UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Tecnologia
Bioquímico-Farmacêutica
Área de Tecnologia de Fermentações

Análise dos mutantes de leveduras *Saccharomyces*
cerevisiae para melhoria na resistência e produção de
etanol

André de Abreu Cavalheiro

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:
Prof^a. Dr^a. Gisele Monteiro de Souza

São Paulo
2013

André de Abreu Cavalheiro

Análise dos mutantes de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* para melhoria na resistência e produção de etanol

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Prof^a. Dr^a. Gisele Monteiro de Souza
orientador/presidente

1º. examinador

2º. examinador

São Paulo, _____ de _____.

Abreviaturas

A_{600nm} - Absorbância em 600nm

BY4741 - Linhagem laboratorial selvagem

G418 - Geneticina

GEEs - Gases de efeito estufa

h - hora.

OD_{600nm} - Densidade ótica em 600nm

PL - *pool*

PE2 - Linhagem coletada na Usina da Pedra (Ribeirão Preto)

CAT1 - Linhagem coletada na Usina de Catanduva (Ribeirão Preto)

SGD - *Saccharomyces Genome Database*

SGKO - Single Gene Knock-Out

UV - Ultravioleta

WT - *wild type*

YKO - *Yeast Knock-Out*

YPD - *Yeast extract-Peptone-Dextrose*

ORF - *Open Reading Frame* – quadro aberto de leitura

Sumário

1 - Resumo.....	8
2 - Abstract.....	9
3 - Introdução.....	10
4 - Revisão bibliográfica.....	16
4.1 - A coleção BY4741 de deleções isogênicas não essenciais.....	16
4.2 - Processo de Fermentação Industrial.....	19
4.3 - Reuso celular em fermentações industriais.....	21
4.4 - Estudo de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> para o melhoramento da produção de etanol combustível.....	24
4.5 - Cepas de leveduras utilizadas no Brasil.....	26
4.6 - Modificação genética de aperfeiçoamento da levedura.....	29
4.6.1 - Tolerância ao etanol.....	29
4.6.2 - Melhoria da produção de etanol.....	30
5 - Justificativa.....	32
6 - Objetivo.....	34
7 - Materiais e métodos.....	35
7.1 - Meio de Cultura.....	35
7.2 - Coleção de mutantes.....	35
7.3 - Determinação das condições de estresse.....	36
7.4 - Testes de tolerância ao etanol e ao choque térmico.....	38
7.5 - Testes de unidade formadora de colônia (UFC).....	39
7.6 - Testes de tolerância com mutantes da placa 07.....	41

8- Resultados e discussão.....	42
8.1 - Teste de viabilidade por diluição seriada da linhagem selvagem na presença de etanol.....	42
8.2 - Teste de tolerância ao estresse térmico e etanólico.....	44
8.3 - Testes de unidade formadora de colônia (UFC).....	50
8.4 – Seleção dos mutantes isolados da placa 07.....	56
8.5 - Descrição dos mutantes selecionados.....	58
9 - Conclusão	65
10 - Referências bibliográficas.....	66
Anexos.....	79

Índice de Figuras

Figura 1: Esquema de deleção e produção da coleção YKO.....	17
Figura 2: Porcentagem das ORFs já verificadas até a presente data.....	18
Figura 3: Produção da placa contendo <i>pools</i> de mutantes da coleção YKO.....	37
Figura 4: Esquema de preparo para análise de UFC.....	40
Figura 5: Teste de viabilidade da linhagem selvagem.....	42
Figura 6: Teste de viabilidade na ausência ou presença de etanol 14% no meio líquido.....	47
Figura 7: Porcentagem de crescimento das linhagens WT e dos <i>pools</i>	53
Figura 8: Valores médios vistos para WT comparando <i>pool</i> 07 em condição de estresse etanólico de 10% e estresse térmico.....	55
Figura 9: Teste dos mutantes selecionados da placa 07 com 10% de etanol e estresse térmico.....	57

Índice de Tabelas.

Tabela 1: Valores de OD _{600nm} das linhagens crescidas em condição controle ou expostas aos estresses térmico e etanólico.....	49
Tabela 2: Número de colônias viáveis observados em meio sólido após 72 h de incubação a 30°C.....	52
Tabela 3: Contagem de UFC da linhagem selvagem e dos <i>pools</i> 05, 07, 12 e 24 após a determinação dos novos padrões de teste.....	54
Tabela 4: Porcentual de unidades formadoras de colônias observadas entre os testes feitos.....	55
Tabela 5: Genes cuja deleção melhorou a tolerância de <i>S. cerevisiae</i> a exposição ao estresse etanólico e térmico.....	57

1 – Resumo.

A atual demanda mundial para redução nas emissões de dióxido de carbono vem aumentando e o uso de etanol como combustível tem sido considerado como uma boa alternativa. Entretanto as condições de cultivo da levedura obrigam o micro-organismo a lidar com diferentes estressores, sendo as altas temperaturas e elevadas concentrações de etanol exemplos dos mais limitantes durante o processo produtivo. Assim, o presente estudo teve como objetivo encontrar mutantes de *Saccharomyces cerevisiae* que apresentassem maior resistência a altas concentrações de etanol e altas temperaturas concomitantemente. Para isso, utilizamos como modelo a coleção YKO (Invitrogen®), que contém 4,828 linhagens mutantes para genes não essenciais na levedura. Primeiramente, estabelecemos as condições de estresse (concentração de etanol e temperatura) as quais se mostrassem limitantes para o crescimento da linhagem isogênica selvagem (BY4741). Foram estabelecidas as condições de estresse em 10% de etanol em conjunto com aumento de temperatura para 37°C, que foram então utilizadas para testar a tolerância das linhagens mutantes agrupadas em 53 *pools*. Foram identificadas as linhagens mutantes para as ORFs *UBP15*, *THI12*, *CLA4*, *DIT1* e *MTC7* que suportaram tais condições, se mostrando possíveis candidatos para melhora genética em linhagens industriais como PE2 e CAT1.

2 – Abstract.

The current world demand for reduced emissions of carbon dioxide is increasing the use of ethanol as a fuel has been considered as a good alternative. However culture conditions requiring the yeast micro-organism to cope with different stressors, as the high temperatures and high concentrations of ethanol the most lititant examples during the production process. Thus, the present study aimed to find *Saccharomyces cerevisiae* mutants that having greater resistance to high ethanol concentrations and high temperatures concurrently. For this, we use a model collection YKO (Invitrogen[®]) which contains 4.828 mutant strains for non-essential genes in yeast. First, we establish the stress conditions (ethanol concentration and temperature) which would prove limiting to the growth of the isogenic wild type (BY4741). Were established stress conditions in 10% ethanol together with temperature rise to 37°C, which were then used to test the tolerance of mutant strains grouped into 53 pools. The mutant lines were identified for UBP15, THI12, CLA4, DIT1 and MTC7 ORFs who endured such conditions are showing possible candidates for genetic improvement in industrial strains as PE2 and CAT1.

3 - Introdução.

O uso da fermentação alcoólica data mais de 4000 anos onde os egípcios fabricavam pão e produziam bebidas alcoólicas usando cereais e frutas. Porém, o conhecimento dos organismos ligados a esse fenômeno só ocorreu quando Antonie van Leewenhoek (1623-1723), em microscópio, analisou amostras de cerveja em fermentação e percebeu a existência das leveduras. Pasteur, em 1863, apresentou a ação microbiana na ausência de oxigênio utilizando-se dos conhecimentos da estequiometria das fermentações de Gay-Lussac, e a partir daí, tornaram-se âmbito de pesquisa as reações enzimáticas envolvidas na transformação química do açúcar em etanol (LIMA, 2001). De acordo com o Ministério da Agricultura, o Brasil é o primeiro produtor e exportador de etanol de cana-de-açúcar do mundo (<http://www.agricultura.gov.br/vegetal/estatisticas>). Veículos leves (automóveis de passeio e comerciais leves) tiveram aumento em suas vendas com taxa média anual de 15,8% de 2003 a 2009. Desde 2003, com a introdução do veículo *flex fuel*, a demanda brasileira de etanol carburante aumentou 107%, apresentando, média anual de 11,1% no período. Ainda que, em 2009, o PIB do país tenha registrado queda de 0,2%, a demanda do produto registrou um crescimento significativo de 7,2% em relação a 2008. Desta forma, o volume de etanol (hidratado e anidro) vendido no mercado interno superou os 22,8 bilhões de litros (EPE – Empresa de Pesquisa Energética - <http://www.epe.gov.br>, acessado em 21/11/2012).

Dadas as condições ambientais atuais e a preocupação com a diminuição na utilização de combustíveis fósseis, há um grande interesse no desenvolvimento de fontes alternativas de energia com menores impactos ambientais. Portanto, a utilização do etanol como combustível tem sido

amplamente incentivada. Em 4 de fevereiro de 2010, a Agência de Proteção Ambiental Americana (EPA) classificou o etanol proveniente de cana-de-açúcar como biocombustível avançado, por evitar a emissão de gases de efeito estufa (GEEs) em pelo menos 50% quando comparado a combustíveis fósseis tradicionais. Graças a esta classificação, as barreiras à entrada do etanol brasileiro no mercado americano têm perspectiva de diminuir (EPE – Empresa de Pesquisa Energética - <http://www.epe.gov.br>, acessado em 21/11/2012).

De acordo com dados de 2012 da Conab (Companhia Nacional de Abastecimento) estima-se que 302,2 milhões de toneladas de cana serão processados para produzir 23,96 bilhões de litros de etanol. Esse montante é 4,81% maior do que a safra 2011/12. Deste total, 14.210 milhões litros correspondem ao etanol hidratado (que é utilizado diretamente como combustível) e 9.740 milhões de litros são produzidos no estado anidro (o qual é misturado a uma taxa de 25% do volume total à gasolina e utilizado para outras aplicações industriais). De acordo com estas projeções, o etanol anidro aumentará em 7,44% em relação ao etanol hidratado e cerca de 3,08% em comparação com a produção de etanol a partir da colheita do ano anterior (CABRINI, 1999).

Observando a expansão da demanda no uso do etanol, há necessidade de otimizar seus processos produtivos. A produção eficiente é vital para o processo industrial e uma maneira possível de implementar essa melhora é através do melhoramento genético de estirpes de leveduras que são utilizados na produção de etanol (WHEALS, 1999).

Dependendo do material utilizado na produção do etanol, tornam-se necessários processos adicionais; um exemplo é hidrólise prévia de matéria-prima (milho) para extração de amido, o que reflete no custo do produto final.

Os processos que demandam hidrólise são executados em planta fechada, o que requer maior aporte financeiro se comparado com a produção do etanol de primeira geração, que é o mais comum no Brasil. Isso porque o processo de primeira geração tem alto rendimento e menor custo produtivo, já que se usa cana-de-açúcar que é rica em açúcares, não necessita de hidrólise e, quase sempre, a fermentação é feita em sistemas abertos (WHEALS, 1999).

Saccharomyces cerevisiae é um organismo amplamente utilizado nos processos de produção brasileiros, pois quando adicionada glicose ou outra fonte de carbono fermentável utilizará a fermentação alcoólica como processo metabólico principal para a obtenção de energia (GANCEDO, 1998). Por consequência, tem-se uma grande coleção de pesquisas relacionadas aos padrões produtivos e possíveis melhorias de variados aspectos para a obtenção do etanol (NORTON, 1994; FUJITA, 2005; YAN, 2008; CHOI, 2009; ZHAO e BAI, 2009). Mesmo com a produção de alto rendimento dos métodos atuais e os avanços tecnológicos importantes na área, cada pequena melhoria ao processo aumenta a eficiência de utilização de carbono e utiliza melhor a matéria prima (que é responsável por aproximadamente 60% do custo de fabricação) (WISSELINK, 2007).

A temperatura das dornas nas destilarias pode atingir em média 37°C, sendo que a temperatura ótima produtiva de *S. cerevisiae* está entre 26°C e 35°C. A temperatura aumentada influencia positivamente na velocidade produtiva do etanol e proporcionalmente à contaminação bacteriana. A proliferação bacteriana é a possível causa de floculação e pode ser um agravante na sensibilidade da levedura à toxicidade do etanol, trazendo a necessidade de controle térmico no processo de fermentação (LIMA, 2001).

Buscando a melhora relativa ao ótimo produtivo dessa levedura e observando o etanol proveniente de cana-de-açúcar, houve neste projeto a preocupação com a tolerância de *S. cerevisiae* em meio saturado de etanol. Além disso, com o aumento nas pesquisas relativas à produção de etanol de segunda geração, espera-se que num futuro próximo, maior quantidade de substrato fermentável esteja disponível para a levedura, aumentando o teor alcoólico na dorna.

