



ANA CAROLINA RODRIGUES FARIA

**OBTENÇÃO E AVALIAÇÃO FERMENTATIVA
DE MUTANTES DE *Saccharomyces cerevisiae*
PARA A PRODUÇÃO DE CACHAÇA**

LAVRAS – MG

2014

ANA CAROLINA RODRIGUES FARIA

**OBTENÇÃO E AVALIAÇÃO FERMENTATIVA DE MUTANTES DE
Saccharomyces cerevisiae PARA A PRODUÇÃO DE CACHAÇA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, área de concentração em Microbiologia Agrícola, para a obtenção do título de Mestre.

Orientador

Dr. Eustáquio Souza Dias

Coorientadores

Dra. Simone Cristina Marques

Dr. Whasley Ferreira Duarte

LAVRAS – MG

2014

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Coordenadoria de Produtos e
Serviços da Biblioteca Universitária da UFLA**

Faria, Ana Carolina Rodrigues.

Obtenção e avaliação fermentativa de mutantes de *Saccharomyces cerevisiae* para a produção de cachaça / Ana Carolina Rodrigues Faria. – Lavras : UFLA, 2014.

46 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2014.

Orientador: Eustáquio Souza Dias.

Bibliografia.

1. Mutagênese. 2. Multitolerância. 3. Radiação UV. 4. Produção de etanol. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 664.68

ANA CAROLINA RODRIGUES FARIA

**OBTENÇÃO E AVALIAÇÃO FERMENTATIVA DE MUTANTES DE
Saccharomyces cerevisiae PARA A PRODUÇÃO DE CACHAÇA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, área de concentração em Microbiologia Agrícola, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em, 04 de abril de 2014

Dr. José Guilherme Lembi Ferreira	UFLA
Dra. Simone Cristina Marques	UFLA
Dr. Whasley Ferreira Duarte	UFLA

Dr. Eustáquio Souza Dias

Orientador

LAVRAS – MG

2014

*Aos meus pais, irmãos e Lucas,
em especial à Marina minha irmã, Madrinha Luisa
e Tio Heleno (in memoriam), por sempre acreditarem em mim.
Para estes, dedico.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por iluminar o meu caminho.

À Universidade de Lavras (UFLA) e ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, pela oportunidade concedida para a realização do mestrado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa de estudos.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, pelos ensinamentos transmitidos.

Ao professor Dr. Eustáquio Souza Dias pela orientação, paciência, dedicação e ensinamentos que foram de grande relevância para a realização deste trabalho e meu crescimento profissional.

Ao professor Dr. Whasley Ferreira Duarte e Dra. Simone Cristina Marques, pela coorientação, também paciência, dedicação e ensinamentos que foram de grande relevância para a realização deste trabalho e meu crescimento profissional.

Aos meus pais, Pedro e Ivone, que sempre estiveram ao meu lado me dando todo apoio e incentivo.

Ao meu irmão Davi, cunhada Karine e sobrinho Pedro Lucas, pela amizade, exemplo e incentivo.

À minha querida irmã Marina, minha madrinha Luisa e meu Tio Heleno (*in memoriam*) por terem depositado confiança em meus objetivos.

Ao meu namorado Lucas Voellger Calasans, por me amparar, apoiar e acompanhar na execução deste trabalho.

Aos meus amigos e companheiros de laboratório pela preciosa ajuda na condução dos experimentos, em especial ao Paulinho, pelo “bom dia” de todas as manhãs.

Aos meus amigos de turma, em especial à Mariana Coelho por sempre estar ao meu lado, seja nos momentos de alegria e tristeza, de euforia e desânimo, de vitórias e derrotas, e de saúde e doença, sempre me mostrando que em nenhum destes estaria sozinha.

À Maria Aparecida (Cidinha) pela preciosa ajuda na execução deste trabalho.

As minhas amigas Gabriele de Faria, Grazielle Santiago e Bruna de Paula, também pela preciosa ajuda na execução deste trabalho.

Ao Newton Moreno Sanches por me introduzir ao meio científico, sempre me orientar e acreditar que sou capaz.

Aos demais familiares e amigos que de alguma forma me apoiaram.

RESUMO

A cachaça é uma bebida brasileira, obtida pela destilação do mosto fermentado de caldo de cana-de-açúcar. Esta fermentação é feita predominantemente por linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* com fenótipos específicos como floculação, não produção de sulfeto de hidrogênio (H₂S), produção de compostos de sabores desejáveis, bem como produção de baixas quantidades de ácido acético. Durante este processo fermentativo, as células de levedura são expostas a condições estressantes, como altas temperaturas e concentrações elevadas de etanol. Quando não toleráveis, estas levam à inviabilidade celular, diminuindo a produção de etanol. Desta forma, é desejável a obtenção de cepas de *S. cerevisiae* superiores quanto à multitolerância às condições estressantes impostas durante o processo fermentativo, pois potencializariam ainda mais a produção e o padrão de qualidade da cachaça. Neste sentido, este trabalho teve como objetivo obter mutantes multitolerantes de *S. cerevisiae*, utilizando radiação ultravioleta (UV) como agente mutagênico. Para isso, a linhagem parental-original foi exposta à radiação UV e as células sobreviventes foram selecionadas quanto ao consumo de açúcares redutores (AR), multitolerância às condições cruzadas de concentrações de etanol (0, 5, 10 e 15%) e temperaturas (28 e 37° C), capacidade de floculação, não produção de sulfeto de hidrogênio (H₂S) e produção de etanol. O primeiro mutante obtido (M15) foi capaz de consumir 45,1% a mais de AR que a cepa parental-original. Na segunda irradiação, 42 mutantes foram capazes de consumir mais AR do que as linhagens referência. Destes, 13 se mostraram mais tolerantes e apenas 7 foram multitolerantes. Dos multitolerantes, 2 (M15.317 e M15.350) foram selecionados para fermentação em mosto de caldo de cana-de-açúcar. Não houve diferença significativa ($p < 0,05$) dentre os parâmetros avaliados de Yp/s, Yg/s, Ym/s, Qp e Ef %. No entanto, o mutante M15.317 exibiu a maior produção de etanol (67,2 g/L) e, conseqüentemente, a maior produtividade volumétrica (Qp = 2,8 g/L por hora). Desta forma, a mutagênese induzida por radiação UV foi eficiente em obter os mutantes de *S. cerevisiae* com características superiores quanto a multitolerância à temperatura de 37 °C e concentração de 15% (v/v) de etanol. No entanto, estes não foram capazes de produzir mais etanol do que a cepa parental-original.

Palavras-chave: Mutagênese. Multitolerância. Radiação UV. Produção de etanol.

ABSTRACT

Cachaça is a Brazilian drink, obtained by distillation of the fermented must of sugar cane broth. This fermentation is carried out mainly by *Saccharomyces cerevisiae* strains with specific phenotypes, such as flocculation, no production of hydrogen sulfide (H₂S), production of compounds of desirable flavors, as well as production of small amounts of acetic acid. During this fermentation process, yeast cells are exposed to stressful conditions, such as high temperatures and high concentrations of ethanol. When not tolerable, they lead to cell inviability, decreasing the production of ethanol. Thus, it is desirable to obtain *S. cerevisiae* strains which are superior for multi-tolerance to stressful conditions imposed during the fermentation process, since they would further potentialize production and the quality standard of cachaça. Therefore, this study aimed to obtain multi-tolerant mutants of *S. cerevisiae*, using ultraviolet radiation (UV) as a mutagenic agent. For this purpose, the original parental strain was exposed to UV radiation and the surviving cells were selected regarding consumption of reducing sugars (RS), multi-tolerance to crossed conditions of ethanol concentrations (0, 5, 10 and 15%) and temperatures (28 and 37 °C), flocculation ability, no production of hydrogen sulfide (H₂S), and ethanol production. The first mutant obtained (M15) was able to consume 45.1% more RS than the original parental strain. In the second irradiation, 42 mutants were able to consume more RS than the reference strains. From these mutants, 13 were more tolerant, and only 7 were multi-tolerant. From the multi-tolerant ones, 2 (M15.317 and M15.350) were selected for fermentation in the must of sugar cane broth. There was no significant difference ($p < 0.05$) among the evaluated parameters of Yp/s, Yg/s, Ym/s, Qp and Ef %. However, the mutant M15.317 exhibited the highest ethanol production (67.2 g/L) and, therefore, the highest volumetric productivity (Qp = 2.8 g/L per hour). Thus, UV-induced mutagenesis was effective in the obtention of *S. cerevisiae* mutants with superior characteristics for multi-tolerance at a temperature of 37 °C and ethanol concentration of 15% (v/v). However, they were not able to produce more ethanol than the original parental strain.

