E+06	7,3E+07	5,2	98,9	7,0	71,8
15	3,52	2,52	3,0	8,6	1,0E+06	5,3E+07	5,7	98,1	7,1	73,6
16	3,52	2,52	3,0	8,6	5,0E+05	5,8E+07	6,9	97,6	7,0	71,8

Tabela 2 – Parâmetros de acompanhamento da evolução 2 (E2), contendo: concentração de inibidores, teor de ART, teor de etanol inicial e final, concentração celular inicial e final, viabilidade celular, número de gerações e rendimento em cada transferência

Transf.	Ac. Acético (g/l)	Furfural (g/l)	Etanol i (%)	ART (%)	Conc. Celular i (cel/ml)	Conc. Celular f (cel/ml)	n° gerações	Viabilidade (%)	Etanol f (%)	Rendimento (%)
1	2,50	1,42	0,96	5,92	2,9E+07	6,3E+07	1,1	91,3	3,95	78,0
2	2,50	1,42	0,96	5,92	2,9E+07	8,3E+07	1,5	96,1	4,00	79,3
3	3,00	1,70	1,16	7,10	8,3E+06	5,4E+07	2,7	88,5	4,80	79,2
4	3,00	1,70	1,16	7,10	8,3E+06	7,3E+07	3,1	98,7	4,65	75,9
5	3,00	1,70	1,16	7,10	8,3E+06	8,3E+07	3,3	96,9	4,60	74,8
6	3,74	2,12	1,44	8,87	8,3E+06	6,1E+07	2,9	98,7	5,70	74,2
7	3,74	2,12	1,44	8,87	8,3E+06	6,7E+07	3,0	98,8	5,45	69,8
8	3,74	2,12	1,44	8,87	8,3E+06	5,9E+07	2,8	97,8	5,60	72,4
9	3,74	2,12	1,44	8,87	4,2E+06	5,2E+07	3,6	98,5	5,55	71,6
10	3,74	2,12	1,44	8,87	4,2E+06	6,7E+07	4,0	98,4	5,65	73,3
11	3,74	2,12	1,44	8,87	4,2E+06	8,1E+07	4,3	98,7	5,60	72,4
12	3,74	2,12	1,44	8,87	2,1E+06	6,9E+07	5,0	98,6	5,65	73,3
13	3,74	2,12	1,44	8,87	1,0E+06	5,9E+07	5,9	98,2	5,40	68,9
14	3,74	2,12	1,44	8,87	5,2E+05	6,4E+07	6,9	91,2	5,70	74,2

4.14 Cariotipagem Eletroforética

As 5 linhagens progenitoras, assim como as culturas em evolução foram plaqueadas em meio YEPD sólido, e incubadas a 30°C por 72 horas. Após este período as colônias foram isoladas e cariotipadas.

Para tal, foi utilizado o protocolo desenvolvido por Blondin e Vézinhét (1988), com algumas modificações descritas por Basso et al. (2008). Foram suspensas 2 a 4 mg de biomassa úmida de cada colônia individualmente, 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 a gelificação de agarose foram incubados e submetidos a Eletroforese de Campo Pulsado a 14°C, modalidade CHEF, utilizando equipamento Biorad modelo DRIII, programado para 6V/cm por 9 horas com pulso de 5 segundos, ambos os blocos com configuração angular de 120°. Após a coloração com brometo de etídio, os géis foram fotografados em iluminação UV, obtendo-se assim, perfis de bandamento dos cromossomos intactos.

4.15 Avaliação de crescimento em microplacas

Para a avaliação do crescimento (estimado em triplicata) foram utilizadas microplacas de 96 poços, contendo 10 µL do cultivo (inoculo, obtido pela reativação das linhagens/isolados) juntamente com 90 µL de meio constituído a base de melaço e hidrolisado lignocelulósico (15,7% ART; 5 g/L de ácido acético, 1,5 g/L furfural; 4% etanol e pH 5,0), seguido pela incubação a 30°C em leitor multifuncional de microplacas (Tecan, modelo Infinite M200). As leituras de Densidade Ótica (DO 600nm) foram coletadas a cada 2 horas por um período de 24 horas e com agitações prévias de 10 minutos antes das leituras.

4.16 Avaliação mediante ensaios com ciclos fermentativos

As 10 linhagens que apresentaram os melhores desempenhos no ensaio em microplacas, assim como a referência D10, foram submetidas a uma avaliação, em triplicata, mediante fermentações com reuso de células, simulando tanto quanto possível as condições encontradas nas destilarias.

Para tal, 0,8 g de biomassa úmida de levedura foi alimentada com 8,0 ml de mosto constituído de hidrolisado acrescido de melaço, (15,5% de ART, 6,6 g/L de ácido acético, 1,8 g/L de furfural e 1,0% etanol).

As fermentações foram conduzidas a 30°C durante 8 horas, e a temperatura ambiente (27°C) por mais 12 horas aproximadamente. Após este período, por meio de centrifugação (4000 rpm/ 15 minutos), separou-se o fermento do vinho delevaturado, o qual foi novamente alimentado, perfazendo-se assim por 3 ciclos fermentativos.

Ao final de cada ciclo fermentativo, foram estimados os teores de biomassa, viabilidade celular, concentração de etanol e o rendimento fermentativo de cada cultura. Ao final do terceiro ciclo foram ainda estimados os teores de trealose.

4.17 Determinação do teor de etanol

O teor de etanol dos vinhos delevurados foi dosado mediante destilação de amostra (5 ml do vinho) em microdestilador Kjeldahl seguida de densimetria digital (ANTON PAAR – DMA48) para a estimativa do teor de etanol (% v/v.). O valor fornecido pelo aparelho foi multiplicado por 10 para compensar a diluição ocorrida durante a destilação (ZAGO et al., 1996).

4.18 Determinação de biomassa

Após cada ciclo fermentativo, os vinhos foram separados do fermento por centrifugação (4000 rpm/ 15 minutos) e pesados. Para estimar a biomassa úmida, era realizada a diferença entre o peso do tubo com a biomassa e o tubo vazio pesado inicialmente.

4.19 Determinação de trealose

A trealose foi extraída a partir de 200 mg de massa úmida de levedura pelo método de extração seletiva com ácido tricloroacético a 0°C (TREVELYAN; HARRISON, 1956). Para tal, a biomassa de cada cultura foi lavada com água destilada gelada e precipitada mediante a centrifugação (3500 rpm por 10 minutos), a extração foi feita utilizando 2 ml de ácido tricloroacético a 0,5 M em banho de gelo durante 20 minutos. Após a centrifugação, coletou-se o extrato sobrenadante, o qual foi armazenado em micro tubos de 1,5 ml. A quantificação foi realizada mediante a cromatografia líquida de alta eficiência utilizando o cromatógrafo iônico DIONEX DX-300, equipado com coluna Carbopack PA1 e detector de amperometria de pulso com eletrodo de ouro, utilizando como fase móvel NaOH (100mmol.L⁻¹) sob fluxo 1ml.min⁻¹ conforme descrito por Basso et al. (2008).

4.20 Análises estatística

A fim de verificar a diferença significativa das linhagens selecionadas quanto a viabilidade (%), teor de trealose (%), teor de biomassa (g), produção de etanol (%) e rendimento (%), foram realizados testes de comparação de médias de Tukey através do Software R Statistical Software, versão 3.3.2, utilizando as médias referentes as triplicatas de cada linhagem, as médias foram consideradas diferentes ao nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Avaliação do crescimento das linhagens progenitoras

Os resultados obtidos pela avaliação do crescimento das linhagens progenitoras (figura 8a), veio a esclarecer parâmetros de importância para o transcorrer do presente trabalho, pois devido ao fato de envolver 5 diferentes linhagens, as quais apresentam diferentes velocidade de crescimento, foi assim possível determinar a fase de crescimento a qual cada cultura se encontra com relação ao tempo e a concentração celular.

Pelo fato de tal avaliação ter sido feita sem repetições, foi realizada a construção de uma segunda curva de crescimento em condições idênticas (figura 8b), podendo assim obter maior segurança quanto aos dados de crescimento, já que os resultados apresentados por ambas as curvas foram extremamente condizentes. Diante disto, foi observado que ao tempo de 16 horas, a maioria das culturas se deslocaram da fase de crescimento exponencial para o início da fase estacionária. No entanto, a linhagem 430 demonstrou possível crescimento em diauxia entre 24 e 32 horas, tendendo a se estabilizar após este período. Segundo Al-mhanna (2010), após consumir toda a glicose de um determinado meio na presença de oxigênio, leveduras *S. cerevisiae* começam a consumir o subproduto etanol quando a glicose está esgotada, demonstrando assim ter duas curvas de crescimento diferentes para estes dois substratos, o que é chamado de comportamento diauxico.

Foi também observado que a concentração celular nas quais as culturas iniciam a fase estacionária, se mostraram particular em cada linhagem, demonstrando valores variados entre $7,4 \times 10^7$ a $1,3 \times 10^8$ cel/ml.