Os micro-organismos, em geral, são sensíveis aos alcoóis que além de tóxicos são inibidores do crescimento celular. Foram descritos genes ligados à sensibilidade ao etanol, representando um montante de aproximadamente 5-10% dos genes codificados pelo genoma da levedura. Alguns estudos mostraram que a perda de um gene específico leva à criação de novas linhagens que são tolerantes a diferentes tipos de estresse, incluindo o etanólico (KIM, 2011, YANG, 2011). Já foram relacionados com este evento 256 genes (KUBOTA, 2004) e pelo menos 137 são responsáveis pela tolerância ao álcool na linhagem diplóide BY4743 (FUJITA, 2005). A linhagem BY4741 em comparação com a linhagem W303-1a apresentou maior resistência em concentrações alcoólicas de 6%, 8% e 9%, sendo que para este último valor apenas BY4741 apresentou crescimento (KUBOTA, 2004).

A modificação dos genes selecionados pode ajudar a levedura a lidar com o estresse que é causado pelo processamento industrial. No entanto, a criação de linhagens laboratoriais mais resistentes, frequentemente, não as torna transferíveis para aplicações industriais, devido ao sistema operacional aberto que é usado no Brasil para produção, que impede que linhagens laboratoriais tenham competitividade com linhagens do ambiente (ZHENG, 2011).

Tentativas para a melhoria de *S. cerevisiae* têm sido realizadas através de mutagênese por múltiplas exposições à UV, onde mutantes aleatórios são gerados por exposição à luz. Outro método conhecido como “*Genome Shuffling*”, feito pela fusão entre protoplastos, permite manipular a recombinação e variabilidade genética, criando novas variedades. Linhagens produzidas por essa metodologia, a partir da linhagem SM-3, alcançaram tolerância térmica para crescimento de até 55°C com 15% de etanol em meio YPD, enquanto as geradas por exposição à luz UV e a linhagem original SM-3 alcançaram cerca de 44°C e 40°C, respectivamente. Porém, a capacidade na produção de etanol começou a decair ao longo do tempo nas linhagens mutantes expostas a estresses maiores que 40°C (SHI, 2008).

De uma forma mais controlada, essa sensibilidade alcoólica e térmica pode ser avaliada através das vias metabólicas e proteínas envolvidas, caso os genes responsáveis por essas funções estejam ausentes. Nosso laboratório dispõe de uma coleção de mutantes isogênicas à linhagem BY4741 (Invitrogen®), onde há deleção (*knockouts*) de 5.916 genes (96,5%) não essenciais. Isso possibilitaria a identificação e o isolamento de mutantes que possuam maior resistência ao estresse alcoólico e térmico, apoiada pela ausência de genes relacionados à sensibilidade a esses processos.

Assim, pretendeu-se caracterizar mutantes de leveduras para aumento na tolerância térmica e alcoólica. Um dos grandes problemas industriais é a não manutenção da linhagem de levedura selecionada durante a produção, devido à substituição desta por leveduras contaminantes mais competitivas (LIMA, 2001). O presente trabalho visou melhorar o processo de produção do etanol de primeira geração, já que as leveduras contaminantes serão mais sensíveis às altas concentrações de álcool em relação à linhagem que será

modificada. Como bactérias também são preocupantes no processo, leveduras mais resistentes ao etanol possibilitariam uma esterilização acompanhada de maior produtividade no processo fermentativo.

A identificação de mutantes tolerantes ao estresse pode ajudar os pesquisadores a compreender a base molecular da tolerância ao estresse. No entanto, estes resultados não garantem a viabilidade e produtividade das cepas selecionadas (INOUE, 2000). Os contratempos enfrentados na produção industrial podem ser estudados utilizando linhagens modificadas para alcançar melhores resultados e até mesmo resolver completamente um problema particular. Esta avaliação incidiu sobre os desafios que são encontrados na produção de etanol e várias modificações que visam melhorar a sua produção pelo sistema brasileiro.

4 - Revisão Bibliográfica.

4.1 - A coleção BY4741 de deleções isogênicas não essenciais.

Em 1996, o *Saccharomyces Genome Project* revelou a presença de mais de 6000 quadros abertos de leitura (ORFs - *Open Reading Frames*) no genoma de *S. cerevisiae*. Aproximadamente um terço dessas ORFs não tinha nenhuma função conhecida quatro anos após a sua descoberta. O objetivo do *Saccharomyces Genome Project* foi gerar um conjunto tão completo quanto possível de linhagens de leveduras por deleção de modo a auxiliar a atribuir a função das ORFs através da análise fenotípica dos mutantes (WINZELER, 2011).

O método utilizado foi uma estratégia de eliminação baseada em recombinação homóloga através da inserção de um produto de PCR (*polimerase chain reaction*) contendo regiões de recombinação: uma do códon inicial e outra do códon de parada para supressão de cada uma das ORFs no genoma da levedura. Como parte do processo de exclusão, cada deleção gênica foi substituída por um módulo *KanMX4* e com *tags* de marcação exclusivos a cada mutante (*barcode*) (Figura 1). A presença das marcas pode ser detectada através da metodologia de *high-density oligonucleotide array*, permitindo a análise individual dos fenótipos de crescimento das cepas e em paralelo.

Figura 1: Esquema da inserção do gene de resistência para geneticina como marca de seleção dos mutantes com deleção. Cada deleção foi construída utilizando duas reações seqüenciais de PCR. Na primeira reação, foi amplificado o gene *KanMX4* que confere resistência a geneticina a levedura e dois marcadores moleculares de 20 pb chamados de *barcode*, que são únicos a cada mutante. A segunda reação teve como alvo a inserção de oligonucleotídeos para permitir a especificidade durante a recombinação homóloga com a fita do gene alvo.

Quando a coleção de leveduras *Yeast KnockOut* (YKO) foi lançada em 2000, as cepas de exclusão foram baseadas nos conhecimentos do sequenciamento do genoma da levedura disponíveis na época. Os laboratórios desenvolvedores aprimoraram a coleção acompanhando novas informações obtidas para atualizar a coleção existente até a versão YKOv2. É possível acompanhar a evolução dos genes codificantes identificados pelo website “*Saccharomyces Genome Database*” (SGD <<http://www.yeastgenome.org/cache/genomeSnapshot.html>> acessado em 25/11/12), que sofre constante atualização. Por essa ferramenta, até a última verificação, viam-se os dados mostrados na Figura 2 em relação às ORFs identificadas.

Figura 2: Porcentagem das ORFs já verificadas até 25/11/2012. Foi interrompido cerca de 90% do genoma da levedura. Classificados por ORFs: 75,45% foram verificados, 12,65% não são caracterizados e 11,9% têm funções incertas por falta de dados ou por estarem em processo de verificação. Pelo menos 10% do genoma da levedura é redundante.

4.2 - Processo de Fermentação Industrial.

Ao longo dos últimos 30 anos, o processo de produção de etanol, no Brasil (cujo design foi baseado em um processo que foi utilizado em França, durante os 30 anos) foi muito melhorada. O processo teve um rendimento de 80% no início do programa de incentivo de produção de etanol há 20 anos e chegou a um marco atual de aproximadamente 92%. Este rendimento inclui ainda a produção de biomassa celular, glicerol, succinato e malato durante a fermentação, enquanto que os 8% restante são dirigidos para o metabolismo das células. (BASSO, 2008)

O processo de produção de etanol do Brasil é caracterizado pelo uso de um mosto que é feito por esmagamento da cana em tanques de grande capacidade (até 3 milhões de litros), a uma densidade celular elevada (10-15% w/v). As destilarias preferem processos alimentados; processos de fermentação contínua são utilizados em 20%-30% das destilarias (GALLO, 1990, AMORIM, 2011). Tipicamente, as concentrações elevadas de células de levedura, entre 8-17%, podem atingir tempos de fermentação de apenas 6-10 h com concentrações finais de etanol de até 11% v/v, o que corresponde a um rendimento de etanol média de 91%. Depois de cada ciclo de fermentação, as células de levedura são separadas, tratadas com ácido sulfúrico diluído, para matar as bactérias contaminantes, e, em seguida, recicladas para iniciar um novo processo de fermentação. Esta sequência pode ser repetida até 200 vezes e minimiza o consumo de carbono destinado ao crescimento da levedura, enquanto proporciona uma produtividade muito elevada de etanol (BRETHAUER, 1999).

O processo de fermentação descontínuo alimentado é um dos regimes de cultivo mais comuns no Brasil, principalmente por causa da repressão

catabólica de *S. cerevisiae* durante o processo de produção, isto é, as altas concentrações de substrato inibem os processos metabólicos específicos, incluindo os que estão relacionados com a velocidade de crescimento celular. Por esta razão, os micro-organismos crescem mais rapidamente em baixas concentrações de substrato. Assim, a aplicação de cultivo alimentado na fermentação alcoólica ainda produz resultados significativos, mantendo os níveis de substrato baixos, enquanto o etanol se acumula no meio. Este regime para produção de etanol permite a realização de produtividade volumétrica elevada (SANCHEZ, 2008).

Em um sistema de fermentação contínuo, o substrato está constantemente alimentando o recipiente de reação, e um fluxo correspondente de caldo fermentado contendo o produto é descarregado para manter constante o volume do reator. Além disso, um equilíbrio entre a alimentação e a descarga é mantida para atingir o estado estacionário de operação sem alterações de condições do reator. Em comparação com uma reação de batelada, este modo de operação proporciona reduzida necessidade de limpeza, menor tempo de inatividade e proporciona uma maior produtividade volumétrica que pode traduzir-se em menor volume do reator e dos investimentos de capital, além da facilidade de controle do estado estacionário (BRETHAUER, 2010).

O projeto e desenvolvimento de sistemas de fermentação contínua permitiram a implementação de processos mais eficazes e de menor custo. Processos contínuos têm várias vantagens em comparação com os processos convencionais de batelada, como os custos de construção reduzidos de biorreatores, menor manutenção e requisitos de operação, melhor controle de processo, e maior produtividade. A principal desvantagem é que as leveduras

que são cultivadas sob condições anaeróbicas durante períodos de tempo longos experimentam uma diminuição da capacidade de sintetizar etanol. Além disso, o substrato não é completamente consumido, e os rendimentos são reduzidos com as taxas de diluição elevada (SANCHEZ, 2008).

Em um estudo das vantagens e desvantagens de processos de fermentação contínua e em batelada de mais de 62 destilarias por um intervalo de tempo de 9 anos (1998-2007), processos em batelada com reciclo de leveduras mostraram-se menos susceptíveis a contaminação bacteriana e a correspondente perda de produtividade do que os processos contínuos (GODOY, 2008). Contaminações por lactobacilos em particular, são considerados como um dos principais fatores que podem reduzir a produção de etanol e prejudicar a centrifugação, e maiores quantidades de antibióticos são necessários para resolver esta questão em processos contínuos. Além disso, o ácido sulfúrico foi ligeiramente mais consumido por processos contínuos. No entanto, os processos contínuos têm a vantagem de reduzir os custos de instalação como um resultado dos seus volumes menores de fermentador e exigências menores da troca de calor. Eles também custam menos como um resultado do seu elevado grau de automatização, em comparação com processo em batelada (GODOY, 2008, BRETHAUER, 2010).

4.3 - Reuso celular em fermentações industriais.

O mosto fermentado é centrifugado para separar a levedura do vinho. Posteriormente, o vinho é enviado para destilação, ao passo que as células de levedura são tratadas com ácido sulfúrico, o qual se destina a reduzir a contaminação bacteriana. Após aproximadamente 3 horas, as células são devolvidas aos tanques de fermentação para iniciar um novo ciclo de

fermentação (AMORIM, 2010). Grandes quantidades de biomassa são recicladas pelas destilarias em um processo que leva cerca de 10 meses em geral, dependendo de parâmetros, tais como o clima, a qualidade da cana e a demanda do produto. A reciclagem de células de levedura é vantajosa para a utilização da energia industrial e evita a geração de massa celular excessiva. Este processo dá origem a um menor custo de energia relacionada com o crescimento celular, que pode ser gasta em maior conversão de etanol (AMORIM, 2005).

Em comparação com os produtores de etanol em todo o mundo, o Brasil tem uma grande vantagem em termos do baixo custo da levedura para este processo. Embora a produção de etanol seja um processo bem conhecido, o estresse causado aos organismos durante o processo não é tão familiar. Apesar da operação das destilarias ser realizada em condições aprovadas, o processo pede uma maior análise, pois certas condições de estresse característicos ocorrem nas destilarias brasileiras. (LOPES, 2010)

Grande biodiversidade tem sido observada em processos de fermentação industrial; cada destilaria possui uma população microbiana e uma particular sucessão de diferentes linhagens (BASSO, 1993). Ocasionalmente, algumas dessas células tornam-se persistentes e prevalentes, e as cepas com estas características merecem atenção especial porque seu comportamento sugere maior competitividade e tolerância ao estresse durante a fermentação industrial (BASSO, 2008).

A maioria das cepas de leveduras nativas que estão presentes durante a fermentação tem algumas características indesejáveis, independentemente da sua posição dominante e persistência, como a produção excessiva de espuma e alta taxa de sedimentação (mesmo durante o processo), tempo de

fermentação longa e açúcar residual após a fermentação. Cepas que produzem espuma não permitem a plena utilização da capacidade do fermentador e também consomem mais anti-espumantes, aumentando assim os custos de produção de etanol. Além disso, as linhagens com elevadas taxas de sedimentação ou floculação podem prejudicar a etapa de centrifugação do processo. A maioria das linhagens que produzem espuma também tem alta flotação; tanto floculação e flotação podem reduzir o contacto entre a levedura e o substrato, aumentando o tempo de fermentação, resultando em elevadas concentrações de açúcar residual (LOPES, 2010).