Keywords: Mutagenesis. Multi-tolerance. UV radiation. Ethanol production.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 Rota metabólica de fermentação alcoólica em *Saccharomyces cerevisiae* (BAI, BASSO e MOO-YOUNG, 2008). (HK) Hexoquinase. (PGI) Fosfoglicoisomerase. (PFK) Fosfofrutoquinase. (FBPA) Frutose bifosfato aldolase. (TPI) Triose fosfato isomerase. (GAPDH) Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase. (PGK) Fosfoglicerato quinase. (PGM) Fosfogliceromutase. (ENO) Enolase. (PYK) Piruvato quinase. (PDC) Piruvato descarboxilase. (ADH) Álcool desidrogenase.. 19
- Figura 2 Conteúdo em g/L de açúcares e etanol analisados em HPLC. (Si) Média da concentração inicial de substrato (sacarose, glicose e frutose) em g/L. (Sf) Média da concentração final de substrato em g/L. Média do etanol produzido durante a fermentação de 24 horas..... 37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Análise de tolerância a temperaturas e concentrações de etanol dos melhores mutantes consumidores de AR.....	31
Tabela 2	Mutantes multitolerantes ao estresse cruzado de etanol (0 a 15%) e temperatura (28 e 37° C). A concentração celular foi definida como o Log da população (UFC/mL). Em negrito estão os mutantes selecionados.....	33
Tabela 3	Classificação da capacidade de floculação dos mutantes tolerantes. O valor de floculação média é definido como a razão entre a densidade óptica a 620 nm da suspensão no momento da adição do tampão Helm (OD_0) e da obtida após 10 minutos que o tampão foi adicionado (OD_{10}) (Equação: $OD_{10}/OD_0 \times 100$). Escala do grau de floculação: razão > 90% indica não floculante (0); razão entre 70% e 90% indica baixa floculação (1); razão entre 30% e 70% indica média floculação (2), e razão < 30% indica alta floculação (3).....	34
Tabela 4	Parâmetros fermentativos, crescimento e sobrevivência das leveduras após fermentação em caldo de cana. Os valores apresentados correspondem às médias dos tratamentos realizados em duplicata. Os fatores de conversão dos substratos (sacarose, glicose e frutose) em etanol (Y_p/s), glicerol (Y_g/s), metanol (Y_m/s) e ácido acético (Y_{ac}/s) foram calculados, juntamente com a produtividade volumétrica de etanol (Q_p), a eficiência de conversão (%) (E_f). (Log) Log das células sobreviventes. (%) Porcentagem de crescimento.....	36

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REFERENCIAL TEÓRICO	17
2.1	Cachaça	17
2.2	Produção da Cachaça	18
2.3	Condições Estressantes durante o Processo Fermentativo da Cachaça	21
2.3.1	Estresse às Concentrações de Etanol	22
2.3.2	Estresse Térmico	23
2.4	Melhoramento Genético de Leveduras	24
3	MATERIAL E MÉTODOS	27
3.1	Curvas de Crescimento e Sobrevivência à Irradiação Ultravioleta ..	27
3.2	Mutagênese Induzida por Meio de Radiação UV	27
3.3	Consumo de Açúcares Redutores pelo Método de DNS	28
3.4	Obtenção de Células Mutantes	28
3.5	Screening dos Mutantes	28
3.5.1	Consumo de Açúcares Redutores pelo Método de DNS	28
3.5.2	Multitolerância a Temperatura e Etanol	28
3.5.3	Avaliação dos Mutantes Multitolerantes	29
3.5.4	Floculação e Produção de H₂S	29
3.6	Desempenho dos Mutantes Seleccionados Frente ao Parental-Original	30
3.7	Análises Químicas	30
3.8	Avaliação das Taxas de Crescimento e Sobrevivência	30
3.9	Avaliação do Desempenho Fermentativo dos Mutantes	31

4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
4.1	Obtenção de Mutantes	32
4.2	Screening dos Mutantes	32
4.3	Mutantes Multitolerantes	33
4.4	Desempenho Fermentativo, Crescimento e Sobrevivência	37
5	CONCLUSÕES	40
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	41
	REFERÊNCIAS	42

1 INTRODUÇÃO

A cachaça é uma bebida alcoólica de origem brasileira, obtida pela destilação do mosto fermentado do caldo de cana-de-açúcar, que pode atingir uma graduação alcoólica de 38 a 48% (v/v) a 20 °C (BRASIL, 2005). A fermentação do mosto de cana é feita predominantemente por linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* (ALENCAR et al., 2009; CAMPOS et al., 2010), com características específicas para a produção da bebida, como capacidade de flocular, não produção de sulfeto de hidrogênio (H₂S), produção de compostos de sabores desejáveis, bem como produção de baixas taxas de ácido acético (OLIVEIRA et al., 2008; SILVA et al., 2009).

Com uma produção anual de cerca de 1,3 bilhões de litros (SOUZA et al., 2012), segundo a Associação Brasileira de Bebidas (ABRABE), a cachaça é a segunda bebida alcoólica mais consumida no país, perdendo somente para a cerveja, e ocupa o terceiro lugar no ranking mundial, perdendo para a vodka e o soju (ABRABE, 2012). Devido as suas características sensoriais peculiares, a cachaça vem conquistando ainda mais mercados (DUARTE et al., 2011), o que tem aumentado a necessidade de expandir sua produção.

Durante o ciclo fermentativo da cachaça, que pode variar de 18 a 48 horas (PATARO et al., 2002; SILVA et al., 2009), as leveduras são submetidas a condições estressantes, como altas temperaturas e concentrações elevadas de etanol. Tais condições alteram a dinâmica biológica das leveduras em nível genético, proteico e metabólico, desregulando suas funções celulares. Quando sobrepostas, estas condições são ainda mais estressantes às leveduras, levando a uma baixa produção de etanol, assim como uma baixa graduação alcoólica após a destilação, refletindo diretamente no valor final da cachaça (VIANNA et al., 2008).

Desta forma, é desejável a obtenção de cepas de *S. cerevisiae* que, além das características específicas para a produção da cachaça, sejam superiores quanto à multitolerância às condições estressantes impostas durante o processo fermentativo (GALLARDO et al., 2011), pois potencializariam ainda mais a produção e o padrão de qualidade da bebida (SILVA et al., 2009).

As técnicas de Engenharia Genética apresentam grande potencial para a manipulação de genomas, visando a obtenção de fenótipos superiores, porque permitem adicionar, deletar ou silenciar regiões nos genomas dos microrganismos em questão. Entretanto, a complexidade dos mecanismos de estresse ligados principalmente ao etanol e a temperatura, que levam à inibição do desempenho das células de leveduras, fazem com que a utilização destas mesmas técnicas se torne limitada na obtenção de cepas superiores quanto à multitolerância ao etanol e temperatura, uma vez que, não apenas um, mas vários genes estão envolvidos na expressão dessas características (HU et al., 2007).

Por outro lado, técnicas da Engenharia Evolutiva têm sido utilizadas com sucesso na obtenção de cepas multitolerantes. A obtenção de cepas superiores tem sido realizada utilizando-se agentes mutagênicos químicos ou físicos e os mutantes obtidos são então submetidos a pressões seletivas, de acordo com a tolerância desejada (SHI, WANG e WANG, 2009; STANLEY et al., 2010).

Neste sentido, este trabalho teve como objetivo a obtenção de mutantes de *S. cerevisiae* com características superiores quanto a produção de etanol associada a multitolerância à temperatura e à concentração de etanol metabolizada, impostas no processo fermentativo da cachaça. Para isto, foram testadas as hipóteses de que: (i) mutantes são capazes de consumir mais açúcares redutores, (ii) são mais tolerantes às condições estressantes de temperaturas e (iii) são mais tolerantes às concentrações crescentes de etanol, do que a

linhagem parental-original, e (iv) mutantes são capazes de produzir mais etanol do que a linhagem parental.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Cachaça

A cachaça é uma bebida alcoólica com características sensoriais peculiares, produzida no Brasil (LIMA et al., 2007). Esta denominação típica e exclusiva desta bebida brasileira apresenta uma graduação alcoólica de 38-48% em volume, à temperatura de 20 °C, obtida pela destilação do mosto fermentado de cana-de-açúcar, podendo ser adicionada de sacarose em até 6 g/L (BRASIL, 2009).

A cachaça é a segunda bebida alcoólica mais consumida no Brasil, perdendo somente para a cerveja, ocupa a terceira posição no ranking mundial (ABRABE, 2012) e vem conquistando mais mercado, em razão dos esforços do setor produtivo, aliados a ações governamentais em diversos níveis. Seu consumo é quase 5 vezes maior do que o do whisky (348 milhões de litros) e da vodca (270 milhões de litros) (GOMES, 2004).

Segundo a Associação Brasileira de Bebidas (ABRABE), o Brasil atinge uma produção de aproximadamente 1,3 bilhões de litros anuais, sendo que cerca de 75% desse total são provenientes da fabricação industrial e 25% da produção artesanal (ABRABE, 2012). Embora a legislação não estabeleça uma distinção entre os produtos finais das destilarias industriais e dos alambiques artesanais, existem diferenças durante os dois processos de produção. A cachaça que apresenta açúcares em quantidade entre 6 e 30 g/L é denominada de cachaça adoçada. Já aquela que apresentar, no mínimo, 50% de aguardente de cana envelhecida por período não inferior a um ano, podendo ser adicionada de caramelo para a correção da cor, é denominada de cachaça envelhecida (BRASIL, 2009).

