



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**“ANÁLISE MOLECULAR DA FLOCULAÇÃO E FORMAÇÃO DE ESPUMA POR
LEVEDURAS UTILIZADAS NA PRODUÇÃO INDUSTRIAL DE ÁLCOOL
COMBUSTÍVEL NO BRASIL”**

Mestranda: Catarina Macedo de Figueiredo

Orientador: Prof. Dr. Boris U. Stambuk

Departamento de Bioquímica – CCB – UFSC.

Florianópolis, Junho de 2008

Catarina Macedo de Figueiredo

**“ANÁLISE MOLECULAR DA FLOCULAÇÃO E DA FORMAÇÃO DE ESPUMA POR
LEVEDURAS UTILIZADAS NA PRODUÇÃO INDUSTRIAL DE ÁLCOOL COMBUSTÍVEL
NO BRASIL”**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Santa Catarina, visando à obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Boris U. Stambuk

Florianópolis, Junho de 2008

Parte desta Dissertação foi apresentada nos seguintes congressos e/ou eventos:

FIGUEIREDO, C. M.; STAMBUK, B. J. C. U. (2007) Análise da Floculação e Produção de Espuma por cepas industriais de *Saccharomyces cerevisiae* utilizadas na produção de Álcool Combustível no Brasil. *In: 24º Congresso Brasileiro de Microbiologia, Brasília - DF. Anais.....*

FIGUEIREDO, C. M. ; STAMBUK, B. J. C. U. (2008) Characterization of Flocculation and Foam production by Industrial *Saccharomyces cerevisiae* strains used for Fuel Ethanol production in Brazil. *In: XXXVII Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology, Águas de Lindóia - SP. Programa e Resumos.....*

Tendo recebido o Prêmio de Mérito Científico no 24º Congresso Brasileiro de Microbiologia (2007) pelo o trabalho: FIGUEIREDO, C.M. & STAMBUK, B.U. Analysis of Flocculation and Foam Formation by *Saccharomyces cerevisiae* industrial strains used in industrial ethanol production in Brazil.

**Dedico este Trabalho aos meus amados
Pais, Guilherme e Graça e aos meus
Irmãos, Leonardo e Daniel.**

AGRADECIMENTOS

- ∞ Ao professor Boris, pela sua orientação, apoio, dedicação, paciência e, sobretudo, pela oportunidade concedida a mim de fazer parte de seu grupo de trabalho, e pelo meu crescimento intelectual, profissional e pessoal;
- ∞ Ao professor Hernán pelo empréstimo de seus equipamentos, pela doação de alguns reagentes e por se responsabilizar pela minha orientação junto ao programa de Pós-graduação em biotecnologia, durante o período de afastamento para aperfeiçoamento do professor Boris;
- ∞ Aos professores Afonso e Risoleta, que permitiram o uso de seus equipamentos;
- ∞ Aos professores e funcionários do departamento de bioquímica da UFSC, assim como à coordenadoria, secretaria e professores da pós-graduação em biotecnologia, pelo apoio e esclarecimentos prestados ao longo do curso;
- ∞ Aos meus queridos amigos da turma do mestrado Gisele, Álvaro, Ênio, Mônica e Larissa pelos bons momentos dentro e fora da sala de aula;
- ∞ Aos colegas de laboratório Ana Cristina Camila, Carolina, Claus, Davi, Franciele, Gabriela, Javier, Júlio, Letícia, Luciano, Ludmila, Manuel, Marcelo, Patrícia, Paulo, Priscila, Rafael, Sérgio, Viviane pelas conversas e companhia durante tanto tempo no “lab”;
- ∞ Aos meus amigos queridos de Recife;
- ∞ Aos colegas e amigos que moram e que moraram comigo Marina, Odir, Emy, Naira, Andrezza e Martina, pela convivência agradável, pela amizade e pelo apoio que sempre me deram;
- ∞ Às mais que colegas Débo, Duda e Mah pelo companheirismo em tantas noites e finais de semana no “lab”, nos experimentos não tão bem sucedidos, nas sextas-feiras à noite em qualquer lugar e em tantos outros momentos;
- ∞ À Pós-Graduação em Biotecnologia da UFSC pela oportunidade;
- ∞ À FAPESP e CNPq pelo apoio financeiro, e à empresa FERMENTEC Ltda. pelo apoio financeiro que viabilizou a concessão de uma bolsa de Mestrado durante o segundo ano no programa, bem como pelo fornecimento de material de trabalho necessário ao desenvolvimento da dissertação;
- ∞ A todos que, de uma forma ou de outra, dentro ou fora da universidade, contribuíram para o meu crescimento não só profissional, mas também pessoal.

E, agradeço principalmente às pessoas mais importantes da minha vida, MEUS PAIS E MEUS IRMÃOS; porque sem o apoio e a torcida de vocês, nada disto teria acontecido e nada valeria à pena. O resultado está aqui e também é fruto de vocês. Amo muito vocês, FAMÍLIA.

Lista de Abreviaturas

AMPc	Adenosina Monofosfato Cíclica
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
GPI	Glicosilfosfatidilinositol
MAPK	Via de Quinases Mitogênicas
PKA	Proteína Quinase A
<i>r</i>	Coefficiente de correlação linear
Tris	2-amino-2-hidroximetil-1,3-propanediol
TOR	Via Rapamicina-Alvo
<i>Δflo11</i> e <i>Δflo8</i>	Linhagens deletadas nestes genes

Sumário

Lista de Figuras	i
Lista de Tabelas	ii
Resumo	iii
Abstract	iv
1. Introdução	
1.1 Histórico e Importância do Álcool Combustível no Brasil	1
1.2 Matérias-Primas do Etanol e suas Vias de Obtenção	3
1.3 Processos Fermentativos	6
1.4 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	9
1.5 Adesinas e Floculinas em <i>S. cerevisiae</i>	13
1.6 Regulação dos genes de adesina em <i>S. cerevisiae</i>	19
1.7 Recombinação entre Repetições Intragênicas geram Polimorfismos	23
2 Objetivos	
2.1 Objetivo Geral	25
2.2 Objetivos Específicos	25
3 Metodologia	
3.1 Linhagens de Leveduras e Condições de Cultivo	26
3.2 Ensaio de Floclulação	26
3.3 Ensaio de Produção de Espuma	28
3.4 Ensaio de Hidrofobicidade Celular	28
3.5 Ensaio de Crescimento Invasivo em Agar	29
3.6 Ensaio de Formação de Biofilme	29
3.7 Determinação de Polimorfismos por PCR	29
4 Resultados	
4.1 Análise da Produção de Espuma pelas Linhagens Industriais	32
4.2 Floclulação das Leveduras Industriais	35
4.3 Análise da Hidrofobicidade celular da Linhagens Industriais	39
4.4 Caracterização do Crescimento Celular Invasivo em Ágar e Formação de Biofilme pelas Linhagens Industriais	39
4.5 Polimorfismo dos genes das Adesinas	43
4.6 Correlações encontradas entre as características fenotípicas estudadas	51
5 Discussão	55
6 Considerações Finais e Perspectivas Futuras	61
7 Referências Bibliográficas	64

Lista de Figuras

Figura 1: Estrutura Geral de uma Floculina	14
Figura 2: Esquema de Adesão Intercelular mediado por Floculinas	16
Figura 3: Vias de Ativação do gene <i>FLO11</i>	22
Figura 4: Volume Máximo de Espuma Formada pelas Linhagens Industriais	33
Figura 5: Exemplos de Formação de Espuma pelas Linhagens Industriais Estudadas	34
Figura 6: Cinética da produção de Espuma por Linhagens Industriais	36
Figura 7: Floculação Celular na Presença e na Ausência de Ca^{+2}	37
Figura 8: Sedimentação celular na presença de Ca^{+2} após repouso de 10 min.	38
Figura 9: Solubilidade das Linhagens Industriais em Solventes Orgânicos	40
Figura 10: Crescimento Invasivo em 2% Ágar	41
Figura 11: Formação de Biofilme em meios contendo 0.3% de ágar	44
Figura 12: Polimorfismo do Gene <i>DAN4</i>	46
Figura 13: Polimorfismo do Gene <i>FLO1</i>	48
Figura 14: Polimorfismo do Gene <i>FLO11</i>	50
Figura 15: Correlações significativas encontradas entre as características fenotípicas estudadas	52
Figura 16: Correlações relevantes encontradas entre as características fenotípicas, e polimorfismos dos genes estudados	54

Lista de Tabelas

Tabela 1: Linhagens Industriais Analisadas	27
Tabela 2: Oligonucleotídeos iniciadores utilizados na reação de PCR	30
Tabela 3: Formação de Espuma pelas linhagens industriais analisadas	32
Tabela 4: Formação de Biofilme e Crescimento Invasivo pelas Linhagens Estudadas	42
Tabela 5: Polimorfismos dos Tamanhos dos genes de adesinas estudadas	47

Resumo

A produção de álcool combustível no Brasil é realizada, na maioria das usinas, através do sistema de batelada alimentada onde, as células de levedura, principalmente *Saccharomyces cerevisiae*, são constantemente centrifugadas e reutilizadas nos vários ciclos fermentativos ao longo da safra. Por ser um ambiente com altas concentrações de açúcares, baixo pH, altas pressões osmóticas e temperaturas elevadas, linhagens de *S. cerevisiae* que atuam no processo de fermentação devem estar adaptadas ao estresse encontrado e apresentar características ideais para o processo industrial. Entretanto, por se tratar de um processo fermentativo não-estéril, o mesmo está sujeito a constantes contaminações por bactérias e leveduras selvagens que trazem enormes prejuízos à indústria. Muitas vezes estas leveduras selvagens apresentam fenótipos como floculação, formação de espuma, pseudohifas, biofilme, e crescimento invasivo, características indesejáveis para a indústria de produção de álcool combustível. Estas propriedades apresentadas por algumas linhagens dificultam a centrifugação e reciclo das células, diminuem o volume útil das dornas, determinam menor contato entre as leveduras e mosto a ser fermentado, afetando portanto a produtividade além de aumentarem os custos de produção. Desta forma, a pronta identificação destas características nas linhagens de leveduras utilizadas nos processos industriais faz-se necessária para minimizar as perdas de rendimento. O presente trabalho tem como objetivo analisar fenotipicamente 17 linhagens isoladas diretamente das dornas de fermentação industrial quanto às várias propriedades descritas acima, e verificar a possível correlação entre as mesmas com a hidrofobicidade celular e polimorfismos em genes possivelmente envolvidos com estes fenômenos de superfície (genes de adesinas). Os resultados obtidos no presente trabalho revelaram significativa variabilidade entre as linhagens quanto às características fenotípicas analisadas. As melhores correlações observadas foram entre a hidrofobicidade celular, floculação (com e sem Ca^{2+}) e formação de biofilme, sendo que este último parâmetro foi inversamente correlacionado com o crescimento invasivo no agar em 70% das linhagens analisadas. A análise por PCR das regiões variáveis das adesinas *AWAI*, *DAN4*, *FLO1* e *FLO11* revelou que provavelmente nenhuma das linhagens possui o gene *AWAI*, enquanto que o gene *DAN4*, presente em mais de dois terços das cepas, não apresentou grandes polimorfismos. O gene *FLO1* foi detectado em um terço das linhagens analisadas, apresentando polimorfismos que foram correlacionados com a hidrofobicidade celular e floculação destas linhagens. Já no caso do gene *FLO11*, o polimorfismo em tamanho da região variável rica em serina e treonina desta adesina foi correlacionado com a floculação, formação de biofilme e produção de espuma de mais da metade das leveduras industriais analisadas. Os resultados obtidos sugerem que a hidrofobicidade celular, que utiliza metodologia simples e rápida na sua determinação, pode ser um parâmetro interessante a ser implementado nas usinas para avaliar o potencial floculante e de produção de biofilme das linhagens presentes no processo industrial, enquanto que o polimorfismo da adesina *FLO11*, determinado através de PCR, pode revelar importante informação sobre o seu potencial floculante e de produção de biofilme e espuma.

Palavras-chave: *Saccharomyces cerevisiae*, Floculação, Espuma, Biofilme, Crescimento Invasivo, Hidrofobicidade Celular, Polimorfismo, *FLO1*, *FLO11*, *DAN4*, *AWAI*.

Abstract

Fuel ethanol production in Brazil is performed, in the majority of distilleries, using a fed-batch process where the yeast cells, mainly *Saccharomyces cerevisiae*, are continuously centrifuged and reused in several fermentative cycles during the whole crop season. This industrial environment, with high concentrations of sugar, low pH, high osmotic pressure and high temperature, requires that the *S. cerevisiae* strains that perform the fermentative process should be adapted to the stresses encountered and show desirable industrial characteristic. However, since it is not a sterile fermentation process, it is constantly contaminated with bacteria or wild yeasts that may impose significant economic losses to this industry. Commonly, these wild yeasts will have some phenotypes like flocculation, foam, pseudohypha and biofilm formation, and invasive growth that are undesirable characteristics for the fuel ethanol industry. These properties expressed by some strains bring problems in centrifuging and recycling of the cells, decrease the usable volume of the fermentors, determine a shorter contact between the yeasts and the medium to be fermented, affecting the productivity and increasing production costs. Therefore, the rapid identification of these characteristics in yeast strains used in the industrial processes is required to diminish yield losses. The objective of the present study was to phenotypically analyze 17 strains isolated directly from the industrial fermentors regarding the properties described above, and to verify possible correlations between them and the cellular hydrophobicity and polymorphisms on genes probably involved in these surface phenomena (adesin genes). The results obtained in the present study revealed significant variability in the analyzed phenotypic characteristics among yeast strains. The best correlations were found between cellular hydrophobicity, flocculation (with or without Ca^{2+}), and biofilm formation, and this last parameter was inversely correlated with invasive growth in agar in 70% of the strains analyzed. PCR analysis of the variable regions of the *AWAI*, *DAN4*, *FLO1* and *FLO11* adesins revealed that probably none of the strains harbor de *AWAI* gene, while the *DAN4* gene, present in two thirds of the strains, did not show great polymorphisms. The *FLO1* gene was detected in one third of the analyzed strains, showing polymorphisms that were correlated with the cellular hydrophobicity and flocculation of these strains. Regarding the *FLO11* gene, the size polymorphism of the serine- and threonine-rich variable region of this adesin was correlated with flocculation, biofilm and foam production of more than half of the industrial yeast analyzed. The results obtained suggest that the cellular hydrophobicity, which uses a simple and rapid methodology for its determination, can be an interesting parameter to be introduced in the distilleries to evaluate the flocculent and biofilm production potential of the strains present in the industrial process, while the polymorphism of the *FLO11* adesin, determined through PCR, can reveal important information regarding its flocculent, biofilm and foam production potential.

Keywords: *Saccharomyces cerevisiae*, Flocculation, Foam, Biofilm, Invasive Growth, Cellular Hydrophobicity, Polymorphism, *FLO1*, *FLO11*, *DAN4*, *AWAI*.

1 Introdução

1.1 Histórico e Importância do Álcool Combustível no Brasil

As indústrias de açúcar e de álcool sempre estiveram correlacionadas desempenhando um papel importante na economia brasileira desde a época do Brasil Império. Deduz-se que a produção de açúcar teve início em 1532 na capitania de São Vicente e posteriormente na de Pernambuco, a partir da vinda das primeiras mudas de cana-de-açúcar provenientes da ilha da Madeira, embora a produção industrial de etanol, no Brasil, tenha começado efetivamente em meados do século XIX, com as sobras de melaço da indústria de açúcar, que ampliava sua capacidade produtiva (WHEALS, et al., 1999; LIMA, et al., 2001).

Em 1929, devido a uma grande crise internacional, a indústria açucareira no Brasil não ficou a salvo. Em remediação a este fato, foi instalada a primeira indústria de álcool anidro brasileira, e também, estabelecida a medida da obrigatoriedade da mistura de 5% de etanol à gasolina. A partir dos anos 70, com a crise mundial de petróleo, iniciou-se uma nova fase na produção de etanol no Brasil. O álcool surgiu, então, como um combustível alternativo, e com a sua utilização, ampliou-se o parque canavieiro, realizou-se uma modernização das destilarias, houve instalação de unidades autônomas, assim como a criação de grande número de empregos diretos e indiretos. A este programa de incentivo à produção de etanol, foi dado o nome de Pró-Álcool (WHEALS, et al., 1999; LIMA, et al., 2001).

A produção total de etanol no Brasil cresceu aproximadamente 4% ao ano desde a década de 90, produzindo cerca de mais de 13% da energia requerida pelo país no final dessa década. Concomitantemente, os custos diminuíram cerca de 3% ao ano desde o

programa Pró-Álcool, resultando num incentivo maior à indústria de etanol como álcool combustível (WHEALS, et al., 1999).

Um dos grandes avanços tecnológicos no processo de fermentação no Brasil foi a introdução do sistema *Melle-Boinot*, que consistia em fermentações com alta densidade celular e reciclagem das leveduras. No sistema *Mellot-Boinot*, o fermento passava por centrífugas contínuas, que separavam o fermento do mosto fermentado a ser destilado. Essas células recuperadas eram denominadas como “pé-de-cuba”, ou pré-inóculo, e seguiam para posteriores tratamento e purificação, sendo assim reaproveitadas em ciclos subseqüentes na produção de álcool combustível (AMORIM, 2005).

Atualmente, o Brasil é o maior produtor mundial de cana de açúcar, tendo produzido cerca de 430 milhões de toneladas entre os anos de 2006 e 2007. A cana é destinada à produção de açúcar e álcool combustível, onde cerca de 30 milhões de toneladas e 18 milhões de m³ foram produzidos, respectivamente entre 2006-2007 (www.portalunica.com.br). O álcool combustível ou bioetanol vem sendo considerado como uma mercadoria lucrativa de acordo com o seu uso crescente como fonte de energia renovável. Hoje em dia, o Brasil tem toda a sua produção industrial de etanol realizada em mais de 300 destilarias, que estão concentradas nas regiões sudeste e nordeste (SILVA FILHO, et al., 2005).

Por ser uma fonte de energia renovável, a utilização do etanol como combustível surgiu na tentativa de tornar o país mais independente do petróleo internacional, sendo a produção desta energia viável por conta da agricultura e das condições econômicas brasileiras. Um dos principais aspectos da utilização do álcool combustível em relação à gasolina é que este é renovável. O etanol pode ser utilizado de várias maneiras: como combustível puro, ou adicionado em diferentes proporções à gasolina ou ao diesel,

diminuindo a emissão de gases tóxicos na atmosfera (WHEALS, et al., 1999; HILL, et al, 2006).

1.2 Matérias-Primas do Etanol e suas Vias de Obtenção

O etanol é proveniente de qualquer produto que contenha açúcar ou outro carboidrato, o qual constitui a sua matéria-prima. A escolha da matéria-prima é realizada a partir de alguns aspectos, tais como o volume de produção, o rendimento industrial e o custo de fabricação. No Brasil, as matérias-primas mais utilizadas na produção industrial de etanol são os melões e o caldo de cana-de-açúcar (WHEALS, et al., 1999; LIMA, et al., 2001). Este último geralmente é constituído de 74% de água, 12,5% de sacarose (dissacarídeo formado por dois açúcares redutores, D-glicose[α 1-2 β]D-frutose), 0,9% de D-glicose, 0,6% de D-frutose, 10% de fibras e o restante dividido entre matérias minerais e outros compostos. Já a composição química do melão, resíduo da fabricação do açúcar, contém em torno de 62% de açúcares (predominantemente sacarose), 20% de água, e 18% de outros compostos (LIMA, et al., 2001). Entretanto, a composição do melão pode variar de acordo com o tipo, a qualidade e o tempo de estocagem da cana bruta utilizada, os métodos de manufatura do açúcar e a região de plantio (ANDRIETTA, et al., 2007).

