

AMANDA FERNANDES BRITO

**RESPOSTA AO ESTRESSE POR ETANOL EM
Kluyveromyces marxianus CCT 7735: UMA ANÁLISE DA EXPRESSÃO
GÊNICA E DO PERFIL METABÓLICO**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Microbiologia Agrícola, para
obtenção do título de Magister
Scientiae.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2015

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da
Universidade Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

B862r
2015 Brito, Amanda Fernandes, 1986-
Resposta ao estresse por etanol em *Kluyveromyces marxianus* CCT 7735 : uma análise da expressão gênica e do perfil metabólico / Amanda Fernandes Brito. - VIÇOSA, MG, 2015.
viii, 44f. : il. ; 29 cm.

Orientador : Wendel Batista da Silveira.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Leveduras (Fungos). 2. Leveduras (Fungos) - Metabolismo. 3. Leveduras (Fungos) - Genética. 4. *Kluyveromyces marxianus*. 5. Biocombustíveis. 6. Etanol. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Microbiologia. Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola. II. Título.

CDD 22. ed. 579.562

AMANDA FERNANDES BRITO

**RESPOSTA AO ESTRESSE POR ETANOL EM
Kluyveromyces marxianus CCT 7735: UMA ANÁLISE DA EXPRESSÃO
GÊNICA E DO PERFIL METABÓLICO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de Magister Scientiae.

APROVADA: 15 de outubro de 2015.

Luciano Gomes Fietto

Moyses Nascimento

Denise Mara Soares Bazzolli
(Orientadora)

A Deus, por ser infinito com seu amor,
graça e presença constante em minha vida
e por me ajudar a vencer
mais esta etapa.

Ofereço

À minha mãe Maria, por tanta dedicação, orações, preocupações, ensinamentos, amor, presença constante e inestimável durante toda a minha vida.

Aos meus avós José e Raimunda, pelos ensinamentos e por serem meus segundos pais e pelo exemplo de vida.

Ao meu marido Cláudio, pela cumplicidade, pelo companheirismo, amor, pela paciência e por ter colocado um sentido mais que especial em minha vida – Desculpa pela minha ausência. Amo você!

À Gabriela, meu maior presente!

Aos meus irmãos Gláucia e Felipe, pela força e ajuda diária, por nunca ter-me deixado desistir, por me entender e apoiar; e à minha prima Elsa, pelo incentivo.

À minha maravilhosa família, pelo apoio, pela torcida, pelas orações e pela força.

Dedico

AGRADECIMENTOS

A **DEUS**, pela saúde, pelo conforto e por ter colocado pessoas tão especiais ao meu lado.

À Universidade Federal de Viçosa (UFV) e ao Departamento de Microbiologia, ao CNPq, à FAPEMIG e à CAPES, pela oportunidade de realização do Mestrado.

Ao meu orientador Professor Wendel Batista da Silveira, pela dedicação, pelos ensinamentos e pelo crescimento pessoal e profissional.

À minha coorientadora Professora Denise Mara Soares Bazzolli, pelo acolhimento no Laboratório de Genética Molecular de Micro-organismos e pelos seus ensinamentos.

Aos professores e pesquisadores Luciano Gomes Fietto e Moyses Nascimento, pela participação na banca de defesa e pelas sugestões.

À Professora Flávia Maria, pela amizade, pelo carinho e pelos conselhos.

A todos os professores do Departamento de Microbiologia, pelo incentivo, pelos ensinamentos e pela agradável convivência.

Ao corpo técnico-administrativo do Departamento de Microbiologia, em especial às secretárias Letícia, Nilcéa e Sandra, pela imensa paciência e ajuda em todos os momentos.

Aos funcionários do BIOAGRO Emília, Senhor Paulo e Evandro, por todo empenho disponibilizado.

Ao grupo do Núcleo de Análise de Biomoléculas da UFV, pela estrutura e pela ajuda. Em especialmente, à Nívea, pela dedicação, pelo carinho, entusiasmo, pela aprendizagem, amizade e pelo companheirismo na realização dos experimentos.

À minha colega pesquisadora Josicelli, pela parceria, dedicação, seriedade, pelo carinho, pela amizade e enorme ajuda dedicada a este trabalho.

Aos meus colegas de mestrado e laboratório Bianca, Breno, Flávia, Josi, Juan, Juliana, Jhonathan, Lilian, Lívia, Lorena, Maria Fernanda, Mariana, Nívia, Raquel e Vanessa, pelo carinho, pelas conversas e pela companhia; Ciro, pelo apoio no início dos experimentos e pelas suas palavras de conforto e incentivo; Fernando, pelas explicações, pelo apoio e pela ajuda; aos meus colegas da MIND André e Ana Paula, por dividirem comigo as angústias e alegrias.

Ao meu amigo de coração, de longa data, Hugo, a quem sou eternamente grata.

À minha mãe Maria Silva e aos meus avós Raimunda e José, meu infinito agradecimento pela força, coragem, pelo carinho e dedicação, pela paciência, compreensão e pelo apoio e amor.

Ao meu querido e amado esposo Cláudio, por ser tão importante na minha vida, pelas palavras carinhosas e amorosas; e à minha pequena Gabi, minha princesa e minha inspiração a querer mais do que consegui até hoje.

Aos meus irmãos Gláucia e Felipe e aos meus cunhados Gécica e Gabriel, pela força e confiança.

À minha prima conselheira Elsa, pelos sábios conselhos nos momentos mais difíceis.

A todos aqueles que acreditaram em mim e me deram todo o apoio para que eu chegasse até aqui.

Ninguém vence sozinho!!!

OBRIGADA A TODOS!

BIOGRAFIA

AMANDA FERNANDES BRITO, filha de Adélio Aparecido Fernandes e Maria Moreira da Silva, nasceu em 10 de novembro de 1986, em São Paulo, SP.

Em março de 2006, iniciou o Curso de Bioquímica na Universidade Federal Viçosa (UFV), em Viçosa, MG, graduando-se em janeiro de 2012.

Em agosto de 2013, ingressou no Programa de Pós-Graduação, em nível de Mestrado, em Microbiologia Agrícola da Universidade Federal de Viçosa, submetendo-se à defesa da dissertação em 15 de outubro de 2015.

SUMÁRIO

RESUMO	vii
ABSTRACT	viii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
3. MATERIAL E MÉTODOS	10
3.1. Micro-organismo e manutenção	10
3.2. Condições de cultivo de <i>Kluyveromyces marxianus</i> CCT 7735	10
3.3. Perfil metabólico de <i>Kluyveromyces marxianus</i> CCT7735	11
3.4. Análise estatística	12
3.5. Determinação do consumo de etanol por HPLC	12
3.6. Amostragem e extração do RNA total	13
3.7. RT-qPCR	13
4. RESULTADOS	15
4.1. Análise da expressão gênica em <i>Kluyveromyces marxianus</i> CCT 7735 sob estresse por etanol	15
4.2. Perfil metabólico de <i>Kluyveromyces marxianus</i> em resposta ao estresse por etanol	16
4.3. Análise do consumo de etanol por <i>Kluyveromyces marxianus</i> CCT7735	22
5. DISCUSSÃO	23
6. CONCLUSÕES	30
7. REFERÊNCIAS	31

RESUMO

BRITO, Amanda Fernandes, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, outubro de 2015.
Resposta ao estresse por etanol em *Kluyveromyces marxianus* CCT 7735: uma análise da expressão gênica e do perfil metabólico. Orientador: Wendel Batista da Silveira.
Coorientadora: Denise Mara Soares Bazzolli.

A produção de etanol combustível pode ser aumentada pelo estabelecimento de novas tecnologias que utilizam subprodutos agroindustriais como matéria-prima. O soro de queijo é um subproduto que pode ser utilizado como substrato para a produção de etanol. A levedura *Kluyveromyces marxianus* CCT 7735 é capaz de produzir etanol da lactose do soro de queijo, contudo concentrações de etanol superiores a 6% (v/v) afetam o crescimento dessa levedura. Apesar de esse ser o principal entrave para a utilização de *Kluyveromyces marxianus* em processos de produção de etanol, existem poucas informações sobre os efeitos e respostas adaptativas ao etanol nessa levedura. Recentemente, o transcriptoma dessa levedura cultivada sob estresse por etanol foi obtido, todavia os dados ainda não foram confirmados. Neste trabalho, o transcriptoma foi validado por meio da análise da expressão dos genes que codificam as enzimas transcetolase, hexoquinase, succinato desidrogenase e isocitrato lisase, respectivamente, por PCR em tempo real (qPCR). No intuito de compreender as respostas adaptativas de *Kluyveromyces marxianus* ao etanol, foi analisado o perfil metabólico desta levedura sob estresse por esse biocombustível. Os metabólitos intracelulares foram analisados por um sistema de cromatografia a gás (GC) acoplado a um espectrômetro de massa (MS). Posteriormente, os metabólitos identificados foram correlacionados com os dados do transcriptoma, também obtido sob estresse por etanol. A análise dos componentes principais indicou que o etanol provocou alterações no perfil metabólico da levedura. O aumento da abundância relativa dos metabólitos ácido nicotínico, alanina, valina, prolina, inositol, gentibiose, melibiose e lactulose parece estar associado às respostas adaptativas ao etanol em *Kluyveromyces marxianus* CCT 7735. Além disso, a análise do perfil metabólico, juntamente com as informações do transcriptoma, evidenciou que a via glicolítica é inibida pelo etanol e a via das pentoses fosfato e o ciclo do glioxilato são importantes no período de 4 h sob estresse por etanol.

ABSTRACT

BRITO, Amanda Fernandes, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, October, 2015. **Response to stress caused by ethanol in *Kluyveromyces marxianus* CCT 7735: an analysis of the gene expression and metabolic profile.** Adviser: Wendel Batista da Silveira. Co-Adviser: Denise Mara Soares Bazzolli.

The production of ethanol may be enhanced by setting up new technologies that use agroindustrial by-products as raw material. Cheese whey is a by-product that can be used as a substrate for the production of ethanol. The yeast *Kluyveromyces marxianus* CCT 7735 is able of producing ethanol from the lactose present in the cheese whey, concentrations higher than 6% (v/v) affect the growth of such yeast, however. Although being the main obstacle for using *Kluyveromyces marxianus* in ethanol production processes, there is little information on the effects and the adaptive responses to the ethanol on such yeast. Recently, the transcriptome of that yeast, cultivated under stress in the ethanol, has been obtained. Nevertheless, the data have not been confirmed yet. In this work, the transcriptome was validated by analysis of gene expression that encodes the enzym estransketolase, hexokinase, succinato desidrogenase and isocitratolisase, respectively by PCR in real time (qPCR). In order to understand the adaptive responses of *Kluyveromyces marxianus* to the ethanol, the metabolic profile of this yeast under ethanol stress was analysed. The intracellular metabolites were analysed by a gas chromatography system (GC) coupled with a mass spectrometer (MS). After that, the identified metabolites were correlated to data of transcriptome, which was also obtained under ethanol stress. The analysis of the principal components revealed that ethanol promoted changes in the metabolic profile of this yeast. The increase in the relative abundance of nicotinic acid, alanine, valine, proline, inositol, gentibiose, melibiose and lactulose may be associated with adaptive responses to ethanol in *Kluyveromyces marxianus* CCT 7735. In addition, the analysis of the metabolic profile together with information of transcriptome revealed that the glycolytic pathway is inhibited by the ethanol, and the phosphate pentose pathway and the glyoxylate pathway are important in the 4-hour period under ethanol stress.

1. INTRODUÇÃO

O etanol, principal biocombustível utilizado no mundo, é produzido, sobretudo, em processos fermentativos que utilizam o milho e a cana-de-açúcar como matérias-primas, que são, todavia, alimentos. Assim, a crescente demanda por esse combustível requer o desenvolvimento de tecnologias que utilizem matérias-primas alternativas, a exemplo do uso de subprodutos agroindustriais. Entre esses subprodutos, destaca-se o soro de queijo, efluente da indústria de laticínios que pode ser utilizado como matéria-prima para a produção de etanol. Esse processo é ambientalmente vantajoso, pois alia o tratamento do soro de queijo à produção de bioetanol.

A tradicional levedura da fermentação alcoólica, *Saccharomyces cerevisiae*, é incapaz, no entanto, de metabolizar a lactose do soro de queijo, apesar de algumas linhagens de *Kluyveromyces marxianus* utilizá-la como fonte de carbono e energia. A lactose é transportada para o citoplasma pela permease de lactose e, posteriormente, hidrolisada em glicose e galactose, em uma reação catalisada pela enzima β -galactosidase. Enquanto a glicose é metabolizada diretamente a piruvato, pela via glicolítica, a galactose é primeiramente transformada em glicose-6-P na via de Leloir. Em seguida, esse metabólito entra na via glicolítica.

Kluyveromyces marxianus CCT 7735 apresenta potencial para produzir etanol de permeado de soro de queijo. Recentemente, as condições ótimas de produção de etanol a partir dessa matéria-prima foram determinadas: temperatura entre 33,3-38,3 °C, pH entre 4,5-5,7, biomassa entre 1,26-1,68 gL⁻¹ e concentração de lactose entre 50-108 gL⁻¹ (DINIZ et al., 2013). Contudo, essa levedura tem o seu crescimento inibido em concentrações de etanol próximas a 6% (v/v), sendo esse o principal entrave para o estabelecimento de um processo fermentativo industrial. Em *Kluyveromyces marxianus*, tanto o efeito quanto as respostas adaptativas ao etanol são pouco conhecidos. No entanto, tais respostas vêm sendo bastante estudadas em *Saccharomyces cerevisiae*, que é mais tolerante ao etanol do que *Kluyveromyces marxianus*. Em resposta ao etanol, *Saccharomyces cerevisiae* regula a expressão gênica, altera a composição lipídica da membrana plasmática e induz a síntese de proteínas e metabólitos. Porém, os mecanismos de respostas dessa levedura não são completamente entendidos.

O genoma de *Kluyveromyces marxianus* CCT 7735 foi anunciado recentemente, e o transcriptoma dessa levedura tem sido analisado sob condição de estresse por etanol, porém esses dados precisam ser validados pela análise da expressão de alguns genes por PCR em tempo real. A confirmação desses dados propiciará que as repostas dessa levedura ao etanol comecem a ser compreendidas. A identificação dos metabólitos associada a essas repostas permitirá correlacioná-los com os dados de expressão gênica, fornecendo a compreensão mais sistêmica das repostas adaptativas ao etanol. Nesse contexto, neste trabalho os objetivos foram confirmar os dados da análise transcriptômica e analisar a expressão de genes relacionados ao metabolismo energético, bem como identificar metabólitos que possam estar associados às repostas adaptativas de *Kluyveromyces marxianus* CCT 7735 ao estresse por etanol.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

As leveduras são micro-organismos eucariontes unicelulares capazes de converter açúcares em etanol (YANASE et al., 2010; HENDERSON et al., 2011; FELDMANN, 2012). Por isso, são amplamente utilizadas na fabricação de bebidas alcoólicas (MENGGEN; LIU, 2010; PAIS et al., 2013) e produção de etanol combustível (GOSHIMA et al., 2013; KIM et al., 2013b).

O etanol, principal biocombustível produzido no mundo, é obtido substancialmente a partir da fermentação da sacarose e da glicose do amido de milho, todavia essas matérias-primas também são utilizadas pela indústria de alimentos (HU et al., 2012; RUYTERS et al., 2015). Nas últimas décadas, entretanto, a utilização industrial de leveduras para a produção de etanol a partir de resíduos agroindustriais vem sendo bastante estudada (ANTONI et al., 2007; HICKERT et al., 2013; CANIZO et al., 2014). Entre esses subprodutos, destacam-se o bagaço de cana-de-açúcar (SOUZA et al., 2012; DIAS et al., 2013; ORTIZ JR., 2014), palha de milho (CASTRO; ROBERTO, 2014) e soro de queijo (SILVEIRA et al., 2005; ZOPPELLARI; BARDI, 2013; DINIZ et al., 2014). Essas fontes de energia possuem açúcares fermentáveis capazes de atender à crescente demanda por matérias-primas para a produção de combustíveis, sem concorrer com a agroindústria (MARYANA et al., 2014; MANZETTI; ANDERSEN, 2015; GUPTA; VERMA, 2015).

O soro de queijo é um efluente oriundo da indústria de laticínios (ARIYANTI; HADIYANTO, 2013; SANSONETTI et al., 2013), que promove poluição ambiental quando descartado sem tratamento prévio na natureza (KOUSHKI et al., 2012). A fermentação da lactose, açúcar do soro de queijo, é uma forma de aliar o tratamento desse subproduto à obtenção de etanol (FLORÊNCIO et al., 2013; GABARDO et al., 2014). No entanto, *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*), a tradicional levedura da fermentação alcoólica, não assimila a lactose (GUIMARÃES et al., 2010; RODRUSSAMEE et al., 2011), sendo necessário utilizar outra levedura que converta esse açúcar em etanol. Assim, a levedura *Kluyveromyces marxianus* metaboliza vários tipos de açúcares, entre eles a lactose (GUO et al., 2010; SIGNORI et al., 2014). Além disso, essa levedura apresenta elevada taxa de crescimento e termotolerância (ABDEL-BANAT et al., 2010; LERTWATTANASAKUL et al., 2013; ZHANG et al., 2014).

