

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

Tárcio Carneiro

**ALTERAÇÕES NA PAREDE CELULAR E NO METABOLISMO
ENERGÉTICO DE *Saccharomyces cerevisiae* SUBMETIDA À ALTA
PRESSÃO HIDROSTÁTICA.**

VITÓRIA, ES

2018

Tárcio Carneiro

**ALTERAÇÕES NA PAREDE CELULAR E NO METABOLISMO
ENERGÉTICO DE *Saccharomyces cerevisiae* SUBMETIDA À ALTA
PRESSÃO HIDROSTÁTICA.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Antônio Alberto Ribeiro Fernandes.

VITÓRIA, ES

2018



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

**"ALTERAÇÃO DA PAREDE CELULAR E DO METABOLISMO ENERGÉTICO
DE *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* SUBMETIDA A ALTA PRESSÃO
HIDROSTÁTICA"**

Tárcio Carneiro

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da
Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para a obtenção
do título de Mestre em Biotecnologia.

Aprovado por:

Prof. Dr. Antonio Alberto Ribeiro Fernandes (UFES)

Orientador

Profa. Dra. Patricia Machado Bueno Fernandes (UFES)
Co-orientadora

Prof. Dr. Alexandre Martins Costa Santos (UFES)

Membro Interno

Profª. Drª. Russolina Benedeta Zingali (UFRJ)

Membro Externo

Vitória-ES, 20 de fevereiro de 2018.

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)
(Biblioteca Setorial do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito
Santo, ES, Brasil)
Bibliotecário: Rafael Lima de Carvalho – CRB-6 MG-002926/O

C289a Carneiro, Tércio, 1992 -
ALTERAÇÕES NA PAREDE CELULAR E NO METABOLISMO
ENERGÉTICO DE *Saccharomyces cerevisiae* SUBMETIDA À ALTA PRESSÃO
HIDROSTÁTICA / Tércio Carneiro - 2018.
53 f. : il.

Orientador: Antonio Alberto Ribeiro Fernandes.
Coorientador: Patrícia Machado Ribeiro Fernandes.

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal do Espírito
Santo, Centro de Ciências da Saúde.

1. Pressão Hidrostática. 2. *Saccharomyces cerevisiae*. 3. Microscopia de Força
Atômica. 4. Cromatografia Líquida de Alta Pressão. I. Fernandes, Antonio Alberto
Ribeiro. II. Fernandes, Patrícia Machado Bueno. III. Universidade
Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências da Saúde. IV. Título.

CDU: 61

AGRADECIMENTOS

Aos meus orientadores Antonio Alberto Ribeiro Fernandes e Patricia Machado Bueno Fernandes.

As agencias de fomento CAPES, FAPES e CNPQ. A universidade Federal do Espirito Santo.

A minha mãe Venilda e minha irmã Myrna por todo amor e força ao longo de toda minha vida.

A Iara de Araújo Capucho por estar presente nesses dois anos e me ajudar a superar todos os problemas.

Aos meus amigos do G.R.E.S. seleção natural, pelos anos de amizade e por todas as noites de segunda.

Aos meus companheiros de laboratório que me ajudaram em inúmeras situações, em especial Ane, Jeferson e Fernanda Bravim.

EPÍGRAFE

*“E aqueles que foram vistos
dançando foram julgados insanos por aqueles que não conseguiam
escutar o som da musica.”*

F. Nietzsche

RESUMO

CARNEIRO T. **Alterações na parede celular e no metabolismo energético de *Saccharomyces cerevisiae* submetida à alta pressão hidrostática.** 2018 xx f. Dissertação de mestrado em Biotecnologia – Programa de Pós-Graduação em biotecnologia, UFES, Espírito Santo. Brasil.

As leveduras são um dos organismos mais importantes nos processos da biotecnologia industrial. Características como, grande capacidade fermentativa e ser considerada um organismo geneticamente seguro (do inglês: “*Generally recognized as safe*” - GRAS), fizeram com que esse organismo fosse um dos primeiros a serem utilizados em grandes produções. Entre suas aplicações não estão apenas seus produtos gerados a partir de seu metabolismo, mas também sua célula em si, que movimenta um mercado que vai desde fermento biológico até pasta de levedura para consumo humano. Com isso entender não só o processo fermentativo, mas também o respiratório se fazem necessário. Os processos de produção em que as leveduras são empregadas expõem-nas a estresses abióticos de diferentes tipos, como a variação de temperatura, pH, salinidade e outros. A alta pressão hidrostática (HHP) é hoje uma metodologia importante no estudo de seus efeitos sobre as células de *Saccharomyces cerevisiae*, agindo como um modelo de estresse. O entendimento desse fenômeno sobre as células nos ajuda não só a compreender os processos de resposta ao estresse, mas também sua utilização como uma ferramenta importante na aplicação industrial. Neste trabalho foram empregadas técnicas de microscopia de força atômica, cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE do inglês HPLC) em conjunto com dados de microarranjo para caracterizar os efeitos da alta pressão hidrostática sobre a parede celular de *Saccharomyces cerevisiae* e sobre seu metabolismo energético. Para a produção dos experimentos, células da linhagem BT0510 foram submetidas à alta pressão hidrostática (50 a 200 MPa) por 30 minutos e em seguida analisada por microscopia de força atômica e em outro experimento as células foram submetidas a pressão de 50MPa por 30 minutos e voltadas a agitação. Os resultados mostraram o aparecimento de faixas de resistências na parede celular em pressões de 100, 150 e 200 MPa, indicando possíveis pontos de fratura, o que acarreta em lesões que comprometem sua viabilidade. Nas pressões de 50MPa a dispersão da resistência da parede celular se assemelha ao controle, o que mostra que essa pressão é de caráter subletal, não interferindo de maneira tão expressiva na mortalidade celular. A resposta ao tratamento com 50 MPa foi então analisada a longo prazo por HPLC, com pontos de coleta em 1, 2, 3, 4 , 12, 36 e 60 horas após a aplicação da pressão. Os resultados mostram

grande afinidade com os dados gerados por microarranjo, onde as células aumentam a velocidade de consumo da glicose na fase (1 a 12 horas) assim como maior produção de etanol. As células também mostraram uma maior eficiência na metabolização do etanol (fase respiratória) o que gerou um aumento da massa celular nas células tratadas com pressão. Com isso foi demonstrado que alta pressão hidrostática tem aplicação industrial em processos de aquisição de massa celular como na fabricação de fermento biológico, mostrando assim a capacidade biotecnológica da utilização deste mecanismo de estresse e gerando o depósito da patente *“Processo para o aumento massa celular em leveduras utilizando altas pressões hidrostáticas”*.

Palavras-chave: alta pressão hidrostática, *Saccharomyces cerevisiae*, microscopia de força atômica, HPLC, massa celular.

ABSTRACT

CARNEIRO T. **Alterations in the cell wall and energetic metabolism of *Saccharomyces cerevisiae* submitted to high hydrostatic pressure.** 2018 xx f. Dissertação de mestrado em Biotecnologia – Programa de Pós-Graduação em biotecnologia, UFES, Espírito Santo. Brasil.

Yeasts are one of the most important organisms in the processes of industrial biotechnology. Its great fermentative capacity and considered as a genetically safe organism, made this organism one of the first to be domesticated by the human being. Among its applications are not only its products generated from the fermentation, but also its cell itself, which moves a market ranging from organic yeast to yeast paste for human consumption. Understanding not only the fermentative process, but also the respiratory process are necessary. The production processes in which the yeasts are employed expose them to abiotic stresses of different types, such as temperature variation, pH, salinity and others. High hydrostatic pressure is now an important methodology in the study of its effects on the cells of *Saccharomyces cerevisiae*, acting as a model of stress. The understanding of this phenomenon on cells has helped not only to understand the processes of response to stress, but also its use as an important tool in industrial application. Atomic force microscopy, high performance liquid chromatography (HPLC) and microarray data were used to characterize the effects of high hydrostatic pressure on the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae* and its energy metabolism. For the production of the experiments, BT0510 cells were submitted to high hydrostatic pressure (50 to 200 MPa) for 30 minutes and then analyzed by atomic force microscopy and in another experiment the cells were subjected to a pressure of 50MPa for 30 minutes and facing to agitation. The results showed the appearance of resistance bands in the cell wall at pressures of 100, 150 and 200 MPa, indicating possible fracture points, which leads to lesions that compromise its viability. At pressures of 50MPa the variation of the resistance of the cell wall resembles the control, which shows that this pressure is of sublethal character, not interfering so expressively in the cellular mortality. The response to 50 MPa treatment was then analyzed in the long term by HPLC, with collection points at 1, 2, 3, 4, 12, 36 and 60 hours after application of pressure. The results show high affinity with microarray generated data, where the cells increase the rate of glucose consumption in the fermentative phase (1 to 12 hours) as well as higher ethanol production. The cells also showed a greater efficiency in the ethanol metabolism which generated an increase in the cell mass in the cells treated with pressure. It was demonstrated that high hydrostatic

pressure has industrial application in cellular mass acquisition processes as in the production of biological yeast, thus showing the biotechnological capacity of the use of this stress mechanism and generating the deposit of the patent "Process for the increase of cellular mass in yeasts using high hydrostatic pressures".