O processo de fabricação que foi projetado para as usinas brasileiras funciona melhor com uma suspensão homogênea de levedura durante a fermentação. Há poucas usinas de fabricação de etanol no Brasil que trabalham sem uma etapa de centrifugação, e nestes casos incomuns, altas taxas de sedimentação são necessários. Algumas destilarias selecionam apenas a população de levedura no final da estação de fermentação porque estas estirpes podem ser mais tolerantes a estresse. No entanto, a população de levedura selecionada não tem características de produção desejáveis. Estirpes industriais de fermentação são sensíveis à contaminação por bactérias e leveduras selvagem (de *Saccharomyces* ou outras espécies), e estes contaminantes competem com as linhagens de leveduras desejadas para sobreviver e consumir o conteúdo dos fermentadores (BASSO, 2008).

A reciclagem sucessiva de toneladas de células de levedura, todos os dias e a dificuldade de esterilização de grandes volumes de água permitem contaminação por micro-organismos do processo de produção. Estes micro-organismos contaminantes desenvolveram diferentes estratégias de sobrevivência e competição dentro dos processos de fermentação alcoólica.

Bactérias gram-positivas, tais como as espécies de lactobacilos estão entre os principais contaminantes (LOPES, 2010), enquanto que a contaminação por bactérias gram-negativas é menos frequente, porém mais difícil de controlar (FIEDUREK, 2008, LOPES, 2002). Populações bacterianas são controladas com o tratamento com ácido, antibióticos, produtos do lúpulo e produtos químicos biocidas que não afetam as células de levedura. No entanto, algumas bactérias são mais resistentes a estes compostos do que os outros, tornando-se difícil de controlar durante o processo de reciclagem. Além disso, a contaminação bacteriológica elevada pode causar a floculação de leveduras e pode inibir a fermentação (AMORIM, 2009).

4.4 – Estudo de *Saccharomyces cerevisiae* para o melhoramento da produção de etanol combustível.

A utilização de linhagens de leveduras tolerantes a etanol é importante para a produção de etanol de alto rendimento, uma vez que a concentração deste continua a aumentar durante a fermentação a níveis que são prejudiciais, até mesmo letais, para as células (AMORIM, 2011).

Várias mudanças fisiológicas ocorrem em leveduras tolerantes a etanol, incluindo o acúmulo intracelular de trealose (KIM, 1996), prolina (TAKAGI, 2005), e ergosterol (INOUE, 2000). Para obter linhagens com tolerância ao etanol, são adotadas além de estratégias clássicas como isolar novas leveduras a partir de recursos naturais (BASSO, 2008), adaptação evolutiva (STANLEY, 2010), mutagênese química aleatória (MOBINI-DEHKORDI, 2008) e *genome shuffling* (PINEL, 2011).

Diversas outras estratégias de modificação genética da levedura que ajudaram a compreender os mecanismos da tolerância ao álcool, vêm sendo usadas. Essas incluem a análise de *Microarray* do DNA genômico (HIRASAWA, 2007), triagem de bibliotecas de mutantes com supressões mediadas por transposons ou coleções de mutantes com nocautes gênicos individuais ("*Saccharomyces Genome KnockOut*" - SGKO) (TAKAHASHI, 2001; FUJITA, 2006; KUBOTA, 2004; TEIXEIRA, 2009; VAN VOORST, 2006; YOSHIKAWA, 2009).

Após a identificação de genes-alvo, tornam-se necessárias etapas de verificação, pois mesmo com a identificação de mutantes tolerantes ao etanol, que ajudariam a compreender a base molecular da tolerância ao estresse, não se pode garantir alta produtividade em geração de álcool pelas linhagens selecionadas (KIM, 2011).

Atualmente encontramos variados esforços em diversos campos para a expansão do etanol combustível, seja pela melhoria dos substratos utilizados por *S. cerevisiae* (WISSELINK, 2007) ou por aumento da produtividade do micro-organismo e o rendimento da fermentação alcoólica (MEDINA, 2010). A obtenção de linhagens tolerantes a maiores níveis de estresse é uma estratégia para garantir a competitividade do processo fermentativo, já que a produção de etanol durante a fermentação é limitada pela incapacidade de *S. cerevisiae* crescer em níveis elevados do álcool (FIEDUREK, 2011). Grandes esforços têm sido feitos à criação ou identificação de linhagens que tolerem elevadas concentrações de etanol e nessa condição, sejam capazes de continuar a fermentação para a produção de maior volume do álcool (ZHENG, 2010, STANLEY, 2010, FIEDUREK, 2011).

4.5 - Cepas de leveduras utilizadas no Brasil.

Melhoria no processo de primeira geração requer estirpes de leveduras que são capazes de sobreviver em condições industriais e competir com a levedura selvagem (AMORIM, 2010, 2004). Muitos estudos têm sido desenvolvidos em todo o mundo sobre a base do sistema de produção brasileiro. As estirpes de levedura CAT1 e PE2 (que foram isoladas a partir das plantas de Catanduva e da Pedra, respectivamente) foram selecionadas depois de mais de 20 anos de processos industriais (por ciclo alimentado e fermentação contínua), durante um programa de seleção de levedura, e têm atraído a atenção dos investigadores de todo o mundo. A seleção destas estirpes foi realizada por cariotipagem molecular dentro da indústria ao longo dos anos (BASSO, 2008).

Destilarias brasileiras têm abundância de linhagens de levedura no mercado para uso de processos de fermentação industrial. A levedura que é usada no cozimento ou no laboratório, bem como as estirpes selecionadas a partir de outros processos de fermentação, geralmente não sobrevivem mais do que um mês a uma escala industrial de operação de produção de etanol, sendo rapidamente substituídos por leveduras selvagens (BASSO, 2008). O desenvolvimento de novas variedades para destilarias brasileiras pode falhar porque eles são baseados em amostras que não são capazes de sobreviver ao processo de reciclagem após o tratamento ácido, os ciclos de rápida fermentação e competição com leveduras selvagens (BASSO, 2008).

PE2 e CAT1 são claramente as estirpes de levedura mais dominantes e, portanto, têm sido amplamente utilizadas em processos de fermentação nas destilarias por vários anos. Essas cepas são diploides, heterotáticas e esporulam bem. São ainda capazes de retomar rapidamente a meiose,

produzindo ascos com três ou quatro esporos viáveis. Alguns estudos sugerem que a espécie tem sofrido adaptações evolutivas que causam rearranjos cromossômicos já perceptíveis na fermentação industrial (KONG, 2007, LOPES, 2000).

Apesar da capacidade de esporos de levedura acasalar com outros indivíduos, há pouca informação sobre a constituição cromossômica e comportamento das células durante a meiose e conjugação. Um ponto de grande interesse é a comparação de desempenho entre as linhagens de leveduras industriais atuais e cepas de laboratório para identificar que tipo de alterações metabólicas que as linhagens industriais sofreram em troca de seu melhor desempenho. Quando introduzido a um ambiente industrial, a levedura de padeiro e estirpes laboratoriais tendem a falhar porque expressam genes que causam nessas cepas problemas para sobreviver ou se adaptar às condições estressantes da fermentação alcoólica. Além disso, estas estirpes não competem bem contra leveduras selvagens e são rapidamente substituídos por tipos que são mais tolerantes e adaptadas ao seu ambiente (BASSO, 2008, LOPES, 2004, STAMBUK, 2009).

Diferentes pesquisadores investigaram as características genéticas especiais de PE2 e CAT1 (ARGUESO, 2009, STAMBUK, 2009). Para compreender como a expressão do gene é controlada nestes organismos durante o processo industrial, é necessário caracterizar seus genomas. Levedura industrial pode servir como um ponto de partida para modificações genéticas, o qual por sua vez, fornece o traço genético característico que melhora estas estirpes específicas. Esta recombinação pode levar essas células a perder a sua posição dominante ou de produtividade, afetando seu equilíbrio gênico, exigindo uma grande quantidade de pesquisa para

desenvolver um organismo melhor. Para fins biotecnológicos, é necessário compreender a constituição genética de leveduras de *S. cerevisiae* selvagem que são encontradas no processo de fermentação industrial, porque elas têm características complexas (AMORIM, 2009).

Sequenciamento de DNA, estudos de expressão gênica, proteômica, metabolômica tornaram-se essenciais para entender como essas cepas são capazes de sobreviver em condições de estresse muito intenso por centenas de ciclos de fermentação. Combinando o conhecimento de genética, fisiologia e processos industriais, podemos introduzir novas características de interesse em cepas de leveduras industriais sem afetar a habilidade das novas cepas de sobreviver aos ciclos sucessivos e ao estresse associado. Obtenção de linhagens que são tolerantes a níveis mais elevados de estresse é uma estratégia para garantir a competitividade de um dado processo de fermentação. (ESTRUCH, 1993).

No momento, há um grande interesse na criação ou identificação de cepas que podem sobreviver em altas concentrações de etanol, mantendo sua capacidade de fermentação (TAKAGI, 2005, KONG, 2007, YOSHIKAWA, 2009). A utilização de estirpes de leveduras mais tolerantes para a produção de etanol pode ser altamente eficiente, porque a concentração de álcool continua a aumentar durante a fermentação para níveis que podem ser prejudiciais ou letais para as células. As leveduras que são tolerantes ao estresse etanólico podem ter algumas diferenças fisiológicas tais como o acúmulo intracelular de trealose, ergosterol e prolina (HUSSY, 2005, KIM, 2011, TAKAGI, 1997), que ajudam a sua sobrevivência.

4.6- Modificação genética para aperfeiçoamento da levedura.

4.6.1 - Tolerância ao etanol.

Para desenvolver cepas mais tolerantes ao etanol, diferentes estratégias foram adotadas para isolar novas leveduras a partir de recursos naturais ou para torná-los resistentes a estressores como, a evolução adaptativa. Essa estratégia baseia-se no princípio de que as populações de células podem se adaptar ao seu ambiente ao longo do tempo pela seleção natural. Estudos anteriores utilizaram a evolução adaptativa para criar leveduras mutantes que são tolerantes a vários fatores de estresse (STANLEY, 2010), tais como o congelamento/descongelamento (TAKAGI, 1997), temperaturas elevadas (WATANABE, 2009), elevadas concentrações de sal (MA, 2010) e elevadas concentrações de ácido acético (AMORIM, 2004).

Outras estratégias, tais como a mutagênese química aleatória (em que um potente agente mutagênico é usado para induzir modificações aleatórias dentro do material genético) (MEDINA, 2010), *genome shuffling* (por ciclos subsequentes de esporulação e hibridação) (YOSHIKAWA, 2009) ou de exposição aos raios ultravioleta (SHI, 2008), ajudaram a desenvolver a compreensão dos mecanismos que são utilizados para a proteção de células durante a produção e a tolerância de álcool. (HIRASAWA, 2007).

Triagem de bibliotecas de mutantes com deleção (com ausência de um único gene) e coleções de mutantes mediadas por transposon têm sido utilizadas para selecionar organismos modificados mais resistentes ao etanol (INOUE, 2000, TAKAGI, 2005, YAZAWA, 2007). A tecnologia conhecida como engenharia da maquinaria global de transcrição (GTME) pode explorar uma biblioteca de mutantes que codificam a proteína de ligação ao TATAbox em S.

cerevisiae como uma ferramenta para a criação de cepas etanol tolerantes (WYMAN, 1990).

A coleção diplóide homozigoto nocaute de levedura também foi usada para encontrar cepas de leveduras que crescessem mais rápido do que o tipo selvagem em meio contendo 8% de etanol. A interrupção de genes *URA7* ou *GAL6* favoreceu esses mutantes de *S. cerevisiae* com resistência aumentada a diferentes tipos de estresse, incluindo etanol. Além disso, estas estirpes demonstraram uma maior taxa de consumo de glicose, a temperaturas baixas do que o tipo selvagem (YANG, 2011).

4.6.2 - Melhoria da produção de etanol.

Alguns estudos têm produzido bons resultados com a ruptura de uma ou de um grupo de genes que conferem a capacidade de estirpes mutantes de ser mais produtivo em etanol do que o tipo selvagem. Para sintetizar glicerol, que é um importante subproduto da produção de álcool, seria necessário a levedura consumir até 4% da carga de alimentação de açúcar que é encontrado em processos típicos de produção de etanol industrial. A produção de etanol foi melhorada através da supressão do gene *GPD2* (glicerol-3-fosfato desidrogenase) e da superexpressão do gene *GLT1* (glutamato sintase) em *S. cerevisiae*. Esta melhoria foi obtida por minimização da formação de glicerol e pelo aumento da taxa de conversão de NADH a NAD⁺ (KIM, 1996).