A cachaça produzida industrialmente é mais conhecida como caninha industrial e a artesanal como cachaça de alambique (BRASIL, 2007). Para a produção em larga escala, utilizam-se, muitas vezes, colunas de destilação e tonéis de aço inox, com teor alcoólico corrigido pela diluição com água, adição de açúcar (até 6 g/L) e produtos químicos como corantes (para diferenciar a tonalidade da cor), além de não se separar a parte nobre do destilado. Já no processo artesanal, a destilação é feita em alambiques de cobre, sem adição de açúcar ou produtos químicos, e a fermentação ocorre de forma natural (GOMES, 2004; BRASIL, 2007).

A produção da cachaça se dá por todas as regiões do país, mas São Paulo se destaca no setor como o maior produtor de cachaça industrial do país com 44% da produção nacional, seguido por Pernambuco com 12,1% e pelo Ceará com 12% (GOMES, 2004). Minas Gerais ocupa o quarto lugar no ranking nacional de produção de cachaça, com 8% da produção nacional de caninha industrial e cachaça artesanal. O Estado é especialista na produção da cachaça de alambique, sendo o maior produtor do país, com cerca de 8.466 alambiques cadastrados (BRASIL, 2007).

2.2 Produção da Cachaça

A fermentação espontânea do mosto de caldo de cana-de-açúcar é o principal passo na produção da cachaça, etapa em que a maioria dos compostos aromáticos são formados, originando o sabor característico da bebida (OLIVEIRA et al., 2005; DATO et al., 2005; BERNARDI et al., 2008). Este processo de fermentação alcoólica da cachaça é normalmente realizado por linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* (SCHWAN et al., 2001; BERNARDI et al., 2008; CAMPOS et al., 2010), com fenótipos importantes como o de floculação, que por serem capazes de sedimentar no meio sem o auxílio de um

suporte inerte, permanecem no interior das dornas, uma vez que normalmente não se emprega a centrifugação durante o processo de produção da bebida (CAMPOS et al., 2010). Além disso, as linhagens de *S. cerevisiae* não devem apresentar produção de sulfeto de hidrogênio (H₂S), mas devem produzir compostos aromáticos, além de bom rendimento de etanol (OLIVEIRA et al., 2008; SILVA et al., 2009).

Durante a produção da cachaça, o ciclo de fermentação normalmente é concluído em 24 horas, e durante este tempo as leveduras são submetidas a diferentes condições de estresse como: altas temperaturas e concentrações do etanol metabolizado (PATARO et al., 2000; PATARO et al., 2002; VIANNA et al., 2008).

Em leveduras, a principal rota metabólica envolvida na fermentação alcoólica é a via glicolítica (FIGURA 1), ou também conhecida como a sua forma mais comum, a via *Embden-Meyerhof-Parnas* (EMP), onde a cada molécula de glicose que é oxidada, duas moléculas de piruvato são produzidas (MADIGAN et al., 2011).

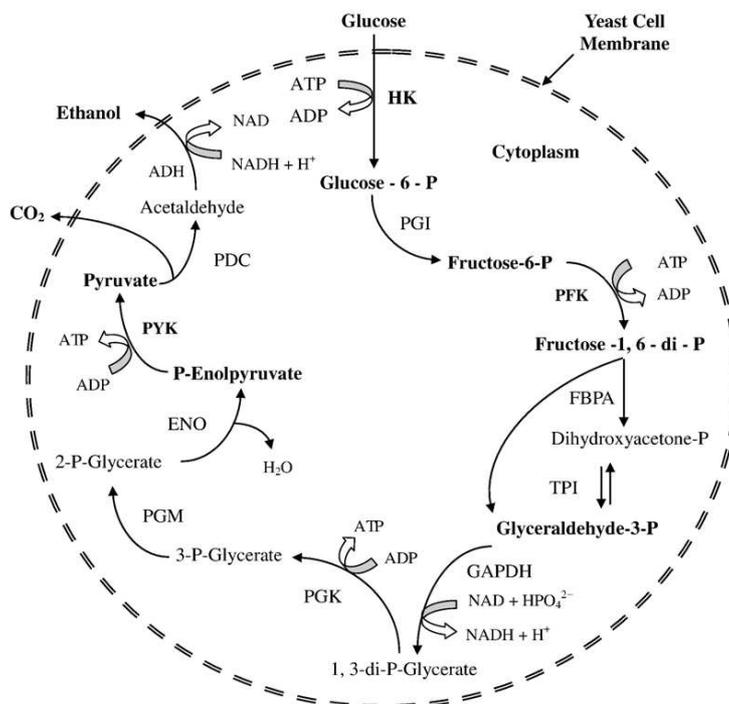


Figura 1 Rota metabólica de fermentação alcoólica em *Saccharomyces cerevisiae* (BAI, BASSO e MOO-YOUNG, 2008). (HK) Hexoquinase. (PGI) Fosfoglicoisomerase. (PFK) Fosfofrutoquinase. (FBPA) Frutose bifosfato aldolase. (TPI) Triose fosfato isomerase. (GAPDH) Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase. (PGK) Fosfoglicerato quinase. (PGM) Fosfogliceromutase. (ENO) Enolase. (PYK) Piruvato quinase. (PDC) Piruvato descarboxilase. (ADH) Álcool desidrogenase.

Em condições de anaerobiose, cada molécula de piruvato é posteriormente reduzida a uma molécula de etanol e uma de gás carbônico. Assim, teoricamente, o rendimento estequiométrico de etanol é de 0,511 g, e 0,489 g de gás carbônico em relação a 1 g de glicose metabolizada (BAI, ANDERSON e MOO-YOUNG, 2008).

Durante o processo fermentativo ocorre também a formação de produtos secundários, que são formados em menores quantidades. Dentre estes estão o glicerol, metanol, aldeídos, ácidos orgânicos, ésteres e álcoois superiores (LIMA

et al., 2009). Segundo o Regulamento de Avaliação da Conformidade da Cachaça, publicado pela Portaria 126/2005 do INMETRO (RAC), a soma destes produtos secundários é tolerável entre as concentrações de 0,20 e 0,65 g/100 mL de álcool anidro, sendo que o metanol e o ácido acético não devem ultrapassar concentrações de 0,25 e 0,15 mL/100 mL de álcool anidro, respectivamente (INMETRO, 2005).

A síntese destes subprodutos, bem como o crescimento celular, inevitavelmente direciona alguns intermediários glicolíticos para as suas correspondentes rotas metabólicas, diminuindo o rendimento final da produção de etanol (BAI, ANDERSON e MOO-YOUNG, 2008). Neste sentido, uma forma de aumentar a produção de etanol seria promover bateladas com altas concentrações de açúcares. Entretanto, estas condições acarretariam um estresse osmótico, levando à perda de viabilidade celular. Além disso, quanto maior é a concentração de etanol produzida maiores são as possibilidades de se atingirem concentrações tóxicas para as células, que inviabilizam o crescimento celular (BREISHA, 2010).

2.3 Condições Estressantes durante o Processo Fermentativo da Cachaça

Como citado anteriormente, durante o processo fermentativo da cachaça, as células de levedura são dinamicamente expostas a condições estressantes. Algumas tensões são ambientais, como deficiência de nutrientes, contaminação, altas temperaturas e concentrações osmóticas, enquanto outras são do próprio metabolismo celular da levedura, tais como a acumulação de etanol e a mudança de pH devido a acidez dos compostos sintetizados (BAI, ANDERSON e MOO-YOUNG, 2008).

Neste trabalho foi dada ênfase ao estresse causado às células de leveduras pelas tensões por acumulação do próprio etanol sintetizado e das altas temperaturas encontradas durante a produção da cachaça.

2.3.1 Estresse às Concentrações de Etanol

O etanol é um agente antizimótico para leveduras, pois inibe a ação enzimática e, conseqüentemente, o processo de fermentação. No que se refere ao crescimento, concentrações relativamente baixas de etanol não são capazes de afetar as células, mas em altas concentrações de etanol, as leveduras têm seu crescimento inibido inicialmente e, posteriormente, a exposição torna-se letal (WALKER, 1998). Por outro lado, o metabolismo glicolítico das leveduras é relativamente resistente aos efeitos inibitórios do etanol. *S. cerevisiae*, por exemplo, consegue resistir à desnaturação enzimática envolvida no metabolismo glicolítico, em concentrações abaixo de 13% de etanol no meio (JONES, 1990; WALKER, 1998). No entanto, se a levedura não apresentar tal resistência, ou a concentração ultrapassar os 13% de etanol no meio, enzimas-chave da via glicolítica, como a hexoquinase e a álcool desidrogenase, podem ser inativadas (BREISHA, 2010).