Palavras-chave: high pressure hydrostatic, *Saccharomyces cerevisiae*, Atomic Force microscopy, HPLC, Cell mass.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Figura 1. Estágios de crescimento celular em <i>S. cerevisiae</i>	18
Figura 2. Etapas para a degradação do etanol na geração de Acetil-CoA	19
Figura 3. Fluorescência de diferentes cDNAs hibridizados por microarranjo	24
Figura 4. Genes induzidos pela alta pressão hidrostática em diferentes tempos.....	26
Figura 5. Fluxograma experimental.....	27
Figura 6. Processo de análise da resistência da parede celular de <i>S. cerevisiae</i>	29
Figura 7. Dispersão das forças de adesão da parede celular de <i>S.cerevisiae</i>	33
Figura 8. Disposição de polímeros de quitina, 1,3 e 1,6 beta-glicanos na parede celular de levedura.....	34
Figura 9. Análise, por HPLC, da produção de etanol em 4 horas de crescimento	37
Figura 10. Representação esquemática da lançadeira glicerol-3-fosfato.....	38
Figura 11. Representação do processo de fermentação.....	39
Figura 12. Glicose no meio YEPD, 12 horas após o tratamento com alta pressão hidrostática.....	40
Figura 13. Etanol presente no meio YEPD, 12 horas após a aplicação da alta pressão hidrostática	40
Figura 14. Glicerol presente no meio YEPD, 12 horas após a aplicação da alta pressão hidrostática	41
Figura 15. Etanol em meio YEPD, 36 horas após o tratamento com alta pressão hidrostática.....	42
Figura 16. Massa celular de <i>S. cerevisiae</i> , 36 horas após o tratamento com alta pressão hidrostática	43
Figura 17. Massa celular obtida 60 horas após a aplicação de alta pressão hidrostática.....	45
Figura 18. Massa celular após 36 horas de crescimento.....	46
Figura 19. Etanol presente no meio 60 horas após o crescimento.....	48
Figura 20. Densidade celular produzida após 60 horas de crescimento.....	48

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AFM	<i>Microscopia de Força Atômica (do inglês Atomic Force Microscopy)</i>
CWI	Integridade da parede celular (do inglês <i>Cell Wall Integrity</i>)
CWP	Proteína de parede celular (do inglês <i>Cell Wall Protein</i>)
D.O.	Densidade Ótica
HPLC	<i>Cromatografia líquida de alta eficiência (do inglês High Performance Liquid Chromatography)</i>
INPI	Instituto Nacional da Propriedade Industrial
NAD	<i>Nicotinamide Adenine Dinucleotide</i>
NADP	<i>Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate</i>
nN	Nano Newton
mg	Miligrama
mL	Mililitro
MPa	Mega Paskal
YEPD	<i>Yeast Extract Peptone Dextrose</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
2.1 SACCHAROMYCES CEREVISIAE	13
2.2 APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS.....	14
2.3 PAREDE E MEMBRANA CELULAR.....	15
2.4 METABOLISMO ENERGÉTICO.....	16
2.5 ALTA PRESSÃO HIDROSTÁTICA	19
2.5.1 EFEITO DA ALTA PRESSÃO HIDROSTÁTICA EM S. CEREVISIAE	20
3. OBJETIVO.....	23
3.1. OBJETIVO GERAL	23
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	23
4. METODOLOGIA.....	24
4.1. BANCO DE DADOS DE MICROARRANJO	24
4.2. FLUXOGRAMA EXPERIMENTAL.....	27
4.3. CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO	27
4.4. TRATAMENTOS COM ALTA PRESSÃO HIDROSTÁTICA	28
4.5. ANÁLISE DA PAREDE CELULAR POR MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA.....	29
4.6. QUANTIFICAÇÃO DE GLICOSE, GLICEROL E ETANOL POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (HPLC).....	30
4.7. QUANTIFICAÇÃO DE MASSA CELULAR	30
4.8. ANÁLISES ESTATÍSTICAS	31
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
5.1. DIFERENTES PRESSÕES HIDROSTÁTICAS E SEUS EFEITOS NA PAREDE CELULAR DE S. CEREVISIAE.....	32
5.2. METABOLISMO ENERGÉTICO APÓS O TRATAMENTO COM ALTA PRESSÃO HIDROSTÁTICA.....	35

5.2.1. FASE FERMENTATIVA	35
5.2.2. PÓS DIÁUXIA.....	42
5.2.3. FASE ESTACIONÁRIA	44
5.2.4. ALTERAÇÃO NA CONCENTRAÇÃO DE GLICOSE	45
6. CONCLUSÃO	48
7. REFERÊNCIAS	49

1. INTRODUÇÃO

Saccharomyces cerevisiae é um dos microrganismos de maior importância, tanto industrial como científica. Seu uso industrial varia desde fermento biológico, passando por produzir biocombustíveis e moléculas de alto valor, como farnecenos e enzimas.

S. cerevisiae mostra-se um organismo eucarionte, de fácil manipulação e seguro para a saúde humana, intitulado modelo de estudos celulares. Por isso o estudo de seu comportamento frente a diferentes modificações, como alterações abióticas, indicam relações de resposta a diversos estresses. Estas respostas podem ser estendidas para todos eucariotos.

A alta pressão hidrostática é um efeito de extremo valor não só no campo industrial como também nas relações de estresse frente aos organismos. A alta pressão é capaz de modular a resposta genética e alterar a estrutura celular de *S. cerevisiae*, mostrando alterações úteis para o conhecimento científico e aplicação tecnológica.

Já é descrito por BRAVIM (2012) que a alta pressão hidrostática melhora a eficiência fermentativa de cepas de leveduras. Suas alterações podem modificar processos bioquímicos e a velocidade com que os quais ocorrem. Com isso, a utilização da alta pressão hidrostática pode se tornar viável para diferentes processos de produção.

Analisaram-se as respostas de *S. cerevisiae* a tratamentos com a alta pressão hidrostática, relacionando a variação das respostas de diferentes pressões com as modificações na parede celular. Conseqüentemente foram estudadas as respostas de produção e consumo de três moléculas que participam do metabolismo energético (glicose, glicerol e etanol).

As interpretações do trabalho a seguir, partem de dados de microarranjo publicado na literatura (BRAVIM *et al.* 2012, BRAVIM *et al.* 2016), que mostram modificações na indução de genes responsáveis pelas vias metabólicas que serão investigadas. As relações dos dados de microarranjo com os resultados de quantificação de glicose, glicerol e etanol (além de massa celular) do presente trabalho mostram uma opção biotecnológica para a utilização da alta pressão hidrostática no ambiente industrial, atuando como acelerador do processo de produção de massa celular. Mostra-se também, com a microscopia de força atômica, o processo de

desestruturação da parede celular de *S. cerevisiae* submetida a altas pressões hidrostáticas, e a sua utilização no acompanhamento de efeitos estressantes em estruturas celulares.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. *Saccharomyces cerevisiae*

Saccharomyces cerevisiae é uma espécie de fungo que se caracteriza por ser unicelular, eucarionte, com parede celular definida e heterotrófica. Não possuem um sistema de locomoção e estão incluídos no gênero *Saccharomyces* (família *Saccharomycetaceae*). Gênero este que tem uma das suas principais características, a alta capacidade fermentativa, além de possuírem divisão por gemulação ou brotamento e não apresentam hifas verdadeiras. (GERSHON e GERSHON, 2000; KREGER-VAN RIJ, 1987).

A dispersão dessa espécie no meio ambiente natural é notável, sendo encontradas em diferentes ambientes, como folhas, poças e em alimentos em decomposição. São também encontradas em padarias, usinas de biocombustíveis e na produção de bebidas alcoólicas. (NEVOIGT, 2008).

Entre os eucariotos, a *S. cerevisiae* se tornou a primeira espécie a ter seu genoma sequenciado. Ao longo de seus 16 cromossomos estão situados cerca de 6000 genes. (GOFFEAU *et al.*, 1996). Por sua fácil manipulação, baixa patogenicidade e principalmente por apresentarem processos celulares similares aos eucariotos superiores, esse organismo foi intitulado um dos principais modelos para estudo científico deste grupo de células nucleadas. Isso também se deve por apresentarem similaridades nos mecanismos de replicação, recombinação, divisão celular e de seus metabólitos produzidos como nos demais eucariotos. (FERNANDES, 2005; BITTERMAN *et al.*, 2003).

Desde sua utilização até os dias de hoje, não há nenhum outro organismo (dentro dos eucariotos) cujo seus processos metabólicos e genéticos tenham sido tão amplamente elucidados. Tornando-se assim o estudo com *Saccharomyces cerevisiae*, um campo necessário para a interpretação de efeitos, não só sobre sua espécie, mas transcendendo a todo o grupo eucarionte. Assim genes de mamíferos podem ser introduzidos no genoma das leveduras e o estudo dos produtos e funções geradas a partir dessas transformações criam novos métodos de análise. (FERNANDES, 2005; FERNANDES *et al.*, 2009)

2.2. APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS

A levedura vem sendo utilizada pelo homem a milênios, sendo possivelmente um dos primeiros organismos a serem domesticados por ele. Não somente por não apresentar riscos, como mencionado, mas também, por sua incrível capacidade em desenvolver processos metabólicos úteis ao ser humano. Suas aplicações na indústria se estendem por várias áreas, como na fabricação de bebidas e alimentos até sua manipulação genética para produção de hormônios e proteínas com diversas funções. Além de seus produtos metabólicos a própria levedura tem seu interesse industrial, sendo ela usada na produção de fermento biológico e também como ração animal e até mesmo alimento humano. Um dos principais fatores para sua utilização como alimento é sua riqueza proteica, fornecendo assim uma ótima estratégia nutricional. (FERNANDES *et al.*, 2009 ; ARAUJO *et. al.* , 2009)

Contribuindo para todas as áreas descritas acima, as leveduras tem seu maior valor atualmente na indústria de biocombustíveis e bebidas. Isso porque conseguem produzir elevadas quantidades de etanol, como também conseguem sobreviver neste meio, com grandes variações de pH, temperatura, diferentes concentrações de açúcares e presença de inibidores (NEVOIGT, 2008.)