Kluyveromyces marxianus possui os genes LAC12 e LAC4, que codificam a permease de lactose e a enzima β -galactosidase, respectivamente (LANE; MORRISSEY, 2010; GABARDO et al., 2014). Primeiro, a lactose é transportada do meio extracelular pela permease; em seguida, a enzima β -galactosidase catalisa a reação de hidrólise da molécula de lactose em glicose e galactose. A glicose é direcionada para a via glicolítica, enquanto a galactose é metabolizada pela via de Leloir (SYRIOPOULOS et al., 2008), formando a glicose 1-P, que é convertida em glicose 6-P, que entra na via glicolítica (SEIBOTH et al., 2007). O piruvato, último intermediário da via glicolítica, dependendo das condições de cultivo, pode seguir pelo ciclo do ácido cítrico, que é totalmente oxidado a CO_2 , ou entrar na via fermentativa, sendo reduzido a etanol (BAI et al., 2008; PFEIFFER; MORLEY, 2014).

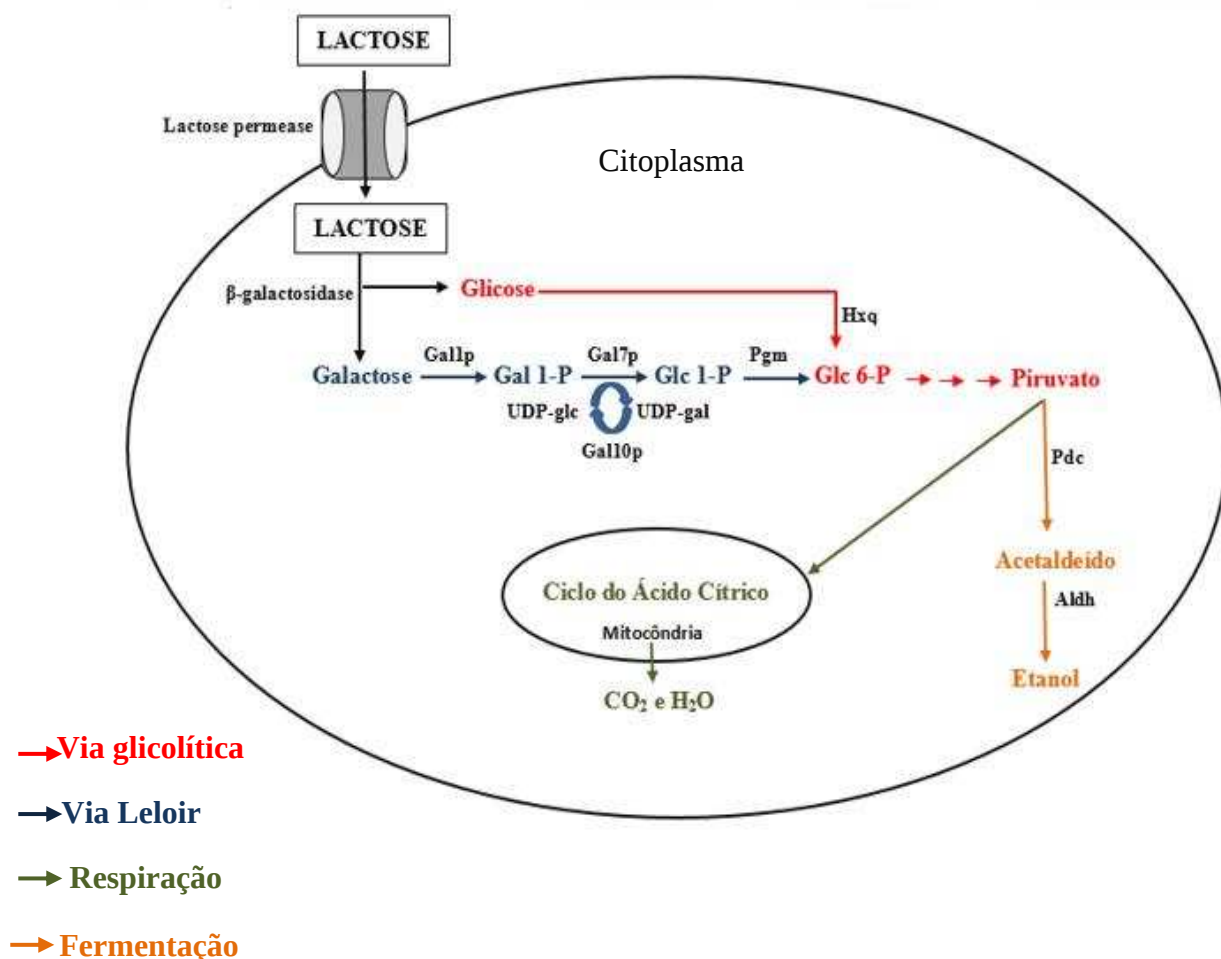


Figura 1 - Representação do metabolismo da lactose em leveduras do gênero *Kluyveromyces*. Gal1p: galactocinase; Gal7p: uridiltransferase; Pgm: fosfoglicomutase; Hxq: hexoquinase; Pdc: piruvato descarboxilase; e Aldh: aldeído desidrogenase. Fonte: Adaptado de RUBIO-TEXEIRA, 2005; RUBIO-TEXEIRA, 2006.

Inicialmente, *Kluyveromyces marxianus* foi classificada como levedura Crabtree negativa (FONSECA, 2008; ZOPPELLARI; BARDI, 2014), isto é, o metabolismo é direcionado preferencialmente para o ciclo do ácido tricarboxílico em aerobiose. Todavia, há estudos mostrando que algumas linhagens produzem etanol quando cultivadas em altas concentrações de açúcar, sendo classificadas como respirofermentativas, ou seja, a fermentação e a respiração ocorrem simultaneamente (LANE; MORRISSEY, 2011; DINIZ et al., 2014).

Kluyveromyces marxianus tem sido isolada de diferentes ambientes e, por isso, apresenta alta diversidade metabólica e substancial grau de polimorfismo intraespecífico (ROCHA et al., 2011b; BRAGANÇA et al., 2015). A levedura *Kluyveromyces marxianus* CCT 7735, inicialmente denominada *Kluyveromyces marxianus* UFV-3, foi isolada de uma indústria de laticínios na região da Zona da Mata mineira. Essa levedura converte a lactose do soro de queijo a etanol com rendimentos próximos ao teórico, quando cultivada em alta concentração de lactose e baixo nível de oxigênio (SILVEIRA et al., 2005). As condições ótimas de produção de etanol nesse substrato foram estabelecidas posteriormente (DINIZ et al., 2012). Contudo, enquanto a *Saccharomyces cerevisiae* tolera concentrações de etanol acima de 10% (v/v), *Kluyveromyces marxianus* não sobrevive em concentrações de etanol superiores a 6% (v/v) (GIL et al., 1996; PINA et al., 2004; COSTA et al., 2014). *Kluyveromyces marxianus* CCTT 7735 apresenta forte inibição do seu crescimento na concentração de etanol 8% (v/v) (SILVEIRA et al., 2005). Apesar de *Saccharomyces cerevisiae* ser mais tolerante ao etanol, a acumulação desse metabólito durante a fermentação interfere em sua viabilidade e capacidade fermentativa (LEWIS et al., 2010; KIM et al., 2013a). Assim, o efeito e as respostas adaptativas ao etanol vêm sendo amplamente investigados, a fim de compreender os mecanismos de tolerância ao etanol.

O etanol inibe o crescimento celular, provocando alterações metabólicas e estruturais que levam à redução da viabilidade das leveduras durante o processo fermentativo (WANG et al., 2007; RICCI et al., 2012; BLEOANCA et al., 2013). A Figura 2 mostra os principais efeitos do estresse por etanol na levedura *Saccharomyces cerevisiae*. O etanol realiza ligação com os grupos polares dos fosfolipídios presentes nas membranas, reduzindo, assim, a quantidade de água dessa estrutura, o que induz a sua desidratação (PATRA et al., 2006). Além disso, a interação do etanol com os lipídios da membrana celular interfere na integridade dessa estrutura, aumentando a sua permeabilidade e fluidez, o que promove a

dissipação do potencial eletroquímico de membrana com a subsequente acidificação intracelular (MA; LIU, 2010a; VANEGAS et al., 2012; PASCHOS et al., 2015). Esse metabólito induz a redução da espessura da membrana (DICKY et al., 2010), afetando o transporte de pequenas moléculas, como aminoácidos e açúcares (ALEXANDRE et al., 2001; LEI et al., 2007; BLEOANCA et al., 2013). O etanol ainda estimula a formação de espécies reativas de oxigênio que causam danos ao DNA (HONG et al., 2010; KAHR et al., 2011; SASANO, 2012a), lipídios e proteínas (AUESUKAREE et al., 2009; ANDERSON et al., 2012). Ele também inativa enzimas importantes, como a hexoquinase e o piruvato quinase, pela mudança conformacional da estrutura dessas proteínas (HONG et al., 2010; DOĞAN et al., 2014; PASCHOS et al., 2015).

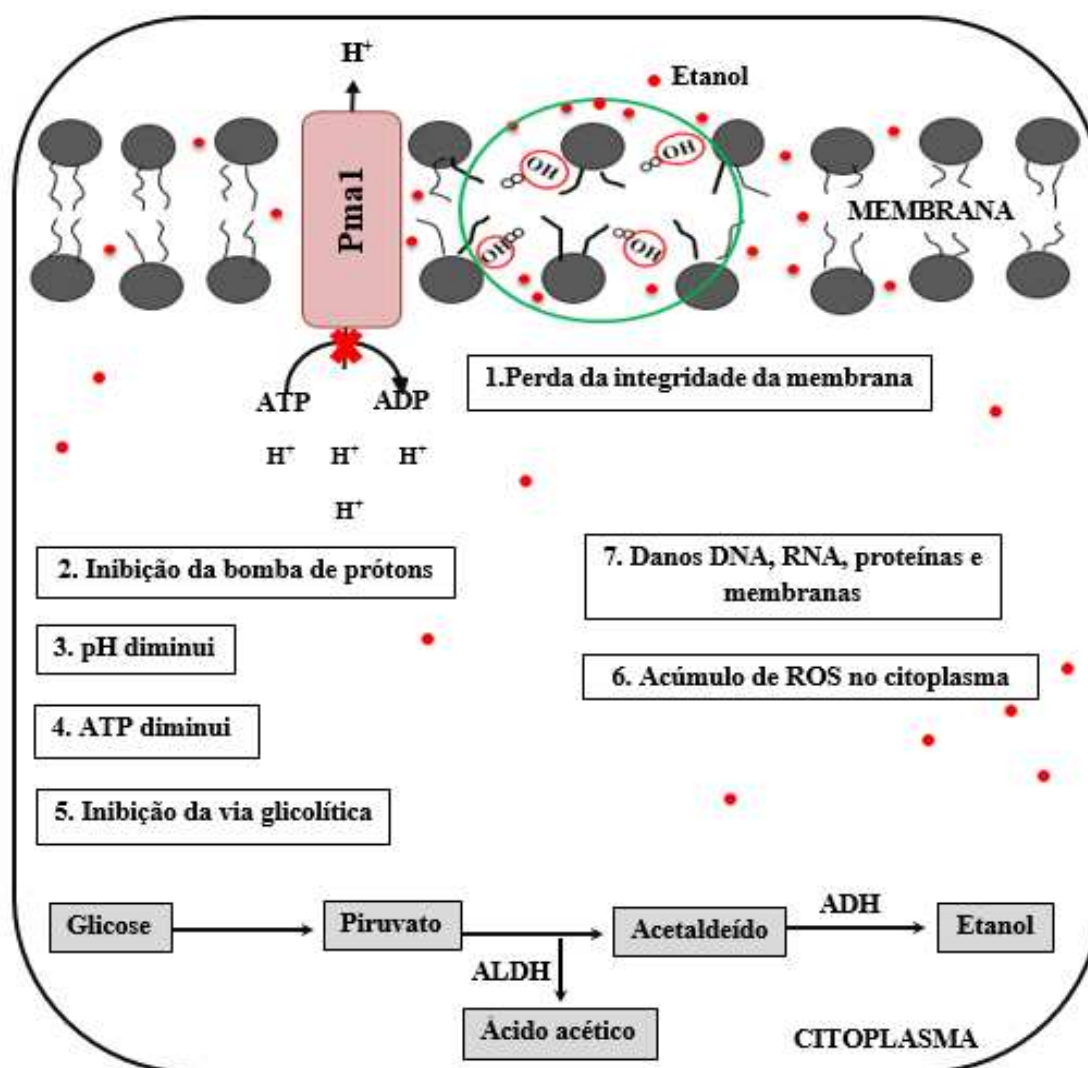


Figura 2 - Representação dos principais mecanismos de inibição celular por etanol em *S. cerevisiae*. ADH: álcool desidrogenase; ALDH: aldeído desidrogenase; e Pma1: bomba de prótons. **Fonte:** DOĞAN et al., 2014.

Devido à exposição aos efeitos tóxicos do etanol, as leveduras reorganizam as atividades celulares para se adaptarem a essa condição de estresse, garantindo, assim, a sua sobrevivência (ARAKI et al., 2009; PLAZA et al., 2013; PASCHOS et al., 2015). As estratégias utilizadas pelas leveduras para tolerar os efeitos tóxicos do etanol incluem regulação da expressão gênica, remodelamento de estruturas celulares e síntese de metabólitos (YU et al., 2012; LI et al., 2012).

A resposta transcricional possibilita a identificação de genes de resposta ao etanol em leveduras (LEWIS et al., 2010). A alteração na expressão de genes relacionados à organização da parede celular, membrana, biogênese, biossíntese de proteínas e trealose, bem como aqueles envolvidos no metabolismo de aminoácidos, nucleotídeos, lipídios, ácidos graxos e ergosterol, é descrita na literatura como responsável por conferir a levedura *Saccharomyces cerevisiae* tolerância ao etanol (TEIXEIRA et al., 2009; YOSHIKAWA et al., 2009; PÉREZ-GALLARDO et al., 2013).

A ativação de genes relacionados à resposta ao estresse ambiental (ESR) induz a expressão dos genes associados à geração de energia, como genes que codificam enzimas glicolíticas (BERRY et al., 2011). No entanto, os genes envolvidos no crescimento celular e na síntese de RNA mensageiro e de proteínas são reprimidos (STANLEY et al., 2010). Além disso, as vias de transdução de sinal que regulam a atividade dos fatores de transcrição Hsf1, Msn2 e Msn4 são requeridas na proteção contra o estresse por etanol (BERRY et al., 2011). Hsf1 é fator de transcrição que induz a expressão de genes que codificam proteínas do choque térmico, HSEs (ARAKI et al., 2009; NOGUCHI et al., 2011). O etanol estimula a translocação de Msn2 e Msn4 do citoplasma para o núcleo, levando à ativação da transcrição dos genes associados aos elementos de respostas ao estresse (WATANABE et al., 2009; NOGUCHI et al., 2011), dos genes que codificam as proteínas de choque térmico e dos genes cujos produtos controlam a acumulação de trealose (VOORST et al., 2006; BLEOANCA et al., 2013). Os genes de síntese da trealose (TPS1, TPS2, TSL1, PGM2 e UPG1) são regulados positivamente sob o estresse por álcool, elevando, assim, a quantidade de trealose no meio. Esse metabólito ajuda no dobramento correto de proteínas e inibe a desnaturação de proteínas, bem como diminui a permeabilidade da membrana (DING et al., 2010; MAHMUD et al., 2012; ZHENG et al., 2013; WANG et al., 2014). Trealose ainda protege as membranas dos estresses ambientais, uma vez que esse carboidrato interage com os grupos polares dos fosfolipídios presentes nessa estrutura, substituindo as moléculas de água perdidas e evitando, assim, a perda da integridade e fluidez da membrana (TANG et al., 2007; SENGUPTA et al.,

2011). As respostas ao estresse por etanol envolvendo os fatores transcricionais HSF1 e Msn2/Msn4 são fundamentais para estabilizar e prevenir a agregação de proteínas desnaturadas e mal dobradas (BLEOANCA et al., 2013).