Figura 8a – Curva de crescimento das linhagens progenitoras durante 48 horas em meio YEPD líquido a 30°C, sendo 24 horas sem agitação e mais 24 horas com agitação (100rpm)

Figura 8b – Segunda curva de crescimento das linhagens progenitoras durante 48 horas em meio YEPD líquido a 30°C, sendo 24 horas sem agitação e mais 24 horas com agitação (100rpm)

5.2 Avaliação de diferentes protocolos de esporulação

Devida a diversidade de protocolos descritos na literatura para obtenção de esporulação em *S. cerevisiae*, foi vista a necessidade de se realizar uma avaliação quanto aos diferentes parâmetros, a fim de selecionar um protocolo capaz de se obter altas taxas de esporulação e viabilidade celular. Como observado na figura 9, os resultados obtidos pela avaliação do comportamento da linhagem CD68 quando induzida a diferentes parâmetros de esporulação, revelaram que com o aumento da concentração de acetato de potássio (de 0,25 a 1,0%), há o consequente aumento na taxa de esporulação, alcançando valores maiores que 80% para os tratamentos C; D e E. Tais resultados diferem do observado por Codón; Ramírez e Benítez (1995), o qual obteve melhor taxa de esporulação em *S. cerevisiae* de panificação, utilizando meio líquido de acetato de potássio a concentração de 0,5%.

No entanto, os resultados deixaram evidente a importância da agitação no ambiente de esporulação, sendo possível observar nos tratamentos A; B; C; D, a rápida resposta da levedura, onde no período de 72 horas, já haviam alcançado taxa de esporulação próxima aos valores máximos, mantendo se praticamente inalterados após este período. Deve-se ainda destaque aos tratamentos C e D, os quais demonstraram alta taxa de esporulação (80,6 e 82,3% respectivamente), valores levemente inferiores ao tratamento E (88,7%), contudo, em 144 horas, o qual se mostrou desfavorecido pela menor agitação.

Tais resultados eram esperados uma vez que já é bem documentado que do ponto de vista metabólico, a esporulação é caracterizada pela exigência das atividades respiratórias e metabolismo gliconeogênico. No entanto existe uma diminuição da atividade das vias gliconeogênica e glioxilato com o passar do tempo durante progresso da esporulação (AON; CORTASSAT, 1996).

Segundo Treinin e Simchen (1993), a respiração celular é necessária para a expressão do gene IME1, um evento chave no processo de meiose e esporulação.

Entre os tratamentos C e D foi ainda observada, maior taxa de esporulação para o tratamento D (3,8% em média).

Figura 9 – Taxa de esporulação da linhagem CD68 a cada 24 horas em meio de acetato de potássio referente a diferentes parâmetros: A = 0,25% $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{K}$, pH 7,4, 120 rpm; B = 0,5% $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{K}$, pH 7,2, 120 rpm; C = 1,0% $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{K}$, pH 7,8, 120 rpm; D = 1,0% $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{K}$, pH 5,5, 120 rpm; E = 1,0% $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{K}$, pH 5,5, 80 rpm; F = 1,0% $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{K}$, pH 7,8, 80 rpm

Como descrito na figura 10, foi observado que os tratamentos com maior agitação (A; B; C; D), demonstraram ao final de 144 horas, a viabilidade das células não esporuladas em média de 24% maior que as médias obtidas nos tratamentos com menor agitação (E; F).

Não foi possível fazer uma correlação entre a taxa de esporulação e a viabilidade celular entre os diferentes tratamentos. No entanto, com relação aos tratamentos que demonstraram maior eficiência de esporulação (C e D), o tratamento D, mesmo que em grandezas pouco expressivas, além da maior taxa de esporulação, demonstrou viabilidade celular em média 3,3% maior.

Figura 10 – Viabilidade das células não esporuladas da cultura CD68 a cada 24 horas em meio de acetato de potássio referente a diferentes parâmetros: A = 0,25% $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{K}$, pH 7,4, 120 rpm; B = 0,5% $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{K}$, pH 7,2, 120 rpm; C = 1,0% $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{K}$, pH 7,8, 120 rpm; D = 1,0% $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{K}$, pH 5,5, 120 rpm; E = 1,0% $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{K}$, pH 5,5, 80 rpm; F = 1,0% $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{K}$, pH 7,8, 80 rpm.

Diante dos resultados acima apresentados, o tratamento D, foi selecionado como protocolo de esporulação base utilizado no decorrer do presente trabalho conforme descrito abaixo:

Após a reativação e crescimento das linhagens em meio YEPD até fase estacionária, as culturas foram centrifugadas (4000 rpm/ 15 minutos), e em seguida foi substituído o meio sobrenadante pelo mesmo volume de meio de esporulação (1,0% de acetato de potássio, pH 5,5). As culturas foram mantidas a 30°C com agitação (120 rpm) pelo período de 72 horas.

5.3 Avaliação do comportamento das linhagens progenitoras quanto a esporulação

É conhecido o fato de que a capacidade de esporulação em leveduras vem a ser particular de cada linhagem. Portanto, foi realizado um ensaio a fim de avaliar o comportamento das diferentes linhagens progenitoras quando induzidas a esporulação.

Como demonstrado na figura 11, as diferentes linhagens demonstraram comportamentos semelhantes, atingindo taxa de esporulação próxima a 90%, exceto pela linhagem 365 que demonstrou taxa de esporulação 30% menor que a média das demais linhagens ao período de 144 horas. Tal variação já vinha a ser esperada, uma vez que é conhecido o fato da taxa de esporulação ser variável em particular com a cepa, podendo apresentar de 0 a 100% de esporulação (SCHNEITER, 2004).

Como observado no ensaio anterior a taxa de esporulação se mostrou com grande atividade nas primeiras 72 horas, permanecendo praticamente inalterada após este período.

É documentada a existência de uma correlação linear entre o consumo de acetato e a taxa de esporulação, exibida pelas culturas esporulantes durante as primeiras 12 horas, período o qual a célula supostamente sintetiza todos os precursores para a parede dos esporos. No entanto, outros estudos demonstraram que tal relação é ainda existente quando alcançadas 72 horas, momento em que as células utilizam a via do glioxilato e gliconeogênicas o que pode ser correlacionados positivamente com a percentagem de esporulação. Contudo, em meio de acetato de potássio, a eficiência de esporulação após 72 horas diminui proporcionalmente à taxa média de 12 horas do consumo de acetato, quando a densidade celular é aumentada e/ou disponibilidade de carbono torna-se limitada (AON; CORTASSAT, 1996; AON; RAPISARDA; CORTASSE, 1996).

Figura 11 – Taxa de esporulação das linhagens progenitoras, durante 144 horas conforme o protocolo de esporulação D

Todas as linhagens progenitoras demonstraram alta viabilidade das células não esporuladas (>80%), mesmo após 144 horas de esporulação. No entanto, as linhagens 430, CD68 e D10 apresentaram uma queda mais acentuada no intervalo de 72 para 144 horas (6,9, 8,9 e 4,6% respectivamente).

Figura 12 – Viabilidade das células não esporuladas das diferentes linhagens progenitoras, durante 144 horas conforme o protocolo de esporulação D

5.4 Purificação dos esporos

A combinação da ação enzimática seguida pela atuação mecânica possibilitou além da liberação dos esporos pela eficiente digestão da parede dos ascos, a maximização da dispersão dos mesmos, aumentando a possibilidade de cruzamentos aleatórios entre células de diferentes linhagens. A figura 13 relata a situação que a cultura de células esporuladas se encontravam antes e depois da aplicação do protocolo de purificação.

Figura 13 – Foto da cultura de células esporuladas antes (1) e depois (2) da aplicação do protocolo de purificação em objetiva 40x

5.5 Determinação da viabilidade dos esporos/haploides

Devido à dificuldade de se obter esporos isolados, o plaquemamento por micromanipulação se mostrou como uma maneira eficiente de se determinar a viabilidade das culturas esporuladas. Deste modo, foi possível obter com segurança colônias provenientes de um esporo isolado. Os resultados obtidos demonstraram viabilidade maior que 50% em quatro das cinco culturas (65% para cultura 365, 45% para cultura 430, 75% para cultura CD68, 65% para cultura CD132 e 75% para cultura D10), mesmo após a severidade da digestão e purificação dos ascos. Tais resultados, não diferem dos relatados por Marullo et al. (2004), onde ao dissecar tétrades de quatro diferentes linhagens de *S. cerevisiae*, observou uma grande heterogeneidade quanto a viabilidade dos esporos, demonstrando valores entre 37 e 76%.

Em recente trabalho envolvendo cruzamento de linhagens industriais de *S. cerevisiae*, Basso (2015) observou a relação positiva entre o tamanho da colônia de haploide com a geração de indivíduos tolerantes ao meio de melaço e hidrolisado. Como demonstrado na figura 14, foi observado no presente trabalho grande heterogeneidade entre tamanhos das colônias de células haploides isoladas provenientes da mesma linhagem, o que pode ter relação com suas respectivas tolerâncias.

Figura 14 – Colônias de haploides da cultura CD68 esporulada, obtidas por micromanipulação para determinação da viabilidade celular (15 esporos geminaram dos 20 semeados)

5.6 Avaliação quanto à capacidade de autodiploidização para diferenciação de linhagens heterotática/homotática

Devido ao fato do presente trabalho envolver linhagens de *S. cerevisiae* ainda pouco estudadas, foi realizado a identificação quanto ao caráter hetero ou homotático das linhagens progenitoras.