2.3. PAREDE E MEMBRANA CELULAR

A parede celular de *Saccharomyces cerevisiae* é responsável pela preservação da morfologia e arquitetura celular, inclusive é responsável pela estabilidade desta morfologia durante o processo de brotamento e esporulação. Ela também tem a capacidade de manter as condições osmóticas necessárias enquanto a célula passa por estes processos reprodutivos. (LEVIN, 2011)

A parede celular é composta de polissacarídeos, lipídeos e proteínas, sendo os polissacarídeos em maior quantidade (cerca de 80%) em relação ao peso da massa seca da parede celular. Dentre os polissacarídeos, destacam-se os beta-glicanos, 1-3 betaglicano e 1-6 betaglicano, que juntos formam aproximadamente 70% dos polissacarídeos que compõem a parede celular, onde o 1,3-betaglicano corresponde a uma faixa de 50 a 55% dos polissacarídeos totais. Manoproteínas e quitina

completam a estrutura básica da parede celular, onde se ligam de várias maneiras com os polissacarídeos mencionados. (LEVIN, 2011; RUIZ-HERRERA, 2012)

A quitina, mesmo sendo encontrada em concentrações menores desempenha papéis importantes na arquitetura e ciclo de vida das células. É a partir de uma interação dela com o 1-3 betaglicano que a estrutura celular importante resistência mecânica. Sabe-se então que quanto mais velha a célula, maior sua resistência mecânica, visto que sua parede celular é mais espessa e o número de cicatrizes é maior. E essas cicatrizes apresentando uma maior deposição de quitina. (DAGUE et al., 2010)

As proteínas de parede celular (CWP, do inglês *Cell Wall Protein*) podem ser classificadas em três grupos, onde cada um deles é designado por sua localidade e função. O primeiro grupo acomoda as proteínas floculinas e aglutininas, responsáveis por promover conexões tanto entre componentes intracelulares como célula-célula. O segundo grupo desempenha função na construção da parede celular, como as hidrolases. E por fim o terceiro grupo de proteínas que se localizam nas membranas plasmáticas com conexões com a parede celular, funcionando como sensores de estresse sobre a parede celular, ativando as respostas por via de CWI (do inglês *Cell Wall Integrity*) (KLIS et al., 2010; DRANGINIS et al., 2007; LEVIN, 2011).

Durante o processo de divisão celular por brotamento a célula mãe controla de maneira mais rigorosa a expressão de quitina, e as células filhas ficam envolvidas no controle da expressão de hidrolases, as enzimas responsáveis pelo processo de separação. (LEVIN, 2011; ORLEAN, 2012)

No processo de crescimento celular, a célula modifica sua organização e composição da parede celular, sendo assim uma levedura em uma fase de crescimento exponencial, não apresenta a mesma característica de organização e composição de parede celular quando estiver em diauxia (adaptação celular em meio com açúcar exaurido). (ORLEAN, 2012)

Aproximadamente 1200 genes, sem contar os essenciais, são responsáveis por algum tipo de impacto sobre o controle e manutenção da parede celular. Esses genes possuem diversas atuações sobre a parede, mesmo de forma indireta. Sendo assim, o número de enzimas que está diretamente relacionada com a construção e remodelamento da parede chega a aproximadamente 180. (De GROOT et al., 2001)

2.4. METABOLISMO ENERGÉTICO

Todos os organismos conhecidos hoje apresentam em comum a necessidade de direcionar a energia adquirida em forma de trabalho. Esta característica constrói o processo lógico básico de desenvolvimento e reprodução destes organismos. Dessa mesma maneira, eles utilizam a energia química proveniente de alimentos para a síntese de moléculas complexas com alto grau de organização. Essa transformação atua na conversão da energia adquirida em potenciais elétricos, gradientes de concentração, movimento, calor e até mesmo luz. (LENHINGUER, 2009; FELDMAN, 2012). O metabolismo pode ser descrito pela assimilação e desassimilação bioquímica de nutrientes em uma célula, constituindo os processos denominados anabolismo e catabolismo. O anabolismo envolve processos redutivos responsáveis pela construção de componentes celulares, já o catabolismo refere-se à oxidação de substrato e consequente transferência de elétrons e intermediários que serão utilizados na geração de energia. Os cofatores comuns nesses processos são o dinucleotídeo de nicotinamida e adenina (NAD, do inglês *nicotinamide adenine dinucleotide*) e o fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina (NADP, do inglês *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*). (FELDMAN 2012; BARNETT 2003)

Em geral *S. cerevisiae* apresenta estágios de desenvolvimento bem distintos e conhecidos. É um organismo anaeróbico facultativo, porém seu metabolismo fermentativo é predominante ao aeróbico na presença de glicose mesmo com disponibilidade de oxigênio. Dentro de seu crescimento apresentam cinco fases distintas:

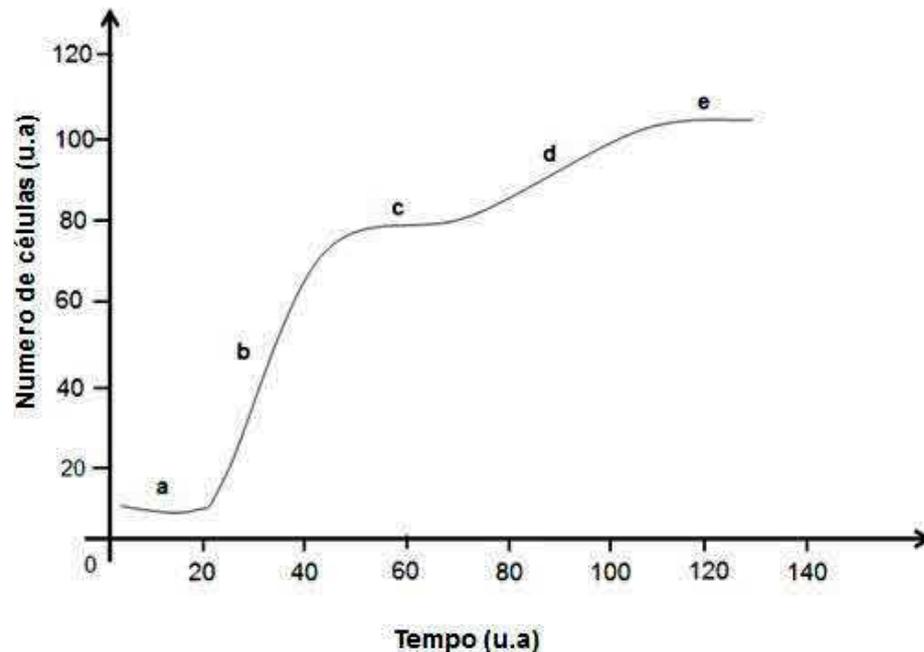


Figura 1. Estágios de crescimento celular em *S. cerevisiae*. (a) Fase lag de adaptação ao meio. (b) Fase logarítmica. (c) Diauxia. (d) Pós-Diauxia. (e) Fase estacionária. Fonte: Adaptado de FERNANDES et al. 2008.

A primeira fase de adaptação fisiológica aos nutrientes e ao ambiente em que se encontra (fase lag). Após sua adaptação ela começa seu processo fermentativo e de crescimento exponencial (considerando que a primeira fonte de energia seja glicose), denominado fase log ou logarítmica. Nesta etapa a levedura se encontra apenas fermentando, pois nesta etapa ocorre a repressão de genes que codificam para enzimas da via respiratória, fazendo com que o piruvato fabricado no início da via glicolítica tenha direcionamento exclusivo para a fermentação. Nesta etapa seus maiores produtos metabólicos são o etanol e o glicerol. (FELDMAN, 2012; PIŠKUR 2014).

Na terceira etapa, quando a glicose se exaure, as células entram em uma segunda etapa lag, denominada diauxia. É neste momento que os genes envolvidos na respiração, que anteriormente eram reprimidos, entram em ativação. Em seguida o penúltimo estágio de crescimento é designado como pós diauxia, onde as células começam a metabolizar o etanol, formando Acetil-CoA que entrará para o ciclo respiratório (Figura 2) (FELDMAN, 2012; PIŠKUR 2014).

