

Augusto Bucker

**ENGENHARIA GENÔMICA DE LINHAGEM INDUSTRIAL DE
SACCHAROMYCES CEREVISIAE VISANDO MELHORAR A
TOLERÂNCIA AO ETANOL**

Tese submetida ao Programa de Pós-
Graduação em Bioquímica da
Universidade Federal de Santa
Catarina para a obtenção do Grau de
Doutor em Bioquímica

Orientador: Prof. Dr. Boris U Stambuk

Florianópolis

2014

Este trabalho é dedicado à minha amada esposa Nádia, e nosso filho Alexandre. Também aos nossos pais Adelino S. Bucker, Iris Hoppe, Newton P.S. Falcão e Noélia L.S. Falcão.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por seu amor estar constantemente presente em minha vida.

Aos meus pais, Adelino e Iris, pela contribuição na formação do meu caráter, pelo amor incondicional, apoio, incentivo e dedicação da vida toda.

A minha família, mãe, pai, irmãos, sogro/sogra, cunhada. Sem eles nada disso seria possível.

A minha querida amada, Nádía. Pelo seu amor, companheirismo, carinho, dedicação e, principalmente, pela paciência. Por sempre ter me apoiado em todas as minhas escolhas e nunca ter se negado a me ajudar no que fosse preciso.

Agradeço ao professor Dr. Boris U. Stambuk, pela sua orientação e, sobretudo, pela oportunidade a mim concedida de fazer parte da sua equipe de laboratório.

Aos colegas de laboratório que contribuíram muito para minha formação: Dra. Maria de Lourdes Magalhães, Dr. Sérgio Alves Júnior, Dra. Débora Trichez, Dra. Catarina Figueiredo, Dra. Gabriela Müller, Ms. Belisa Bordin, Ms. Alice Prompt, Ms. Francisco Cousseau, Ms. Marília Knychala, Ms. Mylena Fernandes, Ms. Adriane Mouro, Ms. Denis Dall Agnolo, Daniella Hock e Victor Godoy pelas conversas, companhia, contribuições e amizade durante o tempo de trabalho.

Em especial aos colegas de laboratório já formados, por me ajudarem e passar seus conhecimentos nos diversos momentos de meu doutoramento, Dr. Marcelo G. Dário, Dr. Júlio César Espírito Santo e Dr. Davi Ludvig.

Aos funcionários do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica pelo apoio e esclarecimento prestado durante o curso.

Aos professores colegas de laboratório Dr. Alcir Dafré e Dr. Carlos Peres, e ao professor Dr. Hernán Terenzi pelas revisões realizadas no desenvolvimento da tese.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo pagamento, sempre em dia da bolsa de doutorado no país, e a Agência de Cooperação Internacional do Japão (JICA) pelo curso realizado em Okinawa no Japão.

A todas as pessoas que contribuíram no desenvolvimento deste trabalho e, direta ou indiretamente, participaram da minha formação como profissional e ser humano.

Aos que acreditaram na minha capacidade, que torceram pela minha vitória e que me ajudaram de alguma maneira para a conquista de mais um sonho.

A todos vocês, fica a minha eterna gratidão.

Natura non facit saltum

(a natureza não procede a saltos)

Axioma da História Natural

“Na história da humanidade (e dos animais também) aqueles que aprenderam a colaborar e improvisar foram os que prevaleceram”

(Charles Darwin)

$C1 \cdot V1 = C2 \cdot V2$

RESUMO

Durante a produção industrial de álcool combustível, um dos fatores limitantes no processo é o estresse promovido às células de levedura pelas altas concentrações de etanol presentes no meio. Este trabalho teve por objetivo incrementar a tolerância ao etanol de uma linhagem industrial de *Saccharomyces cerevisiae* através da modificação da região promotora de dois genes: o gene *TRP1* envolvido na síntese de triptofano, ou o gene *MSN2* que codifica para um fator de transcrição que regula a resposta ao estresse geral em *S. cerevisiae*. As linhagens recombinantes foram desenvolvidas usando técnicas de engenharia genômica baseadas em PCR, para inserir o promotor forte e constitutivo P_{ADH1} na região promotora dos genes alvo. Embora a linhagem industrial utilizada (CAT-1) seja diplóide, apenas um dos alelos do gene alvo foi modificado. Após confirmação por PCR das modificações realizadas no genoma das linhagens recombinantes, a sobre-expressão dos genes foi quantificada por qRT-PCR. Os resultados mostraram que a linhagem de levedura industrial é mais tolerante ao etanol (podendo crescer em até 14% do álcool), quando comparado com uma linhagem de laboratório (nessa última 10% de etanol inibe totalmente o crescimento). Em ambas a linhagens a sobre-expressão do gene *TRP1* claramente incrementou a tolerância ao etanol. As linhagens industriais sobre-expressando o gene *MSN2*, ou uma versão truncada do gene (*MSN2-T*, sem os primeiros 48 aminoácidos), mostraram-se igualmente mais tolerantes ao etanol. A linhagem que sobre-expressa o gene *MSN2* mostrou-se também mais resistente ao estresse salino, mas mais sensível ao estresse oxidativo, enquanto que a linhagem que sobre-expressa o gene *MSN2-T* foi mais resistente a esse último estresse. A análise dos níveis intracelulares de espécies reativas de oxigênio (ROS) revelou que o estresse provocado pelo etanol aumenta significativamente os níveis de ROS nas células, sendo que ocorreu uma redução na quantidade desses compostos nas linhagens modificadas no gene *MSN2*. Em seguida, foi investigado se essa melhora no crescimento celular na presença de altas concentrações de etanol leva a produtividades mais elevadas de etanol durante a fermentação de altas concentrações (200 g/L) de sacarose, inclusive na presença de diferentes concentrações estressantes de etanol no início das fermentações. Os resultados revelaram que não ocorreram diferenças significativas entre a linhagem industrial CAT-1 e as linhagens recombinantes nos diferentes parâmetros fermentativos analisados, tanto em processos de batelada

simples quanto na batelada alimentada, com reciclo celular. O estresse alcoólico afetou principalmente o consumo dos monossacarídeos (glicose e frutose) produzidos na hidrólise da sacarose. Em conclusão, os resultados sugerem que uma maior tolerância ao etanol (através das modificações genômicas realizadas neste trabalho), não significa necessariamente uma maior produção de etanol pela linhagem industrial de *S. cerevisiae*.

Palavras-chave: Estresse alcoólico. *Saccharomyces cerevisiae*. Sobre-expressão. *TRP1*. *MSN2*.

ABSTRACT

During fuel alcohol industrial production, one of the limiting factors in the process is the stress promoted to yeast cells by high ethanol concentrations in the medium. This study aimed to improve the ethanol tolerance of an industrial *Saccharomyces cerevisiae* strain by modifying the promoter region of two genes: the *TRP1* gene involved in the synthesis of tryptophan, or the *MSN2* gene encoding for a transcription factor that regulates the general stress response in *S. cerevisiae*. The recombinant yeast strains were developed using PCR-based genomic engineering techniques, to insert the strong and constitutive P_{ADH1} promoter in the promoter region of the target genes. Although the industrial strain used (CAT-1) is diploid, only one allele of the target gene was modified. After confirmation by PCR of the changes made in the genome of the recombinant strains, gene overexpression was quantified by qRT-PCR. Our results show that the industrial yeast strain is more tolerant to ethanol (being able to grow in up to 14% alcohol), when compared to a laboratory strain (10% ethanol completely inhibited growth of these cells). In both types of strain overexpressing the *TRP1* gene clearly improved ethanol tolerance. The industrial strains overexpressing the *MSN2* gene, or a truncated version of the gene (*MSN2-T*, without the first 48 amino acids), were also more ethanol tolerant. The strain that overexpresses the *MSN2* gene was also more resistant to a salinity stress, but more sensitive to an oxidative stress, while the strain that overexpresses *MSN2-T* was more resistant to this last stress. The analysis of the intracellular levels of reactive oxygen species (ROS) revealed that stress promoted by ethanol significantly increases the levels of ROS in cells, and there was a reduction in the amount of these compounds in the strains modified in the *MSN2* gene. Afterwards, it was investigated whether this improvement in the cellular growth under high ethanol concentrations leads to higher ethanol productivity during fermentation of high (200 g/L) sucrose concentrations, even in the presence of different stressful ethanol concentrations at the beginning of fermentation. The results revealed that there were no significant differences between the industrial strain CAT-1 and the recombinant strains in the different fermentation parameters analyzed, both in simple batch and fed batch processes with cell recycle. The alcoholic stress affected mainly the consumption of monosaccharides (glucose and fructose) produced by the hydrolysis of sucrose. In conclusion, the results suggest that increased tolerance to

ethanol (through genomic modifications carried out in this work), does not necessarily mean a higher ethanol production by an industrial *S. cerevisiae* strain.

Keywords: Alcoholic stress. *Saccharomyces cerevisiae*. Overexpression. *TRP1*. *MSN2*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Um resumo simplificado dos processos de resposta ao estresse em <i>S. cerevisiae</i>	34
Figura 2 - Msn2/4 e Hsf1, moduladores primários de resposta geral ao estresse.	37
Figura 3 - Representação esquemática de Msn2 destacando os diferentes domínios.	40
Figura 4 - Um modelo de recrutamento envolvendo o fator de transcrição Msn2.	42
Figura 5 - Esquema da restauração do gene não funcional <i>trp1-289</i> pelo gene <i>TRP1</i>	48
Figura 6 - Estratégia para sobre-expressão do gene <i>TRP1</i> nas linhagens de levedura.	50
Figura 7 - Estratégia para sobre-expressão do gene <i>MSN2</i>	51
Figura 8 - Estratégia para sobre-expressão do gene <i>MSN2-T</i>	52
Figura 9 - Confirmação por PCR da inserção do módulo de sobre-expressão na região anterior ao gene <i>TRP1</i> no genoma de linhagens de <i>S. cerevisiae</i>	63
Figura 10 - Análise da expressão do gene <i>TRP1</i> por qRT-PCR.	64
Figura 11 - Confirmação por PCR da inserção do módulo de sobre-expressão na região anterior ao gene <i>MSN2</i> no genoma de linhagens de <i>S. cerevisiae</i>	65
Figura 12 - Análise da expressão do gene <i>MSN2</i> por qRT-PCR.	66
Figura 13 - Tolerância ao estresse de etanol em linhagens de laboratório e industrial com sobre-expressão do gene <i>TRP1</i> em condições microaeróbias.	68
Figura 14 - Tolerância ao estresse de etanol nas linhagens industriais com sobre-expressão do gene <i>MSN2</i> ou <i>MSN2-T</i>	70
Figura 15 - Análise da tolerância a diversos estresses pelas linhagens industriais com sobre-expressão do gene <i>MSN2</i> ou <i>MSN2-T</i>	72
Figura 16 - Nível de oxidação intracelular nas linhagens de <i>S. cerevisiae</i>	74

- Figura 17** – Fermentação em batelada de 200 g/L de sacarose com as linhagens de laboratório 77
- Figura 18** - Fermentações em Batelada em linhagens industriais CAT-1 (símbolos pretos) e NAB-1 (símbolos brancos), em meio rico YP contendo 200 g/L de sacarose na ausência ou presença de 14% ou 16% de etanol adicionado no início das fermentações. 79
- Figura 19** - Atividade específica de invertase nas linhagens de laboratório (A) e industriais (B) durante a fermentação em Batelada de 200 g/L de sacarose..... 80
- Figura 20** - Fermentações em Batelada em linhagens industriais CAT-1 (símbolos pretos), ANT-5 (símbolos cinzas) e ATT-6 (símbolos brancos), em meio rico YP contendo 200 g/L de sacarose na ausência ou presença de 12% ou 16% de etanol adicionado no início das fermentações. 83
- Figura 21** - Atividade invertase nas linhagens industriais CAT-1 (símbolos pretos), ANT-5 (símbolos cinzas) e ATT-6 (símbolos brancos) durante a fermentação em Batelada de 200 g/L de sacarose e suplementação com 12% ou 16% de etanol. 84
- Figura 22** - Análise da expressão do gene *SUC2* por qRT-PCR..... 84
- Figura 23** - Esquema que mostra alguns elementos de recrutamento do promotor *SUC2*. 86
- Figura 24** - Fermentações por Batelada Alimentada em linhagens industriais CAT-1 (símbolos pretos) e NAB-1 (símbolos brancos). 88
- Figura 25** - Fermentações por Batelada Alimentada em linhagens industriais CAT-1 (símbolos pretos), ANT-5 (símbolos cinzas) e ATT-6 (símbolos brancos). 91

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Linhagens de leveduras utilizadas.....	45
Tabela 2 – Oligonucleotídeos (iniciadores) utilizados no trabalho.	49
Tabela 3 - Rendimento e produtividade de etanol nas fermentações em batelada de 200 g/L de sacarose pelas linhagens modificadas no gene <i>TRP1</i>	78
Tabela 4 - Rendimento e produtividade de etanol nas linhagens controle e recombinantes no gene <i>MSN2</i> em fermentações em Batelada de 200 g/L de sacarose.....	82
Tabela 5 - Rendimento e produtividade de etanol em ambas as linhagens controle e recombinantes em fermentações em Batelada Alimentada de 200 g/L de sacarose (volume final).....	87

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
DNA	"deoxyribonucleic acid" (ácido desoxirribonucleico)
cDNA	"complementary DNA" (DNA complementar)
DO ₅₇₀	Densidade Óptica mensurada pela absorvância da luz em comprimento de onda de 570 nanômetros.
P.A.	Padrão Analítico - indica alto grau de pureza
PCR	"Polymerase chain reaction" (reação em cadeia da polimerase)
qRT-PCR	"Polymerase chain reaction in real time quantitative" (reação em cadeia da polimerase em tempo real quantitativo)
RNA _m	"ribonucleic acid" (ácido ribonucleico) mensageiro
rpm	rotações por minuto
PBS	"Sodium Buffer Phosphate" (Tampão fosfato de sódio)
YPD	"Yeast extract, Peptone and Dextrose" (Extrato de Levedura, Peptona e Glicose)
YPS	"Yeast extract, Peptone and Sucrose" (Extrato de Levedura, Peptona e Sacarose)
SC ^{-Drop out}	"Synthetic defined" <i>Drop out</i> (Meio sintético)
HPLC	"High Pressure Liquid Chromatography" (Cromatografia líquida de alta pressão)
DCF-DA	Diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína
AMPc	Adenosina monofostato cíclica
P _{ADHI}	Promotor do gene <i>ADHI</i> (Álcool desidrogenase)
pb	Pares de bases nitrogenada
PKA	Protein kinase A (proteína quinase A)
SGD	<i>Saccharomyces Genome Database</i>
UAS	"Upstream Activating Sequence"
VHG	"Very High Gravity" (fermentação com alta densidade)
ZF	"Zinc Finger DNA-binding domain" (domínio de ligação ao DNA)
NLS	"nuclear localization signal" (sinal de localização nuclear)
NES	"nuclear export signal" (sinal de exportação nuclear)
TAD	"transcriptional-activating domain" (domínio de ativação da transcrição)
GRAS	"generally recognised as safe"
P _{etanol}	Produtividade em etanol (g/L/h)
Y _{E/S}	Fator de, ou rendimento na, conversão de substrato a etanol, calculado no momento da obtenção máxima de etanol (g etanol / g substrato)

LISTA DE SÍMBOLOS

\approx	aproximadamente
\pm	variação de mais ou menos o valor que se segue
$^{\circ}\text{C}$	grau(s) Celsius
μg	micrograma(s)
μL	microlitro(s)
μm	micrometro(s)
g	grama(s)
g/L	grama(s) por Litro
h	hora(s)
H^+	ión de hidrogênio (próton)
M	molar
L	litro(s)
mg	miligrama(s)
mg/mL	miligrama(s) por mililitro
min	minuto(s)
mL	mililitro(s)
seg	segundo(s)
U/mg	unidade(s) por miligrama (invertase)
Δ	indica deleção (gene)
λ_{EX}	excitação de comprimento de onda
λ_{EM}	emissão de comprimento de onda

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS -----	V
RESUMO -----	IX
ABSTRACT -----	XI
LISTA DE FIGURAS -----	XIII
LISTA DE TABELAS -----	XV
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS -----	XVII
LISTA DE SÍMBOLOS -----	XIX
SUMÁRIO -----	XXI
1 INTRODUÇÃO -----	23
1.1 A IMPORTÂNCIA ECONÔMICA DO ETANOL NO BRASIL E NO MUNDO	23
1.2 PRODUÇÃO INDUSTRIAL DE ETANOL COMBUSTÍVEL NO BRASIL	24
1.3 <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i> -----	27
1.3.1 <i>Engenharia Genômica de Leveduras Industriais</i> -----	28
1.4 TOLERÂNCIA AO ETANOL POR <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i> -----	30
1.5 RESPOSTA GERAL AO ESTRESSE -----	33
1.5.1 <i>STREs e os fatores de transcrição Msn2 e Msn4</i> -----	35
1.5.2 <i>Regulação de Msn2/Msn4</i> -----	36
1.5.3 <i>Estrutura de Msn2</i> -----	40
1.6 OBJETIVOS-----	44
1.6.1 <i>Objetivo Geral</i> -----	44
1.6.2 <i>Objetivos Específicos</i> -----	44
2 MATERIAL E MÉTODOS -----	45
2.1 LINHAGENS UTILIZADAS E MEIOS DE CULTURA-----	45
2.2 MÉTODOS DE BIOLOGIA MOLECULAR -----	46
2.2.1 <i>Extração de DNA genômico</i> -----	46
2.2.2 <i>Reação em Cadeia de Polimerase (PCR – Polymerase Chain Reaction)</i> -----	46
2.2.3 <i>Eletroforese em Gel de Agarose</i> -----	47
2.2.4 <i>Obtenção dos Módulos de Sobre-expressão</i> -----	47
2.2.4.1 <i>Módulo de sobre-expressão do gene TRP1</i> -----	48
2.2.4.2 <i>Módulos de sobre-expressão dos genes MSN2 e MSN2-Truncado</i> -----	51
2.2.5 <i>Transformação das Linhagens de Saccharomyces cerevisiae</i> ---	52
2.2.6 <i>Análise de Expressão Gênica por PCR quantitativo em Tempo Real (qRT-PCR)</i> -----	53

2.3 CULTIVOS CELULARES -----	54
2.3.1 <i>Pré-cultivo</i> -----	54
2.3.2 <i>Multiplicação das linhagens de S. cerevisiae para uso experimental</i> -----	54
2.3.3 <i>Determinação da Concentração Celular</i> -----	54
2.4 CRESCIMENTOS EM MICROESCALA-----	55
2.5 CRESCIMENTOS EM PLACAS DE PETRI -----	55
2.6 FERMENTAÇÕES -----	56
2.6.1 <i>Fermentação em Batelada Simples</i> -----	56
2.6.2 <i>Fermentação em Batelada Alimentada</i> -----	56
2.6.3 <i>Determinação da Produtividade do Processo Fermentativo</i> ---	57
2.6.4 <i>Determinação do Fator de Rendimento do Processo Fermentativo</i> -----	57
2.7 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA PRESSÃO -----	57
2.8 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE INVERTASE EXTRACELULAR -----	58
2.9 AVALIAÇÃO DO NÍVEL DE OXIDAÇÃO INTRACELULAR -----	58
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO -----	61
3.1 OBTENÇÃO DE LINHAGENS RECOMBINANTES DE <i>S. CEREVISIAE</i> POR ENGENHARIA GENÔMICA-----	61
3.1.1 <i>Obtenção de linhagens recombinantes no gene TRP1</i> -----	62
3.1.2 <i>Obtenção de linhagens recombinantes no gene MSN2</i> -----	65
3.2 ANÁLISE DA TOLERÂNCIA AO ETANOL PELAS LINHAGENS RECOMBINANTES -----	67
3.3 DETERMINAÇÃO DA RESISTÊNCIA A DIFERENTES CONDIÇÕES DE ESTRESSE PELAS LINHAGENS MODIFICADAS NO GENE <i>MSN2</i> -----	70
3.4 ANÁLISE DA PERFORMANCE FERMENTATIVA DAS LINHAGENS RECOMBINANTES -----	76
3.4.1 <i>Fermentações em Batelada Simples</i> -----	76
3.4.2 <i>Fermentações em Batelada Alimentada</i> -----	86
4 CONCLUSÕES -----	93
REFERÊNCIAS -----	95

1 INTRODUÇÃO

1.1 A Importância Econômica do Etanol no Brasil e no Mundo

Após a eclosão da crise do petróleo na década de 1970, o Brasil implementou o programa Proálcool como uma alternativa ao choque causado pela disparada do preço do petróleo, com o objetivo de diminuir a dependência dos combustíveis fósseis em sua matriz energética (COELHO, 1999; GOLDEMBERG, 2008). Essa iniciativa assegurou o Brasil, com cerca de 40 anos de experiência, à frente de outros países na produção de bioetanol de primeira geração (1G), e uma posição privilegiada no setor de combustíveis. Embora hoje em dia o bioetanol de cana-de-açúcar substitua $\approx 1\%$ da gasolina usada no mundo, o potencial dessa tecnologia está longe de ser esgotado. Ganhos de produtividade e expansão geográfica em áreas maiores podem permitir à produção de etanol, a partir da cana-de-açúcar, substituir até $\approx 10\%$ da demanda mundial de gasolina (STAMBUK et al., 2008; GOLDEMBERG; GUARDABASSI, 2010; AMORIM et al., 2011).

Estados Unidos e Brasil são responsáveis por 70% da produção de etanol combustível no mundo (AMORIM et al., 2011). No processo norte americano de produção do etanol combustível é utilizado milho como matéria prima, que para formar o mosto utilizado no processo fermentativo é necessário que os grãos sejam triturados e misturados com α -amilases sob alta temperatura. Portanto, a hidrólise do amido dos grãos de milho é realizado antes de iniciar o processo de fermentação, liberando assim, açúcares fermentáveis (maltose, maltotriose e glicose) às células de levedura. Em comparação à produção brasileira de etanol combustível, o processo norte americano proporciona menores rendimentos devido ao maior tempo de fermentação necessária, além de não empregar reciclo das células de levedura no processo. Consequentemente, o etanol norte americano apresenta maior custo de produção e menor competitividade frente ao etanol brasileiro (WHEALS et al., 1999; SCHUBERT, 2006; MUSSATTO et al., 2010; AMORIM et al., 2011). Na verdade, o etanol combustível brasileiro de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) é altamente competitivo quando comparado com os processos de produção de outras culturas (por exemplo, milho e beterraba), assim como apresenta o maior percentual de redução de emissão de gases, um saldo maior de energia e rendimento por hectare, além dos custos de produção serem mais baixos (SÁNCHEZ; CARDONA, 2008; LEAL; WALTER, 2010; GAROMA et al., 2012).

De acordo com a Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB, 2014), a produção de cana-de-açúcar na safra de 2013/2014 atingiu ≈ 659 milhões de toneladas no Brasil, levando à produção de ≈ 38 milhões de toneladas de açúcar e ≈ 28 bilhões de litros de etanol. No Brasil, quase 65% de todos os veículos leves brasileiros podem funcionar exclusivamente em etanol combustível (UNICA, 2014). Obviamente, a realização de tais números impressionantes só é possível porque o Brasil apresenta vantagem por suas características de solo, condições climáticas, e vasta área de terra. Os canaviais no Brasil estão concentrados em duas regiões: a Centro-Sul, que produz cerca de 90% de todo o açúcar e etanol, e o Norte-Nordeste que é responsável pelos outros 10% (CONAB, 2014). O agronegócio no Brasil é responsável por $\approx 20\%$ do Produto Interno Bruto (PIB) brasileiro e gera 14% dos empregos totais do país, sendo 6% devido à cana-de-açúcar (BRASIL, 2012). Outros países como Japão, Austrália e a União Europeia já ensaiam programas com base na utilização do álcool, estimulados por preocupações ambientais (UNICA, 2014).

O cenário atual da produção, consumo e estoque de energia no mundo mostra que a economia global ainda é muito dependente dos combustíveis fósseis. Nesse cenário, o etanol tem se destacado como um combustível renovável e pouco poluente (ANDRIETTA et al., 2007; GOLDEMBERG, 2008). Embora as tecnologias de obtenção de etanol a partir de cana-de-açúcar e milho, que são as duas principais fontes de carboidratos fermentescíveis empregadas pelas indústrias, tenham sido otimizadas e hoje rendam altas concentrações de etanol por hectare com custo competitivo, a consolidação do etanol como combustível do futuro deve passar pelo desafio de aumentar ainda mais a produtividade sem aumentar o seu custo, e de forma que suas culturas não avancem sobre outras culturas agrícolas, o que impactaria a produção de alimentos.

1.2 Produção Industrial de Etanol Combustível no Brasil

Desde 1975, o rendimento total da indústria brasileira de etanol combustível tem aumentado constantemente em torno de 3-4% ao ano, atingindo hoje mais de 6.500 litros de etanol por hectare de cana-de-açúcar. Esse aumento foi possível devido a várias melhorias agrícolas, incluindo a seleção de novas variedades de cana-de-açúcar com aumento da quantidade de biomassa de cana-de-açúcar por hectare. Embora a quantidade de açúcares totais por tonelada de cana-de-açúcar tenha aumentado significativamente durante os primeiros anos, nos últimos 15 anos, parece ter chegado a um patamar em torno de 140 kg de açúcar

por tonelada de cana-de-açúcar (DELLA-BIANCA et al., 2013). Desse modo, há uma necessidade de melhoria da produção de sacarose e acumulação pela planta de cana-de-açúcar, uma característica que está sob investigação no Brasil (LAM et al., 2009; WACLAWOVSKY et al., 2010). Esta tendência para obtenção de maior quantidade de sacarose por tonelada de biomassa de cana-de-açúcar reflete diretamente na quantidade de etanol produzido a partir de cada tonelada de cana-de-açúcar, uma vez que a fermentação e os processos de destilação também atingiram uma eficiência industrial elevada com um aparente platô nos últimos anos de aproximadamente 80 litros de etanol por tonelada de cana-de-açúcar (DELLA-BIANCA et al., 2013). Assim, processos que venham otimizar a produção de etanol devem trazer soluções para minimizar impactos ambientais e problemas energéticos, entre outras vantagens (GOLDEMBERG, 2007; 2008).

No Brasil, o setor sucroenergético realiza a produção de etanol a partir do processamento de cana-de-açúcar, além de realizar o beneficiamento do açúcar refinado. Após a colheita, a planta é moída para a extração do caldo rico em açúcares, onde: 78-86% é composto de água, 10-20% de sacarose, 0,1-2,0% de açúcares redutores, 0,3-0,5% de cinzas e 0,5-1,0% de compostos nitrogenados (LIMA et al., 2001). O caldo extraído é processado para a obtenção do açúcar refinado ou pode ser utilizado para fermentação na produção do etanol combustível. Com o beneficiamento do açúcar é gerado um subproduto, o melaço, que ainda apresenta grande concentração de açúcar, podendo ser também aproveitado no processo fermentativo. Portanto, o mosto utilizado na obtenção do etanol brasileiro é composto de caldo de cana-de-açúcar, de melaço ou da mistura de ambos, contendo ≈ 180 g/L de açúcares totais (WHEALS et al., 1999; ZANIN et al., 2000; AMORIM et al., 2011).

O sistema de fermentação em batelada alimentada é o processo fermentativo aplicado na maioria dos casos. A fermentação é realizada com elevada concentração de células de levedura (8-15% V/V), medida que proporciona ciclos fermentativos de 6 a 10 horas. Após o fim desse período de fermentação, o mosto fermentado (ou vinho produzido) é decantado, centrifugado e enviado para a destilação do etanol, enquanto o tratamento das leveduras é feito com ácido sulfúrico (pH 2,0 - 2,5) por 2 a 3 horas, para eliminar os micro-organismos que contaminam a fermentação (WHEALS et al., 1999, AMORIM et al., 2011). Isso é necessário porque a obtenção do mosto e a condução do processo fermentativo em condições não estéreis favorecem a proliferação de micro-organismos contaminantes, provocando perdas significativas na produtividade (LIBERAL et al., 2005; SCHELL et al., 2007; BASÍLIO

et al., 2008). Após tratamento com ácido sulfúrico, as células são reutilizadas em dornas de fermentação seguintes, onde um novo ciclo fermentativo é realizado com a colocação de um volume de mosto não fermentado. Esse procedimento é repetido várias vezes, enquanto durar o período de safra da cana-de-açúcar, ao longo de 200 a 230 dias (ZANIN et al., 2000; ANDRIETTA et al., 2007; AMORIM et al., 2011).