No Brasil, 70% das destilarias de álcool utilizam o processo de batelada alimentada com uma capacidade fermentativa maior que 1,5 milhões de litros de etanol, por ciclo fermentativo. Alguns fatores como a alta concentração de leveduras (8-17% v/v) e altas temperaturas (33-35°C) contribuem para a eficiente produção de 8-11% (v/v) etanol, apesar da redução no crescimento celular. Finalmente, o líquido fermentado é destilado, produzindo etanol a 95,5% (v/v) que pode ser convertido a álcool anidro pela remoção da água (WHEALS, et al., 1999).

As leveduras presentes nas dornas de fermentação (tanque industrial onde acontecem os processos fermentativos da produção de álcool combustível) são responsáveis pela transformação dos açúcares em etanol, processo que independe da presença de oxigênio (PIŠKUR, et al., 2006). Segundo Silva Filho e colaboradores (2005), dois dos principais fatores que influenciam no processo de fermentação alcoólica para a produção de combustíveis são a capacidade fermentativa das leveduras utilizadas no processo, e a resistência destas às condições de estresses submetidas.

Entretanto, como os substratos adicionados às dornas de fermentação (melaço e/ou caldo de cana-de-açúcar) não são esterilizados, a fermentação alcoólica para a produção de combustíveis é considerada um processo complexo com sucessões intensas de linhagens de leveduras. Isso favorece ao desenvolvimento de linhagens de leveduras selvagens de *Saccharomyces cerevisiae* e não-*Saccharomyces cerevisiae*, que podem causar a diminuição da produtividade e outros problemas operacionais. A estabilidade das populações (e conseqüentemente da eficiência de produção) depende da utilização de linhagens resistentes e bem adaptadas ao processo industrial. Esta estabilidade ajuda a manter a taxa de produção de etanol alta e estável (AMORIM, et al., 2004; SILVA FILHO, et al., 2005; ANDRIETTA, et al., 2007).

A cana-de-açúcar possui uma microbiota natural bastante vasta com cerca de 100 espécies de fungos por planta. Os gêneros *Saccharomyces*, *Torula* e *Pichia* aparecem como os mais abundantes na matéria bruta utilizada, a cana-de-açúcar. Estas leveduras apresentam-se como principais candidatas a dominar, em biomassa, os tanques de produção de bioetanol. Em alguns tipos de fermentação alcoólica de bebidas fermentadas (produção de *cachaça*), não há a introdução de um pré-inóculo no início do processo fermentativo. Nestes casos, o processo é iniciado por uma mistura de suco de limão, arroz e amido, que apresenta uma fermentação espontânea por 12 a 24 horas. Então, o caldo-de-

cana é adicionado à mistura até que seja observada a produção de CO₂. Isto indica que leveduras nativas estão presentes neste caldo e são responsáveis pela produção da bebida. De qualquer forma, leveduras como *Rhodotorula glutinis*, *Cândida maltosa*, *Kluyveromyces marxianus*, *Cândida valida*, *Candida glabrata*, *Schizosaccharomyces pombe*, *S. exiguus*, *S. unisporus*, e *Saccharomyces paradoxus* vêm sendo isoladas a partir das dornas de fermentação em destilarias brasileiras. Entretanto, *S. cerevisiae* mostra-se como o gênero predominante no mosto (líquido rico em açúcares ser fermentado) de caldo-de-cana (ANDRIETTA, et al., 2007). Recentemente Liberal e colaboradores (2007) identificaram e caracterizaram, através de métodos moleculares, a principal levedura contaminante das plantas de produção de álcool combustível do nordeste brasileiro como sendo a *Dekkera bruxellensis*. Já Basílio e colaboradores (2008) isolaram e identificaram molecularmente 24 espécies de leveduras presentes em dornas de fermentação do nordeste brasileiro e observaram que espécies como *D. bruxellensis*, *Candida tropicalis*, e *Pichia galeiformis* estavam envolvidas com a maioria dos episódios de contaminação por leveduras nas dornas.

Contudo, não somente gêneros de leveduras colonizam as dornas de fermentação. Alguns gêneros de bactérias, principalmente *Bacillus*, *Achromobacter*, *Flavobacterium*, *Microrcoccus*, *Escherichia coli*, *Aerobacter aerogenes*, *A. cloacae*, *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Corynebacterium* mostram-se presentes no mosto fermentado do caldo-de-cana. Entretanto, como as bactérias lácticas são as mais abundantes no substrato de caldo-de-cana, elas também estão sempre presentes nas dornas; cerca de 60% do total de bactérias (ANDRIETTA, et al., 2007).

1.3 Processos Fermentativos

O processo de produção de álcool combustível no Brasil difere drasticamente de outras fermentações industriais. Existem duas peculiaridades em relação a este tipo de fermentação: a primeira é que o mosto a ser fermentado não é submetido a um tratamento prévio para a remoção da microbiota nativa da cana-de-açúcar. A segunda são os números de ciclos fermentativos. Ultimamente, grandes volumes de linhagens de *Saccharomyces* são isoladas durante o processo fermentativo em destilarias brasileiras e vêm sendo utilizadas como pré-inóculo em diversas unidades industriais. Após a caracterização como boas fermentadoras e capazes de dominar o processo fermentativo durante toda a safra, elas são utilizadas como biomassa tanto na unidade em que foi isolada, assim como, em outras unidades. Essas linhagens receberam, então, nomes referentes às iniciais das unidades onde foram isoladas, como: BG-1 (Usina Barra Grande), CR-1 (Usina Cresciumal), SA-1 (Usina Santa Adélia), CAT-1 (Usina Catanduva), PE-2 (Usina da Pedra), entre outras. Com isso, a utilização de leveduras isoladas no processo e posteriormente selecionadas constitui uma alternativa viável na iniciação da temporada industrial (AMORIM, 2005; ANDRIETTA, et al., 2007).

No início da temporada, a linhagem de levedura escolhida para dominar o processo fermentativo é propagada, sendo reciclada e reutilizada durante toda a safra. A reutilização é realizada a partir da centrifugação do mosto fermentado, onde as células são separadas deste, retornando às dornas de fermentação após tratamento ácido. A quantidade de células no processo, assim como, a viabilidade celular são acompanhadas regularmente nas destilarias. A evolução da fermentação alcoólica segue a tendência de outros processos industriais, com a introdução de processos contínuos. A principal vantagem deste tipo de processo inclui o melhor controle do processo e a modernização da indústria, com aumento

na produção, redução dos períodos não-produtivos, e condução da fermentação durante a fase estacionária do processo (ANDRIETTA, et al., 2007).

Contudo, as leveduras apresentam algumas características fenotípicas que podem prejudicar o desempenho industrial. O maior problema encontrado nas usinas de produção de álcool combustível é a floculação prematura das células já que a diminuição do tempo de contato entre as células e o mosto, causada pela floculação celular, reduz o rendimento da fermentação, provocando sérios prejuízos ao processo (AMORIM, 2005).

A floculação de leveduras é um fenômeno que se caracteriza pela adesão entre as células formando aglomerados, finalizando numa sedimentação destes flocos em meios onde anteriormente encontravam-se em suspensão (SATO, et al., 2001; KOIZUMI & OGAWA, 2005). Este fenômeno acontece normalmente com as leveduras em condições de estresse que afetam a composição e morfologia da parede celular. Alguns fatores de estresse comuns aos processos fermentativos industriais, promotores de floculação, incluem a diminuição da quantidade de nutrientes, e condições de temperatura, pH e oxigênio não adequados ao crescimento (VERSTREPEN, et al., 2003).

De acordo com Koizumi e Ogawa (2005), a floculação pode acontecer prematuramente, ou seja, antes da depleção total de nutrientes no meio. No caso dos processos industriais de produção de álcool combustível, onde centrífugas são utilizadas para separar o mosto fermentado das células, a floculação é altamente indesejada, já que os flocos celulares tendem a interferir no correto empacotamento das células sedimentadas pela centrífuga, impedindo a correta separação do mosto, com conseqüentes perdas no reciclo.

Na tentativa de determinar e quantificar a capacidade floculante das leveduras *S. cerevisiae*, quatro parâmetros são tomados como base: força de interação entre as células, a sua morfologia, a taxa de sedimentação e a quantidade de sedimento. Uma estimativa

macroscópica do tamanho do floco também pode ser utilizada como um parâmetro de caracterização da floculação. A quantidade de sedimento e a sua taxa de formação envolvem a quantificação das células em suspensão e sedimentadas (D' HAUTCOURT & SMART, 1999). Um dos principais adjuvantes no processo de floculação é o cálcio. Por, isso, a floculação de leveduras é classificada como cálcio-dependente. O Ca^{2+} participa das interações entre as proteínas de superfície das células floculantes e os resíduos de açúcar, principalmente a cadeia de manose, na superfície de outras células, ajudando a manter a estabilidade das proteínas envolvidas na floculação (SATO, et al., 2001).

A produção de espuma aparece como outra característica fenotípica comumente encontrada em dornas de fermentação alcoólica que provoca uma diminuição no rendimento final do processo fermentativo, pois uma grande parte do fermentador fica ocupada pela espuma formada, como também provoca uma diminuição do reciclo das células. A produção de espuma inicia quando o processo fermentativo está em fase exponencial, e diminui quando este processo se torna mais fraco, podendo ser inclusive utilizado como um importante indicador de progresso no processo fermentativo (SHIMOI, et al., 2002; MIYASHITA, et al., 2004).

A capacidade de formação de espuma, assim como a floculação, vem sendo relacionada com a hidrofobicidade da superfície celular das leveduras, pois ao comparar a hidrofobicidade superficial destas células formadoras de espumas com células não-produtoras de espuma, identifica-se uma hidrofobicidade maior nas superfícies celulares das leveduras espumantes (SHIMOI, et al., 2002; MIYASHITA, et al., 2004). Acredita-se que a hidrofobicidade das superfícies celulares das leveduras permitam uma maior afinidade destas com a interfase ar-líquido das bolhas, levando assim, ao acúmulo de uma grande quantidade de células na espuma formada (DE-SOUSA et al., 2006). Este fato leva

a uma diminuição de células em contato direto com o substrato a ser fermentado, diminuindo a geração do produto, prejudicando o rendimento final de etanol produzido.

1.4 *Saccharomyces cerevisiae*

S. cerevisiae é uma levedura amplamente utilizada em diferentes aplicações industriais, devido principalmente a forte tendência que este microrganismo apresenta de realizar fermentações alcoólicas, gerando produtos como pão, cerveja, vinho, *sake* e álcool combustível. Por isso, estas leveduras vêm sendo extensivamente estudadas e exploradas pela sociedade acadêmica e industrial. Estes organismos são sabidamente os mais tolerantes ao etanol dentre os conhecidos na natureza, podendo proliferar-se em meios contendo 14-16% v/v de etanol. Tendo em vista a habilidade desta levedura de produzir etanol e sua alta tolerância a este, foi proposto que esta característica de *S. cerevisiae* permitiria inibir o crescimento de organismos competitivos nos ambientes ricos em açúcar onde, normalmente são encontrados (VERSTREPEN, et al., 2003; PIŠKUR, et al., 2006). Além disso, *Saccharomyces* apresenta um crescimento rápido, eficiente metabolização de açúcares, habilidade na produção e consumo de etanol, tolerância a altas concentrações de etanol e baixos níveis de oxigênio, osmotolerância, tolerância a grandes variações de temperatura, e atividade celular em ambientes ácidos que são fundamentais na sua utilização industrial (VERSTREPEN, et al., 2003; PIŠKUR, et al., 2006; ANDRIETTA, et al., 2007).

Leveduras desta espécie desenvolveram também habilidades de sobreviver e se adequar a ambientes inóspitos e estressantes. Através da sua capacidade de formar filamentos, de apresentar crescimento invasivo sob a forma de pseudohifas, de flocular, de formar espuma e de desenvolver biofilmes, este microrganismo não só pode explorar

novos ambientes à procura de nutrientes, como também consegue se fixar e persistir naqueles adequados ao seu desenvolvimento (FIDALGO, et al., 2006).

A mudança da forma arredondada ou oval geralmente associada à *S. cerevisiae* para a forma filamentosa é denominada de dimorfismo, caracterizado por formação de cadeias de células. A filimentação é considerada uma importante resposta adaptativa que permite à colônia fúngica ir à busca de nutrientes quando esta encontra-se em ambientes pobres e escassos em nutrientes. Esta vasta exploração do ambiente em condições de baixas fontes energéticas para a célula culmina em adesão intercelular, crescimento celular polarizado promovendo acessibilidade ao substrato e alta taxa volume-superfície dos filamentos, podendo facilitar o transporte de nutrientes (CECCATO-ANTONINI, 2008).

As principais filimentações morfológicas encontradas são a formação de pseudohifas, caracterizado por longos ramos de células aderidas umas às outras, e crescimento invasivo no ágar, onde células individuais adotam brotamentos não-axiais e morfologia alongada, principalmente em resposta à ausência de glicose ou outros açúcares fermentáveis. Embora, a formação de pseudohifas esteja associada à linhagens diplóides e crescimento celular invasivo à haplóides, isso não significa que haplóides não sejam capazes de formar pseudohifas e diplóides de crescerem invasivamente. A diferença é que os filamentos das diplóides se estendem substancialmente ao redor da colônia na superfície do ágar, enquanto nas haplóides, a filimentação não se mostra tão extensiva assim. Além disto, os filamentos formados por linhagens diplóides são mais resistentes a lavagens vigorosas das células crescidas em superfícies como o ágar.

Atualmente, pouco se conhece sobre a extensão e significância da transição dimórfica das linhagens industriais, incluindo como o substrato e as condições de cultivo dos processos biotecnológicos podem induzir mudanças morfológicas em *S. cerevisiae*. Tendo em vista estas características supõe-se que o crescimento invasivo possa ser uma

resposta comum em linhagens industriais diplóides de *S. cerevisiae*, podendo estar relacionada ao padrão de crescimento desta linhagem na natureza, assim como promovendo capacidade de penetrância em substratos naturais como uvas, cana-de-açúcar, etc. Como o caule e colmos da cana-de-açúcar são os principais nichos de origem das linhagens industriais de *S. cerevisiae*, acredita-se que a capacidade de crescer invasivamente esteja viabilizando esta colonização. Acredita-se também que a migração de linhagens de *S. cerevisiae* do solo para o caule da cana-de-açúcar pode fundamentar ainda mais a idéia de que a filamentação é uma característica importante para alguns microrganismos na busca por nutrientes (CECCATO-ANTONINI, 2008).

Como estas linhagens são selvagens ou nativas, elas possuem formações especializadas, dimorfismo celular, que lhes conferem vantagens sobre a comunidade de leveduras em geral. Estas características podem fornecer maior proteção em ambientes estressantes, vantagens na colonização de ambientes diversos, maior acessibilidade a nutrientes, assim como, formação de subgrupos celulares, aumentando a resistência deste organismo em ambientes adversos e seleção de células com funções especializadas. Em um ambiente de laboratório, as leveduras geralmente são mantidas sob temperatura ótima, em meios de cultura líquidos ou em ágar com a devida umidade e abundantes nutrientes. Entretanto, quando estão em ambientes naturais, as leveduras são submetidas a mudanças constantes na temperatura, umidade (excesso ou escassez), ação de compostos tóxicos ambientais ou produzidos por outros organismos. Para lidar com estes tipos de adversidades, as leveduras possuem sistemas que as ajudam a sobreviver, incluindo osmossensores, osmorreguladores, sistemas de excreção de drogas, mecanismos que mantêm a integridade da parede celular, entre outras. Para que estes sistemas funcionem bem, as leveduras tendem a se organizar em estruturas tridimensionais, como por exemplo,

formando biofilmes, colônias, pseudohifas, possibilitando que células se especializem e se organizem em diferentes níveis (PALKOVÁ & VÁCHOVÁ, 2006).

Contrastando com o comportamento das linhagens de *S. cerevisiae* de laboratório, que em geral formam colônias lisas e uniformes, as linhagens selvagens tendem a formar colônias não-convencionais, ou seja, estruturas enrugadas. A morfologia da colônia é influenciada pela presença de diversos tipos celulares, como células leveduriformes, pseudohifas e hifas. As células leveduriformes são comumente encontradas separadas. As pseudohifas são formadas por células elípticas que continuam ligadas umas às outras e geralmente crescem sob forma de galhos ou ramos. A verdadeira hifa consiste em longos filamentos de células individuais que também encontram-se sob a forma de galhos ou ramos, e cujo conteúdo citoplasmático tende a se fundir, produzindo a hifa multinucleada que até o presente não foi observada em *S. cerevisiae* (PALKOVÁ & VÁCHOVÁ, 2006).

A formação de biofilmes é outra característica que difere linhagens selvagens de linhagens de laboratório. Estes microrganismos selvagens possuem a habilidade de crescer em associação com superfícies diversas, como poliestireno, vidro, ágar, formando agregados, os biofilmes. Os biofilmes são designados como comunidades microbianas que possuem funcionalidade e arquitetura diferenciadas, podendo aparecer em superfícies vivas (bióticas) e inertes ou abióticas (REYNOLDS & FINK, 2001; PALKOVÁ & VÁCHOVÁ, 2006).

Leveduras, como outros microrganismos, possuem a capacidade de se adaptar eficientemente em diversas condições ambientais. Várias vias estão envolvidas com a adaptação celular das leveduras. Em geral, a primeira reação das leveduras a condições de estresse envolve a ativação dos genes responsáveis por respostas aos estresses ambientais (ERS), incluindo genes que codificam para proteínas que ajudam à célula a sobreviver ao estresse imediato. Uma adaptação eficiente destas comunidades celulares pode incluir um

aspecto de diferenciação (transição dimórfica) e assim, um diferente destino para os indivíduos pertencentes à comunidade. Um exemplo típico é a mudança da forma leveduriforme de *S. cerevisiae* para a forma de pseudohifa quando em ambientes com depleção de nitrogênio ou carbono (PALKOVÁ & VÁCHOVÁ, 2006). Halme e colaboradores (2004) revelaram que genes encontrados próximos aos telômeros (que codificam para adesinas e floculinas) estão envolvidos com esta mudança morfológica da célula. Pode-se especular que esta situação é vantajosa para essas comunidades pois, podem transitar entre forma leveduriforme e pseudohifa quando esta for mais conveniente para o ambiente em que se encontram.

1.5 Adesinas e Floculinas em *S. cerevisiae*

As principais proteínas envolvidas na floculação são as adesinas, ou mais especificamente, as floculinas, que conferem às células a capacidade de aderência. As adesinas são classificadas geralmente como glicoproteínas que estão localizadas na superfície da parede celular, e medeiam interações entre as células e o ambiente externo. Elas participam na interação sexual das leveduras, formação de biofilmes, aderência intercelular ou a superfícies diversas, formação do broto celular e interações entre a levedura e células de mamíferos ou de plantas (DRANGINIS, et al., 2007). As adesinas de uma mesma espécie podem variar entre as linhagens, assim como os microrganismos podem possuir receptores para diferentes adesinas (TORTORA, et al., 2005).

Em leveduras, as adesinas apresentam uma organização básica que confere suas características, incluindo a localização no lado externo das células (Figura 1): um sinal secretório de 20 a 30 aminoácidos na porção N-terminal (normalmente removido durante a inserção da proteína no lúmen do retículo endoplasmático rugoso), um domínio de ligação proteína-açúcar (“lectin like”) também situado na porção N-terminal, uma porção central

com seqüências repetitivas ricas em resíduos de serina e treonina (local de *o*-glicosilação no complexo de Golgi) contendo também seqüências hidrofóbicas, e a porção C-terminal que media a interação da proteína com a matriz da parede celular através da cauda de GPI (glicosilfosfatidilinositol) inserida na membrana celular (GUO, et al., 2000; VERSTREPEN, et al., 2004a; DRANGINIS, et al., 2007).