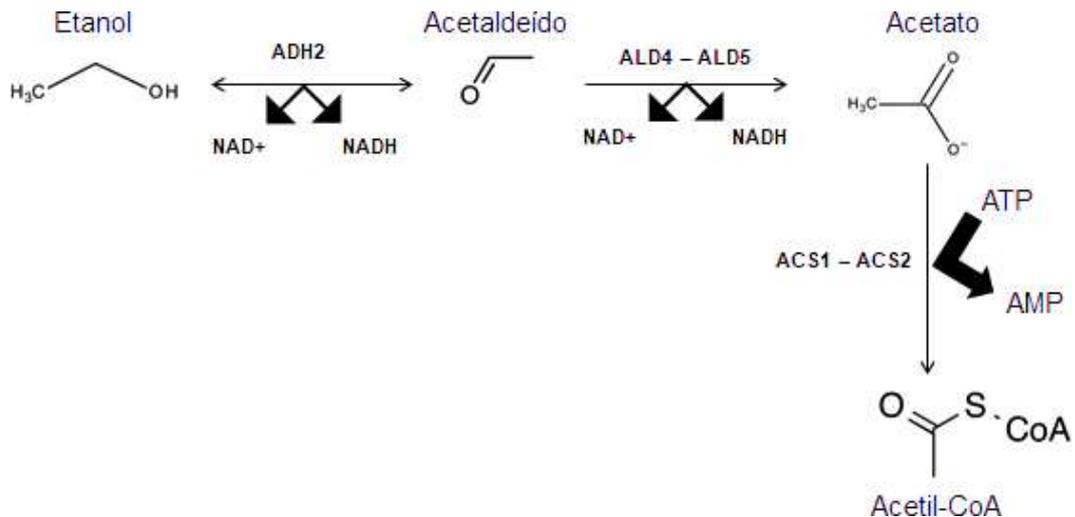


Figura 2. Etapas para a degradação de etanol na formação de Acetil-CoA.

Por fim as células que permaneceram no meio, ao final de todas as fontes de carbono, entram em uma fase denominada estacionária. Esta fase se caracteriza pela pelo acúmulo de reservas energéticas como trealose e glicogênio e passam a produzir proteínas de defesa de forma mais acentuada (exemplo das Hsp's, as proteínas de choque térmico). Esse mecanismo permite que a população entre em latência, mantendo certo numero de células vivas (PIŠKUR, 2014).

2.5. ALTA PRESSÃO HIDROSTÁTICA

Devido a grande diversidade de ambientes no planeta, inúmeros fatores apresentam grandes variações, como temperatura, umidade e disponibilidade de oxigênio. Além das variações descritas são encontradas também diferentes pressões, partindo de 0,1 MPa e alcançando nas fossas marianas cerca de 110 MPa. Os oceanos ocupam cerca de 70% da biosfera terrestre, e são nesses locais em que se encontram a maiores médias de pressões, mostrando que uma alta gama de organismos vive nessas condições. Isso mostra que apesar da aparente agressividade deste meio, ele é em si, um importante ambiente, com uma distinta biodiversidade (SOMERO, 1992; AERTSEN, 2009).

Já é descrito hoje que a alta pressão hidrostática é um parâmetro termodinâmico e que sua variação tem a capacidade de modelar e promover alterações nos sistemas biológicos, caracterizando-se também como um mecanismo de estresse.

(FERNANDES, 2005). A alta pressão hidrostática vem sendo um importante mecanismo na ótica de descontaminação de alimentos, pois ela impede certas mudanças geradas pelos mecanismos tradicionais. O mais usado é a descontaminação por altas temperaturas, mas este processo interfere em importantes características do alimento, como cor, sabor e degradação de importantes nutrientes. Além desta aplicação, temos o desenvolvimento de vacinas e fármacos que utilizam o tratamento com pressões para modular e preparar esses produtos (LOPES et al., 2010 ; ROTHSCCHILD e MANCINELLI, 2001).

Como já é descrito na literatura (FERNANDES *et al.* 2005, FERNANDES *et al.* 1997), o aumento da pressão hidrostática causa uma redução da viabilidade celular, e para evidenciar melhor tal fenômeno, células foram submetidas a pressões acima de 100 MPa mostrando a relação entre alta pressão e mortalidade celular em *S. cerevisiae*. Porém pressões de 50 MPa não são suficientes para matar ou alterar de forma agressiva a morfologia das células de levedura. Com isso, esse valor de pressão passou a ser um importante fator no estudo da resposta ao estresse por pressão hidrostática.

2.5.1. Efeito da alta pressão hidrostática em *S. cerevisiae*

O efeito da alta pressão hidrostática na célula de *S. cerevisiae* varia dependendo do tempo de exposição, valor de pressão aplicado à alta pressão e do ponto em que ela se encontra no seu ciclo celular. Sabe-se que a levedura na sua fase estacionária se encontram mais resistentes ao efeito da alta pressão se comparado à mesma pressão em uma célula na fase logarítmica (fase de proliferação).

Isso se deve, pois em uma de suas características estressantes a pressão interfere na arquitetura celular e na fluidez da membrana plasmática. Como a célula na fase estacionária apresenta sua parede celular mais espessa, esta pressão atua de forma menos agressiva que em uma célula na fase proliferativa (METRÉ et al., 1999).

FERNANDES (2004) descreve que em tratamentos com alta pressão ocorre indução positiva do gene HSP12, responsável por codificar uma proteína de parede. Tal proteína é responsável por aumentar a flexibilidade da parede celular, pois atua interrompendo pontes de hidrogênio e ligações iônicas entre polissacarídeos o que resulta em uma maior maleabilidade (MOTSHWENE et al., 2004).

Sob a alta pressão hidrostática a membrana plasmática também apresenta uma compressão de seus ácidos graxos com que se disponham mais firmemente ordenados e aumentando sua rigidez, conseqüentemente diminuindo sua fluidez. Esta reconformação age de forma a aumentar sua espessura e comprometer sua estrutura, criando assim uma disfunção nas proteínas de membrana e uma necessidade por mudanças na composição e concentração de ácidos graxos (MENTRÉ, 1999; HUI BON HOA, 2001).

ABE (1998) descreve que a alta pressão hidrostática (40 a 60 MPa) atua de forma a acidificar o pH do citoplasma e do vacúolo. Este efeito promoveu variações de 0,3 no citoplasma (indo de pH 7 a 6,7) e 0,3 a 0,5 no vacúolo (indo de pH 6 na pressão atmosférica até 5,5 nas pressões administradas), que se deve a maior difusão de CO₂ no meio formando assim ácido carbônico.

Diferentes organismos apresentam mudanças em sua concentração de ácidos graxos de membrana para promover uma barotolerância. Essa deposição pode ser regulada pela célula com mudança de composição de suas membranas (BENEY; GERVAIS, 2001; BARTLETT 2002)

A alta pressão hidrostática se assemelha a fontes de estresse como limitação nutricional no ponto de parada do ciclo celular. Esta parada do ciclo celular (Fase G1) é notada também em outros estresses como o choque térmico. A fase G1 é responsável pela verificação das condições para que a célula possa prosseguir seu crescimento, indo para a próxima fase de crescimento (Fase S). Caso a célula não tenha condição de prosseguir seu crescimento normal, seu ciclo é desviado para a fase G0, a chamada fase de latência (TROTT; MORANO, 2003 Apud HOHMANN 2003; PALHANO et al., 2004).

Considerando que a alta pressão hidrostática promove diversas respostas celulares, influenciando processos biofísicos, bioquímicos e fisiológicos, compreender sua atuação sobre *S. cerevisiae* é de fundamental importância. É relatada que a alta pressão atua otimizando processos industriais fermentativos, visto isso o acompanhamento de suas respostas em outros processos metabólicos pode revelar possíveis novas técnicas de produção.

3. OBJETIVO

3.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos da pressão na parede celular e no metabolismo energético de *Saccharomyces cerevisiae*.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a conformação de resistência da parede celular após os tratamentos com alta pressão hidrostática.
- Comparar a quantidade de glicose entre células não tratadas e células tratadas com a alta pressão hidrostática.
- Comparar o glicerol e etanol gerado na fase log fermentativa entre células não tratadas e células tratadas com alta pressão hidrostática.
- Comparar o consumo de etanol na fase pós-diauxia em células submetidas à alta pressão hidrostática com células não tratadas com alta pressão.
- Relacionar a quantidade de glicerol e etanol gerada com a formação de fosfolípidios de membrana plasmática.
- Quantificar a massa celular nas etapas 36 e 60 horas pós pressão.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. BANCO DE DADOS DE MICROARRANJO

O microarranjo é uma metodologia de análise do transcriptoma que, por meio da marcação com fluoróforo, os transcritos reversos de cDNAs são hibridizados com sondas complementares aos cDNAs contidos no chip do material. A variação da intensidade de fluorescência dos cDNAs hibridizados é medida e comparada com uma intensidade base (Figura 3).