Outros fatores limitantes no processo fermentativo são os efeitos inibitórios causados pela alta concentração de substrato (pressão osmótica), ou de produto (etanol) no mosto de fermentação. Na batelada alimentada o efeito inibitório do substrato pode ser neutralizado, pois a vazão do meio de alimentação na dorna pode ser controlada, mantendo a concentração de substrato durante a fermentação em níveis baixos. Por outro lado, o etanol é acumulado no meio de cultura, possibilitando atingir alta produtividade, sendo uma vantagem em relação ao processo em batelada simples. Em trabalhos anteriores foi observado que um aumento na produtividade de etanol entre 10-14% pode ser atingido com a adição de sacarose em concentrações decrescentes linear ou exponencial (ECHEGARAY et al., 2000). De acordo com Cot et al. (2007), esse processo de fermentação em batelada alimentada pode ser caracterizado por duas fases distintas de produção de etanol. A primeira fase corresponde à formação de produtos diretamente acoplados ao metabolismo energético, com uma velocidade de produção de etanol específica correlacionada com a velocidade de crescimento específico. Na segunda fase, ocorre que a produção de etanol é, então, “desconectada” do crescimento celular (denominada fase de desacoplamento). O aparecimento dessa desconexão tem relação com a maior concentração de etanol no meio (≈ 100 g/L), e a extensão da fase de desacoplamento mostrou ser determinante para a produção de altas concentrações de etanol. Além disso, a elevada variabilidade na produção de etanol pode ser atribuída a diferenças na capacidade de culturas de leveduras para desencadear corretamente importantes eventos metabólicos no início da fase de desacoplamento para manter a atividade das células elevada (COT et al., 2007).

Durante a fermentação, o passo-chave na produção de etanol, a sacarose (ou, glicose e frutose) é convertida em etanol pela levedura *S. cerevisiae* em dornas que contêm milhões de litros. Quando não há grandes problemas operacionais (como chuva, contaminação e falta de energia), rendimentos tão elevados como 93% da conversão estequiométrica (0,511 g etanol/g equivalente de hexose) podem ser alcançados (DA SILVA-FILHO, 2005). Porém, o rendimento industrial médio no Brasil tem diminuído um pouco durante a última década,

devido à adequações socioambientais importantes. Uma vez que mais da metade do custo final do etanol é devido ao custo da cana-de-açúcar, qualquer aumento no rendimento já representaria grandes ganhos econômicos. Por exemplo, para uma produção anual de 30 bilhões de litros de etanol, um aumento de 1% no rendimento da fermentação iria permitir a produção de 300 milhões de litros adicionais a partir da mesma quantidade de matéria-prima, ou, em outras palavras, a partir da mesma área de cultivo (DELLA-BIANCA et al., 2013). Nesse sentido, a maior tolerância de leveduras ao etanol pode proporcionar uma maior conversão dos açúcares fermentescíveis, bem como maior produtividade de etanol.

1.3 *Saccharomyces cerevisiae*

Além de sua aplicação na indústria de alimentos e combustíveis, *S. cerevisiae* é um organismo que tem desempenhado um papel importante na expansão do conhecimento básico de fisiologia da célula eucariótica em pesquisa científica (GRIGORIEV et al., 2011). Os conhecimentos de biologia molecular e genética da *S. cerevisiae* se encontram bem avançados, tendo seu genoma inteiro elucidado e publicamente disponibilizado em 1996 (GOFFEAU et al., 1996), fazendo com que sua manipulação genética seja relativamente simples e rápida (CLARE, 1995). As leveduras são fungos unicelulares de reprodução quase tão rápida quanto bactérias, com uma maquinaria de tradução típica de eucariotos e com um genoma que é apenas 1/100 daquele de mamíferos (GRIFFITHS et al., 2009). Estão em andamento pesquisas visando à produção de linhagens melhoradas da levedura *S. cerevisiae* com características desejáveis para produção de etanol combustível.

No Brasil, as linhagens de leveduras mais utilizadas na produção de etanol pelas indústrias são PE-2 e CAT-1, porque elas têm capacidades notáveis para competir com as linhagens nativas e para sobreviver e dominar as dornas durante o processo de fermentação industrial. No período da safra 2007/2008, as linhagens PE-2 e CAT-1 foram utilizadas em cerca de 150 destilarias, o que representou cerca de 60% do etanol combustível produzido no Brasil (BASSO et al., 2008). A linhagem industrial CAT-1 foi isolada pela Fermentec Ltda em 1998/1999 na usina VO Catanduva localizada no Estado de São Paulo, em processos industriais de fermentações em batelada alimentada e contínua. Essas linhagens apresentam características essenciais para a sobrevivência em condições de estresse celular em meio industrial:

como resistência aos ciclos celulares, altas temperaturas, alta concentração de etanol, estresse osmótico, variações de pH e competição com bactérias e leveduras selvagens, com muitos desses efeitos agindo sinergicamente (WHEALS et al., 1999; BASSO et al., 2008; AMORIM et al., 2011). As leveduras isoladas do processo fermentativo são geralmente diplóides, característica apontada como responsável por tornar esses micro-organismos mais resistentes às condições extremas e menos susceptíveis a mutação, ao contrário das linhagens de laboratório, que são haplóides (FEREA et al., 1999; LANDRY et al., 2006; BASSO et al., 2008; ARGUESO et al., 2009).

Como descrito anteriormente, as linhagens de *S. cerevisiae* são os micro-organismos mais tolerantes ao etanol dentre os conhecidos na natureza, podendo proliferar e/ou fermentar em meios contendo 14-16% (V/V) de etanol. Tendo em vista a habilidade dessa levedura de produzir etanol e sua alta tolerância ao mesmo, foi proposto que essa característica peculiar permitiria inibir o crescimento de organismos susceptíveis contaminantes, levando uma certa vantagem competitiva nesses ambientes ricos em açúcar (VERSTREPEN et al., 2003; PIŠKUR et al., 2006). Na fermentação do caldo de cana-de-açúcar ela utiliza diferentes fontes de carbono, como os monossacarídeos redutores glicose e frutose, e o dissacarídeo não-redutor sacarose (FLORES et al., 2000; LIMA et al., 2001).

Diversos grupos de pesquisa vêm estudando o comportamento da linhagem industrial diplóide CAT-1 em laboratório e sobre diferentes linhas de pesquisa, como a tolerância a diversos fatores de estresse (DELLA-BIANCA; GOMBERT, 2013; PAIS et al., 2013), termotolerância (COSTA et al., 2014), transcriptoma (BROWN et al., 2013) etc. Experimentos de sacarificação e fermentação simultâneas (*Simultaneous Saccharification and Fermentation - SSF*), revelaram que linhagens industriais de *S. cerevisiae* (CAT-1 e PE-2) têm o potencial para produzir etanol celulósico (de segunda geração – 2G), sendo que o rendimento de etanol apresentado foi semelhante aos rendimentos de linhagens termotolerantes. Por fim, as linhagens industriais são mais tolerantes ao etanol e as variações de temperatura por já serem adaptadas às condições industriais (COSTA et al., 2014).

1.3.1 Engenharia Genômica de Leveduras Industriais

Na biotecnologia industrial existe um esforço contínuo para o aperfeiçoamento dos processos fermentativos focando tanto a seleção de micro-organismos quanto o melhoramento das características próprias

dos processos. Entretanto, nas últimas décadas, a manipulação de genomas de micro-organismos vem sendo amplamente empregada para a modificação de linhagens de leveduras. A engenharia genômica, definida como um aperfeiçoamento racional dos processos celulares pela introdução de modificações genéticas no cromossomo do organismo via engenharia genética, apresenta-se como ferramenta fundamental para alcançar processos mais eficientes (BAILEY, 1991).

As linhagens de leveduras utilizadas industrialmente são caracterizadas pela grande diversidade genômica, com alto grau de polimorfismo cromossômico (RACHIDI et al., 1999). A engenharia genômica de linhagens industriais ainda não é amplamente aplicada, porém em linhagens de laboratório de *S. cerevisiae* essa prática é rotineiramente empregada. A levedura CAT-1 foi isolada do ambiente de destilaria, sendo uma levedura mais robusta e a linhagem mais utilizada até o momento para a produção de bioetanol. Ao final do ano de 2012, o estudo de linhagens selvagens de leveduras ganhou um novo paradigma, quando pesquisadores anunciaram a conclusão do sequenciamento do genoma da levedura industrial CAT-1 (BABRZADEH et al., 2012). O conhecimento do genoma de leveduras utilizadas industrialmente possibilita a utilização de técnicas modernas de engenharia metabólica e engenharia genômica, visando o aprimoramento do processo industrial de fermentação, e consequentemente obter maior produção de etanol (BABRZADEH et al., 2012). Como alternativa para a maior produção de etanol no Brasil, a modificação genética de leveduras industriais pode permitir o aumento na produção de bioetanol a partir de sacarose, independente de investimentos para modificações físicas e instrumentais nas usinas ou o aumento de áreas de cultivo.

O referido processo de modificação genética é obtido pela técnica denominada engenharia genômica, onde através da técnica de PCR (*polymerase chain reaction*) são produzidos fragmentos de DNA linear contendo genes e sequências promotoras de interesse. Esses fragmentos de DNA linear devem por eventos de recombinação homóloga, inserir-se no cromossomo e/ou sequência alvo do genoma, levando à inserção das sequências no genoma (LONGTINE et al., 1998; PETRACEK; LONGTINE, 2002). Essa modificação direta no cromossomo da levedura apresenta as vantagens de estabilidade genética através das gerações, como consequência da multiplicação celular, não sendo necessário o uso de meios de cultivo seletivos para garantir a permanência da modificação na população de leveduras.

Diversas aplicações são permitidas a partir da técnica de recombinação homóloga, como a introdução de uma mutação sítio dirigida na sequência do gene alvo, a deleção de genes específicos, e a modulação da sua expressão colocando os genes alvo sobre o controle de promotores (p.ex. P_{ADHI}) fortes e constitutivos (PETRACEK; LONGTINE, 2002). No caso específico desse trabalho, foi utilizado o promotor constitutivo P_{ADHI} para transformar o genoma da levedura industrial CAT-1, utilizando técnica baseada em PCR para amplificação de módulos de sobre-expressão e eventos de recombinação homóloga para a inserção desses módulos no genoma das leveduras. A recombinação homóloga empregada é chamada de *Short Flanking Homology* - SFH, sendo capazes de se integrar de forma específica, e eficiente, no genoma das leveduras (GÜLDENER et al., 1996; 2002; PETRACEK; LONGTINE, 2002).

1.4 Tolerância ao Etanol por *Saccharomyces cerevisiae*

A levedura *S. cerevisiae* permanece o principal produtor industrial de etanol (ZALDIVAR et al., 2001), por ser um micro-organismo geralmente reconhecido como seguro (GRAS), que pode produzir por fermentação até 20% (V/V) de etanol a partir de fontes de carbono. No entanto, uma limitação importante ocorre no processo industrial, que é a inibição do processo de fermentação por acumulação de etanol (CASEY; INGLEDEW, 1986). Os efeitos tóxicos do etanol em *S. cerevisiae* são relativamente bem conhecidos. Incluem a modificação da composição da membrana lipídica, a redução da atividade metabólica, diminuindo a absorção de glicose e amônio, e a indução de respostas ao estresse (LEÃO; VAN UDEN, 1982; VAN UDEN, 1985; ALEXANDRE et al., 1994; 2001).

O etanol é tóxico para as células, causando danos na membrana celular e em proteínas funcionais, gradualmente reduzindo a viabilidade celular e induzindo a morte celular durante a fermentação (THOMAS et al., 1978; D'AMORE; STEWART, 1987; D'AMORE et al., 1990). Um dos efeitos fisiológicos do etanol é o aumento na fluidez da membrana plasmática, com consequente desarranjo da estrutura molecular da membrana. Em resposta, as células das leveduras tentam alterar a composição da membrana para resistir a fluidização e estabilizá-la (DING et al., 2009). O etanol inibe a absorção de glicose e outros nutrientes por *S. cerevisiae*. O efeito inibitório pode ser modulado alterando a composição lipídica da membrana plasmática, o que indica interferência do etanol com o transporte de membrana (THOMAS et al.,

1978). O potencial da membrana e o gradiente de prótons podem, em princípio, ser afetados por álcoois ou por meio da inibição da extrusão ativa de prótons, ou através do aumento passivo do fluxo de prótons ou por uma combinação dos dois mecanismos (LEÃO; VAN UDEN, 1984).

A alta concentração de etanol no meio faz as células perderem a sua integridade de membrana podendo levar até uma perda massiva de metabólitos intracelulares. Em condições experimentais descritas por Cot et al. (2007), o vazamento de metabólitos foi particularmente importante acima de 10% (V/V) de etanol no meio. Uma observação similar foi relatada por Salgueiro et al. (1988), que também encontraram uma liberação de aminoácidos e compostos no meio de cultura após a incubação de células em glicose com 18% de etanol. O etanol geralmente adicionado à cultura de leveduras, em concentrações até 12%, elimina o gradiente de concentração através da membrana plasmática e inibe sistemas de transporte ativos (LEÃO; VAN UDEN, 1984; JONES; GREENFIELD, 1987; D'AMORE et al., 1990; WALKER-CAPRIOGLIO et al., 1990; ALEXANDRE et al., 1998). Da mesma forma, o etanol causa uma potente ativação na membrana plasmática por H^+ -ATPase, com um efeito ótimo em uma concentração de etanol de 6-8% (V/V), provavelmente como uma compensação para o comprometimento do potencial transmembrana (MONTEIRO; SA-CORREIA, 1998; COT et al., 2007).

Entre os vários fatores de estresse que as células de levedura encontram durante a fermentação, a inibição por etanol e a pressão osmótica são as condições adversas mais importantes (INGRAM; BUTTKE, 1984; BIRCH; WALKER, 2000; QUEROL et al., 2003), especialmente em fermentação com alta densidade (*very high gravity* - VHG), onde as condições em que as células de levedura crescem são de altas concentrações de açúcares (250 g/L), para atingir maior produção de etanol (15% V/V). A fermentação em VHG pode se mostrar promissora para a produção de etanol combustível, devido à sua vantagem pela economia de energia mais ao final do processo, por possibilitar redução de gastos com a destilação, e a multi-*evaporação* para o tratamento de resíduos da destilação (THOMAS; INGLEDEW, 1992; WANG et al., 1999; BAI et al., 2004; 2008; PEREIRA et al. 2011). Por outro lado, a fermentação VHG impõe pressões severas sobre as células de levedura, ou seja, a elevada pressão osmótica no início do processo e a forte inibição de etanol durante a fase final de produção. Essa tecnologia não apresenta resultados satisfatórios na produção de etanol a partir da cana-de-açúcar, pois ocorre queda do rendimento

fermentativo conforme a concentração de sacarose é aumentada (JONES et al., 1994; TAKESHIGE; OUCHI, 1995). A perda de viabilidade celular durante a fermentação em VHG representa grande desafio para a produção eficiente de etanol combustível, e, portanto, a melhoria da tolerância ao etanol pelas células de levedura é imprescindível (ZHAO; BAI, 2009).

Na busca por um maior conhecimento molecular sobre a tolerância das células de leveduras ao estresse de etanol, muitos trabalhos têm utilizado coleções de linhagens com genes deletados dos seus genomas, na procura tanto de genes ditos como essenciais para o crescimento em exposição ao etanol (FUTIJA et al., 2004; VAN VOORST et al., 2006; KAMISAKA et al., 2006), quanto genes envolvidos no aumento da tolerância a altas concentrações de etanol (YAZAWA et al., 2007). Uma levedura “etanol-tolerante” permitiria, hipoteticamente, reduzir o tempo de fermentação, levando a um aumento na produtividade de etanol (JONES, 1989). No entanto, a elucidação do mecanismo fundamental para se obter uma maior tolerância ao etanol em células de levedura é muito complexo, envolvendo mais de 200 genes nas diferentes linhagens testadas (KUBOTA et al., 2004).

Por outro lado, Yazawa et al. (2007) conseguiram identificar dois genes envolvidos na tolerância ao etanol, *ura7Δ* e *gal6Δ*, com o critério de rápido crescimento na presença de 8% de etanol, através de uma seleção de linhagens com genes deletados do seu genoma, para identificar mutantes “etanol-tolerantes”, além de caracterizar a composição lipídica, capacidade fermentativa e viabilidade celular dessas linhagens. Yoshikawa et al. (2009) em trabalho semelhante, identificaram mais dois genes, que ao serem deletados proporcionavam maior tolerância ao etanol. É o caso dos genes *cyb5Δ* e *sfl1Δ*, onde o primeiro está envolvido na biossíntese de lipídeos e esteróis e o segundo relacionado com a floculação e resposta ao estresse.

Hu et al. (2005) constataram que quando células de leveduras eram expostas a 20% (V/V) de etanol todas as células morriam. No entanto, 57% das células permaneceram viáveis quando à solução de etanol foi acrescentado três aminoácidos: isoleucina, metionina e fenilalanina. Em trabalho de Takagi et al. (2005) foi observada a contribuição da prolina no aumento da tolerância das células na presença de etanol. Hirasawa et al. (2007) verificaram que a sobre-expressão dos genes envolvidos na biossíntese de triptofano (*TRP1-TRP5*) proporcionaram um aumento da tolerância ao estresse de etanol (5% V/V) em leveduras de laboratório. Tolerância a altas concentrações

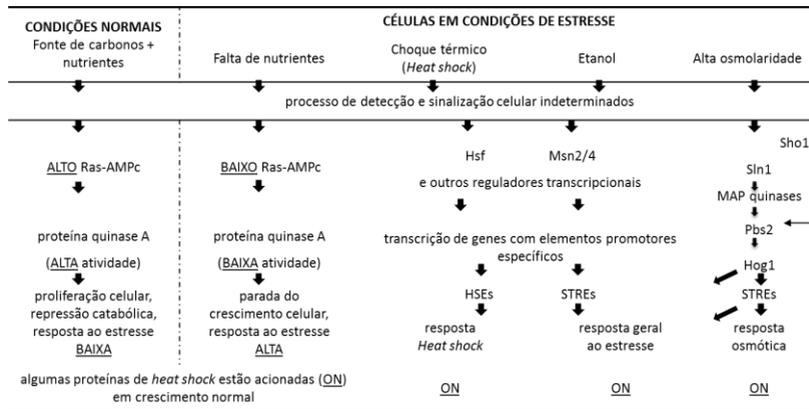
de etanol é uma das características mais desejáveis na indústria, portanto, isolar mutantes tolerantes ao etanol poderia ter aplicação direta na indústria (YAZAWA et al., 2007).

1.5 Resposta Geral ao Estresse

Micro-organismos têm a capacidade de desenvolver diferentes estratégias para a adaptação e sobrevivência em condições de estresse, como a regulação da expressão gênica e a modificação pós-transcricional de proteínas (ABE et al., 2009; ARAKI et al., 2009). Durante o processo fermentativo, as leveduras são expostas a diversas fontes estressantes como pressão osmótica, oxidativa, térmica e altas concentrações de etanol, afetando principalmente as estruturas celulares, como membranas, e diferentes macromoléculas, especialmente os lipídios, proteínas e ácidos nucleicos, os quais sofrem modificações estruturais que afetam seu funcionamento. Essas condições de estresse interferem dramaticamente no processo fermentativo industrial para a produção de etanol (ESTRUCH, 2000; HOHMANN, 2002; DING et al., 2009). Por outro lado, sabe-se que a exposição de células de levedura em uma forma leve de estresse aumenta significativamente a sua capacidade de lidar com um choque mais grave de um tipo diferente de estresse (LEWIS et al., 1995; PARK et al., 1997). Além disso, as células que crescem sob a limitação da disponibilidade de nutrientes são conhecidas por adquirir tolerância a uma série de condições de estresse. Essas observações indicam que a levedura *S. cerevisiae* tem um mecanismo global de aquisição de tolerância ao estresse (Figura 1), que protege as células de diferentes condições de estresse (RUIS; SCHÜLLER, 1995; MAGER; KRUIJFF, 1995; ATTFIELD, 1997).

O termo resposta geral ao estresse tem sido frequentemente interpretado com o significado de que a célula expressa toda uma bateria de mecanismos de proteção de estresse sob uma determinada condição de estresse, porque um tipo de estresse pode aumentar a probabilidade de que outros fatores de estresse possam vir a ocorrer (RUIS; SCHÜLLER, 1995). Embora isso possa ser uma interpretação plausível, Hohmann (2002) argumenta que a resposta geral ao estresse reflete exatamente as necessidades de resposta da célula sob quaisquer condições ambientais adversas.

Figura 1 - Um resumo simplificado dos processos de resposta ao estresse em *S. cerevisiae*



Fonte: Bücker (2014), modificado de Attfield (1997).

Os genes cuja expressão é regulada em condições de estresse, pertencem a três classes: (i) produção de proteína, (ii) proteção celular aos danos oxidativos e desnaturação de proteínas, e (iii) enzimas do metabolismo redox e de carboidratos (GASCH et al., 2000; REP et al., 2000; CAUSTON et al., 2001). Essa interpretação sobre a regulação de genes em condições de estresse, pode ser simplificada e também tendenciosa, pois os genes atualmente caracterizados podem não estar representados de uma forma geral, do conjunto de genes que regulam o estresse. Em todo caso, uma desaceleração na velocidade de proliferação ou mesmo uma parada temporária torna-se necessário, diminuindo a produção de proteínas e ajustando o metabolismo para uma demanda biosintética menor. Danos em proteínas são prováveis que ocorram em uma ampla variedade de condições de estresse e, portanto, faz sentido que as células produzam um conjunto de *chaperonas* em condições estressantes (HOHMANN, 2002). Significativas mudanças de expressão ocorrem no metabolismo de carbono, alterando o conjunto de isoenzimas e aumentando a capacidade de produção de glicerol e trealose para fins de proteção, e glicogênio como reserva. Os ajustes metabólicos tendem incluir a estimulação da respiração e conseqüentemente, alterações no metabolismo redox para a proteção contra espécies reativas de oxigênio (HOHMANN, 2002; TORRE-RUIZ et al., 2010).

Estão envolvidos na resposta geral ao estresse uma série de eventos relacionados, como a rápida síntese de moléculas de proteção e

a ativação de sinais que induzem eventos secundários, como o engatilhamento de atividades enzimáticas pré-existentes e a transcrição de genes que codificam fatores de proteção. As diferentes habilidades que as leveduras apresentam de resistir às condições de estresse durante a produção de etanol, podem determinar suas propriedades fermentativas e estabelecer critérios para a seleção de futuras leveduras industriais (IVORRA et al., 1999; BASSO et al., 2008; TEIXEIRA et al., 2009).

1.5.1 STREs e os fatores de transcrição Msn2 e Msn4

Os Elementos de Resposta ao Estresse (ou *stress-responsive element* - STRE) são uma sequência funcional de 5-pb em ambas as orientações (5'-CCCCT-3' ou 5'-AGGGG-3'). O elemento regulador dessa via "geral" de resposta ao estresse foi originalmente identificado como uma sequência Hsf1 (*heat shock factor protein 1*) independente nos promotores do gene de resposta ao dano de DNA (*DDR2*) e ao gene de resposta ao estresse de nutrientes (*CTT1*) (KOBAYASHI; McENTEE, 1991; WIESER et al., 1991). Análises de variantes mutacionais indicam que uma alteração de sequência dentro do elemento CCCCT elimina completamente a eficácia reguladora do STRE, enquanto as alterações de bases em sequências flanqueadoras e uma modulação do espaçamento entre os elementos só reduzem ligeiramente a resposta transcricional (TREGGER et al., 1998). STRE é capaz de ativar a expressão de genes em resposta a uma variedade de estímulos nocivos, incluindo o estresse oxidativo, limitação de nutrientes, pH baixo, a exposição ao etanol e estresse osmótico (KOBAYASHI; McENTEE, 1993; MARCHLER et al., 1993; SCHÜLLER et al., 1994). Os genes conhecidamente regulados pela STRE incluem *CTT1*, codificando a catalase citosólica; *DDR2*, envolvido na reparação de danos ao DNA; *HSP12* codificando uma proteína de choque térmico; *CYC7*, que codifica o citocromo-c; *SOD2*, que codifica uma superóxido dismutase mitocondrial; *UBI4*, codificando poliubiquitina; *TPS1/2*, que codifica as enzimas envolvidas na biossíntese de trealose; e *GPD1*, que codifica uma enzima necessária para a síntese do osmoprotetor glicerol. Um grande número de outros genes, potencialmente envolvidos na resposta geral ao estresse, tem sido encontrados por conter vários STREs nas suas regiões promotoras (TOONE; JONES, 1998).

Os fatores de transcrição Msn2/Msn4 ativam os genes que contêm o elemento STRE de resposta ao estresse (MARTÍNEZ-

PASTOR et al., 1996; SCHMITT et al., 1996; GASCH et al., 2000; TORRE-RUIZ et al., 2010). *MSN2* foi inicialmente identificado como o supressor de múltiplas cópias da proteína quinase *SNF1* mutante sensível à temperatura (*multicopy suppressor of temperature-sensitive protein kinase SNF1 mutant*) e contém dois motivos de dedo de zinco do tipo Cys₂His₂, próximo a cauda C-terminal, que apresentam relação com os repressores de levedura Mig1 e Rgm1. O gene *MSN4* é semelhante ao gene *MSN2*, com 41% de identidade de sequência de aminoácidos entre eles (ESTRUCH; CARLSON, 1993; ESTRUCH, 2000). *MSN2* é o fator dominante dos dois (SCHMITT; McENTEE, 1996). *MSN2/4* são regulados pela fase de crescimento e estado nutricional; isto é, induzida após a mudança diáuxica ou em células em fase final estacionárias/quiescentes (TROTT; MORANO, 2003).

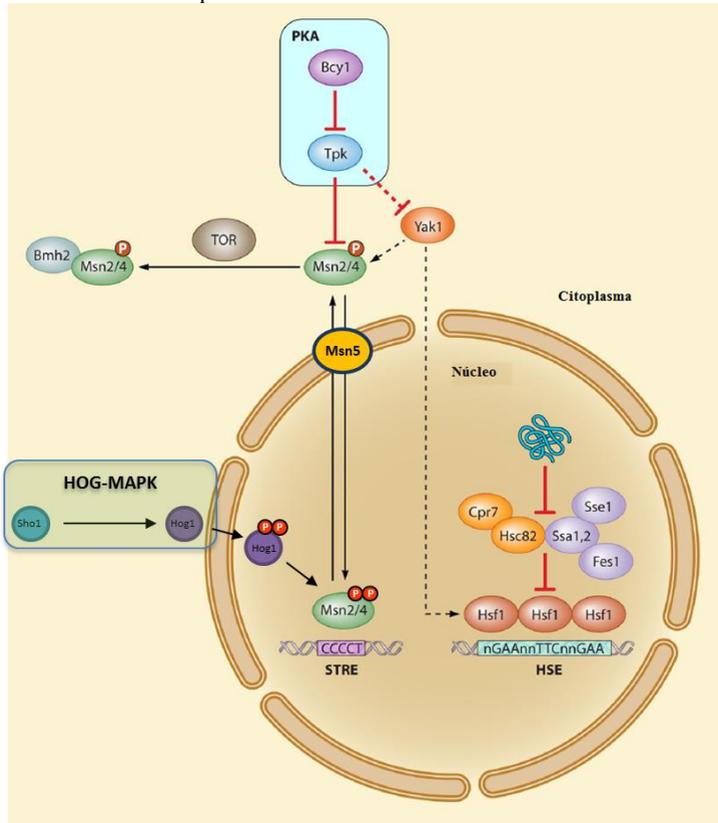
1.5.2 Regulação de Msn2/Msn4

Enquanto a proteína quinase A (PKA) é um importante regulador negativo da função de *MSN2/4*, outras vias de transdução de sinal modulam a atividade desses fatores de transcrição. A proteína quinase Snf1 dependente de adenosina monofostato (AMP), também fosforila e regula negativamente Msn2 (GÖRNER et al., 2002; DE WEVER et al., 2005). Experimentos de vários laboratórios têm envolvido a proteína fosfatase (PP1) na desfosforilação de PKA e Snf1, levando a alterações de fosforilação (MAYORDOMO et al., 2002; De WEVER et al., 2005). PP1 está diretamente envolvida na desfosforilação de Msn2, além de influenciar negativamente na atividade de Snf1, proporcionando, assim, duas vias de controle para a atividade de Msn2. A utilização desses múltiplos e distintos caminhos de controle da função *MSN2/4*, parecem poder proporcionar o meio para a regulação de Msn2 estar relacionada à resposta geral ao estresse celular (MORANO et al., 2012).