Os mecanismos de tolerância ao etanol em leveduras são complexos e envolvem múltiplos genes e, embora a expressão de vários genes tenha sido associada às linhagens de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* resistentes ao etanol, é importante quantificar a expressão desses genes pelo método do PCR em tempo real (qPCR-RT) em *Kluyveromyces marxianus*, para entender a relevância desses genes durante a tolerância ao etanol (LIU et al., 2009; MA; LIU, 2010b). A análise da expressão gênica permite compreender as respostas transcricionais ocorridas nas células devido às variações ambientais (PUROHIT et al., 2015). O envolvimento de alguns genes na resposta ao estresse por etanol foi analisado utilizando esse método. O gene *Rpi1* que codifica a proteína RPI1, regulador negativo da via do cAMP na levedura *Saccharomyces cerevisiae*, foi considerado importante para prolongar a sobrevivência das células sob estresse, conferindo resistência à parede celular durante o estresse por etanol (PURIA et al., 2009). Segundo Zhang et al. (2015), a super expressão dos genes *ERG1*, *ERG9* e *ERG11*, envolvidos nas vias de biossíntese de ergosterol, aumentou a resistência da levedura *Saccharomyces cerevisiae* ZTW1 ao estresse por etanol. Esse resultado é consistente com a conclusão de estudos anteriores de que o ergosterol exerce efeito protetor quando a levedura é submetida a esse tipo de estresse (ZHAO et al., 2009; ZHENG et al., 2013).

As principais respostas da levedura *Saccharomyces cerevisiae* ao estresse por etanol envolvem as proteínas do choque térmico (HSPs), bem como as chaperonas SSA e APJI, que são altamente expressas nessa condição de estresse. As HSPs pertencem à classe das chaperonas, enzimas que atuam auxiliando o enovelamento proteico, assegurando a conformação funcional das proteínas após os processos de desnaturação provocados pelo etanol (MCCLELLAN et al., 2007; GONG et al., 2009; NICOLAOU et al., 2010). Além disso, os estudos com *Saccharomyces cerevisiae* demonstraram que o aminoácido prolina tem os níveis aumentados durante o estresse por etanol, contribuindo para aumentar a estabilidade das membranas, bem como prevenir a agregação proteica durante o redobramento proteico (TAKAGI et al., 2005; PHAM; WRIGHT, 2008; KITAGAKI; TAKAGI, 2014). Esse aminoácido ainda atua capturando as espécies reativas de oxigênio e impedindo seu acúmulo intracelular (TAKAGI, 2008; SASANO, 2012b).

Os danos causados pelo etanol na membrana de leveduras provocam mudança na composição fosfolipídica desta estrutura (HENDERSON et al., 2011), aumentando o conteúdo de ácidos graxos insaturados e ergosterol para estabilizar a sua fluidez (ZHAO, 2009; VANEGAS et al., 2012). Em *Saccharomyces cerevisiae*, os ácidos graxos monoinsaturados palmitoleico e oleico são sintetizados para compensar os danos causados pelo estresse por etanol, conferindo tolerância às leveduras (YOU et al., 2003; AGUILERA et al., 2006; LEWIS et al., 2010). O ergosterol, principal esterol da membrana de *Saccharomyces cerevisiae* (HENDERSON et al., 2011), preserva a integridade estrutural da membrana em condições de estresse ambiental (DICKY et al., 2010). Essa molécula interage com os lipídeos, formando uma fase líquida ordenada, modulando a interação do etanol com a membrana, protegendo-a dos efeitos deletérios dos álcoois (VANEGAS et al., 2010).

Estudos realizados sobre as alterações moleculares da membrana em leveduras tolerantes ao etanol indicaram que o lipídio insaturado fosfatidilinositol e o ergosterol presentes nessa estrutura promoveram uma reorganização lateral da bicamada lipídica, impedindo a redução da espessura da membrana, ou seja, não permitiram o processo de interdigitação induzida pelo etanol (HENDERSON et al., 2011). Além disso, essas alterações contribuíram para manter a espessura adequada da membrana, conferindo, assim, fator de sobrevivência celular diante da toxicidade do etanol (VANEGAS et al., 2012).

3. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados nos Laboratórios de Fisiologia de Micro-Organismos e de Genética Molecular e de Micro-Organismos, localizados no Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO) e no Núcleo de Análises de Biomoléculas (NuBioMol), ambos da Universidade Federal de Viçosa (UFV).

3.1 Micro-organismo e manutenção

Neste trabalho foi utilizada a levedura *Kluyveromyces marxianus* CCT 7735, anteriormente denominada UFV-3, pertencente ao acervo de culturas do Laboratório de Fisiologia de Micro-Organismos do Departamento de Microbiologia (DMB) da UFV. Essa levedura também se encontra depositada na Coleção de Cultura Tropical da Fundação André Tonsello, em Campinas, SP. A cultura de levedura foi mantida em meio YP [extrato de levedura 1% (p/v), peptona 2% (p/v)] acrescido de glicerol 50% (v/v) a -80 °C, e em meio sólido YPD ágar [extrato de levedura 1% (p/v), peptona 2% (p/v) glicose 2% (p/v) e ágar 2% (p/v)] a 4 °C.

3.2. Condições de cultivo de *Kluyveromyces marxianus* CCT 7735

Para obtenção do inóculo, a cultura estoque de *Kluyveromyces marxianus* CCT 7735 mantida a -80 °C foi ativada e inoculada em erlenmeyers de 250 mL com 60 mL de meio YPD. Em seguida, foram incubadas em agitador rotatório (NEW BRUNSWICK SCIENTIFIC 25D) a 37 °C, com agitação de 180 rpm, por 16 h. Posteriormente, as células foram centrifugadas a 9.000 x g, durante 5 min, a 4 °C, sendo o sedimento celular obtido lavado duas vezes com água peptonada 0,1% (p/v). Após essa etapa, as leveduras foram inoculadas em 60 mL de meio YP acrescido de lactose 2% (p/v) e lactose com valor de pH de 5,5, em frascos erlenmeyers de 250 mL, para obtenção de uma densidade óptica (DO_{600nm}) de aproximadamente 0,2. Então, as células foram cultivadas em batelada a 37 °C, com agitação de 180 rpm até a cultura atingir a $DO_{600nm} = 0,8$, mensurada em espectrofotômetro de microplacas (Multiskan GO, Thermo Scientific, Finland). Nessa fase do crescimento, retirou-se uma amostra (controle sem etanol). As células restantes foram centrifugadas e ressuspensas em YP, sendo posteriormente adicionadas à lactose e, a seguir, ao etanol 6%

(v/v). Após o período de 1 e 4 h de cultivo sob estresse por etanol, alíquotas foram coletadas para análises posteriores.

3.3. Perfil metabólico de *Kluyveromyces marxianus* CCT7735

As células de *Kluyveromyces marxianus* CCT 7735 cultivadas na ausência e presença de etanol 6% (v/v) tiveram o metabolismo interrompido após a amostragem, usando o método de Quenching descrito previamente (CANELAS et al., 2008). Uma alíquota de 5 mL das amostras foi adicionada a 5 mL de uma solução de metanol gelado (70% v/v, -80 °C). A seguir, as células foram sedimentadas em uma centrífuga refrigerada a 12.000 x g durante 10 min e, então, congeladas a -80 °C. Posteriormente, os metabólitos foram extraídos utilizando o método descrito por Villas-Bôas et al. (2005), com algumas modificações. Nesse procedimento, foram adicionados 1,5 mL de tampão de extração (água, metanol e clorofórmio) e 60 µL do padrão interno ribitol (0,2 mg/mL) às células mantidas a -80 °C. Em seguida, as amostras foram homogeneizadas no vórtex por 10 seg e agitadas no Thermomixer comfort (Eppendorf) a 950 rpm por 30 min, a 4 °C. Após essa etapa, as amostras foram centrifugadas a 12.000 rpm a 4 °C, por 10 min, e 1 mL do sobrenadante foi transferido para novos tubos. Depois disso, 750 µL de água ultrapura foram adicionados aos frascos, que foram, em seguida, agitados por 10 seg e centrifugados a 12.000 rpm por 15 min, a 4 °C. Ao término da centrifugação, 50 µL dos sobrenadantes foram transferidos para outros tubos. Essas soluções foram submetidas à secagem em speedvac por 30 min. Após o processo de liofilização, foi realizada a etapa de derivatização por meio de uma reação de sililação: trimetilsililação (MST), descrito por Roessner et al. (2000).

Aos extratos secos foram adicionados 40 µL de metoxiamina (methoxylamine-hydrochloride 20 mg/mL) dissolvidos em pirimidina. Posteriormente, as amostras foram agitadas em um agitador de microtubos Thermomixer comfort (Eppendorf) a 950 rpm durante 2 h, a 37 °C.

Em seguida, 70 µL de uma solução de N-methyl-N-(trimethylsilyl) trifluoro acetamid (MSTFA), acrescida de 20 µL mL⁻¹ da mistura-padrão do índice de retenção (FAMES), foram adicionados às amostras. Estas foram agitadas por 30 min a 37 °C e centrifugadas por 10 min a 13.000 rpm.

Para a análise dos metabólitos intracelulares, 100 µL das amostras foram transferidos para um sistema de cromatografia a gás (GC) (Agilent Technologies 7890A), com coluna capilar DB-35MS, 30 m x 0,32 mm x 0,25 µm (Agilent Technologies), acoplado ao

espectrômetro de massa (MS) TruTOF®HT TOFMS (LECO Instruments). Para o processamento cromatográfico e de convolução espectral de massas, foram utilizados o software Chroma TOF, versão 4.50.8.0. (LECO Instruments), e bibliotecas de massa espectrais de compostos derivados de trimetilsilício (TMS), obtido do Instituto Max Planck de Fisiologia Molecular Vegetal (<http://csbdb.mpimp-golm.mpg.de/csbdb>). Atribuição ao pico foi verificada com o software TagSearch [Luedemann, 2008 (bioinformatics)]. As áreas de picos cromatográficos dos íons fragmentados foram verificadas, normalizadas pela área do pico correspondente ao ribitol e corrigidas pelo número de células de cada amostra extraída.

3.4. Análise estatística

Os dados obtidos da Cromatografia Gasosa acoplada ao Espectrômetro de Massas (GC-MS) foram normalizados e, posteriormente, exportados, para o software R (R Development Core Team, 2015), para a análise dos componentes principais (PCA). Na representação do gráfico PCA, a dispersão gráfica das amostras biológicas é baseada nas similaridades e diferenças apresentadas no conjunto de dados metabólicos. As distâncias entre os grupos evidenciaram a diferença global entre os perfis metabólicos das leveduras com os diferentes tratamentos, ausência de etanol e presença de etanol após 1 h e 4 h sob estresse. A análise estatística multivariada foi realizada utilizando a média das replicatas das amostras. O nível de significância da abundância relativa dos metabólitos identificados na presença de etanol em relação aos identificados na ausência de etanol foi avaliado pelos testes t e ANOVA, utilizando o software R. Metabólitos que apresentaram p-valor menor que 0,05 foram considerados estatisticamente significativos.

3.5. Determinação do consumo de etanol por HPLC

As amostras-controle e recolhidas após 1 h e 4 h sob estresse por etanol (6% v/v) foram filtradas em membranas de 0,22 µm. As concentrações de etanol foram determinadas por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), no cromatógrafo Shimadzu LC 20AT acoplado a um detector de índice de refração e coluna de troca iônica Phenomenex Rezex ROA (300x7,8 mm), na temperatura de 30 °C, usando-se ácido sulfúrico 0,005 M como fase móvel, em um fluxo constante de 0,7 mL min⁻¹.

3.6. Amostragem e extração do RNA total

Inicialmente, a levedura *Kluyveromyces marxianus* CCT 7735 foi cultivada em meio YPL, conforme descrito no subitem 3.2. As células foram centrifugadas e ressuspensas em 60 mL de YPL. Uma alíquota de 20 mL foi recolhida como amostra-controle. Aos 40 mL restantes de meio foi adicionado etanol 6% (v/v). Posteriormente, as amostras-controle e aquelas recolhidas após 1 h e 4 h, em condição de estresse por etanol, foram ressuspensas em RNA later (Ambion-Life Technologies, USA) e mantidas por 1 h nessa condição na temperatura ambiente. A seguir, essas amostras foram centrifugadas e os sedimentos, armazenados a -80 °C.

O RNA total foi obtido utilizando o miRneasy Mini Kit (Qiagen, Netherlands), como sugerido por Tesorero et al. (2013), e a sua qualidade foi avaliada em gel de agarose 1% (p/v). Posteriormente, a quantidade do RNA foi determinada por espectrofotômetro, $\lambda = 260$ nm, e a razão A260/A280, calculada. Então, 1 µg de RNA foi tratado com DNase I RNase free (BioLabs, New England), para posterior síntese da fita de DNA complementar.

3.7. RT-q(PCR)

A partir do RNA extraído nas condições do subitem 3.6, foi realizada a síntese do DNA complementar (cDNA). Para a síntese de 20 µL cDNA, 0,5 µg do RNA tratado com DNase foi utilizado na reação de transcrição reversa ImProm-II (Promega, USA) contendo random primers, como descrito no manual do fabricante. Os produtos de amplificação gerados foram analisados em gel de agarose 1,0% (p/v). O controle positivo da reação de transcrição reversa foi realizado com DNA genômico de *Kluyveromyces marxianus*, enquanto para o controle negativo se utilizou o RNA total tratado com DNase.

A análise da expressão dos genes que codificam as enzimas transcetolase (ch8_g282), hexoquinase (ch6_g384), succinato desidrogenase (ch5_g512) e isocitrato liase (ch7_g159) foi realizada através do PCR em Tempo Real. Já o PCR quantitativo (qPCR) foi preparado com o SYBR® Green Platinum® SuperScript® III (Invitrogen, USA). Em um volume de 25 µl de reação, adicionaram-se 1 µl de cDNA, 12,5 µl da mistura SYBR® Green (corante SYBR® Green I, MgSO₄, dNTPs e Taq polimerase), 1 µl de cada primer e 4,5 µl de água DEPC. A eficiência desses primers foi verificada por PCR, estando os primers utilizados no qPCR listados na Tabela 1.

A amplificação foi realizada no equipamento da Bio-Rad (CFX96 Real-Time System), usando o seguinte programa, 95 °C por 5 min, seguido de 40 ciclos (95 °C por 30 seg, 60 °C por 1 min e 72 °C por 10 min, para mensurar a fluorescência) e resfriamento para 4 °C. A intensidade da fluorescência de cada transcrito, o C_T , foi determinada a partir do aumento linear da fluorescência acima da fluorescência basal (background). A expressão dos genes foi determinada por comparação das amostras de cDNA obtidas a partir do RNA total proveniente da levedura cultivada na ausência e presença de etanol, como descrito no subitem 3.2.

A expressão relativa foi determinada utilizando o método de quantificação relativa $2^{-\Delta\Delta CT}$ (WINER et al., 1999; LIVAK; SCHMITTGEN, 2001), tendo a expressão do gene constitutivo ch4_g216, que codifica gliceraldeído 3-P desidrogenase, na ausência de etanol, como controle endógeno de referência. Para calcular a eficiência de cada par de primer, uma curva-padrão usando uma série de diluições de cDNA foi construída. Esse experimento foi realizado em três réplicas biológicas, com triplicata experimental.

Tabela 1 - Primers utilizados na análise por qPCR

Primer alvo	Sequência (5 → 3)	Tamanho Amplicon	Referência
Hexoquinase	ch6_g384R (GCAATGGCTCAGAGACACCT) ch6_g384F (TGCCAGACCACTTGAGAACTG)	110	Este trabalho
Succinato desidrogenase	ch5_g512R (GGAGGGGGAGCAACATAAGC) ch5_g512F (GCTTTCCAAACTACCGCCAAG)	100	Este trabalho
Transcetolase	ch8_g282R (TGTCCCAATCTTGTCCGTCG) ch8_g282F (GGAGGCACCGAATCTGTTCA)	119	Este trabalho
Isocitrato liase	ch7_g159R (CAGTGTTCTGTGATGCGTGC) ch7_g159F (GCAAACCTCCTTCGCTTGCTC)	117	Este trabalho
Gliceraldeído 3-P desidrogenase (endógeno)	ch4_g216R(TCTCTGAAGGTAAGTTGAAGGACG) ch4_g216F(ACGGCTTGAATGGAGACGTAG)	120	Este trabalho

4. RESULTADOS

4.1. Análise da expressão gênica em *Kluyveromyces marxianus* CCT 7735 sob estresse por etanol

A expressão relativa dos genes ch8_g282, ch6_g384, ch5_g512 e ch7_g159, que codificam as enzimas transcetolase, hexoquinase, succinato desidrogenase e isocitrato liase, respectivamente, foi analisada por PCR em tempo real (qPCR). Os genes descritos foram selecionados com a finalidade de compreender as respostas transcricionais em *Kluyveromyces marxianus* CCT 7735 sob estresse por etanol, contribuindo, assim, para a compreensão dos mecanismos de resposta ao etanol nessa levedura.

O perfil da expressão desses genes foi obtido pela comparação do cultivo na presença e ausência de etanol. Após a adição de etanol, amostras foram coletadas nos períodos de 1 e 4 h. Desse modo, a expressão dos genes na ausência de etanol foram padronizados para 1. Quando essa relação foi maior que 1, o nível de expressão do gene aumentou. Quando esse valor foi menor que 1, a expressão dos genes diminuiu.