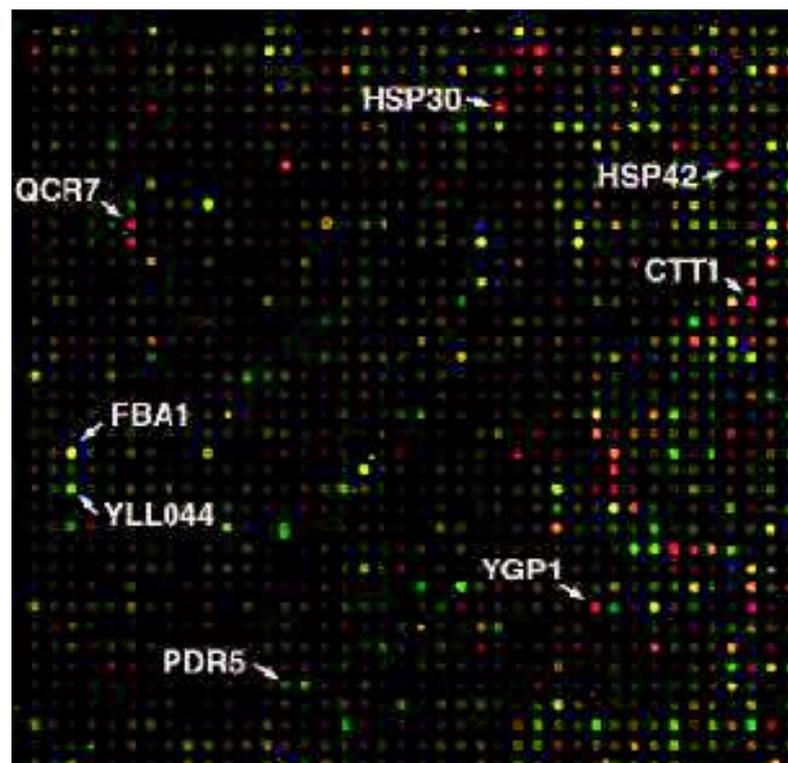


Figura 3: Fluorescência de diferentes cDNAs hibridizados. A fluorescência dos pontos corresponde à expressão do gene. Quanto maior a fluorescência, maior a sua indução. Fonte: DE RISI, 1997.

A seguir são retratadas as respostas da expressão gênica referentes a cepa BT0510 submetida a alta pressão hidrostática de 50 MPa por 30 minutos (Figura 4), já publicados na literatura. Os resultados da microanálise demonstram a expressão de genes 15, 10, 5 minutos e imediatamente após a pressão. Valores menores que -1 são considerados genes reprimidos e valores superiores a 1 são considerados

superexpressos.

NOME SISTEMÁTICO	NOME PADRÃO	0,1 MIN	5 MIN	10 MIN	15 MIN	DESCRIÇÃO
YLR304C	ACO1	0,84	0,58	2,25	2,75	Aconitase, requerida no metabolismo do ácido cítrico.
YAL054C	ACS1	0,34	0,81	0,83	1,39	AcetilCoa citnase, expressa em condições aeróbicas. (crescimento com fontes de carbono não fermentativas) *.
YOR374W	ALD4	1,23	3,57	4,04	4,52	Aldeído desidrogenase, requerida para crescimento em etanol*.
YNR001C	CIT1	4.24	3.94	4.98	5.26	Citrato sintase, catalisa a reação entre Acetil-Coa e oxalacetato para formar citrato.
YER141W	COX15	1,65	2,14	2,2	2,03	Citocromo c Oxidase, um grupo prostético essencial para a citocromo c oxidase.
YEL039C	CYC7	4,09	7,06	7,17	6,53	Isoforma 2 do citocromo c, requerida na cadeia respiratória.
YDL022W	GPD1	1,89	3,32	4,04	4,31	Glicerol 3-fosfato desidrogenase, essencial pra crescimento em estresse osmótico.

YIL155C	GUT2	2,48	3,11	3,67	4,27	Glicerol 3-fosfato desidrogenase, mitocondrial. Desregulada por fontes de carbono não fermentáveis.
YDR343C	HXT6	2,77	2,39	3,53	4,18	ador de glicose de alta afinidade.
YDR342C	HXT7	2,72	2,49	3,78	4,52	ador de glicose de alta afinidade.
YER065C	ICL1	1,7	1,12	1,4	1,34	Catalisa a reação de formação do succinato e glioxalato a partir do isocitrato
YKL085W	MDH1	1,61	2,02	3,75	4,35	Malato desidrogenase mitocondrial, catalisando a conversão de malato em oxalacetato.
YML120C	NDI1	2,01	3,2	4,34	4,58	NADH desidrogenase interna. Atua transferindo elétrons na cadeia respiratória.
YGL062W	PYC1	2,57	2,52	3,02	3,13	Piruvato carboxilase (isoforma).

Figura 4. Quadro de genes induzidos pela alta pressão hidrostática em diferentes tempos. O quadro demonstra as respostas da expressão gênica referentes a cepa BT0510 submetida a alta pressão hidrostática de 50 Mpa nos tempos descritos. *genes não discutidos em trabalhos anteriores. Fonte: Adaptado de BRAVIM et al. 2012.

4.2. FLUXOGRAMA EXPERIMENTAL

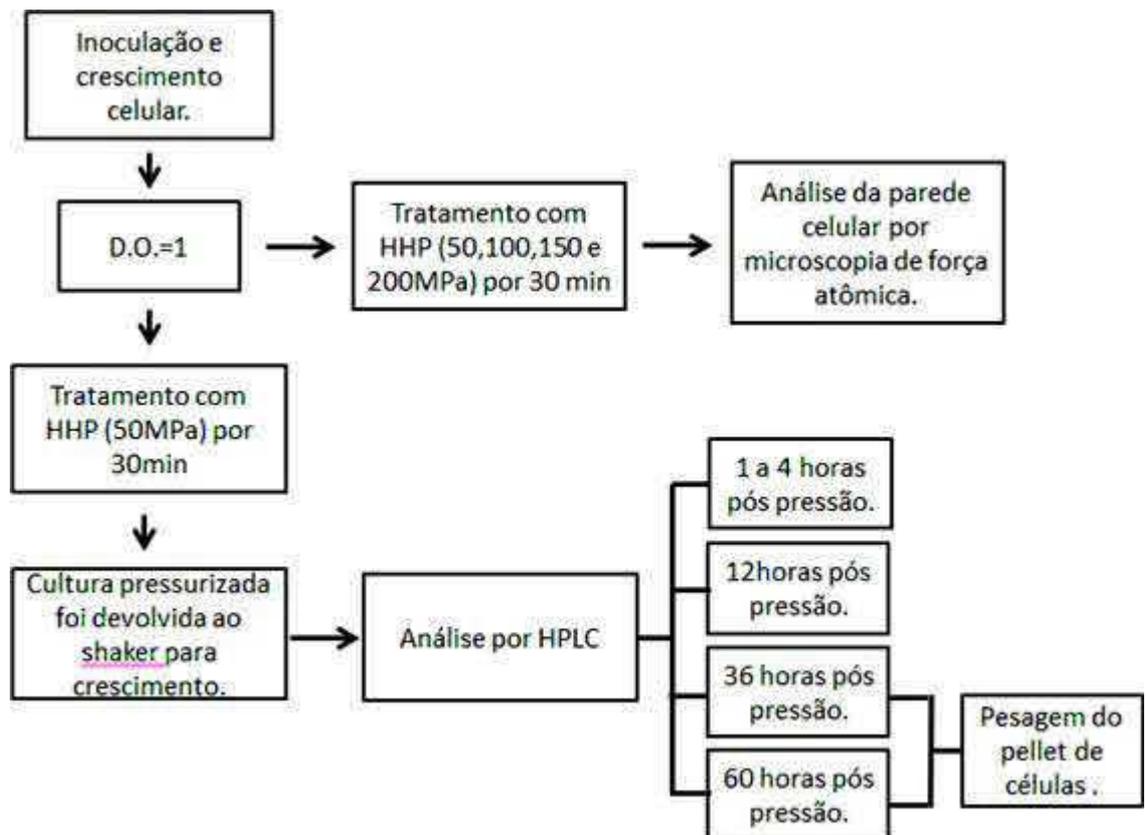


Figura 5. Fluxograma experimental. Esquematização da metodologia realizada no presente trabalho.

4.3. CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO

A cepa da levedura *S. cerevisiae* utilizada no presente estudo (BT0510) foi previamente isolada de alambique do estado do Espírito Santo (BRAVIM, 2011). As células de levedura foram cultivadas em meio YEPD (2% (m/v) de glicose, 2% (m/v) de peptona, e 1% (m/v) de extrato de levedura), incubadas a 28 °C com 150 rpm de agitação até a fase logarítmica de crescimento com a D.O próxima de 1 (cerca de 16 horas). O mesmo cultivo de células foi feito com meio de cultura YEPD na concentração de glicose igual a 10% (m/v).

4.4. TRATAMENTO COM ALTA PRESSÃO HIDROSTÁTICA

Após o crescimento da cepa e quantificação de sua densidade ótica (D.O. = 1), a mesma foi levada a um tubo teflon que armazenou cerca de 20 mL do meio de cultura na referida D.O. Antes de lacrar o tubo foi certificada a ausência de bolhas de ar, e após a certificação o tubo teflon foi encapsulado em um cilindro metálico. A pressão foi aplicada através de uma prensa hidráulica operada manualmente (Eureka, MG, Brasil), e o calibrador acoplado a esta prensa foi utilizado para aferir a pressão desejada.

As células foram submetidas ao tratamento com alta pressão hidrostática para em seguida serem analisadas por microscopia de força atômica e por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, do inglês, *High Performance Liquid Chromatography*). As pressões relativas às análises com microscopia de força atômica foram de 50, 100, 150 e 200 MPa por 30 min. Para o experimento de acompanhamento do crescimento celular a pressão aplicada foi de 50 MPa por 30 minutos.

4.5. ANÁLISES DA PAREDE CELULAR POR MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA

Após o tratamento com os valores de pressão descritos no item anterior, as células foram retiradas da cápsula de pressão e imediatamente lavadas com água destilada (2 vezes) e alíquotas de 1 a 3 microlitros foram depositadas no porta amostra do microscópio. O microscópio utilizado neste trabalho se trata do SPM-9600 Series (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão) e suas imagens foram adquiridas no modo contato com força constante, usando cantilevers (ponta refrataria), de Si₃N₄ OMCL-TR (Olympus, Tokyo, Japão) com constante de mola de 0,57 N/m e frequência de ressonância de ≈ 73 kHz.