Segundo Schneiter (2004), se esporos haploides de linhagens heterotáticas forem mecanicamente separados por micromanipulação, a haplofase pode ser mantida de forma estável. Em contraste, a presença do alelo HO em cepas homotáticas, causa a comutação do mating type durante o crescimento das células haploides. Assim, as células MATa produzem brotos MAT α , e as células MAT α produzir brotos MATa. Como consequência, ocorre o cruzamento originando células diploides.

Com base na citação acima foi possível concluir que todas as linhagens utilizadas no presente trabalho (365; 430; CD68; CD132; D10), são heterotáticas, uma vez que não foi observado esporulação nas culturas proveniente de esporos/haploides isolados por micromanipulação, mesmo quando submetidas a meio de acetato de potássio, após serem crescida em meio rico, demonstrando não ter ocorrido comutação de mating type durante seus respectivos crescimento, o que resultaria na formação de células diploides, consequência do cruzamento entre haploides de mating type opostos.

5.7 Cruzamento massal/ genome shuffling

O cruzamento massal é uma técnica na qual um grande número de células de leveduras haplóides, muitas vezes de parentais diferentes são misturadas, o que permite cruzarem de forma aleatória. Tal técnica por permitir combinar diferentes propriedades de duas ou mais linhagens, podendo ser usada para gerar linhagens industriais com características melhoradas (STEENSELS et al., 2014).

Neste sentido, com a intenção de se obter linhagens melhoradas quanto a tolerância aos inibidores presentes do hidrolisado lignocelulósico foi realizado o cruzamento massal entre as linhagens (365, 430, CD68, CD132 e D10), o que resultou em uma cultura com concentração celular de $8,9 \times 10^7$ cel/ml e 95,2% de viabilidade.

5.8 Evolução adaptativa / seleção

Recente estudo envolvendo melhoramento em *S. cerevisiae* através de evolução adaptativa para tolerância aos inibidores comumente encontrados no hidrolisado lignocelulósico, relatou que após aproximadamente 463 gerações, resultou em mutantes com diferentes níveis de resistência para diferentes inibidores, apresentando aumento na taxa de crescimento de 57% no hidrolisado, 12% em ácido acético, 22% em HMF e 24% em furfural (ALMARIO; REYES; KAO, 2013).

No entanto, as estratégias de evolução adotada no presente trabalho (subitem 4.13), tiveram como objetivo a seleção da biodiversidade gerada pelo cruzamento massal, assim como o enriquecimento das linhagens mais resistentes na cultura em evolução. Sendo assim, devido ao baixo número de gerações aplicados em ambas linhas de evolução (média de 51 gerações), a possibilidade de melhoramento pela ocorrência de mutações foi reduzida, prevalecendo a seleção de indivíduos já presentes na cultura de híbridos.

Ambas as culturas evoluídas foram plaqueadas em YEPD sólido em dois momentos, ao final da 13^o e da 16^o transferência em E1, e ao final da 11^o e da 14^o transferência em E2. Nestas transferências (precoce e tardia), foram obtidas em média 33 e 51 gerações, respectivamente, em ambas as linhas de evolução. As colônias isoladas de cada cultura foram resgatadas assepticamente para posterior cariotipagem e avaliação em microplaca.

5.9 Cariotipagem Eletroforética

As populações de ambas as linhagens submetidas à evolução/seleção foram cariotipadas mediante bandejamento eletroforético dos cromossomas intactos. As figuras 15, 16 e 17 mostram, respectivamente, os perfis eletroforéticos de 3 colônias de cada linhagem parental, 15 colônias coletadas na 13^a transferência da linha de evolução E1 e 15 colônias coletadas na 11^a transferência da linha de evolução E2. Tais perfis demonstram serem todas as colônias referentes à espécie *Saccharomyces cerevisiae* (que, com 16 cromossomas, exibem um perfil eletroforético característico, diferenciando inclusive de outras leveduras não *Saccharomyces*).

Evidencia-se na Figura 15 que cada uma das linhagens parentais representavam diferentes linhagens, cada qual com um perfil eletroforético distinto. Perfis muito próximos das linhagens originais foram observados nas populações evoluídas. Assim o perfil 10 da linha de evolução E1 é praticamente o mesmo da linhagem parental CD68, enquanto o perfil

10 da linha de evolução E2 é muito próximo da linhagem parental D10. Porém na maior parte dos isolados se observa perfis eletroforéticos distintos, embora com regiões apresentando similaridades entre si e com as linhagens parentais. Sabe-se que esporulação de *Saccharomyces cerevisiae* resulta em populações com rearranjos cromossômicos e que estas alterações de polimorfismo cromossômico são mais intensas na região dos cromossomas menores (na parte inferior do gel), como documentado por Lopes (2000). A diversidade dos perfis eletroforéticos observados em ambas as linhas de evolução, em comparação com as linhagens originais, demonstram que material genético novo foi gerado mediante o cruzamento massal.

Figura 15 – Perfis eletroforéticos em triplicatas das 5 linhagens progenitoras

Figura 16 – Perfis eletroforéticos de 15 colônias isoladas após 33 gerações da linha de evolução 1 (E1)

Figura 17 – Perfis eletroforéticos de 15 colônias isoladas após 32 gerações da linha de evolução 2 (E2)

5.10 Avaliação de crescimento em microplacas

Apartir da avaliação em microplaca quanto ao crescimento (DO_{600nm}) e velocidade específica de crescimento ($\mu_{\max}$), envolvendo as 5 linhagens progenitoras, como demonstrado na figura 18, foi possível observar o maior crescimento da linhagem D10 com relação as demais linhagens. Diante deste resultado tal linhagem foi empregada como controle para as demais avaliações.

Figura 18 – Crescimento em ensaio de microplaca envolvendo as 5 linhagens progenitoras, em substrato constituído de hidrolisado e melaço (15,7% ART, 5,0 g/L de ácido acético, 1,5 g/L de furfural, 4,0% etanol, pH 5,0)

Assim como as progenitoras, 98 isolados resultantes do cruzamento e evolução/seleção, foram avaliadas quanto aos seus respectivos crescimentos em ensaio de microplaca, sempre tendo como referência a linhagem parental D10. Destes, 49 foram produtos da linha de evolução 1, sendo 29 provenientes da 13^o transferência e 20 provenientes da 16^o transferência (figuras 19 e 20), e mais 49 isolados produtos da linha de evolução 2, sendo 29 provenientes da 11^o transferência e 20 resultantes da 14^o transferência (figura 21 e 22).

A partir de tal avaliação, como demonstrado na figura 19, 43% dos isolados provenientes de 33 gerações a partir de E1, apresentaram crescimento superior em

comparação a linhagem D10. Ainda com relação a E1, após 51 gerações, 10% dos isolados avaliados apresentaram maior crescimento que com a linhagem controle (figura 20). Tal resultado veio a ser inesperado, pois diante ao maior número de gerações, deveria haver o maior enriquecimento das linhagens resistentes na cultura em evolução, o que por consequência, aumentaria a frequência de linhagens melhoradas.

Figura 19 – Crescimento em ensaio de microplaca envolvendo 29 isolados provenientes de 13 transferências (33 gerações) da linha de evolução 1, em substrato constituído de hidrolisado e melaço (15,7% ART, 5,0 g/L de ácido acético, 1,5 g/L de furfural, 4,0% etanol, pH 5,0)

Figura 20 – Crescimento em ensaio de microplaca envolvendo 20 isolados provenientes de 16 transferências (51 gerações) da linha de evolução 1, em substrato constituído de hidrolisado e melaço (15,7% ART, 5,0 g/L de ácido acético, 1,5 g/L de furfural, 4,0% etanol, pH 5,0)

Em contrapartida, os resultados referentes a E2, assim como previsto, demonstraram aumento na frequência de isolados com maior crescimento com relação a linhagem controle em paralelo ao maior número de gerações a qual a cultura foi submetida. Sendo assim, após 32 gerações, 3% dos isolados avaliados demonstraram crescimento superior a linhagem D10, e após 50 geração o número de isolados superiores aumentou para 50%, demonstrado o eficiente enriquecimento das linhagens mais resistentes em E2 (figura 21 e 22).

Figura 21 – Crescimento em ensaio de microplaca envolvendo 29 isolados provenientes de 11 transferências (32 gerações) da linha de evolução 2, em substrato constituído de hidrolisado e melaço (15,7% ART, 5,0 g/L de ácido acético, 1,5 g/L de furfural, 4,0% etanol, pH 5,0)

Figura 22 – Crescimento em ensaio de microplaca envolvendo 20 isolados provenientes de 14 transferências (50 gerações) da linha de evolução 2, em substrato constituído de hidrolisado e melaço (15,7% ART, 5,0 g/L de ácido acético, 1,5 g/L de furfural, 4,0% etanol, pH 5,0)

A figura 23, representa a classificação dos 20 isolados que demonstraram maior crescimento no ensaio em microplacas (5 melhores de cada placa), em comparação com a linhagem progenitora D10, sendo os 10 melhores isolados submetidos a próxima avaliação com ciclos fermentativos.