Ainda se tratando dos efeitos das concentrações de etanol sobre as células de leveduras, este é um dos principais estresses químicos que atuam sobre a membrana plasmática das leveduras (WHEALS et al., 1999; ALEXANDRE et al., 2001; MARTINI et al. 2006), influenciando na captação de nutrientes e no potencial de membrana, por diminuir a atividade da H⁺-ATPase da membrana plasmática (BREISHA, 2010).

Normalmente, a eficiência fermentativa de *S. cerevisiae* em temperaturas acima de 40 °C é muito baixa devido ao aumento da fluidez da membrana, à qual a levedura responde alterando a composição de ácidos graxos

presentes na membrana plasmática (WHEALS et al., 1999; HOHMANN, 2002; BREISHA, 2010; BASSO, BASSO e ROCHA, 2011).

2.3.2 Estresse Térmico

Os danos causados pelo estresse térmico às células de leveduras resultam principalmente em quebra de pontes de hidrogênio e interações hidrofóbicas. Estes eventos conduzem diretamente à desnaturação geral de proteínas e ácidos nucleicos. Como as leveduras não têm a capacidade de controlar a sua temperatura intracelular, quanto maior for a temperatura externa, maiores serão os danos às células (WALKER, 1998). No entanto, em resposta ao estresse térmico, as células de *S. cerevisiae* sintetizam proteínas do choque térmico (HSP), que são funcionalmente agrupadas em sete classes, incluindo chaperones moleculares e fatores de transcrição. Todas as HSP protegem as células contra desnaturação de proteínas, aumento da fluidez da membrana, e de danos ao citoesqueleto causados pelo estresse térmico. Para uma proteção adicional, as células de *S. cerevisiae* também produzem trealose, um dissacarídeo que protege as proteínas intracelulares de degeneração e agregação, alterando o ambiente de moléculas de água em torno das proteínas (RICHTER, HASLBECK e BUCHNER, 2010).

No caso da fermentação da cachaça, a temperatura inicial (28 a 32 °C) não prejudica as células de leveduras, por apresentar condição ótima para o crescimento celular. Entretanto, durante o processo de fermentação, a temperatura aumenta aproximadamente 8 °C acima da inicial, devido ao metabolismo e ao etanol produzido, fazendo com que a temperatura também se torne um fator estressante para as leveduras (SCHWAN et al., 2001).

Desta forma, considerando que a fermentação do mosto de caldo de cana-de-açúcar atinge temperaturas de 40 °C e termina com concentrações de 6 a

8% (v/v) de etanol no final de cada ciclo fermentativo (MORAIS et al., 1997; PATARO et al., 2000), leveduras que superem estes dois estresses simultaneamente, são consideradas multitolerantes.

2.4 Melhoramento Genético de Leveduras

Todos os países que estiveram presentes na Convenção das Nações Unidas sobre a Diversidade Biológica, realizada em 1992 no Rio de Janeiro, reconheceram a importância do estabelecimento de legislações específicas, que prevenissem ou reduzissem os riscos associados ao desenvolvimento, manipulação, transporte, utilização, transferência e liberação de organismos geneticamente modificados – OGM (BORÉM, 2001). Desta forma, no Brasil, a legislação vigente é regida pela Lei de Biossegurança nº11.105/2005, que redefiniu a Comissão Técnica Nacional de Biossegurança – CTNBio, no âmbito do Ministério da Ciência e Tecnologia, e criou o Conselho Nacional de Biossegurança – CNBS, vinculado à Presidência da República (BRASIL, 2005).

Por lei, OGM é qualquer organismo cujo material genético – DNA/RNA – tenha sido modificado por qualquer técnica de Engenharia Genética. No artigo 6º, inciso I, da Lei vigente, é proibida a implementação de projeto relativo à OGM sem a manutenção de registro de seu acompanhamento individual (BRASIL, 2005).

Além de toda a parte burocrática de se trabalhar com OGM, a falta de conhecimento e a complexidade dos mecanismos de estresse ligados principalmente ao etanol e temperatura, que levam à inibição do desempenho das células de leveduras, fazem com que a utilização da Engenharia Genética se torne limitada (HU et al., 2007).

Por outro lado, no artigo 4º, inciso I, da Lei vigente, é permitido um melhoramento genético através de mutagênese (BRASIL, 2005). Desta forma, a

Engenharia Evolutiva tem sido a mais utilizada para a obtenção de cepas melhoradas. Esta evolução é baseada nos princípios da seleção natural, segundo a qual, características variáveis oriundas de mutações aleatórias, acumuladas ao longo de gerações dentro de uma população, são selecionadas naturalmente. Mas, para haver uma seleção, estas características devem ser impreterivelmente favoráveis ao meio, e passadas aos descendentes (SAUER, 2001).

Neste sentido, a obtenção em laboratório de cepas tolerantes a condições de estresse pode ser feita através de agentes mutagênicos químicos ou físicos. As estirpes mutantes são então submetidas a pressões seletivas, como altas temperaturas e concentrações de etanol (SRIDHAR, KIRAN SREE e VENKATESWAR RAO, 2002; SHI, WANG e WANG, 2009; STANLEY et al., 2010). Johnston e Oberman (1979) induziram mutações com radiação ultravioleta (UV) e MNNG (N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine) e selecionaram cepas melhoradas de leveduras de panificação na Polônia e URSS. Sridhar, Kiran Sree e Venkateswar Rao (2002) conseguiram obter mutantes de *S. cerevisiae* multitermotolerantes a etanol e osmolaridade, a partir de irradiação com luz UV. Zarif e Azin (2011) utilizaram radiação UV e ácido nitroso como agentes mutagênicos e obtiveram mutantes capazes de produzir mais etanol do que a estirpe parental.

Portanto, considerando a literatura internacional, as técnicas de Engenharia Evolutiva podem ser aplicadas com sucesso também no Brasil para a obtenção de novas cepas de *S. cerevisiae* não apenas para a produção de etanol, mas também para a produção de cachaça.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Para a obtenção de leveduras mutantes utilizou-se a cepa *Saccharomyces cerevisiae* UFLA CA798 e a cepa UFLA CA11 como cepa referência. Estas cepas apresentam características favoráveis à produção de cachaça, tais como capacidade de floculação e não produção de sulfeto de hidrogênio (H₂S).

3.1 Curvas de Crescimento e Sobrevivência à Irradiação Ultravioleta

Para realização da curva de sobrevivência de *S. cerevisiae* UFLA CA798, sob diferentes intensidades de irradiação, realizou-se uma curva de crescimento para se determinar o período necessário de incubação das células para atingir a fase log de crescimento (10⁷ células/mL). Foi realizado o plaqueamento em superfície do ágar YEPG (1% de extrato de levedura, 2% de peptona, 2% de glicose, 1,5% de ágar), com ajuste do inóculo para a obtenção, após a irradiação, de 50 a 100 colônias, ou seja, de 5 a 10% de sobrevivência. As placas contendo o inóculo padronizado foram irradiadas em forno de hibridização (HL-2000 HybriLinker) nas intensidades de 9, 10 e 11 mJ/cm². Como controle, foram utilizadas placas sem irradiação. As placas foram incubadas a 28°C no escuro, por até 48h. O experimento foi realizado em triplicata.

3.2 Mutagênese Induzida por Meio de Radiação UV

Estabelecida a intensidade de irradiação UV (9 mJ/cm²) necessária para obtenção da sobrevivência desejada, a cepa original UFLA CA798 foi submetida a radiação UV para a obtenção de leveduras mutantes. Para isto, a cepa parental-original foi cultivada e irradiada nas mesmas condições nas que se realizou a curva de sobrevivência à radiação UV.

3.3 Consumo de Açúcares Redutores pelo Método de DNS

O *screening* das células irradiadas foi feito avaliando a taxa de consumo de açúcares redutores (AR), em comparação ao consumo de AR pelas cepas parental-original e comercial, utilizadas como cepas referência. Utilizou-se o método do Ácido Dinitrosalicílico (DNS) com curva padrão de glicose, descrito por Gonçalves et al. (2010).

3.4 Obtenção de Células Mutantes

O mutante que apresentou maior consumo de AR foi utilizado como parental para os novos ciclos e irradiação e obtenção de novos mutantes. As condições de cultivo e irradiação foram as mesmas descritas no item 3.2.

3.5 *Screening* dos Mutantes

3.5.1 Consumo de Açúcares Redutores pelo Método de DNS

O *screening* dos mutantes foi realizado pelo método de DNS descrito anteriormente, selecionando aqueles mutantes com taxa de consumo de açúcar igual ou superior às linhagens referência (UFLA CA798 e UFLA CA11) e o mutante selecionado como parental (M15). Os mutantes selecionados foram armazenados em freezer -20°C.