Duas vias de detecção de nutrientes têm sido descritas para desempenhar funções reguladoras importantes no controle de *MSN2/4*: a via HOG1, a qual é ativada em resposta ao aumento da osmolaridade externa, e a via AMPc-PKA (Figura 2), o qual está envolvido na detecção do estado nutricional da célula através da modulação dos níveis de AMPc celular por ativação de proteínas G e de adenilato ciclase (MARCHLER et al., 1993; SCHÜLLER et al., 1994). Em condições normais Msn2/4 estão localizados no citoplasma da célula e são rapidamente acumuladas no núcleo quando em condições de estresse. Porém, em leveduras com baixos níveis de atividade da PKA, provocado por calor ou crescimento em condições de concentração alta

de glicose, ocorre acumulação nuclear de Msn2/4 na ausência de estresse, enquanto que elevados níveis de atividade da PKA bloqueiam eficientemente a localização nuclear de fatores de transcrição nas células em condições de estresse, inibindo a ativação da transcrição de genes de resposta ao estresse (TOONE; JONES, 1998; GARREAU et al., 2000; GÖRNER et al., 1998, 2002). Embora não haja ainda nenhuma evidência de que PKA fosforile Msn2 diretamente, esses resultados sugerem que PKA exerce seu efeito na expressão de genes dependentes de Msn2, por inibição direta de Msn2 (SMITH et al., 1998).

Figura 2 - Msn2/4 e Hsf1, moduladores primários de resposta geral ao estresse. As linhas tracejadas representam as interações da quinase Yak1 na regulação tanto de Msn2/4 quanto de Hsf1. As linhas vermelhas indicam interações de regulação da PKA. P - fosforilação; STRE - elemento de resposta ao estresse; HSE – elemento de choque térmico.



Fonte: Bücker (2014), modificado de Verghese et al. (2012).

Estudos anteriores mostraram que Yak1 pode contribuir para a inibição da atividade de PKA em Msn2/4. Yak1 quinase ativa Msn2/4 em condições de falta de glicose e fosforila diretamente os dois fatores *in vitro* (LEE et al., 2008). Yak1 também está presente no citoplasma em altas concentrações de glicose por uma associação com a proteína Bmh1 (LEE et al., 2011). Além disso, evidências genéticas indicam que Bcy1 (uma subunidade reguladora da PKA), afeta principalmente a região de sinalização para localização nuclear (NLS) de Msn2 por regulação negativa da PKA (GÖRNER et al., 2002). Contudo, quando as células se encontram em estado de inanição de glicose, a atividade da PKA é regulada negativamente via Bcy1. A diminuição da atividade de PKA ativa a Yak1, que por sua vez fosforila Msn2/4 (Figura 2). A hiperfosforilação de Msn2/Msn4 evita a sua exportação, e consequentemente, a acumulação desses dois fatores no núcleo levam a uma indução de genes regulados por STRE. Interessantemente, a expressão do gene *YAK1* é mediada por Msn2/4, sugerindo uma potencial autorregulação (MALCHER et al., 2011; VERGHESE et al., 2012).

Análises genéticas de mutantes *msn2Δ*, *msn4Δ* e *msn2Δ/msn4Δ* mostraram que, embora Msn2 e Msn4 apresentem redundância funcional, eles podem desempenhar papéis distintos na regulação da expressão gênica na indução da resposta ao estresse. Por exemplo, a deleção de ambos *MSN2* e *MSN4* leva a sensibilidade ao estresse térmico, oxidativo, e osmótico (MARTÍNEZ-PASTOR et al., 1996; ESTRUCH, 2000). Além disso, a indução dependente de estresse de *PDE2*, um gene que codifica uma AMPc fosfodiesterase de alta afinidade, não é afetada por Msn2 mas é completamente eliminada na linhagem duplo mutante. Estudos de expressão genômica de células de leveduras utilizando *microarrays* de DNA mostraram que mais de 90% dos genes cuja expressão é dependente de Msn2/4 na resposta ao calor ou a exposição por H₂O₂ também foram induzidos pela sobre-expressão de *MSN2* ou *MSN4*, mas significativamente mais genes de resposta geral ao estresse foram influenciados pela sobre-expressão dos fatores de transcrição Msn2/4 que por sua deleção (GASCH et al., 2000).

A via de sinalização TOR (*target of rapamycin*) também impacta as atividades de Msn2 e Msn4. Ao contrário da via AMPc-PKA, que parece regular principalmente a exportação nuclear, enquanto a via de sinalização TOR impede a importação nuclear de Msn2/Msn4. A via TOR estimula a associação de Msn2/4 com a proteína citoplasmática Bmh2 (Figura 2), inibindo a expressão de genes que contêm STRE, (BECK; HALL, 1999). No entanto, a localização de Msn2/4 não é o

único ponto de regulação da expressão de genes mediados por STREs. A localização nuclear de Msn2/4 é dependente da expressão de *MSN5*, que codifica um receptor de exportação do núcleo (ALEPUZ, 1999). A deleção de *MSN5* resulta na acumulação dos dois fatores de transcrição no núcleo da célula em condições normais de crescimento, porém não tem nenhum efeito sobre a regulação da expressão de genes dependentes de STRE (ESTRUCH, 2000). Em estudo sistemático recente (SADEH et al., 2011), foram examinados os efeitos de 35 mutantes de deleção única de genes relacionados com Msn2/4 sobre a expressão gênica dependente de STRE, após a exposição ao calor, ao estresse oxidativo e ao estresse osmótico. Nesse estudo foi sugerido que a atividade de Msn2/4 é precisamente modulada por múltiplos genes associados, para fornecer uma resposta ótima ao estresse. O controle combinatório da resposta "geral" ao estresse é fundamental para gerir eficazmente a expressão gênica induzida por múltiplos estresses ambientais diferentes (VERGHESE et al., 2012).

A resposta da levedura ao estresse osmótico é desencadeada pela via de sinalização HOG (*high osmolarity glycerol*). No caso da via HOG, não é claro o modo como a ativação de Hog1 leva ao aumento da transcrição de genes relacionados aos STRE, e mesmo se essa regulação envolve Msn2/4 (TOONE; JONES, 1998). A via HOG consiste em dois receptores de membrana, Sln1 e Sho1 (HERSEN et al., 2008) que são estimulados pelas alterações osmóticas do meio. Este fenômeno desencadeia uma cascata de sinalização que envolve a ativação de proteínas que são importadas para o núcleo se ligando a vários promotores, bem como ativando vários fatores de transcrição ligados a produção e retenção de glicerol. A via HOG é responsável pela adaptação à alta osmolaridade, e resulta no acúmulo intracelular de solutos que contrabalançam a perda da água (BREWSTER et al., 1993; MAEDA et al., 1994, 1995; HOHMANN, 2002; TATEBAYASHI et al., 2006).

O estresse hiperosmótico é uma condição de estresse importante para as leveduras, pois a alta concentração de açúcares no mosto de fermentação produz um estresse osmótico nas células da levedura ao qual elas devem resistir para conduzirem eficientemente a fermentação. Uma condição de estresse hiperosmótico se define como uma diminuição no potencial hídrico do ambiente no qual se está desenvolvendo o micro-organismo. A resposta imediata é uma saída de água intracelular, seguida de um processo adaptativo a fim de levar a um ajuste osmótico. Devido ao movimento de água, as concentrações intracelulares de íons e biomoléculas aumentam resultando em

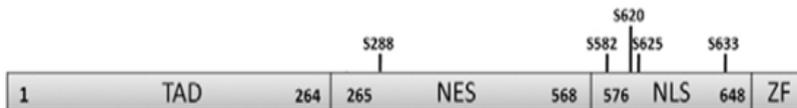
diminuição da atividade celular. Uma vez que o micro-organismo se adaptou, retoma o crescimento (SAITO; POSAS, 2012). Um dos mecanismos da resposta ao estresse osmótico inclui o aumento da produção e retenção intracelular de glicerol, que envolve o aumento da expressão do gene que codifica a enzima glicerol-3-fosfato desidrogenase (HERSEN et al., 2008). Leveduras osmotolerantes são aptas a reter o glicerol sintetizado para atuar como um soluto compatível ou osmorregulador. Qualquer que seja o mecanismo, a habilidade da levedura *S. cerevisiae* em resistir às condições hiperosmóticas de estresse irá depender tanto da produção quanto da retenção intracelular de glicerol (MYERS et al., 1997; SAITO; POSAS, 2012).

A localização de Msn2/Msn4 é inalterada na linhagem mutante *hog1Δ* (GÖRNER et al., 1998). Essas observações podem indicar que Hog1 controla a atividade nuclear de Msn2 e Msn4 após um choque osmótico. Várias observações indicam que sob estresse osmótico Msn2 e Msn4 são translocados para o núcleo, porém não suficiente para a estimulação da expressão gênica. Contudo, a análise global de expressão gênica revela uma aparente correlação entre Msn2/Msn4 e Hog1 (REP et al., 2000).

1.5.3 Estrutura de Msn2

Estudos anteriores sobre a relação da sequência e atividade de Msn2 identificou várias regiões funcionais da proteína, incluindo: (i) o domínio de ativação da transcrição (*transcriptional-activating domain* - TAD), localizado na região N-terminal; (ii) região contendo o sinal de exportação nuclear (*nuclear export signal* - NES); (iii) região contendo o sinal de localização nuclear (*nuclear localization signal* - NLS); e (iv) domínio de ligação ao DNA de dedo de zinco (*Zinc Finger binding domain* - ZF) na região C-terminal (Figura 3).

Figura 3 - Representação esquemática de Msn2 destacando os diferentes domínios.



Fonte: Bucker (2014), modificado de Sadeh et al. (2012).

Segundo Lallet et al. (2006), o domínio TAD promove localização nuclear de Msn2 ao interagir fisicamente com Gal11, uma subunidade do complexo mediador. Domínios funcionais de Msn2 foram identificados principalmente por truncamento de grandes regiões de *MSN2* e pela fusão de fragmentos Msn2 com domínios não naturais de ligação ao DNA (BOY-MARCOTTE et al., 2006). No entanto, apesar de tal visão sobre a sequência funcional de *MSN2*, muito pouco se sabe sobre as propriedades estruturais globais do fator de transcrição Msn2. Em especial, não está claro quais são os motivos funcionais e os resíduos específicos da região TAD de Msn2 que controlam a localização nuclear de Msn2 e a sua atividade transcricional (SADEH et al., 2012).

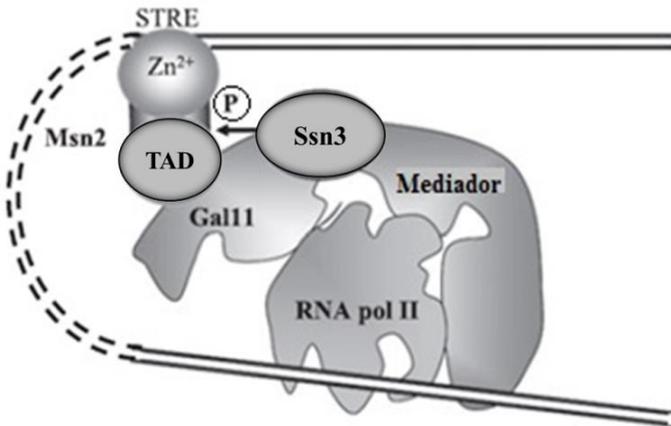
Msn2 e Msn4 contêm uma região de sinalização nuclear (NLS), perto da região C-terminal (SADEH et al., 2012). Análises de deleção e mutagenicidade demonstraram que a substituição de serina, na posição S288, por alanina ou aspartato em *MSN2* leva à acumulação nuclear constitutiva, que é reversível por níveis elevados de AMPc exógeno. A exportação é completamente abolida quando S288 é modificada em combinação com S620, S625, S633. Assim, o local de consenso de PKA requerido para a exportação nuclear de Msn2 inclui S288, e os níveis de AMPc são parcialmente redundantes com PKA para regular a translocalização dos dois fatores (GÖRNER et al., 1998).

Como muitos fatores de transcrição, Msn2 está sujeito a múltiplas fosforilações (HOLMBERG et al., 2002). Assim como a colaboração de uma ciclina-dependente de proteína quinase Ssn3, que faz parte do mediador de RNA polimerase II (HENGARTNER et al., 1995; LIU et al., 2001; CHI et al., 2001; LALLET et al., 2004). De acordo com o modelo de recrutamento, fatores de transcrição específicos recrutam o complexo mediador, que atua como um arcabouço para o recrutamento da RNA polimerase II e de fatores de transcrição gerais (GAUDREAU et al., 1997; PTASHNE; GANN, 1997). O mediador é um grande complexo composto por várias proteínas (KANG et al., 2001; GUGLIELMI et al., 2004; BJORKLUND; GUSTAFSSON, 2005). A proteína Gal11 é parte do mediador (MYERS; KORNBERG, 2000) e sabe-se que, por meio do domínio N-terminal de Gal11, há interação direta com o domínio de ativação de vários fatores de transcrição (LEE et al., 1999; BHOITE et al., 2001; ZHANG et al., 2004). Defeitos estruturais em Gal11 e Ssn3 apresentam o mesmo efeito no fator de transcrição Msn2, tanto na hiperfosforilação quanto na sua degradação, devendo desempenhar um papel crítico na maquinaria de transcrição e nos processos de montagem do mediador. Dessa forma, a interação

direta entre a região TAD de Msn2 e o domínio N-terminal de Gal11, ressalta o papel da Msn2 no recrutamento do mediador e a maquinaria de transcrição, levando à ativação da transcrição e posterior fosforilação de Msn2 dependente de Ssn3, provocando sua degradação (LALLET et al., 2006).

Uma vez que o complexo de iniciação da transcrição foi formado, a maquinaria de RNA polimerase II tem de ser remodelada para permitir que os seguintes passos da transcrição ocorram. Um mecanismo foi proposto para explicar a liberação dos componentes do complexo de transcrição desnecessários para o alongamento, o modelo proposto por Tansey (2001) foi chamado de “viúva negra”, o qual sugere uma relação forte entre a ativação da transcrição e da degradação proteolítica dos fatores de transcrição (esquema na Figura 4): após a montagem do mecanismo de transcrição nos promotores controlados por Msn2, o complexo Ssn3 num segundo passo promove a hiperfosforilação e, finalmente, a degradação de Msn2 (LALLET et al., 2004; BOSE et al., 2005).

Figura 4 - Um modelo de recrutamento envolvendo o fator de transcrição Msn2. Em condição de estresse, Msn2 é preferencialmente localizado no núcleo onde se dirige a montagem da maquinaria de transcrição da RNA polimerase II em promotores controlados por STRE por meio da interação com a subunidade Gal11 do mediador. Depois disso, o complexo Ssn3 promove a fosforilação e a degradação de Msn2 pelo proteossoma.



Embora Gal11 e Ssn3 sejam essenciais para a hiperfosforilação de Msn2 por indução pelo estresse, por outro lado apresentam efeitos opostos sobre a transcrição de genes dependentes de Msn2, que é aumentada em uma linhagem mutante *ssn3*Δ e diminuída em uma linhagem mutante *gal11*Δ. Essa diferença pode ser explicada pela interação de Msn2 com Gal11, contribuindo para o recrutamento da maquinaria de transcrição e, portanto, estar envolvida na ativação da transcrição, enquanto a fosforilação promovida por Ssn3 leva à degradação intranuclear de Msn2. Deste modo, um defeito em Ssn3 prejudicaria a degradação de Msn2 e aumentaria a transcrição, enquanto um defeito em Gal11 afetaria negativamente a formação do complexo de pré-iniciação da transcrição (LALLET et al., 2006).

1.6 Objetivos

1.6.1 Objetivo Geral

Incrementar a tolerância ao etanol de uma linhagem industrial (CAT-1) de *S. cerevisiae* através da modificação da região promotora dos genes *TRP1* e *MSN2*, e analisar o impacto dessas modificações na performance fermentativa das linhagens recombinantes.

1.6.2 Objetivos Específicos

- *Engenhar geneticamente leveduras industriais*: sobre-expressar os genes *TRP1* e *MSN2* utilizando técnicas de engenharia genômica, para que seja modificada a região promotora desses genes no genoma das leveduras.
- *Analisar a tolerância ao etanol*: analisar o crescimento das leveduras recombinantes em diferentes concentrações de etanol, bem como e analisar a tolerância a diversas outras condições de estresse.
- *Analisar o nível de oxidação intracelular nas condições de estresse*: analisar o nível intracelular de espécies reativas de oxigênio nas células após a exposição às diferentes condições de estresse.
- *Analisar a capacidade fermentativa das leveduras*: Avaliar a performance fermentativa das linhagens recombinantes em fermentações em batelada simples contendo 200 g/L de sacarose, suplementadas ou não com altas concentrações de etanol; e em fermentações em batelada alimentada, com reciclo celular, em condições semelhantes às encontradas na indústria.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Linhagens Utilizadas e Meios de Cultura

As linhagens utilizadas neste trabalho estão descritas na Tabela 1. Para o crescimento das leveduras foram utilizados meio líquido YP (10,0 g/L de extrato de levedura; 20,0 g/L de peptona) contendo 2% de glicose, ou meio sintético *Drop-out* (6,7 g/L de *Yeast Nitrogen Base* sem aminoácidos; 20,0 g/L de glicose; 0,7 g/L Triptofano *Drop-out*; SC^{-Drop-out}). Os meios tiveram seu pH ajustado com solução de HCl para 5,0 ±0,1 e esterilizados em autoclave a 120 °C por 20 min. Quando necessário foi adicionado aos meios 20 g/L de ágar (meios sólidos), ou 200 µg/mL de geneticina (G-418, Sigma) esterilizada previamente por filtração, utilizando filtros de nitrocelulose com porosidade de 0,22 µm (HAWP; Millipore). Filtros e demais componentes do processo de filtração foram previamente esterilizados em autoclave a 120 °C por 20 min (SHERMAN, 2002). Todos os reagentes utilizados no preparo dos meios de cultivo foram de grau analítico (Sigma Chemical Co.).

Tabela 1 - Linhagens de leveduras utilizadas.

Linhagem	Genótipo ou descrição	Fonte ou referência
S288C	<i>MATα mal gal2 CUP1 flo1 hap1- SUC2 TRP1</i>	Alves-Jr et al. (2008)
BSY21-34B3	<i>MATα MAL2-8^c his3Δ1 trp1-289 loxP-KanMX-loxP-P_{ADHI}::iSUC2</i>	Müller (2013)
CEN.PK2-1C	<i>MATα MAL2-8^c ura3-52 his3Δ1 leu2-3/112 trp1-289</i>	Entian; Kotter (1998)
ABH-4	Isogênica à CEN.PK2-1C mas, <i>trp1-289::TRP1</i>	Este trabalho
ABH-4.2	Isogênica à ABH-4 mas, <i>loxP-KanMX-loxP-P_{ADHI}::TRP1</i>	Este trabalho
CAT-1	Industrial diplóide	Basso et al. (2008)
NAB-1	Isogênica à CAT-1 mas, <i>loxP-KanMX-loxP-P_{ADHI}::TRP1</i>	Este trabalho
ANT-5	Isogênica à CAT-1 mas, <i>loxP-KanMX-loxP-P_{ADHI}::MSN2</i>	Este trabalho
ATT-6	Isogênica à CAT-1 mas, <i>loxP-KanMX-loxP-P_{ADHI}::MSN2-T</i>	Este trabalho

FONTE: Bücker (2014)

2.2 Métodos de Biologia Molecular

As regiões promotoras dos genes *TRP1* e *MSN2* nas leveduras foram modificadas por engenharia genômica, baseadas em técnicas de PCR e integração do módulo de sobre-expressão no genoma por recombinação homóloga (AGATEP et al., 1998; GIETZ; WOODS, 2002; PETRACEK; LONGTINE, 2002). A técnica de engenharia genômica permite modificar a expressão de um gene de interesse, inserindo uma sequência de nucleotídeos que codificam para uma região promotora constitutiva, o que permite a sobre-expressão do gene. A seleção das células modificadas ocorre através de meio seletivo preparado com a suplementação necessária (antibiótico ou meio sintético SC^{-Trp}), onde o gene KanMX, que confere resistência à geneticina, está flanqueado por regiões LoxP. Posteriormente, o DNA é extraído das colônias recombinantes e utilizado para verificação por PCR da inserção do módulo no local correto no genoma da levedura.

2.2.1 Extração de DNA genômico

O DNA das leveduras foi extraído de células pré-crescidas em 3 mL de meio líquido YP contendo 2% de glicose, durante 48 horas, a 28 °C. Posteriormente, a cultura foi centrifugada (6.000 g, 3 min), o sobrenadante desprezado e o DNA da suspensão celular foi extraído utilizando kits comerciais de extração de DNA de leveduras (YeaStar Genomic DNA Kit™, Zymo Research) seguindo as instruções do fabricante. Após, o material genômico foi ressuspendido com 20 µL de água deionizada (MilliQ) autoclavada e a amostra foi armazenada em freezer a -20 °C.

2.2.2 Reação em Cadeia de Polimerase (PCR – *Polymerase Chain Reaction*)

Para a obtenção dos módulos de sobre-expressão as reações foram realizadas com enzima de alta fidelidade (Phusion® High Fidelity DNA Polymerase, Thermo Scientific) seguindo as seguintes condições: 50 ng DNA, Tampão Phusion HF® 5x (F518), dNTPs 10 mM, 5 µM de cada iniciador, 1 U da enzima Phusion e água deionizada para completar o volume para 200 µL. Foi utilizado o termociclador Mastercycler Gradient® (Eppendorf) para o programa de PCR, com os seguintes passos: desnaturação inicial de 98 °C por 20 seg; seguida de 29 ciclos com desnaturação de 98 °C por 10 seg, anelamento dos iniciadores com temperatura de 60 °C por 20 seg e mais um passo de extensão das fitas

de 72 °C por 15–30 seg/Kb, além de um passo final de extensão de 72 °C por 7 min.

Já para a verificação das linhagens recombinantes, as reações de PCR foram conduzidas com a enzima GoTaq[®] DNA Polimerase (Promega) de acordo com as seguintes condições: 50 ng de DNA, Tampão Green[®] 5x, dNTPs 200 µM, 5 µM de cada iniciador, 0,75 U da enzima GoTaq[®] e água deionizada para completar o volume total de 20 µL. O termociclador foi programado com os seguintes passos: desnaturação inicial de 95 °C por 2 min; seguida de ciclo de 33 vezes com um passo de desnaturação de 95 °C por 1 min, anelamento dos iniciadores com temperatura de 55 °C por 1 min e um passo de extensão das fitas de 72 °C por 3 min, com extensão final de 72 °C por 8 min.

2.2.3 Eletroforese em Gel de Agarose

As reações de PCR para obtenção dos módulos de sobre-expressão e as verificações das transformações genômicas foram analisadas através de eletroforese em gel de agarose 1,0% em tampão TBE (45 mM Tris-borato, 1 mM EDTA pH 8,0) contendo 2,5 µg/mL de brometo de etídio para observação das bandas em luz ultravioleta. Para a eletroforese foi aplicado no gel de agarose um volume de 10 µL (20 µL da reação submetida a PCR, misturado com 2 µL de tampão de corrida 6x) da amostra em cada poço, e 6 µL do marcador de peso molecular de 1 kb ladder (BioLabs[®]). O gel foi submetido à eletroforese em mesmo Tampão TBE, a 75 V por 40 - 60 min. Após o término do tempo, o gel foi analisado e fotografado sob luz ultravioleta em fotodocumentador Molecular Imager[®] Gel Doc[™] XR+ System (BioRad).

2.2.4 Obtenção dos Módulos de Sobre-expressão

Os genes *TRP1* e *MSN2* sofreram alteração nas suas regiões promotoras no genoma das linhagens de levedura pelo processo de recombinação homóloga, através de metodologias baseadas em PCR (PUIG et al., 1998; AGATEP et al., 1998; PETRACEK; LONGTINE, 2002; GIETZ; WOODS, 2002). Inicialmente foi produzido um fragmento linear de DNA que apresenta nas suas extremidades uma sequência (40 pares de bases) com homologia à região alvo do genoma da levedura, obtida a partir do *Saccharomyces Genome Database* (SGD - vide <http://www.yeastgenome.org>). Esse fragmento foi chamado de “módulo de sobre-expressão”.

A linhagem de laboratório BSY21-34B3 (Tabela 1) possui em seu genoma o gene *iSUC2* (invertase intracelular) controlado pelo

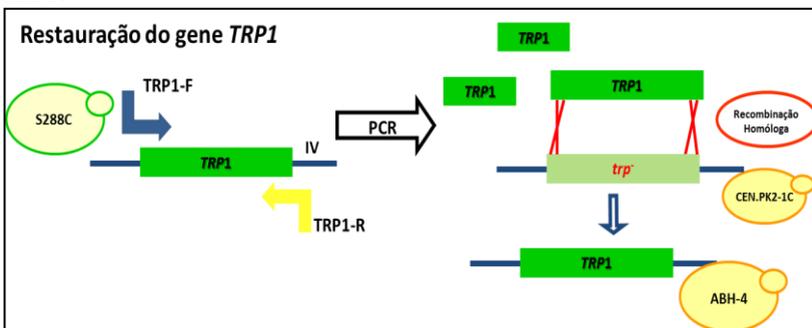
promotor forte e constitutivo do gene *ADHI* (P_{ADHI} - que codifica a expressão da enzima álcool desidrogenase de *S. cerevisiae*) e o gene KanMX, que confere resistência a um antibiótico para realizar a seleção das linhagens recombinantes. Essas regiões *LoxP*, na presença da enzima cre-recombinase, se recombinam e permitem a remoção do gene KanMX por excisão do genoma (GÜLDENER et al., 1996; 2002).

Sabe-se que o P_{ADHI} responde fortemente a presença de glicose, aumentando a expressão do gene a qual esse promotor controla (DEMARINI et al., 2001). O gene KanMX foi isolado do plasmídeo pUG6 por PCR e inserido na linhagem BSY21-34B, gerando a linhagem BSY21-34B3 (BASSO et al. 2011; ESPÍRITO-SANTO, 2012; MÜLLER, 2013).

2.2.4.1 Módulo de sobre-expressão do gene *TRP1*

Inicialmente a levedura de laboratório, CEN.PK2-1C, precisou ter o seu gene *TRP1* restaurado, uma vez que o mesmo não está funcional na levedura. Para isso, foi amplificado o gene *TRP1* funcional da levedura de laboratório haplóide S288C, utilizando os iniciadores TRP1-F e TRP1-R (Tabela 2) e foi substituído o gene completo por recombinação homóloga (Seção 2.2.5), originando a linhagem ABH-4 (Figura 5).

Figura 5 - Esquema da restauração do gene não funcional *trp1-289* pelo gene *TRP1*.



Fonte: Bückner (2014)

Tabela 2 – Oligonucleotídeos (iniciadores) utilizados no trabalho.