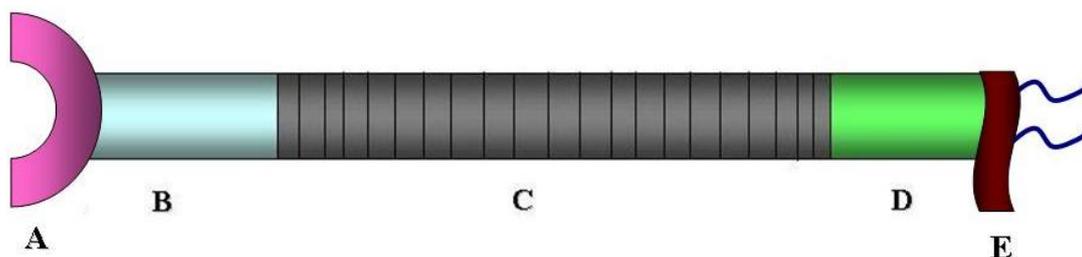


Figura 1: Estrutura geral de uma floculina. Porção N-Terminal (A e B) da proteína, contendo o domínio “lectin-like” (A) de ligação de açúcares; seguido do domínio Central polimórfico rico em Ser/Thr (C); e o domínio C-Terminal (D e E), contendo a cauda GPI (E).

O domínio central contendo regiões repetitivas ricas em serina e treonina geralmente apresenta polimorfismos de tamanho que estão associados à evolução de sítios funcionais, principalmente mostrando-se como motivos de glicosilação e fosforilação. Segundo Bowen e Wheals (2006), quando há uma alteração na quantidade de repetições destes resíduos, em algumas proteínas de parede celular, pode haver uma mudança das propriedades fisiológicas da mesma, provavelmente conferindo certas vantagens adaptativas em determinadas condições ambientais. As moléculas de manose, que foram integradas aos resíduos de serina e treonina nas *O*-glicosilações, atuam na interação célula-célula, ligando-se a receptores celulares de membrana e aos resíduos “lektin-like” das regiões N-terminal de outras adesinas, promovendo a adesão intercelular (Figura 2). Resíduos de prolina também são freqüentes nesta região, e juntamente com os resíduos de serina e treonina funcionam como espaçadores, mantendo o domínio de adesão da proteína na parte externa da parede celular. Entre estes aglomerados de resíduos ser/thr existem conjuntos de resíduos hidrofóbicos, assim como resíduos de cisteína. Estes aminoácidos, capazes de formar pontes dissulfeto entre eles, encontram-se próximos à superfície da parede celular e interferem nos limites de permeabilidade da parede celular. Finalmente, a região C-Terminal, que apresenta também uma pequena cauda intracelular (~5 resíduos de aminoácido), após algumas modificações pós-translacionais recebe a ancora de GPI assim como alguns resíduos de manose, que são adicionados predominantemente aos resíduos de açúcar do glicosilfosfatidilinositol (BOWEN, et al., 2006; DRANGINIS, et al., 2007).

Vários estudos têm caracterizado genes envolvidos no processo de floculação em *S. cerevisiae*, incluindo os genes pertencentes à família *FLO*, e o *DAN4* (GUO, et al, 2000; MARINANGELI, et al., 2003; HALME, et al., 2004; ZARA, et al., 2005; VERSTREPEN, et al., 2005).

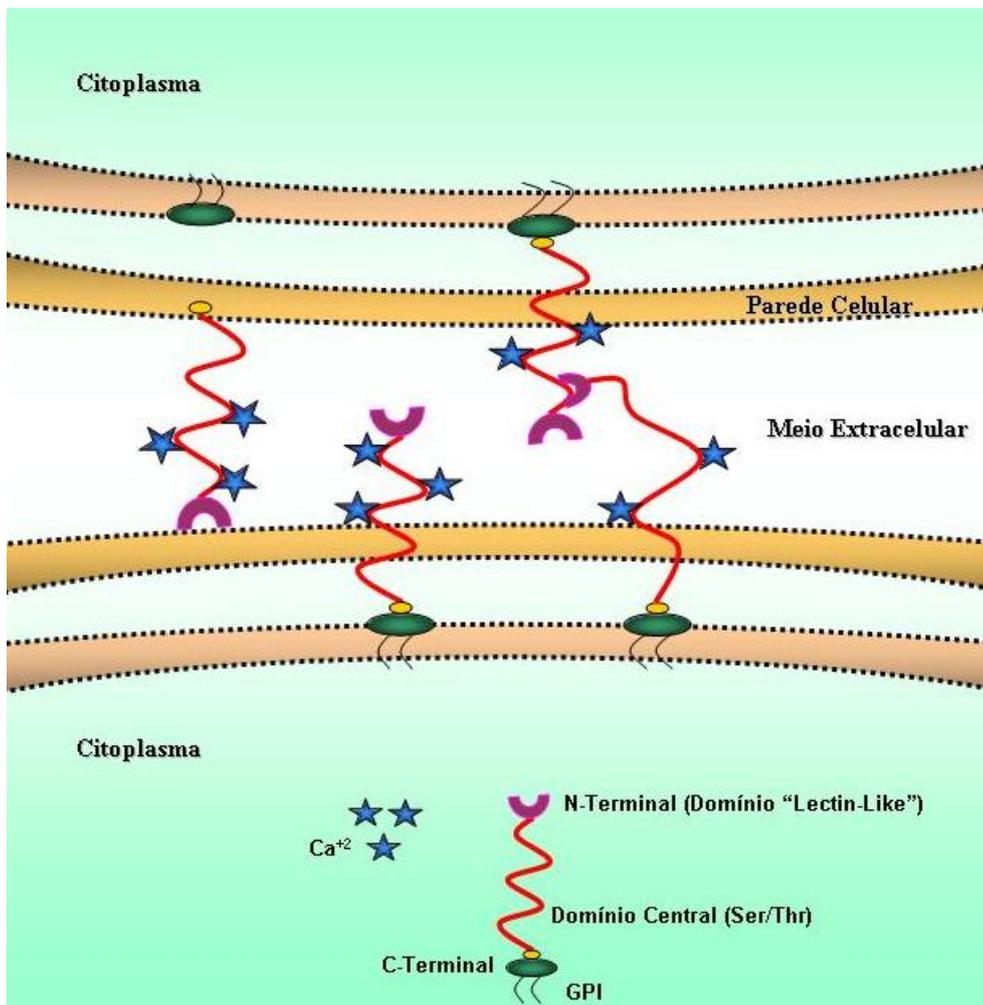


Figura 2: Esquema de Adesão Intercelular mediado por Floculinas. A figura representa as formas de adesão via floculinas; tanto ligação floculina-floculina, através da ligação do domínio “lectin-like” e resíduos de manose encontrados presos à outra floculina, quanto ligação floculina-parede celular a resíduos de manose presentes na superfície de outras células.

A família *FLO* é constituída por diferentes genes com localização telomérica (~10-40 kb do telômero), incluindo o *FLO1*, *FLO2*, *FLO4*, *FLO5*, *FLO8*, *FLO9*, *FLO10*, e o gene *FLO11* que constitui o único a situar-se na região subtelomérica do braço direito do cromossomo IX (HALME, et al., 2004).

O gene *FLO1* está situado no braço direito do cromossomo I e é o gene floculante mais conhecido. Sua fase de leitura é constituída por ~ 4.6 kb, a qual inclui um grande número de seqüências repetitivas em sua parte central, variável de acordo com a linhagem. Este gene codifica para uma glicoproteína (*flo1*) que possui a estrutura de uma típica floculina, e tem sido reportado como um dos responsáveis pela adesão célula-célula (VERSTREPEN, et al., 2003; 2005; CUNHA, et al., 2006). A adesão, que acontece a partir da interação de *FLO1* com resíduos de manose, pode ser geralmente inibida pela presença deste açúcar no meio, pois esta poderá ocorrer entre a floculina e os resíduos de manose encontrados no meio, ao invés da ligação ocorrer com os açúcares ligados à parede celular e/ou a floculinas de outras células. (SATO, et al, 2001; VERSTREPEN, et al., 2005; LIU, et al., 2007).

Entretanto, algumas linhagens de leveduras floculantes apresentam o gene *FLO1* com algumas alterações, e foram denominados *Lg-FLO1* ou *NewFLO*. Estes genes codificam para adesinas que provavelmente se ligam aos receptores com resíduos tanto de manose, quanto de glicose, sacarose e maltose, sendo o seu fenótipo floculante inibido por estes açúcares quando presentes no meio extracelular. De acordo com este princípio, estas linhagens são utilizadas em alguns processos fermentativos (p.ex. cervejaria), pois o seu fenótipo é inibido durante o processo fermentativo enquanto ainda há a presença destes açúcares, possibilitando que a sedimentação só ocorra no final da fermentação, facilitando a separação das células do produto gerado (CHANG, et al., 2005; CUNHA, et al., 2006).

Já o gene *FLO11*, outro integrante da família *FLO*, único não-telomérico, apresenta uma fase de leitura de ~ 4 kb e localiza-se no cromossomo IX. Este gene vem sendo largamente estudado e identificado como responsável por várias características fenotípicas de *S. cerevisiae*, como a formação de biofilmes (REYNOLDS & FINK, 2001; ZARA, et al., 2005; REYNOLDS, 2006; PUREVDORJ-GAGE, et al., 2007; REYNOLDS, et al., 2007), a floculação (GUO, et al., 2000; BAYLY, et al., 2005), o crescimento invasivo em ágar de células haplóides, e formação de pseudohifas em células diplóides (LO & DRANGINIS, 1998; GUO, et al., 2000; HALME, et al., 2004; REYNOLDS, 2006; DOUGLAS, et al., 2007; JIN, et al., 2008), a adesão célula-poliestireno (MORTENSEN, et al., 2007), e a produção de volume ou "flor yeast" (filme formado por células de leveduras que crescem espontaneamente na superfície de mostos de *sherry wines* durante sua maturação) (FIDALGO, et al., 2006). Semelhante à *flo1*, a proteína *flo11* também apresenta uma estrutura típica de uma floculina. Entretanto, Fitchner e colaboradores (2007) demonstraram recentemente que a proteína *flo11* é responsável pela interação célula-substrato, enquanto a *flo1* se mostra essencial nas interações célula-célula das camadas superiores, concluindo que ambas as proteínas são necessárias para que haja crescimento invasivo de *S. cerevisiae* no ágar.

Outro gene que vem sendo descrito na literatura como possível gene envolvido no processo de floculação em leveduras de cervejaria durante anaerobiose é o *DAN4* (LAWRENCE, et al., 2006). Este gene de ~ 1,2 kb, localizado no cromossomo X, codifica para uma proteína de superfície celular, que igualmente aos genes que compõem a família *FLO*, apresenta-se com a típica estrutura de uma adesina. Este gene contém seqüências semelhantes à minissatélites com função ainda desconhecida. Estes minissatélites são motivos de 10-100 bp repetitivos que funcionam como centros de recombinação, resultando num polimorfismo de tamanho do gene, podendo ser utilizados na identificação

de diferentes linhagens industriais utilizadas na produção de vinho (MARINANGELI, et al., 2004; VERSTREPEN, et al., 2005).

Pouco é conhecido sobre possíveis genes e/ou proteínas envolvidos na formação de espuma por leveduras. O único gene sabidamente envolvido (*AWAI*) foi caracterizado em algumas linhagens de levedura *S. cerevisiae* produtoras de *sake*. Este gene é constituído por ~ 5,1 kb em sua janela de leitura, localizado no cromossomo XV, e codifica para uma proteína de membrana que apresenta as características típicas das adesinas incluindo um domínio N-terminal, um domínio central rico em seqüências repetitivas de serina e treonina, e uma âncora GPI no domínio C-terminal (SHIMOI, et al., 2002). Da mesma forma que as proteínas envolvidas na floculação, a proteína *awa1* possui tamanhos variáveis devido a um número variável de repetições da região central rica em treonina e serina. Esta variabilidade tem sido proposta como metodologia adequada na identificação de diferentes linhagens utilizadas na produção de *sake* (MIYASHITA, et al., 2004; SHIMIZU, et al., 2005).

1.6 Regulação dos Genes de Adesinas em *S. cerevisiae*

As formas invasivas e de pseudohifas de *S. cerevisiae* mostram-se como específicas às condições ambientais, principalmente durante a limitação de nutrientes. Sob condições de limitação de fontes de nitrogênio e de carbono, *S. cerevisiae* apresenta dimorfismo, passa da forma leveduriforme para forma de pseudohifa, ajudando a célula a ir à busca de nutrientes e ambientes que favoreçam seu crescimento. Considerando que a maioria de propriedades morfológicas está correlacionada com a expressão do gene *FLO11*, este gene tem sido apontado como paradigma em estudos de regulação destes processos dimórficos em *S. cerevisiae*. De fato, a região promotora do gene *FLO11* é uma das maiores encontradas nesta levedura, e a expressão deste gene conseqüentemente é governada por

uma complexa rede de vias de sinalização que incluem o AMPcíclico e a proteína quinase A (PKA), a cascata de fosforilação que regula o ciclo sexual e divisão celular (governado pelas MAPK quinases), e a via de sinalização de nitrogênio controlada pelas proteínas TOR (vide Figura 3; e VAN DYK, et al., 2005; BAHN, et al., 2007; VINOD, et al., 2008).

A correlação entre os níveis intracelulares de AMPc e o estado nutricional celular é bem definido. Células que apresentam altos níveis de AMPc são mais sensíveis ao estresse e à depleção de nutrientes no meio extracelular, tendo assim, dificuldades em esporular e crescer em meios com açúcares não-fermentáveis e pouca fonte de nitrogênio. Entretanto, altos níveis de AMPc intracelulares ou exógenos estimulam crescimento celular sob a forma de pseudohifa, e esse fenótipo de pseudohifa é co-relacionado com aumento nos níveis de expressão do gene *FLO11*. Muitos dos componentes da via do AMPc que participam da regulação do crescimento sob a forma de pseudohifas em leveduras, via transcrição do *FLO11*, já foram definidos (GAGIANO, et al., 2002; VERSTREPEN, et al., 2004b; VINOD, et al., 2008). Na presença de altas concentrações de glicose e/ou sacarose, e carência de NH^4 no meio extracelular, o receptor *gpr1* e o transportador de amônia *mep2* captam estes sinais e a cascata de ativação do AMPc é desencadeada (Figura 3). A proteína *Gα gpa2* e as proteínas *ras2* ativam a adenilato ciclase (*cyr1*), estas últimas em resposta à acidificação intracelular. Após a formação do AMPc pela adenilato ciclase, este se liga às subunidades regulatórias da PKA, liberando as subunidades catalíticas. Das três subunidades catalíticas encontradas em *S. cerevisiae*, a *tpk2* é responsável pela fosforilação do repressor *sfl1* impedindo sua ligação ao promotor do gene *FLO11* e assim, possibilitando sua ativação pelo fator de transcrição *flo8* (GAGIANO, et al., 2002; PAN & HEITMAN, 2002; VAN DE VELDE, et al., 2008; VINOD, et al., 2008).

Mas normalmente as células de *S. cerevisiae* não são floculantes quando colocadas em meios contendo altas concentrações de glicose. Isto é possível por que outra via

também participa da regulação da transcrição do gene *FLO11* via os repressores *NGR1* e *NGR2* (Figura 3). Após a entrada da glicose pelos transportadores hxt, a hexoquinase 2 (*hxk2*) ativa a via de repressão pela glicose, que tem como principal componente a inibição da quinase *snf1*, uma quinase que inibiria a transcrição dos repressores *ngr1* e *ngr2* (permitindo assim a transcrição do *FLO11*) apenas na ausência de glicose (GAGIANO, et al.; 2002; VAN DE VELDE, et al., 2008).

Com relação a ambientes pobres em fontes de nitrogênio, as células de levedura também respondem pela via de cascata MAP (“matting-pheromone pathway”) quinases (MAPK-MAP4K), levando ao crescimento filamentosos em *S. cerevisiae* (Figura 3). Após ativação de *cdc42* e *ste20*, esta última fosforila *ste11*, que fosforila *ste7*, e esta última também fosforila *kss1*, que se desprende do complexo e ativa dois outros reguladores positivos da transcrição do gene *FLO11*, os fatores de transcrição *ste12* e *tec1* (GAGIANO, et al., 2002; VERSTREPEN & KLIS, 2006; VINOD, et al., 2008). A via TOR (“target of rapamycin”) também regula incontáveis funções, incluindo síntese de proteínas, biogênese de ribossomos, autofagia, crescimento celular polarizado, progressão do ciclo celular e filamentoação. Neste caso as quinases *tor1* e *tor2* ativam a *tap42* (Figura 3), que ativa as ciclinas *cln3* e *cln1/2*, ciclinas que participam da fase G1 e também ativam a transcrição do gene *FLO11* (GAGIANO, et al., 2002; VINOD, et al., 2008).

Recentemente, estudos identificaram outro ativador da transcrição do *FLO11*, a proteína *mss11*. Esta proteína é absolutamente necessária para que haja a ativação do *FLO11*, pois interage com a maioria das proteínas de sinalização descritas acima. Segundo Van Dyk e colaboradores (2005), a *mss11* é um elemento central na regulação do crescimento invasivo. Linhagens deletadas neste gene (*mss11Δ*) não foram capazes de transcrever o *FLO11* mesmo possuindo multicópias dos genes que codificam para os ativadores da transcrição, *FLO8* e *TEC1* (BESTER, et al., 2006).

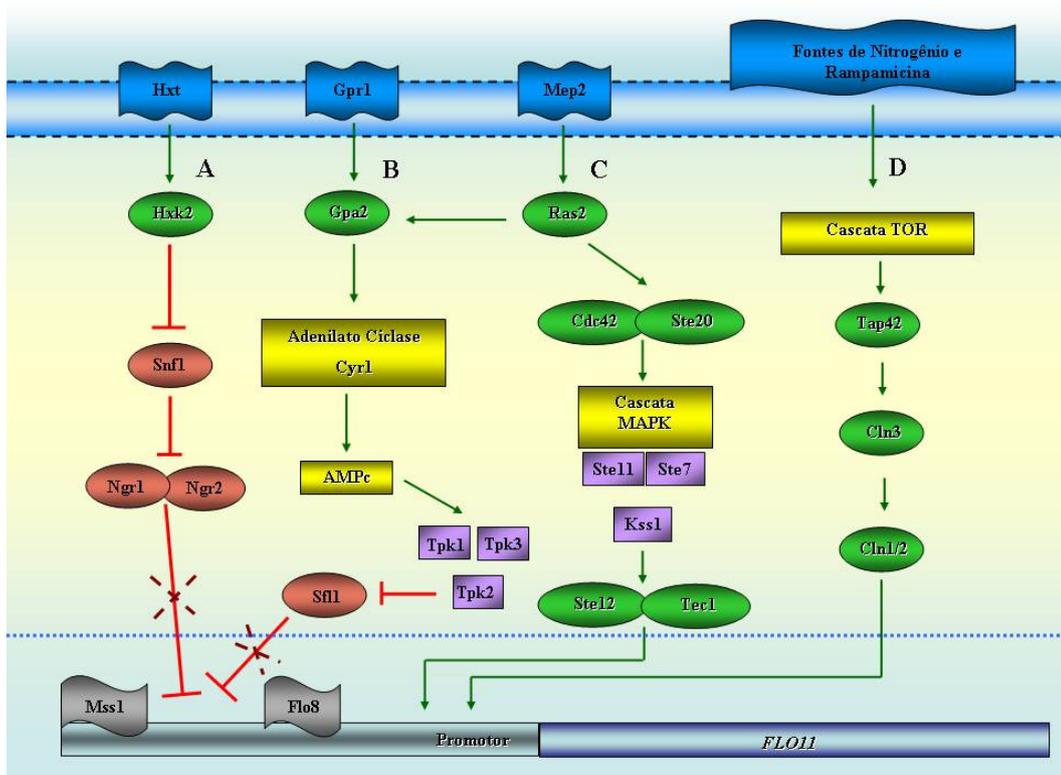


Figura 3: Vias de Regulação do gene *FLO11*. Em (A) é demonstrada a via de repressão pela glicose, e em (B) é encontrada a via AMPc que regula a expressão do gene *FLO11* em resposta a presença dos açúcares glicose e sacarose. A via MAPK (C) leva à indução dos reguladores *ste12* e *tec1*, que juntamente com a via TOR (D) que desencadeia uma cascata de ativação via ciclinas, terminam ativando a transcrição do gene *FLO11* durante a depleção de fontes de carbono e nitrogênio.