Em outro estudo, o gene *GPD1* de *Bacillus cereus*, uma glicerol-3-fosfato desidrogenase NAD-dependente foi substituído por um GPD não dependente de NADP⁺ em levedura industrial produtora de etanol. Esta estirpe resultante produziu baixos níveis de glicerol e exibiu um maior

rendimento de etanol ($7,6 \pm 0,1\%$ do que o tipo selvagem), mas falhou em fermentar glicose em altas concentrações (25%). Para solucionar esse problema, foram superexpressos os 2 genes de síntese de trealose *TPS1* e *TPS2* na estirpe mutante, e a levedura resultante apresentou rendimentos reduzidos de glicerol, taxa de crescimento específica máxima indistinguíveis em relação à selvagem e capacidade de fermentação do tipo selvagem em fermentações anaeróbicas (GALLO, 1990).

5 - Justificativa.

O presente estudo tem como principal objetivo encontrar informações para a obtenção de linhagens de leveduras melhoradas com relação ao processo produtivo do etanol, considerando que o produto tem crescido economicamente e que os produtores ainda trabalham sem controle das linhagens utilizadas na produção. Dada a competitividade e o volume de negócios gerados pelo álcool no Brasil, a seleção de leveduras eficientes será crucial para manter nosso país como um dos líderes mundiais na produção desse combustível.

No programa BIOEN (FAPESP *Bioenergy Program*) poucos projetos estão centrados na melhoria das linhagens de leveduras utilizadas para a produção de etanol. Um dos maiores problemas encontrados na indústria é a sucessão de linhagens que ocorre desde o inóculo até o final do processo fermentativo. As linhagens selecionadas e utilizadas atualmente não permanecem na dorna de fermentação até o final do processo, pois são substituídas por leveduras contaminantes com maior capacidade proliferativa, porém com menor capacidade produtiva de etanol, o que pode gerar uma considerável perda de eficiência na produção.

Três importantes problemas encontrados na produção do etanol de primeira geração foram abordados nesse estudo através da identificação de linhagens resistentes ao etanol e ao estresse térmico:

- Essas leveduras poderiam nos indicar genes a serem modificados nas linhagens industriais que passariam a ser mais competitivas na dorna de fermentação, podendo manter-se como linhagem predominante durante todo o processo produtivo nas

atuais condições adotadas pela indústria, como a não esterilização dos materiais e o pouco controle de temperatura.

- Essas leveduras poderiam nos indicar genes a serem modificados nas linhagens industriais que passariam a resistir melhor ao etanol e à temperatura da dorna do que outras leveduras e bactérias contaminantes, evitando processos como a floculação. Sabe-se que durante o processo produtivo do etanol há um aumento na temperatura da dorna.

- Essas leveduras poderiam nos indicar genes a serem modificados nas linhagens industriais que passariam a ser usadas em preparados advindos de biomassa lignocelulósica, antevendo a necessidade de linhagens que possam processar esse material com quantidade de glicose disponível significativamente aumentada e, conseqüentemente, a possibilidade de altos teores de etanol durante o processo.

Esse conhecimento pode gerar alvos de modificação nas linhagens atualmente utilizadas e adaptadas para a indústria não envolvendo gastos adicionais de readaptação do processo produtivo já adotado. Esse ponto é de crucial importância, já que os usineiros não se interessam por processos caros e sofisticados, pois possuem a flexibilidade de desviar o uso da matéria-prima (cana-de-açúcar) para produção de açúcar refinado. Sendo assim, o melhoramento do processo produtivo tem implicações políticas e governamentais com relação à produção de combustível etanol no país.

6 - Objetivo.

Tendo a coleção de leveduras BY4741 com deleções em genes não essenciais como alvo, objetiva-se identificar quais mutantes apresentam maior tolerância ao estresse alcoólico e térmico. Foram avaliadas as capacidades e os fatores moleculares que permitem a reorganização celular buscando as vias metabólicas utilizadas nas resistências térmica e alcoólica, permitindo futura melhora por modificação genética de linhagens industriais, obtendo maior produção de etanol sem a necessidade de modificar os atuais moldes do processo produtivo brasileiro.

7 - Materiais e Métodos.

7.1 - Meio de Cultura.

YPD líquido (1% extrato de levedura OXOID[®]; 2% peptona Merck[®]; 2% dextrose Amresco[®]) e sólido (acrescido de 2% ágar Amresco[®]). Na montagem dos *pools* para seleção foi adicionado o antibiótico geneticina (G418-USB).

7.2 - Coleção de mutantes.

BY4741 (*MATa his3-1 leu2-2 met5-0 ura3-0* - Invitrogen), linhagem selvagem de *S. cerevisiae* e suas respectivas mutantes com deleções não essenciais são apresentadas em placas de 96 poços onde estão contidos os mutantes. A coleção (Invitrogen[®] 95401.H3) com os 4.828 mutantes está disposta em 53 placas e foi gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Luis ES. Netto, Depto de Genética e Biologia Evolutiva, Instituto de Biociências – USP.

Pelo grande número de mutantes, foram montados *pools* para as análises de viabilidade (Figura 3). A montagem dos *pools* foi feita em placas de Petri com 50 mL YPD líquido e G418 200 µg/mL, onde foram inoculados os mutantes das placas matrizes da coleção, utilizando o carimbo replicador (para placas de 96 poços). Esse conteúdo foi transferido para Erlenmeyers de 250 mL e incubado por 16 horas a 30°C e 170 RPM. O conteúdo foi centrifugado por 10 minutos a 4°C e 5000 RPM e o pellet foi ressuscitado em 1 mL YPD adicionado de G418 e 15% glicerol. Foram feitos estoques em micro tubos de 1,5 mL e congelados a -80°C.

Para facilitar o uso distribuíram-se os *pools* em uma microplaca de 96 poços, onde 53 deles foram utilizados em correspondência às placas 01 a 51, 70, 71 mais um para WT. Os poços foram inoculados com 5 µL dos *pools* em

180 µL de YPD contendo G418 e incubados por 16 horas a 30°C e 120 RPM. Essa placa serviu como matriz para 5 repiques, onde cada poço teve seu volume completado para 180 µL com glicerol 15% (concentração final) e as placas foram finalmente estocadas em ultra-freezer -80°C.

7.3 - Determinação das condições de estresse.

O pré-inóculo com a linhagem selvagem em YPD foi incubado por 16 horas a 30°C, 170 RPM. O inóculo foi realizado a partir desse cultivo e incubado por 24 horas a 30°C 170 RPM. Dessa amostra celular foram feitas 5 diluições seriadas: o primeiro tubo possui uma concentração celular correspondente a uma OD_{600nm} 0,2 e outras 4 sucessivas diluições seriadas de 5 vezes (onde se transferiram 100 µL para 400 µL de água) foram feitas. Aliquotas de 5 µL de cada diluição foram aplicadas em forma de gota na placa de meio YPD sólido com diferentes concentrações de etanol (0% - controle, 12%, 14%, 16% e 20%). As placas foram incubadas a 30°C em estufa até 72 horas, sendo observado o crescimento a cada 24 horas.

Figura 3: Placa contendo *pools* de mutantes advindos das placas da *Yeast Deletion Collection* (coleção YKO Invitrogen®). Leveduras do poço A1 representam o conjunto de 96 mutantes contidos na placa original 1. O poço A2 contém o *pool* de 96 clones mutantes diferentes contidos na placa original 2 e assim sucessivamente, até completar uma única placa contendo 53 *pools*. O poço E7 é o branco (meio de cultivo apenas) e o poço E12 a linhagem selvagem isogênica BY4741 (WT).

7.4 - Testes de tolerância ao etanol e ao choque térmico.

Foram realizados em meio YPD sólido ou líquido para crescimento de WT e dos *pools* com as dosagens observadas como limítrofes no teste de viabilidade com diluição seriada.

- Meio sólido – As células foram pré-inoculadas em YPD líquido distribuído em microplaca de 96 poços (de poço profundo), 16 horas a 30°C, 170 RPM, a partir do estoque que estava armazenado a -80°C. Com carimbo replicador foi realizado o inóculo de células em YPD fresco e incubadas nas mesmas condições acima, mas por 24 horas. Após esse período, com o auxílio de pipetador multicanal foi adicionado 14% de etanol e incubado novamente em shaker a 37°C. Após 8 h, 24 h e 48 h de incubação, foram retiradas alíquotas das células controle ou crescidas na presença de etanol e plaqueadas em meio YPD sólido. As placas foram deixadas em estufa 30°C por 24 h. Os resultados foram registrados por foto documentação.
- Meio líquido – As células foram pré-inoculadas em 5 mL de YPD líquido em tubos falcon de 50 mL por 16 horas a 30°C, 170 RPM, a partir do estoque que estava armazenado a -80°C. As células foram diluídas à OD_{600nm} 0,2 em 10 mL de YPD fresco para inóculo, incubadas 24 h a 30°C e 170 RPM. Após esse período o conteúdo de cada amostra foi separado em 2 novos tubos falcon de 50 mL: uma condição controle incubada 24 horas a 30°C, 170 RPM; a outra parte foi incubada pelo mesmo tempo e agitação a 37°C em YPD + 14 ou 16% de etanol. O crescimento foi avaliado medindo a densidade ótica a 600 nanômetros em

espectrofotômetro nos tempos 0 h e 24 h após o início do estresse (adição de etanol e mudança de temperatura para 37°C).

7.5 - Testes de unidade formadora de colônia (UFC).

Foi realizado o crescimento de WT e dos *pools* observados como mais resistentes no teste de tolerância. Os pré-inóculos foram realizados em 3 mL de YPD líquido em tubos de ensaio por 16 horas a 30°C, 170 RPM, a partir do estoque que estava armazenado a -80°C. As células foram diluídas à OD_{600nm} 0,2 em 30 mL de YPD fresco para inóculo, incubadas 24 h a 30°C e 170 RPM em frascos Erlenmeyers de 250 mL. Após esse período o conteúdo de cada amostra foi separado em 6 frascos Erlenmeyers de 150 mL: 3 como condição controle, incubados por 4 ou 8 horas a 30°C, 170 RPM; 3 incubados por tempo equivalente ao controle e agitação a 37°C em YPD + 10% ou 14% de etanol. Esse teste foi executado em triplicata.

O crescimento foi avaliado por densidade ótica (600 nm) em espectrofotômetro após 4 ou 8 horas do início do estresse. Foram retiradas alíquotas que foram diluídas em água Milli-Q estéril totalizando 1 mL, em micro-tubos de 1,5 mL, para obter a concentração celular total de 10⁶. Partindo dessa densidade, foram feitas duas novas diluições, a primeira utilizando 10 µL do conteúdo do tubo anterior para 990 µL de água estéril em um segundo tubo; e na segunda diluição foi utilizado 100 µL do conteúdo do segundo tubo para 900 µL de água estéril em um terceiro tubo. Após estas diluições estava contida no terceiro tubo a concentração de 10³ células/mL, possibilitando o controle do número de células a ser inoculado pelo volume pipetado do tubo (Figura 4).

Foram pipetados 100 µL de cada tubo e espalhados com a alça de Drigalski em placas de Petri contendo YPD sólido. Essas placas foram

incubadas em estufa a 30 °C por até 72 h e após esse período foi feita a contagem das colônias visíveis.

Figura 4: Esquematização de preparo para análise de UFC. O inóculo (30 mL) foi dividido em 6 diferentes frascos após 24 h de cultivo: 3 dos frascos receberam 4,5 mL do cultivo cada e o volume foi completado com água estéril para 5 mL (controle), os 3 frascos remanescentes receberam 4,5 mL do cultivo cada e o volume completado para 5 mL com etanol para ensaio com estresse 10%. Para ensaios com 8%, 12%, 14% e 16% de etanol os volumes foram acertados partindo de 4,6 mL até 4,2 mL do cultivo para cada situação e os volumes completados para 5 mL com água e etanol. Após serem incubados 4 ou 8 horas a 30°C (controle) ou 37°C (estresse) e 170 RPM, foram preparadas três diluições sequenciais até ser obtida a concentração de 10^3 células/mL e partindo desta concentração, 100 µL foram pipetados em meio YPD sólido, espalhados com alça de Drigalski e incubados por até 72 h a 30°C.

7.6 - Testes de tolerância com os mutantes da placa 07.

Foram realizados em meio YPD líquido o crescimento de WT e dos mutantes presentes na placa 07 com a dosagem de 10% de etanol ou água para as situações de estresse e controle, respectivamente. Foi preparado o pré-inóculo em 30 mL de YPD líquido em frascos Erlenmeyers de 50 mL por 24 horas a 30°C, 170 RPM, partindo de estoque armazenado a -80°C. As células foram diluídas à OD_{600nm} 0,2 em 60 mL de YPD fresco para inóculo, incubadas 24 h a 30°C e 170 RPM. Após esse período o conteúdo de cada amostra foi separada em 2 novos frascos de 50 mL: um para condição controle, incubado por 24 horas a 30°C, 170 RPM; o outro para condição de estresse pelo mesmo tempo e agitação a 37°C. O crescimento foi avaliado medindo a densidade ótica a 600 nanômetros em espectrofotômetro nos tempos 0 h e 24 h após o início do estresse (adição de etanol e mudança de temperatura para 37°C).

8 - Resultados e Discussão.

8.1 - Teste de viabilidade por diluição seriada da linhagem selvagem na presença de etanol.