A Figura 3 ilustra essas alterações ocorridas na expressão relativa dos genes. Após 1 h de exposição ao etanol, observou-se redução na expressão dos genes analisados. Após um período de 4 h de estresse etanólico, a expressão dos genes que codificam as enzimas hexoquinases que catalisam a reação de glicose a glicose 6-P na via glicolítica e succinato desidrogenase, enzima que atua no ciclo do ácido cítrico, permaneceu com menor expressão. No entanto, foi observado aumento na expressão dos genes que codificam as enzimas transcetolase e isocitrato liase, enzimas que atuam, respectivamente, na via das Pentoses Fosfato e Ciclo do Glioxilato.

A alteração no nível de expressão dos genes analisados neste trabalho indica que as leveduras induzem a reprogramação gênica, a fim de responder ao estresse provocado pelo etanol. E o aumento na expressão gênica observado após o período de 4 h pode estar relacionado a um mecanismo de tolerância ao etanol.

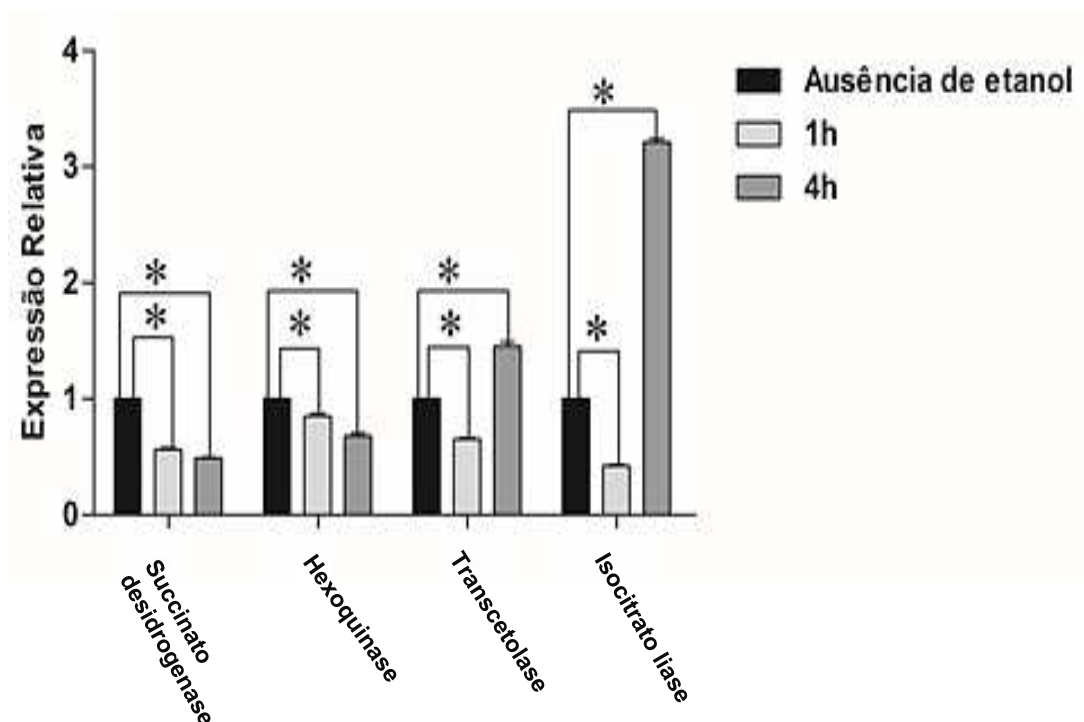


Figura 3 - Expressão relativa dos genes ch5_g512, ch6_g384, ch8_g282ech7_g159, que codificam as enzimas succinato desidrogenase, hexoquinase, transcetolase e isocitrato liase, respectivamente, de *Kluyveromyces marxianus* CCT 7735 cultivada sob estresse por etanol. T = 1 h e t = 4 h representam os períodos de cultivo sob estresse por etanol (6% v/v) em relação ao controle, ausência de etanol.

*Teste t significativo para p-valor < 0,05 em relação ao controle (ausência de etanol).

4.2. Perfil metabólico de *Kluyveromyces marxianus* em resposta ao estresse por etanol

Neste experimento foram detectados 70 compostos, porém apenas 23 metabólitos (Tabela 4) foram identificados pela biblioteca em *Kluyveromyces marxianus* CCT 7735, tanto na ausência de etanol quanto sob estresse por etanol. Esses metabólitos foram classificados quimicamente em ácidos orgânicos, aminoácidos, açúcares e poliálcoois.

Tabela 4 - Metabólitos intracelulares de *Kluyveromyces marxianus* CCT 7735, identificados por GC-MS na ausência e presença de etanol

	Concentração de etanol (%)		
	0	6 (T = 1 h)	6 (T = 4 h)
Metabólitos	Abundância relativa (mg/ml) /nº de célula		
Ácidos orgânicos			
Ácido cítrico	4,84656E-12	4,36256E-11*	8,33497E-11*
Ácido nicotínico	3,86807E-13	2,19378E-11*	6,79176E-11*
Ácido málico	5,49054E-13	6,21613E-12*	7,3415E-12 *
Aminoácidos			
Alanina	3,24518E-14	1,72794E-12*	1,94664E-12*
Asparagina	2,57961E-12	3,23391E-11	1,91688E-11
Aspartato	2,87965E-11	4,64852E-10	2,70367E-10
Fenilalanina	2,32344E-11	3,20567E-10	1,99183E-10
Glicina	8,45815E-11	1,05077E-09	8,27569E-10
Glutamato	5,91906E-11	7,2645E-10	7,2645E-10
Isoleucina	6,9886E-12	9,69863E-11	6,25281E-11
Lisina	1,49397E-11	1,95995E-10	1,52252E-10
Metionina	8,10711E-12	1,26083E-10	9,0154E-11
Ornitina	3,55521E-12	5,0257E-11*	5,13182E-11*
Prolina	1,66829E-11	2,29268E-10*	2,54497E-10*
Serina	2,41032E-11	3,47795E-10	2,32877E-10
Tirosina	1,75252E-11	2,31115E-10	1,53042E-10
Valina	6,40281E-12	7,44797E-11*	8,58131E-11*
Açúcares			
Gentibiose	3,88187E-13	1,34344E-11*	1,68007E-11*
Glicose	1,18088E-13	3,87761E-12	2,75184E-12
Melibiose	2,65266E-13	4,50813E-12*	5,42644E-12*
Lactulose	3,23593E-12	3,9268E-11*	3,52217E-11*
Poliálcoois			
Galactinol	2,72629E-13	4,17924E-12*	4,79992E-12*
Inositol	2,08318E-12	2,19378E-11*	2,19378E-11*

(*) Significativo $p < 0,05$ pela análise de ANOVA e pelo teste t, amostras comparadas ao controle.

Entre esses 23 metabólitos, 12 apresentaram diferenças significativas quando se compara o controle com o cultivo sob estresse por etanol, a saber: ornitina, prolina, alanina, valina, citrato, malato, ácido nicotínico, gentibiose, melibiose, galactinol, inositol e lactulose. Portanto, essas variações foram relacionadas, principalmente, ao metabolismo de carboidratos, aminoácidos e ácidos orgânicos.

A análise de componentes principais (PCA) foi realizada utilizando os metabólitos que foram significativos estatisticamente, no intuito de reduzir a dimensionalidade dos dados e representar graficamente as alterações induzidas pelo etanol no perfil metabólico de *Kluyveromyces marxianus*, bem como identificar quais metabólitos estavam associados à condição de estresse por etanol.

A análise explicou 77,20% da variância acumulada nos dois primeiros componentes PC1 e PC2 (Figura 4). O primeiro componente (PC1) contribuiu com 62,56% da variância explicada, e o segundo componente (PC2) explicou 14,64% da variância dos dados. Nessa figura, pode-se observar que as amostras foram aglomeradas em três grupos distintos: leveduras na ausência de etanol no 3º quadrante (grupo vermelho), leveduras tratadas com etanol após 4 h no 1º quadrante (grupo azul) e leveduras tratadas com etanol depois de 1 h no 4º quadrante (grupo verde).

A separação espacial entre esses agrupamentos demonstrou diferença entre as amostras-controle (à esquerda) e as leveduras tratadas com etanol (à direita), ou seja, o etanol influenciou o perfil metabólito de *Kluyveromyces marxianus*. Além disso, os metabólitos apresentaram comportamentos distintos nesses agrupamentos. No grupo azul, eles apresentaram elevados valores nos dois componentes principais, no grupo verde demonstraram alto valor no primeiro componente e baixo no segundo, enquanto no grupo-controle foram verificados baixos valores nos dois componentes.

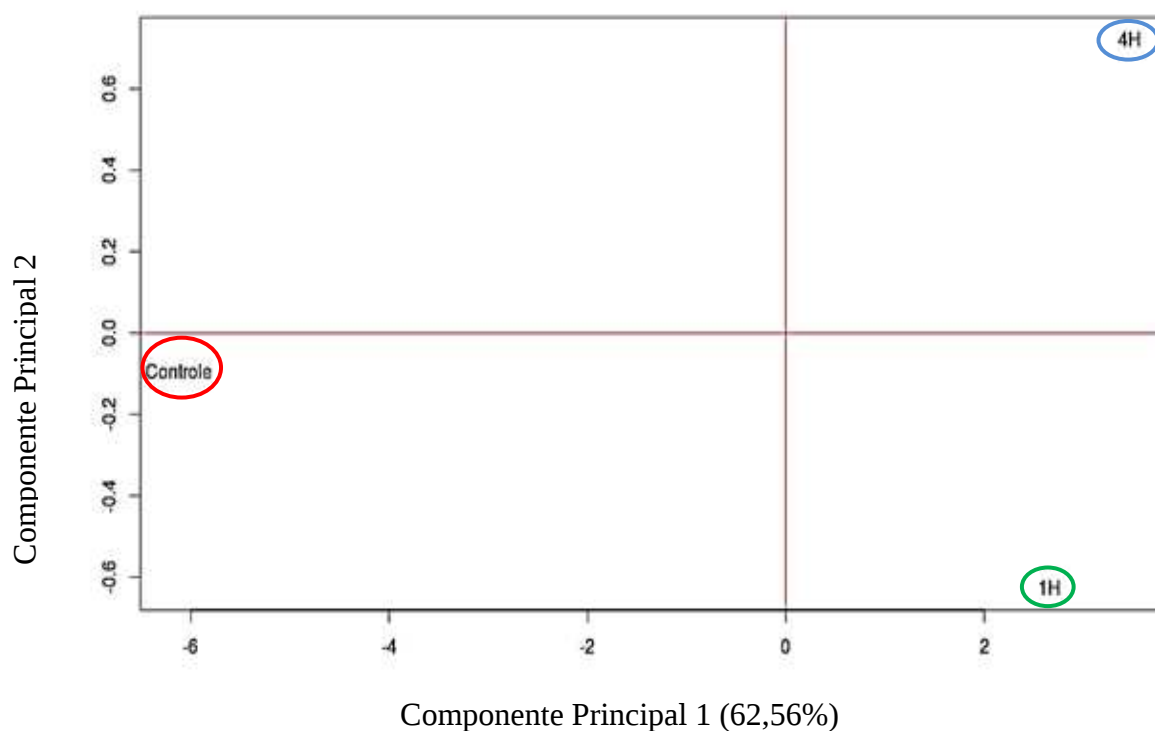


Figura 4 - Análise de componentes principais dos metabólitos produzidos por *Kluyveromyces marxianus* CCT 7735 na ausência (controle) e presença de etanol, períodos de 1 h e 4 h. Os metabólitos avaliados por meio da análise dos componentes principais foram: alanina, prolina, galactinol, gentibiose, melibiose, ornitina, valina, malato, lactulose, inositol, citrato, asparagina, aspartato, fenilalanina, glicina, glutamato, isoleucina, lisina, metionina, serina, tirosina e glicose. Os tratamentos correspondem a C = controle (grupo vermelho), E_{1h} = etanol após 1 h (grupo verde) e E_{4h} = etanol após 4 h (grupo azul).

O peso dos metabólitos na contribuição dos componentes principais demonstrou que as variáveis apresentaram correlação positiva com o componente principal 1 (Tabela 5). Isso significa que esses metabólitos influenciaram as amostras tratadas com etanol em relação às amostras-controle. No entanto, as amostras tratadas com etanol após 4 h foram influenciadas por variáveis que apresentaram correlação negativa e positiva com o componente principal 2. Citrato e lactulose foram os metabólitos que mais influenciaram as amostras após 4 h sob estresse por etanol em relação às amostras na ausência de etanol.

Tabela 5 - Peso dos metabólitos nos componentes principais

Metabólitos	PC1	PC2
Alanina	0,2014667	0,03032851
Ácido nicotínico	0,3114470	-0,05174621
Citrato	0,2800167	0,51732235
Galactinol	0,3106360	-0,14637947
Gentibiose	0,3062315	-0,16290141
Inositol	0,2948251	-0,24292323
Lactulose	0,2562590	0,75241607
Malato	0,3111138	-0,10030524
Melibiose	0,3095970	-0,12260878
Ornitina	0,3099985	-0,04401286
Prolina	0,3095445	-0,15314714
Valina	0,3117202	-0,07816148

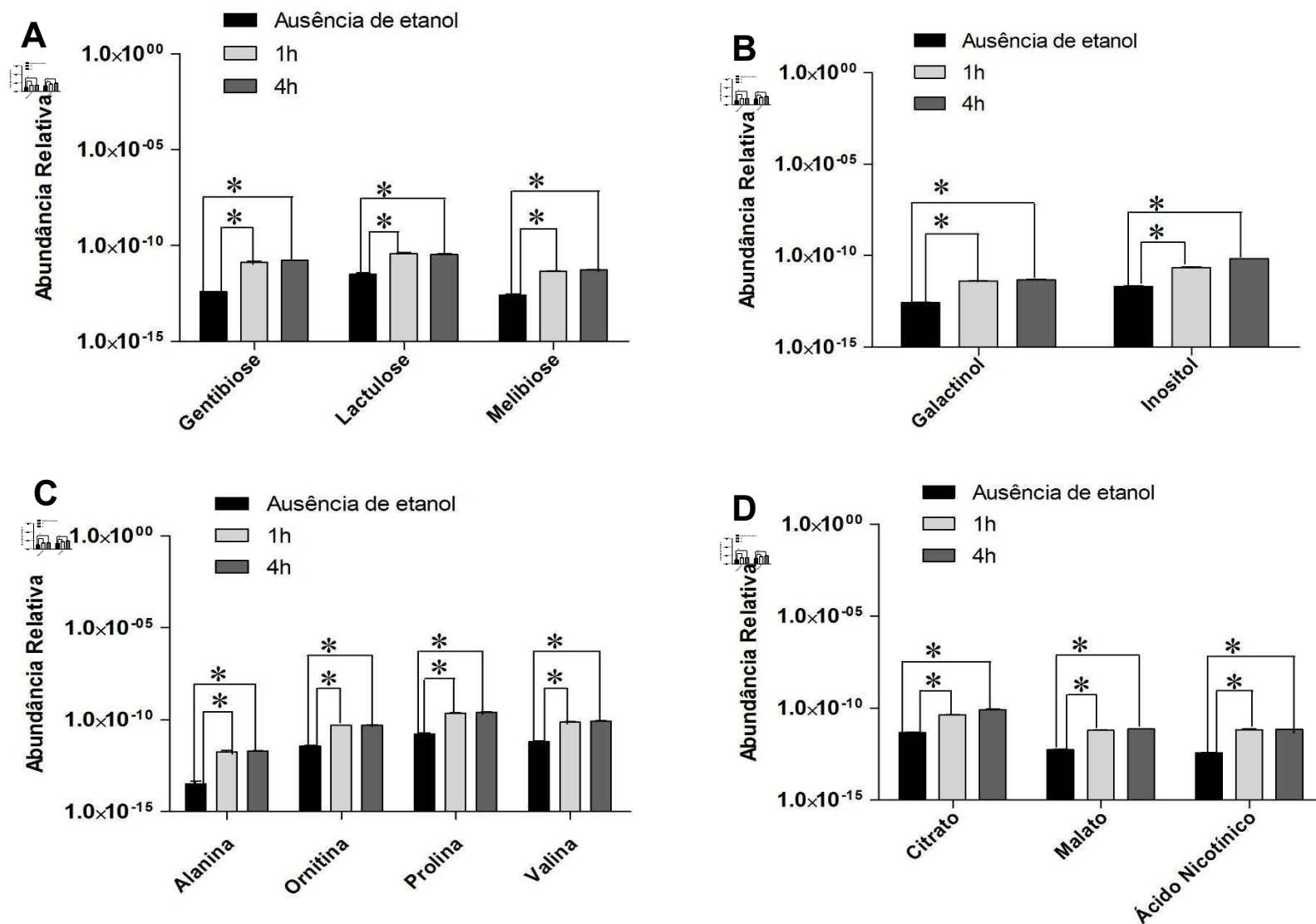


Figura 5 - Abundância relativa dos metabólitos identificados: metabólitos [(mg/ml)/nº célula]. **A:** açúcares; **B:** poliálcoois; **C:** aminoácidos; e **D:** ácidos orgânicos. As barras de erro indicam os desvios-padrão de três tratamentos biológicos. Significativo ($p < 0,05$).