1.7 Recombinação entre Repetições Intragênicas geram Polimorfismos

Teoricamente, todos os procariotos e eucariotos possuem regiões de repetições intragênicas. Estas regiões geralmente são classificadas como microssatélites, contendo unidades acima de nove nucleotídeos e minissatélites, com segmentos maiores. A proximidade entre essas regiões no DNA promovem eventos freqüentes de recombinação entre eles, gerando novos alelos que diferem entre si de acordo com o número de unidades em cada micro ou minissatélites. Em *S. cerevisiae*, essas repetições são associadas a genes induzidos por estresse e ligados à superfície celular. As variações destas repetições podem prover às células uma rápida adaptação das propriedades da superfície celular de acordo com as alterações ambientais em que se encontram (LEGENDRE, et al., 2007).

Alguns gêneros de leveduras carregam um número limitado de genes que codificam para adesinas que apresentam algumas pequenas diferenças entre si. Entretanto, várias linhagens industriais de *S. cerevisiae* possuem genes *FLO* também com variações significantes em seu tamanho. Essa variabilidade genética resulta em fenótipos de adesão celular variáveis entre diferentes linhagens e espécies de leveduras. Esta variação gênica deve-se a seqüências repetitivas na região central do gene das adesinas que culminam na criação de novas adesinas. De acordo com a natureza e similaridade destas repetições, a recombinação durante a replicação do DNA é bastante freqüente, levando à adição e à remoção de algumas unidades repetitivas, e assim contração ou expansão dos genes das adesinas. Longas adesinas geralmente conferem boas aderências, ao passo que curtas têm sua aderência diminuída, possivelmente por causa da região N-terminal destas proteínas continuarem presas à parede celular, ou poderem se estender para fora desta estrutura. Este mecanismo de recombinação também pode gerar formas quiméricas que apresentem vias de regulação e propriedades adesivas diferentes (VERSTREPEN & KLIS, 2006).

De acordo com polimorfismos verificados em adesinas de *S. cerevisiae*, alguns estudos vêm propondo análises mais detalhadas destas regiões para identificação de linhagens. Marinangeli e colaboradores, em 2004, propuseram a análise do polimorfismo dos minissatélites do gene *DAN4* com a finalidade de identificar linhagens industriais de *S. cerevisiae* envolvidas na produção de vinho. Através da reação da polimerase em cadeia (PCR), polimorfismos no tamanho destes genes puderam ser identificados e assim, diferentes linhagens de *S. cerevisiae* foram classificadas pelo seu padrão polimórfico.

Em 2005, Shimizu e colaboradores, estudaram o polimorfismo do gene *AWAI*, relacionado este parâmetro com a produção de espuma em *S. cerevisiae* produtoras de *sake*. Através de reações de PCR, o grupo obteve perfis polimórficos diferentes entre as linhagens analisadas. Com isto, verificaram que havia diferenças entre os tamanhos do gene *AWAI* e que esta diferença estava ligada a diferentes fenótipos encontrados nas linhagens industriais estudadas.

Também em 2005, Verstrepen e colaboradores, estudaram o polimorfismo do gene *FLO1* em uma linhagem de laboratório, KV133. O grupo construiu vários alelos diferentes do gene com tamanhos diferentes e expressaram estes genes na linhagem escolhida. Com isso, puderam analisar que a diferença entre os tamanhos do gene *FLO1* estava relacionada com diferentes fenótipos de superfície analisados, ou seja, quanto maior o gene, maior a capacidade floculante da célula, por exemplo.

2 Objetivos

Como salientado na Introdução, a floculação, produção de espuma, a formação de biofilme e o crescimento invasivo de leveduras, características indesejadas na indústria de produção de álcool combustível no Brasil, depende da expressão na superfície celular de adesinas com tamanhos variáveis. Desta forma, o presente trabalho teve como objetivos:

2.1 Objetivo Geral

Analisar as propriedades floculantes, de formação de espuma e biofilme, e de crescimento invasivo no ágar de linhagens de leveduras isoladas em usinas industriais de produção de álcool combustível no Brasil, bem como desenvolver metodologias que permitam a rápida identificação molecular destas leveduras.

2.2 Objetivos Específicos

- Analisar e classificar as linhagens industriais quanto à capacidade de produzir espuma;
- Determinar as propriedades floculantes das leveduras industriais;
- Analisar a capacidade das células de apresentarem um crescimento invasivo em ágar;
- Analisar a formação de biofilmes pelas leveduras,
- Determinar a hidrofobicidade das células;
- Analisar, através de PCR, a presença e o polimorfismo de genes de adesinas;
- Correlacionar todas as características estudadas em cada linhagem, no intuito de identificar relações significativas que possam ser aplicadas para identificar e classificar as linhagens pelas suas características de superfície.

3 Metodologia

3.1 Linhagens de Levedura e Condições de Cultivo

As linhagens da levedura *S. cerevisiae* analisadas (Tabela 3.1) foram gentilmente cedidas pela FERMENTEC Ltda. (Piracicaba, SP), empresa que presta assessoria e consultoria a inúmeras usinas de produção de álcool combustível no Brasil e exterior (vide www.fermentec.com.br). As características industriais e morfológicas das linhagens descritas na Tabela 3.1 foram determinadas pela FERMENTEC. Todas estas linhagens foram isoladas diretamente de fermentadores durante o processo de produção do etanol em usinas industriais. Além das linhagens industriais, foram também utilizadas as linhagens de laboratório S288C (*MAT α mal gal2 mel flo1 flo8-1 hap1 SUC2*) e CEN.PK2-1C (*MAT α MAL2-8^c ura3-52 his3 Δ 1 leu2-3_112 trp1-289*). As leveduras foram rotineiramente cultivadas em meio rico YP (1% extrato de levedura, 2% peptona) contendo 2% de glicose. Alternativamente, foram utilizados meios à base de melação (2% de açúcares redutores totais, 0.5% de extrato de levedura, 0.5% (NH₄)₂SO₄ e 0.2% de KH₂PO₄). As culturas foram incubadas a 28°C sob agitação de 160 rpm em erlenmeyers contendo 20% do volume de meio de cultivo.

3.2 Ensaio de Flocculação.

O ensaio de flocculação foi adaptado do trabalho de Wang e colaboradores (2008). Após o crescimento em meio melação, as células foram coletadas por centrifugação (4.000 rpm, 5 min), lavadas duas vezes com tampão citrato de sódio (50 mM; pH 3.0) contendo 5 mM EDTA, e mais duas vezes com água a 4°C. As células lavadas foram ressuspensas em água destilada a 4°C até atingir uma D.O. igual a 2.0 a 600 nm. A flocculação (sedimentação) das células foi determinada na ausência ou presença de 10 mM de cloreto

Tabela 1. Linhagens Industriais analisadas.

Levedura	Morfologia das colônias (borda e brilho)	Morfologia das células e brotamento	Produção Espuma	Sedimentação	Açúcar residual no vinho
CAT-1	lisa, brilhante	Células isoladas, brotamento normal	+	<i>NF</i> ^a	+
PE-2	lisa, brilhante	Isoladas, brotamento normal	+	<i>NF</i>	+
BAT-1	Rugosa, opaca	pseudohifas ou falhas de brotamento	+++	+++	nd. ^b
FT278	Rugosa, opaca	cadeias de células e células isoladas	+++	+	nd.
FT279	Rugosa, opaca	pseudohifas	+++	+	nd.
FT281	lisa, brilhante	isoladas, brotamento normal	+++	<i>NF</i>	+
FT517	Rugosa, opaca	pseudohifas ou falhas de brotamento	+++	+++	++
FT540	lisa, brilhante	isoladas, brotamento normal	+	+++	++
FT645	Rugosa, opaca	pseudohifas ou falhas de brotamento	+++	+	+
FT697	lisa, brilhante	isoladas, brotamento normal	++	<i>NF</i>	+
FT699	Rugosa, opaca	pseudohifas ou falhas de brotamento	+++	+	++
FT700	Rugosa, opaca	pseudohifas ou falhas de brotamento	+++	++	+
FT705	Rugosa, opaca	pseudohifas ou falhas de brotamento	+	++	+
FT714	lisa, brilhante	isoladas, brotamento normal	++	<i>NF</i>	+
FT718	Rugosa, opaca	pseudohifas ou falhas de brotamento	+	+++	+++
FT729	lisa, brilhante	isoladas, brotamento normal	+	nd.	nd.
FT730	lisa, brilhante	isoladas, brotamento normal	+	+++	+

^a*NF*, não floculante; ^bnd., não determinado.

de cálcio. Após uma agitação vigorosa dos tubos, amostras foram retiradas da parte superior do tubo para determinação da DO a 600 nm no tempo 0 e após 10 minutos da suspensão ter sido colocada em repouso.

3.3 Ensaio de Produção de Espuma

As células previamente crescidas em meio YP- 2% glicose por 48 horas foram recuperadas por centrifugação (4.000 rpm, 5 min) e lavadas duas vezes com água a 4°C e ressuspensas em meio melaço contendo 2% de açúcares redutores totais. A suspensão foi mantida sob agitação constante, à temperatura ambiente por 8 horas. A produção de espuma foi monitorada através da observação da textura da espuma e da determinação volumétrica da quantidade formada ao longo do tempo.

3.4 Ensaio de Hidrofobicidade celular

As células foram previamente crescidas em meio rico YP-2% glicose a 160 rpm, 28°C por 48 horas e posteriormente 100 µl deste crescimento foram inoculados em meio melaço contendo 2% de açúcares redutores totais. Após crescimento por 24 horas a 160 rpm e 28°C, as células foram coletadas por centrifugação (4.000 rpm, 5 min) e lavadas duas vezes com água a 4°C e ressuspensas em água destilada até atingir uma DO a 600 nm em torno de 0.8. Amostras de 600 µl foram adicionadas a 300 µl de um solvente orgânico (tolueno ou hexano) e misturadas vigorosamente por trinta segundos, sendo a DO determinada novamente na fase aquosa logo após a separação das fases orgânica e aquosa, como descrito por Fidalgo e colaboradores (2006).

3.5 Ensaio de Crescimento Invasivo em Agar

As células foram semeadas em placas de Petri contendo YP-2% glicose acrescidas de 2% de ágar e mantidas a 28°C por 3 dias, e à temperatura ambiente por mais 2 dias, para melhor gelificação do ágar. As placas primeiramente foram fotografadas, e a seguir lavadas (mergulhadas) em um recipiente com água e fotografadas novamente, como descrito por Fichtner e colaboradores (2007).

3.6 Ensaio de Formação de Biofilme

No meio de placas de Petri contendo YP-2% glicose acrescido de 0.3% de ágar, as células de levedura foram inoculadas, utilizando-se palitos de dente estéreis. As placas foram mantidas à temperatura ambiente, em repouso completo, por 15 dias. A formação da colônia foi documentada em intervalos de tempo pré-determinados, de acordo com Reynolds & Fink (2001).

3.7 Análise de Polimorfismos por PCR

A reação de PCR foi realizada utilizando-se como molde o DNA extraído das diferentes leveduras industriais, bem como das linhagens de laboratório S288C e CEN.PK2-1C (vide Tabela 1). O DNA foi extraído a partir de 1,5 ml de uma cultura crescida em YP-2% glicose por 12 horas. Foi utilizado o kit para extração de DNA Yeastar Genomic DNA Kit (Zymo Research, USA), seguindo as instruções do fabricante. Foram utilizados aproximadamente 1-3 µg de DNA molde e 20 pmoles dos iniciadores específicos para as regiões polimórficas dos genes *FLO1*, *FLO11*, *DAN4* e *AWA1*, descritos na Tabela 2, com 10 mM de dNTPs e 1 unidade de Taq polimerase recombinante (Invitrogen) na presença de 1,5 mM de Mg²⁺. As temperaturas utilizadas durante as reações de PCR foram 94°C para denaturação da fita dupla de DNA por 2 minutos, 55°C para anelamento dos

iniciadores à fita de DNA molde por 1 minuto, e 72°C para a elongação da nova fita de DNA por tempo variável de acordo com cada gene a ser amplificado: para o gene *FLO1* foram 5 minutos de elongação, o gene *FLO11* em 3 minutos e meio, e os genes *DAN4* e *AWAI* com 3 minutos. Os produtos da PCR foram fracionados em gel de agarose a 0.85% em tampão 40 mM Tris-acetato (pH 8.5) com 2 mM EDTA, e visualizados através da coloração com 0.5 µg/ml brometo de etídio.

Tabela 2: Oligonucleotídeos iniciadores utilizados na reação de PCR: iniciadores dos genes *DAN4*, *FLO1* e *FLO11* desenhados a partir do genoma da linhagem s288c e do gene *AWAI* a partir do genoma da linhagem K7.

Primer	Seqüência 5'->3'	Tamanho (bases)	Posição no Gene	Tm (°C)
<i>AWAI-F</i>	CCGAAGCACTTGCAAAGGATGG	22	1601-1622	73,6
<i>AWAI-R</i>	GGGAGTTGGAAGCAGTTGCGC	21	3755-3775	73,5
<i>DAN4-F</i>	CATATCCTTCGGAAATCGCAGC	22	188-209	70,8
<i>DAN4-R</i>	CTAATGGTAGCGGTGGTAGTTGC	23	2965-2987	68,3
<i>FLO1-F</i>	GGCAGTCTTTACACTTCTGGCAC	23	30-52	67,8
<i>FLO1-R</i>	CAGTATTGGTAGTCGTTTCAGCAGC	25	4243-4267	70,0
<i>FLO11-F</i>	GATGTGACTTCCGTTTCTTGGG	22	190-211	67,9
<i>FLO11-R</i>	CCGTAGTGACTGATGGAGTTGGAG	24	3221-3244	69,7

4 Resultados

4.1 Análise da produção de espuma pelas linhagens industriais

Foram recebidas 17 linhagens de *S. cerevisiae* da empresa FERMENTEC Ltda., isoladas diretamente das dornas das usinas durante os processos fermentativos de produção de álcool combustível. Estas linhagens já tinham sido previamente identificadas no ambiente industrial como floculantes/espumantes ou não, mas estas informações (para a maioria das linhagens) só foram fornecidas após a conclusão dos trabalhos, na hora de redigir a presente dissertação. Desta forma as análises realizadas no presente trabalho não seriam influenciadas pela prévia caracterização industrial das linhagens obtidas pela FERMENTEC Ltda.

Inicialmente as linhagens industriais foram testadas, em laboratório, quanto a sua capacidade de produzir espuma durante a fermentação de meio contendo 200 g/L de açúcares totais (na forma de melaço). Entretanto, várias linhagens apresentaram produção de espuma acima de 16 mL (Tabela 3), provocando transbordamento do conteúdo do balão volumétrico utilizado no ensaio. Desta forma, foram realizadas determinações volumétricas da produção de espuma utilizando meios contendo 20 g/L de açúcares totais, sendo as linhagens avaliadas também quanto a sua capacidade de adesão celular à parede de vidro e às bolhas de CO₂ formadas durante as fermentações (Tabela 3).

Nossos resultados mostram que 7 das 17 linhagens estudadas apresentaram-se como fortemente espumantes, produzindo o equivalente a 13-25% do volume total do meio sendo fermentado (4 a 8 mL) de espuma durante as 8 horas de ensaio (Tabela 3 e Figura 4). Todas estas linhagens apresentaram-se como capazes de aderir tanto às bolhas de CO₂ formadas, assim como à superfície do balão volumétrico utilizado no ensaio (Tabela 3, vide Figura 5). Entre as demais linhagens, 4 apresentaram-se como moderadamente

Tabela 3: Formação de espuma pelas linhagens industriais analisadas.

Linhagem	Espuma (mL) com 200 g/L açúcar	Espuma (mL) com 20 g/L açúcar	Tempo (h) até o volume máximo com 20 g/l açúcar	Aderência célula-bolha de CO ₂
CAT-1	1.2	1.87 ± 0.3	1.0	NÃO
BAT	< 16.0	5.83 ± 1.18	4.0	SIM
PE-2	1.6	1.46 ± 0.88	4.5	NÃO
FT278	< 16.0	1.11 ± 0.5	2.5	NÃO
FT279	< 16.0	2.08 ± 0.6	1.5	NÃO
FT281	-	6.39 ± 1	2.0	SIM
FT517	-	3.47 ± 0.24	1.0	SIM
FT540	-	1.8 ± 0.2	1.5	NÃO
FT645	< 16.0	4.79 ± 2.06	4.5	SIM
FT697	-	5.64 ± 2.03	1.0	SIM
FT699	-	2.9 ± 1.1	1.0	SIM
FT700	-	6.58 ± 1.3	1.5	SIM
FT705	-	2.92 ± 1.2	3.0	SIM
FT714	< 16.0	7.0 ± 0.4	1.5	SIM
FT718	-	1.39 ± 0.5	2.5	NÃO
FT729	-	3.19 ± 0.5	1.5	NÃO
FT730	-	1.39 ± 0.6	0.5	NÃO

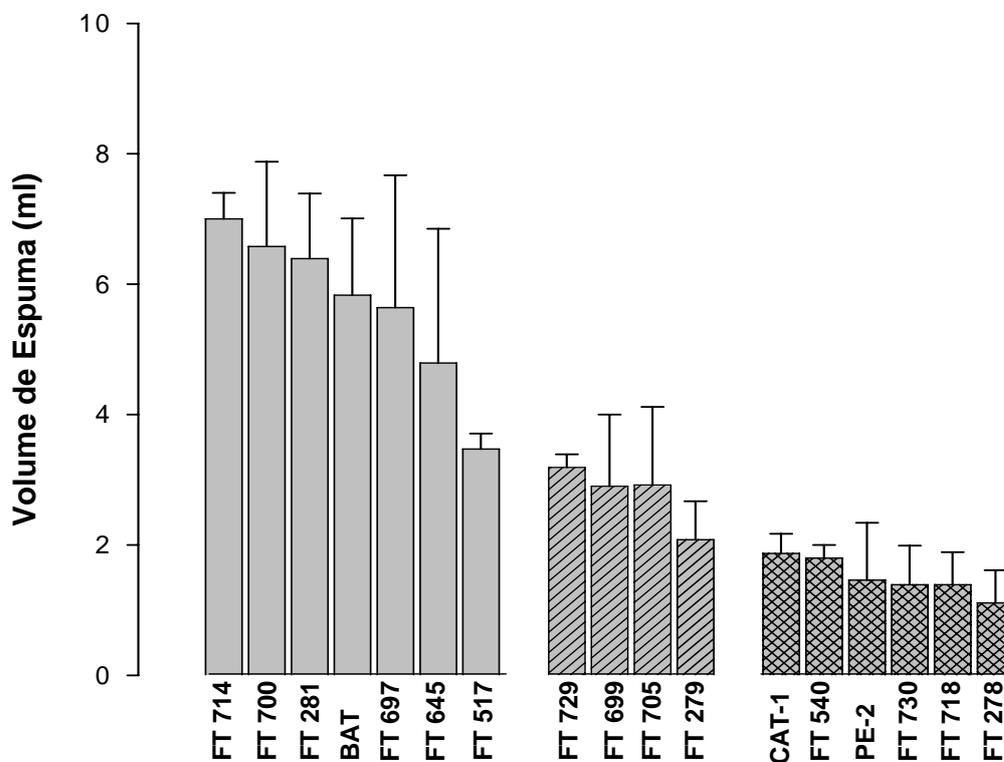


Figura 4: Volume máximo de espuma formada pelas linhagens industriais. Os resultados foram obtidos durante 8 horas de fermentação de meio melado contendo 20 g/L de açúcares totais.. As linhagens foram divididas em três grupos: Fortemente Espumantes (Barras Lisas), Moderadamente Espumantes (Barras Listradas) e Fracamente Espumantes (Barras Quadriculadas).