Iniciador ^a	Sequência 5' → 3' ^b	Proposta
TRP1-F	GGCAGCTTGGAGTATGTCTG (-13 a 7)	Recuperar o gene <i>TRP1</i>
TRP1-R	CAGGCAAGTGCACAAACAAT (723 a 698)	Recuperar o gene <i>TRP1</i>
TRP1-LPkanr-F1	GAGAGGGCCAAGAGGGAGGGCATTGGTGACTAT TGAGCACCCAGCTGAAGCTTCGTACGC (-80 a -40)	Modificar o gene <i>TRP1</i>
TRP1-ADH1-LPkanr-R4	TCACCAATGGACCAGAACTACCTGTGAAAATTAAT AACAGACATTGTATATGAGATAGTTG (43 a 3)	Modificar o gene <i>TRP1</i>
MD.MSN2-F4	CGGGAAGATCACAAACAGTAGTAGCAAGGTATTTTC ATACGCCCCAGCTGAAGCTTCGTACG (-131 a -91)	Modificar o gene <i>MSN2</i>
MD.MSN2-R4	CATGGTCGACCGTCATTTTAGATCTAGTTCCTCT ATGAGCCCAATGGACCAGAACTACCTG (-24 a 16)	Modificar o gene <i>MSN2</i>
MD.MSN2-R7	CAGTGAAGTTTCTTGATTTTGAATGTCATTGAGA TCCGCCAATGGACCAGAACTACCTG (185 a 145)	Modificar o gene <i>MSN2</i>
V-kanr-F	CCGGTTGCATTCGATTCC (380 a 398)	Verificação
VR-TRP1-F3	GGTCCTGAATGGGTCCTTGG (-623 a -603)	Verificação
VR-MSN2-F8	TGACGGTCGACCATGATTCA (2 a 21)	Verificação
VR.MSN2-R5	TGAAGGTACCGGAAAAATGG (2238 a 2218)	Verificação
ACT1-F	TGGATTCCGGTGATGGTGTT (767 a 787)	qRT-PCR
ACT1-R	CGGCCAAATCGATTCTCAA (853 a 833)	qRT-PCR
SUC2-889-F	CCAACCTACGGTTCAGCATT (829 a 849)	qRT-PCR
SUC2-944-R	TGGGTTAGTTGGGACAAAGG (903 a 883)	qRT-PCR
VRT-TRP1-F	GTTCCCTCGGTTTGCCAGTTA (330 a 349)	qRT-PCR
VRT-TRP1-R	GTAAGCTTTCGGGGCTCTCT (520 a 501)	qRT-PCR
RT.MSN2-F6	CGCGATGCAAGAACTATTGA (301 a 320)	qRT-PCR
RT.MSN2-R6	TGAAGGTACCGGAAAAATGG (465 a 446)	qRT-PCR

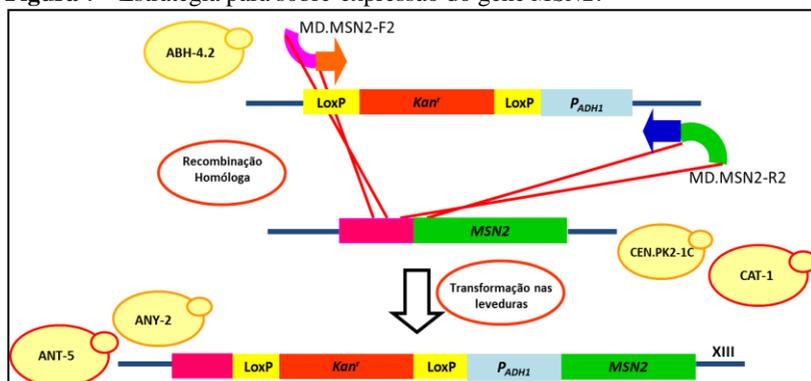
NOTA: ^a Os iniciadores F (*forward*) são complementares a fita 3' → 5', enquanto que, os iniciadores R (*reverse*) são complementares a fita 5' → 3';

^b Sequências sublinhadas permitem à amplificação do produto de PCR *loxP-KanMX-loxP-P_{ADH1}*; as sequências em negrito têm homologia com as regiões a montante e no início dos genes *TRP1* e *MSN2*. FONTE: Bucker (2014).

2.2.4.2 Módulos de sobre-expressão dos genes *MSN2* e *MSN2-Truncado*

O módulo genético para a sobre-expressão do gene *MSN2* foi amplificado por PCR da linhagem ABH-4.2 utilizando os iniciadores MD.MSN2-F2 e MD.MSN2-R2 (Tabela 2), contendo sequências flanqueadoras de 40 pb com homologia à região a montante do gene *MSN2* no cromossomo XIII das linhagens CEN.PK2-1C e CAT-1, originando as linhagens ANY-2 e ANT-5, respectivamente, com o módulo de sobre-expressão inserido na frente do gene *MSN2* (Figura 7). As verificações das transformações foram realizadas utilizando os iniciadores VR.MSN2-F8, V-Kanr-F e RT.MSN2-R6 (Tabela 2).

Figura 7 - Estratégia para sobre-expressão do gene *MSN2*.



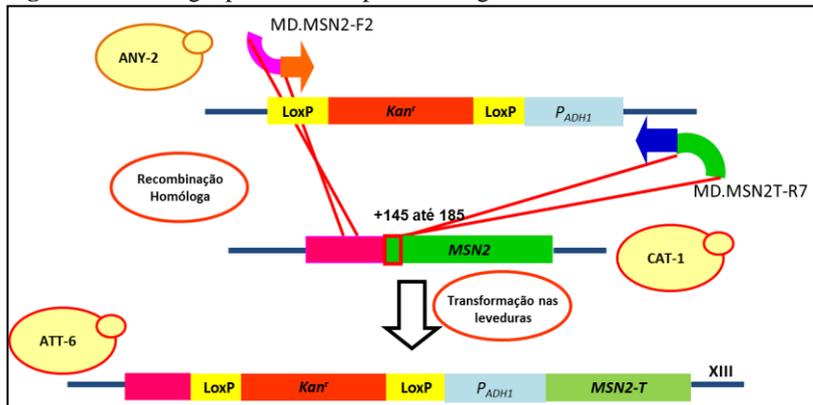
Fonte: Bücker (2014)

O módulo genético para a sobre-expressão da forma truncada do gene *MSN2* (*MSN2-T*) foi amplificado por PCR da linhagem ANY-2 utilizando os iniciadores MD.MSN2-F2 e MD.MSN2T-R7 (Tabela 2), contendo sequências flanqueadoras de 40 pb de homologia à região anterior e inicial ao gene *MSN2* no cromossomo XIII da linhagem CAT-1, originando a linhagem ATT-6 com o módulo de sobre-expressão inserido no início do gene *MSN2*. O iniciador MD.MSN2T-R7 contém uma sequência de 40 pb (145 a 185 pb) de homologia ao gene *MSN2*, referente a sua região TAD (ver Introdução, Figura 3). Essa estratégia visa a substituição dos primeiros 48 aminoácidos do gene *MSN2* pelo módulo de sobre-expressão amplificado, de acordo com a Figura 8.

Após a transformação (Seção 2.2.5), os recombinantes foram então selecionados em placas de Petri, contendo meio de cultivo contendo geneticina (200 $\mu\text{g}/\text{mL}$). A verificação da transformação foi

realizada utilizando os iniciadores VR.MSN2-F8, V-Kanr-F e RT.MSN2-R6 (Tabela 2).

Figura 8 - Estratégia para sobre-expressão do gene *MSN2-Truncado*



Fonte: Bucker (2014)

2.2.5 Transformação das Linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*

As linhagens de levedura foram transformadas, sob condições assépticas com manipulação do material em câmara de fluxo laminar, através do protocolo descrito por Gietz e Woods (2002) e adaptações segundo Dário (2011). As linhagens de interesse foram pré-cultivadas em tubos de ensaio que continham 3 mL de meio líquido YP contendo 2% de glicose. No dia seguinte, um volume de 1,5 mL do pré-cultivo foi transferido para um frasco de erlenmeyer, com capacidade para 250 mL, preenchido com 50 mL de meio líquido YP contendo 2% de glicose. O frasco foi incubado a 28 °C sob agitação orbital de 160 rpm, até atingir $DO_{570} \approx 1,0$ para então a cultura ser transferida para tubo cônico tipo Falcon e centrifugada por 5 min a 3000 g, sendo a parte líquida (sobrenadante) desprezada. As células foram gentilmente suspensas em 1 mL de uma solução 0,1 M de acetato de lítio estéril, e a suspensão celular obtida foi transferida a um tubo de microcentrifuga (1,5 mL). Em seguida, o tubo foi centrifugado por 2 min a 3000 g, e após descartar o sobrenadante obtido, as células foram suspensas em um volume de 300 a 500 μ L de 0,1 M acetato de lítio. Em novos tubos, foram adicionados 50 μ L de suspensão celular, 300 μ L de solução PLI (0,1 M de acetato de lítio e 40% de PEG 3350), 5 μ L de ssDNA (DNA fita simples; 10 mg/mL) e mais 50 μ L de água deionizada ou 50 μ L do produto de PCR

– “módulo de sobre-expressão”). Essas suspensões celulares foram então, vigorosamente agitadas com auxílio de agitador tipo Vortex, e em seguida incubadas em banho maria a 42 °C por 30 min, agitando-se rapidamente os tubos a cada 5 min. Os tubos foram centrifugados por 2 min a 3.000 g e o sobrenadante descartado. No concentrado de células obtido, foi adicionado um volume de 1 mL de meio líquido YP contendo 2% de glicose, e os tubos foram incubados a 28 °C por 3 a 4 horas sob agitação orbital de 160 rpm. A seguir, os tubos foram centrifugados por 2 min a 3.000 g e o sobrenadante desprezado. Uma suspensão celular foi obtida utilizando 500 µL de água deionizada, e inoculada na superfície de placas de Petri, contendo meio SC^{-Trp}, no caso das transformações para restaurar o gene *TRP1*, ou as células foram inoculadas em meio sólido YP contendo 2% de glicose e 200 µg/mL de geneticina. As placas foram deixadas, com a tampa aberta, dentro de capela de fluxo laminar, até secar a superfície do meio sólido (≈ 30 min) e, em seguida, as placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 28 °C de 3 a 5 dias, até surgirem colônias de células na superfície do meio. As colônias que cresceram foram repicadas, com auxílio de alça bacteriológica, para novas placas contendo o mesmo tipo de meio e condições de cultivo utilizado anteriormente. Após o crescimento, as células foram utilizadas para confirmação da inserção das modificações no genoma das linhagens, conforme descrito a seguir.

2.2.6 Análise de Expressão Gênica por PCR quantitativo em Tempo Real (qRT-PCR)

Para analisar a expressão dos genes *TRP1*, *MSN2* e *SUC2* nas linhagens estudadas, as células foram coletadas por centrifugação (7.000 g, 4 min) e em seguida lavadas com água deionizada gelada (4 °C) e armazenadas a -20 °C para posterior análise. Todos os kits utilizados para as análises gênicas por qRT-PCR seguiram as instruções do fabricante. As células foram descongeladas e realizada a extração do RNA total utilizando o RNeasy[®] Mini Kit (Qiagen). Em seguida, 0,5 µg de RNA total foram utilizados para a síntese de cDNA com o QuantiTect[®] Reverse Transcription Kit (Qiagen). Para realização do qRT-PCR foi utilizado o kit comercial QuantiFast[®] Sybr Green PCR Kit (Qiagen). Os oligonucleotídeos específicos para cada gene, utilizados nessas reações de qRT-PCR, estão listados na Tabela 2. Foram utilizados 1 mM de cada par de oligonucleotídeos e 50 ng de cDNA em cada reação. As reações de qRT-PCR foram realizadas no equipamento Rotor-Gene[®] Q (Qiagen) com os seguintes ciclos: incubação inicial de

95 °C por 5 min; 40 ciclos a 95 °C por 10 seg; 60 °C por 15 seg e 72 °C por 20 seg; e uma incubação final de 95 °C por 2 min. Os dados gerados a partir dessas reações foram analisados com o *software* próprio do equipamento. Em cada ensaio, foi gerada uma curva de dissociação (curva de *melting*) para confirmar a amplificação de apenas um produto. Todas as amostras foram avaliadas em duplicatas. Os valores de expressão gênica representam uma quantificação relativa obtida através do cálculo do DeltaDelta Ct ($\Delta\Delta Ct$), que leva em consideração o cálculo do ΔCt (tempo de ciclagem) da amostra e o cálculo do ΔCt da amostra calibradora. O gene calibrador utilizado nas reações foi o gene da actina *ACT1* (Tabela 2).

2.3 Cultivos Celulares

2.3.1 Pré-cultivo

As células foram inoculadas em tubos de ensaio, contendo 3 mL de meio líquido YP contendo 2% de glicose, e incubadas por 48 horas a 28 °C em agitador orbital INNOVA[®] 44 (New Brunswick Scientific) sob agitação de 160 rpm.

2.3.2 Multiplicação das linhagens de *S. cerevisiae* para uso experimental

Uma alíquota (500 μ L) do pré-cultivo foi transferida para erlenmeyers contendo 1/5 do seu volume de meio líquido YP contendo 2% de sacarose. As culturas foram incubadas como descrito acima por 6 – 8 horas até atingir o início da fase exponencial de crescimento com $DO_{570} \approx 1,0$. As células de levedura foram removidas do meio de cultivo por centrifugação a 3.000 g, por 5 min, lavadas três vezes com água destilada a 4 °C, e ressuspensas em água destilada de forma a atingir uma concentração celular inicial (X_0) de $20,0 \pm 1$ g/L para as fermentações em batelada simples e de $30,0 \pm 1$ g/L para as fermentações em batelada alimentada, como descrito a seguir.

2.3.3 Determinação da Concentração Celular

A concentração celular foi determinada pela relação entre a leitura da Densidade Óptica (DO) em espectrofotômetro a 570 nm (Agilent Cary 60 UV-VIS) e seguindo critérios de quantificação de biomassa celular de acordo com Dário (2012). Fez-se a determinação da densidade óptica das culturas, sendo respeitada a faixa linear de absorvância (0,030 – 0,250), de acordo com a equação 1.

$$C_{\text{celular}} = \text{Abs}_{\text{amostra}} \cdot D \cdot \text{FC} \quad (1)$$

Onde:

C_{celular} = concentração de biomassa celular na amostra em g/L;

$\text{Abs}_{\text{amostra}}$ = absorvância da amostra em 570 nm da amostra;

D = fator de diluição da amostra;

FC = fator de conversão da absorvância (0,27), para massa seca em g/L.

2.4 Crescimentos em Microescala

As células foram inoculadas (diluição 1:100) em 100 μL de meio líquido YP contendo 2% de sacarose em cada poço de placas de ELISA de 96 poços. Quando necessário os meios eram acrescidos de concentrações pré-definidas de etanol. Para evitar a contaminação e/ou evaporação dos meios e do etanol, as placas foram seladas com “AccuClear Sealing Film for qPCR” (E&K Scientific) e, portanto, as condições de crescimento foram consideradas limitadas por oxigênio (ou microaeróbias). As leveduras foram incubadas a 28 °C e 160 rpm por até 60 horas em uma leitora de placas TECAN Infinite[®] M200 Pro (Tecan Group Ltd, Grödig, Salzburg, Áustria), sendo a absorvância a 570 nm determinada a cada 15 min e para calcular o valor final do crescimento celular, foi subtraída a absorvância obtida no experimento por poços controle somente contendo meio YP (STAMBUK et al., 2009).

2.5 Crescimentos em Placas de Petri

Foram utilizadas placas de Petri contendo meio sólido YP (20 g/L de ágar) suplementado com glicose (20 g/L) e diferentes condições de estresse, como etanol na concentração de 16% (V/V), H_2O_2 3 mM, NaCl 0,7 M, e incubação a 40 °C. As linhagens foram pré-crescidas em tubos de ensaio com 3 mL de meio líquido YP contendo 2% de glicose, e incubadas por 48 horas a 28 °C sob agitação de 160 rpm. Em seguida, as células foram inoculadas em uma placa de ELISA de 96 poços e ajustada a uma $\text{DO}_{570} = 0,5$ em um volume de 200 μL . Essa suspensão celular sofreu cinco diluições seriadas na própria placa de ELISA. Ainda em condições estéreis, um carimbo metálico previamente esterilizado (flambado) foi mergulhado na série de diluições seriadas e depois posicionado nas placas de Petri contendo os meios sólidos de interesse. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 28 °C (exceto a condição experimental de 40 °C) e fotografadas a cada 24 horas em fotodocumentador Molecular Imager[®] Gel Doc[™] XR System (Bio-Rad).

2.6 Fermentações

2.6.1 Fermentação em Batelada Simples

As linhagens foram pré-crescidas a 28 °C e 160 rpm em meio líquido YP contendo 2% de sacarose até atingirem $DO_{570} \approx 1,0$. Em seguida as células foram lavadas com água fria deionizada e ajustada a uma concentração celular de $X_0 = 20,0 \pm 1,0$ g/L, em 50 mL, sendo posteriormente misturadas em frascos (erlenmayer de 500 mL) contendo mais 50 mL de meio líquido YP (2 vezes concentrado) com 40% de sacarose. Foram feitas leituras de absorbância (DO_{570}) para a determinação da concentração celular e alíquotas de 750 μ L foram retiradas de hora em hora para serem centrifugadas (5.000 g por 3 min), e o sobrenadante armazenado a -20 °C para posterior determinação de açúcares (sacarose, glicose e frutose) e produtos da fermentação (etanol e glicerol). Experimentos com adição de etanol foram realizados com o acréscimo de etanol no tempo zero de cada experimento, variando as concentrações de etanol: 5%, 8%, 10%, 12%, 14% e 16% (V/V).

2.6.2 Fermentação em Batelada Alimentada

Para a realização da fermentação em Batelada Alimentada, as linhagens foram pré-crescidas a 28 °C e 160 rpm em meio líquido YP contendo 2% de sacarose até atingirem $DO_{570} \approx 1,0$. Após realizada a propagação celular, as células de levedura foram ressuspensas em 200 mL de água deionizada e ajustada a uma concentração celular de $X_0 = 30,0 \pm 1,0$ g/L. As fermentações foram conduzidas em um fermentador BioFlo[®]/CelliGen[®] 115 (New Brunswick Scientific) com capacidade de 1,3 litros a 28 °C, agitação de 110 rpm sem aeração, e pH controlado em 5,0 (ajustado automaticamente com HCl / KOH). A alimentação do processo se deu com acréscimo de 400 mL de meio líquido YP contendo 20% de sacarose (15,0 g/L de extrato de levedura, 30,0 g/L de peptona e 300,0 g/L de sacarose), a uma velocidade de alimentação de 66,7 mL/hora por 6 horas. Foram feitas leituras de absorbância (DO_{570}) e alíquotas de 750 μ L foram retiradas de hora em hora, como descrito anteriormente.

2.6.3 Determinação da Produtividade do Processo Fermentativo

A produtividade em etanol (P_{etanol}) foi calculada pela razão entre a concentração máxima de etanol e o tempo necessário para obter essa concentração máxima de etanol, conforme equação 2. A produtividade máxima de etanol foi expressa em g/L/h.

$$P_{etanol} = [E_f - E_0] / t_h \quad (2)$$

2.6.4 Determinação do Fator de Rendimento do Processo Fermentativo

O fator de rendimento do processo fermentativo ($Y_{E/S}$) é a razão entre a concentração máxima de etanol produzido e a quantidade de açúcar consumido pelas células, conforme a equação 3.

$$Y_{E/S} = \frac{[E_f - E_0]}{(Sac_0 - Sac_f) - [(Gli_f - Gli_0) + (Fru_f - Fru_0)]} \quad (3)$$

E_f = concentração de etanol no tempo final de fermentação, em g/L

E_0 = concentração de etanol no início da fermentação, em g/L

Sac_f = concentração de sacarose no final da fermentação, em g/L

Sac_0 = concentração de sacarose no início da fermentação, em g/L

Gli_f = concentração de glicose no final da fermentação, em g/L

Gli_0 = concentração de glicose no início da fermentação, em g/L

Fru_f = concentração de frutose no final da fermentação, em g/L

Fru_0 = concentração de frutose no início da fermentação, em g/L

2.7 Cromatografia Líquida de Alta Pressão

As concentrações de sacarose, glicose, frutose e etanol foram determinadas por cromatografia líquida de alta pressão (HPLC- Jasco X-LC), com detector por índice de refração (RI 2031 plus- Jasco) e coluna para ácidos orgânicos (HyperREZ XP Organic Acid Column- Thermo Scientific). A fase móvel utilizada foi 5 mM de ácido sulfúrico, a 20 °C, com fluxo de 0,2 mL/min durante 40 minutos. As curvas de calibração foram estabelecidas para todos os açúcares analisados utilizando cinco concentrações diferentes, na faixa de 5,0 a 20,0 g/L.

2.8 Determinação da Atividade de Invertase Extracelular

Esse método baseia-se na quantificação da glicose liberada após a hidrólise da sacarose pela atividade da enzima invertase (SILVEIRA et al., 1996). A atividade da invertase extracelular foi determinada utilizando-se células íntegras coletadas de 3 em 3 horas, até 24 horas para as fermentações em batelada simples e alimentada. A concentração celular foi ajustada para uma $DO_{570} = 1,0$ então, um volume de 100 μL da suspensão celular foi misturado a 100 μL de Tampão NaF (Succinato-Tris 150 mM; pH 5,0; NaF 150 mM) e incubado em banho maria por 30 min, a 30 °C. Em seguida foi adicionado 100 μL de sacarose 300 mM e novamente incubados em banho maria por 5 min, a 30 °C. A seguir as amostras foram colocadas a 100 °C por 5 min, seguida de centrifugação a 5.000 g por 3 min. A glicose formada, presente no sobrenadante, foi determinada utilizando kit enzimático comercial seguindo as instruções do fabricante (Glicose PAP Liqform, Labtest, Lagoa Santa-MG, Brasil). Todas as determinações foram realizadas em triplicata e utilizando controles negativos com células fervidas (100 °C durante 5 min) em duplicata. A atividade específica da invertase foi expressa em nmoles de glicose liberada por minuto por mg de células (massa seca).

2.9 Avaliação do Nível de Oxidação Intracelular

O nível intracelular de ROS (*reactive oxygen species* – ROS) induzido nas células durante o estresse foi medido usando o composto diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína (DCF-DA) (Molecular Probes, Eugene, OR). Este composto é aprisionado no interior das células, e após a clivagem do diacetato por uma esterase intracelular, é oxidada por espécies radicais, principalmente H_2O_2 (ROYALL; ISCHIROPOULOS, 1993).

Os testes foram realizados de acordo com Iinoya et al. (2009), Nishimura et al. (2010) e Sasano et al. (2012). Foram utilizadas células em fase exponencial de crescimento obtidas a partir do crescimento das células em tubos de ensaio, contendo 3 mL de meio líquido YP contendo 2% de glicose. Após essa etapa, as células foram ressuspendidas a uma $DO_{570\text{nm}} = 1,0$ utilizando tampão PBS (*Phosphate Buffered Saline* - Tampão fosfato salino) 50 mM (pH 7,4) contendo DCF-DA 10 mM e incubadas a 28 °C por 30 min, no escuro. Então foram submetidas aos testes de estresse, onde as células foram incubadas a 28 °C por 1 hora em H_2O_2 (3 mM); por 4 horas em NaCl (0,7 M); 4 horas de incubação a 40 °C; ou 6 horas na presença de etanol

20% (V/V). Após o tratamento, as células foram lavadas e ressuspendidas em 1 mL de água destilada (em triplicata) e rompidas com bolas de vidro sob forte agitação com auxílio de vortex por 5 minutos. A seguir o extrato celular (50 μ L) foi misturado com 150 μ L de água destilada estéril, e determinada a fluorescência com comprimento de onda de excitação em 504 nanômetros ($\lambda_{EX} = 504\text{nm}$) e fluorescência com comprimento de onda de emissão em 524 nanômetros ($\lambda_{EM} = 524\text{nm}$) usando espectrofotômetro de fluorescência TECAN Infinite® M200 Pro (Tecan Group Ltd, Grödig, Salzburg, Áustria). A intensidade de fluorescência de cada linhagem antes da exposição ao estresse oxidativo (0 minuto) foi relativamente considerado 100%.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Obtenção de Linhagens Recombinantes de *S. cerevisiae* por Engenharia Genômica

No andamento das últimas pesquisas acerca de engenharia genômica, cresce a importância na utilização de dados obtidos a partir da análise ampla do genoma (*genome-wide*) por se mostrar eficaz para a seleção de genes candidatos na construção de micro-organismos que apresentem maior tolerância ao etanol (TEIXEIRA, 2009; BABRZADEH et al., 2012; SWINNEN et al., 2012). No caso da produção industrial de etanol combustível, sua acumulação resulta na diminuição do crescimento das células, do consumo de substrato, e conseqüentemente perda da produtividade de etanol. Em trabalhos anteriores, a análise ampla do genoma tinha sido empregada para a seleção de genes candidatos para a construção de micro-organismos mais tolerantes ao etanol. Hirasawa et al. (2007) com análise de *microarrays* de DNA, relataram que o aumento da expressão de genes relacionados à biossíntese de triptofano confere maior tolerância ao estresse de etanol para as células de levedura, comprovando em seus resultados que, de fato, linhagens de laboratório com sobre-expressão de genes da biossíntese de triptofano apresentaram tolerância a 5% de etanol. Assim como em trabalho de Yoshikawa et al. (2009), que quantificaram o comportamento de crescimento de linhagens com deleção única no gene sob estresse de etanol, e constataram que as linhagens com deleção nos genes classificados na categoria de “metabolismo de triptofano” foram sensíveis a 8% de etanol. Portanto, comprovando a importância do gene *TRP1* na tolerância da célula de levedura ao etanol. O gene *MSN2* codifica para um fator de transcrição, que em condições normais essa proteína Msn2 permanece no citosol. O propósito da intervenção na expressão desse gene se baseia no interesse de que a forma intranuclear do fator de transcrição (forma hiperfosforilada) seja mais expressa, provocando assim um fenótipo de resposta ao estresse de forma constitutiva. A intenção seria, que as linhagens apresentassem alta expressão desse fator de transcrição dentro do núcleo da célula em resposta ao estresse, não precisando sair ao citosol para receber o estímulo que desencadeasse a resposta ao fator estressante (HONG et al., 2010).

Neste trabalho os genes *TRP1* e *MSN2* foram modificados em suas regiões promotoras no genoma das linhagens padrão de laboratório (CEN.PK2-1C) e industrial (CAT-1), através da técnica de engenharia genômica com o intuito de incrementar a tolerância ao etanol.

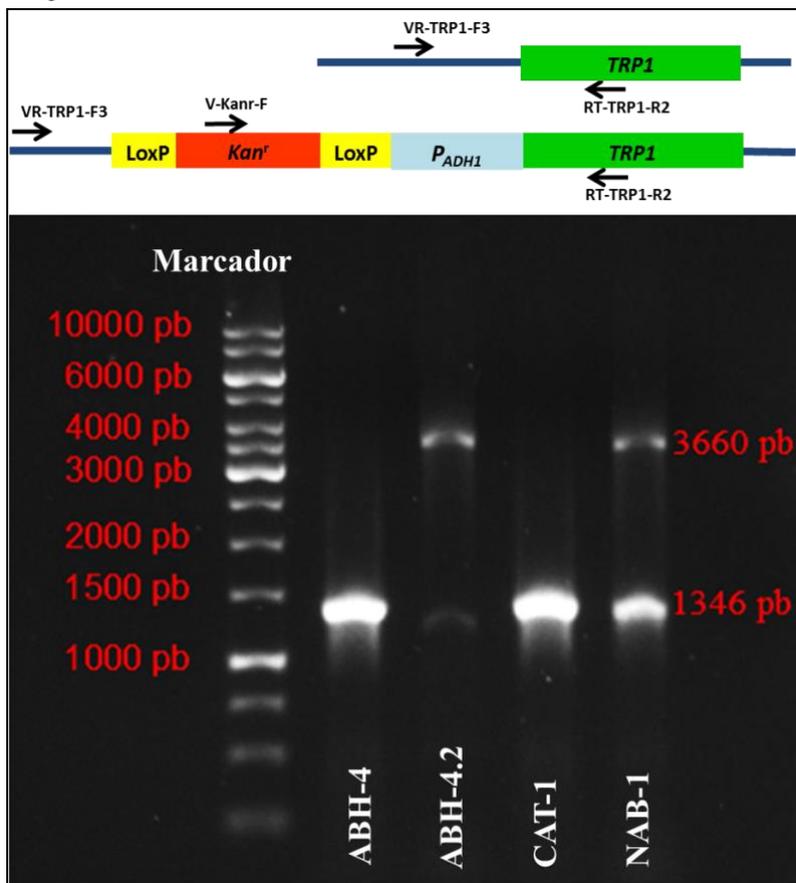
3.1.1 Obtenção de linhagens recombinantes no gene *TRP1*

Primeiramente, a levedura de laboratório (CEN.PK2-1C) precisou ter o seu gene *TRP1* restaurado, uma vez que essa levedura possui um alelo mutante (*trp1-289*) no seu genoma. Para isso, foi amplificado o gene *TRP1* funcional da levedura de laboratório haplóide S288C (Tabela 1) e foi substituído o gene completo por recombinação homóloga, crescendo em meio sintético SC^{Trp}, originando a linhagem ABH-4 (Figura 9). A seguir, fragmentos lineares de DNA, chamados “módulos de sobre-expressão”, foram confeccionados por PCR utilizando uma linhagem de laboratório BSY21-34B3 como DNA molde, com o intuito de expressar o gene *TRP1* constitutivamente. A linhagem de laboratório BSY21-34B3 possui em seu genoma o gene *iSUC2* (invertase intracelular) controlado pelo promotor forte e constitutivo *ADH1* e um gene que confere resistência à geneticina, KanMX (Tabela 1).