3.5.2 Multitolerância a Temperatura e Etanol

Tolerâncias a etanol e temperatura foram analisadas simultaneamente. As concentrações de 0, 5, 10 e 15% (v/v) de etanol foram avaliadas cultivando

os mutantes em caldo YEPG, com incubação de cada concentração a 28 e 37 °C, segundo metodologia adaptada de Breisha (2010). O experimento foi montado com sete repetições em microplacas, com leituras de absorbância a 620nm, nos tempos de 0 e 24 horas.

O crescimento e sobrevivência celular foram determinados pelo plaqueamento em ágar YEPG, por técnica de microgota, com incubação das placas a 28 °C por 24 horas.

3.5.3 Avaliação dos Mutantes Multitolerantes

Para selecionar os mutantes que apresentaram multitolerância superior à cepa parental-original, obteve-se primeiramente a taxa de crescimento em cada uma das amostras, subtraindo as absorbâncias de 24 horas das respectivas absorbâncias de 0 hora. Logo, foi feita análise de variância (teste F) e agrupamento das médias pelo teste de Scott-Knott, no software SISVAR 5.3 (Lavras, MG, Brasil).

3.5.4 Flocculação e Produção de H₂S

Os mutantes que apresentaram os melhores resultados nos testes de tolerâncias cruzadas foram submetidos aos testes de flocculação (espectrofotometria) e produção de sulfeto de hidrogênio (H₂S). A flocculação foi determinada de acordo com Valles et al. (2008). Para a detecção de mutantes não produtores de H₂S foi utilizada a metodologia descrita por Silva, Rosa e Oliveira (2006). Os dois experimentos foram conduzidos em quatro repetições.

3.6 Desempenho dos Mutantes Selecionados Frente ao Parental-Original

Os melhores mutantes anteriormente selecionados e as linhagens parental-original UFLA CA798 e a comercial UFLA CA11 foram submetidos à fermentação diretamente em mosto de caldo de cana. Todos os mutantes e as linhagens referência foram inoculados em frascos de 250 mL contendo 90 mL de caldo YEFG, com incubação por 24 horas a 28 °C, sem agitação. Após mensuração da absorbância a 620 nm, a suspensão celular foi ajustada para a obtenção de um inóculo com aproximadamente 10^8 células/mL (DUARTE et al. 2010). O inóculo foi utilizado em 100 mL de caldo de cana estéril a 16 °Brix, sendo incubado por 24 horas a 28 °C, sem agitação. O experimento foi realizado em duplicata.

Amostras foram coletadas no início e ao final (24 horas) da fermentação para determinar as concentrações de sacarose, glicose e frutose residuais, glicerol, metanol, ácido acético e etanol produzidos.

3.7 Análises Químicas

O conteúdo de açúcares (sacarose, glicose e frutose), ácido orgânico (ácido acético), glicerol, metanol e etanol foram quantificados por HPLC, de acordo com Duarte et al. (2009).

3.8 Avaliação das Taxas de Crescimento e Sobrevivência

O crescimento celular durante a fermentação foi determinado por contagem em placas contendo YEFG, e determinadas as UFC/mL nos tempos de 0 e 24 horas de fermentação. A taxa de crescimento da população neste trabalho refere-se à porcentagem de crescimento em relação ao inóculo inicial. Para isso

calculou-se a diferença da população no tempo de 24 horas, pela população no tempo de 0 hora.

3.9 Avaliação do Desempenho Fermentativo dos Mutantes

Para determinar o desempenho fermentativo dos mutantes, fatores de conversão foram usados para calcular a conversão dos substratos (sacarose, glicose e frutose) em etanol ($Y_{p/s}$), glicerol ($Y_{g/s}$), metanol ($Y_{m/s}$) e ácido acético ($Y_{ac/s}$), juntamente com a produtividade volumétrica de etanol (Q_p), e a eficiência de conversão (%) (E_f) (Duarte et al., 2010; Ramos et al., 2013). As equações utilizadas foram: $[Y_{p/s} = (P_f - P_i)/(S_i - S_f)]$; $[Y_{g/s} = (g_f - g_i)/(S_i - S_f)]$; $[Y_{m/s} = (m_f - m_i)/(S_i - S_f)]$; $[Y_{ac/s} = (A_{cf} - A_{ci})/(S_i - S_f)]$; $[Q_p = (P_f - P_i)/t_f]$; $[E_f = (Y_{p/s} / 0.51) \times 100]$.

Nestas equações, P_i é a concentração inicial de etanol e P_f a concentração no final da fermentação, o S_i é a concentração inicial de substrato e S_f a concentração no final da fermentação, g_i é a concentração de glicerol inicial e g_f a concentração no final da fermentação, m_i é a concentração de metanol inicial e m_f a concentração no final da fermentação, A_{ci} é a concentração de ácido acético inicial e A_{cf} a concentração de ácido acético no final da fermentação, e t_f é o tempo total de fermentação. Para calcular a concentração de substrato, o teor de sacarose foi convertido matematicamente aos valores correspondentes de frutose e glicose.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Obtenção de Mutantes

A fase log da linhagem parental UFLA CA798 inicia logo após 4h de incubação, perdurando por aproximadamente 9h de cultivo (APÊNDICE A). Durante a fase logarítmica de crescimento, os microrganismos são mais sensíveis aos agentes mutagênicos como a radiação ultravioleta (SRIDHAR, SREE e RAO, 2002). Nas células, a radiação UV é absorvida principalmente pelas moléculas de DNA, mas também pelas de RNA, proteínas, aminoácidos aromáticos, como a tirosina e o triptofano, levando a mutações aleatórias. Estas mutações, quando não deletérias, podem proporcionar adaptações a ambientes antes intoleráveis (SRIDHAR, SREE e RAO, 2002). Neste sentido, trabalhou-se com a intensidade de 9 mJ/cm^2 de irradiação UV, capaz de eliminar 90,8% das células sensíveis a luz UV, permitindo que as sobreviventes fossem viáveis, efetuando suas atividades biológicas (APÊNDICES B e C).

4.2 *Screening* dos Mutantes

Na primeira irradiação UV, dentre 20 mutantes sobreviventes, foi selecionado o mutante M15, capaz de consumir 45,1% a mais de AR que a cepa parental-original (APÊNDICE D). Esse mutante foi utilizado como parental na obtenção de novos mutantes. Na segunda irradiação foram analisadas 407 isolados sobreviventes, dentre os quais foram selecionados 42 mutantes capazes de consumir mais AR do que as linhagens referência (APÊNDICE E.A, B, C, D, E, F, G e H).

4.3 Mutantes Multitolerantes

Dos mutantes analisados, 13 foram selecionados por serem mais tolerantes a temperaturas e concentrações de etanol, apresentando crescimento maior ou igual às linhagens referência (Tabela 1).

Tabela 1 Análise de tolerância a temperaturas e concentrações de etanol dos melhores mutantes consumidores de AR.

Mutante/linhagem	28°C		37°C	
	10%	15%	10%	15%
UFLA CA798	1.097871 (b)	1.053457 (g)	0.581057 (d)	0.287986 (b)
UFLA CA11	0.986371 (a)	0.968400 (g)	0.795386 (e)	0.778686 (d)
M15	0.941671 (a)	0.000000 (a)	0.007157 (a)	0.000000 (a)
M15.3	0.924286 (a)	0.007043 (a)	0.000000 (a)	0.001043 (a)
M15.13	1.275957 (d)	1.041829 (g)	0.522800 (d)	0.708400 (d)
M15.36	1.073271 (b)	1.008671 (g)	0.259514 (c)	0.322343 (b)
M15.41	1.353929 (d)	0.978471 (g)	0.198571 (b)	0.005214 (a)
M15.46	1.220000 (c)	0.143229 (b)	0.041729 (a)	0.000000 (a)
M15.47	1.031671 (b)	1.047286 (g)	0.085529 (a)	0.124371 (a)
M15.58	0.929157 (a)	0.114571 (b)	0.002314 (a)	0.000000 (a)
M15.64	1.110971 (b)	0.988086 (g)	0.185171 (b)	0.000000 (a)
M15.102	0.971843 (a)	0.500943 (d)	0.028400 (a)	0.000000 (a)
M15.106	0.861314 (a)	0.089214 (b)	0.000000 (a)	0.000000 (a)
M15.137	0.951986 (a)	0.338286 (c)	0.030314 (a)	0.000000 (a)
M15.147	0.922771 (a)	0.393586 (c)	0.079329 (a)	0.000000 (a)
M15.152	1.072986 (b)	1.058300 (g)	0.292514 (c)	0.332671 (b)
M15.160	0.980386 (a)	0.892857 (f)	0.334886 (c)	0.620857 (c)
M15.317	1.335771 (d)	1.013371 (g)	0.440257 (c)	0.010700 (a)
M15.321	1.069829 (b)	0.085157 (b)	0.065129 (a)	0.000000 (a)
M15.322	1.336071 (d)	0.667557 a5	0.245571 (c)	0.002229 (a)
M15.325	1.109414 (b)	0.876429 (f)	0.134714 (b)	0.000000 (a)
M15.326	1.147543 (b)	0.650686 (e)	0.280914 (c)	0.000000 (a)
M15.328	1.074814 (b)	0.443686 (d)	0.131057 (b)	0.000000 (a)
M15.335	0.954814 (a)	0.015600 (a)	0.000000 (a)	0.000000 (a)