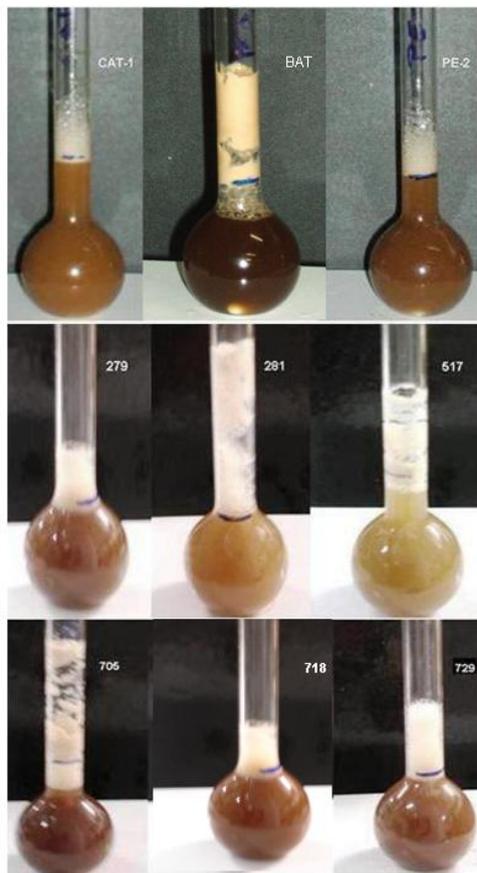


Figura 5: Exemplos de formação de espuma pelas linhagens industriais estudadas. As fotos registram exemplos do volume máximo de espuma formada por cada linhagem durante a fermentação de 30 mL de meio melaço contendo 20 g/L de açúcares totais.

espumantes (6-13% do volume total em espuma, 2 a 4 mL). Entretanto, neste caso somente 2 linhagens (FT699 e FT705) demonstraram afinidade com a interface ar-líquido das bolhas de CO₂. Quanto às linhagens caracterizadas como fracamente espumantes (Figura 4), nenhuma destas apresentaram algum tipo de adesão celular, seja célula-bolha de CO₂, seja célula-vidro (Tabela 2).

É importante salientar que foram observadas também diferenças significativas nas cinéticas de produção de espuma pelas linhagens analisadas (Figura 6, e vide Tabela 3), onde fica evidente inclusive a estabilidade que algumas espumas adquirem durante a fermentação. Por outro lado, ensaios com 200 g/L de açúcares totais deverão ser realizados com todas as linhagens (com modificações na metodologia e vidraria utilizada na fermentação), uma vez que algumas linhagens que se mostraram fortemente espumantes nestas condições (p.ex. FT278 e FT279, Tabela 3), produziram pouca espuma quando ensaiadas com 20 g/L de açúcares totais na forma de melão (Tabela 3 e Figuras 4 e 5).

4.2 Floculação das leveduras industriais

As linhagens industriais estudadas neste trabalho foram crescidas em meio melão contendo 2% de açúcares totais, e a análise da floculação celular determinada na presença ou ausência de Ca⁺² (Figuras 7 e 8). Das 17 linhagens analisadas, 8 apresentaram uma taxa de floculação alta (>50%) tanto na ausência quanto presença de Ca⁺², sendo que 5 destas linhagens apresentaram taxa de floculação superior a 90% nestas condições (Figura 7 e 8). Todas estas linhagens com alta taxa de floculação cálcio-independente foram também as que apresentaram maior produção de espuma durante a fermentação (vide acima). Outro grupo (3 linhagens) apresentou uma taxa de floculação (~20%) que incrementou significativamente (para ~ 50%) após adição de Ca⁺², indicando neste caso, uma floculação cálcio dependente. Finalmente, as linhagens restantes (total de 6) apresentaram pouca ou

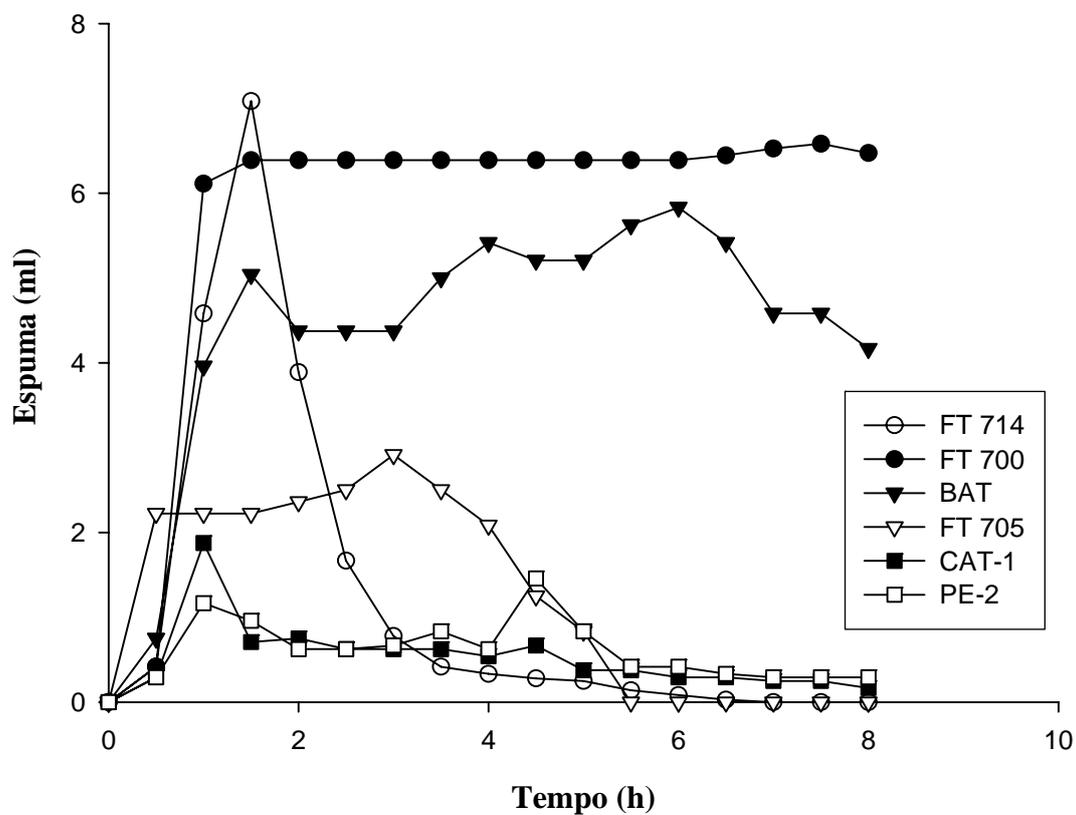


Figura 6: Cinética de produção de espuma por linhagens industriais. O gráfico ilustra a cinética de formação de espuma de seis linhagens estudadas neste trabalho (indicadas na legenda) durante a fermentação de 30 mL de meio melaço contendo 20 g/L de açúcares totais..

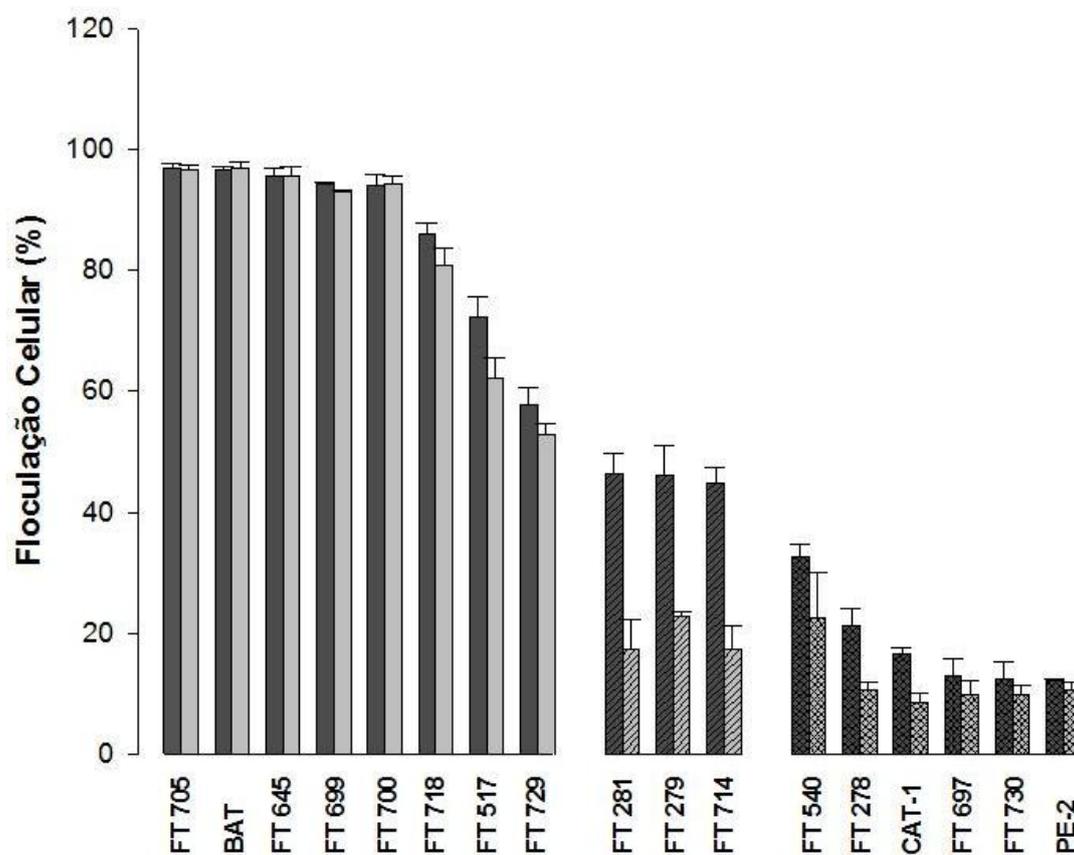


Figura 7: Flocculação celular na ausência ou presença de Ca²⁺. A flocculação foi determinada como a porcentagem de células sedimentadas após 10 min de repouso na ausência (barras cinza) ou presença de 10 mM de Ca²⁺ (barras pretas).



Figura 8: Sedimentação celular na presença de Ca^{+2} após repouso de 10 min. As setas nas fotos indicam as células sedimentadas no fundo dos tubos após 10 minutos em repouso na presença de 10 mM Ca^{2+} .

praticamente nenhuma floculação (10-30%), tanto na presença quanto na ausência de Ca^{+2} (Figura 7 e 8).

4.3 Análise da hidrofobicidade celular das linhagens industriais

Com o intuito de quantificar a hidrofobicidade da parede celular das linhagens, a solubilidade em solventes orgânicos, como tolueno e hexano, foi analisada (densidade de 0,8669 e 0,659 g/mL, respectivamente), das células suspensas e em meio aquoso após mistura vigorosa com o solvente orgânico. Nossos resultados (Figura 9) mostram significativa variabilidade na hidrofobicidade celular entre as linhagens, e significativas diferenças também foram observadas nos resultados obtidos com os dois solventes utilizados. Mas, em termos gerais, novamente verificamos que a solubilidade em tolueno e hexano foi maior nas linhagens fortemente produtoras de espuma, do que nas linhagens que praticamente não formam espuma durante a fermentação.

Cabe salientar neste contexto que embora o uso do tolueno aparentemente mostrou resultados de hidrofobicidade celular (Figura 9) mais condizentes com os resultados de produção de espuma e floculação (vide Figuras 4 e 7 acima), este solvente orgânico provocou a morte de todas as células durante o ensaio de solubilidade, o que não ocorreu com o hexano (dados não mostrados).

4.4 Caracterização do crescimento celular invasivo em ágar e formação de biofilme pelas linhagens industriais.

As 17 linhagens estudadas neste trabalho foram testadas quanto a sua capacidade de crescer invasivamente em placas de Petri contendo meio rico (YP-2% glicose) solidificado com 2% de ágar (Figura 10). As linhagens foram semeadas nas placas e mantidas à temperatura de 28°C por 3 dias, e mais 2 dias à temperatura ambiente. Após o crescimento

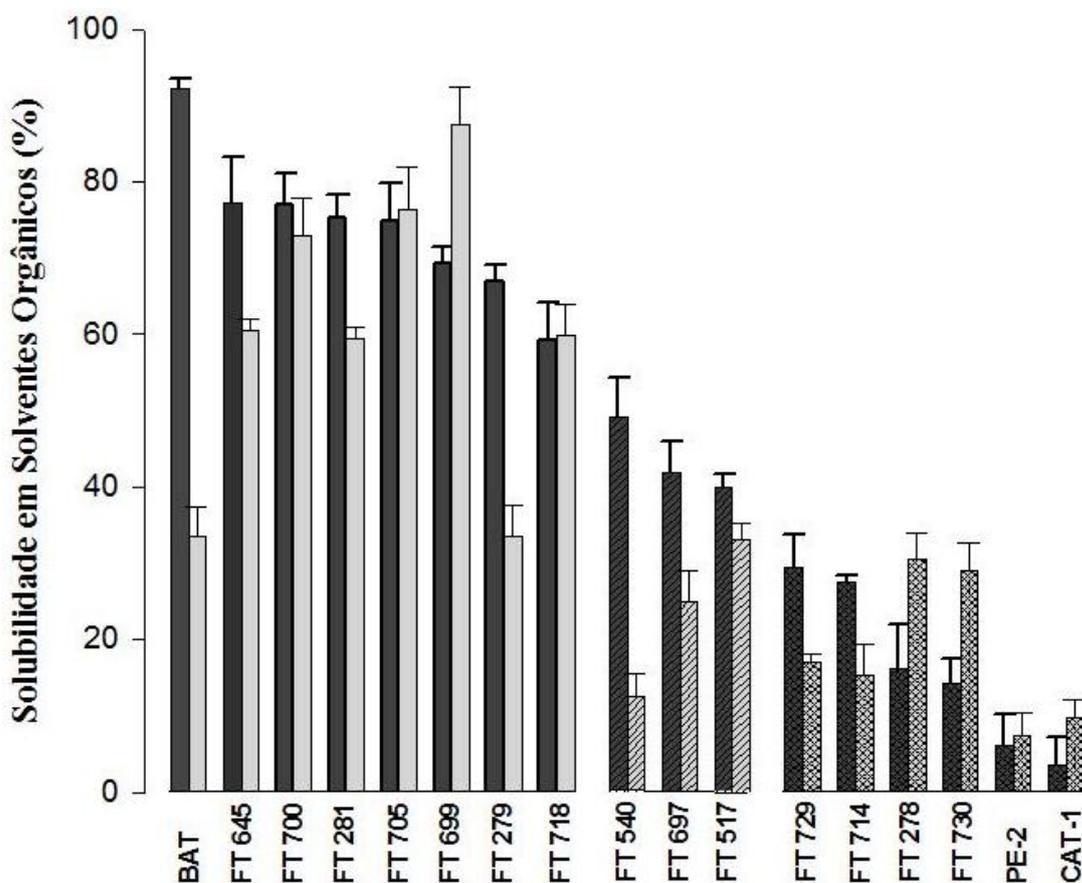


Figura 9: Solubilidade das linhagens industriais em solventes orgânicos. A porcentagem de partição em tolueno (barras escuras) ou hexano (barras cinza) das células de levedura industriais indicadas foram determinadas como descrito em Materiais e Métodos.

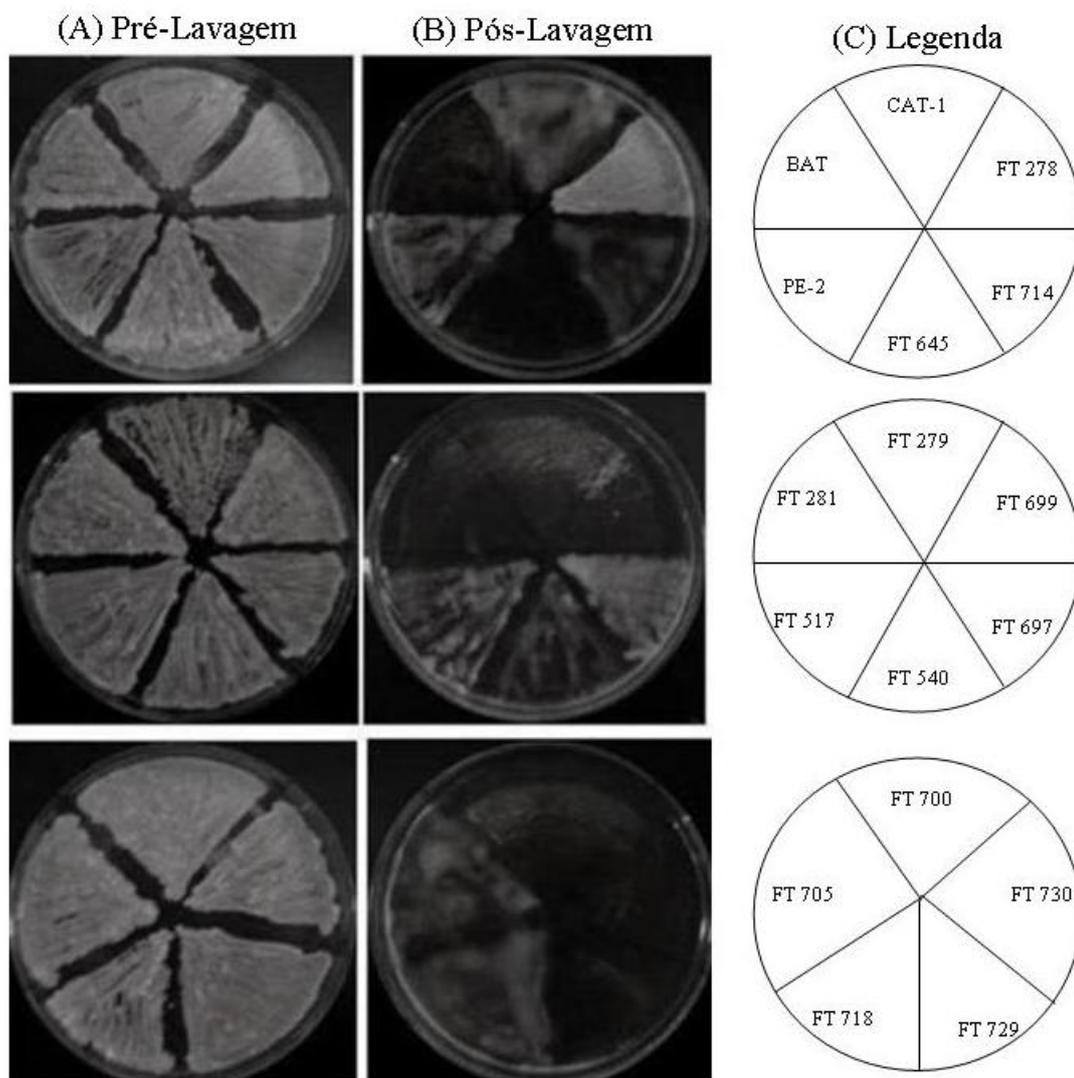


Figura 10: Crescimento invasivo em 2% ágar. As células de cada linhagem foram crescidas em placas contendo YP-2% glicose e 2% ágar por 3 dias à temperatura de 28°C e mais dois dias à temperatura ambiente (A), e em seguida foram lavadas em um recipiente com água e fotografadas novamente (B). Em C encontram-se as legendas das placas mostradas em A e B.

Tabela 4: Formação de biofilme e crescimento invasivo pelas linhagens estudadas.