Foram obtidas imagens de células em uma área de 15 x 15 micrometros no modo de leitura on line. Em seguida no modo off line as imagens foram tratadas e foi retirada a região da imagem que corresponde a parte central da levedura, cerca de 3x3 micrômetros e em seguida analisada no software, *Force Curve* do próprio SPM-9600. Os passos desta etapa são descritos na figura 6.

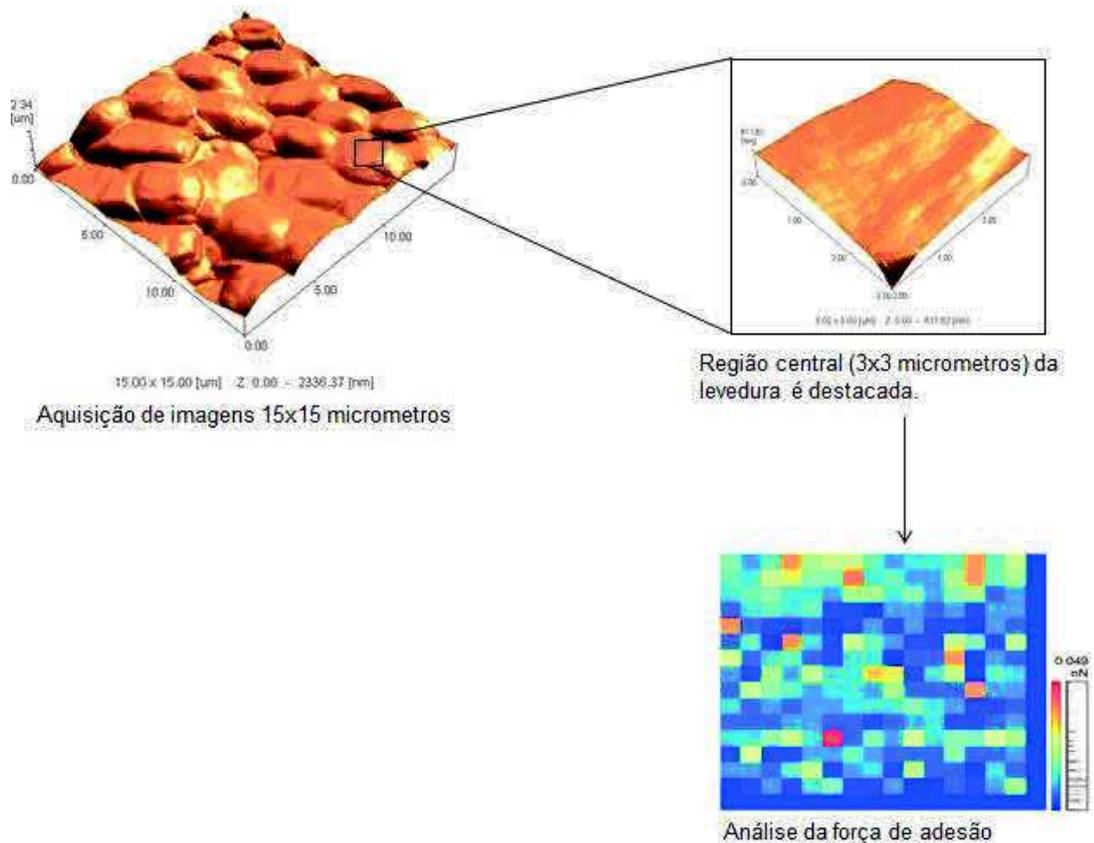


Figura 6. Processo de análise da resistência da parede celular de *S. cerevisiae*. Etapa de aquisição da imagem celular, focalização da parte central da parede celular de uma levedura e consequente utilização do software FORCE CURVE para adquirir a imagem.

Os valores de força de adesão são relacionados com a intensidade em que a ponta que plana sobre a amostra, é repelida. Essa intensidade de repulsão é detectada pela variação de sinal no detector do microscópio de força atômica (AFM, do inglês, *Atomic Force Microscopy*). Os valores de repulsão descritos no gráfico variam da menor força registrada em azul (menor rigidez) a maior força em vermelho (maior rigidez).

4.6. ANÁLISES DE GLICOSE, GLICEROL E ETANOL POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (HPLC)

O perfil cromatográfico da glicose, glicerol e etanol em cada meio de cultura e em cada tempo de fermentação foi analisado por HPLC (LC20AT Prominence, Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão). A coluna utilizada para a separação foi Rezex RFQ-Fast Acid+ (8%), comprimento 100 x 7.8 mm, com fase móvel referente a 0,005N H₂SO₄ em fluxo isocrático de 0.5 ml/min. A análise ocorreu em 60°C (forno: CTO20A, Prominence colun over) e foi detectada por refração diferencial feita pelo detector (RID10A, Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão).

Para a interpretação da separação foi utilizado o software LC Solution (versão 1.25 SP2, Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão). Os picos de glicose, glicerol e etanol foram previamente identificados (e validados com amostra padrão) e o tempo de retenção para glicose se estabeleceu em 3,91 minutos, do glicerol em 5,65 minutos e do etanol em 9,03 minutos. Os valores da integralização da área de cada pico gerada pelo próprio software foram utilizados para gerar os gráficos dos tópicos 5.2 (exceto figura 17, 18 e 20). Esses valores são diretamente proporcionais à quantidade de moléculas na amostra.

4.7. QUANTIFICAÇÃO DE MASSA CELULAR

Para a quantificação da massa celular tubos (2 mL) foram pesados e seu peso foi subtraído do peso total do eppendorf contendo o *pellet* de células que foi centrifugado e seco. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi secado por 1 hora a temperatura ambiente (28°C) e sua massa fresca foi medida em miligramas por mililitro de meio. O processo pode ser evidenciado segundo a tabela 1.

Peso do tubo	Peso do tubo + <i>pellet</i> de células	(Tubos + <i>pellet</i>) - Tubos	Valor em mg/mL de células.
X1	Y1	Y1 – X1	Z1

X2	Y2	Y2 – X2	Z2
X3	Y3	Y3 – X3	Z3
X4	Y4	Y4 – X4	Z4
X5	Y5	Y5 – X5	Z5

Tabela 1. Procedimento para a quantificação da massa celular fresca

4.8. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Todas as análises foram feitas em triplicata usando média e desvio padrão para o cálculo das barras de erro.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 DIFERENTES PRESSÕES HIDROSTÁTICAS E SEUS EFEITOS NA PAREDE CELULAR E MEMBRANA PLASMÁTICA DE *S. cerevisiae*.

ABE (2015) e KAWAMOTO (2009) comparam a adaptação natural de microrganismos barotolerantes com organismos não adaptados a esse tipo de estresse, e relatam que os resistentes a esse tipo de ambiente apresentam à membrana plasmática de maneira mais ordenada (rígida), a temperatura ambiente. Assim com a aplicação de altas pressões, a membrana destes organismos continua com o mesmo aspecto ordenado.

Em contraste, sendo *S. cerevisiae* um organismo natural de baixas pressões, a sua membrana se dispõe desordenada (fluida) e quando dirigida a um ambiente de alta pressão muda sua conformação devido a movimentos rotacionais de grupamentos acila. (ABE, 2015) Com isso atua modificando a ordem natural de fluidez da membrana de *S. cerevisiae*.

Pode-se perceber que a variação da fluidez/rigidez da superfície celular muda de acordo com a intensidade de pressão aplicada, criando faixas de adesões altas e baixas. As células em sua condição normal apresentam uma homogeneidade nas forças de adesão da parede celular (menores que 50 nN), enquanto a medida que a pressão é aplicada, faixas de resistência são claramente evidenciadas na parede celular com regiões de baixa resistência e outras com elevados valores de resistência mecânica (chegando próximo de 140 nN). Isso pode ser traduzido como os prováveis pontos de fratura na parede celular que acarretaram num consequente rompimento desta estrutura (Figura 7).