“Tabela 1, conclusão”

M15.336	0.910386 (a)	0.223929 (b)	0.026800 (a)	0.000000 (a)
M15.338	1.136443 (b)	0.146086 (b)	0.013986 (a)	0.000000 (a)
M15.339	0.933643 (a)	0.038200 (a)	0.000000 (a)	0.000000 (a)
M15.341	1.064157 (b)	0.862857 (f)	0.209457 (b)	0.513829 (c)
M15.344	0.915943 (a)	0.929071 (g)	0.284329 (c)	0.655471 (d)
M15.348	1.024057 (b)	0.082386 (b)	0.000200 (a)	0.000000 (a)
M15.349	1.028686 (b)	0.887500 (f)	0.178686 (b)	0.006100 (a)
M15.350	1.558471 (e)	1.029571 (g)	0.070571 (a)	0.005571 (a)
M15.356	1.112743 (b)	0.734300 (e)	0.000000 (a)	0.000000 (a)
M15.357	1.034871 (b)	0.795343 (f)	0.059814 (a)	0.000000 (a)
M15.363	0.847214 (a)	0.693600 (e)	0.001886 (a)	0.000000 (a)
M15.372	0.915000 (a)	0.000000 (a)	0.005714 (a)	0.000000 (a)
M15.375	1.097500 (b)	0.117257 (b)	0.000886 (a)	0.095243 (a)
M15.378	0.992057 (a)	0.090514 (b)	0.000000 (a)	0.000000 (a)
M15.380	0.852329 (a)	0.185014 (b)	0.000000 (a)	0.000000 (a)
M15.381	1.186814 (c)	0.343771 (c)	0.083971 (a)	0.000000 (a)
M15.390	1.021029 (b)	0.883743 (f)	0.105157 (b)	0.000000 (a)
M15.391	1.050257 (b)	1.099671 (g)	0.068243 (a)	0.020957 (a)
M15.396	0.882400 (a)	0.512886 (d)	0.005271 (a)	0.000000 (a)
M15.404	1.132171 (b)	0.869471 (f)	0.070686 (a)	0.000000 (a)
M15.406	1.159657 (b)	0.813000 (f)	0.239643 (c)	0.000029 (a)

Valores em negrito correspondem aos mutantes que apresentaram crescimento maior ou igual às linhagens referência. Os valores médios dentro da mesma coluna seguidos por letras diferentes entre parênteses diferem significativamente ($p < 0,05$) pelo teste de Scott-Knott.

Dos treze mutantes selecionados, sete foram multitolerantes (M15.13, M15.41, M15.152, M15.317, M15.344, M15.350 e M15.391) (Tabela 2), pois quando submetidos ao estresse cruzado de temperatura a 37 °C e concentração de 15% de etanol, mantiveram um crescimento igual aos tratamentos-controle de 28 °C e 37 °C / 0%. Neste aspecto, as cepas UFLA CA798 e UFLA CA11 não são consideradas multitolerantes, pois ambas não toleraram as mesmas condições de estresse cruzado.

Estes resultados mostraram que os 7 mutantes foram capazes de se adaptar às condições estressantes às quais foram submetidos. Além disso, todos esses mutantes apresentaram resultado negativo para produção de H₂S, a qual é também uma das características desejadas. Por outro lado, os mutantes M15.41 e M15.391 perderam a capacidade de flocular, o que os tornaram impróprios para o processo fermentativo da cachaça (Tabela 3).

Tabela 2 Mutantes multitolerantes ao estresse cruzado de etanol (0 a 15%) e temperatura (28 e 37° C). A concentração celular foi definida como o Log da população (UFC/mL). Em negrito estão os mutantes selecionados.

Leveduras	28°C				37°C			
	Log ^a				Log ^a			
	0%	5%	10%	15%	0%	5%	10%	15%
UFLA CA798	9.38	9.38	7.44	4.74	9.56	8.50	4.88	0.00
UFLA CA11	7.45	7.27	5.06	0.72	6.85	6.58	2.10	0.00
M15	8.33	8.37	6.21	2.87	8.15	7.80	4.17	1.03
M15.13	9.49	9.59	9.46	9.68	9.42	5.67	7.13	8.77
M15.41	9.43	9.45	9.29	9.41	9.18	8.81	8.77	8.76
M15.152	9.47	9.54	9.28	9.39	9.28	5.39	8.77	8.31
M15.317	9.39	9.44	9.29	9.41	9.18	9.34	8.44	9.18
M15.344	7.19	7.47	8.98	9.02	7.01	8.52	7.13	7.24
M15.350	9.51	9.54	9.46	9.40	9.21	9.21	9.10	9.31
M15.391	9.31	9.46	9.55	9.00	6.27	9.01	9.33	9.38

Tabela 3 Classificação da capacidade de flocculação dos mutantes tolerantes. O valor de flocculação média é definido como a razão entre a densidade óptica a 620 nm da suspensão no momento da adição do tampão Helm (OD_0) e da obtida após 10 minutos que o tampão foi adicionado (OD_{10}) (Equação: $OD_{10}/OD_0 \times 100$). Escala do grau de flocculação: razão > 90% indica não flocculante (0); razão entre 70% e 90% indica baixa flocculação (1); razão entre 30% e 70% indica média flocculação (2), e razão < 30% indica alta flocculação (3).

Levedura	Flocculação média	Grau de Flocculação
UFLA CA798	20.86	3
UFLA CA11	19.32	3
M15	19.12	3
M15.13	83.31	1
M15.41	92.47	0
M15.152	78.86	1
M15.317	76.02	1
M15.344	22.00	3
M15.350	51.29	2
M15.391	22.93	0

O mutante M15.344 apresentou o maior nível de flocculação dentre os multitolerantes, porém, a densidade populacional nos tratamentos controles estudados sem adição de etanol foi apenas dez vezes maior (10^7) que a utilizada como inóculo (10^6) (Tabela 2). Para que a levedura seja competitiva, e obtenha sucesso durante o ciclo fermentativo da cachaça, é necessário primeiramente assegurar o crescimento celular antes de iniciar e aumentar a produção de etanol (PATARO et al., 2002).

Como a concentração de etanol no final de cada ciclo fermentativo termina em média com 6 a 8% (v/v) de etanol, os mutantes M15.13 e M15.152, mesmo apresentando uma densidade de sobrevivência alta na temperatura de 28 °C, não toleraram a concentração de 5% a 37 °C. Neste sentido, mesmo sendo multitolerantes, estes não se tornaram interessantes ao processo fermentativo da bebida, pelo fato de a concentração de etanol no meio, ter um aumento gradual durante o ciclo fermentativo.

Os mutantes M15.317 e M15.350 foram selecionados para serem testados em fermentação com caldo de cana, por apresentarem uma sobrevivência constante em todas as concentrações de etanol e temperaturas estudadas.

4.4 Desempenho Fermentativo, Crescimento e Sobrevivência

Não houve diferença significativa no desempenho fermentativo entre os mutantes M15.317 e M15.350, e as linhagens UFLA CA798 e UFLA CA11, ($p < 0,05$) pelo teste de Scott-Knott (Tabela 4). Mesmo não havendo diferença significativa, e todos serem capazes de converter açúcares em grandes proporções de etanol, o mutante M15.317 exibiu a maior produção de etanol (67,4 g/L) e, conseqüentemente, a maior produtividade volumétrica ($Q_p = 2,81$ g/L por hora). Souza et al. (2012) utilizaram trifluor-D,L- leucina (TLF) como agente mutagênico para obter cepas mutantes fermentadoras de cachaça, com qualidades sensoriais superiores, e encontraram o valor máximo de 37,1 g/L de produção de etanol. Este valor foi menor do que os obtidos pelos mutantes deste trabalho (Figura 2).

Tabela 4 Parâmetros fermentativos, crescimento e sobrevivência das leveduras após fermentação em caldo de cana. Os valores apresentados correspondem às médias dos tratamentos realizados em duplicata. Os fatores de conversão dos substratos (sacarose, glicose e frutose) em etanol (Yp/s), glicerol (Yg/s), metanol (Ym/s) e ácido acético (Yac/s) foram calculados, juntamente com a produtividade volumétrica de etanol (Qp), a eficiência de conversão (%) (Ef). (Log) Log das células sobreviventes. (%) Porcentagem de crescimento.