Figura 23 – Classificação dos 20 isolados que demonstraram melhor crescimento em microplacas (D.O. 600nm) em comparação com a linhagem progenitora D10

5.11 Avaliação mediante ensaio com ciclos fermentativos

As 10 linhagens que demonstraram maior crescimento no ensaio em microplacas (C6E1-13T, C8E1-13T, C1E1-13T, C14E1-13T, C2E2-11T, C9E1-13T, C7E2-14T, C5E1-16T, C1E1-16T e C17E1-16T), assim como a progenitora D10, foram submetidas a ensaio fermentativo com reciclo de células em triplicata, simulando tanto quanto possível o processo industrial, na busca por linhagens com maior tolerância ao mosto constituído por melaço e hidrolisado lignocelulósico, sobretudo com potencial de serem implantadas nas destilarias brasileira.

Para isto, foram realizados 3 ciclos fermentativos, os quais foram conduzidos a 30°C durante 8 horas, e a temperatura ambiente por mais 12 horas, exceto pelo segundo ciclo, o qual procedeu a temperatura de 30°C pelo período de aproximadamente 20 horas, com intenção de se intensificar os estresses e obter maior diferenciação entre as linhagens resistentes.

Segundo Hou (2010), o sucesso do melhoramento por genome shuffling depende da seleção das linhagens iniciais, da eficiência do “embaralhamento” genético durante a meiose e conjugação e da capacidade das abordagens de seleção.

A alta severidade imposta pelos componentes inibidores presentes no mosto, resultou na queda do peso de biomassa em todas as linhagens logo no primeiro ciclo fermentativo, a qual foi ainda acentuada no transcorrer dos ciclos (figura 24). No entanto, as linhagens C8E1-13T, assim como a referência D10, demonstraram menor percentual de queda, 11 e 14% respectivamente ao final do terceiro ciclo, contudo não demonstraram diferença significativa com relação as linhagens C7E2-14T, C1E1-16T e C17E1-16T. A linhagem C6E1-13T, a qual durante os dois primeiros ciclos havia apresentado peso de biomassa estatisticamente igual as linhagens C7E2-14T, C1E1-16T, C17E1-16T C8E1-13T e D10, ao final do terceiro ciclo demonstrou uma queda acentuada (22% menor que o peso inicial).

Figura 24 – Produção de Biomassa úmida (g) das linhagens selecionadas em comparação a referência (D10) ao final de cada ciclo fermentativo. Médias com letras iguais dentro de um mesmo ciclo não diferem ao nível de 5% de significância

Baixa queda de biomassa ou até mesmo seu acréscimo durante os ciclos fermentativos, vem a ser de total interesse para a indústria de etanol. Segundo Basso, Basso e Rocha (2011), a reutilização celular característica do processo de fermentação industrial brasileiro, reduz a necessidade de propagação intensiva de levedura, sendo assim, menos açúcar é desviado para a produção de biomassa, a qual demonstra um aumento entre 5 a 10% em relação à biomassa inicial durante um ciclo fermentativo. No entanto, as fermentações com base no processo primeira geração vem a ser consideravelmente menos impactante a levedura, já que o mosto a

base de melaço diluído, não contem a sobrecarga de inibidores constituintes do hidrolisado lignocelulósico.

Tais resultados já eram esperados, uma vez que o decréscimo no crescimento da levedura na presença dos componentes inibidores presentes no hidrolisado já é bem conhecido. Autores relatam que o sinergismo entre os furfural e HMF torna propensa até mesmo a total inibição do crescimento da levedura (VERDUYN et al., 1990; PALMQVIST et al., 1996; TAHERZADEH et al., 2000; ALMEIDA et al., 2007).

O ácido acético disponível em grande quantidade no mosto utilizado na presente avaliação, é uma das restrições mais limitantes no crescimento e na viabilidade da levedura durante a fermentação alcoólica (ZHENG et al., 2011).

O parâmetro de viabilidade celular vem a ser de fundamental importância, pois este reflete o impacto que a somatória dos estresses está exercendo sobre as células, possibilitando ao longo dos ciclos selecionar as linhagens mais resistentes pela maior viabilidade.

Os resultados quanto as viabilidades celulares demonstraram valores praticamente inalterada para todas as linhagens ao termino do primeiro ciclo fermentativo. Contudo, a partir da segunda fermentação, foi possível obter maior diferenciação entre as linhagens resistentes. Diante disto, como observado na figura 25, ao final do terceiro ciclo, 2 linhagens proveniente do melhoramento se destacaram por demonstrar viabilidade maior que 80% (C8E1-13T, C14E1-13T), assim como a linhagem controle D10 (81%). No entanto estas não apresentaram diferenças significativas em comparação as linhagens C7E2-14T, C5E1-16T, C1E1-16T e C17E1-16T. Em contrapartida a linhagem C2E2-11T se mostrou consideravelmente menos resistente que as demais linhagens apresentando ao final do terceiro ciclo 46% de viabilidade.

Figura 25 – Viabilidade celular (%) das linhagens selecionadas em comparação a referência (D10) ao final de cada ciclo fermentativo. Médias com letras iguais dentro de um mesmo ciclo não diferem ao nível de 5% de significância

Quanto ao rendimento fermentativo demonstrado na figura 27, mesmo sob os estresses provenientes dos inibidores constituintes do hidrolisado, todas as linhagens demostram no primeiro e no segundo ciclo valores maiores/igual a 80%. No entanto foi observado no terceiro ciclo menor produção de etanol (figura 26) e consequentemente queda no rendimento, reflexo da queda na viabilidade celular acentuada no segundo ciclo.

Figura 26 – Teor de etanol (% v/v) nos vinhos delevedurados referente as linhagens selecionadas em comparação a referência (D10) ao final de cada ciclo fermentativo. Médias com letras iguais não diferem ao nível de 5% de significância

Figura 27 – Rendimento fermentativo (%) referente as linhagens selecionadas em comparação a referência (D10) ao final de cada ciclo fermentativo. Médias com letras iguais não diferem ao nível de 5% de significância

A partir disto foi possível destacar a linhagem C8E1-13T, a qual demonstrou 74,2% de rendimento fermentativo ao final do terceiro ciclo, 1,3 % maior que a linhagem referência D10, demonstrando melhoria no fenótipo de tolerância a somatória dos estresses e produção de etanol. No entanto, tal valor não diferiu significativamente dos valores apresentados pelas linhagens C6E1-13T, C5E1-16T, C1E1-16T assim como a controle D10.

Hou (2010), em estudo envolvendo aplicação de genome shuffling em células mutagenizadas, para melhoria na tolerância a múltiplos estresses (etanol, pressão osmótica e alta temperatura), obteve o aumento no rendimento em etanol de 10,96% em comparação com a linhagem controle.

Através da aplicação de genome shuffling envolvendo mutantes derivados de uma mesma linhagem, Zheng et al. (2011), obteve sucesso na obtenção de linhagem melhorada quanto tolerância ao ácido acético, demonstrando um crescimento significativamente mais rápido e maior viabilidade celular, além da produção de etanol 21,6% maior que a linhagem progenitora.

A trealose em *Saccharomyces* tem implicação em sua sobrevivência sob várias condições de estresse (HOUNSA et al., 1998).

Vários autores relatam as funções protetoras que a trealose desempenha sob leveduras. Mais especificamente, trabalhos com *S. cerevisiae* indicam que a trealose é crucial para a sobrevivência ao estresse proveniente de altas temperaturas, assim como sob severo estresse osmótico (HOUNSA et al., 1998; SINGER; LINDQUIST, 1998).

Diante disto, tal parâmetro foi considerado determinante para seleção de linhagens melhoradas no presente trabalho, pois logo, acreditasse que o teor de trealose foi um fator decisivo para sobrevivência das linhagens avaliadas diante do conjunto estresses as quais as mesmas foram submetidas durante os ciclos fermentativos.

Assim como observado no presente trabalho com relação aos resultados apresentados pela linhagem C8E1-13T, Mansure et al. (1994), observou uma correlação positiva entre viabilidade celular e concentração de trealose, ao avaliar várias linhagens de leveduras com diferenças no metabolismo de trealose, quanto suas respectivas capacidades de sobreviverem na presença de etanol.

Diante de tais resultados, fica sugerido que apesar de não ter sido observado diferenças significativa quanto a viabilidade celular entre as linhagens C14E1-13T, C7E2-14T, C5E1-16T, C1E1-16T, C17E1-16T e D10, a linhagem C8E1-13T é possivelmente capaz de suportar um maior número de estresses, devido ao fato de ter apresentado reserva de trealose significativamente maior que as demais linhagens, como observado na figura 28.

Figura 28 – Teores de reservas de trealose (% na matéria seca) das linhagens selecionadas em comparação a referência (D10) ao final do 3 ciclo fermentativo. Médias com letras iguais não diferem ao nível de 5% de significância

Os resultados obtidos no presente trabalho quanto a diversos parâmetros, a princípio não parecem ser tão promissores se comparado aos resultados relatados pela literatura. No entanto, é necessário salientar que a linhagem controle (D10), se trata de uma linhagem de *Saccharomyces cerevisiae* já melhorada para fenótipo de alta tolerância, a qual como relatado por Silvello (2016), demonstrou viabilidade celular aproximadamente 20% maior que a

linhagem SA-1 após 5 ciclos fermentativos em mosto a base de melaço e hidrolisado lignocelulósico.