Este teste foi feito para identificar quais concentrações de etanol teriam maior toxicidade ou seriam letais para a linhagem selvagem. Os testes de viabilidade foram realizados em condições controle ou de estresse (altas concentrações de etanol em meio sólido) usando a linhagem WT e foi analisada pela capacidade de formação de colônias nas diferentes diluições (Figura 5).

Figura 5: Teste de viabilidade da linhagem selvagem. Avaliada por diluição seriada em meio YPD adicionado ou não das concentrações de etanol indicadas na figura. Células crescidas por 24 h em YPD, 30°C, 170 RPM. As placas foram incubadas a 30°C por 24 h (foto), 48 h e 72 h.

Os resultados indicam que após 24 h na estufa a 30°C, o controle (sem estresse, 0% de etanol) apresentou crescimento em todas as diluições. Na presença de 12% de etanol, as células mostraram-se 25 vezes mais sensíveis do que as células crescidas em condições controle no mesmo período de tempo; porém, após 48 h na estufa, observou-se crescimento dessa amostra em todas as diluições (dado não mostrado). Em células expostas a 14% de etanol, a amostra mostrou 125 vezes mais sensibilidade que o controle após 24 h na estufa, apresentando crescimento em todas as diluições após 48 h de incubação (dado não mostrado).

Nas amostras incubadas na presença de 16% ou 20% de etanol, não houve crescimento durante as 48 h iniciais de incubação. Após 72 h, houve crescimento da amostra exposta a 16% de etanol, não sendo observado o mesmo para células que foram expostas a 20% de etanol.

A partir desses resultados foram consideradas as condições de estresses de 14% e 16% de etanol adicionado ao meio de cultivo, para continuidade do presente trabalho. Isto porque 14% foi a maior concentração de etanol que permitiu viabilidade da linhagem selvagem em 24 h de incubação; já a condição de crescimento com 16% de etanol foi quase letal, pois somente após 72 h a amostra inicial (maior concentração celular) mostrou formação de colônias (dado não mostrado).

Como as observações foram realizadas em intervalos de 24 h, tomou-se o menor período como referência para a escolha da concentração etanólica limítrofe. A partir deste dado esperava-se encontrar entre os *pools*, um mutante (ou um conjunto) que apresentasse uma maior viabilidade diante da linhagem WT nessas condições de estresse.

8.2 - Teste de tolerância ao estresse térmico e etanólico.

Para selecionar as melhores linhagens de leveduras candidatas a partir de nossa coleção e melhorar o suporte ao estresse etanólico e térmico durante a fermentação foram feitos testes margeados com as informações observadas na literatura, como visto no trabalho de Kim (2011), que observou tolerância de até 15% de etanol no cultivo e suporte ao estresse térmico de 42°C.

Em placas de Petri de 150 mm com YPD adicionado de 0% (controle), 14% ou 16% de etanol, foram inoculadas as linhagens WT e os *pools* de linhagens mutantes com o carimbo replicador; as placas foram incubadas a 30°C por 72 h, sendo avaliado o crescimento em 24 h, 48 h e 72 h. Porém, a cada repetição do ensaio, notavam-se diferenças no crescimento dos *pools*, que impediam qualquer inferência sobre o resultado obtido, apesar de a linhagem WT apresentar crescimento correspondente ao ensaio de viabilidade avaliada por diluição seriada. O tempo máximo de observação permaneceu sendo 72 h, pois notaram-se irregularidades no crescimento em repetições desse ensaio (dados não apresentados). Acreditamos que ao adicionar o etanol no meio sólido antes de iniciar a polimerização do Agar, não era possível controlar precisamente a temperatura, variando assim a proporção de etanol que evaporava no processo.

Por estas razões, o teste de tolerância não foi realizado com estresse etanólico presente em meio sólido (como mostrado na Figura 6), mas sim, modificado para que o etanol fosse adicionado ao meio líquido, com avaliação dos resultados em meio sólido, por capacidade de formação de colônias (células vivas) após o período de estresse.

Além dessa modificação, foi introduzido o estresse térmico nas células que sofrem exposição ao etanol. Assim, na condição controle, as células são

crescidas em condições ótimas (30°C, 170 RPM, YPD), já as células que são expostas ao estresse, sofrem tanto o estresse pela alta concentração de etanol (adição de 14% ao meio YPD) quanto pela incubação em alta temperatura (37°C). Isso foi introduzido devido aos trabalhos de Basso, (1993, 2004, 2008), os quais demonstram que o estresse térmico só é relevante quando em sinergia com estresse etanólico ou ácido (SILVA-FILHO, 2005). Como essas são duas condições de interesse do projeto, resolvemos realizar a varredura de mutantes avaliando ambas as repostas celulares com os estresses aplicados ao mesmo tempo. Percebeu-se ao longo dos experimentos que o volume de etanol supracitado pode ser até mesmo extrapolado para 16% com BY4741, entretanto esses altos volumes apenas podem ser alcançados quando as linhagens testadas são submetidas apenas ao estresse etanólico (KIM, 2011).

O estresse térmico utilizado atualmente neste projeto não é o maior observado até agora, visto que em outros trabalhos foram utilizados até 42°C (SILVA-FILHO, 2005, AN, 2011). Porém foi decidido aplicar a média térmica encontrada nas dornas das destilarias de 37°C para equiparar ao máximo a situação de teste ao fator térmico limitante encontrado nas dornas (LIMA, 2001).

As placas foram fotografadas a cada 24 h (Figura 6). Células crescidas na presença de 14% de etanol não apresentaram crescimento normal em grande parte das amostras, porém cresceram normalmente na ausência de estresse (Figura 6A). Na Figura 6B, os *pools* 01, 05, 07, 08, 09, 10, 11, 12, 24, 37, 49, 70 foram capazes de formar colônias mais vigorosas, sendo que os *pools* de mutantes 10, 11, 12, 24 e 49 apresentaram maior crescimento em relação às outras amostras. Interessantemente, nessa concentração de etanol e na presença do choque térmico (37°C) a linhagem selvagem não foi capaz de

sobreviver (Figura 6B, círculo amarelo). Dessa forma, os vários *pools* de mutantes analisados apresentam pelo menos algum grau de resistência aumentada a essas condições de estresse quando comparados à linhagem selvagem. Esses resultados obtidos estão de acordo com os dados de Kubota, (2004) e Fujita, (2005), que relacionaram pelo menos 256 linhagens mutantes de leveduras com a sensibilidade ao etanol.

Os doze *pools* selecionados em 14% de etanol foram utilizados para testes com 16% de etanol adicionado ao meio YPD, a 37°C, pois ainda havia um número muito elevado de possíveis candidatos (12 *pools* equivalem a 12 placas com 96 mutantes diferentes, que representam um universo de mais de 1100 linhagens). A resistência ao etanol nesse caso foi avaliada com relação ao crescimento da linhagem selvagem frente às condições de estresse comparado com o crescimento na condição controle. Esses dados foram coletados realizando leituras de densidade ótica em espectrofotômetro em OD_{600nm} para comparação da proliferação celular em 8 h e 24 h. Com esse ensaio foi testada a capacidade de crescimento das linhagens mutantes em 16% de etanol na presença a 37°C, avaliando o aumento de massa celular. A concentração celular inicial foi normalizada para OD_{600nm} 0,2 nos tubos contendo 10 mL de YPD e as respectivas linhagens celulares: WT e *pools* 01, 05, 07, 08, 09, 10, 11, 12, 24, 37, 49, 70.

A

B

Figura 6: Teste de viabilidade na ausência ou presença de etanol 14% no meio líquido. As células foram pré-inoculadas em YPD por 16 horas e então diluídas para uma OD_{600nm} 0,2 em YPD fresco, incubadas a 30°C, 170 RPM por 24 horas para obtenção de massa celular. Esse inóculo foi então separado em duas partes iguais: uma foi mantida a 30°C, sem adição de etanol - condição controle **(A)** e a outra parte sofreu adição de 14% de etanol e foi transferida para 37°C **(B)**. Ambas foram plaqueadas em YPD com o auxílio de um replicador de 96 amostras após 24 h de exposição celular as condições controle ou de estresse. As placas foram incubadas por 24 h em estufa a 30°C e fotografadas.

Após 24 h as amostras foram divididas em dois tubos cada, para: condição controle (YPD incubado a 30°C) e condição de estresse (a 37°C, na presença de 16% de etanol no YPD). Foram efetuadas as leituras de densidade ótica e cálculo da porcentagem relativa das células crescidas em condição controle e expostas ao estresse após 24 h. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 1.

Entre os *pools* analisados, foram selecionados os quatro conjuntos de mutantes que apresentaram maior porcentagem de proliferação que a linhagem selvagem em condições de estresse térmico e etanólico, sendo eles correspondentes às placas: 05, 07, 12 e 24, que foram utilizados nas etapas seguintes para isolar mutantes únicos.

Essa nova análise nos permitiu reduzir nossa quantidade de candidatos de mais de 1000 (Figura 6) para menos de 400, uma redução de mais de 60%.

Tabela 1: Leituras de OD_{600nm} das linhagens crescidas em condição controle ou expostas aos estresses térmico e etanólico.

TUBO	OD _{600nm} controle	OD _{600nm} 16% EtOH	% de células em relação ao controle
WT	7,68	5,08	66
01	8,29	5,47	61
05	7,81	5,02	70
07	7,05	5,64	80
08	8,10	4,96	61
09	8,00	5,33	67
10	8,12	4,87	60
11	7,90	5,39	68
12	8,08	5,76	71
24	7,75	5,55	72
37	7,87	4,83	61
49	8,47	5,51	65
70	9,99	6,22	62

Comportamento da linhagem selvagem destacado em vermelho. Em azul, destacados os pools que apresentaram relação maior de tolerância aos estresses comparados com a WT.

8.3 - Testes de unidade formadora de colônia (UFC).

Utilizando WT e os *pools* 05, 07, 12, 24, selecionados nos testes de tolerância, foram realizadas avaliações por unidade formadora de colônia (UFC). Desse modo, foi possível averiguar se a concentração de etanol no meio, utilizada nos testes anteriores, estava causando aumento de massa celular seguido de morte ou se as linhagens selecionadas ainda apresentavam viabilidade após o estresse.

Inicialmente, os testes foram feitos em triplicatas com concentrações de 14% e 16% de etanol no meio somado ao estresse térmico de 37°C e condição controle com 0% de etanol e 30°C. A linhagem selvagem e os *pools* foram mantidos nessa condição por 24 h com agitação de 170 RPM e então plaqueados seguindo a metodologia apresentada na Figura 4. Quando observadas as placas controle, foi possível a contagem das colônias visíveis já que estas apresentaram bom crescimento e em quantidades próximas ao total plaqueado (100 UFC), entretanto as placas correspondentes às situações de estresse, não apresentavam qualquer crescimento (dados não mostrados).

Após duas repetições observando o mesmo comportamento para todas as situações citadas acima, foi necessário estabelecer novos padrões para a execução desses testes. Portanto para dar continuidade aos testes, foi utilizada apenas a linhagem selvagem e observada a maior concentração de etanol que esta suportaria em correlação ao tempo submetido ao estresse.

Em triplicata, o inóculo da linhagem selvagem foi incubado por 24 h e após esse período foi adicionado 0% (controle), 8%, 10%, 12%, 14% e 16% de etanol no cultivo juntamente com estresse térmico a todas as condições exceto no controle. Para verificar a evolução das colônias em relação ao aumento do estresse etanólico foram admitidos os tempos de 4 h, 8 h e 24 h após o início

do estresse para que fosse iniciado o plaqueamento das amostras em meio YPD sólido. As placas foram observadas após 72 h em estufa a 30°C sendo feita a contagem das colônias formadas.

Pela observação das placas foi possível concluir que o aumento da concentração de etanol gerou estresse muito alto para a linhagem selvagem desde 12% (Tabela 2), sendo possível considerar letais concentrações superiores a 10%, quando cultivadas em meio líquido a 37°C.

A diferença no número de colônias visíveis observada entre as placas referentes a 4 h de estresse e 8 h não foram significativas. Em concentrações de etanol acima de 10% não eram vistas quaisquer colônias mesmo após 24 h de incubação (dado não apresentado). Contudo nas placas controle foi observado crescimento normal (Tabela 2).

Tabela 2: Número de colônias visíveis observados em meio sólido após 72 h de incubação a 30°C em estufa.

CONDIÇÃO	REPLICATAS			MÉDIA
	1	2	3	
WT 0%	97	82	63	81
WT 8%	73	63	58	65
WT 10%	23	19	40	27
WT 12%	5	6	7	6
WT 14%	0	7	1	3
WT 16%	1	0	1	1

Os dados obtidos nos testes anteriores com a linhagem selvagem se correlacionaram com dados vistos por Silva-Filho, (2005), que utilizando a linhagem PE2 com estresse térmico de 37°C apresentou 92% de células viáveis após 4 h de estresse. Portanto, para continuação do trabalho, foi escolhida a concentração de 10% de etanol em sinergia com o estresse térmico de 37°C com intervalos de 4 h como parâmetros para observação nos ensaios. Os *pools* 05, 07, 12 e 24 foram os que menos sofreram redução na capacidade de crescimento com relação a linhagem selvagem, mesmo nas condições extremas testadas (Tabela 1). Isto nos sugeriu que esses *pools* possuíam linhagens bem mais resistentes ao estresse térmico e etanólico, sendo então escolhidas para continuação do estudo.