Levedura	Yp/s	Qp	Yg/s	Ym/s	Yac/s	Ef %	Log	%
UFLA CA11	0.29 ± 0.04 (a)	1.9 ± 0.06 (a)	0.022 ± 0.00 (a)	0.002 ± 0.000 (a)	0.001 ± 0.000 (a)	56.88 ± 8.99 (a)	8.63 ± 0.04 (a)	24.52 (a)
UFLA CA798	0.29 ± 0.00 (a)	2.37 ± 0.68 (a)	0.023 ± 0.00 (a)	0.003 ± 0.001 (a)	0.000 ± 0.000 (a)	57.17 ± 0.27 (a)	8.52 ± 0.04 (a)	28.69 (a)
M15.350	0.27 ± 0.03 (a)	2.39 ± 0.55 (a)	0.020 ± 0.00 (a)	0.004 ± 0.000 (a)	0.001 ± 0.000 (a)	53.70 ± 6.07 (a)	8.55 ± 0.04 (a)	146.19 (b)
M15.317	0.27 ± 0.00 (a)	2.81 ± 0.04 (a)	0.020 ± 0.00 (a)	0.003 ± 0.000 (a)	0.000 ± 0.000 (a)	53.59 ± 0.38 (a)	8.42 ± 0.04 (a)	12.98 (a)

Os valores médios dentro da mesma coluna seguidos por letras diferentes entre parênteses diferem significativamente ($p < 0,05$) pelo teste de Scott-Knott.

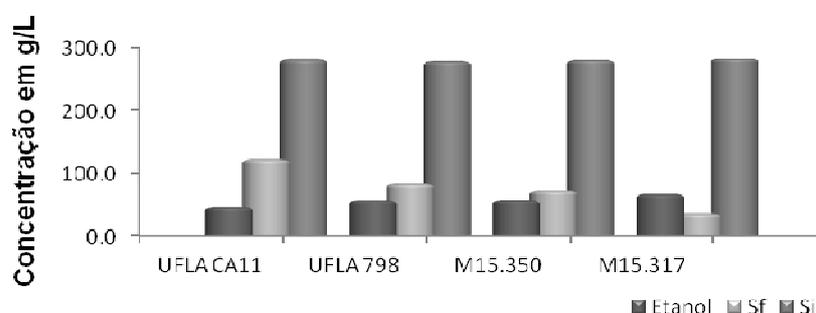


Figura 2 Conteúdo em g/L de açúcares e etanol analisados em HPLC. (Si) Média da concentração inicial de substrato (sacarose, glicose e frutose) em g/L. (Sf) Média da concentração final de substrato em g/L. Média do etanol produzido durante a fermentação de 24 horas.

Os parâmetros de conversão de substratos em produtos secundários foram baixos para todas as leveduras. Sabe-se que o metabolismo do glicerol está ligado ao crescimento das leveduras em resposta a condições de estresse osmótico (WALKER, 1998; WANG et al., 2001). O glicerol é sintetizado no início do processo fermentativo, através da fermentação glicero-pirúvica, em função da necessidade de assegurar a reoxidação da coenzima NADH^+/H^+ , reduzindo dihidroxiacetona em glicerol (RAMOS et al., 2013). Os baixos níveis de glicerol encontrados neste trabalho podem ser associados a um metabolismo fermentativo ativo, com um desempenho tolerante ao estresse submetido.

A densidade populacional de células sobreviventes, também foi semelhante para todas as quatro leveduras. Porém, o mutante M15.350 apresentou a melhor taxa de crescimento (146,19 %) durante as 24 horas de fermentação. Isso significa que este mutante foi capaz de usar os carboidratos para converter parte em etanol (57,30 g/L) e parte em biomassa (8,55 log UFC/mL), havendo um equilíbrio entre esses parâmetros.

5 CONCLUSÕES

Com base nos resultados deste trabalho, a mutagênese induzida por radiação UV foi eficiente na obtenção dos mutantes M15.13, M15.41, M15.152, M15.317, M15.344, M15.350 e M15.391 de *S. cerevisiae*, com características superiores quanto a multitolerância à temperatura de 37 °C e à concentração de 15% (v/v) de etanol.

Desta forma, mutantes foram selecionados com características de consumo de AR e de multitolerância superiores, aceitando assim nossas primeiras hipóteses. No entanto, a obtenção de mutantes capazes de produzir mais etanol do que a cepa parental-original não foi alcançada, pois não houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre estes.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir deste estudo, novas pesquisas poderão ser realizadas com o objetivo de se obter uma linhagem de levedura comercial com características multitolerantes e maior produção de etanol. Estes estudos poderão ser realizados utilizando técnicas clássicas de melhoramento, como cruzamento e fusão de protoplastos, as quais podem permitir a agregação de características genéticas pontuais aos mutantes obtidos anteriormente.

REFERÊNCIAS

ABRABE. (2012). Associação Brasileira de Bebidas. Disponível em: <<http://www.abrabe.org.br>>. Acesso em: 23 nov. 2012.

ALENCAR E.M.B.; SOUZA-MOTTA, C.M.; WALTER, B.S.; SANTOS, R.M.P.; MARQUES, O.M.; QUEIROZ, L.A. (2009). Fermentation Capacity of *Saccharomyces cerevisiae* Cultures. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Vol.52, n. 4: pp.819-824.

ALEXANDRE, H.; ANSANAY-GALEOTE, V.; DEQUIN, S.; BLONDIN, B. (2001). Global gene expression during short-term ethanol stress in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEBS Letters** 498(1): 98-103.

AMORIM, H.V. (2006). Ethanol production in Brazil: a successful history. Proceedings of the Sugar Processing Research Conference 1:44-47.

BAI, F.W.; ANDERSON, W.A.; MOO-YOUNG, M. (2008). Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks. **Biotechnol Adv**, v.26, n°1, p. 89-105.

BASSO, L.C.; BASSO, T.O.; ROCHA, S.N. (2011). Ethanol Production in Brazil: The Industrial Process and Its Impact on Yeast Fermentation. In: BERNARDES, M.A.S. (Ed.) **Biofuel Production-Recent Developments and Prospects**. p.85-101.

BERNARDI, T.L., PEREIRA, G.V.M., CARDOSO, P.G., DIAS, E.S.; SCHWAN, R.F. (2008). *Saccharomyces cerevisiae* strains associated with the production of cachaça: identification and characterization by traditional and molecular methods (PCR, PFGE and mtDNA-RFLP). **World. J. Microbiol. Biotechnol.** 24, 2705-2712.

BORÉM, A. (2001). **Escape gênico & Transgênicos**. Rio Branco: Editora Suprema. p. 204.

BRASIL. (2005). Decreto nº11.105 do Ministério da Saúde, de 24 de março, de 2005. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Brasília, DF: Congresso Nacional.

BRASIL. (2007). Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. BUAINAIN, A.M.; BATALHA, M. O. (Coord.) PAUTILLO, L.F.; MELLO, F.O.T. Cadeia produtiva da agroenergia. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Brasília: MAPA/SPA, vol. 3, 112p, 2007.

BRASIL. (2009). Decreto nº 6.871, de 4 de junho de 2009. Presidência da República. Casa Civil. Regulamenta a Lei nº8.918, de 14 de julho de 1994, que dispõe sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas.

BREISHA, G.Z. (2010) Production of 16% ethanol from 35% sucrose. **Biomass and Bioenergy**, 34, p. 1243e1249.

CAMPOS, C.R.; SILVA, C.F.; DIAS, D.R.; BASSO, L.C.; AMORIN, H.V.; SCHWAN, R.F. (2010) Features of *Saccharomyces cerevisiae* as a culture starter for the production of the distilled sugar cane beverage cachaça in Brazil. **J Appl Microbiol**, 108:1871–1879.

DATO, M.C.F.; PIZAURO, J.M.Jr, MUTTON, M.J.R. (2005) Analysis of the secondary compounds produced by *Saccharomyces cerevisiae* and wild yeast strains during the production of “cachaça”. **Braz. J. Microbiol.** 36:70-74.

DUARTE, W.F.; DE SOUSA, M.V.F.; DIAS, D.R.; SCHWAN, R.F. (2011) Effect of co-inoculation of *Saccharomyces cerevisiae* and *Lactobacillus fermentum* on the quality of the distilled sugar cane beverage cachaça. **J Food Sci**,76:C1307–C1318.

DUARTE, W.F.; DIAS, D.R.; PEREIRA, G.V.M.; GERVASIO, I.M.; SCHWAN, R.F. (2009) Indigenous and inoculated yeast fermentation of gabioba (*Campomanesia pubescens*) pulp for fruit wine production. **J Ind Microbiol Biotechnol**, 36, 557–569.

DUARTE, W.F.; DRAGONE, G.; DIAS, D.R.; OLIVEIRA, J.M.; TEIXEIRA, J.A.; SILVA, J.B.A.; SCHWAN, R.F. (2010) Fermentative behavior of *Saccharomyces* strains during microvinification of raspberry juice (*Rubus idaeus* L.). **Int J Food Microbiol**, 143:173–182.

GALLARDO, J.C.M.; SOUZA, C.S.; CICALLELLI, R.M.B.; OLIVEIRA, K.F.; MORAIS, M.R.; LALUCE, C. (2011). Enrichment of a continuous culture of *Saccharomyces cerevisiae* with the yeast *Issatchenkia orientalis* in the production of ethanol at increasing temperatures. **J Ind Microbiol Biotechnol**, 38:405–414.