Diante disto, ficou evidenciado o sucesso na obtenção de linhagens melhoradas no presente trabalho, sendo possível destacar a linhagem C8E1-13T, a qual além de apresentar alta viabilidade celular (significativamente igual a linhagem D10), demonstrou ainda teor de reserva de trealose 3,5 vezes maior que o teor apresentado pela linhagem controle, o que permitiria sugerir que tal linhagem poderia tolerar situações mais estressantes que aquelas imposta no presente trabalho, ou as mesmas condições por um período mais prolongado.

6 CONCLUSÕES

No presente trabalho verificou-se que os protocolos de esporulação permitem esporulação eficiente mesmo quando se pretende a esporulação de diferentes linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*.

O cruzamento massal de diferentes linhagens de *Saccharomyces* gera uma diversidade de híbridos, os quais, mediante avaliação de parâmetros fisiológicos permiti a seleção de alguns deles com atributos desejáveis superiores aos parentais.

Através de cruzamento massal híbridos são obtidos com melhor perfil de tolerância para suportar os estresses inerentes à uma fermentação de substrato lignocelulósico em condições de reciclo de células.

Tais linhagens com atributos de multitolerância, como a C8E1-13T, se constituem em material genético valioso para uma futura inserção de atributos metabólicos que as capacitem a promover a fermentação de pentose, favorecendo um aproveitamento total dos açúcares oriundos dos hidrolisados lignocelulósicos.

REFERÊNCIAS

- ALMARIO, M. P.; REYES, H. L.; KAO, K. C. Evolutionary Engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for Enhanced Tolerance to Hydrolysates of Lignocellulosic Biomass. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 110, n. 10, p. 2616-2623, 2013.
- AL-MHANNA, N. M. M. Observation of Crabtree Effect and Diauxic Behaviour of Yeast by Using Absorption. **Chemical Engineering Transactions**, Milão, v. 21, p. 1465-1470, 2010.
- ALMEIDA, J. R. M. et al. Increased tolerance and conversion of inhibitors in lignocellulosic hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*. **Chemical Technology and Biotechnology**, Oxford, v. 82, n. 4, p. 340-349, 2007.
- ALVES, L. M. C. et al. Metagenoma e a desconstrução da biomassa. In: GIANNINI, M. J. S. M. et al. (Ed.). **Bioenergia desenvolvimento, pesquisa e inovação**, São Paulo, Cultura Acadêmica, 2012. cap. 4, p. 83-112.
- ANDRADE, R. R. et al. Kinetics of ethanol production from sugarcane bagasse enzymatic hydrolysate concentrated with molasses under cell recycle. **Bioresource Technology**, Essex v. 130, p. 351–359, 2013.
- AON, J. C.; CORTASSA, S. Metabolic rates during sporulation of *Saccharomyces cerevisiae* on acetate. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 69, p. 257-265, 1996.
- AON, J. C.; RAPISARDA, V.A.; CORTASSA, S. Metabolic Fluxes Regulate the Success of Sporulation in *Saccharomyces cerevisiae*. **Experimental Cell Research**, New York, v.222, p.157–162, 1996.
- BASSO, L. C. et al. Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil. **FEMS Yeast Research**, Amsterdam, v. 8, n. 7, p. 1155-1163, 2008.
- BASSO, L. C.; BASSO, T. O.; ROCHA, S. N. Ethanol production in Brazil: the industrial process and its impact on yeast fermentation. In: SANTOS BERNARDES, M. A (Ed.). **Biofuel production: recent developments and prospects**. Croácia: Intech, 2011, cap. 5, p. 85-100.
- BASSO, T. P. **Improvement of *Saccharomyces cerevisiae* by hybridization for increased tolerance towards inhibitors from second-generation ethanol substrate**. 2015. 106p. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2015.
- BILINSKI, C. A.; RUSSELL, I.; STEWART, G. G. Analysis of sporulation in brewer's yeast: Induction of tetrad formation. **Journal of Institute of Brewing**, London. v. 92, p. 594-598, 1986.
- BLONDIN, B.; VÉZINHET, F. Identification de souches de levure oenologiques par leur caryotypes obtenus em electrophorese em champ pulse. **Revue Française d'Oenologie**, Paris, v.28, p. 7-11, 1988

BNDES; CGEE. **Bioetanol de cana de açúcar Energia para o desenvolvimento sustentável**. Rio de Janeiro: Editora Senac Rio, 2008. 316p.

CARBONARI, C. A.; VELINI, E. D.; ANTUNIASI, U. R. Tecnologia de aplicação e inovação voltadas ao uso racional de defensivos agrícolas em culturas destinadas à produção de bioenergia. In: GIANNINI, M. J. S. M. et al. (Ed.). **Bioenergia desenvolvimento, pesquisa e inovação**, São Paulo, Cultura Acadêmica, 2012. Cap. 3, p. 271-318.

CODÓN, A. C.; GASENT-RAMÍREZ, J. M.; BENÍTEZ, T. Factors which affect the frequency of sporulation and tetrad formation in *Saccharomyces cerevisiae* baker's yeasts. **Applied and Environmental Microbiology**. Washington, v. 61, n. 2, p. 630–638, 1995.

ÇAKAR, Z. P. et al. Evolutionary engineering of multiple-stress resistant *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Yeast Research**, Amsterdam, n.5, p. 569-578, 2005.

ÇAKAR, Z. P.; TURANLI-YILDIZ, B.; ALKIM, C.; YILMA, U. Evolutionary engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for improved industrially important properties. **FEMS Yeast Research**, Amsterdam. v. 12, p.171–182, 2012

ERNANDES, F. M. P. G.; GARCIA-CRUZ, C. H. P. Produção de etanol por *Zymomonas mobilis* CCT 4494 utilizando substratos não convencionais como alternativa à produção convencional. In: GIANNINI, M. J. S. M. et al. (Ed.). **Bioenergia desenvolvimento, pesquisa e inovação**, São Paulo, Cultura Acadêmica, 2012. cap. 8, p. 195-250.

GIUDICI, P. et al. Strategies and perspectives for genetic improvement of wine yeasts. **Applied Microbiology Biotechnology**, Berlin. v.66, p.622–628, 2005.

GOMES, E. et al. Resíduos agrícolas e agroindustriais: potencialidades de uso na produção de etanol. In: GIANNINI, M. J. S. M. et al. (Ed.). **Bioenergia desenvolvimento, pesquisa e inovação**, São Paulo, Cultura Acadêmica, 2012. Cap. 10, p. 271-319.

GREIG, D. et al. Hybrid Speciation in Experimental Populations of Yeast. **Science**, Washington v. 298, p. 1773-1774, 2002.

GRITZALI, M.; BROWN, JR., R.D. Relationships between purified extracellular enzymes from induce or Cellulose-grown cells. In: BROWN, JR., R.D.; JURASEK, L. (Ed.). **Hydrolysis of cellulose: Mechanisms of enzymatic and acid catalysis**. American Chemical society, Washington, 1979. Cap. 12, p. 237-261.

GUIMARÃES, P. M. R. et al. Adaptive Evolution of a Lactose-Consuming *Saccharomyces cerevisiae* Recombinant. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 74, p. 1748–1756, 2008.

HEIPIEPER, H.F.; KEWELOH, H.; REHM, H.J. Influence of Phenols on Growth and Membrane Permeability of Free and Immobilized *Escherichia coli*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington. v. 57, p. 1213-1217, 1991.

HORVÁTH, I. S. et al. Effects of Furfural on the Respiratory Metabolism of *Saccharomyces cerevisiae* in Glucose-Limited Chemostats. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, p. 4076-4086, 2003.

HOU, L. Improved Production of Ethanol by Novel Genome Shuffling in *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Biochemistry Biotechnology**, Clifton, v. 160, p. 1084-1093, 2010.

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

HOUNSA, C. G. et al. Role of trehalose in survival of *Saccharomyces cerevisiae* under osmotic stress. **Microbiology**, New York, v. 144, p. 671-680, 1998.

HUMPHREY, A. E. The hydrolysis of cellulosic materials to useful products. BROWN, JR., R.D.; JURASEK, L. (Ed.). **Hydrolysis of cellulose: Mechanisms of enzymatic and acid catalysis**. American Chemical society, Easton, 1979. cap. 2, p. 25-54.

JÖNSSON, L. J.; ALRIKSSON, B.; NILVEBRANT, N. Bioconversion of lignocellulose: inhibitors and detoxification. **Biotechnology for Biofuels**, Sweden, v. 6, n. 16, p. 1-10, 2013.

JOSHI, B. et al. Lignocellulosic ethanol production: Current practices and recent developments. **Biotechnology and Molecular Biology Reviews**, Lagos, v. 6, p. 172-182, 2011.