Para a obtenção de linhagens com o gene *TRP1* sobre-expresso, inicialmente foi necessário realizar a transformação da levedura de laboratório ABH-4, através de recombinação homóloga utilizando um módulo de sobre-expressão amplificado pelos iniciadores TRP1-LPKanr-F1 e TRP1-ADH1-LPKanr-R4 (Tabela 2), esses módulos apresentavam aproximadamente ≈ 2.400 pb de comprimento, e nas extremidades, sequências homólogas às regiões cromossômicas a montante (40 pb) e no início (40 pb) do gene *TRP1*. As células da linhagem ABH-4 foram transformadas a partir da amplificação desses módulos de sobre-expressão, e em seguida inoculadas na superfície de placas de Petri contendo meio de cultura suplementado com geneticina. Por recombinação homóloga, houve a integração dos módulos de sobre-expressão no genoma de algumas células, permitindo o desenvolvimento de colônias resistentes ao antibiótico. Os DNAs genômicos, das colônias que se desenvolveram na superfície da placa de Petri, foram extraídos e analisados por PCR, para verificar a presença ou a ausência dos módulos genéticos imediatamente anteriores ao gene *TRP1* nas linhagens. O DNA genômico da linhagem recombinante foi submetido à PCR com os iniciadores de verificação VR-TRP1-F3 (que hibridiza numa região cromossômica a montante do módulo de sobre-expressão) e RT-TRP1-R2 (que hibridiza a jusante do gene *TRP1*), e observou-se amplificação de um fragmento com 1.346 pb de comprimento indicando a presença do gene *TRP1*, e a amplificação de um fragmento de 3.660 pb, indicando que o módulo de sobre-expressão foi inserido corretamente no genoma das leveduras recombinantes (Figura 9). As

células recombinantes foram isoladas para análises posteriores, e denominadas ABH-4.2 ($P_{ADHI}::TRP1$).

Figura 9 - Confirmação por PCR da inserção do módulo de sobre-expressão na região anterior ao gene *TRP1* no genoma de linhagens de *S. cerevisiae*. Utilizando dois pares de iniciadores (VR-TRP1-F3 e RT-TRP1-R2), os tamanhos dos fragmentos obtidos por PCR indicam a presença da construção desejada: 1.346 pb nas linhagens *TRP1* (ABH-4 e CAT-1), e/ou 3.660 pb nas linhagens $P_{ADHI}::TRP1$ (ABH-4.2. e NAB-1)

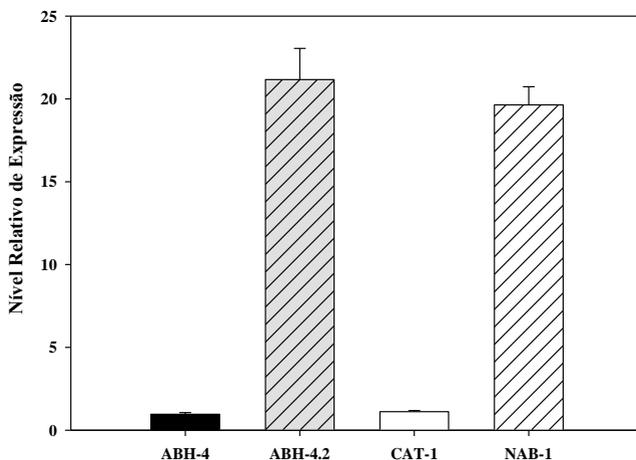


Fonte: Bückner (2014)

Posteriormente foi utilizada a mesma estratégia de engenharia genômica para transformar a levedura industrial CAT-1, porém, foi utilizado o DNA molde da própria linhagem ABH-4.2, obtendo-se a

linhagem industrial recombinante NAB-1 ($P_{ADHI}::TRP1 / TRP1$). Como pode ser observado na Figura 9, a análise por PCR com os iniciadores VR-TRP1-F3 e RT-TRP1-R2 da linhagem NAB-1 revelou a presença de dois produtos com tamanhos de 1.346 e 3.660 pb, indicando que apenas um gene no genoma diplóide da linhagem NAB-1 foi modificado. Em uma outra abordagem, a inserção do módulo de sobre-expressão foi confirmada por PCR utilizando os iniciadores TRP1-R e V.kanr-F (que hibridiza no meio do gene *KanMX* presente no módulo, vide Tabela 2), sendo que nesse caso foi obtido um produto de PCR com 2.020 pb apenas nas linhagens $P_{ADHI}::TRP1$ (linhagens ABH-4.2 e NAB-1), e não foi obtida nenhuma amplificação nas linhagens ABH-4 ou CAT-1 (dados não mostrados). A análise da expressão do gene *TRP1* nas linhagens parental e recombinantes, por PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR), confirmou que nas linhagens ABH-4.2 e NAB-1 ($P_{ADHI}::TRP1$) a expressão do gene é aproximadamente 20 vezes maior do que o observado nas linhagens parentais ABH-4 e CAT-1 (Figura 10), confirmando o sucesso na estratégia desenvolvida.

Figura 10 - Análise da expressão do gene *TRP1* por qRT-PCR. O RNA total de cada linhagem foi preparado de amostras coletadas às 5 horas de fermentação em batelada simples de 200 g/L de sacarose, submetido à transcrição reversa para obtenção do DNac, e a análise da expressão gênica determinado por qRT-PCR. Os limites (*thresholds*) de cada ciclo para cada gene foram normalizados com o gene *ACT1*. A expressão relativa de cada linhagem representa a diferença na abundância dos transcritos, e as barras de erro representam os desvios padrão de duas determinações.

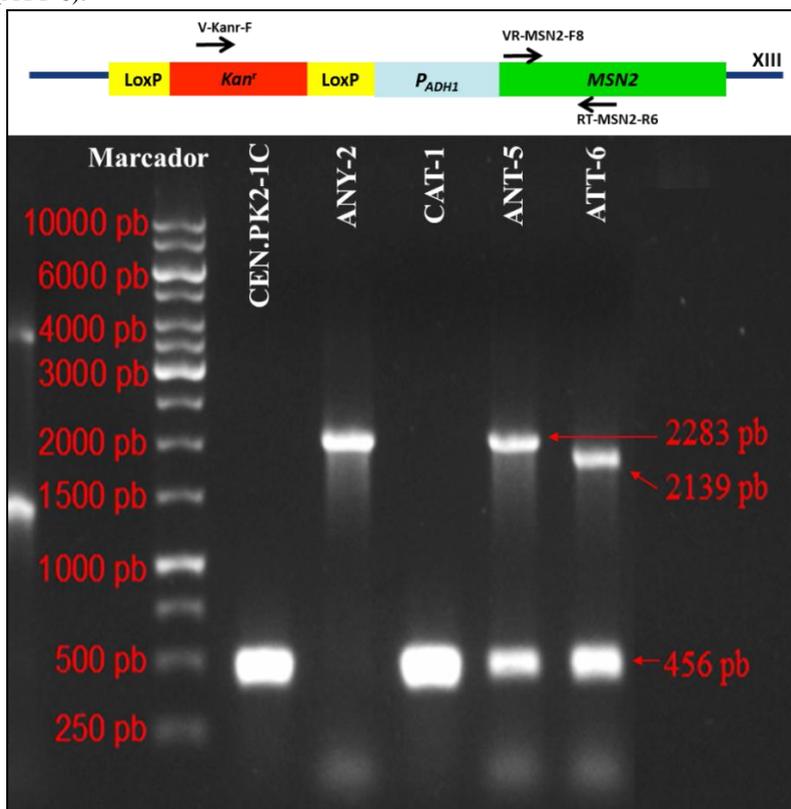


Fonte: Bucker (2014)

3.1.2 Obtenção de linhagens recombinantes no gene *MSN2*

Uma estratégia semelhante à usada com o gene *TRP1* foi empregada para sobre-expressar o gene *MSN2* nas leveduras, utilizando os iniciadores MD.MSN2-F2 e MD.MSN2-R2 (Tabela 2). Os DNAs genômicos das colônias que cresceram em geneticina foram extraídos e analisados por PCR, para verificar a presença dos módulos genéticos $P_{ADH1}::MSN2$ substituindo o promotor natural do gene *MSN2* (Figura 11).

Figura 11 - Confirmação por PCR da inserção do módulo de sobre-expressão na região anterior ao gene *MSN2* no genoma de linhagens de *S. cerevisiae*. Os tamanhos dos fragmentos obtidos indicam a presença da construção desejada. Foram utilizados os seguintes pares de iniciadores: VR-MSN2-F8 e RT.MSN2-R6 – 456 pb; V-Kanr-F e RT.MSN2-R6 – 2283 pb (ANY-2; ANT-5) e 2139 pb (ATT-6).

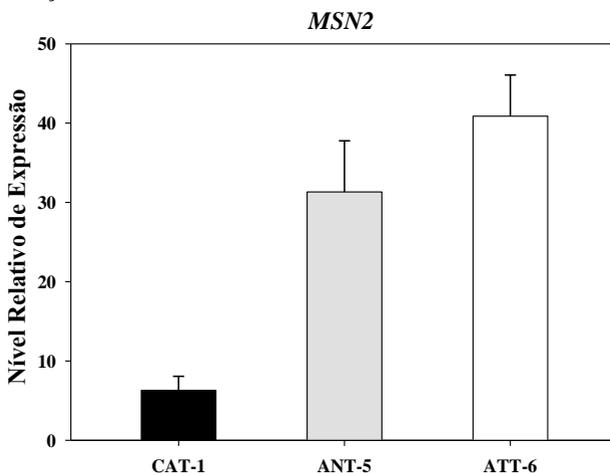


Fonte: Bucker (2014)

Quando foram utilizado os iniciadores de verificação VR-MSN2-F8 (que hibridiza na região cromossômica no início do gene *MSN2*), V-Kanr-F (que hibridiza numa região no meio do gene *KanMX* no módulo de sobre-expressão) e RT.MSN2-R6 (que hibridiza no meio do gene *MSN2*), observou-se amplificação de um fragmento com 456 pb indicando que as linhagens apresentam o gene *MSN2* (Figura 11), e a amplificação de um fragmento de 2.283 pb (Figura 13) nas linhagens ANY-2 (derivada da CEN.PK2-1C, vide Tabela 1) e ANT-5 (derivada da linhagem industrial CAT-1, vide Tabela 1), indicando que o módulo de sobre-expressão está inserido à frente do gene *MSN2* (Figura 11).

Apesar de provavelmente apenas um gene no genoma diplóide da linhagem ANT-5 ter sido modificada, claramente o gene *MSN2* se apresenta sobre-expresso (Figura 12). A análise da expressão do gene *MSN2* por qRT-PCR na linhagem ANT-5 ($P_{ADHI}::MSN2$) está ilustrada na Figura 12, confirmando que a expressão do gene é aproximadamente 7 vezes maior do que o observado na linhagem parental CAT-1 (Figura 12) obtendo sucesso com a estratégia proposta.

Figura 12 - Análise da expressão do gene *MSN2* por qRT-PCR. O RNA total de cada linhagem foi preparado de amostras coletadas às 3 horas de fermentação em batelada simples de 200 g/L de sacarose, submetido à transcrição reversa para obtenção do DNac, e a análise da expressão gênica determinado por qRT-PCR. Os limites (*thresholds*) de cada ciclo para cada gene foram normalizados com o gene *ACT1*. A expressão relativa de cada linhagem representa a diferença na abundância dos transcritos, e as barras de erro representam os desvios padrão de duas determinações.



Fonte: Bücker (2014)

Na linhagem industrial CAT-1 foi introduzido um módulo para sobre-expressar o gene *MSN2-Truncado* ($P_{ADHI}::MSN2-T$), utilizando os iniciadores MD.MSN2-F2 e MD.MSN2T-R7 (que hibridiza a partir de 145 pb após o início de gene *MSN2*, Tabela 2). A presença do módulo genético, inserido imediatamente após o aminoácido número 48 do gene *MSN2*, na linhagem recombinante foi confirmada por PCR com os iniciadores de verificação utilizados acima (VR-MSN2-F8, V-Kanr-F e RT.MSN2-R6, vide Tabela 2). Observou-se à amplificação de um fragmento com 456 pb de comprimento (Figura 11), indicando que a linhagem apresentava o gene *MSN2*, e um fragmento de 2.139 pb, indicando que o módulo de sobre-expressão está inserido no início do gene *MSN2* da levedura recombinante ATT-6, causando a deleção dos primeiros 48 aminoácidos do domínio de ativação de transcrição (região TAD) do fator de transcrição codificado pelo gene *MSN2*.

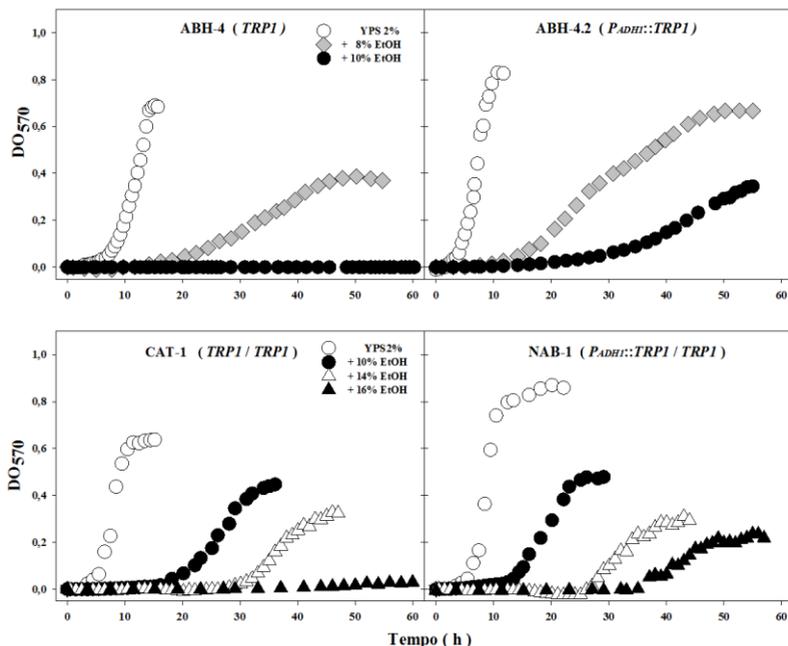
A análise da expressão do gene *MSN2* por qRT-PCR na linhagem ATT-6 ($P_{ADHI}::MSN2-T$) está ilustrada na Figura 12, confirmando que a expressão do gene é aproximadamente 8 vezes maior do que o observado na linhagem parental CAT-1 (Figura 12) obtendo, portanto, sucesso com a estratégia proposta.

3.2 Análise da Tolerância ao Etanol pelas Linhagens Recombinantes

Para investigar o impacto da sobre-expressão do gene *TRP1* na tolerância ao etanol nas linhagens de laboratório de *S. cerevisiae* recombinantes, as linhagens ABH-4 e ABH-4.2 foram cultivadas em meio líquido YP contendo 2% de sacarose com diferentes concentrações de etanol em leitor de microplacas de 96 poços, e a DO_{570} determinado a cada 15 minutos. A densidade de células na inoculação foi ajustada para cerca de 10^6 células/mL, porque o tamanho do inóculo afeta a duração da fase *lag* de crescimento das células de levedura, como descrito por Walker-Caprioglio et al. (1985). A análise do crescimento das células da linhagem de laboratório ABH-4 em meio líquido YP contendo 2% de sacarose, adicionado de diferentes concentrações de etanol (Figura 13) é apresentado que na presença de 8% (V/V) de etanol afeta a velocidade de ambas as fases *lag* e exponencial de crescimento, enquanto que 10% de etanol aboliu completamente o crescimento da linhagem ABH-4. A linhagem recombinante ABH-4.2 ($P_{ADHI}::TRP1$) cresceu melhor do que a linhagem parental, em todos os meios testados, inclusive na presença de 10% de etanol (Figura 13). Esses resultados foram consistentes com os obtidos por Hirasawa et al. (2007), indicando que a sobre-expressão

do gene *TRP1* envolvido na biossíntese do triptofano pode aumentar a tolerância ao etanol em linhagens de laboratório de *S. cerevisiae*.

Figura 13 - Tolerância ao estresse de etanol em linhagens de laboratório e industrial com sobre-expressão do gene *TRP1* em condições microaeróbias. O crescimento foi medido em meio líquido YP contendo 2% de sacarose, com as concentrações indicadas de etanol (% V/V) em um leitor de microplacas TECAN. **A.** Crescimento da linhagem de laboratório ABH-4 (*TRP1*) e a recombinante ABH-4.2 ($P_{ADHI}::TRP1$). **B.** Crescimento da linhagem industrial CAT-1 (*TRP1* / *TRP1*) e a recombinante NAB-1 ($P_{ADHI}::TRP1$ / *TRP1*).



Fonte: Bücker (2014)

A Figura 13 mostra também que a linhagem industrial CAT-1 é mais tolerante ao etanol do que as linhagens de laboratório, pois é possível observar crescimento mesmo na presença de até 14% de etanol, enquanto a linhagem de laboratório não apresentou crescimento em 10% de etanol. Da mesma forma, a sobre-expressão do gene *TRP1* na linhagem industrial apresentou maior crescimento na ausência de etanol. Carrasco et al. (2001) em condições experimentais diferentes encontraram apenas uma linhagem industrial da produção de vinho capaz de crescer em 15% de etanol após 5 dias de incubação. Vários

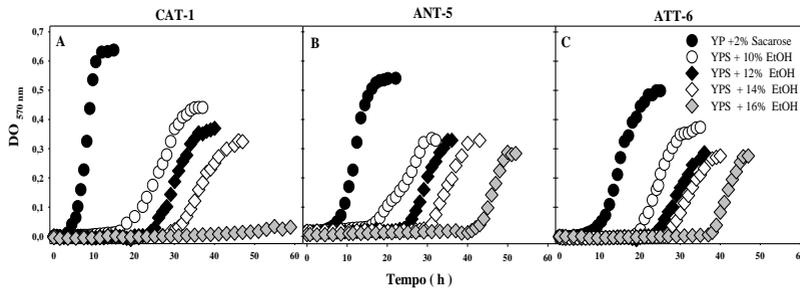
estudos demonstraram a relação entre a biossíntese de aminoácidos e tolerância ao estresse de etanol em células de leveduras (TAKAGI et al., 2005; HIRASAWA et al., 2007; LI et al., 2010). A biossíntese de aminoácidos é uma atividade de elevado custo de energia para as células de leveduras, especialmente metionina e os aminoácidos aromáticos, como o triptofano.

Como mencionado anteriormente na Figura 13, o desempenho de crescimento durante os cultivos com estresse por etanol (10%) revelou uma tolerância natural maior para a linhagem recombinante industrial NAB-1 ($P_{ADHI}::TRP1/TRP1$), do que da linhagem de laboratório ABH-4.2, também sobre-expressando o gene *TRP1*. Uma parte desses resultados pode ser explicada pela diferença de *background* entre essas leveduras (vide Tabela 1). As linhagens de laboratório possuem alguma auxotrofia e as linhagens industriais possuem adaptações tanto físicas ao meio ambiente das dornas de fermentação, quanto um ambiente competitivo pela captura de fontes de nutrientes contra outras espécies oportunistas presentes no fermentador. Além disso, linhagens diplóides e haplóides frequentemente apresentam tolerância diferente para uma variedade de fatores de estresse, mesmo apresentando um mesmo *background* (KATOU et al., 2008). A maioria dos trabalhos sobre tolerância ao etanol, geralmente utilizam linhagens de laboratório para experimentos com concentrações baixas ou moderadamente altas de etanol (5-12%). Quanto as linhagens industriais, os resultados têm se mostrado contraditórios, com alguns artigos mostrando menor resistência a esse estresse quando comparados a linhagens de laboratório (ALBERS; LARSSON, 2009; BRAVIM et al., 2010), enquanto que outros trabalhos têm mostrado que algumas linhagens industriais podem ser claramente mais tolerantes (BADOTTI et al. 2010), provavelmente refletindo a natureza poligênica da resistência ao etanol pelas leveduras. Um estudo recente em grande escala analisando a tolerância ao estresse de etanol de diversas linhagens de levedura (laboratório e industrial), revelou que muitas das linhagens industriais brasileiras, utilizadas na produção de etanol combustível, são realmente mais resistentes e capazes de crescer em altas concentrações (15-17%) de etanol (SWINNEN et al., 2012; PAIS et al., 2013).

A Figura 14 mostra os resultados dos crescimentos obtidos com as linhagens industriais sobre-expressando o gene *MSN2* e sua forma truncada. Ambas as linhagens recombinantes ANT-5 ($P_{ADHI}::MSN2 / MSN2$) e ATT-6 ($P_{ADHI}::MSN2-T / MSN2$), apresentaram maior tolerância ao etanol (16%), enquanto a linhagem CAT-1 (controle) não apresentou crescimento celular nessa condição. Esses resultados

corroboram com os obtidos por Hong et al. (2010), indicando que a sobre-expressão do gene *MSN2* truncado pode aumentar a tolerância ao etanol em uma linhagem industrial de *S. cerevisiae*. Por outro lado, as linhagens recombinantes no gene *MSN2* apresentaram um desempenho inferior à linhagem parental quanto ao crescimento celular na condição controle em meio líquido YP contendo 2% de sacarose.

Figura 14 - Tolerância ao estresse de etanol nas linhagens industriais com sobre-expressão do gene *MSN2* ou *MSN2-T*. Crescimento em meio líquido YP contendo 2% de sacarose das linhagens CAT-1 (*MSN2* / *MSN2*); ANT-5 (*P_{ADHI}::MSN2* / *MSN2*) e ATT-6 (*P_{ADHI}::MSN2-T* / *MSN2*) com as concentrações indicadas de etanol (% , V/V), realizado em um leitor de microplacas TECAN.



Fonte: Bucker (2014)

3.3 Determinação da Resistência a Diferentes Condições de Estresse pelas Linhagens Modificadas no Gene *MSN2*

Considerando que o gene *MSN2* regula a expressão de diversos outros genes envolvidos na resposta geral ao estresse (MARTÍNEZ-PASTOR et al., 1996; MAYORDOMO et al., 2002), avaliamos a tolerância da linhagem industrial CAT-1 e das recombinantes ANT-5 e ATT-6 a várias condições de estresse (IVORRA et al., 1999; DELLA-BIANCA; GOMBERT, 2013). Diluições seriadas de cada linhagem foram inoculadas em placas de Petri contendo meio sólido YP e 2% de glicose (considerado o controle normal de crescimento), ou este mesmo meio contendo 30% de glicose ou suplementado com diversas concentrações de NaCl, H₂O₂ ou etanol, ou ainda alta temperatura (40 °C). O crescimento foi acompanhado por 6 dias, e registrado diariamente. A Figura 15 mostra que as 3 linhagens industriais são tolerantes à temperatura de 40 °C, já que o crescimento registrado após 48 horas é idêntico ao das linhagens crescidas na temperatura controle

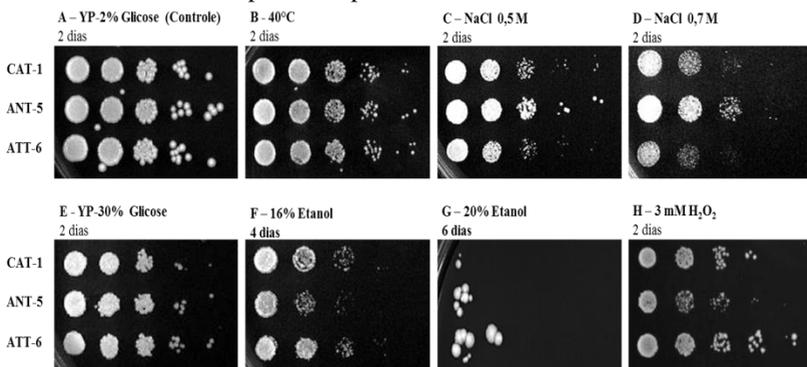
(28 °C). Della-Bianca e Gombert (2013) reportaram recentemente, utilizando uma metodologia semelhante à empregada neste trabalho, que várias das linhagens industriais brasileiras (p.ex. CAT-1, BG-1 e JP1) se caracterizam por serem termotolerantes, enquanto que as linhagens de laboratório (p.ex. S288C e CEN.PK113-7D), ou ainda uma linhagem industrial (PE-2), mostraram-se sensíveis à temperatura de 40 °C. As três linhagens industriais também se mostraram igualmente resistentes ao estresse osmótico provocado pela alta concentração de açúcar no meio (30% de glicose), em concordância com os estudos realizados por outros pesquisadores utilizando tanto linhagens industriais quanto de laboratório (BELLOCH et al., 2008; ALBERS; LARSSON, 2009; JIMÉNEZ-MARTÍ et al., 2011). É importante salientar que 20% de açúcar no meio de cultura já é uma concentração que desencadeia uma resposta de estresse em *S. cerevisiae* (GOMAR-ALBA et al., 2012). No entanto, a sobre-expressão do gene *MSN2*, ou da sua versão truncada (*MSN2-T*), não incrementou a tolerância das linhagens às altas concentrações de açúcar (Figura 15).

Em relação à tolerância ao estresse salino provocado por elevadas concentrações (0,5 e 0,7 M) de NaCl, os resultados mostrados na Figura 15 indicam que a sobre-expressão do gene *MSN2* (linhagem ANT-5) permitiu um maior crescimento das células, enquanto que a linhagem que sobre-expressa o gene *MSN2* truncado (linhagem ATT-6) foi igualmente afetada pelo estresse salino quanto a linhagem parental CAT-1. De qualquer forma, os resultados corroboram os resultados reportados por Gasch et al. (2000) e Berry e Gasch (2008), que mostraram que o gene *MSN2* é induzido durante o estresse salino provocado pelo NaCl, indicando que este fator de transcrição estaria envolvido na resposta a esse tipo de estresse.

A Figura 15 mostra ainda que quando o crescimento foi avaliado em placas contendo 16% de etanol, após 4 dias, é possível verificar um menor crescimento das linhagens recombinantes em relação ao controle, sendo que a linhagem ANT-5 (que sobre-expressa o *MSN2*) foi mais afetada por essa concentração de etanol do que a linhagem referência CAT-1, ou a linhagem que sobre-expressa a forma truncada do gene *MSN2* (linhagem ATT-6). Os resultados com a linhagem ANT-5 confirmam os dados reportados por Sasano et al. (2012) que indicam que a sobre-expressão do gene *MSN2* aumenta a sensibilidade das células a altas concentrações de etanol. Cabe salientar que essa concentração de etanol (16%) inibiu o crescimento da linhagem parental CAT-1 em condições microaeróbias (vide Figuras 13 e 14), enquanto que na Figura 15 as células foram incubadas em placas e portanto o

crescimento pode ser considerado aeróbio. Portanto, esses resultados sugerem que o estresse provocado pelo etanol afeta as células de forma diferente dependendo se há ou não disponibilidade de oxigênio. Por outro lado, uma concentração maior de etanol (20%) praticamente inibiu completamente o crescimento da linhagem CAT-1 (Figura 15), enquanto que algumas colônias são visíveis para a linhagem ANT-5, mas principalmente com a linhagem que sobre-expressa o gene *MSN2* truncado (linhagem ATT-6).

Figura 15 – Análise da tolerância a diversos estresses pelas linhagens industriais com sobre-expressão do gene *MSN2* ou *MSN2-T*. As células obtidas em crescimento exponencial em meio líquido YP contendo 2% de glicose foram transferidas para placas com meio sólido YP contendo 2% de glicose com diferentes condições de estresse, como indicado. A condição controle (A) é livre de estresse e incubada a 28 °C. As linhas representam diferentes linhagens e as colunas representam diluições seriadas. As imagens foram registradas após o número de dias descrito para cada placa.