Linhagem	Crescimento Invasivo	Diâmetro do Biofilme (cm)
CAT-1	SIM	2.0
BAT-1	NÃO	4.5
PE-2	SIM	2.0
FT278	SIM	1.5
FT279	NÃO	3.0
FT281	NÃO	1.5
FT517	SIM	3.5
FT540	SIM	1.2
FT645	NÃO	4.0
FT697	SIM	1.5
FT699	NÃO	4.0
FT700	NÃO	4.8
FT705	SIM	4.0
FT714	SIM	3.0
FT718	NÃO	4.5
FT729	NÃO	3.0
FT730	NÃO	1.5
S288C	-	2.0

(Figura 10A), as células foram lavadas em um recipiente contendo água (Figura 10B), e as células que permaneceram presas ao ágar, mesmo após a lavagem, foram caracterizadas como capazes de crescerem invasivamente no ágar (vide Tabela 4).

As linhagens industriais foram também avaliadas quanto à capacidade de formar biofilme sobre meio rico YP-2% glicose contendo 0.3% ágar, e as placas de Petri foram mantidas à temperatura ambiente por 8 dias (Figura 11). Como pode ser verificado nesta figura e na Tabela 4, na maioria das linhagens o crescimento invasivo celular é inversamente proporcional à formação de biofilme pelas linhagens, ou seja, quanto maior o biofilme formado, menor a capacidade de a mesma linhagem crescer invasivamente.

4.5 Polimorfismo dos genes das adesinas.

Polimorfismo é uma característica bastante comum em genes de mamíferos e leveduras. Em leveduras, o polimorfismo pode acontecer tanto em relação ao tamanho do gene, quanto ao número de cópias deste gene (ou pseudogenes) no genoma da levedura. Os iniciadores utilizados na amplificação e identificação, por reações de PCR, dos genes *FLO1*, *FLO11*, *DAN4* e *AWAI* foram desenhados com a finalidade de que os iniciadores anelassem aos genes em segmentos próximos às regiões que contém as repetições intragênicas. Os iniciadores para os genes *FLO1*, *FLO11* e *DAN4* foram desenhados a partir do genoma da linhagem de laboratório S288C (disponível em www.yeastgenome.org), enquanto que para o gene *AWAI* os iniciadores foram desenhados a partir da seqüência publicada para este gene por Shimoï e colaboradores (2002).

No caso do gene *AWAI*, o mesmo não foi detectado em nenhuma das linhagens analisadas, e embora diversas condições para a PCR tenham sido testadas, nenhuma delas foi capaz de amplificar qualquer fragmento referente a este gene. Como este gene foi identificado e seqüenciado (vide SHIMOÏ, et al., 2002) a partir de uma linhagem industrial

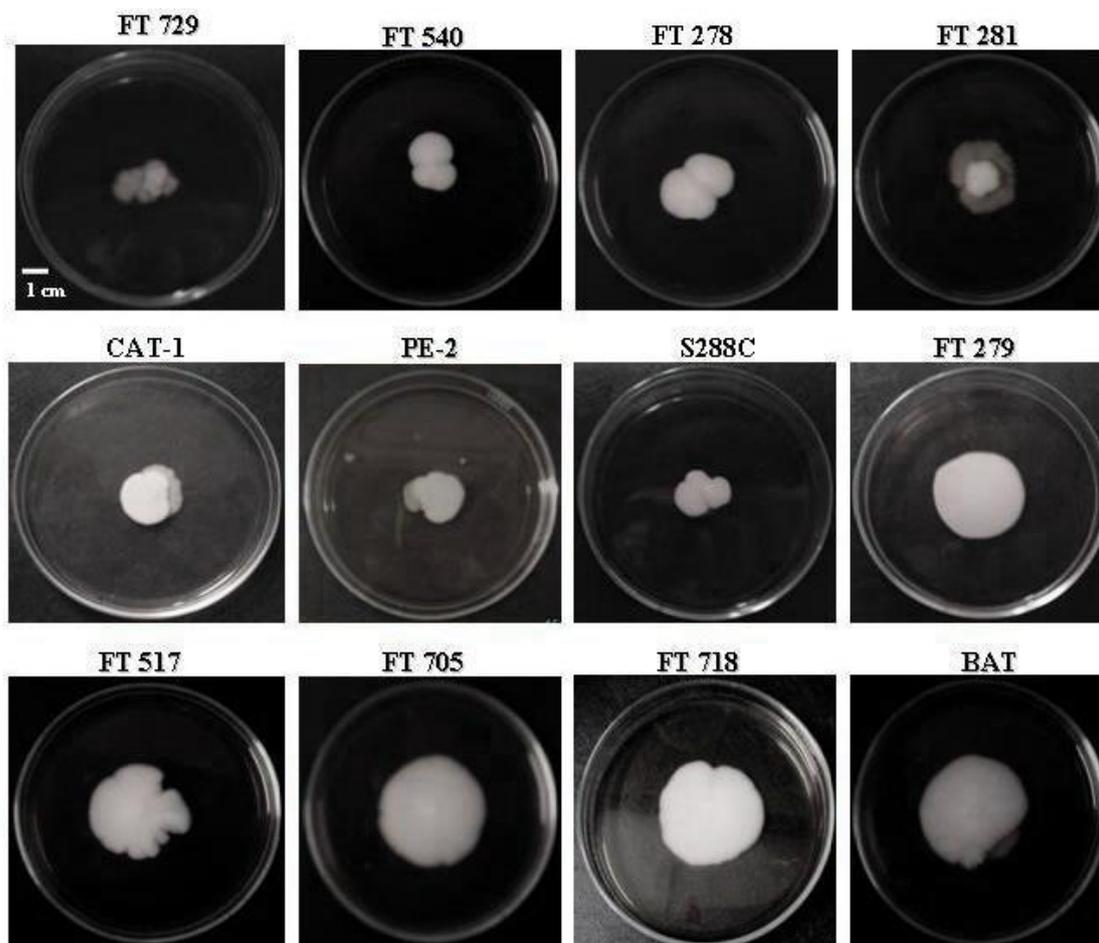


Figura 11: Formação de biofilme em meios sólidos contendo 0.3% ágar. As células foram inoculadas no meio das placas de Petri com o auxílio de alças estéreis descartáveis, e mantidas à temperatura ambiente por 8 dias, como descrito em Materiais e Métodos.

(K7) utilizada na produção de *sake* (não estando presente no genoma da S288C, vide www.yeastgenome.org), as linhagens industriais utilizadas na produção de álcool combustível no Brasil provavelmente não possuem este gene. Entretanto, não podemos descartar a necessidade de uma melhor padronização das condições utilizadas na reação de PCR, e também a verificação da funcionalidade dos iniciadores utilizados neste trabalho, pois o fato de não possuímos um controle positivo para esta reação, nos impede qualquer interpretação mais precisa.

No caso do gene *DAN4*, nossos resultados (Figura 12) revelaram que a maioria das linhagens industriais (ao todo 12 cepas) apresentou um fragmento amplificado deste gene com um tamanho igual (ou muito semelhante) ao esperado pelo genoma da S288C, indicando poucos polimorfismos neste gene, nas condições testadas, nas linhagens isoladas no ambiente industrial de produção de álcool combustível no Brasil. Um resumo dos resultados obtidos para este gene em todas as linhagens analisadas encontra-se descrito na Tabela 5. Nesta tabela é possível verificar que algumas linhagens apresentaram dois fragmentos de PCR com os iniciadores para o gene *DAN4*, sendo geralmente um deles menor do que o esperado, confirmando a natureza provavelmente diplóide destas linhagens industriais.

Já no caso do gene *FLO1*, o mesmo foi encontrado em um terço das linhagens industriais estudadas, apresentando significativos polimorfismos de tamanho. Até no DNA genômico da linhagem S288C foi verificada a presença adicional de 3 fragmentos amplificados com os iniciadores do gene *FLO1*, além do fragmento esperado de ~ 4,3 kb, com tamanhos que variaram dos 2,4 a 1,3 kb (Figura 13, e Tabela 5). Estes fragmentos menores possivelmente são referentes a pseudogenes ou a outros genes da família *FLO* presentes no genoma da S288C, como *FLO5*, *FLO9* e *FLO10*, que por terem estruturas semelhantes ao *FLO1* podem ter sido amplificados inespecificamente juntamente com este

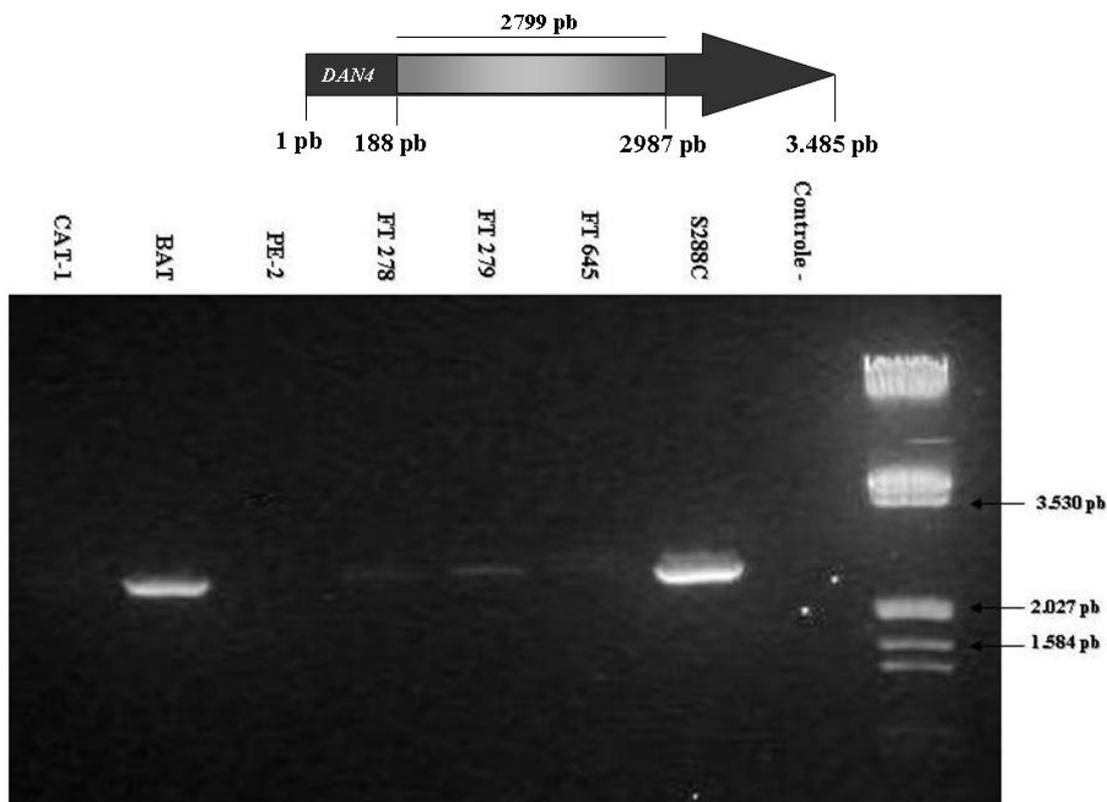


Figura 12: Polimorfismo do Gene *DAN4*. Gel de eletroforese em agarose mostrando os produtos das reações de PCR obtidos a partir do DNA genômico das linhagens indicadas, utilizando os iniciadores descritos na Tabela 2. O marcador de peso molecular para DNA utilizado neste gel foi o DNA do fago λ digerido com as enzimas de restrição *Hind*III e *Eco*R1. Na figura acima do gel encontra-se uma representação do gene *DAN4* com a posição onde cada iniciador anela, e o tamanho do fragmento esperado (no caso da linhagem S288C).

Tabela 5: Polimorfismos de tamanho nos genes das adesinas estudadas. Fragmentos relacionados com os genes *FLO1*, *FLO11* e *DAN4* estão descritos na tabela. Nenhum fragmento foi encontrado para o gene *AWAI*.

Linhagem	Fragmentos (pb) ^a obtidos na PCR dos genes:			
	<i>FLO1</i>	<i>FLO11</i>	<i>DAN4</i>	<i>AWAI</i>
S288C	4.300 2.400 2.100 1.300	3.100	2.800	-
CEN.PK2-1C	-	1.800	-	-
CAT-1	1.300 700	1.700	-	-
BAT-1	3.000 1.400 760	2.700	2.200	-
PE-2	780	640	-	-
FT278	2.600	-	2.000	-
FT279	2.800	-	2.100	-
FT281	-	2.300	2.800	-
FT517	-	2.300	2.800 950	-
FT540	2.900	500	-	-
FT645	-	2.400	2.800 600	-
FT697	-	-	-	-
FT699	-	2.700	2.700 900	-
FT700	-	-	2.700 920	-
FT705	-	-	2.700 880	-
FT714	-	2.600	2.600	-
FT718	-	1.900	2.700 920	-
FT729	-	-	-	-
FT730	-	-	2.700 920	-

^aOs valores em negrito indicam os tamanhos de fragmentos esperados para cada gene, baseado no genoma da linhagem S288C (www.yeastgenome.org)

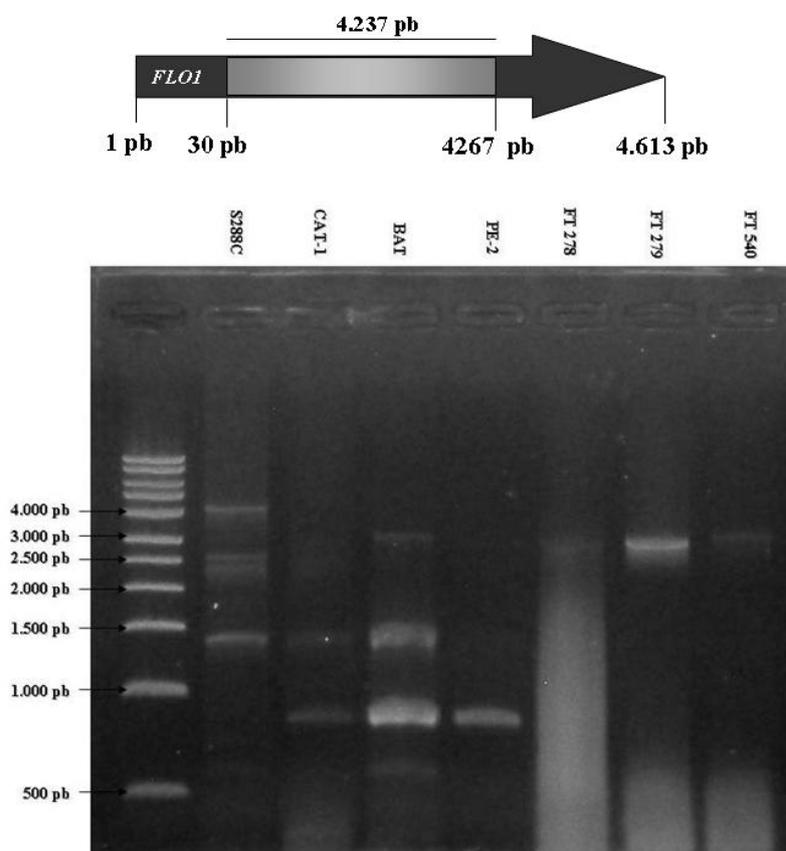


Figura 13: Polimorfismo do Gene *FLO1*. Eletroforese em gel de agarose mostrando os produtos das reações de PCR obtidos a partir do DNA genômico das linhagens indicadas, utilizando os iniciadores descritos na Tabela 2. O marcador de peso molecular para DNA utilizado neste gel foi o 1 kb DNA Ladder (Invitrogen). Na figura acima do gel encontra-se uma representação do gene *FLO1* com a posição onde cada iniciador anela, e o tamanho do fragmento esperado (no caso da linhagem S288C).

gene. Nas demais linhagens que apresentaram mais de um fragmento, pode-se especular um polimorfismo de números de cópias, assim como também poderia ser uma amplificação inespecífica de outro(s) pseudogene(s).

Com relação ao gene *FLO11*, aproximadamente dois terços das linhagens industriais analisadas apresentaram fragmentos amplificados utilizando os iniciadores para este gene (Tabela 5 e Figura 14). Em todas as linhagens onde foram encontrados fragmentos, estes apareceram em uma única cópia e com polimorfismos de tamanho diferentes, sendo que nenhuma apresentou o tamanho (~3,1 kb) descrito para a este gene na linhagem S288C, indicando que provavelmente este gene nas linhagens industriais possui um tamanho menor do que o encontrado na linhagem de laboratório.

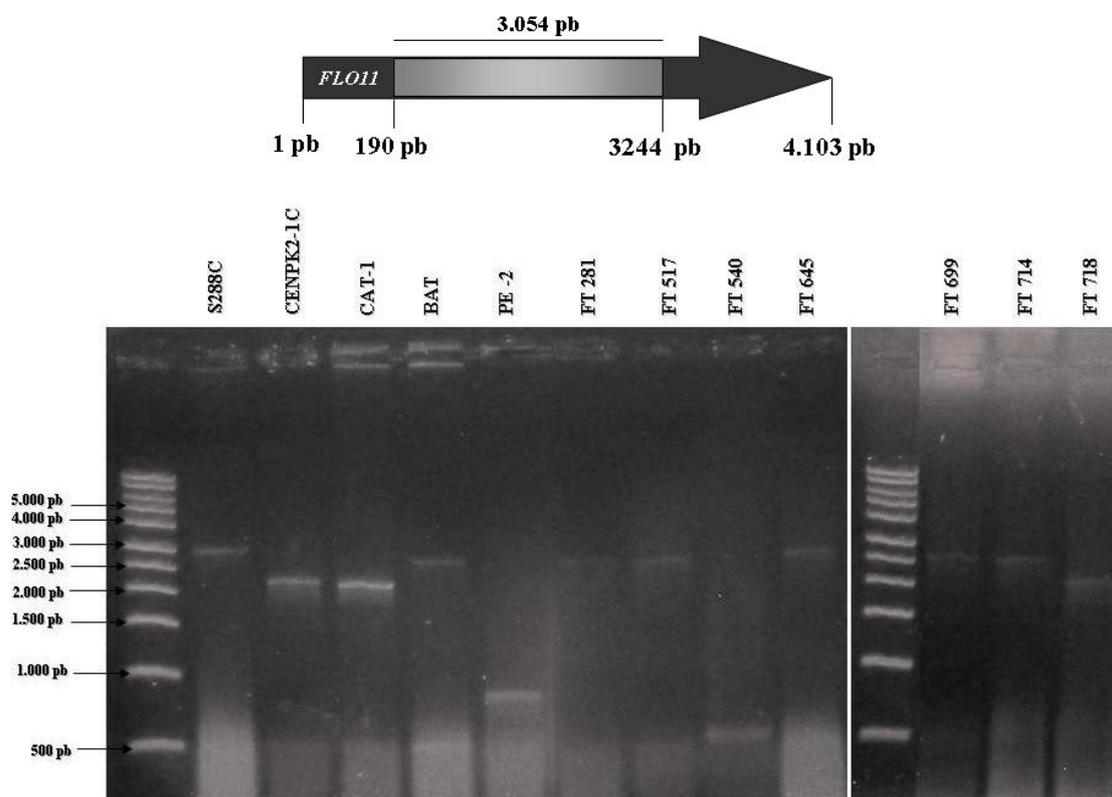


Figura 14: Polimorfismo do Gene *FLO11*. Eletroforese dos géis de agarose mostrando os produtos das reações de PCR obtidos a partir do DNA genômico das linhagens indicadas, utilizando os iniciadores descritos na Tabela 2. O marcador de peso molecular para DNA utilizado nestes géis foi o 1 kb DNA Ladder (Invitrogen). Na figura acima do gel encontra-se uma representação do gene *FLO11* com a posição onde cada iniciador anela, e o tamanho do fragmento esperado (no caso da linhagem S288C).

4.6 Correlações encontradas entre as características fenotípicas estudadas

A partir de todas as características estudadas no presente trabalho, foram realizadas comparações entre elas, e analisadas as possíveis correlações encontradas entre elas. Todos os dados foram plotados em gráficos de relação e a partir da regressão linear da equação de reta encontrada, foi calculado o coeficiente de regressão linear (r). A seguir serão apresentadas as correlações mais significativas, com $r \geq 0,65$. Além da relação entre as características fenotípicas, foram também realizadas correlações entre estas características e polimorfismos dos dois genes estudados neste trabalho: *FLO1* e *FLO11*.