KUMAR, D.; MURTHY, G. S. Impact of pretreatment and downstream processing technologies on economics and energy in cellulosic ethanol production. **Biotechnology for Biofuels**. Sweden, v. 4 p. 1-19, 2011.

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

LADISCH, M. R. et al. Process considerations in the enzymatic hydrolysis of biomass. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 5, p. 82-101, 1983.

LEE, S. M.; JELLISON, T.; ALPER, H. S. Systematic and evolutionary engineering of a xylose isomerase-based pathway in *Saccharomyces cerevisiae* for efficient conversion yields. **Biotechnology for Biofuels**. Sweden, v.7, p. 1-8, 2014.

LOPES, M. L. **Estudo do polimorfismo cromossômico em levedura selecionada do processo industrial de produção de etanol**. 2000. 118p. Tese (Doutorado-Microbiologia aplicada) – Instituto de Biociências, “Campus de Rio Claro” Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2000.

LUNDBLAD, L.; STRUHL, K. Yeast, Introduction. In. Ausubel, F. M. Brent, R.; Kingston, R. E.; Moore, D. D.; Seidman, J.G.; Smith, J. A.; Struhl, K. (Ed). **Current Protocols in Molecular Biology**. John Wiley & Sons Inc; 2003. Cap. 13.

MADIGAN, M.T. et al. **Microbiologia de Brock**. 14a ed. Porto Alegre: Artmed, 2016. 1005p.

MADIGAN, M.T. et al. **Microbiologia de Brock**. 12a ed. Porto Alegre: Artimed, 2010. 1160p.

MANSURE, J.J. et al. Trehalose inhibits ethanol effects on intact yeast cells and liposomes. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 191, n. 2, p. 309-316, 1994.

MARULLO, P. et al. Inheritable nature of enological quantitative traits is demonstrated by meiotic segregation of industrial wine yeast strains. **FEMS Yeast Research**, Amsterdam, v. 4, p. 711-719, 2004.

MIRA, N. P. et al. Genome-wide identification of *Saccharomyces cerevisiae* genes required for tolerance to acetic acid. **Microbial Cell Factories**. Lisboa. v. 9, p. 13, 2010.

MIRANDA, E.S. **Seleção de linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* tolerantes aos inibidores presentes no hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar**. 2016. 111p. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2016.

MOREIRA, I. C.; GOLDEMBERG, J. The Alcohol Program. **Energy Policy**, Surrey, v. 27, n. 4, p. 229-245, 1999.

MORJANOFF, P. J.; GRAY, P. P. Optimization of steam explosion as a method for increasing susceptibility of sugarcane bagasse to enzymatic saccharification. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 29, p. 733-741, 1987.

MOSIER, N. et al. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, Essex, v. 96, p. 673-686, 2005.

OLIVEIRA, A. J. et al. Métodos para o controle microbiológico na produção de álcool e açúcar. Piracicaba: **FERMENTEC/FEALQ/ESALQ-USP**, 1996. 89p.

OLSSON, L.; HAHN-HAGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates for ethanol production. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 18, p. 312-331, 1996.

PALMQVIST, E. et al. The effect of water-soluble inhibitors from steam-pretreated willow on enzymatic hydrolysis and ethanol fermentation. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 19, p. 470-476, 1996.

PALMQVIST, E.; HAHN-HAGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates I: inhibition and detoxification. **Bioresource Technology**, Essex, v. 74, p. 17-24, 2000.

PALMQVIST, E.; HAHN-HAGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition. **Bioresource Technology**, Essex, v.74, p.25-33, 2000.

PARKS, H. D. et al. The *S. cerevisiae* Nitrogen Starvation-Induced YVH LP and PTP2P Phosphatases Play a Role in Control of Sporulation. **YEAST**. Davis, v. 12, p. 1135-1151, 1996.

PATNAIK, R. et al. Genome shuffling of *Lactobacillus* for improved acid tolerance. **Nature biotechnology**, New York, v. 20, p. 707-712, 2002.

PINEL, D. et al. *Saccharomyces cerevisiae* Genome Shuffling through Recursive Population Mating Leads to Improved Tolerance to Spent Sulfite Liquor. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 77, p. 4736–4743, 2011.

POPOFF, T.; THEANDER, O. Formation of aromatic compounds from carbohydrates: Part III. Reaction of D-glucose and D-fructose in slightly acidic, aqueous solution. **Acta Chemica Scandinavica**, Copenhagen, v. 30, p. 397-402, 1976.

PRETORIUS, L. S.; VAN DER WESTHUIZEN, T. J. The Impact of Yeast Genetics and Recombinant DNA Technology on the Wine Industry - A Review. **South African Journal of Enology and Viticulture**, Stellenbosch, v. 12, p. 3-31, 1991.

RAINIERI, S.; PRETORIUS, L. S. Selection and improvement of wine yeasts. **Annals of Microbiology**. Stellenbosch. v. 50, p. 15-31, 2000.

RUSSELL, I. Understanding yeast fundamentals. In: JACQUES, K.A.; LYONS, T.P.; KELSALL, D.R. (Ed.). **The Alcohol Textbook**, 4th Edition. Alltech Inc. 2003. England, cap. 9, p. 85-120.

SANCHEZ, R. G.; SOLODOVNIKOVA, N.; WENDLAND, J. Breeding of lager yeast with *Saccharomyces cerevisiae* improves stress resistance and fermentation performance. **Yeast**. Davis, v. 29, p. 343–355, 2012.

SANDERSON, K. A chewy problem. Outlook Biofuels. **Nature**, London, v. 474, p. 12-14, 2011.

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

SCHNEITER, R. **Genetics, Molecular and Cell Biology of Yeast**. University Fribourg, 2004, 86 p.

SILVELLO, C. **Obtenção de leveduras tolerantes aos inibidores do hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar mediante hibridação**. 2016. 111p. Dissertação (Mestra em Microbiologia Agrícola) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2016.

SINGER, M. A.; LINDQUIST, S. Thermotolerance in *Saccharomyces cerevisiae*: The Yin and Yang of trehalose. **Tibtech**. v. 16, p. 460-468, 1998.

SONDEREGGER, M.; SAUER, U. Evolutionary Engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for Anaerobic Growth on Xylose. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, p. 1990–1998, 2003.

STEENSELS, J. et al. Improving industrial yeast strains: exploiting natural and artificial diversity. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 38, p. 947-995, 2014.

STEINMETZ, L. M. et al. Dissecting the architecture of a quantitative trait locus in yeast. **Nature**, London, v. 416, p.326-330, 2002.

SUN, Y.; CHENG, J. Y. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. **Bioresource Technology**, Essex, v. 83, p. 1-11, 2002.

TAHERZADEH, M. J. et al. Physiological effects of 5-hydroxymethylfurfural on *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 53, p. 701-708, 2000.

TAHERZADEH, M. J.; KARIMI, K. Pretreatment of Lignocellulosic Wastes to Improve Ethanol and Biogas Production: A Review. **International Journal of Molecular Sciences**. Basel, v. 9, p. 1621-1651, 2008.

TAHERZADEH, M. J.; MILLATI, R.; NIKLASSON, C. Continuous Cultivation of Dilute-Acid Hydrolysates to Ethanol by Immobilized *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 95, p. 45-57, 2001

THEVELEIN, J. M. Regulation of Trehalose Mobilization in Fungi. **Microbiological Reviews**. v.48, p. 42-59, 1984.

TOMÉ, J. A. T. R. Etanol de segunda geração: O grande salto tecnológico. In: VICENTINI, B. H.; GUIMARÃES JUNIOR, O.; BASSO, T. P. (Ed.). **Temas de Agronegócios**. Piracicaba, Linha Impressa, 2015. Cap. 1, p.13-25.

TRECO, D. A.; WINSTON, F. Growth and Manipulation of Yeast. In: AUSUBEL, F. M. et al. (Ed). **Current Protocols in Molecular Biology**. John Wiley & Sons Inc; 2003. cap. 13, Unit 13.2.

TREININ, M.; SIMCHEN, G. Mitochondrial activity is required for the expression of ime1, a regulator of meiosis in yeast. **Current Genetics**, New York, v. 23, p. 223-227, 1993.

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

ÚNICA. Etanol, 60 países já adotam mistura obrigatória de biocombustíveis aos combustíveis fósseis. Disponível em: <http://www.unica.com.br/noticia/27251092920325965467/60-paises-ja-adotam-mistura-obrigatoria-de-biocombustiveis-aos-combustiveis-fosseis/>. Acesso em: 14 març. 2016.

VERDUYN, C.; POSTMA, E.; SRCHEFFERS, W.A.; VAN DIJKEN, J.P. Physiology of *Saccharomyces cerevisiae* in anaerobic glucose-limited chemostat cultures. **Journal of General Microbiology**. London v. 136, p. 395-403, 1990.

Walker, G. M. **Yeast Physiology and Biotechnology**. 1st Edition. Wiley, 2009. p. 478-491. Disponível em: <http://pt.slideshare.net/villalvaa/2009-yeast>. Acesso em: 22 jan. 2016.

WANG, H.; HOU, L. Genome Shuffling to Improve Fermentation Properties of Top fermenting Yeast by the Improvement of Stress Tolerance. **Food Science and Biotechnology**, v. 19, p. 145-150, 2010.