Fonte: Bucker (2014)

Finalmente, outra condição avaliada foi o estresse oxidativo provocado pelo peróxido de hidrogênio. Os resultados indicam que as leveduras industriais são igualmente resistentes à concentração de 2 mM de H_2O_2 (crescimento semelhante à condição controle, dados não mostrados), mas no meio contendo 3 mM de H_2O_2 (Figura 15) a linhagem ANT-5 (que sobre-expressa *MSN2*) teve menor crescimento que a linhagem parental, enquanto que a linhagem que sobre-expressa a versão truncada do gene *MSN2* (linhagem ATT-6) foi mais resistente a este tipo de estresse. Embora Sasano et al. (2012) tenham relatado que as linhagens de laboratório contendo plasmídeos que sobre-expressam o gene *MSN2* foram mais resistentes a 2 mM de H_2O_2 , como as leveduras

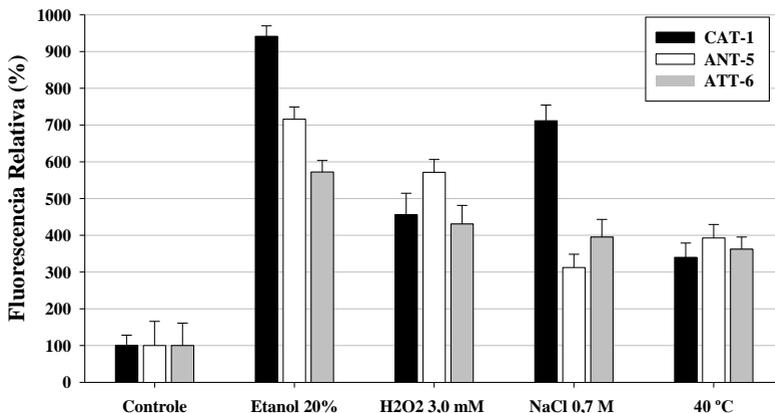
industriais analisadas já são resistentes a essa concentração de peróxido de hidrogênio, os resultados indicam que a sobre-expressão do gene *MSN2* em leveduras industriais não necessariamente melhora a tolerância ao estresse oxidativo, mas isto precisa ser melhor avaliado já que a linhagem ATT-6 que sobre-expressa a versão truncada do gene *MSN2* mostrou-se mais tolerante a este tipo de estresse.

Em resumo, é possível afirmar que nenhuma das linhagens industriais recombinantes para o gene *MSN2* investigadas é a mais tolerante à todas as condições de estresse testadas neste trabalho. Isto provavelmente é relacionado ao fato de que a linhagem CAT-1 foi selecionada e isolada de usinas de cana-de-açúcar, ou seja, já se encontram bem adaptadas as condições de estresse do processo industrial.

Apesar da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) ser geralmente associada com a respiração celular, há evidências de que ROS podem ser formados mesmo durante o metabolismo fermentativo (LANDOLFO et al., 2008), o que significa que o estresse oxidativo pode também ocorrer durante a produção de etanol combustível industrial. Inclusive, é sugerido (COSTA et al., 1997; DU; TAKAGI, 2007; IINOYA et al., 2009) que concentrações estressantes de etanol apresentam toxicidade às células através da geração intracelular de ROS. Desta forma, avaliamos os níveis de espécies reativas de oxigênio nas linhagens recombinantes para o gene *MSN2* durante a exposição às diferentes condições de estresse. Como pode ser observado na Figura 16, todas as condições de estresse testadas (exposição a 20% etanol, H_2O_2 3 mM, NaCl 0,7 M ou temperatura de 40 °C) elevaram os níveis de oxidação intracelular nas células.

Condizente com os resultados apresentados na Figura 15, a exposição das linhagens a 20% etanol foi o estresse que mais incrementou os níveis de ROS nas células (Figura 16), sendo que as linhagens recombinantes de *S. cerevisiae* sobre-expressando *MSN2* mostraram uma diminuição ($\approx 25\%$) no nível de fluorescência relativa após este estresse (quando comparado à fluorescência relativa da linhagem CAT-1), enquanto que a linhagem ATT-6 (que sobre-expressa a forma truncada do *MSN2*) apresentou uma diminuição de $\approx 39\%$ no nível de ROS detectado por fluorescência (Figura 16), e foi a única linhagem a apresentar algum crescimento nessa condição de estresse (vide Figura 15). Esses resultados sugerem que concentrações estressantes de etanol provocam toxicidade através da geração intracelular de ROS, em adição a dano deletério na membrana celular e em proteínas celulares.

Figura 16 – Nível de oxidação intracelular nas linhagens de *S. cerevisiae*. A intensidade da fluorescência do DCF-DA foi determinada por espectrofotometria nas linhagens CAT-1 e nas recombinantes ANT-5 e ATT-6 após o estresse provocado pela exposição por 6 horas na presença de 20% (V/V) etanol, 1 hora em H₂O₂ 3,0 mM, 4 horas na presença de NaCl 0,7 M, ou ainda 4 horas de incubação a 40 °C. A intensidade de fluorescência de cada linhagem antes da exposição ao estresse (controle) foi considerando 100%. Os resultados indicam a média e o desvio padrão de três experimentos independentes.



Fonte: Bucker (2014)

Após incubação por 1 hora na presença de H₂O₂ 3,0 mM, foi possível também verificar uma correlação entre os resultados obtidos avaliando o crescimento de diluições seriadas em placas nessa condição de estresse (Figura 15), com os resultados obtidos para avaliar o nível intracelular de ROS, uma vez que a linhagem mais sensível ao peróxido de hidrogênio (linhagem ANT-5, que sobre-expressa o gene *MSN2*) é a que possui os maiores níveis de ROS nessa condição de estresse oxidativo. No entanto, a linhagem mais resistente (ATT-6, que sobre-expressa a forma truncada do *MSN2*, vide Figura 15) apresentou os mesmos níveis de ROS detectado por fluorescência do que a linhagem parental CAT-1 (Figura 16). É importante salientar que a resposta específica ao estresse oxidativo é controlada também por outros 2 fatores de transcrição codificados pelos genes *YAP1* e *SKN7*, embora o envolvimento do fator de transcrição *MSN2* seja evidente, uma vez que uma linhagem duplo mutante *msn2Δmsn4Δ* apresenta hipersensibilidade ao H₂O₂ (HASAN et al., 2002). Após o estresse salino provocado pela exposição a 0,7 M de NaCl por 4 horas (Figura 16) podemos perceber que a linhagem ANT-5 (*P_{ADHI}::MSN2*) apresentou os menores níveis de

ROS intracelulares e foi a linhagem que melhor cresceu nessa condição de estresse (Figura 15). Embora a linhagem industrial CAT-1 seja tão sensível ao estresse salino quanto a linhagem ATT-6 (*P_{ADHI}::MSN2-T*), indicando menor geração de ROS intracelulares durante o estresse salino (Figura 16). Apesar de Sadeh et al. (2012) terem demonstrado que o gene *MSN2* truncado promove a expressão da *HSP12* e de uma das subunidades do complexo de síntese de trealose (codificada pelo gene *TPS2*) durante o estresse provocado por NaCl 0,5 M, é importante salientar que as respostas ao estresse salino envolvem outras vias regulatórias como a via de sinalização de cálcio pela calcineurina, ou a via de sinalização HOG, regulando a expressão da ATPase de membrana (codificada pelo gene *ENA1*) responsável pela extrusão do sódio da célula (POSAS et al. 2000). Finalmente, durante o estresse provocado por altas temperaturas (40 °C durante 4 horas) os níveis de ROS intracelulares claramente aumentaram, quando comparado à condição controle (Figura 16), embora não haja diferença entre as três linhagens analisadas. Este resultado é condizente com o apresentado na Figura 15, uma vez que as três linhagens cresceram igualmente nessa condição de estresse.

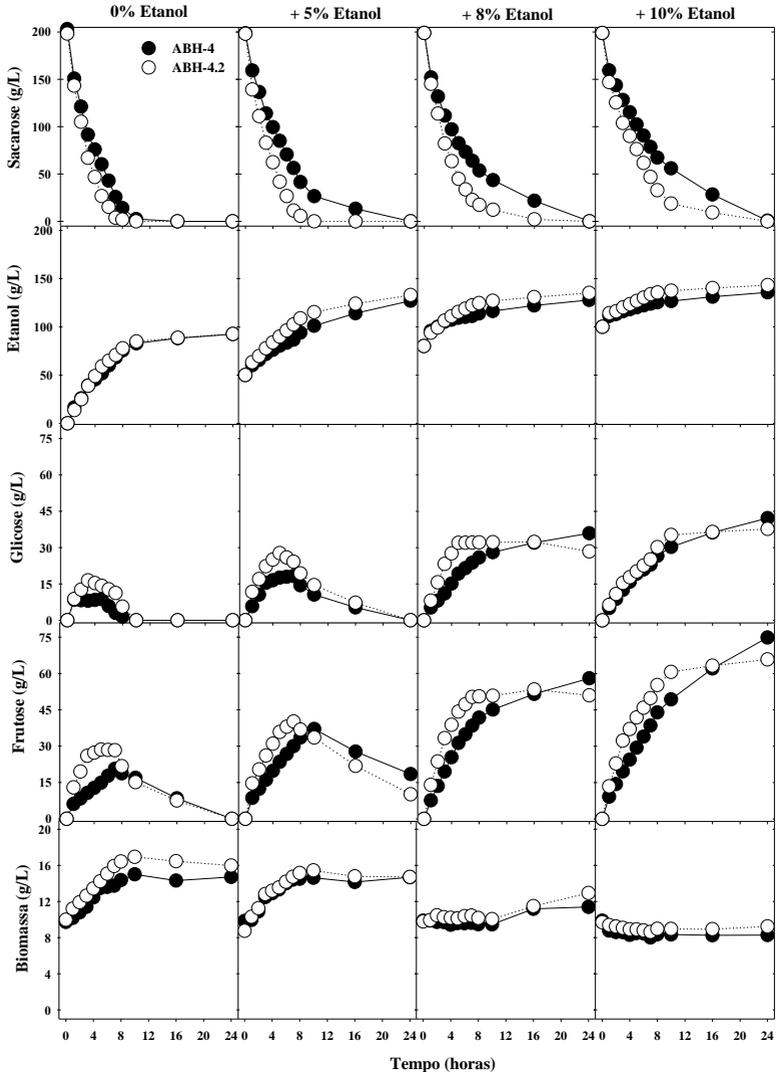
3.4 Análise da Performance Fermentativa das Linhagens Recombinantes

3.4.1 Fermentações em Batelada Simples

A seguir foi investigado se a melhora no crescimento celular em altas concentrações de etanol poderia levar a produtividades mais elevadas de etanol durante a fermentação pelas linhagens de *S. cerevisiae*. Inicialmente foram avaliadas as linhagens de laboratório em um sistema de fermentação em batelada com meio YP contendo altas concentrações de sacarose (200 g/L), na ausência e na presença de etanol (5%, 8% ou 10%).

Na Figura 17 podemos visualizar as fermentações com ambas as linhagens de laboratório apresentando o mesmo perfil cinético de hidrólise e consumo de sacarose, produzindo quantidades de glicose e frutose no meio, que foram subsequentemente consumidas pelas leveduras, permitindo uma produção de ≈ 92 g/L de etanol. Na presença de 5% de etanol ao início da fermentação, foi observado uma clara redução da cinética de hidrólise de sacarose, em especial para a linhagem referência ABH-4 (*TRP1*). Apesar dessa linhagem hidrolisar sacarose mais lentamente na presença de etanol adicionado no início da fermentação, a glicose e especialmente a frutose liberada para o meio também foram consumidos mais lentamente (no caso da frutose, ainda restavam ≈ 18 g/L no meio, mesmo após 24 horas de fermentação) e, conseqüentemente, menos etanol foi produzido, atingindo um máximo de 127 g/L (Figura 17). Por outro lado, a linhagem sobre-expressando *TRP1* (ABH-4.2) consumiu os açúcares monossacarídeos mais eficientemente e com isso, produziu mais etanol (133 g/L) em comparação com a linhagem controle (Tabela 3).

Figura 17 – Fermentação em batelada de 200 g/L de sacarose com as linhagens de laboratório. As cinéticas de consumo de açúcares e produção de etanol pelas linhagens ABH-4 (símbolos pretos) e ABH-4.2 (símbolos brancos) foram determinadas em meio rico YP contendo altas concentrações de sacarose na ausência ou presença de 5%, 8% ou 10% de etanol adicionado no início das fermentações.



Fonte: Bücker (2014)

No caso das linhagens industriais, as fermentações com elevadas concentrações de sacarose (200 g/L), foi observada uma performance fermentativa semelhante na produção de etanol, bem como nenhuma diferença significativa no rendimento da fermentação (Tabela 3), sendo que ambas as linhagens produziram ≈ 95 g/L de etanol (Figura 18).

Tabela 3 - Rendimento e produtividade de etanol nas fermentações em batelada de 200 g/L de sacarose pelas linhagens modificadas no gene *TRP1*.

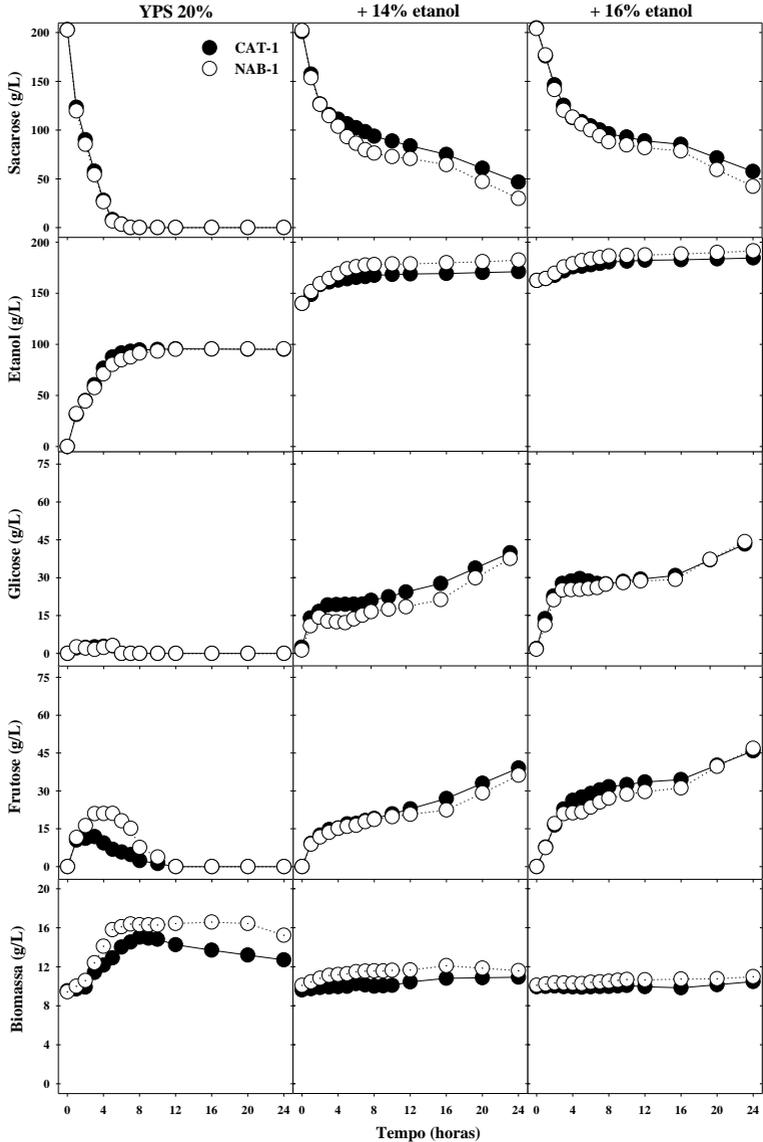
Linhagens	$Y_{E/S}$ (g _{etanol} /g _{sacarose})			P_{etanol} (g / L / h)		
	Controle	+ 5% EtOH	+ 10% EtOH	Controle	+ 5% EtOH	+ 10% EtOH
ABH-4	0,46	0,41	0,44	9,40	4,48	2,00
ABH-4.2	0,47	0,42	0,46	9,70	5,06	3,10
	Controle	+ 14%	+ 16%	Controle	+ 14%	+ 16%
		EtOH	EtOH		EtOH	EtOH
CAT-1	0,47	0,40	0,37	17,46	3,12	2,80
NAB-1	0,47	0,43	0,40	16,35	4,24	3,89

Fonte: Bucker (2014)

Tendo em vista esses resultados, a atividade da enzima invertase foi determinada durante as fermentações em batelada na ausência de estresse ao etanol. Apesar de ambas as linhagens de laboratório apresentaram praticamente a mesma atividade de invertase no início da fermentação até 3 horas, após esse período a linhagem recombinante ABH-4.2 produziu níveis mais elevados da enzima quando comparado com a linhagem referência ABH-4 (

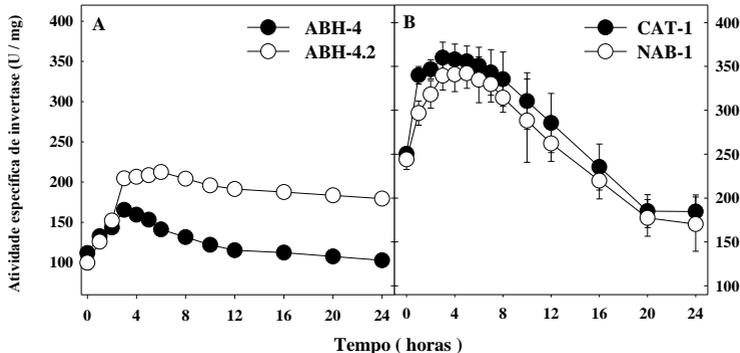
Figura 19-A). As cinéticas mais lentas de consumo de glicose, e especialmente de frutose, em fermentação na presença de etanol 10% (Figura 17) são mais difíceis de explicar, mas estão de acordo com publicação recente mostrando que em alta concentração de etanol há a inibição da fermentação de monossacarídeos (especialmente frutose) em células de leveduras (ZINNAI et al., 2013). Em geral, a maior velocidade de crescimento e produtividade de etanol da linhagem recombinante de laboratório na presença de etanol sugere que a sobre-expressão de *TRP1* em ABH-4.2 conduziu a um aumento da tolerância ao estresse de etanol.

Figura 18 - Fermentações em Batelada em linhagens industriais CAT-1 (símbolos pretos) e NAB-1 (símbolos brancos), em meio rico YP contendo 200 g/L de sacarose na ausência ou presença de 14% ou 16% de etanol adicionado no início das fermentações.



Fonte: Bücker (2014)

Figura 19 - Atividade específica de invertase nas linhagens de laboratório (A) e industriais (B) durante a fermentação em Batelada de 200 g/L de sacarose.



Fonte: Bucker (2014)

Em relação à atividade invertase durante a fermentação em batelada pelas linhagens industriais, um comportamento oposto foi observado (

Figura 19-B), quando comparados os resultados com as linhagens de laboratório. A atividade de invertase na linhagem NAB-1 sobre-expressando *TRP1*, não apresentou diferença significativa quando comparada com a linhagem controle CAT-1, embora o gene *TRP1* ter sido claramente sobre-expressado nessas condições de fermentação (Figura 10, Seção 3.1.1). Esses resultados sugerem que as linhagens industriais estão claramente mais adaptadas ao estresse de etanol que as linhagens de laboratório, e que a sobre-expressão do gene *TRP1* na linhagem industrial teve um baixo efeito sobre o rendimento fermentativo (Tabela 3), além de não apresentar efeito sobre a expressão do gene *SUC2*, codificante da enzima invertase, indispensável na hidrólise de sacarose.

No caso do consumo da sacarose, foi verificado que na ausência e na presença de 5% de etanol, a hidrólise de sacarose foi mais eficiente na linhagem ABH-4.2 (que sobre-expressa *TRP1*) do que a linhagem parental ABH-4, bem como apresentando uma maior atividade extracelular de invertase, como pode ser visto na

Figura 19-A. Esses resultados indicam que a linhagem ABH-4.2, ao menos de uma forma indireta, seja por melhorar a viabilidade celular, ou por um tipo de indução do gene *SUC2*, atinge uma maior produção e/ou apresenta uma maior atividade da enzima invertase. De acordo com Gancedo (1992; 1998), o principal efeito da glicose sobre a expressão

do gene *SUC2* ocorre ao nível da transcrição através da ligação de proteínas reguladoras na região do promotor do gene *SUC2*. Nessa região promotora, um complexo de proteínas que consiste em Mig1, Ssn6 e Tup1 são ligados. Ssn6 e Tup1 são responsáveis pela inibição efetiva da transcrição do gene *SUC2*, enquanto Mig1 é responsável pela ligação ao DNA e direciona o complexo de proteínas para os respectivos promotores. Quando a concentração de glicose no meio estiver elevada, poderia tornar o complexo Snf1 inativo e Mig1 estaria desfosforilado. Neste caso, Mig1 iria se ligar ao promotor do gene *SUC2* e ser reprimido pela glicose. Após a glicose ser consumida pela fermentação ou a formação de novas células, assim como uma concentração alta de etanol, levaria a uma fosforilação de Mig1 e sua translocação para o citoplasma. Nesse caso, Mig1 estaria inativo e o gene *SUC2* desreprimido (GANCEDO, 1998).

Níveis mais altos da expressão de genes envolvidos na biossíntese de triptofano leva a uma maior tolerância ao etanol, da mesma maneira que com a suplementação de triptofano também aumento a tolerância de etanol pela levedura (HIRASAWA et al., 2007). A biossíntese de tirosina, fenilalanina e triptofano procedem de uma via metabólica comum. A maioria dos genes dessa via são significativamente reprimidos na presença de etanol, tal como *TRP1-TRP5*, *ARO2*, *ARO3*, e *ARO9* (LI et al., 2010). Com os resultados obtidos nesse trabalho (Figura 18) é sugerido que a produtividade em etanol da linhagem NAB-1 não apresentou nenhuma diferença significativa por influência do estresse osmótico causado pela alta concentração de sacarose (200 g/L) e pela toxicidade de etanol no final do processo, quando comparado com a linhagem parental (CAT-1). Dinh et al. (2009) em seus resultados encontraram em uma categoria funcional do metabolismo de aminoácidos, que muitos genes envolvidos na biossíntese desses aminoácidos foram regulados positivamente na linhagem controle, mas não na linhagem tolerante ao etanol. No entanto, os resultados desse trabalho sugerem que a sobre-expressão do gene *TRP1*, responsável pela biossíntese de triptofano, está mais envolvida na resposta ao estresse de etanol para o crescimento celular, mas não sendo tão importante para o processo fermentativo nessa condição de estresse.

Foram avaliados os perfis fermentativos das linhagens recombinantes sobre-expressando o gene *MSN2* (ANT-5), e sua forma truncada *MSN2-T* (ATT-6) em condições de estresse ao etanol. Nas fermentações em batelada com altas concentrações de sacarose (200 g/L), as células foram expostas também a altas concentrações de etanol (12% e 16%) no início da fermentação, causando estresse não somente à

concentração inicial de etanol adicionado, como também ao etanol produzido durante a fermentação. Os resultados observados na Figura 20 mostram que não houve diferença nos perfis fermentativos entre as linhagens testadas na condição controle e aquelas com acréscimo de 16% de etanol no início da fermentação.

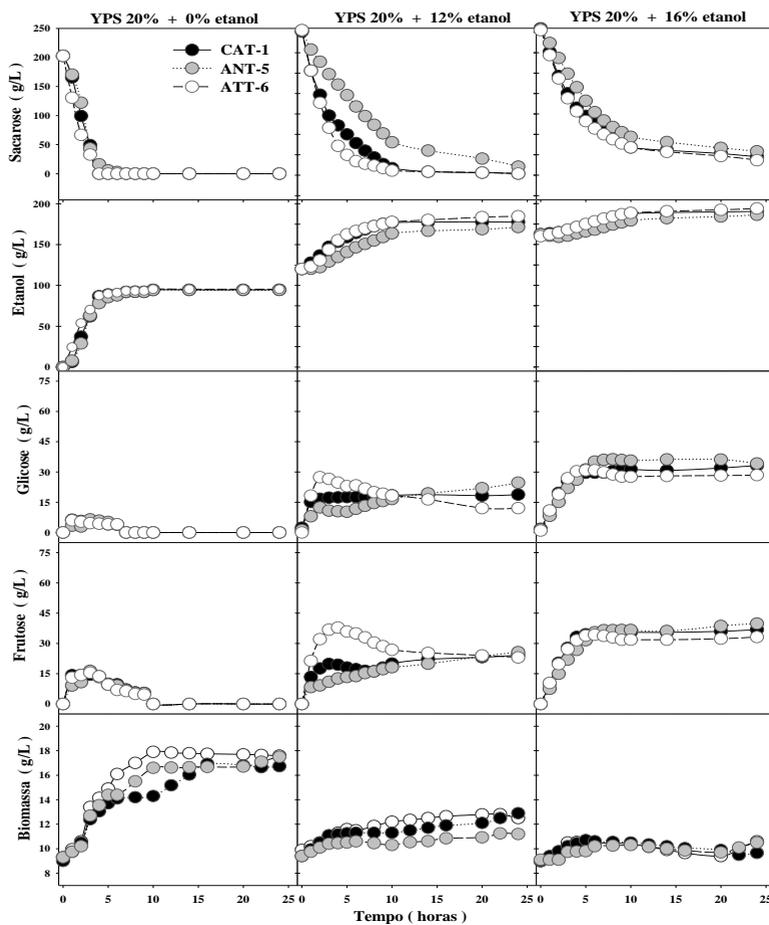
Na condição de batelada com acréscimo de 12% de etanol no início da fermentação, a linhagem recombinante ANT-5 sobre-expressando o gene *MSN2*, apresentou uma visível queda de rendimento na hidrólise da sacarose em relação a linhagem controle. Por outro lado, a linhagem ATT-6 (*P_{ADH1}::MSN2-T*) apresentou um melhor potencial de hidrólise da sacarose em relação a linhagem controle. A produção de etanol pela linhagem ATT-6 também mostrou uma maior produtividade de etanol na fase inicial de fermentação (primeiras 5 horas), quando comparado com a linhagem parental (Figura 20). Porém os rendimentos finais de produção de etanol foram semelhantes para todas as linhagens (Tabela 4).

Tabela 4 - Rendimento e produtividade de etanol nas linhagens controle e recombinantes no gene *MSN2* em fermentações em Batelada de 200 g/L de sacarose.

Linhagens	$Y_{E/S}$ (g _{etanol} / g _{sacarose})			P_{etanol} (g / L / h)		
	Controle	+ 12% EtOH	+ 16% EtOH	Controle	+ 12% EtOH	+ 16% EtOH
CAT-1	0,47	0,43	0,33	17,77	5,70	2,50
ANT-5	0,47	0,44	0,32	17,11	4,37	1,68
ATT-6	0,47	0,46	0,35	17,96	5,78	2,86

Fonte: Bucker (2014)

Figura 20 - Fermentações em Batelada em linhagens industriais CAT-1 (símbolos pretos), ANT-5 (símbolos cinzas) e ATT-6 (símbolos brancos), em meio rico YP contendo 200 g/L de sacarose na ausência ou presença de 12% ou 16% de etanol adicionado no início das fermentações.

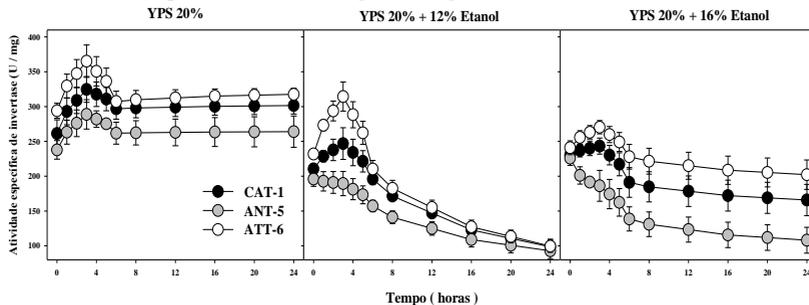


Fonte: Bücker (2014)

Em relação à atividade invertase durante a fermentação em batelada pelas linhagens industriais, uma tendência inibitória foi observada conforme maior exposição ao estresse de etanol (Figura 21). A atividade de invertase na linhagem ANT-5 sobre-expressando *MSN2*, apresentou desvantagem da atividade de invertase comparada com a linhagem controle CAT-1, embora o gene *MSN2* ter sido claramente

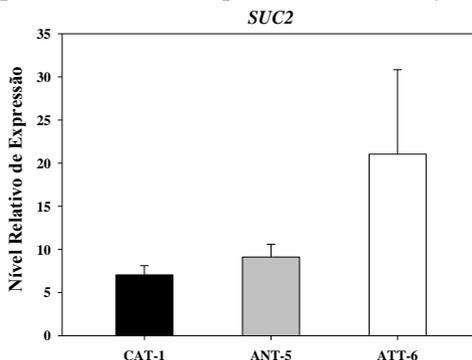
sobre-expressado nessas condições de fermentação (Figura 12, Seção 3.1.2). Por outro lado, a linhagem ATT-6 sobre-expressando a forma truncada de *MSN2*, apresentou uma atividade de invertase maior que a linhagem controle CAT-1, e o gene *MSN2-T* claramente sobre-expresso nessas condições de fermentação (Figura 12). Além disso, a Figura 22 mostra uma maior expressão relativa do gene *SUC2* na linhagem ATT-6, que sobre-expressa o gene *MSN2-T*. Esses resultados sugerem que, apesar de as duas formas de Msn2 estarem sobre-expressas, apenas a forma truncada apresentou algum efeito relevante para a maior expressão do gene *SUC2* e, subsequente maior atividade da enzima invertase.