4.3. Análise do consumo de etanol por *Kluyveromyces marxianus* CCT 7735

A fim de verificar se as leveduras consumiram o etanol do meio extracelular durante o período de 1 h a 4 h sob estresse por etanol, a concentração de etanol (gL^{-1}) foi determinada por HPLC.

O teor médio de etanol verificado para $t = 1 \text{ h}$ foi de $57,58 \text{ gL}^{-1}$, enquanto para $t = 4 \text{ h}$ esse valor foi de $48,60 \text{ gL}^{-1}$, conforme demonstrado na Tabela 4. A diferença de $8,98 \text{ gL}^{-1}$ observada durante esse intervalo de tempo indica que ocorreu diminuição no teor de etanol em $t = 4 \text{ h}$. Embora o teor de etanol tenha diminuído, o número de células verificadas durante o período de 1 h a 4 h não foi substancialmente alterado (Tabela4), sugerindo que as leveduras utilizaram o etanol do meio extracelular.

Tabela 4 - Número de células de *Kluyveromyces marxianus* CCT 7735 e concentração de etanol no sobrenadante

Número de células		Concentração de etanol (gL^{-1})	
1ch	4ch	1ch	4ch
$M_{1h} = 2,34 \times 10^{+11}$	$M_{4h} = 2,19 \times 10^{+11}$	$M_{1h} = 57,58$	$M_{4h} = 48,60$

5. DISCUSSÃO

O transcriptoma de *Kluyveromyces marxianus* CCT 7735 sob estresse por etanol foi obtido recentemente, cujos dados são mostrados na Figura 6, os quais ainda não foram publicados (manuscrito em preparação) e precisam ser confirmados. No intuito de compreender os mecanismos de respostas ao etanol, a expressão dos genes ch8_g282, ch6_g384, ch5_g512 e ch7_g159, que codificam as enzimas transcetolase, hexoquinase, succinato desidrogenase e isocitrato lisase, respectivamente, foi analisada por qPCR. A análise da expressão desses genes é importante porque eles codificam enzimas relacionadas ao metabolismo energético que contribuem para o entendimento das alterações metabólicas que ocorrem durante o estresse etanólico. Além disso, o perfil metabólico dessa levedura foi analisado nas mesmas condições de estresse utilizadas na obtenção dos dados do transcriptoma, a fim de compreender o efeito e as respostas adaptativas de *Kluyveromyces marxianus* CCT 7735 ao estresse por etanol.

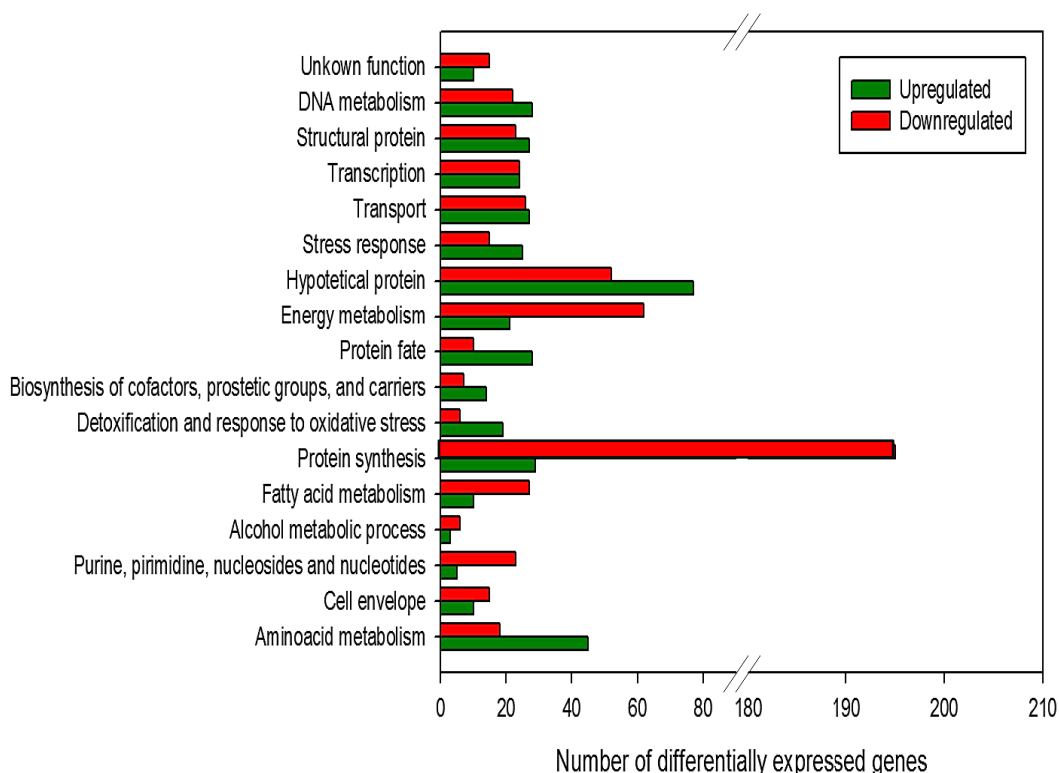


Figura 6 - Dados obtidos do transcriptoma de *Kluyveromyces marxianus* sob estresse por etanol.

Fonte: DINIZ et al., 2016 (manuscrito em preparação).

A análise do transcriptoma de *Kluyveromyces marxianus* CCT 7735 (Figura 7) indicou que a maioria dos genes que codificam enzimas da via glicolítica teve sua expressão reprimida no período de 1 h sob estresse por etanol. Observou-se ainda que o ativador transcricional de genes glicolíticos Gcr1p também teve sua expressão reprimida. Neste trabalho, verificou-se que a transcrição do gene que codifica a hexoquinase, enzima que catalisa a primeira reação da via glicolítica, foi reprimida. O perfil metabólico identificado nesta dissertação reforça os dados do transcriptoma, isto é, a via glicolítica é inibida pelo etanol. O acúmulo da lactulose, metabólito formado a partir da lactose, fonte de carbono usada nos experimentos, indica que houve pouca liberação de glicose e galactose, contribuindo, possivelmente, para a diminuição do fluxo de carbono, tanto na via glicolítica quanto na via de Leloir. Esta última via é responsável pelo metabolismo de galactose. É importante salientar que a análise do transcriptoma indicou que os genes ch2_g313, ch2_g311 e ch3_g90, que codificam as enzimas da via de Leloir galactocinase, galactose uridiltransferase e fosfoglicomutase, respectivamente, tiveram sua expressão reprimida; essas alterações são demonstradas na Figura 6. Estudo sobre as respostas metabólicas em *Saccharomyces cerevisiae* sob estresse por etanol também evidenciou que a via glicolítica foi inibida por esse agente estressor (LI et al., 2012).

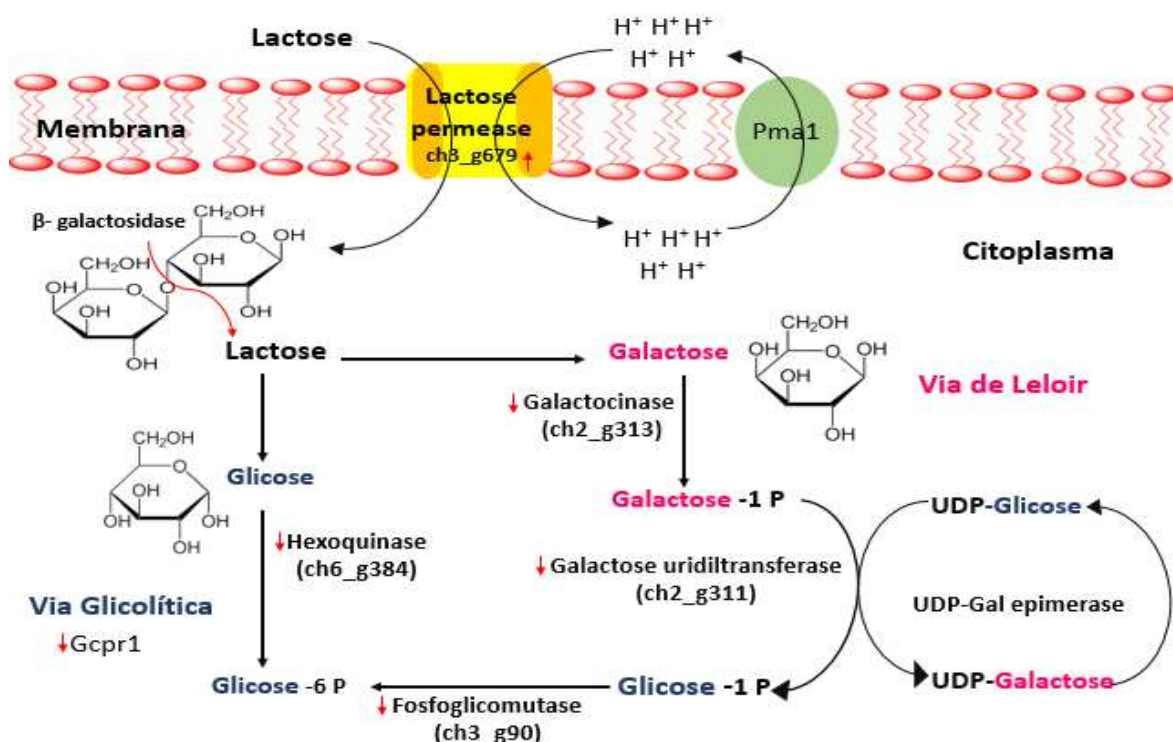


Figura 7 - Representação das principais alterações ocorridas nas vias relacionadas ao metabolismo de lactose.

Fonte: LEHNINGER et al., 2002.

Os níveis de malato e citrato, intermediários do ciclo do ácido tricarboxílico (TCA), aumentaram em resposta ao estresse por etanol. O excesso de citrato pode contribuir para a inibição da via glicolítica, tendo em vista que esse metabólito regula negativamente a enzima fosfofrutocinase. Além disso, o acúmulo de citrato indica que a demanda energética é baixa, o que resulta na diminuição do fluxo de carbono pelo TCA. O acúmulo de malato, intermediário do TCA, também indica que o fluxo de carbono nesse ciclo diminuiu. Esses resultados confirmam que os transcriptomas indicaram que os genes que codificam as enzimas aconitase hidratase, fumarato redutase e succinato desidrogenase do TCA foram reprimidos, como mostrado na Figura 8. Neste trabalho, foi confirmado que o gene que codifica a succinato desidrogenase (SDH) foi reprimido. Ding e colaboradores (2010) também verificaram que, sob estresse por etanol, o metabolismo central das linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* MAT α/a , MAT α (CGMCC 2758-1) e MAT α (CGMCC 2758-2) foi alterado.

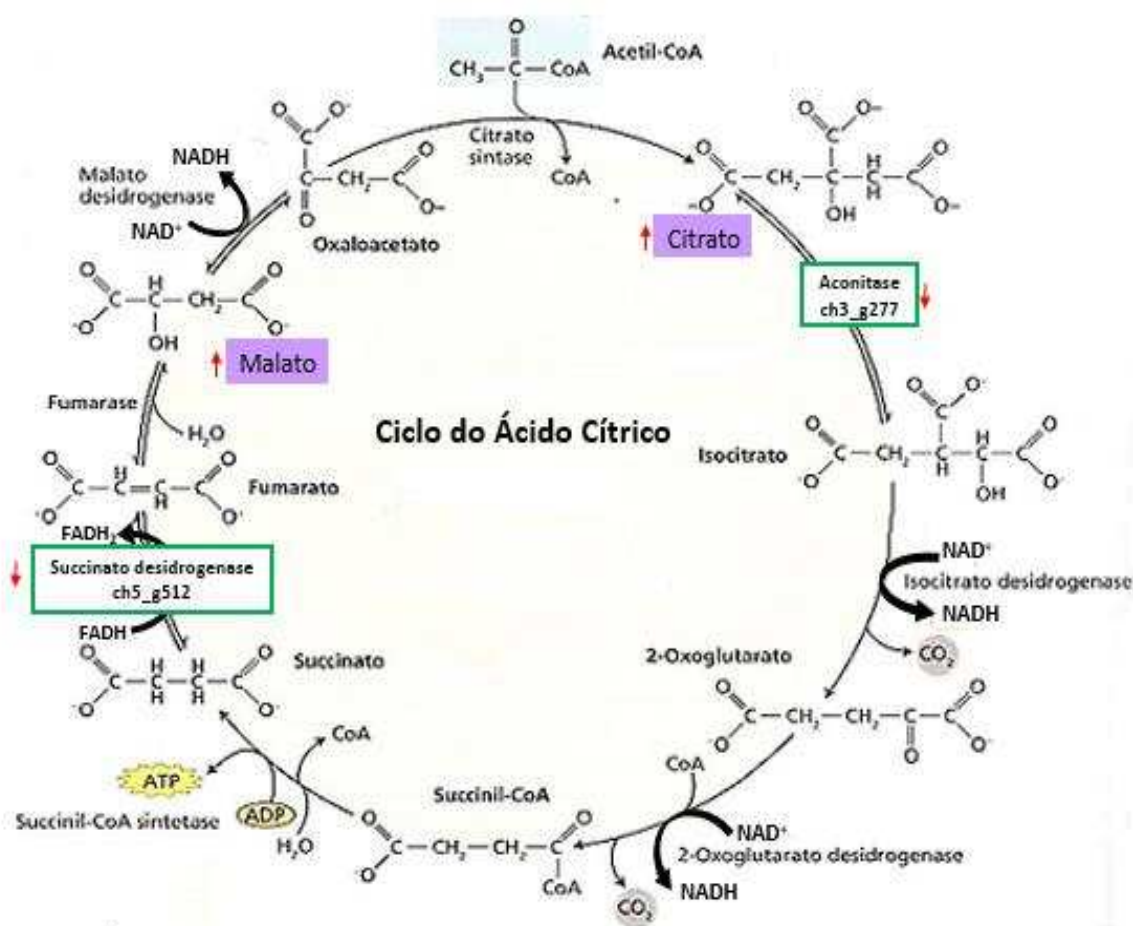


Figura 8 - Representação das alterações ocorridas no ciclo do ácido cítrico. **Fonte:** TORTORA et al., 2006.

Em condições de estresse por etanol, as leveduras reorganizam a expressão dos genes relacionados ao metabolismo energético para garantir a sobrevivência (STANLEY et al., 2010). A ativação dos genes *ch8_g282* e *ch7_g159* que codificam as enzimas transcetolase da via das pentoses fosfato e isocitrato liase do ciclo do glioxilato, respectivamente, após 4 h de exposição ao etanol, indica que a levedura utilizou parte do etanol consumido (Tabela 4) como fonte de carbono. O gene *ch6_g228*, que codifica malato sintase, enzima da via do glioxilato, observado no transcriptoma (manuscrito em preparação), também se encontrava ativo. Além disso, a ativação dos genes *ch8_g286* e *ch4_g103* que codificam, respectivamente, as enzimas álcool desidrogenase I e III reforçam a ideia de que *Kluyveromyces marxianus* utilizou o etanol do meio de cultura. Uma vez que não houve crescimento nesse período, esse consumo está relacionado com a adaptação da levedura à condição de estresse (Figura 9).