YARRIS, L. **The Evolutionary Road to Biofuels**. Berkeley Lab. U.S. Department of Energy, California, 2009. Disponível em: <http://www2.lbl.gov/Publications/YOS/Feb/>. Acesso em: 09 jan. 2017.

ZAGO, E. A. et al. Métodos analíticos para o controle da produção de álcool. Piracicaba: **FERMENTEC**; FEALQ, ESALQ, 1996. 194p.

ZHENG, D. Q. et al. Drug resistance marker-aided genome shuffling to improve acetic acid tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Hampshire, v. 38, p. 415 – 422, 2011.

ANEXOS

ANEXO A - Taxa de esporulação (%) da linhagem CD68 referente a diferentes protocolos de esporulação

Taxa de esporulação (%)							
Tratamento	0h	24h	48h	72h	96h	120h	144h
A	0,0	0,0	9,7	15,7	14,5	17,2	15,3
	0,0	0,0	13,1	14,1	16,4	13,8	16,0
	0,0	0,0	7,7	12,5	12,0	13,7	14,1
Média	0,0	0,0	10,2	14,1	14,3	14,9	15,1
Desvio padrão	0,00	0,00	2,73	1,60	2,21	1,99	0,96
B	0,0	0,0	40,5	41,3	45,2	48,4	46,0
	0,0	0,0	38,5	44,6	42,2	46,4	52,4
	0,0	0,0	38,9	44,6	45,2	46,9	53,8
Média	0,0	0,0	39,3	43,5	44,2	47,2	50,7
Desvio padrão	0,00	0,00	1,06	1,91	1,73	1,04	4,16
C	0,0	0,0	58,8	78,4	77,8	81,8	82,5
	0,0	0,0	60,8	81,4	84,8	82,6	76,7
	0,0	0,0	61,8	82,0	82,1	83,9	83,4
Média	0,0	0,0	60,5	80,6	81,6	83,8	80,9
Desvio padrão	0,00	0,00	1,53	1,93	3,53	1,06	3,64
D	0,0	0,0	70,1	79,7	86,3	86,8	85,4
	0,0	0,0	64,8	83,8	84,9	83,2	78,3
	0,0	0,0	68,6	83,5	83,8	85,7	83,2
Média	0,0	0,0	67,8	82,3	85,0	85,2	82,3
Desvio padrão	0,00	0,00	2,73	2,29	1,25	1,84	3,63
E	0,0	0,0	1,0	17,2	60,3	89,5	90,1
	0,0	0,0	1,0	3,2	17,4	54,9	82,9
	0,0	0,0	1,1	12,2	49,8	82,4	93,5
Média	0,0	0,0	1,0	10,9	42,5	75,6	88,8
Desvio padrão	0,00	0,00	0,06	7,09	22,36	18,27	5,41
F	0,0	0,0	0,5	0,8	1,2	1,9	3,3
	0,0	0,0	0,2	0,8	1,2	2,1	3,9
	0,0	0,0	0,3	0,7	1,4	1,8	1,4
Média	0,0	0,0	0,3	0,8	1,3	1,9	2,9
Desvio padrão	0,00	0,00	0,15	0,06	0,12	0,15	1,31

ANEXO B – Viabilidade celular (%) das células não esporuladas da linhagem CD68 referente a diferentes protocolos de esporulação

Viabilidade (%)							
Tratamento	0h	24h	48h	72h	96h	120h	144h
A	100	100	97	97	96	98	90
	100	100	98	98	95	96	92
	100	99	99	96	94	92	81
Média	100	100	98	97	95	95	88
Desvio padrão	0,00	0,15	0,86	1,14	0,95	2,80	6,20
B	100	100	91	96	93	92	81
	100	100	97	96	91	89	73
	100	100	97	95	91	92	68
Média	100	100	95	95	92	91	74
Desvio padrão	0,00	0,17	3,20	0,49	1,10	1,78	6,70
C	100	99	96	87	83	83	83
	100	100	93	84	82	79	83
	100	99	93	74	76	80	80
Média	100	99	94	82	81	81	82
Desvio padrão	0,00	0,26	1,53	6,95	3,79	2,00	1,47
D	100	100	98	85	82	82	86
	100	100	96	88	86	83	86
	100	100	94	88	89	85	87
Média	100	100	96	87	85	84	86
Desvio padrão	0	0,17	1,75	2,08	3,10	1,81	0,36
E	100	99	98	98	95	83	47
	100	98	97	99	98	93	80
	100	100	99	98	99	85	56
Média	100	99	98	98	97	87	61
Desvio padrão	0,00	0,60	1,21	0,65	2,03	5,44	17,14
F	99	99	90	83	75	67	69
	99	99	89	84	73	63	62
	99	99	87	87	75	64	61
Média	99	99	89	85	74	64	64
Desvio padrão	0,00	0,38	1,65	2,16	0,95	2,04	4,08

ANEXO C – Taxa de esporulação (%) das linhagens progenitoras, conforme o protocolo de esporulação D

Taxa de esporulação (%)					
Linhagens	0h	24h	48h	72h	144h
365	0,0	0,0	45,3	59,7	63,5
	0,0	0,0	47,6	59,8	61,6
	0,0	0,0	34,7	60,0	58,5
Média	0,0	0,0	42,5	59,8	61,2
Desvio padrão	0,00	0,00	6,88	0,15	2,52
430	0,0	1,5	72,9	88,0	85,4
	0,0	1,4	80,2	85,9	86,3
	0,0	1,5	61,9	83,7	85,8
Média	0,0	1,5	71,7	85,9	85,8
Desvio padrão	0,00	0,06	9,21	2,15	0,45
CD68	0,0	0,0	83,2	93,9	92,0
	0,0	0,0	71,5	81,0	87,9
	0,0	0,0	54,2	79,6	89,2
Média	0,0	0,0	69,6	84,8	89,7
Desvio padrão	0,00	0,00	14,59	7,88	2,10
CD132	0	1,4	57,2	85,6	87,2
	0	1,4	59,7	84,2	89,9
	0	1,3	62,3	86,2	87,9
Média	0	1,4	59,7	85,3	88,3
Desvio padrão	0,00	0,06	2,55	1,03	1,40
D10	0,0	0,0	75,4	85,4	87,6
	0,0	0,0	73,0	86,1	87,9
	0,0	0,0	66,4	85,4	87,9
Média	0,0	0,0	71,6	85,6	87,8
Desvio padrão	0,00	0,00	4,66	0,40	0,17

ANEXO D – Viabilidade celular (%) das células não esporuladas das linhagens progenitoras conforme o protocolo de esporulação D

Viabilidade (%)					
Linhagens	0h	24h	48h	72h	144h
365	99	97	92	86	89
	99	97	92	82	88
	99	99	97	86	89
Média	99	97	94	85	88
Desvio padrão	0,17	1,21	2,54	2,11	0,46
430	100	97	100	89	90
	100	98	92	93	78
	100	99	97	91	84
Média	100	98	96	91	84
Desvio padrão	0,00	0,75	4,11	1,98	6,10
CD68	100	98	89	83	82
	100	98	96	96	75
	100	99	95	97	93
Média	100	98	93	92	83
Desvio padrão	0,00	0,71	3,86	7,47	8,90
CD132	100	98	92	91	87
	100	100	93	85	83
	100	97	93	88	91
Média	100	98	93	88	87
Desvio padrão	0,00	1,47	0,10	2,65	3,60
D10	99	99	94	95	88
	99	100	99	97	91
	99	98	98	98	97
Média	99	99	97	97	92
Desvio padrão	0,00	1,12	2,63	1,43	4,30

ANEXO E – Teor de Biomassa úmida (g) das linhagens avaliadas em comparação a referência (D10) ao final de cada ciclo fermentativo

Biomassa (g)							
Linhagens	Ciclo 1	Ciclo 2	Ciclo 3	Linhagens	Ciclo 1	Ciclo 2	Ciclo 3
D10	0,82	0,78	0,71	C9E1-13T	0,77	0,66	0,62
	0,82	0,76	0,72		0,75	0,64	0,58
	0,78	0,70	0,70		0,74	0,64	0,59
Média	0,81	0,75	0,71	Média	0,75	0,65	0,60
Desvio padrão	0,02	0,04	0,01	Desvio padrão	0,02	0,01	0,02
C6E1-13T	0,79	0,71	0,65	C7E2-14T	0,79	0,72	0,67
	0,78	0,72	0,65		0,80	0,71	0,67
	0,81	0,72	0,66		0,80	0,72	0,68
Média	0,79	0,72	0,65	Média	0,80	0,72	0,67
Desvio padrão	0,02	0,01	0,01	Desvio padrão	0,01	0,01	0,01
C8E1-13T	0,79	0,75	0,70	C5E1-16T	0,73	0,66	0,64
	0,78	0,74	0,71		0,72	0,65	0,62
	0,81	0,78	0,73		0,74	0,68	0,62
Média	0,79	0,76	0,71	Média	0,73	0,66	0,63
Desvio padrão	0,02	0,02	0,02	Desvio padrão	0,01	0,02	0,01
C1E1-13T	0,76	0,66	0,61	C1E1-16T	0,76	0,72	0,68
	0,75	0,65	0,62		0,75	0,72	0,67
	0,75	0,67	0,64		0,76	0,72	0,67
Média	0,75	0,66	0,62	Média	0,76	0,72	0,67
Desvio padrão	0,01	0,01	0,02	Desvio padrão	0,01	0,00	0,01
C14E1-13T	0,75	0,68	0,64	C17E1-16T	0,78	0,71	0,66
	0,75	0,69	0,65		0,79	0,73	0,68
	0,77	0,71	0,65		0,78	0,73	0,68
Média	0,76	0,69	0,65	Média	0,78	0,72	0,67
Desvio padrão	0,01	0,02	0,01	Desvio padrão	0,01	0,01	0,01
C2E2-11T	0,78	0,66	0,58				
	0,79	0,68	0,64				
	0,78	0,66	0,61				
Média	0,78	0,67	0,61				
Desvio padrão	0,01	0,01	0,03				