Como pode ser observado na Figura 15, as melhores correlações estabelecidas entre os fenótipos analisados foram para a formação de biofilme e a floculação na ausência ($r=0,85$) ou presença de Ca^{+2} ($r=0,84$), demonstrando que formação de biofilmes e a floculação provavelmente estão fortemente correlacionadas. A formação de biofilme também apresentou uma boa correlação com a hidrofobicidade celular, seja utilizando o solvente orgânico hexano ($r= 0,65$) ou tolueno ($r=0,66$). É importante lembrar ainda que a capacidade de formar biofilmes, aparentemente, apresenta uma correlação inversa com a propriedade de crescimento invasivo no ágar, já que 76% das linhagens estudadas que são capazes de formar biofilme, não são capazes de crescer invasivamente no ágar (vide Figuras 10 e 11, e Tabela 3 acima).

Dada a alta correlação existente entre formação de biofilmes e a floculação e hidrofobicidade celular, não é de estranhar que estas duas últimas características fenotípicas estejam também significativamente correlacionadas, com coeficientes de correlação linear que variaram de 0,73 a 0,80 (Figura 15) para a floculação tanto na presença quanto na ausência de Ca^{+2} , e a solubilidade em solventes orgânicos como o tolueno ou hexano.

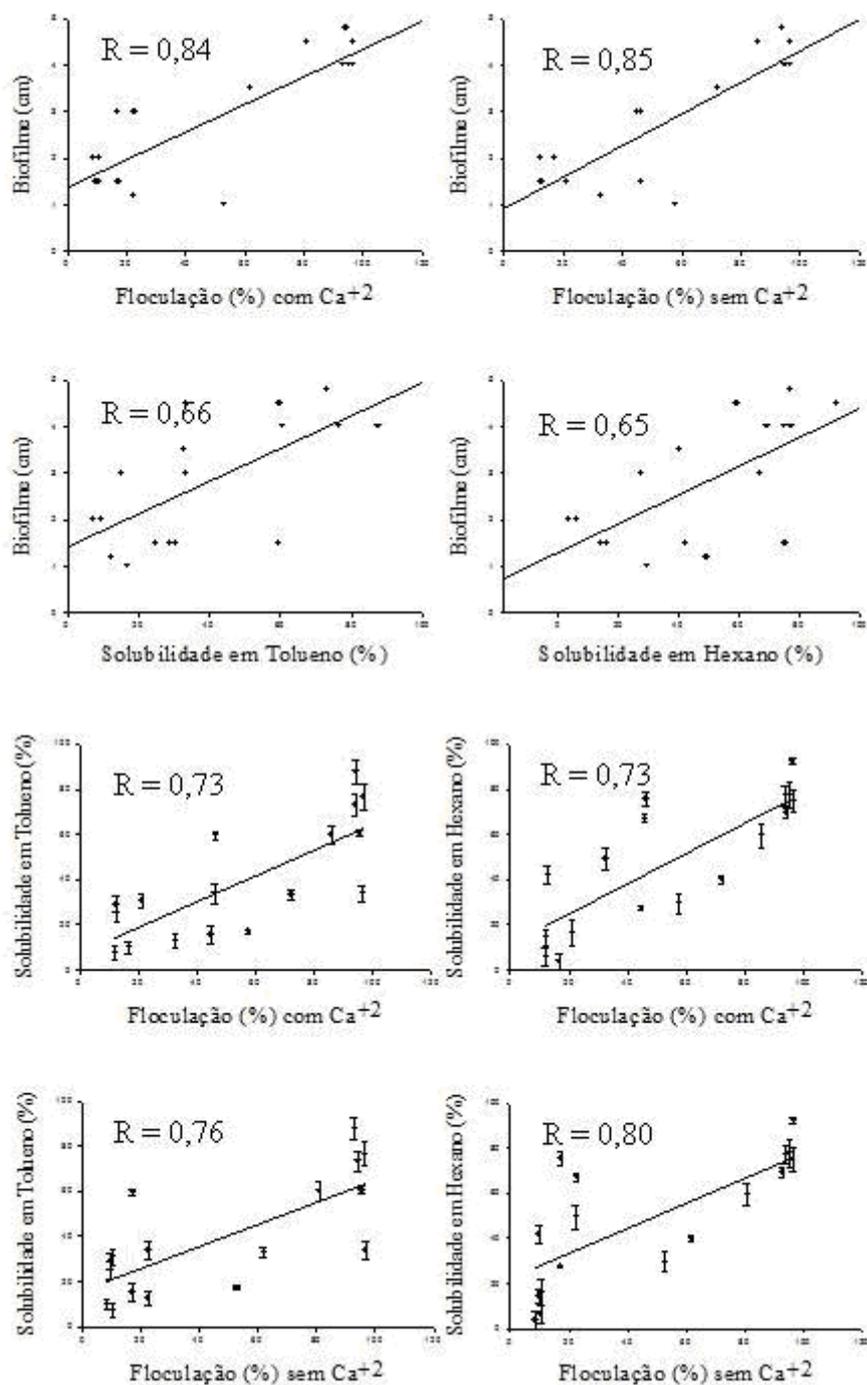


Figura 15: Correlações significativas encontradas entre as características fenotípicas estudadas. Os gráficos acima ressaltam as correlações mais significantes entre os parâmetros analisados neste trabalho.

No caso do polimorfismo de tamanho nos genes estudados (*FLO1* e *FLO11*), as maiores correlações encontradas (Figura 16) foram entre o tamanho do gene *FLO1* e a solubilidade celular em solventes orgânicos ($r=0,79$ para o hexano, e $r=0,75$ para o tolueno), indicando que quanto maior a região polimórfica deste gene, maior a hidrofobicidade celular da linhagem industrial. O polimorfismo do gene *FLO1* também apresentou uma boa correlação com a capacidade floculante das células na presença de Ca^{+2} ($r= 0,65$). Já no caso do gene *FLO11*, os polimorfismos de tamanho deste gene foram mais bem correlacionados (Figura 16) com a capacidade de formação de biofilme ($r=0,70$), a floclulação na presença de Ca^{+2} ($r=0,70$) e a produção de espuma ($r=0,66$).

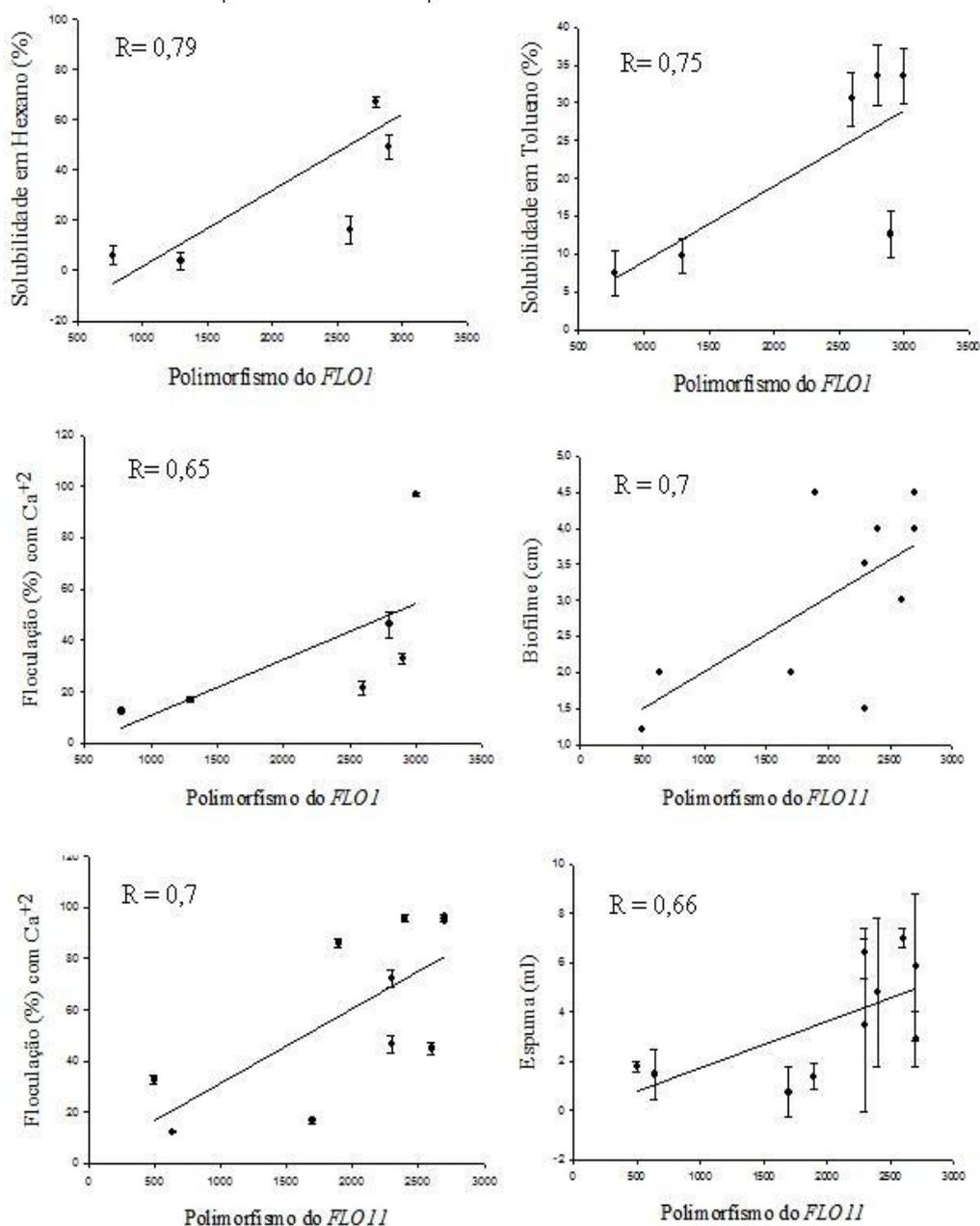


Figura 16: Correlações relevantes encontradas entre as características fenotípicas analisadas, e polimorfismos dos genes estudados. Os gráficos acima representam as correlações mais significativas entre algumas características fenotípicas das linhagens estudadas, e o polimorfismo no tamanho dos genes *FLO1* e *FLO11* estudados no presente trabalho.

5 Discussão

Na produção de álcool combustível no Brasil, assim como em outros processos fermentativos industriais, as principais linhagens de leveduras utilizadas são as pertencentes ao gênero *Saccharomyces*. Estas linhagens são geralmente diplóides, dimórficas e apresentam algumas características fenotípicas de adaptação a ambientes inóspitos. Como objeto de estudo do presente trabalho, foram escolhidos os principais aspectos fenotípicos de linhagens industriais de leveduras importantes na produção de álcool combustível, incluindo floculação, produção de espuma, hidrofobicidade da parede celular, formação de biofilme e crescimento invasivo em ágar. Estas características vêm sendo relacionadas na literatura com genes da família *FLO*, principalmente com os genes *FLO1* e *FLO11*, e com outros genes como *DAN4* e *AWA1*, todos estes genes que codificam para glicoproteínas classificadas como adesinas.

Os resultados obtidos no presente trabalho em relação a produção de espuma pelas linhagens industriais estudadas em meios com 20 g/L de açúcares totais apresentaram algumas divergências em relação à classificação realizada pela FERMENTEC no ambiente industrial, ou seja, apenas 59% das linhagens apresentaram características semelhantes. Por exemplo, linhagens como FT278, FT279 e FT699 que foram identificadas como fortemente espumantes em ambientes industriais, quando testadas em laboratório em meio contendo 20 g/L de açúcares totais, mostraram-se como moderadamente espumantes. Entretanto, quando as linhagens FT278 e FT279 foram testadas em meio contendo 200 g/L de açúcar, que é aproximadamente a mesma concentração utilizada na indústria de álcool combustível, foi verificada produção de grande volume de espuma (>16 ml), condizendo com os dados apresentados por estas linhagens no ambiente industrial. Isso indica que dependendo da quantidade de açúcar no meio a ser fermentado, a característica fenotípica

de produção de espuma pode variar. Comparando ainda os resultados obtidos em laboratório e os observados nas indústrias, pôde-se notar que 86% das linhagens que tiveram uma produção de espuma média ou forte, foram capazes de interagir com as bolhas de CO₂ formadas durante o processo fermentativo.

Quando analisada as relações entre a produção de espuma e as demais características estudadas, apenas uma relação mostrou-se relevante: linhagens que mostraram-se fracamente espumantes, foram capazes de crescer invasivamente em ágar (cerca de 83% das linhagens). Quando relacionadas a polimorfismos dos genes estudados, o volume de espuma produzido apresentou uma boa correlação com o polimorfismo do gene *FLO11*, indicando uma provável ligação entre a produção de espuma por linhagens industriais e a expressão e tamanho do gene desta floculina. Este resultado condiz com resultados obtidos por Fidalgo e colaboradores (2006), que ao estudarem a produção de volume por uma linhagem industrial produtora de vinho, encontraram o gene *FLO11* como responsável por esta característica. Como as propriedades do volume se assemelham às propriedades da espuma (as células no volume encontram-se na região superior do vinho fermentado, em contato com o ar), pode-se especular que este gene também influencie a formação de espuma em linhagens industriais de *S. cerevisiae*. Outros trabalhos relataram o gene *AWAI* como o responsável pela produção de espuma em uma linhagem industrial de *sake* (SHIMOI, et al., 2002; MIYASHITA, et al.; 2004 & SHIMIZU, et al., 2005). Entretanto no presente trabalho nenhum fragmento relacionado com este gene foi encontrado. Entretanto, serão necessários mais estudos para determinar a presença ou não deste gene nas linhagens industriais estudadas.

Com relação aos resultados obtidos nos ensaios de floculação, as linhagens apresentaram perfis floculantes condizentes aos obtidos previamente em ambientes industriais para 71% das linhagens estudadas. Quando analisadas as correlações

estabelecidas entre floculação (tanto na presença quanto na ausência de Ca^{+2}), as características fenotípicas e os polimorfismos dos genes *FLO1*, e *FLO11*, a correlação mais relevante foi obtida entre a capacidade floculante das células, a formação de biofilme e a hidrofobicidade celular. Como já foi descrito acima, o tamanho dos genes *FLO1* e *FLO11* também foram correlacionados à floculação e formação de biofilmes, e inclusive com a hidrofobicidade da parede celular, indicando que quanto maior o gene, maior a hidrofobicidade da parede celular nos solventes orgânicos testados. Estes resultados estão de acordo com Jibiki e colaboradores (2001) que verificaram uma relação semelhante quando analisaram o polimorfismo do gene *FLO5*, e a hidrofobicidade da superfície celular em linhagens *S. cerevisiae* industriais para produção de cerveja de baixa fermentação.

Quanto à floculação e ao crescimento invasivo celular em ágar, pode-se dizer que 83% das linhagens que se apresentaram como fracamente floculantes na presença de Ca^{+2} , foram capazes de crescer invasivamente em ágar, esta proporção caindo significativamente (para 66%) quando a floculação foi analisada na ausência de cálcio. Estes dados divergem ligeiramente dos apresentados por Guo e colaboradores (2000), que ao sobreexpressar genes da família *FLO*, como *FLO1*, *FLO10* e *FLO11*, em linhagens com *background* genético da $\Sigma 1278b$, verificaram que floculação e crescimento invasivo apresentavam-se como características paralelas. Verificaram também que o gene *FLO11* seria o responsável pelo crescimento invasivo em células haplóides e formação de pseudohifas em diplóides, contudo a sobreexpressão do gene *FLO10* pode superar o requerimento de gene *FLO11* na filamentação e crescimento celular invasivo.

Outro aspecto importante encontrado neste trabalho é a relação estabelecida entre a capacidade floculante das células na presença de Ca^{+2} , e os polimorfismos encontrados nos genes *FLO1* e *FLO11*, ou seja, quanto maior o tamanho destes genes, maior sua capacidade floculante na presença de Ca^{+2} . Estes resultados confirmam os obtidos por

Verstrepen e colaboradores (2005) que ao construírem oito linhagens a partir da linhagem S288C com tamanhos variáveis nas regiões de repetições intragênicas, obtiveram perfis de floculação diferentes. Quanto maior a região de repetições intragênicas, maior a capacidade floculante da célula, indicando que esta região seria a responsável pela variação no perfil floculante de diferentes linhagens. Ainda, estudando a relação entre polimorfismos dos genes *FLO* e a taxa de floculação das células, Jibiki e colaboradores (2001) observaram através de reações de PCR que quanto maior o polimorfismo do gene *FLO5*, é também maior a taxa de floculação das trinta linhagens fermentadoras tipo “lager” (linhagens de leveduras que possuem uma temperatura ótima para fermentação entre 7-15°C, localizando-se principalmente no topo do fermentador durante o processo. São extensivamente utilizadas na indústria cervejeira).

Outro trabalho que relata a relação entre os genes *FLO1*, *FLO8* e *FLO11* foi publicado recentemente por Fichtner e colaboradores (2007), onde verificaram que a linhagem haplóide S288C requer os genes *FLO1* e *FLO8* para que haja crescimento invasivo em ágar e interação célula-célula durante a floculação. Entretanto, estas propriedades podem ser compensadas em linhagens que não possuem o gene *FLO1*, pelo gene *FLO11*, como acontece na linhagem $\Sigma 1278b$ que não possui o gene *FLO1*. Assim como em $\Sigma 1278b$, em linhagens diplóides de S288C, o gene *FLO11* aparece como o único responsável pela formação de pseudohifas. Este trabalho também sugere que o gene *FLO1* possui a mesma regulação que o *FLO11*, ou seja, ele também é regulado pelos fatores de transcrição *MSS11* e *FLO8*. Isto indica que ambos os genes estão envolvidos com o processo de floculação celular e podem estar sob o controle das mesmas condições nutricionais do meio.

Outros resultados relevantes deste trabalho foram a análise e caracterização das linhagens industriais quanto à formação de biofilmes. Foi verificado que sete das dezessete

linhagens industriais foram capazes de formar biofilmes em meio YP-2% glicose com 0.3% ágar. Comparando-se os resultados obtidos em laboratório com os observados no ambiente industrial, pôde-se concluir que a morfologia das colônias está ligada à capacidade de formação de biofilme, ou seja, 86% das linhagens com colônias rugosas foram capazes de formar biofilme, assim como 88% das linhagens de colônias lisas não foram capazes de formar biofilme. Foi verificado também que a formação de biofilme e de pseudohifa também apresentaram uma relação marcante: 89% das linhagens que não formaram biofilmes também não foram capazes de formar pseudohifas, assim como 100% das que formaram biofilmes, foram também capazes de formar pseudohifas.

Biofilme e solubilidade em solventes orgânicos apresentaram uma boa correlação, ou seja, quanto maior o diâmetro do biofilme formado, maior a hidrofobicidade da parede celular, e a formação de biofilme pode ser correlacionada também aos polimorfismos do gene *FLO11*. Estes resultados estão de acordo com dados obtidos por Reynolds & Fink (2001) que ao estudarem a formação de biofilmes em linhagens isogênicas haplóides e diplóides de *S. cerevisiae* utilizadas na indústria de panificação, verificaram que quando os genes *FLO11* ou *FLO8* foram inativados, foi observada uma alteração na formação de biofilmes pelas linhagens. Em outro estudo mais recente, Reynolds (2006) também observou que a produção de biofilme por *S. cerevisiae* é uma característica *FLO11*-dependente.