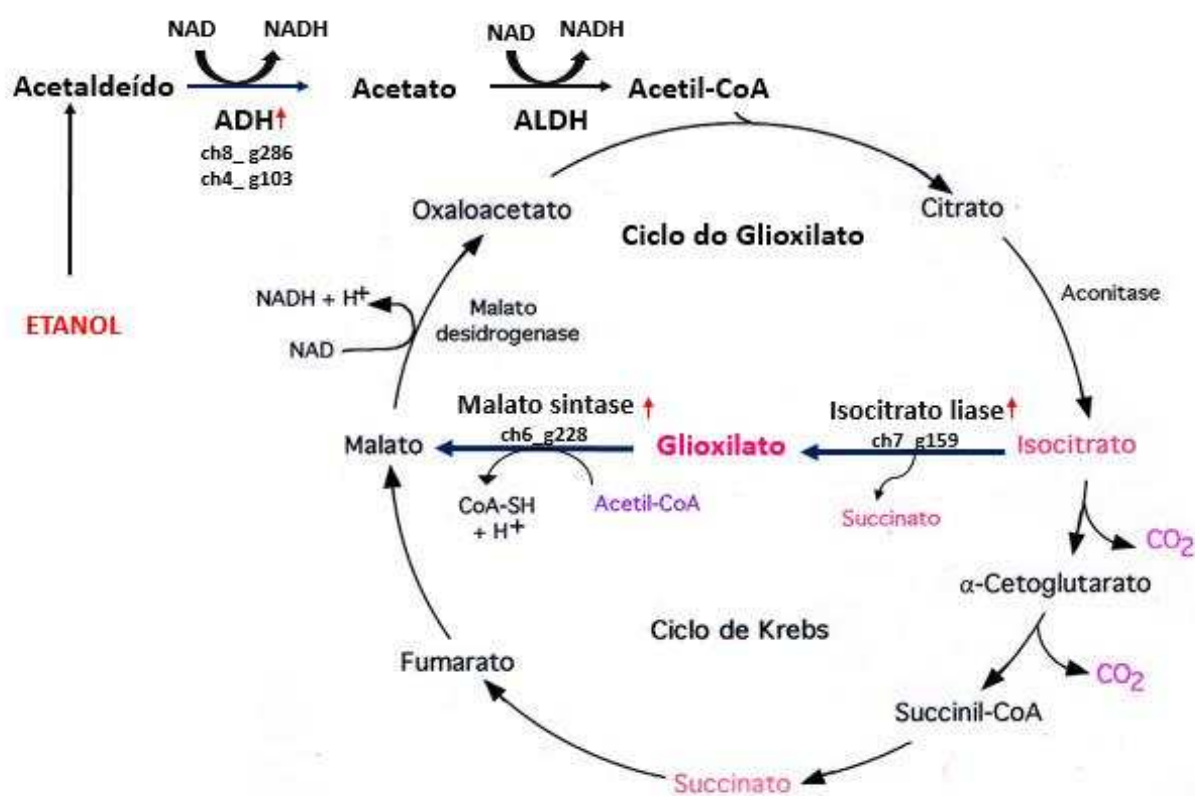


Figura 9 - Representação das alterações relacionadas ao consumo de etanol e sua utilização pelo ciclo do glioxilato. **Fonte:** TORTORA et al., 2006.

Os resultados do transcriptoma (Figura 6) indicaram que, além do gene que codifica a transcetolase, os genes *ch1_g725* e *ch6_g22*, que codificam as enzimas glicose 6-P isomerase e ribulose 3-P epimerase, respectivamente, tiveram aumento na sua expressão, sugerindo que

a via da pentose fosfato é importante na condição de estresse por etanol. Liu e colaboradores (2009) observaram que, em *Saccharomyces cerevisiae* NRRL Y-50316, a integração da expressão dos genes da via glicolítica e das pentoses fosfato foi fundamental na adaptação dessa levedura ao etanol. Além disso, a via das pentoses fosfato fornece NADPH, precursor na biossíntese de lipídeos que são essenciais para a tolerância ao etanol em leveduras (Figura 10).

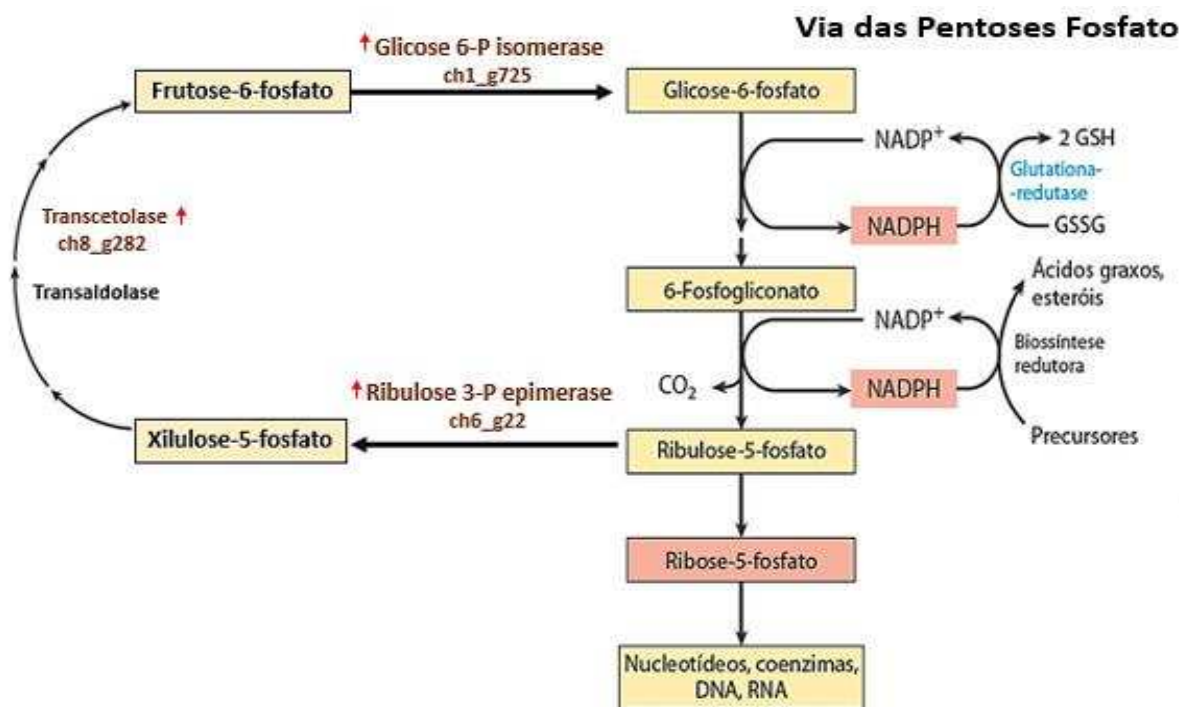


Figura 10 - Representação das alterações ocorridas na via das pentoses fosfato. Fonte: LEHNINGER et al., 2002.

O aumento no nível de ácido nicotínico após 4 h de exposição ao etanol indica que esse metabólito, precursor das coenzimas NADH e NADPH, foi acumulado em resposta ao desequilíbrio redox celular causado pelo etanol. NADPH é importante para a eliminação das espécies reativas de oxigênio (ROS) e a manutenção do balanço redox durante o estresse oxidativo em leveduras (PERRONE et al., 2008; TAN et al., 2009; PÉREZ-GALLARDO et al., 2013). Deve-se salientar que a exposição ao etanol leva à formação de espécies reativas de oxigênio em leveduras (DOĞAN et al., 2014).

O aumento nos níveis do aminoácido alanina em *Kluyveromyces marxianus* parece conferir tolerância ao estresse por etanol, uma vez que a adição desse aminoácido no meio de cultura de leveduras contribui para a tolerância ao estresse por etanol (PHAM; WRIGHT, 2008). Li e colaboradores (2013) verificaram que os aminoácidos alanina e prolina são

importantes para a proteção contra os danos oxidativos, prevenindo a geração de ROS e a oxidação de lipídeos e proteínas em eritrócitos de peixes. Em células endoteliais humanas, a alanina estimulou a resposta antioxidativa, protegendo as células do dano oxidativo (GROSSER et al., 2004).

Em *Saccharomyces cerevisiae*, a prolina exerce papel importante na sua adaptação ao etanol (SEKINE et al., 2007; YOSHIKAWA et al., 2009; LOURENÇO et al., 2013). Esse aminoácido promove a estabilidade das membranas, inibe a agregação de proteínas e elimina as espécies reativas de oxigênio (ROS) (DING et al., 2009; SASANO, 2012ab). A análise metabolômica de leveduras mutantes, *S. cerevisiae* BY4742, sob estresse por etanol demonstrou que os metabólitos, prolina, valina e inositol contribuíram para a tolerância dessas leveduras ao etanol (OHTA et al., 2015). Entretanto, apesar do acúmulo de prolina em *Kluyveromyces marxianus* sob estresse por etanol, nenhuma modificação na expressão dos genes de biossíntese de prolina foi notada durante a análise do transcriptoma dessa levedura. Contudo, verificou-se aumento na expressão dos genes *ch6_g208* e *ch3_g10*, codificadores de permeases específicas de prolina (Put4p), sugerindo que o acúmulo de prolina ocorreu em razão da sua captação do meio de cultura. Em células de *Saccharomyces cerevisiae* estressada por etanol, o aumento na concentração intracelular de prolina ocorreu pelo transporte mediado pela permease Put4 (KAINO; TAKAGI, 2008; ZHAO; BAI, 2009). A expressão do gene *PUT4* também é ativada durante os processos de fabricação de vinho em resposta ao estresse imposto durante a fermentação (MARKS et al., 2008; MA; LIU, 2010a). Prolina também protege as plantas da dissecação (TOSHIBA et al., 1997). Em condições de estresse hídrico, o acúmulo de ornitina é essencial para a síntese de prolina (HERVIEU et al., 1994). O acúmulo do aminoácido ornitina possivelmente contribuiu para a síntese de prolina, que pode estar associada à adaptação de *Kluyveromyces marxianus* ao estresse por etanol.

O aumento no conteúdo de inositol, observado em *Kluyveromyces marxianus* CCT 7735 sob estresse por etanol, pode estar relacionado à resposta a esse álcool. Ding e colaboradores (2010) verificaram que o aumento no nível de inositol contribuiu para proteger linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* haploides e diploides contra os danos causados pelo etanol. Em leveduras, os genes de biossíntese de fosfolipídios são ativados na presença de inositol (DERANIEH et al., 2015). A análise do transcriptoma de *Kluyveromyces marxianus* CCT 7735 sob estresse por etanol indicou que houve ativação dos genes *ch6_g244*, *ch6_g65*, *ch3_g137*, que codificam, respectivamente, as enzimas fosfatidilinositol, N-acetilglicosamina fosfatidilinositol e quinase fosfatidilinositol. Isso sugere que o acúmulo de inositol está relacionado à maior síntese de fosfatidilinositol nessa levedura. Em *Saccharomyces cerevisiae*

L2056, o maior nível de fosfatidilinositol na membrana contribuiu para a tolerância dessa linhagem ao etanol (HENDERSON et al., 2011). Além disso, o inositol contribuiu para a tolerância ao etanol em *Saccharomyces cerevisiae* K901, por estimular a atividade ATPase, evitando, assim, a acidificação do citoplasma (FURUKAWA et al., 2004). Em *Kluyveromyces marxianus* IGC 2671, a ativação da ATPase de membrana plasmática foi identificada como resposta ao estresse por etanol (ROSA; SÁ-CORREIA, 1992).

É conhecido que o etanol gera espécies reativas de oxigênio que inibem a função mitocondrial e causa danos oxidativos a lipídios, proteínas e DNA (BLEONCA et al., 2013; SPENCER et al., 2014). Galactinol, composto que pode ser originado a partir de inositol, contribui para a tolerância ao estresse oxidativo em plantas (VALLURU; ENDE, 2011). Em *Arabidopsis thaliana*, a super expressão do gene TsGOLS2 que codifica a enzima galactinol sintase leva ao aumento da síntese de galactinol, responsável por eliminar as espécies reativas de oxigênio formadas nessas plantas, tornando-as mais tolerantes ao estresse oxidativo (NISHIZAWA et al., 2008; SUN et al., 2013). É possível que o aumento no teor de galactinol em *K. marxianus* CCT 7735 sob estresse por etanol esteja relacionado ao estresse oxidativo induzido por etanol.

A trealose (α -D-glicopiranosil α -D-glicopiranosídeo) é um dissacarídeo presente em leveduras (LUCIO-ETEROVIC et al., 2005; LÓPEZ et al., 2008; PALABIYIK; GHODS, 2015). O acúmulo desse metabólito durante o estresse por etanol evita a agregação proteica e previne a desnaturação das proteínas (DING et al., 2009; RODRIGUEZ-NAVARRO et al., 2010; WANG et al., 2014). Além disso, em condições de estresse hídrico, trealose atua como osmoprotetor das membranas, protegendo-as da dissecação (GARG et al., 2002). O etanol reduz a quantidade de água das membranas, provocando estresse hídrico nessas estruturas (GARGA et al., 2002; PATRA et al., 2006). Contudo, esse metabólito não foi identificado no perfil metabólico de *Kluyveromyces marxianus*. Entretanto, o acúmulo dos dissacarídeos melibiose e lactulose sugere que esses podem desempenhar papel semelhante ao da trealose em *Kluyveromyces marxianus* sob estresse por etanol, haja vista que esses carboidratos são análogos da trealose (LEE et al., 2015). A gentibiose, isômero da trealose, também pode estar envolvida com a adaptação de leveduras ao etanol. Esse metabólito atua como osmoprotetor em bactérias *Rhizobium leguminosarum* e *Arthrobacter aureus* (GOUFFI et al., 1999). Gouffi e colaboradores (2000) verificaram que o acúmulo de gentibiose em *Sinorhizobium meliloti* é um mecanismo de osmoproteção dessas bactérias.

6. CONCLUSÕES

A análise da expressão dos genes ch8_g282, ch6_g384, ch5_g512 e ch7_g159, que codificam as enzimas transcetolase, hexoquinase, succinato desidrogenase e isocitrato lisase, respectivamente, permitiu confirmar alterações no metabolismo central de *Kluyveromyces marxianus* CCT 7735 sob estresse por etanol.

A análise de componentes principais indicou que o etanol promoveu alterações no perfil metabólico dessa levedura. O aumento no conteúdo dos metabólitos ácido nicotínico, alanina, prolina, inositol, gentibiose, melibiose e lactulose parece estar associado às respostas adaptativas ao etanol em *Kluyveromyces marxianus* CCT 7735.

A análise do perfil metabólico, juntamente com as informações do transcriptoma, indicou que a via glicolítica é inibida pelo etanol e a via da pentose fosfato e o ciclo do glioxilato são importantes no período de 4 h sob estresse por etanol em razão, possivelmente, do consumo desse álcool.

Portanto, a associação entre os dados do transcriptoma e do perfil metabólico de *Kluyveromyces marxianus* permitiu identificar algumas das respostas adaptativas ao etanol.

7. REFERÊNCIAS

- ABDEL-BANAT, B. M. A.; HOSHIDA, H.; ANO, A.; HOSHIDA, H.; NONKLANG, S.; AKADA, R. High-temperature fermentation: how can processes for ethanol production at high temperatures become superior to the traditional process using mesophilic yeast? **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 85, p. 861-867, 2010.
- AGUILERA, F.; PEINADO, R. A.; MILLÁN, C.; ORTEGA, J. M.; MAURICIO, J. C. Relation ship between ethanol tolerance, H⁺-ATPase activity and the lipid composition of the plasma membrane in different wine yeast strains. **International Journal of Food Microbiology**, v. 110, p. 34-42, 2006.
- ALEXANDRE, H.; ANSANAY-GALEOTE, V.; BLONDIN, S. D. B. Global gene expression during short-term ethanol stress in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEBS Letters**, v. 498, p. 98-103, 2001.
- ANDERSON, M. J.; BARKER, S. L.; BOONE, C.; MEASDAY, V. Identification of RCN1 and RSA3 as ethanol-tolerant genes in *Saccharomyces cerevisiae* using a high copy barcoded library. **FEMS Yeast Research**, v. 12, p. 48-60, 2012.
- ANTONI, D.; ZVERLOV, V. V.; SCHWARZ, W. H. Biofuels from microbes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 77, p. 23-35, 2007.
- ARAKI, Y.; WU, H.; KITAGAKI, H.; AKAO, T.; TAKAGI, T.; SHIMOI, H. Ethanol stress stimulates the Ca²⁺-mediated calcineurin/Crz1 pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 107, p. 1-6, 2009.
- ARIYANTI, D.; HADIYANTO, H. Ethanol Production from Whey by *Kluyveromyces marxianus* in Batch Fermentation System: Kinetics Parameters Estimation. **Bulletin of Chemical Reaction Engineering & Catalysis**, v. 7, p. 179-184, 2013.
- AUESUKAREE, C.; DAMNERNSAWAD, A.; KRUATRACHUE, M.; POKETHITIYOOK, P.; BOONCHIRD, C.; KANEKO, Y.; HARASHIMA, S. Genome-wide identification of genes involved in tolerance to various environmental stresses in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal Applied Genetic**, v. 50, p. 301-310, 2009.
- BAI, F. W.; ANDERSON, W. A.; MOO-YOUNG, M. Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks. **Biotechnology Advances**, v. 26, p. 89-105, 2008.

BERRY, D. B.; GUAN, Q.; HOSE, J.; HAROON, S.; GEBBIA, M.; HEISLER, L. E.; NISLOW, C.; GIAEVER, G.; GASCH, A. P. Multiple means to the same end: the genetic basis of acquired stress resistance in yeast. **PLOS Genetics**, v. 7, p. 1-11, 2011.

BLEOANCA, I.; SILVA, A. R. C.; PIMENTEL, C.; POUSADA, C. R.; MENEZES, R. A. Relationship between ethanol and oxidative stress in laboratory and brewing yeast strains. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 116, p. 697-705, 2013.

BRAGANÇA, C. R. S.; COLOMBO, L. T.; ROBERTI, A. S.; ALVIM, M. C. T.; CARDOSO, S. A.; REIS, K. C. P.; PAULA, S. O.; SILVEIRA, W. B.; PASSOS, F. M. L. Construction of recombinant *Kluyveromyces marxianus* UFV-3 to express dengue virus type 1 nonstructural protein 1 (NS1). **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, p. 1191-1203, 2015.