ANEXO F – Viabilidade celular (%) das linhagens avaliadas em comparação a referência (D10) ao final de cada ciclo fermentativo

Viabilidade (%)							
Linhagens	Ciclo 1	Ciclo 2	Ciclo 3	Linhagens	Ciclo 1	Ciclo 2	Ciclo 3
D10	99	94	83	C9E1-13T	97	77	72
	99	93	79		98	68	67
	99	93	80		99	66	66
Média	99	93	81	Média	98	70	68
Desvio padrão	0,25	0,50	2,08	Desvio padrão	1,35	5,54	3,01
C6E1-13T	99	81	63	C7E2-14T	99	81	85
	100	81	75		99	85	78
	98	84	66		98	84	75
Média	99	82	68	Média	99	83	79
Desvio padrão	0,75	1,59	5,94	Desvio padrão	0,50	2,21	5,16
C8E1-13T	99	94	81	C5E1-16T	98	88	76
	99	95	80		98	90	79
	99	96	82		97	88	81
Média	99	95	81	Média	98	88	78
Desvio padrão	0,25	1,05	0,86	Desvio padrão	0,62	1,02	2,31
C1E1-13T	97	73	62	C1E1-16T	99	94	75
	96	68	71		100	95	77
	98	71	64		99	95	68
Média	97	70	66	Média	99	95	73
Desvio padrão	1,15	2,32	4,74	Desvio padrão	0,50	0,72	4,85
C14E1-13T	99	89	83	C17E1-16T	99	92	82
	98	94	84		99	91	82
	99	89	81		100	88	73
Média	99	90	83	Média	99	90	79
Desvio padrão	0,44	3,06	1,22	Desvio padrão	0,12	1,87	5,05
C2E2-11T	98	59	46				
	98	61	42				
	98	61	51				
Média	98	61	46				
Desvio padrão	0,12	1,31	4,16				

ANEXO G – Teor de reserva de trealose (% na matéria seca) das linhagens avaliadas em comparação a referência (D10) ao final do 3 ciclo fermentativo

Trealose (%)			
Linhagens	Ciclo 3	Linhagens	Ciclo 3
D10	0,80	C9E1-13T	0,76
	0,75		0,96
	0,61		0,97
Média	0,72	Média	0,90
Desvio padrão	0,09	Desvio padrão	0,12
C6E1-13T	1,22	C7E2-14T	0,86
	1,31		0,96
	1,12		0,85
Média	1,22	Média	0,89
Desvio padrão	0,09	Desvio padrão	0,06
C8E1-13T	2,65	C5E1-16T	1,00
	2,37		1,04
	2,54		1,17
Média	2,52	Média	1,07
Desvio padrão	0,14	Desvio padrão	0,09
C1E1-13T	0,87	C1E1-16T	1,69
	0,72		1,44
	0,93		1,52
Média	0,84	Média	1,55
Desvio padrão	0,11	Desvio padrão	0,12
C14E1-13T	1,11	C17E1-16T	1,23
	1,14		1,28
	1,35		1,11
Média	1,20	Média	1,21
Desvio padrão	0,13	Desvio padrão	0,09
C2E2-11T	0,38		
	0,38		
	0,44		
Média	0,40		
Desvio padrão	0,04		

ANEXO H – Teor de etanol (% v/v) nos vinhos delevedurados das linhagens avaliadas em comparação a referência (D10) ao final de cada ciclo fermentativo

Etanol (%)							
Linhagens	Ciclo 1	Ciclo 2	Ciclo 3	Linhagens	Ciclo 1	Ciclo 2	Ciclo 3
D10	9,2	9,8	8,7	C9E1-13T	9,2	9,7	6,7
	9,2	9,9	8,3		9,2	9,7	6,7
	9,1	9,8	7,5		9,2	9,6	7,2
Média	9,2	9,8	8,2	Média	9,2	9,7	6,9
Desvio padrão	0,06	0,06	0,61	Desvio padrão	0,00	0,06	0,29
C6E1-13T	9,4	9,9	7,6	C7E2-14T	9,3	9,7	7,5
	9,2	9,7	8,0		9,4	9,8	7,4
	9,3	9,7	7,8		9,3	9,8	7,8
Média	9,3	9,8	7,8	Média	9,3	9,8	7,6
Desvio padrão	0,10	0,12	0,20	Desvio padrão	0,06	0,06	0,21
C8E1-13T	9,3	9,6	8,5	C5E1-16T	9,2	9,8	7,6
	9,0	9,5	8,5		9,2	9,6	7,9
	9,2	9,6	8,8		9,1	9,9	8,0
Média	9,2	9,6	8,6	Média	9,2	9,8	7,8
Desvio padrão	0,15	0,06	0,17	Desvio padrão	0,06	0,15	0,21
C1E1-13T	9,2	9,7	6,3	C1E1-16T	9,0	9,6	8,1
	9,2	9,6	7,5		9,1	9,6	8,5
	9,1	9,6	6,3		9,0	9,7	8,0
Média	9,2	9,6	6,7	Média	9,0	9,6	8,2
Desvio padrão	0,06	0,06	0,69	Desvio padrão	0,06	0,06	0,26
C14E1-13T	9,2	9,7	7,5	C17E1-16T	9,3	10,0	7,5
	9,3	9,8	7,5		9,3	9,8	7,9
	9,3	9,7	7,5		9,4	9,9	7,8
Média	9,3	9,7	7,5	Média	9,3	9,9	7,7
Desvio padrão	0,06	0,06	0,00	Desvio padrão	0,06	0,10	0,21
C2E2-11T	9,1	9,6	5,3				
	8,7	9,7	5,1				
	8,8	9,6	5,1				
Média	8,9	9,6	5,2				
Desvio padrão	0,21	0,06	0,12				

ANEXO I – Rendimento fermentativo (%) das linhagens avaliadas em comparação a referência (D10) ao final de cada ciclo fermentativo

Rendimento (%)							
Linhagens	Ciclo 1	Ciclo 2	Ciclo 3	Linhagens	Ciclo 1	Ciclo 2	Ciclo 3
D10	83,4	87,3	74,8	C9E1-13T	83,6	85,5	54,0
	83,5	88,2	70,7		83,4	85,5	54,0
	82,2	87,0	62,7		83,4	84,6	59,4
Média	83,1	87,5	69,4	Média	83,4	85,2	55,8
Desvio padrão	0,73	0,63	6,16	Desvio padrão	0,12	0,56	3,11
C6E1-13T	85,4	87,8	63,2	C7E2-14T	84,4	85,9	62,3
	83,3	86,0	67,5		85,6	86,7	61,3
	84,4	85,7	65,4		84,5	86,8	65,5
Média	84,4	86,5	65,4	Média	84,8	86,5	63,0
Desvio padrão	1,06	1,15	2,15	Desvio padrão	0,64	0,52	2,21
C8E1-13T	84,6	85,1	73,0	C5E1-16T	83,2	87,0	63,7
	81,2	84,3	73,3		83,2	84,9	66,9
	83,5	85,3	76,2		82,3	88,2	67,5
Média	83,1	84,9	74,2	Média	82,9	86,7	66,0
Desvio padrão	1,73	0,55	1,77	Desvio padrão	0,54	1,71	2,06
C1E1-13T	83,1	85,6	49,7	C1E1-16T	81,1	85,3	68,9
	83,1	84,6	62,7		82,2	85,3	73,0
	82,0	84,8	49,9		81,3	86,4	67,6
Média	82,7	85,0	54,1	Média	81,5	85,7	69,8
Desvio padrão	0,65	0,56	7,43	Desvio padrão	0,56	0,61	2,83
C14E1-13T	83,4	85,9	62,5	C17E1-16T	84,6	89,1	62,1
	84,5	87,0	62,4		84,6	87,0	66,5
	84,5	86,0	62,3		85,5	88,1	65,3
Média	84,1	86,3	62,4	Média	84,9	88,1	64,6
Desvio padrão	0,61	0,62	0,11	Desvio padrão	0,49	1,02	2,26
C2E2-11T	82,2	84,5	39,1				
	78,0	86,0	37,0				
	79,0	84,7	37,1				
Média	79,8	85,0	37,7				
Desvio padrão	2,19	0,80	1,16				