Os testes efetuados com as novas especificações mostraram como resultado que não somente a concentração de etanol aliada à temperatura era

limitante a viabilidade de todos os mutantes, mas também o tempo de exposição ao estresse. Foi possível observar crescimento para WT e todos os *pools* permitindo verificar que a linhagem selvagem teve menor crescimento que os *pools* 05, 07 e 24 quando exposta às condições de estresse (Figura 7). Mesmo tendo o *pool* 12 maior número médio de colônias que a linhagem selvagem, relativamente os dois apresentaram crescimento muito similar. Os *pools* 05 e 24 apresentaram bom crescimento, entretanto seus desvios padrão ainda apresentaram intersecção numérica com o desvio da linhagem selvagem. Entretanto, *pool* 07 apresentou crescimento muito superior ao de WT mostrando-se praticamente insensível ao estresse submetido (Figura 7 e Tabela 3).

Figura 7: Porcentagem de formação de colônias de WT e dos *pools*. A linhagem selvagem apresentou 66% de crescimento contra 96% do *pool* 07 após 4 h de incubação com a concentração de 10% de etanol no meio em sinergia com estresse térmico de 37°C.

Tabela 3: Contagem UFC da linhagem selvagem e dos *pools* 05, 07, 12 e 24 após a determinação dos novos padrões de teste. Foi possível observar que o *pool* 07 apresentou crescimento 32% superior ao da linhagem selvagem após incubação a 37°C e 10% de etanol no cultivo por 4 h com agitação, (ctrl é a abreviação para controle).

Pool - Condição	Replicata			Média	Crescimento (%)
	1	2	3		
WT - ctrl	97	119	94	103	64
WT - 10%	84	47	67	66	
05 - ctrl	108	106	130	115	79
05 - 10%	87	113	73	91	
07 - ctrl	81	91	105	92	96
07 - 10%	95	61	109	88	
12 - ctrl	119	113	126	119	65
12 - 10%	62	88	84	78	
24 - ctrl	83	85	95	88	72
24 - 10%	54	64	72	63	

O teste de unidade formadora de colônia foi repetido utilizando a linhagem selvagem e o *pool* 07 em condições idênticas às padronizadas e utilizadas no teste anterior para verificação de possíveis variações entre os resultados. A média de crescimento entre os experimentos se manteve tanto para WT quanto para o *pool* 07 (Figura 8), que mostrou-se 28% menos sensível ao estresse submetido do que a linhagem selvagem (Tabela 4).

Figura 8: Valores médios de UFC observados para WT comparada ao *pool 07* em condição de estresse etanólico de 10% a 37°C.

Tabela 4: porcentual de unidades formadoras de colônias observadas entre os testes feitos. O *pool 07* apresentou 28% menos sensibilidade ao estresse que a linhagem selvagem.

	controle (%)	10% etanol (%)	erros +ou- (%)
WT	100	67	5
pool7	100	95	5

8.4 – Seleção dos mutantes isolados da placa 07.

Seguindo a metodologia usada durante a seleção dos *pools*, foram feitos os testes para averiguação de quais mutantes da placa 07 seriam responsáveis pela tolerância etanólica e térmica aumentadas. Inicialmente, usando uma microplaca com 1 mL de capacidade, foi realizado o cultivo dos mutantes em 500 µL de YDP que posteriormente seriam inoculados em duas diferentes placas contendo 10% de água a 30 °C ou 10% de etanol a 37°C e incubados em agitação de 170 RPM, 24 h. Com isso foi possível observar que tal condição desfavoreceu o crescimento de grande parte dos mutantes contidos na placa restando apenas 13 que apresentaram crescimento com aumento da densidade ótica após as 24 h de incubação (Figura 9).

Os mutantes que apresentaram crescimento após 24 h em situação de estresse foram utilizados em novo teste, porém em Erlenmeyers utilizando maior volume de cultura (30 mL) para cada frasco, com esse experimento foi possível averiguar que aplicando a condição de 10% de estresse etanólico somado a temperatura de 37°C apenas 5 entre os selecionados anteriormente suportaram a condição oferecida (Figura 9).

Assim, procuramos quais eram os genes que estavam ausentes nas respectivas linhagens, a fim de compreender ou relacionar suas funções descritas com a tolerância térmica e etanólica observada (Tabela 5).

Figura 9: Amostragem dos mutantes com e 37°C para condição de estresse e 10% água e 30°C para controle ambos mantidos em agitação de 170 RPM durante esse período. Os poços B12, D5, E5, F12 e G5 apresentaram crescimento pelo menos 50% superior em comparação ao controle.

Tabela 5: Genes cuja deleção melhorou a tolerância de *S. cerevisiae* a exposição ao estresse etanólico e térmico.

ORFs	Função
<i>UBP15</i>	ubiquitina-protease específica envolvida na desubiquitinação de proteínas - YMR304W
<i>THI12</i>	envolvida com a síntese de hidroximetilpirimidina (HMP), precursor da tiamina - YNL332W
<i>CLA4</i>	quinase de transdução envolvida na conjugação de anel de septina, herança vacuolar, citocinese, regulação na absorção de esteróis - YNL298W
<i>DIT1</i>	enzima específica da esporulação necessária para a maturação de esporos de parede, contendo o precursor da parede de esporos - YDR403W
<i>MTC7</i>	tem previsto papel metabólico como mutante sensível a oscilações de temperatura - YEL033W

8.5 - Descrição dos mutantes selecionados.

Entre os mutantes que apresentaram maior crescimento, destacaram-se os mutantes com silenciamento de **UBP15** (poço D5 placa 07), uma Ubiquitina-protease específica (AMERIK, 2000) envolvida na desubiquitinação de proteínas que tem a atividade catalítica regulada por um domínio N-terminal semelhante a TRAF e sequências C-terminais. Ubp15p interage fisicamente com o ativador do complexo promotor da anáfase/ciclossomo (APC/C), Cdh1p formando um complexo com peroxinas AAA, Pex1p e Pex6p (LAYFIELD 1999, BOZZA 2011, DEBELYY 2011). Já foi observado que Ubp15p pode desubiquitar Pex5p, sendo o estado de ubiquitinação do receptor PTS1 influenciado diretamente em seu ciclo catalítico (CARVALHO, PLATTA, 2007). As células *ubp15Δ* contêm mais clusters peroxissomais do que as células do tipo selvagem, sendo assim, concebível que a deleção de Ubp15p influencia o processo de importação de proteínas PTS1 como catalase. Assim, possivelmente afeta também a morfologia, a aglomeração de peroxissomos e leva a uma desaceleração do ciclo Pex5p, que está certamente associada às taxas de importação reduzidas nas ubiquitinas (DEBELYY, 2011). Embora Ubp15p não seja essencial para a biogênese peroxissomal, em condições normais, a sua função de regulador ganha importância significativa quando as células são inoculadas com o estressor e requerem uma importação eficiente de proteínas de matriz em peroxissomos (LEGAKIS, 2002, PETRIV, 2004). Porém, nenhum estudo foi ligado ao estresse etanólico e térmico demandando maior aprofundamento para identificação da possível melhora na tolerância.

THI12 (poço E5 placa 07) (HATHER, 1996), envolvida com a síntese de hidroximetilpirimidina (HMP), precursor da tiamina, membro de uma família de genes subtelomérica THI5, THI11, THI12 e THI13 (WIGHTMAN, 2003). Estando

THI12 silenciado, pode ter favorecido a expressão aumentada da família *THI5*, conhecida por conter quatro membros muito conservados, sendo *THI5*, *THI11*, *THI12* e *THI13*. Este grupo de genes de leveduras é identificado por estar envolvido com a capacidade para fermentar uma grande variedade de açúcares, os quais são metabolizados através de glicólise para piruvato e daí por fermentação anaeróbica para etanol ou pelo metabolismo aeróbio para produzir biomassa (WIGHTMAN, 2003).

THI12 pertence aos membros da família de genes *SNO* e *SNZ*, ambos inicialmente identificados como genes expressos no momento da entrada de fonte de carbono até à fase estacionária (PADILLA, 1998). Os homólogos do *SNZ* de outros fungos foram desde então descritos como codificadores de enzimas biossintéticas de piridoxina (EHRENSHAFT, OSMANI, 1999). Foi confirmado como responsável por sintetizar hidroximetilpirimidina (HMP), precursor da tiamina (RODRIGUEZ-NAVARRO, 2002). Provavelmente há uma forte necessidade metabólica ou de produzir grandes quantidades de produtos finais, ou um dos compostos intermediários ou as proteínas que satisfazem as outras funções necessárias quando as células estão esgotadas de tiamina considerando que a expressão destes genes é reprimida em condição de abundância da proteína sintetizada por esse gene.

Possivelmente o silenciamento de *THI12* favoreceu maior expressão de algum dos três outros genes, o que refletiu no aumento mais eficiente de massa e maior tolerância ao estresse.

CLA4 (poço G5 placa 07) (CVRCKOVA 1995) quinase de transdução ativada por sinal Cdc42p da família PAK, juntamente com Ste20p e Skm1p, está envolvido na conjugação do anel de septina, herança vacúolar, citocinese,

regulação na absorção de esteróis, fosforila Cdc3p e Cdc10p. (CVRCKOVA 1997, BARTHOLOMEW 2009, LIN 2009). A ligação defeituosa entre Cdc10p e Cdc12p solúveis nos mutantes para *CLA4* formam complexos heteroméricos com outras septinas tanto em leveduras quanto em bactérias e, ao contrário do tipo selvagem, os complexos mutantes não se ligam a GTP e não desenvolvem filamentos (VERSELE, 2004).

A supressão do domínio de ligação Cla4p-Cdc42p acarreta no aumento da atividade quinase em quase três vezes; isto sugere que a atividade de quinase por si só não é suficiente para a função completa. A remoção do domínio de ligação de Cdc42p também altera a regulação do ciclo celular da atividade de quinase. Em vez de um pico na mitose, a atividade quinase mutante apresenta redução na regulação do ciclo celular e que culmina na passagem de G1/S. A atividade quinase de Cla4p não é reduzida por inativação mutacional de *gin4*, sugerindo que pode ser Gin4p o regulador *downstream* ou paralelo com Cla4p na citocinese (BENTON, 1997). Não sabemos explicar a função dessa quinase na tolerância aos estresses térmico e etanólico, mas como quinases são reguladores de muitas vias metabólicas, pode ser uma relação ainda não descrita.

DIT1 (poço B12 placa 07) (BRIZA 1990), enzima específica da esporulação necessária para a maturação de esporos de parede, envolvidos na produção de uma LL-ditirosina solúvel contendo o precursor da parede de esporos (BRIZA 1994, FRIESEN 1997). A correlação destes efeitos fenotípicos da mutação *DIT1* com o efeito sobre a estrutura da parede do esporo sugere que a camada mais externa da parede de ligação cruzada de esporos é responsável pela resistência ao aquecimento. Presume-se que a camada mais

externa da parede normalmente contribui para a estabilidade da parede de esporos e que a ausência desta camada nas estirpes mutantes pode levar a ruptura das paredes dos esporos mais frequentemente (BRIZA, 1990). *DIT1* foi descrito como intrinsecamente ligado a *DIT2*, sendo muito complexo poder obter informações de apenas um dos dois genes sem sofrer interferência do outro (BRIZA, 1994).

É possível que a vantagem para crescimento celular esteja ligada à diferenciação de parede entre linhagem selvagem e o mutante com *DIT1* silenciado, visto que a linhagem mutada tem menor amplitude de parede, é possível que tenha maior facilidade para se desenvolver e duplicar desenvolvendo mais rapidamente as colônias. Não há maiores informações sobre estresse de qualquer tipo descritas para esse gene, tornando um possível alvo para testes mais específicos. A ausência desse gene pode levar a algum tipo de resposta compensatória, tornando as células mais resistentes aos estresses analisados devido a mudança de perfil proteico. Esse tipo de resposta é comum quando há genes de função redundante, caso de *DIT1* e *DIT2*, bem como acontece para os genes *MSN2* e *MSN4* descritos adiante.

MTC7 (poço F12 placa 07) (ADDINALL 2008) ainda não foi caracterizado, mas tem previsto papel metabólico com base em um estudo de supressão em larga escala e de identificação dos locais de ligação do fator de transcrição. Seu mutante nulo é sensível a oscilações de temperatura (SCHLITT 2003). *MTC7* pertence a um grupo de genes que, quando são excluídos, conferem sensibilidade alta ou baixa aos telômeros curtos. Este conjunto inclui a manutenção dos telômeros, a metilação das histonas, e o silenciamento gênico indicando que *MTC7* pode influenciar a biologia do telômero através de

um desses processos (ADDINALL, 2008). Está ligado a apenas um outro gene, *BUD21*, que está envolvido no processamento de rRNA (SCHLITT, 2003).