BRÜNING, B. A.; PRÉVOST, S.; STEHLE, R.; STEITZ, R.; FALUS, P.; FARAGO, B.; HELLWEG, T. Bilayer undulation dynamics in unilamellar phospholipid vesicles: effect of temperature, cholesterol and trehalose. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1838, p. 2412-2419, 2014.

CANELAS, A. B.; RAS, C.; PIERICK, A. T.; van DAM, J. C.; HEIJNEN, H. J.; van GULIK, W. M. Leakage-free rapid quenching technique for yeast metabolomics. **Metabolomics**, v. 4, p. 226-239, 2008.

CANIZO, J. R.; CORTES-CALLEJAS, M. L.; DAVILA-GOMEZ, F. J.; HEREDIA-OLEA, E.; PEREZ-CARRILLOA, E.; SERNA-SALDÍVAR, S. O. Release of potentially fermentable sugars during dilute acid treatments of Bermuda grass NK37 (*Cynodon dactylon*) for second-generation ethanol production. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 89, p. 1941-1947, 2014.

CASTRO, R. C. A.; ROBERTO, I. C. Selection of a thermotolerant *Kluyveromyces marxianus* strain with potential application for cellulosic ethanol production by simultaneous saccharification and fermentation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 172, p. 1553-1564, 2014.

COSTA, D. A.; SOUZA, C. J. A.; COSTA, P. S.; RODRIGUES, M. Q. R. B.; SANTOS, A. F.; LOPES, M. R.; GENIER, H. L. A.; SILVEIRA, W. B.; FIETTO, L. G. Physiological characterization of thermotolerant yeast for cellulosic ethanol production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, p. 3829-3840, 2014.

DERANIEH, R. M.; SHI, Y.; TARSIO, M.; CHEN, Y.; MCCAFFERY, J. M.; KANE, P. M.; GREENBERG, M. L. Perturbation of the vacuolar-ATPase: a novel consequence of inositol depletion. **Journal of Biological Chemistry**, v. 29, p. 1-32, 2015.

DIAS, M. O. S.; JUNQUEIRA, T. L.; CAVALETT, O.; PAVANELLO, L. G.; CUNHA, M. P.; JESUS, C. D. F.; FILHO, R. M. Biorefineries for the production of first and second generation ethanol and electricity from sugarcane. **Applied Energy**, v.109, p. 72-78, 2013.

DICKEY, A. N.; YIM, W. S.; FALLER, R. Using ergosterol to mitigate the deleterious effects of ethanol on bilayer structure. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 113, p. 2388-2397, 2010.

DING, J.; HUANG, X.; ZHANG, L.; ZHAO, N.; YANG, D.; ZHANG, K. Tolerance and stress response to ethanol in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 85, p. 253-263, 2009.

DING, M. Z.; LI, B. Z.; CHENG, J. S.; YUAN, Y. J. Metabolome analysis of differential responses of diploid and haploid yeast to ethanol stress. **OMICS**, v. 14, p. 553-561, 2010.

DINIZ, R. H. S.; RODRIGUES, M. Q. R. B.; FIETTO, L. G.; PASSOS, F. M. L.; SILVEIRA, W. B. The high fermentative metabolism of *Kluyveromyces marxianus* UFV-3 relies on the increased expression of key lactose metabolic enzymes. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 101, p. 541-50, 2012.

DINIZ, R. H. S.; RODRIGUES, M. Q. R. B.; FIETTO, L. G.; PASSOS, F. M. L.; SILVEIRA, W. B. Optimizing and validating the production of ethanol from cheese whey permeate by *Kluyveromyces marxianus* UFV-3. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 3, p. 111-117, 2014.

DOĞAN, A.; DEMIRCI, S.; AYTEKIN, A. O.; ŞAHİN, F. Improvements of tolerance to stress conditions by genetic engineering in *Saccharomyces cerevisiae* during ethanol production. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 174, p. 28-42, 2014.

DONG, M.; FENG, L.; KUANG, S. Y.; LIU, Y.; JIANG, J.; HU, K.; JIANG, W. D.; LI, S. H.; TANG, L.; ZHOU, X. Q. Growth, body composition, intestinal enzyme activities and microflora of juvenile Jian carp (*Cyprinus carpio* var. Jian) fed graded levels of dietary valine. **Aquaculture Nutrition**, v. 19, p. 1-14, 2013.

FELDMANN, H. **Yeast: molecular and cell biology**. 2nd ed. [S.l. : s.n.], 2012. p. 464.

FLORÊNCIO, I. M.; FLORENTINO, E. R.; SILVA, F. L. H.; MARTINS, R. S.; CAVALCANTI, M. T.; GOMES, J. Production of ethanol from industrial whey. **Revista Brasileira Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 17, p. 1088-1092, 2013.

FONSECA, G. G.; HEINZLE, E.; WITTMANN, C.; GOMBERT, A. K. The yeast *Kluyveromyces marxianus* and its biotechnological potential. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 79, p. 339-354, 2008.

FURUKAWA, K.; KITANO, H.; MIZOGUCHI, H.; HARA, S. Effect of cellular inositol content on ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* in Sake Brewing. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 98, p. 107-113, 2004.

GABARDO, S.; RECH, R.; ROSA, C. A.; AYUB, M. A. Z. Dynamics of ethanol production from whey and whey permeate by immobilized strains of *Kluyveromyces marxianus* in batch and continuous bioreactors. **Renewable Energy**, v. 69, p. 89-96, 2014.

GIL, J. V.; JIMENEZ, M. M.; PASTOR, A.; HUERTA, T. Aroma compounds in wine as influenced by apiculate yeasts. **Journal of Food Science**, v. 61, p. 1247-1250, 1996.

GONG, Y.; KAKIHARA, Y.; KROGAN, N.; GREENBLAT, T. J.; EMILI, A.; ZHANG, Z.; HOURY, W. A. An atlas of chaperone-protein interactions in *Saccharomyces cerevisiae*: implications to protein folding pathways in the cell. **Molecular Systems Biology**, v. 5, p. 1-14, 2009.

GOSHIMA, T.; TSUJI, M.; INOUE, H.; YANO, S.; HOSHINO, T.; MATSUSHIKA, A. Bioethanol production from lignocellulosic biomass by a novel *Kluyveromyces marxianus* strain. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v.77, p. 1505-1510, 2013.

GOUFFI, K.; BLANCO, C. Is the accumulation of osmoprotectant the unique mechanism involved in bacterial osmoprotection? **International Journal of Food Microbiology**, v. 55, p.171-174, 2000.

GOUFFI, K.; PICA, N.; PICHEREAU, V.; BLANCO, C. Disaccharides as a new class of nonaccumulated osmoprotectants for *Sinorhizobium meliloti*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, p. 1491-1500, 1999.

GROSSER, N.; OBERLE, S.; BERNDT, G.; ERDMANN, K.; HEMMERLE, K.; SCHRODER, H. Antioxidant action of L-alanine: heme oxygenase-1 and ferritin as possible mediators. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 314, p. 351-355, 2004.

GUIMARÃES, P. M. R.; TEIXEIRA, J. A.; DOMINGUES, L. Fermentation of lactose to bio-ethanol by yeasts as part of integrated solutions for the valorization of cheese whey. **Biotechnology Advances**, v. 28, p. 375-384, 2010.

GUO, X.; JUN, Z.; XIAO, D. Improved ethanol production by mixed immobilized cells of *Kluyveromyces marxianus* and *Saccharomyces cerevisiae* from cheese whey powder solution fermentation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 160, p. 532-538, 2010.

GUPTA, A.; VERMA, J. P. Sustainable bio-ethanol production from agro-residues: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 41, p. 550-567, 2015.

HENDERSON, C. M.; LOZADA-CONTRERAS, M.; NARAVANE, Y.; LONGO, M. L.; BLOCK, D. E. Analysis of major phospholipid species and ergosterol in fermenting industrial yeast strains using atmospheric pressure ionization ion-trap mass spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, p. 12761-12770, 2011.

HERVIEU, F.; DILY, F. L.; BILLARD, J. P.; HUAULT, C. Effects of water-stress on proline content and ornithine aminotransferase activity of radish cotyledons. **Phytochemistry**, v. 37, p. 1227-1231, 1994.

HICKERT, L. R.; PEREIRA, F. C.; SOUZA-CRUZ, P. B.; ROSA, C. A.; AYUB, M. A. Z. Ethanogenic fermentation of co-cultures of *Candida shehatae* HM 52.2 and *Saccharomyces cerevisiae* ICV D254 in synthetic medium and rice hull hydrolysate. **Bioresource Technology**, v. 131, p. 508-514, 2013.

HONG, M. F.; LEE, K-S.; YUB, B. J.; SUNGA, Y-J.; PARK, S. M.; KOO, H. M.; KWEONA, H-D.; PARK, J. C.; JINC, Y-S. Identification of gene targets eliciting improved alcohol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae* through inverse metabolic engineering. **Journal of Biotechnology**, v. 149, p. 52-59, 2010.

HU, N.; YUAN, B.; SUN, J.; WANG, S.; LI, F. Thermotolerant *Kluyveromyces marxianus* and *Saccharomyces cerevisiae* strains representing potentials for bioethanol production from Jerusalem artichoke by consolidated bioprocessing. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.95, p. 1359-1368, 2012.

- KAHR, H.; HELMBERGER, S.; JÄGER, A. G. Yeast adaptation on the substrate straw. **Bioenergy Technology**, v. 8, p. 492-499, 2011.
- KAINO, T.; TAKAGI, T. Gene expression profiles and intracellular contents of stress protectants in *Saccharomyces cerevisiae* under ethanol and sorbitol stresses. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 79, p. 273-283, 2008.
- KIM, S.; KIM, Y. S.; KIM, H.; JIN, I.; YOON, H. S. *Saccharomyces cerevisiae* KNU5377 stress response during high-temperature ethanol fermentation. **Molecules and Cells**, v. 35, p. 210-218, 2013a.
- KIM, S.; PARK, J. M.; KIM, C. H. Ethanol production using whole plant biomass of jerusalem artichoke by *Kluyveromyces marxianus* CBS1555. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 169, p. 1531-1545, 2013b.
- KITAGAKI, H.; TAKAGI, H. Mitochondrial metabolism and stress response of yeast: applications in fermentation technologies. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 117, p. 383-393, 2014.
- KOUSHKI, M.; JAFARI, M.; AZIZI, M. Comparison of ethanol production from cheese whey permeate by two yeast strains. **Journal of Food Science Technology**, v. 49, p. 614-619, 2012.
- LANE, M. M.; MORRISSEY, J. P. *Kluyveromyces marxianus*: a yeast emerging from its sister's shadow. **Fungal Biology Reviews**, v. 24, p. 17-26, 2010.
- LANE, M. M.; BURKE, N.; KARREMAN, R.; WOLFE, K. H.; O'BYRNE, C. P.; MORRISSEY, J. P. Physiological and metabolic diversity in the yeast *Kluyveromyces marxianus*. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 100, p. 507-519, 2011.
- LEE, G. C.; LIN, C. H.; TAO, Y. C.; YANG, J. M.; HSU, K. C.; HUANG, Y. J.; HUANG, S. H.; KUNG, P. J.; CHEN, W. L.; WANG, M. C.; WU, Y. R.; CHEN, M. C.; LIN, J. Y.; LI, H. M. H.; CHEN, G. J. L. The potential of lactulose and melibiose, two novel trehalase-indigestible and autophagy-inducing disaccharides, for polyQ-mediated neurodegenerative disease treatment. **NeuroToxicology**, v. 48, p. 120-130, 2015.
- LEI, J.; ZHAO, X.; GE, X.; BAI, F. Ethanol tolerance and the variation of plasma membrane composition of yeast floc populations with different size distribution. **Journal of Biotechnology**, v. 131, p. 270-275, 2007.

LEHNINGER, A.; NELSON, D.; COX, M. **Principios de bioquímica**. 2nd edition. Sarvier, 2002.

LERTWATTANASAKUL, N.; SUPRAYOGI, A.; MURATA, M.; RODRUSSAMEE, N.; LIMTONG, S.; KOSAKA, T.; YAMADA, M. Essentiality of respiratory activity for pentose utilization in thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* DMKU 3-1042. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 103, p. 933-945, 2013.

LEWIS, J. A.; ELKON, I. M.; MCGEE, M. A.; HIGBEE, A. J.; GASCH, A. P. Exploiting natural variation in *Saccharomyces cerevisiae* to identify genes for increased ethanol resistance. **Genetics**, v. 186, p. 1197-205, 2010.

LI, H. T.; FENGA, L.; JIANGA, W. D.; LIUA, Y.; JIANGA, J.; LI, S. H.; ZHOU, X. Q. Oxidative stress parameters and anti-apoptotic response to hydroxyl radicals in fish erythrocytes: Protective effects of glutamine, alanine, citrulline and proline. **Aquatic Toxicology**, v. 106, p. 169-179, 2013.

LI, H.; MA, M. L.; LUO, S.; ZHANG, R. M.; HAN, P.; HU, W. Metabolic responses to ethanol in *Saccharomyces cerevisiae* using a gas chromatography tandem mass spectrometry-based metabolomics approach. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 44, p. 1087-1096, 2012.

LI, P.; MAI, K. S.; TRUSHENSKI, J.; WU, G. Y. New developments in fish amino acid nutrition: towards functional and environmentally oriented aquafeeds. **Amino Acids**, v. 37, p. 43-53, 2009.

LIU, Z. L.; MA, M.; SONG, M. Evolutionarily engineered ethanologenic yeast detoxifies lignocellulosic biomass conversion inhibitors by reprogrammed pathways. **Molecular Genetics and Genomics**, v. 282, p. 233-244, 2009.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)). **Methods**, v. 25, p. 402-408, 2001.

LÓPEZ, M.; HERRERA-CERVERA, J. A.; IRIBARNE, A.; TEJERA, N. A.; LLUCH, C. Growth and nitrogen fixation in *Lotus japonicus* and *Medicago truncatula* under NaCl stress: Nodule carbon metabolism. **Journal of Plant Physiology**, v. 165, p. 641-665, 2008.

LOURENÇO, A. B.; ROQUE, F. C.; TEIXEIRA, M. C.; ASCENSO, J. R.; CORREIA, I. S. Quantitative ¹H-NMR-metabolomics reveals extensive metabolic reprogramming and the effect of the aquaglyceroporin *fps1* in ethanol-stressed yeast cells. **PLOS ONE**, v. 8, p. 1-12, 2013.

LUCIO-ETEROVIC, A. K. B.; JORGE, J. A.; POLIZELI, M. L. T. M.; TERENCEZIT, H. F. Biochemical characterization of the trehalase of thermophilic fungi: an enzyme with mixed properties of neutral and acid trehalase. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1723, p. 201-207, 2005.

MA, M.; LIU, L. Z. Quantitative transcription dynamic analysis reveals candidate genes and key regulators for ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. **BMC Microbiology**, v. 10, p. 1471-2180, 2010b.

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

MAHMUD, S. A.; HIRASAWA, T.; FURUSAWA, C.; YOSHIKAWA, K.; SHIMIZU, H. Understanding the mechanism of heat stress tolerance caused by high trehalose accumulation in *Saccharomyces cerevisiae* using DNA microarray. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 113, p. 526-528, 2012.

MANZETTI, S.; ANDERSEN, O. A review of emission products from bioethanol and its blends with gasoline. Background for new guidelines for emission control. **Fuel**, v. 140, p. 293-301, 2015.

MARKS, V. D.; SUI, S. J. H.; ERASMUS, D.; van der MERWE, G. K.; BRUMM, J.; WASSERMAN, W. W.; BRYAN, W.; van VUUREN, H. J. J. Dynamics of the yeast transcriptome during wine fermentation reveals a novel fermentation stress response. **FEMS Yeast Research**, v. 8, p. 35-52, 2008.

MARYANA, R.; MA'RIFATUNB, D.; WHENI, I. A.; SATRIYO, K. W.; RIZALA, W. A. Alkaline pretreatment on sugarcane bagasse for bioethanol production. **Energy Procedia**, v. 47, p. 250-254, 2014.

MCCLELLAN, A. J.; XIA, Y.; DEUTSCHBAUER, A. M.; DAVIS, R. W.; GERSTEIN, M.; FRYDMAN, J. Diverse cellular functions of the Hsp90 molecular chaperone uncovered using systems approaches. **Cell**, v. 5, p. 121-135, 2007.

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

NICOLAOU, S. A.; GAIDA, S. M.; PAPOUTSAKIS, E. T. A comparative view of metabolite and substrate stress and tolerance in microbial bioprocessing: From biofuels and chemicals, to biocatalysis and bioremediation. **Metabolic Engineering**, v. 12, p. 307-331, 2010.

NISHIZAWA, A.; YABUTA, Y.; SHIGEOKA, S. Galactinol and raffinose constitute a novel function to protect plants from oxidative damage. **Plant Physiology**, v. 147, p. 1251-1263, 2008.