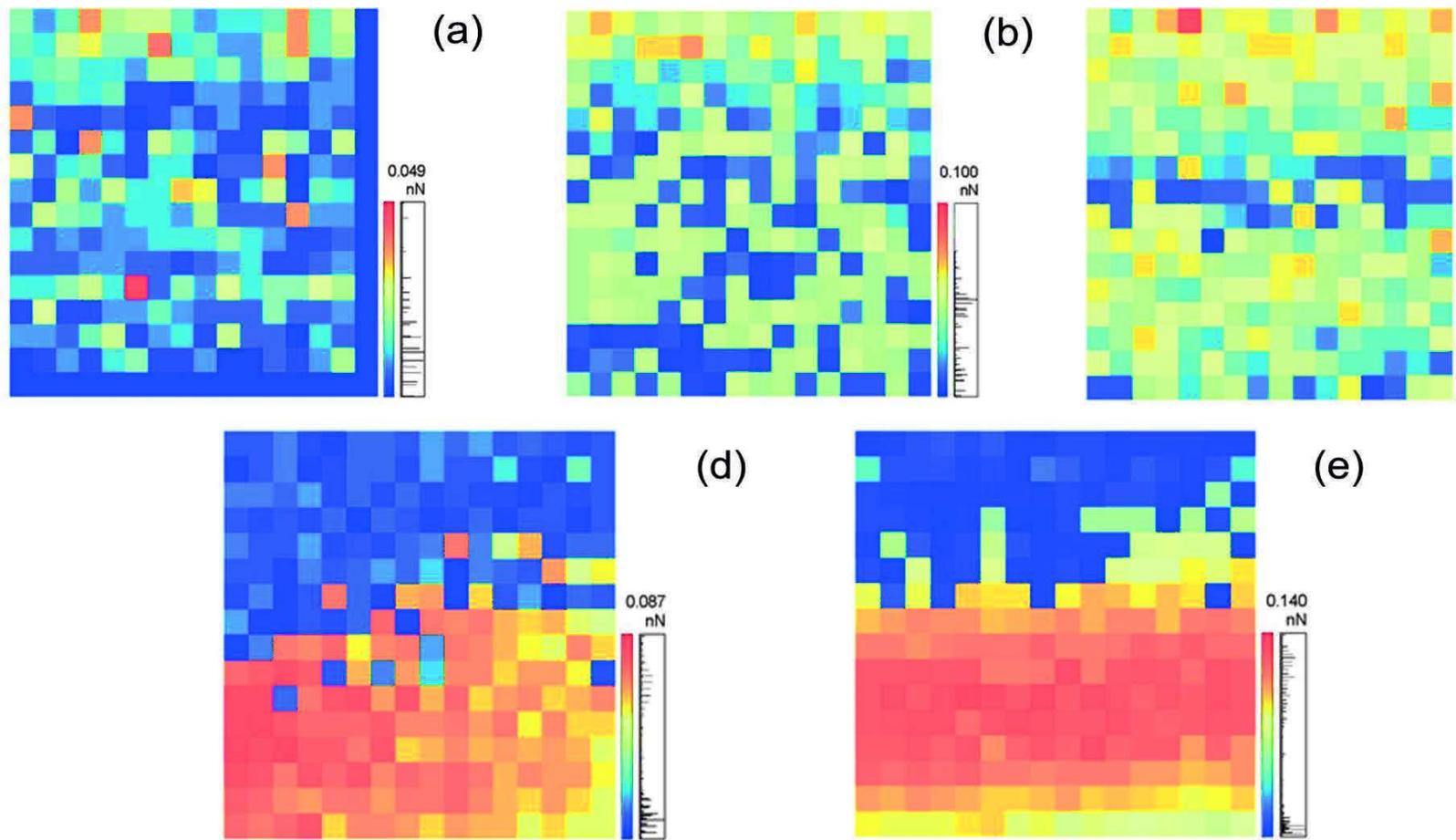


Figura 7. Medição das forças de adesão da parede celular de *S.cerevisiae*. (a) Sem aplicação da alta pressão hidrostática. (b) Com a aplicação de 50 MPa por 30 minutos. (c) Com a aplicação de 100 Mpa por 30 minutos. (d) Com a aplicação de 150 Mpa por 30 minutos. (e) Com a aplicação de 200 Mpa por 30 minutos.

Pressões superiores a 100 MPa são normalmente consideradas letais, variando de acordo com a cepa estudada, condições do seu meio de cultura e tempo de duração do piezotratamento. Além disso, as pressões de 100 a 150 MPa interrompem o *centro organizador de microtúbulos*, e pressões acima de 300 MPa desconectam estruturas subcelulares como as membranas nucleares (KOBIRI, 1995).

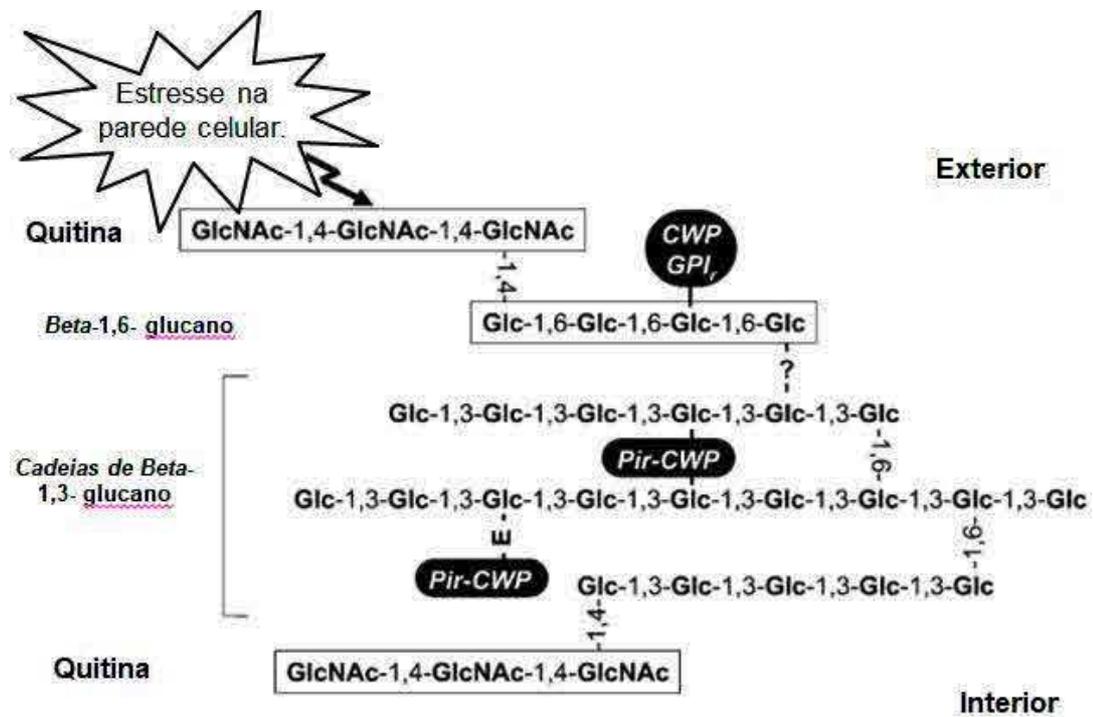


Figura 8. Disposição de polímeros de quitina, 1,3 e 1,6 beta-glicanos na parede celular de levedura. Fonte: Adaptado de LESAGE e BUSSEY, 2006

Segundo Levin (2011) a ramificação entre as cadeias de 1,3 e 1,6 beta-glicano, fornece a resistência mecânica da parede celular, e a deposição de quitina no exterior da célula é induzida na resposta de estresse da parede celular. A partir disso, a disposição das forças de adesão da parede celular visualizadas pelo microscópio de força atômica em função da pressão aplicada pode ser correlacionada com a desestruturação das ligações (1,3 – 1,6) beta glicano, culminando em pontos de fratura e lise celular nas pressões mais elevadas. Já nas pressões de 50 MPa, foi observado que a medição dos valores de resistência ainda apresentam homogeneidade, indicando que as alterações na superfície do substrato são mais brandas, o que pode ser correlacionado com alterações na, rigidez/fluidez da membrana plasmática relatado anteriormente. Com a parede celular ainda

integra, a célula é capaz de se reestruturar de forma eficiente.

Diferenças de pressão intra e extracelular e variações no pH interno do organismo podem alterar a oscilação da ponta modificando as propriedades nanomecânicas de suas estruturas celulares. (BUT, 2005; GABORIAUD, 2005) Como já descrito anteriormente, a pressão hidrostática promove alteração em pH e compactação celular. Esses dois fatores também contribuem para interpretação dos resultados adquiridos nas análises de força de adesão, mostrando que diferentes variações promovidas pelo estresse estão associadas às alterações na superfície celular.

5.1 METABOLISMO ENERGÉTICO APÓS O TRATAMENTO COM HHP

5.1.1 Fase fermentativa

Foram realizadas análises por HPLC foram feitas identificando e mensurando os picos de glicose, etanol e glicerol das células pressurizadas e não pressurizadas nas primeiras 4 horas e após 12 horas de crescimento pós-tratamento com alta pressão hidrostática. Os resultados mostram que nas primeiras 4 horas já é possível identificar a maior produção de etanol (Figura 9)

A divergência de tempo em que o etanol se encontra em maior produção com a utilização da alta pressão hidrostática pode ser explicada pela diferença nas metodologias aplicadas entre este trabalho e o anterior (BRAVIM, 2012). Pois as células pressurizadas não foram usadas como inóculo (como realizado por BRAVIM, 2012), com isso não ocorreu variação no meio de cultura e nas concentrações de nutrientes. Variação essa que pode interferir no potencial da resposta fermentativa. Outro importante fator é a utilização de uma metodologia diferente da descrita no trabalho citado.