Por se tratar de uma ORF não caracterizada, a elucidação da resistência aumentada só pode se dar após identificação e estudo detalhado das funções do gene.

O uso de um conjunto de mutantes com deleções não essenciais favorece a seleção de mutações que podem ser benéficas. Uma biblioteca de mutante mediada por transposon foi recentemente usada para aumentar tolerância ao calor e ao etanol. 5 estirpes apresentaram tolerância ao álcool em meio contendo até 15% de etanol, e 2 deles eram também tolerantes ao calor (42°C). A regulação negativa simultânea dos genes *SSK2* (que produz uma MAPKKK da via Hog1p essencial para a sobrevivência da levedura, em condições de alta osmolaridade) e *PPG1* (que produz uma putativa serina / treonina fosfatase, proteína que é necessária para a acumulação de glicogênio), que foi produzida por uma inserção de transposon em ambas as regiões do promotor, resultou em uma das estirpes resistentes ao etanol e à alta temperatura. A outra estirpe resistente a ambos os estresses foi produzida por ruptura de um único gene, *PAM1* (que produz uma proteína de função desconhecida) (INOUE, 2000).

A interrupção de *MSN2* já havia sido relacionada com a tolerância ao etanol. Em associação com Msn4p (que compartilha 41% de identidade com Msn2p), Msn2p regula uma resposta global contra estresse na levedura que envolve cerca de 200 genes (MOBINI-DEHKORDI, 2008). Mutantes de deleção única de *MSN2* ou *MSN4* não mostram fenótipo óbvio, mas mutantes *knockout* duplos *MSN2* e *MSN4* são hipersensíveis à depleção de carbono, ao estresse

oxidativo e osmótico, bem como ao choque térmico. Os autores especularam que a mutação única *MSN2* poderia produzir uma maior resistência ao etanol do que o tipo selvagem, pois a sua ausência levaria a expressão de *MSN4* e, por conseguinte, para a indução de genes regulados especificamente por Msn4p (INOUE, 2000). Embora *MSN2* e *MSN4* parecerem ter funções redundantes, este resultado sugere que os genes específicos que são regulados por este último podem ser especialmente importantes na determinação da tolerância ao etanol.

Outros estudos mostraram que a superexpressão *MSN2* e *MSN4* causa maior sensibilidade a fome e choque térmico em leveduras que o habitual (INOUE, 2000). Ambos os fatores de transcrição causam alterações semelhantes na membrana lipídica (MONTEIRO, 2004) através da regulação dos genes que são responsáveis pela codificação de proteínas de choque térmico (LUCENA, 2010). A superexpressão de *MSN2* promoveu maior tolerância ao etanol e melhora na capacidade de fermentação de linhagens de leveduras (TEIXEIRA, 2009).

Em conclusão, a utilização de leveduras geneticamente modificadas pode ajudar na identificação de genes que são responsáveis pela maior tolerância ao estresse e pode, eventualmente, mostrar que eles estão envolvidos em sensibilidade ao calor e álcool. Este conhecimento pode guiar os investigadores na construção de mutantes melhoradas em CAT1 ou PE2 modificadas. Existe uma lacuna na literatura corrente na descrição de genes de leveduras que são importantes para a resistência ao estresse durante o processo de reciclagem de células, o que é amplamente utilizado no Brasil. Este recurso merece um estudo mais aprofundado para melhorar a capacidade

de cepas de leveduras industriais para se defender contra o estresse dentro do processo de fermentação.

Atualmente mesmo com estudos voltados para otimização da própria cana-de-açúcar, existe resistência por parte dos usineiros em modificar as plantas industriais dado o grande aporte financeiro necessário e a possibilidade de desviar a produção para a obtenção de açúcar refinado em caso de baixa de preços. Com o presente estudo permite-se o uso otimizado de toda a infraestrutura e metodologia já existente para produção do etanol combustível de primeira geração.

9 – Conclusão.

Os resultados apresentados nesse estudo relacionam 5 genes de *S. cerevisiae* com a sensibilidade aos estresses térmico e etanólico. Interessantemente, essa é a primeira descrição do envolvimento dos mesmos com essa resposta. Os resultados abrem possibilidade de investigação e modificação desses alvos em linhagens industriais buscando a melhoria da produtividade do etanol de primeira geração produzido no Brasil.

10 – Bibliografia.

- AARNIO, T. H., SUIHKO, M. L., KAUPPINEN, V. S. Isolation of acetic acid tolerant baker's yeast variants in a turbidostat. *Appl Biochem Biotechnol* 27, 55–63. (1991).
- ADDINALL S. G., *et al.* A Genomewide Suppressor and Enhancer Analysis of *cdc13-1* Reveals Varied Cellular Processes Influencing Telomere Capping in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 180(4):2251-66. (2008).
- AMERIK, A. Y., *et al.* Analysis of the deubiquitinating enzymes of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biol Chem* 381(9-10):981-92. (2000).
- AMORIM, H. V., LOPES, M. L. Os principais processos 1 de fermentação para álcool combustível no mundo. *Guia Internacional do Álcool* 1, 74–77. (2004).
- AMORIM, H. V., LOPES, M. L. Ethanol production in a petroleum dependent world: the Brazilian experience. *Sugar J.* 67, 11–14. (2005).
- AMORIM, H. V., BASSO, L. C., LOPES, M. L. Sugar cane juice and molasses, beet molasses and sweet sorghum: composition and usage. In: Ingledew, W.M., KELSALL, D. R., AUSTIN, G. D., KLUHSPIES, C. (eds) *The alcohol textbook: a reference for the beverage, fuel, and industrial alcohol industries, vol. 1*. Nottingham University Press, Nottingham, UK.39–46. (2009).
- AMORIM, H. V., GRYSCHKE, M., LOPES, M. L. The success and sustainability of the Brazilian sugarcane – fuel ethanol industry. In: Eggleston, G. (ed) *Sustainability of the sugar and sugar ethanol industries, ACS Symposium Series Vol. 1058, Chapter 5*. American Chemical Society, Washington, USA, p.73–82. (2010).

- AMORIM, H. V., LOPES, M. L., DE CASTRO OLIVEIRA, J. V., BUCKERIDGE, M.S., GOLDMAN, G.H. Scientific challenges of bioethanol production in Brazil. *Appl Microbiol Biotechnol.* 91(5), 1267-75. (2011).
- AN, M. -Z., TANG, Y. -Q., MITSUMASU, K., LIU, Z. -S., SHIGERU, M., E KENJI, K. Enhanced thermotolerance for ethanol fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* strain by overexpression of the gene coding for trehalose-6-phosphate synthase. *Biotechnology letters.* 33(7):1367-74. (2011).
- ARGUESO, J. L., CARAZZOLLE, M. F., MIECZKOWSKI, P. A., DUARTE, F. M., NETTO, O. V. C., MISSAWA, S. K., GALZERANI, F., COSTA, G. G. L., VIDAL, R. O., NORONHA, M. F., DOMINSKA, M., ANDRIETTA, M. G. S., ANDRIETTA, S. R., CUNHA, A. F., GOMES, L. H., TAVARES, F. C. A., ALCARDE, A. R., DIETRICH, F. S., MCCUSKER, J. H., PETES, T. D., PEREIRA, G. A. G. Genome structure of a *Saccharomyces cerevisiae* strain widely used in bioethanol production. *Genome Res.* 19, 2258– 2270. (2009).
- AUSUBEL, F. M., BRENT, R., KINGSTON, R. E., MOORE, D. D., SEIDMAN, J. G., SMITH, J. A., STRUHL, K. Current protocols in molecular biology. *Evangelist Wiley and Sons.* 1ed. Londres, (2003).
- BARTHOLOMEW, C. R., HARDY, C. F. p21-activated kinases Cla4 and Ste20 regulate vacuole inheritance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell* 8(4):560-72. (2009).
- BASSO, L. C., AMORIM, H. V., OLIVEIRA, A. J., LOPES, M. L. Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil. *FEMS Yeast Research*, 8(7), 1155-63, (2008).

- BASSO L. C., PAULILO S. C. L., RODRIGUES D. A., BASSO T. O., AMORIN A. V., WALKER G. M. Aluminium toxicity towards yeast fermentation and the protective effect of magnesium. *International Congress on Yeasts: Yeasts in Science and Biotechnology The Quest for Sustainable Development. Book of Abstracts*, Rio de Janeiro, p. PB-14, (2004).
- BASSO L. C., OLIVEIRA A. J., ORELLI V. F. D. M., CAMPOS A. A., GALLO C. R., AMORIM H. V. Dominância das leveduras contaminantes sobre as linhagens industriais avaliada pela técnica da cariotipagem. *Anais Congresso Nacional da STAB* 5: 246–250, (1993).
- BELLAVER, L. H., DE CARVALHO, N. M., ABRAHÃO-NETO J., GOMBERT A. K. Ethanol formation and enzyme activities around glucose-6-phosphate in *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556 exposed to glucose or lactose excess. *FEMS Yeast Research*. 4(7): 691-698, (2004).
- BOZZA, W. P., ZHUANG, Z. Biochemical Characterization of a Multidomain Deubiquitinating Enzyme Ubp15 and the Regulatory Role of Its Terminal Domains. *Biochemistry*. 50(29):6423-6432. (2011).
- BRETHAUER, S., WYMAN, C. E. Continuous hydrolysis and fermentation for cellulosic ethanol production. *Bioresource Technology*. 101, 4862–4874. (2010).
- BRIZA, P., *et al.* The sporulation-specific enzymes encoded by the DIT1 and DIT2 genes catalyze. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 91(10):4524-8 (1994).
- BRIZA, P., *et al.* Isolation of two developmentally regulated genes involved in spore wall maturation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev* 4(10):1775-89. (1990).

- CABRINI, K. T., GALLO, C. R. Identificação de leveduras no processo de fermentação alcoólica em usina do estado de São Paulo, Brasil. *Scientia Agricola*. 56(1): 207-216. (1999).
- CADERNOS DE ENERGIA - EPE *Análise de Conjuntura dos Biocombustíveis*. 08 de julho. (2010).
- CARVALHO A. F., PINTO M. P., GROU C. P., ALENCASTRE I. S., FRANSEN M., SÁ-MIRANDA C., AZEVEDO J. E. Ubiquitination of Mammalian Pex5p, the Peroxisomal Import Receptor. *J. Biol. Chem.* 282, 31267-31272. (2007).
- CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/12_04_10_09_19_04_boletim_de_cana.pdf. Acessado em 20 de novembro de 2012.
- CHOI, G. W, KANG H. W, MOON, S. K. Repeated-batch fermentation using flocculent hybrid, *Saccharomyces cerevisiae* CHFY0321 for efficient production of bioethanol. *Applied Microbiology and Biotechnology* 84(2): 261-269, (2009).
- CVRCKOVA, F, *et al.* Ste20-like protein kinases are required for normal localization of cell growth and for cytokinesis in budding yeast. *Genes Dev* 9(15): 1817-30. (1995).
- CVRCKOVA, F., NASMYTH, K. Yeast G1 cyclins CLN1 and CLN2 and a GAP-like protein have a role in bud formation. *EMBO J* 12(13): 5277-86. (1993).
- DEBELYY, M. O., *et al.* Ubp15p, an ubiquitin hydrolase associated with the peroxisomal export machinery. *J Biol Chem* 286(32): 28223-34. (2011).
- EPE – Empresa de Pesquisa Energética - <http://www.epe.gov.br>, acessado em 21/11/2012.

- ESTRUCH, F., CARLSON, M. Two homologous zinc finger genes identified by multicopy suppression in a SNF1 protein kinase mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.* 13, 3872–3881. (1993).
- FIEDUREK, J., SKOWRONEK, M., & GROMADA, A. Selection and adaptation of *Saccharomyces cerevisiae* to increased ethanol tolerance and production. *Polskie Towarzystwo Mikrobiologów*, 60(1), 51-8, (2011).
- FRIESEN, H., *et al.* An Ssn6-Tup1-dependent negative regulatory element controls sporulation-specific expression of DIT1 and DIT2 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 17(1):123-34. (1997).
- FUJITA, K., MATSUYAMA, A., KOBAYASHI, Y., IWAHASHI, H. The genome-wide screening of yeast deletion mutants to identify the genes required for tolerance to ethanol and other alcohols. *FEMS Yeast Res.* 6: 744-750, (2006).
- GALLO, C. R. *Determinação da microbiota bacteriana de mosto e de dornas de fermentação alcoólica*. Campinas (D.Sc. Thesis. Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP). (1990).
- GANCEDO, J. M. Yeast carbon catabolite repression. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 62 (2): 334-361, (1998).
- GODOY, A., AMORIM, H.V., LOPES, M. L., OLIVEIRA, A. J. Continuous and batch fermentation processes: advantages and disadvantages of these processes in the Brazilian ethanol production. *Int. Sugar J.* 110, 175–181. (2008).
- HATHER, R. J., MEACOCK, P. A. Characterization of two new thiamine regulated *Saccharomyces cerevisiae* genes, THI11 and THI12. Unpublished. (1996).