GOMES, W.O. (2004). Perfil da Cachaça. Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas – SEBRAE.

GONÇALVES, C.; RODRIGUEZ-JASSO, R.M.; GOMES, N.; TEIXEIRA, J.A.; BELO, I. (2010). Adaptation of dinitrosalicylic acid method to microtiter plates. **Analytical Methods**, 2, 2046–2048.

GUERRA, J.B.; ARAÚJO, R.A.C.; PATARO, C.; FRANCO, G.R.; MOREIRA, E.S.A.; MENDONÇA-HAGLER, L.C.; ROSA, C.A. (2001). Genetic diversity of *Saccharomyces cerevisiae* strains during the 24 h fermentative cycle for the production of the artisanal Brazilian cachaça. **Letters in Applied Microbiology**. v.33, 106-111.

HOHMANN, S. (2002) Osmotic stress signaling and osmoadaptation in yeasts. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.** 66:300-372.

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

INMETRO. (2005). Portaria n.º 126, de 2005. Aprova o Regulamento de avaliação da conformidade da cachaça. DOU, Brasília. Diário Oficial da República federativa do Brasil. Disponível em: <www.inmetro.gov.br>. Acesso em 05 ago. 2005

JOHNSTON, J.R.; OBERMAN, H. (1979). Yeast genetics in industry. In: BULL, M.J. (Ed.) Progress in industrial microbiology. Elsevier, Amsterdam, v.15, pp.151-205.

JONES, R.P. (1990). Roles for replicative inactivation in yeast ethanol fermentations. **Crit. Rev. Biotechnol.** 10, 205-222.

LIMA, A.J.B.; CARDOSO, M.G.; GUIMARÃES, L.G.L.; LIMA, J.M.; NELSON, D.L. (2009). Efeito de substâncias empregadas para remoção de cobre sobre o teor de compostos secundários da cachaça. **Química Nova**, v.32, n°4, p. 845-848.

LIMA, J.R.; BRUNO, L.M.; SILVA, J.L.A.; CASIMIRO, A.R.S. (2007). Potencial de utilização de leveduras “killer” para produção de cachaça. **Revista de Ciências Agrárias**, Fortaleza, v.38, n.4, p.366-371.

MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; STAHL, D.; CLARK, D.P. (2011). Biology of Microorganisms. 13th ed., **Person Education**.

MARTINI, S.; RICCI, M.; BARTOLINI, F.; BONECHI, C.; BRACONI, D.; MILLUCCI, L.; SANTUCCI, A.; ROSSI, C. (2006). Metabolic response to exogenous ethanol in yeast: an in vivo NMR and mathematical modeling approach. **Biophysical Chemistry**. v.120, 135-142.

MORAIS, P.B., ROSA, C.A., LINARDI, V.R., PATARO, C.; MAIA, A.B.R.A. (1997). Characterization and succession of yeast populations associated with spontaneous fermentations during the production of the Brazilian sugar-cane. Aguardente. **World Journal of Microbiology and Biotechnology** 13, 241-243.

OLIVEIRA, E.S.; CARDELLO, H.M.A.B.; JERONIMO, E.M.; SOUZA, E.L.R.; SERRA, G.E. (2005). The influence of different yeasts on the fermentation, composition and sensory quality of cachaça. **World J Microbiol Biotechnol** 21:707-715.

OLIVEIRA, V.A.; VICENTE, M.A.; FIETTO, L.G.; CASTRO, I.M.; COUTRIM, M.X.; SCHÜLLER, D.; ALVES, H.; CASAL, M.; SANTOS, J.O.; ARAÚJO, L.D.; SILVA, P.H.A.; BRANDÃO, R.L. (2008). Biochemical and Molecular Characterization of *Saccharomyces cerevisiae* Strains Obtained from Sugar-Cane Juice Fermentations and Their Impact in Cachaça Production. **Applied and Environmental Microbiology**, p. 693-701.

PATARO, C.; GUERRA, J.B.; GOMES, F.C.O.; NEVES, M.J.; PIMENTEL, P.F.; ROSA, C.A. (2002). Trehalose accumulation, invertase activity and physiological characteristics of yeasts isolated from 24 h fermentative cycles during the production of artisanal Brazilian cachaça. **Braz. J. Microbiol.** 33:202-208.

PATARO, C.; GUERRA, J.B.; PETRILLO-PEIXOTO, M.L.; MENDONÇA-HAGLER, L.C.; LINARDI, V.R.; ROSA, C.A. (2000). Yeast communities and genetic polymorphism of *Saccharomyces cerevisiae* strains associated with artisanal fermentation in Brazil. **Journal of Applied Microbiology** 89, 24-31.

RAMOS, C.L.; DUARTE, W.F.; FREIRE, A.L.; DIAS, D.R.; ELEUTHERIO, E.C.A.; SCHWAN, R.F. (2013). Evaluation of stress tolerance and fermentative behavior of indigenous *Saccharomyces cerevisiae*. **Brazilian Journal of Microbiology**, (AHEAD), 0-0.

SAUER, U. (2001). Evolutionary engineering of industrially important microbial phenotypes. **Adv Biochem Eng Biotechnol.** 73:129-69.

SCHWAN, R.F.; MENDONÇA, A.T.; SILVA Jr, J.J.; RODRIGUES, V.; WHEALS, A.E. (2001). Microbiology and physiology of cachaça (Aguardente) fermentations. **Antonie Van Leeuwenhoek** 79:89-96.

SHI, D.J.; WANG, C.L.; WANG, K.M. (2009). Genome shuffling to improve thermotolerance, ethanol tolerance and ethanol productivity of *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.** 36(1):139-147.

SILVA, C.L.C.; ROSA, C.A.; OLIVEIRA, E.S. (2006). Studies on the kinetic parameters for alcoholic fermentation by flocculent *Saccharomyces cerevisiae* strains and non-hydrogen sulfide-producing strains. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, 22: 857–863.

SILVA, C.L.C.; VIANNA, C.R.; CADETE, R.M.; SANTOS, R.O.; GOMES, F.C.O.; OLIVEIRA, E.S.; ROSA, C.A. (2009). Selection, growth, and chemosensory evaluation of flocculent starter culture strains of *Saccharomyces cerevisiae* in the large-scale production of traditional Brazilian cachaça. **International Journal of Food Microbiology**, 131, p. 203–210.

SOUZA, A.P.; VICENTE, M.D.E.A.; KLEIN, R.C.; FIETTO, L.G.; COUTRIM, M.X.; AFONSO, R.J.C.F.; ARAÚJO, L.D.; SILVA, P.H.; BOUILLET, L.E.; CASTRO, I.M.; BRANDÃO, R.L. (2012). Strategies to select yeast starters cultures for production of flavor compounds in cachaça fermentations. **Antonie van Leeuwenhoek**, 101:379–392.

SRIDHAR, M.; KIRAN SREE, N.; VENKATESWAR RAO, L. (2002). Effect of UV radiation on thermotolerance, ethanol tolerance and osmotolerance of *Saccharomyces cerevisiae* VS1 and VS3 strains. **Bioresource Technology** 83, 199-202.

STANLEY, D.;FRASER, S.;CHAMBERS, P.J.; ROGERS, P.;STANLEY, G.A. (2010). Generation and characterisation of stable ethanol-tolerant mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.** 37:139-149.

VALLES, B.S.; BEDRIÑANA, R.P.; QUEIPO, A.L.; ALONSO; J.J.M. (2008) Screening of cider yeasts for sparkling cider production (Champenoise method). **Food Microbiol**, 25:690-697.

VIANNA, C.R.; SILVA, C.L.C.; NEVES, M.J.; ROSA, C.A. (2008). *Saccharomyces cerevisiae* strains from traditional fermentations of Brazilian cachaça: trehalose metabolism, heat and ethanol resistance. **Antonie Van Leeuwenhoek**, 93:205-217.

WALKER, G.M. (1998). **Yeast Physiology and Biotechnology**. John Wiley and Sons Ltd, England. pp.362.

WANG, Z.; ZHUGE, J.; FANG, H.; PRIOR, B. A. (2001). Glycerol production by microbial fermentation: A review. **Biotechnology Advances** ,v.19, Issue 3, p. 201–223.

WHEALS, A.E.; BASSO, L.C.; ALVES, D.M.G.; AMORIM, H.V. (1999). Fuel ethanol after 25 years. **Trends in Biotechnology**, v.17, p. 482-487.

ZARIF, B.R.; AZIN, M. (2011). Increasing the bioethanol yield in the presence of furfural via mutation of a native strain of *Saccharomyces cerevisiae*. **African Journal of Microbiology Research**, v.5(6) pp. 651-656.

RICHTER, K.; HASLBECK, M.; BUCHNER, J. (2010). The Heat Shock Response: Life on the Verge of Death. **Molecular Cell**, v.40(2) pp. 253-266.