Figura 21 - Atividade invertase nas linhagens industriais CAT-1 (símbolos pretos), ANT-5 (símbolos cinzas) e ATT-6 (símbolos brancos) durante a fermentação em Batelada de 200 g/L de sacarose e suplementação com 12% ou 16% de etanol.



Fonte: Bucker (2014)

Figura 22 - Análise da expressão do gene *SUC2* por qRT-PCR. O RNA total (2 µg) de cada linhagem foi preparado de amostras coletadas antes e até o tempo de 3 horas após começar os experimentos em Batelada Simples de 200 g/L de sacarose. As barras representam os desvios padrão de duas medições.



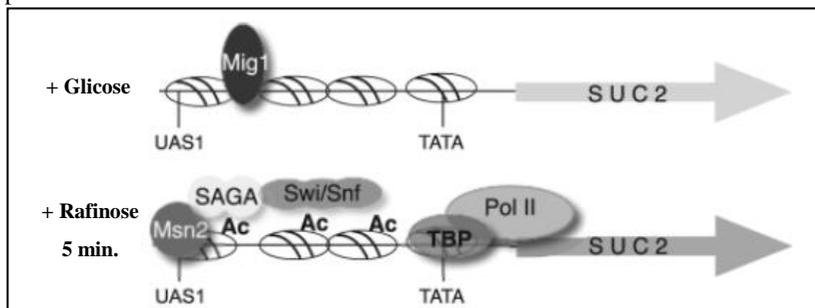
Fonte: Bucker (2014)

Tem sido proposto na literatura, que Msn2 pode reconhecer seqüências promotoras do gene *SUC2* (invertase) que são normalmente pareados pelo repressor MIG1. Desta maneira, Msn2 pode apresentar efeitos antagônicos para *MIG1* em relação a expressão de *SUC2* (ESTRUCH; CARLSON, 1993). Há reconhecidos dois locais de ligação em *MIG1* com a região promotora de *SUC2*, um contendo um motivo CCCCG e o outro contendo um motivo CCCCC (NEHLIN; RONNE, 1990). Essas seqüências funcionais de 5-pb são semelhantes com a seqüência de elementos de resposta ao estresse (STRE: CCCCT; vide Introdução, Seção 1.5.1), corroborando para um modelo em que a superprodução de Msn2 leva à ocupação de sítios de ligação *MIG1* e com isso, o aumento da transcrição de *SUC2* (SCHMITT; McENTEE, 1996).

A indicação de que o fator de transcrição Msn2 tem influência ou participação na ativação de transcrição do gene *SUC2*, também corrobora com trabalhos anteriores como o de Geng e Laurent (2004), indicando que Msn2 atua especificamente na fase inicial de indução de *SUC2*. Geng e Laurent (2004) analisaram ao decorrer de um determinado tempo, a indução da transcrição do gene *SUC2* regulada por glicose, em resposta a limitação de glicose. Os dados encontrados pelos autores indicam que a indução de *SUC2* é rápida e, inesperadamente, prossegue em duas fases distintas, a primeira se trata de uma fase inicial após 5 minutos de indução com rafinose, como provavelmente, uma resposta geral ao estresse pelo fator de transcrição Msn2 que se liga ao promotor de uma forma dependente ao Snf2. A ligação de Swi/Snf nessa fase inicial é prejudicada em qualquer um mutante seja *gcn5* ou *esa1*, componentes HAT (*histone acetyltransferase*) de SAGA e NuA4, respectivamente). Depois de um pico logo no início, a expressão caiu e, em seguida, começou a formar um segundo pico. Nessa fase mostrou pequenas diferenças exigidas pelos co-ativadores transcricionais: o recrutamento dos complexos Swi/Snf e SAGA ocorreu ao mesmo tempo, e a deleção de um não teve nenhum efeito sobre a ligação do outro, em contraste com o ocorrido na primeira fase. Concluindo que Swi/Snf é essencial para ambas as fases de indução do gene e associação com o promotor de *SUC2* de uma maneira bifásica. Na Figura 23 **Error! Reference source not found.**, os passos levando a ativação da transcrição são mostrados em seqüência nos diagramas das regiões promotoras. Na presença de glicose, Mig1 se liga ao promotor e, em combinação com vários nucleossomas bem posicionados, inibe *SUC2*. Pouco tempo após a indução por rafinose (5 min), Mig1 é fosforilado e transportado para fora do núcleo. Em uma

resposta rápida à falta de glicose, o fator de transcrição de resposta ao estresse Msn2 se liga na região *UAS1*. O complexo SAGA acetila histonas (Ac), criando uma estrutura de cromatina mais relaxada no promotor. Isto permite a fraca ligação da proteína TBP (TATA *binding protein*) e a enzima Pol II (BIDDICK; YOUNG, 2009).

Figura 23 - Esquema que mostra alguns elementos de recrutamento do promotor *SUC2*.



Fonte: Bucker (2014), modificado de Biddick e Young (2009)

Portanto, evidências da literatura sugerem que Msn2 e Msn4 desempenham funções na ativação da expressão do gene *SUC2* (BIDDICK; YOUNG, 2009). No entanto, a importância fisiológica dessa função permanece pouco clara porque o duplo mutante não foi demasiadamente defeituoso na expressão de *SUC2*. Uma possibilidade é que as proteínas Msn2/4 contribuem de maneira muito particular na ativação da expressão de *SUC2*, enquanto que outras proteínas não relacionadas, seriam as principais responsáveis pela ativação. Tendo em vista essas informações, se fazem necessários mais estudos sobre os papéis regulatórios de Msn2 envolvidos na tolerância ao etanol e mesmo indução de *SUC2*, uma vez que há pouca informação disponível para a função da forma truncada de Msn2.

3.4.2 Fermentações em Batelada Alimentada

O ensaio experimental de fermentação em batelada alimentada foi realizado pois é o experimento que mais se assemelha às condições industriais de produção de álcool combustível no Brasil (WHEALS et al., 1999; BASSO et al., 2011; DELLA-BIANCA et al., 2013; DELLA-BIANCA; GOMBERT, 2013). Os experimentos seguiram os parâmetros conforme descrição anterior em Material e Métodos (Seção 2.6.2).

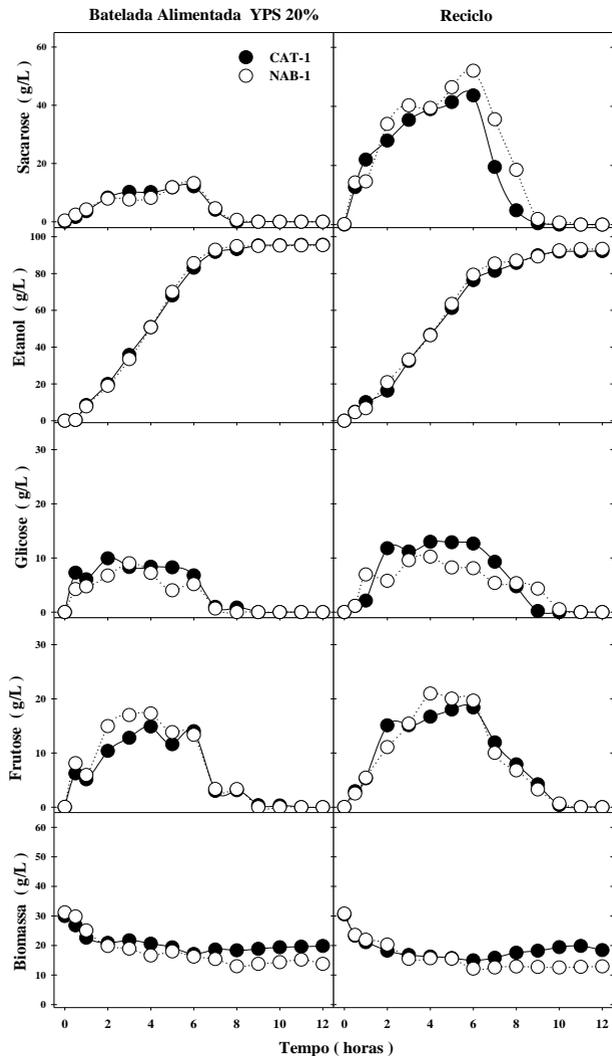
Em relação à produção de biomassa nessa condição de fermentação, com concentração inicial de 30,0 g/L (volume inicial de 200 mL), a linhagem CAT-1 terminou com 20,0 g/L (volume final de 600 mL) enquanto a linhagem NAB-1 terminou com 15,0 g/L de concentração celular, produzindo em média 25% menos biomassa em comparação com a linhagem parental CAT-1, mostrando com isso, uma velocidade menor de crescimento enquanto continua o processo fermentativo (Figura 24). Quanto à produção e consumo de açúcares, ambas as linhagens seguiram comportamento semelhante nas fermentações de ciclo e reciclo celular. Porém, foi observada uma velocidade menor de hidrólise e consumo de sacarose para o reciclo celular, e um maior acúmulo de frutose pela linhagem CAT-1. Apesar da linhagem NAB-1 também apresentar uma hidrólise e consumo mais lentos de sacarose pela célula na segunda fermentação (reciclo), o consumo de glicose foi mais rápido que o observado na linhagem controle CAT-1 (Figura 24). Na primeira fermentação, foram consumidos todos os açúcares em ≈ 9 horas. No reciclo celular, foram consumidos todos os açúcares em ≈ 10 horas. Em resumo, as duas linhagens apresentaram parâmetros fermentativos semelhantes (Tabela 5), não havendo diferença significativa entre as linhagens industriais CAT-1 ($TRP1 / TRP1$) e NAB-1 ($P_{ADHI}::TRP1 / TRP1$).

Tabela 5 - Rendimento e produtividade de etanol em ambas as linhagens controle e recombinantes em fermentações em Batelada Alimentada de 200 g/L de sacarose (volume final).

Linhagens	$Y_{E/S}$ (g _{etanol} / g _{sacarose})		P_{etanol} (g / L / h)	
	Ciclo	Reciclo	Ciclo	Reciclo
CAT-1	0,48	0,46	12,9	11,6
NAB-1	0,48	0,47	13,3	12,2
ANT-5	0,47	0,46	12,9	11,7
ATT-6	0,47	0,47	13,0	11,9

Fonte: Bücker (2014)

Figura 24 - Fermentações por Batelada Alimentada em linhagens industriais CAT-1 (símbolos pretos) e NAB-1 (símbolos brancos). As células foram suspensas em 200 mL e a batelada foi alimentada com 400 mL de meio rico YP contendo 200 g/L de sacarose (volume final, 600 mL) durante 6 horas (painel à esquerda). Após o final da fermentação, as células foram centrifugadas, lavadas com água gelada e então, uma segunda fermentação em batelada alimentada foi realizada, seguindo as mesmas condições experimentais anteriores (painel à direita).



Fonte: Bücker (2014)

Em relação às fermentações em batelada alimentada com as linhagens recombinantes no gene *MSN2*, a produção de biomassa da linhagem controle CAT-1 ($X_0 = 30$ g/L) terminou com 20 g/L de concentração celular, e a linhagem ANT-5 terminou com ≈ 13 g/L de células, produzindo em média 35% menos biomassa em comparação com a linhagem parental CAT-1, enquanto a linhagem ATT-6 mostrou uma produção de biomassa semelhante à parental CAT-1 (Figura 25). Assim, sugere-se que a linhagem recombinante ANT-5 (*MSN2* sobre-expresso) apresentou maiores dificuldades em fermentar os açúcares nessa condição em batelada alimentada, por apresentar uma desvantagem na sua proliferação celular e, conseqüentemente, menos células aptas para realizar o processo fermentativo.

Quanto à produção e consumo de açúcares, ambas as linhagens controle e recombinantes para o gene *MSN2* seguiram comportamento semelhante na primeira fermentação (ciclo celular). Porém, para os resultados observados na segunda fermentação, no reciclo celular, um menor consumo de sacarose foi observado, principalmente na linhagem ANT-5, e um maior acúmulo de frutose (Figura 25). Porém, ao final do processo fermentativo, não houve diferença significativa entre as linhagens industriais CAT-1 (*MSN2* / *MSN2*), ANT-5 ($P_{ADHI}::MSN2$ / *MSN2*) e ATT-6 ($P_{ADHI}::MSN2-T$ / *MSN2*), com as três linhagens apresentando parâmetros muito semelhantes (Tabela 5).

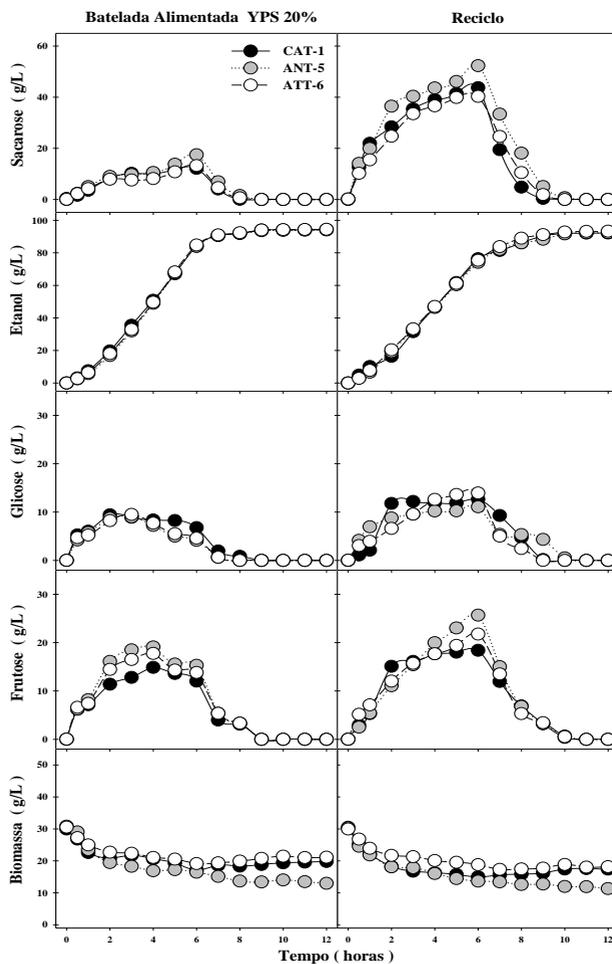
Está claro com os resultados observados neste trabalho, que a sobre-expressão do gene *MSN2* e *MSN2-T* desempenham papéis diferentes na resposta geral ao estresse, principalmente por atuação na regulação de genes relacionados ao controle da via PKA, inibindo (ANT-5) ou promovendo (ATT-6) uma maior proliferação celular nas leveduras de *S. cerevisiae* em resposta ao estresse de etanol. A inativação da via PKA bloqueia o crescimento celular e provoca parada na fase G1 do ciclo celular, como ocorre com a depleção de nutrientes (THEVELEIN; WINDE, 1999). Curiosamente, a deleção de *MSN2* e *MSN4* supera a parada do crescimento causada pela inativação de PKA, o que indica que esses fatores de transcrição interferem na expressão de proteínas que causam a inibição de crescimento (SMITH et al., 1998). Diversas linhas de evidência apontam para Yak1 como o principal candidato para este papel. *YAK1* codifica uma proteína-quinase, que é conhecida por inibir o crescimento (GARRETT et al., 1991). Primeiro, *Msn2/4* controla a expressão de *YAK1* (SMITH et al., 1998); em segundo lugar, a atividade da quinase Yak1 é diretamente inibida por fosforilação de PKA (LEE et al., 2008). Além disso, Yak1 fosforila a subunidade reguladora de PKA, Bcy1, polarizando a sua localização

para o citoplasma. Em contraste com a regulação negativa exercida sobre Msn2/4 pela PKA, Yak1 fosforila e ativa Msn2/4 e Hsf1 sob condições de baixa glicose (GRIFFIOEN et al., 2001; LEE et al., 2008). Essa constatação torna esta quinase uma das poucas proteínas reguladoras conhecidas por influenciar tanto Hsf1 quanto Msn2/4 (GRIFFIOEN et al., 2001; LALLET et al., 2004; LEE et al., 2008; MORANO et al., 2012). De acordo com a literatura (LALLET et al., 2004), Msn2 é degradado no núcleo após uma ativação crônica ou constitutiva, proporcionado por um potencial mecanismo de adaptação aos períodos prolongados de limitação de nutrientes ou estresse ambiental.

O que é proposto para a ação da linhagem ANT-5 nos ensaios em batelada alimentada é que as células estão respondendo com uma baixa proliferação celular, sendo sugerido que a proteína quinase Yak1 está fosforilando PKA e assim, inibindo o crescimento celular, e por sua vez menor potencial de fermentação nessas condições de fermentação. Enquanto a proposta para a ação do fator de transcrição Msn2 na linhagem ATT-6 é sugerido, em um primeiro momento, que a forma truncada de Msn2 não esteja influenciando de uma maneira tão forte a atuação de Yak1 sobre PKA, dessa maneira, o crescimento celular não é completamente inibido, bem como PKA não apresenta forte influência na atividade de Msn2 no núcleo da célula. Porém, em um segundo momento, PKA passa a exercer uma certa atividade na inibição de Msn2, ou conforme Lallet et al. (2004), Msn2 pode estar sendo degradado no núcleo após sua ativação constitutiva. Os mecanismos de regulação operando através dos fatores de transcrição de resposta ao estresse, como Msn2/4 e Yak1 em leveduras, permanecem obscuros. No entanto, a identificação desses fatores de transcrição e os STREs com seus genes alvo específicos, sem dúvida poderão facilitar a compreensão de como esses fatores de transcrição em si são regulados e como diferentes sinais de resposta celular alimentam as vias de ativação por estresse podem induzir uma resposta celular específica.

É sugerido que em experimentos futuros em batelada alimentada, a alimentação com sacarose no mosto fermentativo seja feita de forma a se ter uma maior concentração de sacarose nas fases iniciais do processo, aumentando a vazão de alimentação. Pois dessa maneira, pode ser permitida à célula responder aos estímulos em uma condição de estresse osmótico via atuação de Msn2, e analisar o efeito da (suposta) rápida indução do gene *SUC2* por Msn2 no início da fermentação em batelada alimentada, visando um melhor aproveitamento das características das linhagens recombinantes obtidas neste trabalho.

Figura 25 - Fermentações por Batelada Alimentada em linhagens industriais CAT-1 (símbolos pretos), ANT-5 (símbolos cinzas) e ATT-6 (símbolos brancos). As células foram suspensas em 200 mL e a batelada foi alimentada com 400 mL de meio rico YP contendo 200 g/L de sacarose (volume final, 600 mL) durante 6 horas (painel à esquerda). Após o final da fermentação, uma segunda fermentação em batelada alimentada foi realizada, seguindo as mesmas condições experimentais anteriores (painel à direita).



Fonte: Bücker (2014)

4 CONCLUSÕES

Os resultados revelaram que a linhagem industrial CAT-1 é mais tolerante ao etanol do que a linhagem de laboratório CEN.PK2-1C. A linhagem de laboratório foi capaz de crescer em 8% de etanol (adicionado ao meio líquido YP contendo 2% sacarose), enquanto que a linhagem industrial praticamente foi capaz de tolerar o dobro (14%) da concentração do álcool. Mesmo sendo mais tolerante, a sobre-expressão dos genes *TRP1* ou *MSN2* (e sua forma truncada) na linhagem industrial incrementou mais ainda a tolerância ao etanol, permitindo que elas fossem capazes de crescer com 16% de etanol. As estratégias de modificação genômica dos promotores dos genes alvo (*TRP1* e *MSN2*), baseada na transformação das linhagens com módulos de DNA contendo um gene que confere resistência à geneticina (para selecionar as células modificadas) seguido de um promotor forte e constitutivo (*P_{ADHI}*) e nas extremidades sequências (de 40 pb) com homologia à região de interesse a ser modificada, permitiu sobre-expressar os genes *TRP1*, *MSN2*, ou ainda uma versão truncada deste gene (*MSN2-T*, sem os primeiros 48 aminoácidos). Como as modificações ocorrem diretamente no cromossoma das células, as linhagens recombinantes são estáveis e não precisam meios seletivos para expressar os genes modificados, como ocorre quando plasmídeos são utilizados.

A análise dos níveis intracelulares de espécies reativas de oxigênio (ROS) revelou que o estresse provocado pelo etanol aumenta significativamente os níveis de ROS nas células, sendo que ocorreu uma redução na quantidade desses compostos nas linhagens modificadas no gene *MSN2*. Níveis elevados de ROS foram também encontrados após estresse térmico, estresse salino, e após expor as células ao peróxido de hidrogênio, sendo que a linhagem que sobre-expressa o gene *MSN2* mostrou-se também mais resistente ao estresse salino, porém mais sensível ao estresse oxidativo, enquanto que a linhagem que sobre-expressa o gene *MSN2* truncado foi mais resistente a este último tipo de estresse. Finalmente, os resultados revelaram que não ocorreram diferenças significativas entre a linhagem industrial CAT-1 e as linhagens recombinantes nos diferentes parâmetros fermentativos analisados, tanto em batelada simples com altas concentrações (200 g/L) de sacarose, mesmo na presença de diferentes concentrações estressantes de etanol no início das fermentações, como também não foram encontradas diferenças significativas em processos de fermentação em batelada alimentada com ciclo celular. O estresse alcoólico afetou principalmente a velocidade de consumo dos

monossacarídeos (glicose e frutose) produzidos na hidrólise da sacarose. Portanto, os resultados sugerem que uma maior tolerância ao etanol (através das modificações genômicas realizadas neste trabalho), não significa necessariamente numa maior produção de etanol pela linhagem industrial de *S. cerevisiae*.

Como perspectivas futuras de trabalho, seria interessante analisar a performance fermentativa das linhagens industriais mais tolerantes ao etanol, desenvolvidas no presente estudo, em processos fermentativos (batelada simples ou batelada alimentada com reciclo de células) com uma concentração maior (30-35%) de açúcares, o que certamente levaria a uma concentração maior de etanol ao final da fermentação. Alternativamente, seria interessante também estudar a possibilidade de modificar a batelada alimentada de forma a aumentar a vazão de alimentação para atingir uma maior concentração de açúcar nas fases iniciais da fermentação. Além destas modificações no processo fermentativo, seria importante avaliar o desempenho das linhagens mais tolerantes ao etanol durante vários ciclos das células (e não apenas um como realizado neste trabalho), bem como analisar a dominância e persistência das células em processos fermentativos industriais.

REFERÊNCIAS¹

- ABE, H. et al. Ethanol-tolerant *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated under selective conditions by over-expression of a proofreading-deficient DNA polymerase δ . **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 108, n. 3, p. 199-204, 2009.
- AGATEP, R. et al. Transformation of *Saccharomyces cerevisiae* by the lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol protocol. **Technical Tips Online**, v. 3, n. 1, p. 133-137, 1998.
- ALBERS, E.; LARSSON, C. A comparison of stress tolerance in YPD and industrial lignocellulose-based medium among industrial and laboratory yeast strains. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 36, n. 8, p. 1085–1091. 2009.
- ALEPUZ, P.M. et al. The *Saccharomyces cerevisiae* RanGTP-binding protein Msn5p is involved in different signal transduction pathways. **Genetics**, v. 153, p. 1219–1231, 1999.
- ALEXANDRE, H. et al. Global gene expression during short-term ethanol stress in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEBS Letters**, v. 498, p. 98–103, 2001.
- ALEXANDRE, H. et al. Lack of correlation between trehalose accumulation, cell viability and intracellular acidification as induced by various stresses in *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiology**, v. 144, p. 1103–1111, 1998.
- ALVES-JR, S.L. et al. Molecular analysis of maltotriose active transport and fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* reveals a determinant role for the *AGT1* permease. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, p. 1494–1501, 2008.
- AMORIM, H. et al. Scientific challenges of bioethanol production in Brazil. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 91, n. 5, p. 1267-1275, 2011.
- ANDRIETTA, M.G.S. et al. Bioethanol - Brazil, 30 years of Proálcool. **International Sugar Journal**, v. 109, n. 1299, p. 195-200, 2007.

¹ De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS - ABNT. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

ARAKI, Y. et al. Ethanol stress stimulates the Ca²⁺-mediated calcineurin/Crz1 pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 107, n. 1, p. 1-6, 2009.

ARGUESO, J.L. et al. Genome structure of a *Saccharomyces cerevisiae* strain widely used in bioethanol production. **Genome Research**, v. 19, p. 2258-2270, 2009.

ATTFIELD, P.V. et al. Stress tolerance: the key to effective strains of industrial baker's yeast. **Nature Biotechnology**, v. 15, n. 13, p. 1351–1357, 1997.

BABRZADEH, F. et al. Whole-genome sequencing of the efficient industrial fuel-ethanol fermentative *Saccharomyces cerevisiae* strain CAT-1. **Molecular Genetics and Genomics**, v. 287, p. 485–494, 2012.

BADOTTI, F. et al. Physiological and molecular characterization of *Saccharomyces cerevisiae* cachaça strains isolated from different geographic regions in Brazil. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 26, p. 579-87, 2010.

BAI, F.; ANDERSON, W.; MOO-YOUNG, M. Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks. **Biotechnology Advances**, v. 26, p. 89–105, 2008.

BAI, F.W. et al. Continuous ethanol production and evaluation of yeast cell lysis and viability loss under very high gravity medium conditions. **Journal of Biotechnology**, v. 110, p. 287–293, 2004.

BAILEY, J.E. et al. Toward a science of metabolic engineering. **Science**, v. 252, p. 1668-1675, 1991.

BASÍLIO, A.C. et al. Detection and identification of wild yeast contaminants of the industrial fuel ethanol fermentation process. **Current Microbiology**, v. 56, p. 322-326, 2008.

BASSO, L.C.; BASSO, T.O.; ROCHA, S.N. Ethanol production in Brazil: The industrial process and its impact on yeast fermentation. In: Bernardes M.A.S. Biofuel production, 1. **Rijeka: InTech**, 2011. p. 85–100.

BASSO, L.C. et al. Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil. **FEMS Yeast Research**, v. 8, p. 1155–1163, 2008.

- BECK, T.; HALL, M.N. The TOR signalling pathway controls nuclear localization of nutrient-regulated transcription factors. **Nature**, v. 402, p. 689–692, 1999.
- BELLOCH, C. Fermentative stress adaptation of hybrids within the *Saccharomyces sensu stricto* complex. **International Journal of Food Microbiology**, v. 122, p. 188–195, 2008.
- BERRY, D.B.; GASCH, A.P. Stress-activated genomic expression changes serve a preparative role for impending stress in yeast. **Molecular Biology of the Cell**, v. 19, p. 4580–4587, 2008.
- BIDDICK, R.; YOUNG, E.T. The disorderly study of ordered recruitment. **Yeast**, v. 26, p. 205–220, 2009.
- BIRCH, R.M.; WALKER, G.M. Influence of magnesium ions on heat shock and ethanol stress responses of *Saccharomyces cerevisiae*. **Enzyme Microbial Technology**, v. 26, p. 678–687, 2000.
- BOSE, S.; DUTKO, J.A.; ZITOMER, R.S. Genetic factors that regulate the attenuation of the general stress response of yeast. **Genetics**, v. 169, p. 1215–1226, 2005.
- BOY-MARCOTTE, E. et al. The transcriptional activation region of Msn2p, in *Saccharomyces cerevisiae*, is regulated by stress but is insensitive to the cAMP signalling pathway. **Molecular Genetics and Genomics**, v. 275, p. 277–287, 2006.
- BRASIL. Acompanhamento da produção sucroalcooleira. Ministry of Agriculture, Livestock and Food Supply. 2012. http://mapas.agricultura.gov.br:81/Spc/daa/Resumos/ACOMPANHAMENTO_PRODUCAO_01_06_2012_11-12.pdf, acessado em 16 de Março de 2014.
- BRAVIM, F. et al. Biotechnological properties of distillery and laboratory yeasts in response to industrial stresses. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 37, p. 1071–79, 2010.
- BREWSTER, J.L. An osmosensing signal transduction pathway in yeast. **Science**, v. 259, p. 1760–1763, 1993.
- BROWN, N.A. et al. Transcriptional profiling of Brazilian *Saccharomyces cerevisiae* strains selected for semi-continuous fermentation of sugarcane must. **FEMS Yeast Research**, v. 13 n. 3, p. 277–290, 2013.