Os resultados obtidos no presente trabalho vão, portanto, de encontro a relatos recentes na literatura indicando que a floculina *FLO11* é a principal responsável pelas atividades de adesão celular em leveduras, uma vez que quando esta proteína isolada é ligada a microesferas, as mesmas sofrem significativa agregação (DOUGLAS, et al., 2007). Graças ao domínio “lectin like” presente na extremidade N-terminal das adesinas, estas proteínas reconhecem e se ligam em resíduos de açúcar presentes não só na parede

celular, mas também nas glicosilações da própria adesina, promovendo o contato célula-célula, como recentemente demonstrado para adesinas de *Candida* expressas em *S. cerevisiae* (ZUPANCIC et al., 2008). No caso de adesinas de *Candida* expressas em *S. cerevisiae*, o tamanho da região central contendo as repetições ricas em serina e treonina também é fundamental não só para poder estender o domínio “lectin like” para fora da parede celular, e assim mediar as interações da célula com outras células, como também para interagir diretamente com outras superfícies, provavelmente graças às propriedades hidrofóbicas que esta região possui (LI & PALECEK, 2008).

6 Considerações Finais e Perspectivas Futuras

A levedura *S. cerevisiae* possui várias aplicações industriais, sendo o principal microrganismo utilizado no processo de produção de álcool combustível no Brasil. No presente trabalho foram estudadas dezessete linhagens industriais isoladas diretamente das dornas de fermentação de produção de álcool de algumas destilarias do Brasil. Após verificação do comportamento destas em ambientes industriais, foram realizados ensaios em laboratório para melhor caracterização das principais características fenotípicas apresentadas por elas que poderiam influenciar o processo de produção.

A partir destas análises, foi possível estabelecer algumas relações que se mostraram bastante interessantes. Os resultados indicam que os genes estudados pertencentes à família *FLO*, particularmente *FLO1* e *FLO11*, estão intimamente relacionados com as características fenotípicas analisadas. Pode-se notar igualmente que o polimorfismo destes genes também está relacionado com a intensidade do fenótipo observado nestas linhagens industriais.

Considerando que para otimizar a produção de álcool combustível seria interessante otimizar o tempo de análise populacional das linhagens de leveduras presentes numa dorna de fermentação, para que se necessário, haja uma intervenção rápida afim de não perder um ciclo fermentativo inteiro, algumas metodologias poderiam ser propostas a partir dos resultados obtidos no presente trabalho para pronta utilização na indústria. A metodologia que avalia o grau de hidrofobicidade da parede celular com o uso de solventes orgânicos (tolueno ou hexano) mostrou-se como uma interessante ferramenta a ser utilizada, uma vez que foi capaz de identificar cerca de 70% das leveduras floculantes.

Outra metodologia que pode ser proposta para uso industrial é a identificação de linhagens floculantes pelo polimorfismo do gene *FLO11* através de reações de PCR. Cerca

de 70% destas linhagens apresentaram um grau de floculação proporcional ao tamanho do gene. Esta prática facilitaria o controle de linhagens floculantes na indústria de álcool combustível, já que esta característica dificulta a reciclagem das células após a fermentação, aumentando os gastos da indústria durante o processo fermentativo. Além de identificar linhagens floculantes, com esta metodologia seria possível verificar a presença de linhagens formadoras de biofilme, pois foi verificada uma correlação boa também entre biofilme e polimorfismo do *FLO11*. A identificação de linhagens formadoras de biofilme é extremamente importante para a indústria, pois estas poderiam contribuir para a obstrução do sistema de encanamento. Isso leva a diminuição na produção, pois a dorna com problemas de biofilmes deve ser esvaziada para limpeza, tornando-a inutilizável por um período de tempo.

Considerando-se que a formação de espuma também é prejudicial ao processo de produção de álcool combustível, pois há perda de células e de mosto quando seu volume é exacerbado (provocando o transbordamento do vinho da dorna), serão necessárias análises complementares para uma melhor identificação e caracterização das linhagens espumantes. Também será realizada sua possível correlação com as outras características fenotípicas e de polimorfismo das adesinas analisadas no presente trabalho.

Cabe salientar que no caso de algumas linhagens (p.ex. FT697 e FT729) não foi possível detectar nenhum dos genes estudados, indicando que estas leveduras possam possuir outras adesinas e/ou floculinas no seu genoma que permitiriam a expressão das características fenotípicas de superfície analisadas no presente trabalho. Desta forma, seria interessante tentar identificar esses outros genes presentes nestas leveduras, e sua relação com as adesinas e floculinas já conhecidas em *S. cerevisiae*. Igualmente, seria extremamente interessante seqüenciar os fragmentos das adesinas amplificados na PCR, para identificar a natureza molecular dos polimorfismos encontrados nestes genes.

Finalmente, no presente trabalho não foi realizada nenhuma tentativa de analisar a expressão dos genes *FLO1*, *FLO11* e *DAN4* nas linhagens industriais, e as possíveis vias de regulação envolvidas na percepção do estado nutricional do meio de cultivo. Estes estudos são fundamentais para termos uma visão mais completa do processo de produção de espuma, floculação e outras propriedades de superfície das linhagens de *S. cerevisiae* utilizadas na produção industrial de álcool combustível no Brasil. Estes aspectos regulatórios são de extrema relevância para a indústria brasileira, uma vez que recentemente foi mostrado que a sacarose (principal açúcar utilizado na indústria) é o açúcar que mais induz a expressão das propriedades floculantes e de formação de pseudohifas em *S. cerevisiae* (VAN DE VELDE, et al., 2008)

7 Referências Bibliográficas

- AMORIM, V.A. **Fermentação alcoólica: ciência e tecnologia**. Piracicaba: FERMENTEC, 2005. 434p.
- AMORIM, H.V., BASSO, L.C., LOPES, M.L. 'Evolution of ethanol fermentation in Brazil', in J. H. Bryce & G.G. Stewart. **Tradition and Innovation**. 2ed. Nottihan University Press, UK, 2004.
- ANDRIETTA, M.G.S.; ANDRIETTA, S.R.; STECKELBERG, C. & STUPIELLO, E.N.A. Bioethanol – 30 years of Proálcool, **International Sugar Journal**, v.109, n.1299, p.195-200, 2007.
- BAHN, Y.-S.; XUE, C.; IDNURM, A.; RUTHERFORD, J.C.; HEITMAN, J. & CARDENAS, M.E. Sensing the environment: lessons from fungi, **Nature Reviews Microbiology**, v.5, p.57-69, 2007.
- BASÍLIO, A.C.M.; ARAÚJO, P.R.L.; MORAIS, J.O.F.; SILVA FILHO, E.A.; MORAIS, M.A. & SIMÕES, D.A.JR. Detection and identification of wild yeast contaminants of the industrial fuel ethanol fermentation process, **Current Microbiology**, v.56, p.322-326, 2008
- BAYLY, J.C.; DOUGLAS, L.M.; PRETORIUS, I.S.; BAUER, F.F. & DRANGINIS, A.M. Characteristics of *FLO11*-dependent flocculation in *Saccharomyces cerevisiae*, **FEMS Yeast Research**, v. 5, p.1151-1156, 2005
- BESTER, M.C.; PRETORIUS, I.S. & BAUER, F.F. The regulation of *Saccharomyces cerevisiae* *FLO* gene expression and Ca⁺²- dependent flocculation by Flo8p and Mss11p, **Current Genetics**, v.49, p. 375-383, 2006.
- BOWEN, S & WHEALS, A. Ser/Thr-rich domains are associated with genetic variation and morphogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*, **Yeast**, v.23, p.633-640, 2006.

- CECCATO-ANTONINI, S.R. Biotechnological implications of filamentation in *Saccharomyces cerevisiae*, **Biotechnology Letters**, v.30, p.1151-1161, 2008.
- CHANG, Y-I; SHIH, L-H & CHEN, S-W Effects of glucose and mannose on the flocculation behavior of *Saccharomyces cerevisiae* at different life stages, **Colloids and Surfaces**, v. 44, p.6-14, 2005.
- CUNHA, A. F.; MASSWA, S. K.; GOMES, L. H.; REIS, S. F & PEREIRA, G. A. G. Control by sugar of *Saccharomyces cerevisiae* flocculation for industrial ethanol production, **FEMS Yeast Research**, v.6, p.280-287, 2006.
- DE-SOUSA, S. R.; OLIVEIRA, K. F.; SOUZA, C. S.; KILIKIAN, B. V. & LALUCE, C. Yeas floataion as the result of interplay of supernatant composition and cell-wall hydrophobicity, **Colloids and Surfaces**, v.29, p.309-319, 2003.
- DOUGLAS, L.M.; LI, L.; YANG, Y. & DRANGINIS, A.M. Expression and characterization of the flocculin FLO11/MUC1, a *Saccharomyces cerevisiae* mannoprotein with homotypic properties of adhesion, **Eukaryotic Cell**, v.6, n.12, p.2214-2221, 2007.
- DRANGINIS, A.M.; RAUCEO, J.M.; CORONADO, J.E. & LIPKE, P.N. A biochemical guide to yeast adhesins: glycoproteins for social and antisocial occasions, **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.71, n.2, p.282-294, 2007.
- FICHTNER, L.; SCHULZE, F. & BRAUS, G. H. Differential Flo8p-dependent regulation of *FLO1* and *FLO11* for cell-cell and cell-substrate adherence of *S. cerevisiae* S288C, **Molecular Microbiology**, v.65, n.5, p.1276-1289, 2007.
- FIDALGO, M.; BARRALES, R. R.; IBEAS, J. I. & JIMENEZ, J. Adaptive evolution by mutations in the *FLO11* gene, **Proceedings of the Natural Academy of Science of USA** , v.103, n.30, p.11228-11233, 2006.

- GAGIANO, M.; BAUER, F.F. & PRETORIUS, I.S. The sensing of nutritional status and relationship to filamentation growth in *Saccharomyces cerevisiae*, **FEMS Yeast Research**, v.2, p.433-470, 2002.
- GUO, B.; SYLES, C. A.; FENG, Q. & FINK, G. R. A *Saccharomyces cerevisiae* gene involved in invasive growth, cell-cell adhesion and mating, **Proceedings of the Natural Academy of Science of USA** , v.97, n.22, p.12158-12163, 2000.
- HALME, A.; BUMGARNER, S., STYLES, C. & FINK, G. R. Genetic and epigenetic regulation of the *FLO* gene family generates cell-surface variation in yeast, **Cell**, v.116., p.405-415, 2004.
- HILL, J.; NELSON, D.; POLASKY, S. & TIFFANY, D. Environmental, economic and energetic cost and benefits of biodiesel and ethanol biofuels, **Proceedings of the Natural Academy of Science of USA**, v.103, p.11206-11210, v.103, n.30, 2006.
- JIBIKI, M.; ISHIBIKI, T.; YUUKI, T. & KAGAMI, N. Amplification of polymerase chain reaction to determine the flocculation properties of brewer's lager yeast, **American Society of Brewing Chemists**, v.59, n.3, p.107-110, 2001.
- JIN, R.; DOBRY, C.J.; McCOWN, P.J & KUMAR, A. Large-scale analysis of yeast filamentous growth by systematic gene disruption and overexpression, **Molecular Biology of the Cell**, v.19, p.284-296, 2008.
- KOIZUMI, H. & OGAWA, T. Rapid and sensitive method to measure premature yeast flocculation activity in malt, **Journal of The American Society of Brewing Chemists**, v.63, n.4, p.147-150, 2005.
- LAWRENCE, S.; GIBSON, B.; & SMART, K.A. Can flocculation be controlled during full-scale fermentations? In: American Society of Brewing Chemists 2006 Annual Meeting, La Quinta (CA, USA). **ASBC Newsletter** v. 66, p. 15, 2006.

- LEGENDRE, M.; POCHET, N.; PAK., T & VERSTREPEN, K.J. Sequence-based estimation of minisatellite and microsatellite repeat variability, **Genome Research**, v.17, p.1787-1796, 2007.
- LI, F., PALECEK, S.P. Distinct domains of the *Candida albicans* adhesin Eap1p mediate cell–cell and cell–substrate interactions. **Microbiology**, v. 154, p. 1193-1203, 2008
- LIBERAL, A.T.S.; BASÍLIO, A.C.M.; RESENDE, A.M.; BRASILEIRO, B.T.V.; SILVA-FILHO; E.A.; MORAIS, J.O.F.; SIMÕES, D.A. & MORAIS-JR, M.A. Identification of *Dekkera bruxellensis* as a major contaminant yeast in continuous fuel ethanol fermentation, **Journal of Applied Microbiology**, v.102, p.538-547, 2007.
- LIMA, U. A; BASSO, L. C. & AMORIM, H. V. “Produção de Etanol” In: LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. & SCHMIDELL, W. **Biotecnologia Industrial**. v.3. São Paulo: Ed. Edgard Blücher Ltda., 2001.
- LIU, N; WANG., D.; WANG, Z. Y.; HE, X. P. & ZHANG, B. Genetics basis of flocculation phenotype conversion in *Saccharomyces cerevisiae*, **FEMS Yeast Research**, v.7, n.8, p.1362-1370, 2007..
- LO, W.-S.; DRANGINIS, A.M. The cell surface flocculin *FLO11* is required for pseudohyphae formation and invasion by *Saccharomyces cerevisiae*, **Molecular Biology of the Cell**, v.9, p.161-171, 1998.
- MARINANGELI, P.; CIANI, A. M.; CLEMENTI, F. & MANNAZZU, I. Minisatellites in *Saccharomyces cerevisiae* genes encoding cell wall proteins: a new way towards strain characterization, **FEMS Yeast Research**, v.4, p. 427-435, 2004.
- MIYASHITA, K.; SAKAMOTO, K.; KITAGAKI, H.; IWASHITA, K.; ITO, K. & SHIMOI, H. Cloning and analysis of the *AWA1* gene of a nonforming mutant of a sake yeast, **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v.97, n.1, p.14-18, 2004.

- MORTENSEN, H.D.; DUPONT, K.; JESPERSEN, L. & ARNEBORG, N. The flo11p-deficient *Saccharomyces cerevisiae* strain background S288c can adhere to plastic surfaces, **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v.60, p.131-134, 2007.
- PALKOVÁ, Z. & VÁCHOVÁ, L. Life within a community: benefit to yeast long-term survival, **FEMS Microbiology Reviews**, v.30, p.806-824, 2006.
- PAN, X & HEITMAN, J. Protein Kinase A operates a molecular switch that governs yeast pseudohyphal differentiation, **Molecular and Cellular Biology**, v.22, n.12, p.3981-3993.
- PIŠKUR, J.; ROZPEDOWSKA, E.; POLAKOVA, S.; MERICO, A. & COMPAGNO, C. How did *Saccharomyces* evolve to become a good brewer?, **Trends in Genetics**, v.22, n.4, p.183-186, 2006.
- PUREVDORJ-GAGE, B.; ORR, M.E.; STOODLEY, P., SHEEHAN, K.B. & HYMAN, L.E. The role of *FLO11* in *Saccharomyces cerevisiae* biofilm development in a laboratory based flow-cell system, **FEMS Yeast Research**, v.7, n.3, p.372-379, 2007.
- REYNOLDS, T. B. & FINK, G. R. Baker's Yeast, a Model for Fungal Biofilm Formation, **Science**, v.291, p.878-881, 2001.
- REYNOLDS, T.B. The Opi1p transcription factor affects expression of *FLO11*, mat formation, and invasive growth in *Saccharomyces cerevisiae*, **Eukaryotic Cell**, v.5, n.8, p.1266-1275, 2006.
- REYNOLDS, T.B.; JANSEN, A.; PENG, X. & FINK, G.R. Mat formation in *Saccharomyces cerevisiae* requires nutrient and pH gradients, **Eukaryotic Cell**, v. 7, p.122-130, 2007.
- SATO, M.; WATARI, J. & SHINOTSUKA Genetic instability in flocculation of bottom-fermenting yeast, **Journal of The American Society of Brewing Chemists**, v.59, n.3, p.130-134, 2001.

- SHIMIZU, M.; MIYASHITA, K.; KITAGAKI, H., ITO, K; SHIMOI, H. Amplified fragment length polymorphism of the *AWAI* gene of sake yeast for identification of sake yeast strains, **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v.100, n.6, p.678-680, 2005.
- SHIMOI, H.; SAKAMOTO, K.; OKUDA, M.; ATTHI, R.; IWASHITA, K. & ITO, K. The *AWAI* gene is required for the foam-formation phenotype and cell surface hydrophobicity of sake yeast, **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, n.4, p.2018-2025, 2002.
- SILVA FILHO, E. A.; MEOL, H. F.; ANTUNES, D. F.; SANTOS, S. K. B.; RESENDE, A. M.; SIMÕES, D. A. & MORAIS JR., M. A. Isolation by genetic and physiological characteristics of fuel-ethanol fermentative *Saccharomyces cerevisiae* strain with potential for genetic manipulation, **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v.32, p.481-486, 2005.
- TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R. & CASE, C. L. **Microbiologia**. 8 ed. Porto Alegre: Ed. Artmed, 2005, 894p.
- VAN DE VELDE, S. & THEVELEIN, J.M. Cyclic AMP-Protein kinase A and Snf-1 signaling mechanisms underlie the superior potency of sucrose for induction of filamentation in *Saccharomyces cerevisiae*, **Eukaryotic Cell**, v.7, n.2, p.286-293, 2008.
- VAN DYK, D.; PRETORIUS, I.S. & BAUER, F.F. Mss11p is a central element of the regulation network that controls *FLO11* expression and invasive growth in *Saccharomyces cerevisiae*, **Genetics**, v.169, p.91-106, 2005.
- VERSTREPEN, K. J.; DERDELINCKX, G & VERACHTERT, H. Yeast flocculation: what brewers should know, **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 61, p.197-205, 2003.

- VERSTREPEN, K. J.; REYNOLDS, T. B. & FINK, G. R. Origins of variation in the fungal cell surface, **Nature Reviews in Microbiology**, v.2, p.533-540, 2004a.
- VERSTREPEN, K.L.; ISERENTANT, D.; MALCORPS, P.; DERDELINCKX, G.; DIJCK, P.V.; WINDERICKX, J.; PRETORIUS, I.S.; THEVELEIN, J.M. & DELVAUX, F.R. Glucose and sucrose: hazardous fast-food for industrial yeast?, **Trends in Biotechnology**, v.22, n.10, p.531-537, 2004b.
- VERSTREPEN, K. J.; JANSEN, A.; LEWITTER, F. & FINK, G. R. Intragenic tandem repeats generate functional variability, **Nature Genetics**, v.37, n.9, p.986-990, 2005.
- VERSTREPEN, K.J. & KLIS, F.M. Flocculation, adhesion and biofilm formation in yeasts, **Molecular Microbiology**, v.60, n.1, p.5-15, 2006.
- VINOD, P.K.; SENGUPTA, N.; BHAT, P.J. & VENKATESH, K.V. Integration of global signaling pathways, c AMP-PKA, MAPK and TOR in regulation of *FLO11*, **Plos One**, v.3, n.2, p.1-14, 2008.
- WANG, F.-Z.; SHEN, W.; RAO, Z.-M.; FANG H.-Y.; ZHAN X.-B. & ZHUGE J. Construction of a floccuating yeast for fuel ethanol production. **Biotechnology Letters**, v.37, p.97-102, 2008.
- WHEALS, A. E.; BASSO, L. C., ALVES, D. M. G. & AMORIM, H. V. Fuel ethanol after 25 years, **Trends in Biotechnology**, v. 17, p.482-487, 1999.
- ZARA, S.; BAKALINSKY, A. T.; ZARA, G.; PIRINO, G.; DEMONTIS, M. A. BUDRONI, M. *FLO11*-Based model for air-liquid interfacial biofilm formation by *Saccharomyces cerevisiae*, **Applied and Environmental Microbiology**, v.71, n.6, p.2934-2939, 2005.
- ZUPANCIC, M.L., FRIEMAN, M., SMITH, D., ALVAREZ, R.A., CUMMINGS, R.D., CORMACK, B.P. Glycan microarray analysis of *Candida glabrata* adhesin ligand specificity. **Molecular Microbiology**, v. 68, n. 3, p. 547-559., 2008.

<http://www.portalunica.com.br/portalunica/?Secao=referencia>, Acesso em 04/ 09/2007, às 10:45.