NOGUCHI, C.; WATANABE, D.; ZHOU, Y.; AKAO, K.; SHIMOI, H. Association of constitutive Hyperphosphorylation of Hsf1p with a defective ethanol stress response in *Saccharomyces cerevisiae* sake yeast strains. **Applied and Environmental Microbiology**, p. 385-392, 2011.

OHTA, E.; NAKAYAMA, Y.; MUKAI, Y.; BAMBA, T.; FUKUSAK, E. Metabolomic approach for improving ethanol stress tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 15, p. 1-7, 2015.

ORTIZ, P. S.; JR., S. O. Exergy analysis of pretreatment processes of bioethanol production based on sugarcane bagasse. **Energy**, v. 76, p. 130-138, 2014.

PAIS, T. M.; FOULQUIE'-MORENO, M. R.; HUBMANN, G.; DUITAMA, J.; SWINNEN, S.; GOOVAERTS, A.; YANG, Y.; DUMORTIER, F.; THEVELEIN, J. M. Comparative polygenic analysis of maximal ethanol accumulation capacity and tolerance to high ethanol levels of cell proliferation in yeast. **PLOS Genetics**, v. 6, p. 1-10, 2013.

PALABIYIK, B.; GHODS, F. J. Role of oxidative stress response and trehalose accumulation in the longevity of fission yeast. **Jundishapur Journal Microbiology**, v. 8, p. 1-5, 2015.

PASCHOS, T.; XIROS, C.; CHRISTAKOPOULOS, P. Ethanol effect on metabolic activity of the ethalogenic fungus *Fusarium oxysporum*. **BMC Biotechnology**, v. 15, p. 1-12, 2015.

PATRA, M.; SALONEN, E.; TERAMA, E.; VATTULAINEN, I.; FALLER, R.; LEE, B. W.; HOLOPAINEN, J.; KARTTUNEN, M. under the influence of alcohol: the effect of ethanol and methanol on lipid bilayers. **Biophysical Journal**, v. 90, p. 1121-1135, 2006.

PÉREZ-GALLARDO, R. V.; BRIONES, L. S.; DÍAZ-PÉREZ, A. L.; GUTIÉRREZ, S.; RODRIGUEZ-ZAVALA, J. S.; CAMPOS-GARCIA, J. Reactive oxygen species production induced by ethanol in *Saccharomyces cerevisiae* increases because of a dysfunctional mitochondrial iron-sulfur cluster assembly system. **FEMS**, v. 13, p. 804-819, 2013.

PERRONE, G. G.; TAN, S. H.; DAWES, I. W. Reactive oxygen species and yeast apoptosis. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1783, p. 1354-1368, 2008.

PFEIFFER, T.; MORLEY, A. An evolutionary perspective on the Crabtree effect. **Frontiers in Molecular Biosciences**, v. 1, p. 1-6, 2014.

PHAM, T. K.; WRIGHT, P. C. Proteomic analysis of calcium alginate-immobilized *saccharomyces cerevisiae* under high-gravity fermentation conditions. **Journal Proteome Research**, v. 2, p. 515-25, 2008.

PINA, C.; ANTÓNIO, J.; HOGG, T. Ethanol tolerance of five non-*Saccharomyces* wine yeasts in comparison with a strain of *Saccharomyces cerevisiae* - influence of different culture conditions. **Food Microbiology**, v. 21, p. 439-447, 2004.

PLAZA, M. A.; MATHIS, A. G.; CISNEROS, R. N.; GUERRERO, M. C.; MANZO-ÁVALOS, S.; HERNANDEZ, J. C. G.; SAAVEDRA-MOLINA, A. Respiratory capacity of the *Kluyveromyces marxianus* yeast isolated from the mezcal process during oxidative stress. **World Journal Microbiology and Biotechnology**, v. 29, p. 1279-1287, 2013.

PURIA, R.; MANNAN, M. A.; CHOPRA-DEWASTHALY, R.; GANESAN, K. Critical role of RPI1 in the stress tolerance of yeast during ethanolic fermentation. **FEMS Yeast Research**, v. 9, p. 1161-1171, 2009.

PUROHIT, G. K.; MAHANTY, A.; MOHANTY, B. P.; MOHANTY, S. Evaluation of housekeeping genes as references for quantitative real-time PCR analysis of gene expression in the murrel *Channa striatus* under high-temperature stress. **Fish Physiology and Biochemistry**, p. 1-11, 2015.

RICCI, M.; AGGRAVI, M.; BONECHI, C.; MARTINI, S.; ALOISI, A. M.; ROSSI, C. Metabolic response to exogenous ethanol in yeast: An in vivo statistical total correlation NMR spectroscopy approach. **Journal Bioscience**, v. 37, p. 749-755, 2012.

ROCHA, S. N.; NETO, J. A.; GOMBERT, A. K. Physiological diversity within the *Kluyveromyces marxianus* species. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 100, p. 619-630, 2011b.

RODRÍGUEZ-NAVARRO, J. A.; RODRÍGUEZ, L.; CASAREJOS, M. J.; SOLANO, R. S.; GÓMEZ, A.; PERUCHO, J.; CUERVO, A. M.; YÉBENES, J. G.; MENA, M. Trehalose ameliorates dopaminergic and tau pathology in parkin deleted/tau overexpressing mice through autophagy activation. **Neurobiology of Disease**, v. 39, p. 423-438, 2010.

RODRUSSAMEE, N.; LERTWATTANASAKUL, N.; HIRATA, K.; SUPRAYOGI, A; LIMTONG, S.; KOSAKA, T.; YAMADA, M. Growth and ethanol fermentation ability on hexose and pentose sugars and glucose effect under various conditions in thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 90, p. 1573-1586, 2011.

ROESSNER, U.; WAGNER, C.; KOPKA, J.; TRETHEWEY, R. N.; WILLMITZER, L. Simultaneous analysis of metabolites in potato tuber by gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Plant**, v. 23, p. 131-142, 2000.

ROSA, M. F.; SÁ-CORREIA, I. Ethanol tolerance and activity of plasma membrane ATPase in *Kluyveromyces marxianus* and *Saccharomyces cerevisiae*. **Enzyme and Microbiology Technology**, v. 14, p. 23-27, 1992.

RUBIO-TEIXEIRA, M. A. A comparative analysis of the GAL genetic switch between not-so distant cousins – *Saccharomyces cerevisiae* versus *Kluyveromyces lactis*. **FEMS Yeast Research**, v. 5, p. 1115-1128, 2005.

RUBIO-TEXEIRA, M. Endless versatility in the biotechnological applications of *Kluyveromyces* LAC genes. **Biotechnology Advances**, v. 24, p. 212-225, 2006.

RUYTERS, S.; MUKHERJEE, V.; VERSTREPEN, K. J.; THEVELEIN, J. M.; WILLEMS, K. A.; LIEVENS, B. Assessing the potential of wild yeasts for bioethanol production. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 42, p. 39-48, 2015.

SANSONETTI, S.; HOBLEY, T. J.; CURCIO, S.; VILLADSEN, J.; SIN, G. Use of continuous lactose fermentation for ethanol production by *Kluyveromyces marxianus* for verification and extension of a biochemically structured model. **Bioresource Technology**, v. 130, p. 703-709, 2013.

SASANO, Y.; HAITANI, Y.; HASHIDA, K.; OHTSU, I.; SHIMA, J.; TAKAGI, H. Enhancement of the proline and nitric oxide synthetic pathway improves fermentation ability under multiple baking-associated stress conditions in industrial baker's yeast. **Microbial Cell Factories**, v. 11, p. 1-8, 2012a.

SASANO, Y.; HAITANI, Y.; OHTSU, I.; SHIMA, J.; TAKAGI, H. Proline accumulation in baker's yeast enhances high-sucrose stress tolerance and fermentation ability in sweet dough. **International Journal of Food Microbiology**, v. 152, p. 40-43, 2012b.

SEIBOTH, B.; PAKDAMAN, B. S.; HARTL, L.; KUBICEK, C. P. Lactose metabolism in filamentous fungi: how to deal with an unknown substrate. **Fungal Biology Reviews**, v. 21, p.42-48, 2007.

SENGUPTA, S.; LAHIRI, S.; BANERJEE, S.; BASHISTHA, B.; GHOSH, A.K. Arginine mediated purification of trehalose-6-phosphate synthase (TPS) from *Candida utilis*: Its characterization and regulation. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1810, p. 1346-1354, 2011.

SEKINE, T.; KAWAGUCHI, A.; HAMANO, Y.; TAKAGI, H. Desensitization of feedback inhibition of the *Saccharomyces cerevisiae* – Glutamyl kinase enhances proline accumulation and freezing tolerance. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, p. 4011-4019, 2007.

SIGNORI, L.; PASSOLUNGHI, S.; RUOHONEN, L.; PORRO, D.; BRANDUARDI, P. Effect of oxygenation and temperature on glucose-xylose fermentation in *Kluyveromyces marxianus* CBS712 strain. **Microbial Cell Factories**, v. 51, p. 1-13, 2014.

SILVEIRA, W. B.; PASSOS, F. J. V.; MANTOVANI, H. C.; PASSOS, F. M. L. Ethanol production from cheese whey permeate by *Kluyveromyces marxianus* UFV-3: a flux analysis of oxido-reductive metabolism as a function of lactose concentration and oxygen levels. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 36, p. 930-936, 2005.

SOUZA, C. J. A.; COSTA, D. A.; RODRIGUES, M. Q. R. B.; SANTOS, A. F.; LOPES, M. R.; ABRANTES, A. B. P.; COSTA, P. S.; SILVEIRA, W. B.; PASSOS, F. M. L.; FIETTO, L. G. The influence of presaccharification, fermentation temperature and yeast strain on ethanol production from sugarcane bagasse. **Bioresourse and Biotechnology**, v. 109, p. 63-69, 2012.

SPENCER, J.; PHISTER, T. G.; SMART, T. A.; GREETHAM, D. Tolerance of pentose utilizing yeast to hydrogen peroxide-induced oxidative stress. **BMC Research Notes**, v. 7, p. 1-12, 2014.

STANLEY, D.; BANDARA, A.; FRASER, S.; CHAMBERS, P. J.; STANLEY, G. A. The ethanol stress response and ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 109, p. 13-24, 2010.

SUN, Z.; QI, X.; WANG, Z.; LI, P.; WU, C.; ZHANG, H.; ZHAO, Y. Overexpression of TsGOLS2, a galactinol synthase, in *Arabidopsis thaliana* enhances tolerance to high salinity and osmotic stresses. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 69, p. 82-89, 2013.

SYRIOPOULOS, C.; PANAYOTAROU, A.; LAI, K.; KLAPA, M. I. Transcriptomic analysis of *Saccharomyces cerevisiae* physiology in the context of galactose assimilation perturbations. **Molecular BioSystems**, v. 4, p. 937-949, 2008.

TAKAGI, H. Proline as a stress protectant in yeast: physiological functions, metabolic regulations, and biotechnological applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 81, p. 211-223, 2008.

TAKAGI, H.; TAKAOKA, M.; KAWAGUCHI, M.; KUBO, Y. Effect of L-proline on sake brewing and ethanol stress in *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, p. 8656-8662, 2005.

TAN, S. X.; TEO, M.; LAM, Y. T.; DAWES, I. W.; PERRONE, G. G. Cu, Zn superoxide dismutase and NADP(H) homeostasis are required for tolerance of endoplasmic reticulum stress in *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular Biology of the Cell**, v. 20, p. 1493-1508, 2009.

TANG, M.; WARING, A. J.; HONG, M. Trehalose-protected lipid membranes for determining membrane protein structure and insertion. **Journal of Magnetic Resonance**, v. 184, p. 222-227, 2007.

TEIXEIRA, M. C.; MIRA, N. P.; LOURENÇO, A. B.; SÁ-CORREIA, I. Genome-wide identification of *Saccharomyces cerevisiae* genes required for maximal tolerance to ethanol. **Applied and Environment Microbiology**, v. 75, p. 5761-5772, 2009.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 8nd edition. [S.l.]: Artmed, 2006.

VALLURU, R.; ENDE, W. V. Myo-inositol and beyond – Emerging networks under stress. **Plant Science**, v. 181, p. 387-400, 2011.

VANEGAS, J. M.; CONTRERAS, M. F.; FALLER, R.; LONGO, M. L. Role of unsaturated lipid and ergosterol in ethanol tolerance of model yeast biomembranes. **Biophysical Journal**, v. 102, p. 507-16, 2012.

VANEGAS, J. M.; FALLER, R.; LONGO, M. L. Influence of ethanol on lipid/sterol membranes: phase diagram construction from AFM imaging. **Langmuir Letter**, v. 26, p. 10415-10418, 2010.

VILLAS-BÔAS, S. G.; HOJER-PEDERSEN, J.; AKESSON, M.; SMEDSGAARD, J.; NIELSEN, J. Global metabolite analysis of yeast: evaluation of sample preparation methods. **Yeast**, v. 22, p. 1155-1169, 2005.

VOORST, F. V.; HOUGHTON-LARSEN, J.; JONSON, L.; KIELLAND-BRANDT, M. C.; BRANDT, A. Genome-wide identification of genes required for growth of *Saccharomyces cerevisiae* under ethanol stress. **Yeast**, v. 23, p. 351-359, 2006.

WANG, M.; ZHAO, J.; YANG, Z.; DUD, Z.; YANG, Z. Electrochemical insights into the ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. **Bioelectrochemistry**, v. 71, p. 107-112, 2007.

WANG, P. M.; ZHENG, D. Q.; CHI, X. Q.; LI, O.; QIAN, C. D.; LIU, T. Z.; ZHANG, X. Y.; DU, F. G.; SUN, P. Y.; QU, A. M.; WU, X. C. Relationship of trehalose accumulation with ethanol fermentation in industrial *Saccharomyces cerevisiae* yeast strains. **Bioresource Technology**, v. 152, p. 371-376, 2014.

WATANABE, M.; WATANABE, D.; AKAO, T.; SHIMOI, H. Overexpression of MSN2 in a sake yeast strain promotes ethanol tolerance and increases ethanol production in sake brewing. **Journal of Bioscience Bioengineering**, v. 107, p. 516-8, 2009.

WINER, J.; JUNG, C. K.; SHACKEL, I.; WILLIAMS, P. M. Development and validation of real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction for monitoring gene expression in cardiac myocytes in vitro. **Analytical Biochemistry**, v. 270, p. 41-49, 1999.

YANASE, S.; HASUNUMA, T.; YAMADA, R.; TANAKA, T.; OGINO, C.; FUKUDA, H.; KONDO, A. Direct ethanol production from cellulosic materials at high temperature using the thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* displaying cellulolytic enzymes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 88, p. 381-388, 2010.

YOSHIBA, Y.; KIYOSUE, T.; NAKASHIMA, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. Regulation of levels of proline as an osmolyte in plants under water stress. **Plant and Cell Physiology**, v. 38, p. 1095-1102, 1997.

YOSHIKAWA, K.; TANAKA, T.; FURUSAWA, C.; NAGAHISA, K.; HIRASAWA, T.; SHIMIZU, H. Comprehensive phenotypic analysis for identification of genes affecting growth under ethanol stress in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Yeast Research**, v. 9, p. 32-44, 2009.

YOU, K. M.; ROSENFELD, C. L.; KNIPPLE, D. C. Ethanol tolerance in the yeast *saccharomyces cerevisiae* is dependent on cellular oleic acid content. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, p. 1499-1503, 2003.

YU, K. O.; JUNG, J.; RAMZI, A. B.; CHOE, S. H.; KIM, S. W.; PARK, C.; HAN, S. O. Increased ethanol production from glycerol by *Saccharomyces cerevisiae* strains with enhanced stress tolerance from the overexpression of SAGA complex components. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 51, p. 237-243, 2012.

ZHANG, J.; ZHANG, B.; WANG, D.; GAO, X.; HONG, J. Xylitol production at high temperature by engineered *Kluyveromyces marxianus*. **Bioresource Technology**, v. 152, p.192-201, 2014.

ZHANG, K.; TONG, M.; GAO, K.; DI, Y.; WANG, P.; ZHANG, C.; WU, X.; ZHENG, D. Genomic reconstruction to improve bioethanol and ergosterol production of industrial yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 42, p. 207-218, 2015.

ZHAO, X. Q.; BAI, F. W. Mechanisms of yeast stress tolerance and its manipulation for efficient fuel ethanol production. **Journal of Biotechnology**, v. 144, p. 23-30, 2009.

ZHENG, D. Q.; LIU, T. Z.; CHEN, J.; ZHANG, K.; LI, O.; ZHU, L.; ZHAO, Y. H.; WU, X. C.; WANG, P. M. Comparative functional genomics to reveal the molecular basis of phenotypic diversities and guide the genetic breeding of industrial yeast strains. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, p. 2067-2076, 2013.

ZOPPELLARI, F.; BARDI, L. Production of bioethanol from effluents of the dairy industry by *Kluyveromyces marxianus*. **New Biotechnology**, v. 30, p. 607-613, 2013.