CARRASCO, P.; QUEROL, A.; DEL OLMO, M. Analysis of the stress resistance of commercial wine yeast strains. **Archives of Microbiology**, v. 175, n. 6, p. 450–457, 2001.

CASEY, G.P.; INGLEDEW, W.M. Ethanol tolerance in yeasts. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 13, p. 219–80, 1986.

CAUSTON, H.C. Remodeling of yeast genome expression in response to environmental changes. **Molecular Biology of the Cell**, v. 12, p. 323–337, 2001.

CLARE, J.J. Expression of cloned genes in the yeasts *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia pastoris*. **Methods in Molecular and Cellular Biology**, v. 5, p. 319–329, 1995.

COELHO, S.T. **Mecanismos para implementação da cogeração de eletricidade a partir de biomassa: Um modelo para o estado de São Paulo**. 1999. 180f. Tese (Doutorado) - Programa Interunidades de Pós-Graduação em Energia - PIPGE, Universidade de São Paulo - USP, São Paulo, SP, 1999.

CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento da Safra Brasileira de Cana-de-Açúcar, Quarto Levantamento, Brasília, p. 1-14, 2014.

COSTA, V. et al. Mitochondrial superoxide dismutase is essential for ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* in the post-diauxic phase. **Microbiology**, v. 143, p. 1649–1656, 1997.

COSTA, D.A. et al. Physiological characterization of thermotolerant yeast for cellulosic ethanol production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, n. 8, p. 3829–3840, 2014.

COT, M. Physiological behaviour of *Saccharomyces cerevisiae* in aerated fed-batch fermentation for high level production of bioethanol. **FEMS Yeast Research**, v. 7, p. 22–32, 2007.

D'AMORE, T. A study of ethanol tolerance in yeast. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 9, p. 287–304, 1990.

D'AMORE, T.; STEWART, G.G. Ethanol tolerance of yeast. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 9, p. 322–330, 1987.

DA SILVA-FILHO, E.A. Isolation by genetic and physiological characteristics of a fuel-ethanol fermentative *Saccharomyces cerevisiae*

strain with potential for genetic manipulation. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 32, n. 10, p. 481–486, 2005.

DÁRIO, M.G. **Efeito da alteração na captação de sacarose ao metabolismo de *Saccharomyces cerevisiae***. 2011. 153f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Curso de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

DE WEVER, V. et al. A dual role for PP1 in shaping the Msn2-dependent transcriptional response to glucose starvation. **EMBO Journal**, v. 24, p. 4115–4123, 2005.

DELLA-BIANCA, B.E. et al. What do we know about the yeast strains from the Brazilian fuel ethanol industry? **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, p. 979–991, 2013.

DELLA-BIANCA, B.E.; GOMBERT, A.K. Stress tolerance and growth physiology of yeast strains from the Brazilian fuel ethanol industry. **Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology**, v. 104, n. 6, p. 1083-1095, 2013.

DEMARINI, D.J. et al. Constitutive promoter modules for PCR-based gene modification in *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, v. 18, p. 723-728, 2001.

DING, J. et al. Tolerance and stress response to ethanol in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 85, p. 253-263, 2009.

DINH, T.N. et al. Analysis of adaptation to high ethanol concentration in *Saccharomyces cerevisiae* using DNA microarray. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 32, p. 681-688, 2009.

DU, X.; TAKAGI, H. Acetyltransferase Mpr1 confers ethanol tolerance on *Saccharomyces cerevisiae* by reducing reactive oxygen species. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 75, p. 1343–1351, 2007.

ECHEGARAY, O.F. et al. Fed-batch culture of *Saccharomyces cerevisiae* in sugar-cane blackstrap molasses: invertase activity of intact cells in ethanol fermentation. **Biomass and Bioenergy**, v. 19, p. 39-50, 2000.

ENTIAN, K.D.; KOTTER, P. Yeast mutant and plasmid collections. **Methods in Microbiology**, v. 26, p. 431–449, 1998.

ESPÍRITO-SANTO, J.C.A. **Aperfeiçoamento da fermentação de sacarose através da modificação da expressão dos genes *SUC2* e *AGT1* em linhagens diplóides de *Saccharomyces cerevisiae***. Tese (Doutorado em Biotecnologia) — Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

ESTRUCH, F.; CARLSON, M. Two homologous zinc finger genes identified by multicopy suppression in a SNF1 protein kinase mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular and Cellular Biology**, v. 13, p. 3872–3881, 1993.

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

FEREA, T.L. et al. Systematic changes in gene expression patterns following adaptive evolution in yeast. **Proceedings of the National Academy of Sciences, USA**, v. 96, p.9721-9726, 1999.

FLORES, C.L.; et al. Carbohydrate and energy-yielding metabolism in non-conventional yeasts. **FEMS Microbiological Research**, v. 24, p. 507-29, 2000.

FUJITA, K. et al. Comprehensive gene expression analysis of the response to straight-chain alcohols in *Saccharomyces cerevisiae* using cDNA microarray. **Journal of Applied Microbiology**, v. 97, p. 57–67, 2004.

GANCEDO, J.M. Carbon catabolite repression in yeast. **European Journal of Biochemistry**, v. 206, p. 297–313, 1992.

GANCEDO, J.M. Yeast carbon catabolite repression. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 62, p. 334–61, 1998.

GAROMA, T.; BEN-KHALED, M.; BEYENE, A. Comparative resource analyses for ethanol produced from corn and sugarcane in different climatic zones. **International Journal of Energy Research**, v. 36, n. 10, p. 1065–1076, 2012.

GARREAU, H. et al. Hyperphosphorylation of Msn2p and Msn4p in response to heat shock and the diauxic shift is inhibited by cAMP in *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiology**, v. 146, p. 2113–2120, 2000

GARRETT, S.; MENOLD, M.M.; BROACH, J.R. The *Saccharomyces cerevisiae* YAK1 gene encodes a protein kinase that is induced by arrest

- early in the cell cycle. **Molecular and Cellular Biology**, v. 11, p. 4045-4052, 1991.
- GASCH, A.P. et al. Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. **Molecular Biology of the Cell**, v. 11, p. 4241–4257, 2000.
- GENG, F.; LAURENT, B.C. Roles of SWI/SNF and HATs throughout the dynamic transcription of a yeast glucoserepressible gene. **EMBO Journal**, v. 23, p. 127–137, 2004.
- GOFFEAU, A. et al. Life with 6000 genes. **Science**, v. 274, n. 5287, p. 546, 1996.
- GOLDEMBERG, J.; GUARDABASSI, P. The potential for first-generation ethanol production from sugarcane. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 4, n. 1, p. 17–24, 2010.
- GOLDEMBERG, J. The Brazilian biofuels industry. **Biotechnolgy for Biofuels**, v. 1, p. 6, 2008.
- GOLDEMBERG, J. Ethanol for a sustainable energy future. **Science**, v. 315, n. 5813, p. 808-810, 2007.
- GOMAR-ALBA, M.; JIMÉNEZ-MARTÍ, E.; DEL OLMO, M. The *Saccharomyces cerevisiae* Hot1p regulated gene YHR087W (*HGI1*) has a role in translation upon high glucose concentration stress. **BMC Molecular Biology**, v. 21, n. 13, p. 19, 2012.
- GÖRNER, W. et al. Acute glucose starvation activates the nuclear localization signal of a stress-specific yeast transcription factor. **EMBO Journal**, v. 21, p. 135–144, 2002.
- GÖRNER, W. et al. Nuclear localization of the C₂H₂ zinc finger protein Msn2p is regulated by stress and protein kinase A activity. **Genes & Development**, v. 12, p. 586-597, 1998.
- GRIFFIOEN, G.P. et al. Nucleocytoplasmic distribution of budding yeast protein kinase A regulatory subunit Bcy1 requires Zds1 and is regulated by Yak1-dependent phosphorylation of its targeting domain. **Molecular and Cellular Biology**, v. 21, p. 511–523, 2001.
- GRIFFITHS, A.J.F. et al. **Introdução à genética**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara koogan, 2009. p.726.
- GRIGORIEV, I.V. et al. Fueling the future with fungal genomics. **Mycology**, v. 2, n. 3, p. 192-209, 2011.

GUIETZ, R.D.; WOODS, R.A. Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method. **Methods in Enzymology**, v. 350, p. 87-96, 2002.

GÜLDENER, U. et al. A new efficient gene disruption cassette for repeated use in budding yeast. **Nucleic Acids Research**, v. 24, p. 2519–2524, 1996.

GÜLDENER, U. et al. A second set of loxP marker cassettes for cre-mediated multiple gene knockouts in budding yeast. **Nucleic Acids Research**, v. 30, p. 23, 2002.

HASAN, R. et al. The control of the yeast H₂O₂ response by the Msn2/4 transcription factors. **Molecular Microbiology**, v. 45, p. 233–241, 2002.

HERSEN, P. et al. Signal processing by the HOG MAP kinase pathway. **Proceedings of the National Academy of Sciences, USA**, v.105, p. 7165-7170, 2008.

HIRASAWA, T. et al. Identification of target genes conferring ethanol stress tolerance to *Saccharomyces cerevisiae* based on DNA microarray data analysis. **Journal of Biotechnology**, v. 131, p. 34–44, 2007.

HOHMANN, S. et al. Osmotic stress signaling and osmoadaptation in yeasts. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 66, p. 300–372, 2002.

HONG, M.E. et al. Identification of gene targets eliciting improved alcohol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae* through inverse metabolic engineering, **Journal of Biotechnology**, v. 149, p. 52-59, 2010.

HU, C.K.; BAI, F.W.; AN, L.J. Protein amino acid composition of plasma membranes affects membrane fluidity and thereby ethanol tolerance in a self-flocculating fusant of *Schizosaccharomyces pombe* and *Saccharomyces cerevisiae*. **Chinese Journal of Biotechnology**, v. 21, p. 809–813, 2005.

IINOYA, K. et al. Engineering of the yeast antioxidant enzyme Mpr1 for enhanced activity and stability. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 103, p. 341–352, 2009.

INGRAM, L.O.; BUTTKE, T.M. Effects of alcohols on microorganisms. **Advances in Microbial Physiology**, v. 25, p. 253–300, 1984.

- IVORRA, C. et al. An inverse correlation between stress resistance and stuck fermentations in wine yeasts. A molecular study. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 64, p. 698-708, 1999.
- JIMÉNEZ-MARTÍ, E. et al. Molecular response of *Saccharomyces cerevisiae* wine and laboratory strains to high sugar stress conditions. **International Journal of Food Microbiology**, v. 145, p. 211–220, 2010.
- JONES, R.P.; GREENFIELD, P.F. Ethanol and the fluidity of the yeast plasma membrane. v. 3, p. 223–232, 1987.
- JONES, A. M.; THOMAS, K. C.; INGLEDEW, W. M. Ethanol fermentation of blackstrap molasses and sugarcane juice using very high gravity technology. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 42, p. 1242-1246, 1994.
- JONES, R. Biological principles for the effects of ethanol. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 11, p. 130–153, 1989.
- KAMISAKA, Y. Identification of genes affecting lipid content using transposon mutagenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 70, p. 646-653, 2006.
- KATOU, T. Brewing characteristics of haploid strains isolated from sake yeast Kyokai No. 7. **Yeast**. v. 25, n. 11, p. 799–807, 2008.
- KOBAYASHI, N.; MCENTEE, K. Evidence for a heat shock transcription factor-independent mechanism for heat shock induction of transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. **Proceedings of the National Academy of Sciences, USA**, v. 87, p. 6550–6554, 1991.
- KOBAYASHI, N.; MCENTEE, K. Identification of *cis* and *trans* components of a novel heat shock stress regulatory pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular and Cellular Biology**, v. 13, p. 248–256, 1993.
- KUBOTA, S. et al. 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**, v. 68, p. 968–972, 2004.
- LALLET, S. et al. Role of Gal11, a component of the RNA polymerase II mediator in stress-induced hyperphosphorylation of Msn2 in *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular Microbiology**, v. 62, p. 438-452, 2006.

LALLET, S. et al. Heat shock-induced degradation of Msn2p, a *Saccharomyces cerevisiae* transcription factor, occurs in the nucleus. **Molecular Genetics & Genomics**, v. 272, p. 353–362, 2004.

LAM, E. et al. Improving sugarcane for biofuel: engineering for an even better feedstock. **GCB Bioenergy**, v. 1, p. 251–255, 2009.

LANDOLFO, S. et al. ROS accumulation and oxidative damage to cell structures in *Saccharomyces cerevisiae* wine strains during fermentation of high-sugar-containing medium. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1780, p. 892–898, 2008.

LANDRY, C.R. et al. Ecological and evolutionary genomics of *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular Ecology**, v. 15, p. 575–591, 2006.

LEAL, M.R.L.V.; WALTER, A.D.S. Sustainability of the production of ethanol from sugarcane: the Brazilian experience. **International Sugar Journal**, v. 112, p. 7, 2010.

LEÃO, C.; VAN UDEN, N. Effects of ethanol and other alkanols on the glucose transport system of *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 24, p. 2601–2604, 1982.

LEÃO, C.; VAN UDEN, N. Effects of ethanol and other alkanols on passive proton influx in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 774, p. 43–48, 1984.

LEE, P. et al. Yeast Yak1 kinase, a bridge between PKA and stress-responsive transcription factors, Hsf1 and Msn2/Msn4. **Molecular Microbiology**, v. 70, p. 882–895, 2008.

LEE, P. et al. Regulation of yeast Yak1 kinase by PKA and autophosphorylation-dependent 14-3-3 binding. **Molecular Microbiology**, v. 79, p. 633–646, 2011.

LEWIS, J. G. LEARMONTH, R. P.; WATSON, K.; Induction of heat, freezing and salt tolerance by heat and salt shock in *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiology**, v. 141, p. 687–694, 1995.

LI, B. et al. Transcriptome analysis of differential responses of diploid and haploid yeast to ethanol stress. **Journal of Biotechnology**, v. 148, n. 4, p. 194–203, 2010.

LIBERAL, A.T.S. et al. Contaminant yeast detection in industrial ethanol fermentation must by rDNA-PCR. **Letters in Applied Microbiology**, v. 40, p. 19–23, 2005.

LIMA, U.A.; BASSO, L.C.; AMORIM, H.V. Produção de etanol. In: LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. Processos fermentativos e enzimáticos. **Biotecnologia Industrial**, v. 3, p. 1-43, 2001.

LONGTINE, M.S. et al. Additional modules for versatile and economical PCR-based gene deletion and modification in *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, v. 14, p. 953-961, 1998.

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

MAEDA, T.; TAKEKAWA, M.; SAITO, H. A two-component system that regulates an osmosensing MAP kinase cascade in yeast. **Nature**, v. 369, p. 242-245, 1994.

MAGER, W. H., KRUIJFF A. J. Stress-induced transcriptional activation. **Microbiology**, v. 59, p. 506-531, 1995.

MALCHER, M.; SCHLADEBECK, S.; MOSCH, HU. The Yak1 protein kinase lies at the center of a regulatory cascade affecting adhesive growth and stress resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. **Genetics and Molecular Research**, v. 187, p. 717-730, 2011.

MARCHLER, G. et al. A *Saccharomyces cerevisiae* UAS element controlled by protein kinase A activates transcription in response to a variety of stress conditions. **EMBO Journal**, v. 12, p. 1997-2003, 1993.

MARTÍNEZ-PASTOR, M.T. et al. The *Saccharomyces cerevisiae* zinc finger proteins Msn2p and Msn4p are required for transcriptional induction through the stress response element (STRE). **EMBO Journal**, v. 15, p. 2227-2235, 1996.

MAYORDOMO, I.; ESTRUCH, F.; SANZ, P. Convergence of the target of rapamycin and the Snf1 protein kinase pathways in the regulation of the subcellular localization of Msn2, a transcriptional activator of STRE (Stress Response Element)-regulated genes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, p. 35650-35656, 2002.

MONTEIRO, G.A.; SA-CORREIA, I. *In vivo* activation of yeast plasma membrane H⁺-ATPase by ethanol: effect on the kinetic parameters and involvement of the carboxyl-terminus regulatory domain. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1370, p. 310-316, 1998.

MORANO, K.A.; GRANT, C.M.; MOYE-ROWLEY, W.S. The response to heat shock and oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae*. **Genetics**, v. 190, p. 1157-1195, 2012.

MÜLLER, G. **Engenharia genômica da linhagem de levedura industrial CAT-1 visando melhorar o rendimento da Produção de etanol combustível**. Tese (Doutorado em Bioquímica) – Curso de Pós-Graduação em Bioquímica, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2013.

MUSSATTO, S.I. et al. Technological trends, global market, and challenges of bio-ethanol production. **Biotechnology Advances**, v. 28, p. 817–830, 2010.

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

NEHLIN, J.O.; RONNE, H. Yeast MIG1 repressor is related to the mammalian early growth response and Wilms' tumour finger proteins. **EMBO Journal**, v. 9, p. 2891–2898, 1990.

NISHIMURA, A. et al. An antioxidative mechanism mediated by the yeast N-acetyltransferase Mpr1: oxidative stress-induced arginine synthesis and its physiological role. **FEMS Yeast Research**, v. 10, p. 687–698, 2010.

PAIS, T.M. et al. Comparative Polygenic Analysis of Maximal Ethanol Accumulation Capacity and Tolerance to High Ethanol Levels of Cell Proliferation in Yeast. **PLoS Genetics**, v. 9, p. 6, 2013.

PARK, J.I. et al. The freeze-thaw stress response of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* is growth phase specific and is controlled by nutritional state via the RAS-cyclic AMP signal transduction pathway. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, p. 3818–3824, 1997.

PEREIRA, F.B. et al. Robust industrial *Saccharomyces cerevisiae* strains for very high gravity bio-ethanol fermentations. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 112, p. 130–136, 2011.

PETRACEK, M.E.; LONGTINE, M.S.; PCR-Based Engineering of Yeast Genome. In: Guthrie, C.; Fink, G.R. (Eds). **Methods in Enzymology**. v. 350 – Guide to Yeast Genetics and Molecular Cell

Biology, v. 25, p. 445-469, 2002.

PIŠKUR, J. et al. How did *Saccharomyces* evolve to become a good brewer? **Trends in Genetics**, v. 22, p. 183-186, 2006.

POSAS, F. et al. The transcriptional response of yeast to saline stress. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, p. 17249–17255, 2000.

PUIG, O. et al. New constructs and strategies for efficient PCR-based gene manipulations in yeast. **Yeast**, v. 14, p. 1139-1146, 1998.

QUEROL, A. et al. Adaptive evolution of wine yeast. **International Journal of Food Microbiology**, v. 86, p. 3–10, 2003.

RACHIDI, N.; BARRE, P.; BLONDIN, B. Multiple Ty-mediated chromosomal translocation lead to karyotype changes in a wine strain of *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular Genetics and Genomics**, v. 261, p. 841-850, 1999.

REP, M. et al. The transcriptional response of *Saccharomyces cerevisiae* to osmotic shock. Hot1p and Msn2p/Msn4p are required for the induction of subsets of high osmolarity glycerol pathway-dependent genes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, p. 8290–8300, 2000.

ROYALL, J.A.; ISCHIROPOULOS, H.; Evaluation of 2',7'-dichlorofluorescein and dihydrorhodamine 123 as fluorescent probes for intracellular H₂O₂ in cultured endothelial cells. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 302, p. 348–355, 1993.

RUIS, H.; SCHÜLLER, C. Stress signaling in yeast. **BioEssays**, v. 17, p. 959–965, 1995.

SADEH, A. et al. Fine-tuning of the Msn2/4-mediated yeast stress responses as revealed by systematic deletion of Msn2/4 partners. **Molecular and Cellular Biology**, v. 22, p. 3127–3138, 2011.

SADEH, A. et al. Conserved motifs in the Msn2-activating domain are important for Msn2-mediated yeast stress response. **Journal of Cell Science**, v. 125, p. 3333–3342, 2012.

SAITO, H.; POSAS, F. Response to Hyperosmotic Stress. **Genetics**, v. 192, p. 289–318, 2012.

SALGUEIRO, S.P.; SA-CORREIA, I.; NOVAIS, J.M. Ethanol-induced leakage in *Saccharomyces cerevisiae*: kinetics and relationship to yeast ethanol tolerance and alcohol fermentation productivity. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 54, p. 903–909, 1988.

SÁNCHEZ, Ó.J.; CARDONA, C.A. Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 5270-5295, 2008.

SASANO, Y. et al. Overexpression of the yeast transcription activator Msn2 confers furfural resistance and increases the initial fermentation rate in ethanol production. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 113, p. 451-455, 2012.

SCHELL, D. et al. Contaminant occurrence, identification and control in a pilot-scale corn fiber to ethanol conversion process. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 2942-2948, 2007.

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

SCHUBERT, C. Can biofuels finally take center stage? **Nature Biotechnology**, v. 24, p. 777-784, 2006.

SCHÜLLER, S. et al. The HOG pathway controls osmotic regulation of transcription via the stress response element (STRE) of the *Saccharomyces cerevisiae* *CTT1* gene. **EMBO Journal**, v. 13, p. 4382-4389, 1994.

SHERMAN, F. Getting started with yeast. **Methods in Enzymology**, v. 350, p. 3-41, 2002.

SILVEIRA, M.C.F.; CARVAJAL, E.; BON, E.P.S. Assay for *in vivo* yeast invertase activity using NaF. **Analytical Biochemistry**, v. 238, p. 26-28, 1996.

SMITH, A.; WARD, M.P.; GARRETT, S. Yeast PKA represses Msn2p/Msn4p-dependent gene expression to regulate growth, stress response and glycogen accumulation. **EMBO Journal**, v. 17, p. 3556-3564, 1998.

STAMBUK, B.U. et al. Brazilian potential for biomass ethanol: The challenge of using hexose and pentose co-fermenting yeast strains. **Journal of Scientific & Industrial Research**, v. 67, p. 918-926, 2008.

STAMBUK, B.U. et al. Industrial fuel ethanol yeast contain adaptive copy number changes in genes involved in vitamin B1 and B6 biosynthesis. **Genome Research**, v. 19, p. 2271-2278, 2009.

- SWINNEN, S. et al. Identification of novel causative genes determining the complex trait of high ethanol tolerance in yeast using pooled-segregant whole-genome sequence analysis. **Genome Research**, v. 22, p. 975-984, 2012.
- TAKAGI, H. et al. Effect of L-proline on sake brewing and ethanol stress in *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, p. 8656-8662, 2005.
- TAKESHIGE, K.; OUCHI, K. Effects of yeast invertase on ethanol production in molasses. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 79, p. 513-515, 1995.
- TANSEY, W.P. Transcriptional activation: risky business. **Genes & Development**, v. 15, p. 1045-1050, 2001.
- TATEBAYASHI, K. et al. Adaptor functions of Cdc42, Ste50, and Sho1 in the yeast osmoregulatory HOG MAPK pathway. **EMBO Journal**, v. 25, p. 3033-3044, 2006.
- TEIXEIRA, M.C. Genome-wide identification of *Saccharomyces cerevisiae* genes required for maximal tolerance to ethanol. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, p. 5761-5772, 2009.
- THEVELEIN, J.M.; WINDE, J.H. Novel sensing mechanisms and targets for the cAMP-protein kinase A pathway in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular Microbiology**, v. 33, p. 904-918, 1999.
- THOMAS, D.S.; HOSSACK, J.A.; ROSE, A.H. Plasma-membrane lipid composition and ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. **Archives of Microbiology**, v. 117, p. 239-245, 1978.
- THOMAS, K.C.; INGLEDEW, W.M. Production of 21% (V/V) ethanol by fermentation of very high gravity (VHG) wheat mashes. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 10, p. 61-68, 1992.
- TOONE, W.M.; JONES, N. Stress-activated signalling pathways in yeast. **Genes to Cells**, v. 3, p. 485-498, 1998.
- TORRE-RUIZ, M.A. How budding yeast sense and transduce the oxidative stress signal and the impact in cell growth and morphogenesis. **Current Protein and Peptide Science**, v. 11, p. 669-679, 2010.
- TREGER, J.M.; MAGEE, T.R.; MCENTEE, K. Functional analysis of the stress response element and its role in the multistress response of

Saccharomyces cerevisiae. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 243, p. 13–19, 1998.

TROTT, A.; MORANO, K.A. The yeast response to heat shock. In: Hohmann, S.; Mager, W.H. (Eds). *Yeast Stress Responses*. **Topics in Current Genetics**. v. 1, p. 71–119, 2003.

UNICA. Frota brasileira de autoveículos leves (ciclo Otto). 2014. <http://www.unicadata.com.br/listagem.php?Idmn=55>; Acessado em 15 de Abril de 2014.

VAN UDEN, N. Ethanol toxicity and ethanol tolerance in yeasts. **Annual Report Fermentation Process**, v. 8, p. 11–58, 1985.

VAN VOORST, F. et al. Genome-wide identification of genes required for growth of *Saccharomyces cerevisiae* under ethanol stress. **Yeast**, v. 3, p. 351–359, 2006.

VERGHESE, J. et al. Biology of the heat shock response and protein chaperones: Budding yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) as a model system. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 76, p. 115–158, 2012.

VERSTREPEN, K.J.; DERDELINCKX, G.; VERACHTERT, H. Yeast flocculation: what brewers should know. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 61, p. 197–205, 2003.

WACLAWOVSKY, A.J. et al. Sugarcane for bioenergy production: an assessment of yield and regulation of sucrose content. **Plant Biotechnology Journal**, v. 8, p. 263–276, 2010.

WALKER-CAPRIOGLIO, H.M.; CASEY, W.M.; PARKS, L.W. *Saccharomyces cerevisiae* membrane sterol modifications in response to growth in the presence of ethanol. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, p. 2853–2857, 1990.

WALKER-CAPRIOGLIO, H.M.; RODRIGUEZ, R.J.; PARKS, L.W. Recovery of *Saccharomyces cerevisiae* from ethanol-induced growth inhibition. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 50, p. 685–689, 1985.

WANG, S. et al. Grain pearling and very high gravity (VHG) fermentation technologies for fuel alcohol production from rye and triticale. **Process Biochemistry**, v. 34, p. 421–428, 1999.

- WHEALS, A.E. et al. Fuel ethanol after 25 years. **Trends in Biotechnology**, v. 17, p. 482-487, 1999.
- WIESER, R. et al. Heat shock factor-independent heat control of transcription of the *CTTI* gene encoding the cytosolic catalase T of *Saccharomyces cerevisiae*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 266, p. 12406–12411, 1991.
- YAZAWA, H.; IWAHASHI, H.; UEMURA, H. Disruption of *URA7* and *GAL6* improves the ethanol tolerance and fermentation capacity of *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, v. 24, p. 551-560, 2007.
- YOSHIKAWA, K. et al. Comprehensive phenotypic analysis for identification of genes affecting growth under ethanol stress in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Yeast Research**, v. 9, p. 32-44, 2009.
- ZALDIVAR, J.; NIELSEN, J.; OLSSON, L. Fuel ethanol production from lignocellulose: a challenge for metabolic engineering and process integration. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 56, p. 17–34, 2001.
- ZANIN, G.M. et al. Brazilian bioethanol program. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 84-86, p. 1147-1161, 2000.
- ZHAO, X.Q.; BAI, F.W.; Mechanisms of yeast stress tolerance and its manipulation for efficient fuel ethanol production. **Journal of Biotechnology**, v. 144, p. 23–30, 2009.
- ZINNAI, A. et al. Kinetics of D-glucose and D-fructose conversion during the alcoholic fermentation promoted by *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 115, n. 1, p. 43-9, 2013.