- HIRASAWA, T., YOSHIKAWA, K., NAKAMURA, Y., NAGAHISA, K., FURUSAWA, C., KATAKUTA, *et al.* Identification of target genes conferring ethanol stress tolerance to *Saccharomyces cerevisiae* based on DNA microarray data analysis. *Journal of Biotechnology*. 131(1): 34-44, (2007).
- HUSSY, I., HAWKES, F. R., DINSDALE, R., HAWKES, D. L. Continuous fermentative hydrogen production from sucrose and sugarbeet. *International Journal of Hydrogen Energy* 30, 471–483. (2005).
- INOUE T., IEFUJI H., FUJII T., SOGA H. Cloning and characterization of a gene complementing the mutation of an ethanol-sensitive mutant of sake yeast. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 64:229–236, (2000).
- KIM, H. -S., KIM, N. -R., YANG, J., & CHOI, W. Identification of novel genes responsible for ethanol and/or thermotolerance by transposon mutagenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied microbiology and biotechnology*. 62, 1563-1569. (2011).
- KIM, J., ALIZADEH, P., HARDING, T. HEFNER-GRAVINK, A., KLIONSKY, D. J. Disruption of the yeast ATH1 gene confers better survival after dehydration, freezing, and ethanol shock: potential commercial applications. *Applied and environmental microbiology*, 62(5), 1563-9, (1996).
- KONG, Q. X., ZHANG, A. L., CAO, L. M., CHEN, X. Over-expressing GLT1 in a *gpd2Delta* mutant of *Saccharomyces cerevisiae* to improve ethanol production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 75 (6), 1361-1366. (2007).
- KUBOTA, S., TAKEO, I., KUME, K., KANAI, M., SHITAMUKAI, A., MIZUNUMA, M., MIYAKAWA, T., SHIMOI, H., IEFUJI. H., HIRATA, D. Effect of ethanol on cell growth of budding yeast: Genes that are important for cell growth in the presence of ethanol. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 68(4): 968-972. (2004).

- LAYFIELD, R., *et al.* Chemically synthesized ubiquitin extension proteins detect distinct catalytic capacities of deubiquitinating enzymes. *Anal Biochem* 274(1):40-9. (1999).
- LEGAKIS J. E., KOEPKE J. I., JEDESZKO C., BARLASKAR F., TERLECKY L. J., EDWARDS H. J., WALTON P. A., TERLECKY S. R. Peroxisome Senescence in Human Fibroblasts. *Mol. Biol. Cell* 13, 4243–4255. (2002).
- LIMA, U. A., AQUARONE, E., BORZANI, W., SCHMIDELL, W. *Biotecnologia Industrial: Processos Fermentativos e Enzimáticos - Vol.3*, Edgard Blucher, RJ. “Produção de etanol”, p. 1-43. (2001).
- LIN M, *et al.* The Cdc42 effectors Ste20, Cla4, and Skm1 down-regulate the expression of genes involved in sterol uptake by a mitogen-activated protein kinase-independent pathway. *Mol Biol Cell* 20(22):4826-37. (2009).
- LOPES, M.L. 30 years of fuel ethanol production in Brazil. Identification and selection of dominant industrial yeast strains. 12th International Conference on Culture Collections. Biological resources centers: gateway to biodiversity and services for innovation in biotechnology Florianópolis, SC. (2010).
- LOPES, M. L., AMORIM, H. V., GODOY, A., OLIVEIRA, A. J., CHERUBIN, R. A., BASSO, L. C. Interaction between yeast and acetic acid bacteria in industrial fermentation for ethanol production: a case study. Eleventh International Congress on Yeast-Yeasts in Science and Technology, Rio de Janeiro, RJ, 1, 183-183. (2004).
- LOPES, M. L., BASSO, L. C., AMORIM, H. V. Chromosomal polymorphism in *Saccharomyces cerevisiae* (strain PE2) used in industrial fermentation for ethanol production. 2002 Yeast Genetics and Molecular Biology Meeting, Madison, WI, p. 159. (2002).

- LOPES, M. L. Estudo do polimorfismo cromossômico em *Saccharomyces cerevisiae* (linhagem PE2) utilizada no processo industrial de produção de etanol. Rio Claro. (PhD. Thesis. Instituto de Biociências de Rio Claro. Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho). (2000).
- LUCENA, B. T., DOS SANTOS, B. M., MOREIRA, J. L., MOREIRA, A. P., NUNES, A. C., AZEVEDO, V., MIYOSHI, A., THOMPSON, F. L., DE MORAIS, M. A. jr. Diversity of lactic acid bacteria of the bioethanol process. *BMC Microbiol.* 10, 298. (2010).
- MA, M., LIU, Z. L. Mechanisms of ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 87, 829–845. (2010).
- MATSUTANI, K., FUKUDA, Y., MUTRATA, K., KIMURA, A., 1 YAJIMA, N. Adaptation mechanism of yeast to extreme environments: construction of salt-tolerance mutants of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Ferm. Bioeng.* 73, 228–229. (1992).
- MEDINA, V. G., ALMERING, M.J., VAN MARIS, A.J., PRONK, J.T. Elimination of glycerol production in anaerobic cultures of a *Saccharomyces cerevisiae* strain engineered to use acetic acid as an electron acceptor. *Applied and Environmental Microbiology*, 76, 190–195, (2010).
- MOBINI-DEHKORDI, M., NAHVI, I., ZARKESH-ESFAHANI, H., GHAEDI, K., TAVASSOLI, M., & AKADA, R. Isolation of a novel mutant strain of *Saccharomyces cerevisiae* by an ethyl methane sulfonate-induced mutagenesis approach as a high producer of bioethanol. *Journal of bioscience and bioengineering*, 105(4), 403-8, (2008).
- MONTEIRO, G., NETTO, L. E. Glucose repression of PRX1 expression is mediated by Tor1p and Ras2p through inhibition of Msn2/4p in

Saccharomyces cerevisiae. *FEMS Microbiology Letter*. 241(2): 221-228, (2004).

- NORTON, S., WATSON, K., D'AMORE, T. Ethanol tolerance of immobilized brewers' yeast cells. *Applied Microbiology and Biotechnology* 43: 18-24, (1995).
- OKUYAMA, H., SAITO, M. Regulation by temperature of the chain length of fatty acids in yeast. *J. Biol. Chem.* 254, 12281–12284. (1979).
- PETRIV O. I., RACHUBINSKI R. A. Lack of Peroxisomal Catalase Causes a Progeric Phenotype in *Caenorhabditis elegans*. *J. Biol. Chem.* 279, 19996–20001. (2004).
- PINEL, D., D'AOUST, F., DEL CARDAYRE, S. B., BAJWA, P. K., LEE, H., MARTIN, V. J. J. Genome shuffling of *Saccharomyces cerevisiae* through recursive population mating leads to improved tolerance to spent sulfite liquor. *Applied and environmental microbiology*. 77(14): 4736–4743. (2011).
- PLATTA H. W., EL MAGRAOUI F., SCHLEE D., GRUNAU S., GIRZALSKY W., ERDMANN R. Ubiquitination of the peroxisomal import receptor Pex5p is required for its recycling. *J. Cell Biol.* 177, 197–204. (2007).
- SANCHEZ, O. J., CARDONA, C. A. Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. *Bioresource Technology*. 99, 5270–5295. (2008).
- SCHLITT, T., *et al.* From gene networks to gene function. *Genome Res* 13(12):2568-76. (2003).
- SCHWER, B., MAO, X., SHUMAN, S. Accelerated mRNA decay in conditional mutants of yeast mRNA capping enzyme. *Nucleic Acids Research*, 26(9), 2050-7, (1998).

- SHI, D. J., WANG, C. L., WANG, K. M. Genome shuffling to improve thermotolerance, ethanol tolerance and ethanol productivity of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 36: 139-147, (2008).
- SILVA FILHO, E. A. DA, MELO, H. F. DE, ANTUNES, D. F., SANTOS, S. K. B. DOS, MONTE RESENDE, A. DO, SIMÕES, D. A., *et al.* Isolation by genetic and physiological characteristics of a fuel-ethanol fermentative *Saccharomyces cerevisiae* strain with potential for genetic manipulation. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 32(10), 481-6, (2005).
- STAMBUK, B. U., DUNN, B., ALVES JUNIOR, S. L., DUVAL, 1 E. H., SHERLOCK, G. Industrial fuel ethanol yeasts contain adaptive copy number changes in genes involved in vitamin B1 and B6 biosynthesis. *Genome Res.* 19, 2271–2278. (2009).
- STANLEY, D., FRASER, S., CHAMBERS, P. J., ROGERS, P., & STANLEY, G. A. Generation and characterization of stable ethanol-tolerant mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 37(2), 139-49, (2010).
- TAKAGI, H., TAKAOKA, M., KAWAGUCHI, A., KUBO, Y. Effect of L-proline on sake brewing and ethanol stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 8656–8662. (2005).
- TAKAGI, H., TAKAOKA, M., KAWAGUCHI, A., & KUBO, Y. Effect of L - Proline on Sake Brewing and Ethanol Stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(12), 8656-8662, (2001).
- TAKAGI, H., IWAMOTO, F., NAKAMORI, S. Isolation of freeze-tolerant laboratory strains of *Saccharomyces cerevisiae* from proline-analogue resistant mutants. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 47, 405–411. (1997).

- TEIXEIRA, M. C., RAPOSO, L. R., MIRA, N. P., LOURENÇO, A. B., & SÁ-CORREIA, I. Genome-wide identification of *Saccharomyces cerevisiae* genes required for maximal tolerance to ethanol. *Applied and environmental microbiology*, 75(18), 5761-72, (2009).
- VAN VOORST F., HOUGHTON-LARSEN J., JONSON L., KIELLAND-BRANDT, M. C., BRANDT A. Genome-wide identification of genes required for growth of *Saccharomyces cerevisiae* under ethanol stress. *Yeast*, 23:351–359, (2006).
- WATANABE, M., WATANABE, D., AKAO, T., SHIMOI, H. Overexpression of MSN2 in a sake yeast strain promotes ethanol tolerance and increases ethanol production in sake brewing. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 107(5): 516-518, (2009).
- WATI, L., DHAMIJA, S. S., SINGH, D., NIGAM, P., MARCHANT, R. Characterization of genetic control of thermotolerance in mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Gen. Eng. Biotechnol.* 16, 19–28. (1996).
- WHEALS, A. E., BASSO, L. C., ALVES, D. M., AMORIM, H. V. Fuel ethanol after 25 years. *Trends in biotechnology*, 17(12): 482-7, (1999).
- WIGHTMAN, R., MEACOCK, P. A. The THI5 gene family of *Saccharomyces cerevisiae*: distribution of homologues among the hemiascomycetes and functional redundancy in the aerobic biosynthesis of thiamin from pyridoxine. *Microbiology* 149(Pt 6):1447-60. (2003).
- WINZELER, E. A., SHOEMAKER, D. D., ASTROMOFF, A., LIANG, H., ANDERSON, K., ANDRE, B., *et al.* Functional Characterization of the *S. cerevisiae* Genome by Gene Deletion and Parallel Analysis. *Science*, 285: 901, (2011).

- WISSELINK, H. W., TOIRKENS, M. J., BERRIEL, M. D. F., WINKLER, A. A., VAN DIJKEN, J. P., PRONK, J. T., VAN MARIS, A. J. A. Engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for efficient anaerobic alcoholic fermentation of L-arabinose. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(15): 4881-4891, (2007).
- WYMAN, C. E. e HINMAN, N. D. Ethanol – Fundamentals of Production From Renewable Feedstocks and Use as a Transportation Fuel. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 24-5:735-753, (1990).
- YAN, F., BAI, F., TIAN, S., ZHANG, J., ZHANG, Z., YANG, X. Strain construction for ethanol production from dilute-acid lignocellulosic hydrolysate. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 157: 473-482, (2009).
- YANG, J., BAE, J.Y., LEE, Y.M., KWON, H., MOON, H.Y., KANG, H.A., YEE, S.B., KIM, W., CHOI, W. Construction of *Saccharomyces cerevisiae* strains with enhanced ethanol tolerance by mutagenesis of the TATA binding protein gene and identification of novel genes associated with ethanol tolerance. *Biotechnol. Bioeng.* 108 (8), 1776-87. (2011).
- YAZAWA, H., IWAHASHI, H., UEMURA, H. Disruption of URA7 and GAL6 improves the ethanol tolerance and fermentation capacity of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 551-560, (2007).
- YOSHIKAWA, K., TANAKA, T., FURUSAWA, C., NAGAHISA, K., HIRASAWA, T., E SHIMIZU, H. Comprehensive phenotypic analysis for identification of genes affecting growth under ethanol stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Research*, 9(1), 32-44. (2009).
- ZHAO, X. Q., BAI, F. W. Mechanisms of yeast stress tolerance and its manipulation for efficient fuel ethanol production. *Journal of Biotechnology*. 144(1):23-30. (2009).

- ZHENG, D. -Q., WU, X. -C., TAO, X. -L., WANG, P. -M., LI, P., CHI, X. -Q.,
et al. Screening and construction of *Saccharomyces cerevisiae* strains with
improved multi-tolerance and bioethanol fermentation performance.
Bioresource technology, 102(3), 3020-7. (2011).