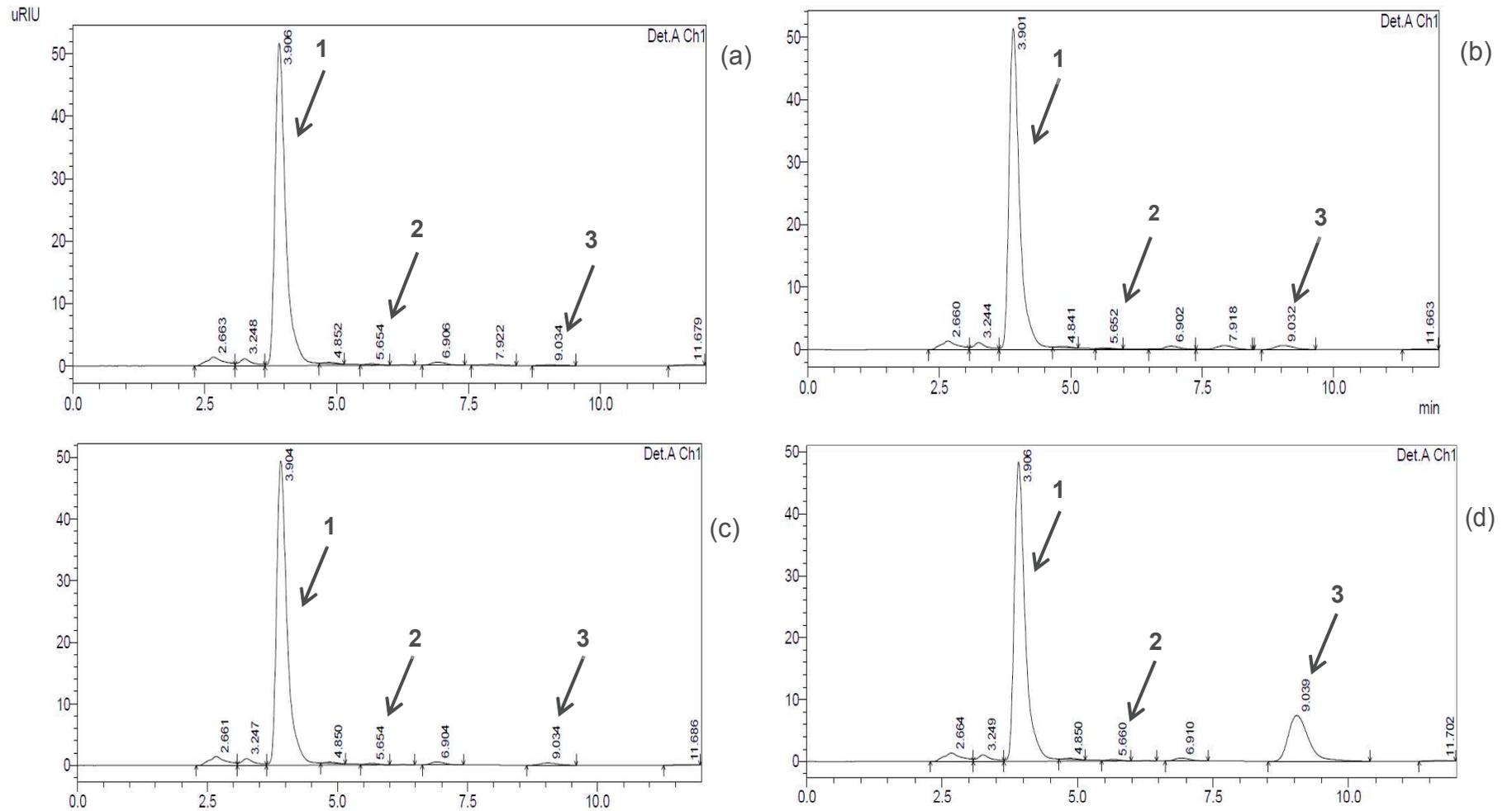


Figura 9. Análise, por HPLC, da produção de etanol, glicerol e glicose. As setas indicam: 1- glicose, 2- glicerol e 3- etanol. Gráfico (a) Controle. Uma hora de crescimento após incubação a 0,1 MPa por 30 minutos. (b) 1 hora de crescimento após a aplicação de 50 MPa por 30 min. (c) Controle, 4 horas de crescimento após incubação a 0,1 MPa por 30 minutos. (d) 4 horas de crescimento após o tratamento.

Na fase fermentativa, a concentração de glicerol produzida se manteve igual entre as células tratadas com a alta pressão hidrostática e as células de controle. Isso mostra que a superexpressão de GPD1 (vista nos dados de microarranjo) não acarretou numa maior produção de glicerol, apesar do passo metabólico para a produção de glicerol-3 fosfato ser o fator chave para a produção de glicerol final. Percebe-se então que a superexpressão de GUT2 (Figura 4), cujo é responsável pela transformação de glicerol 3-fosfato em diidroxiacetona, manteve o balanceamento o produto de glicerol final formado.

Essas dois genes, GPD1 e GUT2, são responsáveis por constituir a lançadeira glicerol-3-fosfato. Esse mecanismo contribui para a geração de espécies reativas de oxigênio, pois a mesma transfere equivalentes redutores do citosol para a mitocôndria para a redução da ubiquinona a ubiquinol utilizado na cadeia transportadora de elétrons (Figura 10) (LARSSON et I.1998)

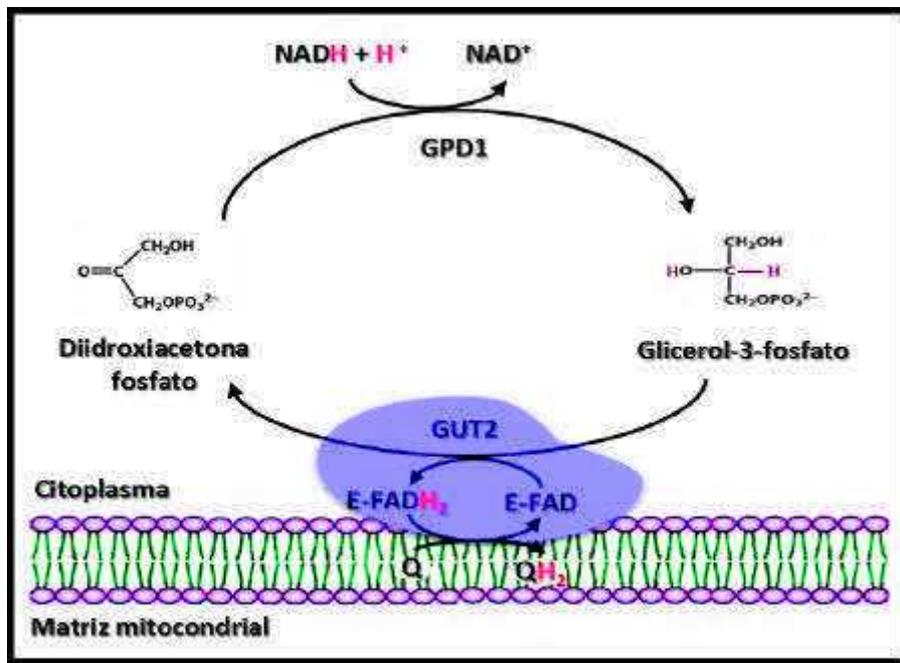


Figura 10. Representação esquemática da lançadeira Glicerol 3 fosfato..Fonte: MONTOVANELLI, 2016.

Além da relação entre a alta pressão hidrostática e a geração de espécies reativas de oxigênio, as análises por HPLC sugerem que este passo está sendo induzido para que a célula forme mais glicerol 3-fosfato e diidroxiacetona, que tem dentro de suas

funções bioquímicas a síntese de fosfolipídios, que participam da síntese, reparo e reestruturação da membrana plasmática (Figura 11) (SCANES, 1998).

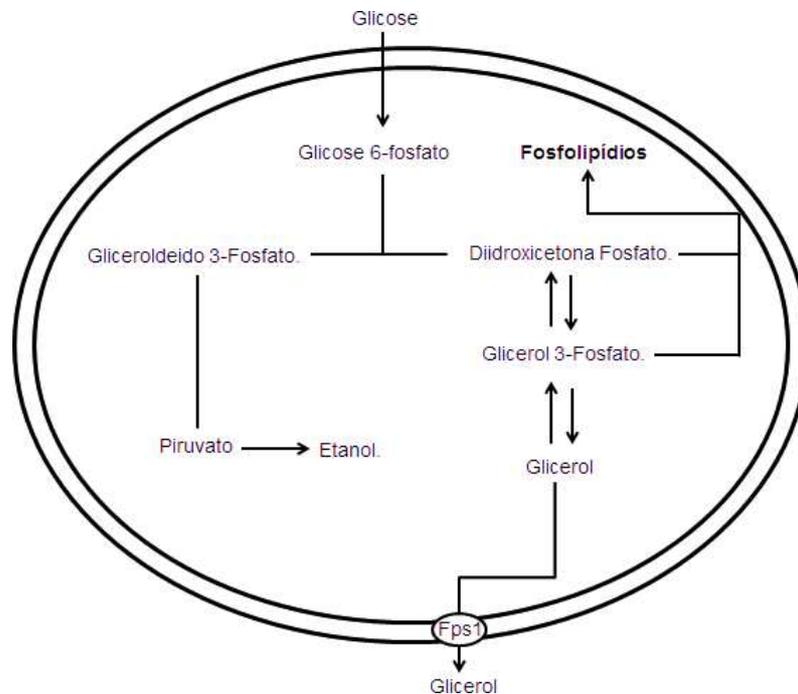


Figura 11. Representação do processo de fermentação. Passos para a formação de Diidroxicetona Fosfato e Glicerol 3-fosfato, requeridos para a formação de fosfolipídios. Fonte: Adaptado de SCANES, 1998.

Os resultados 12 horas pós-tratamento mostraram que as induções já descritas por Bravim (2012), de genes relacionados com a importação da glicose (gene Hxt descrito na Figura 4), atuam acelerando o processo fermentativo. Junto a essa informação, pode-se perceber que a aceleração da fermentação também pôde ser notada pelo consumo de glicose relatado na figura 12.

Pode-se perceber também, que a formação de etanol permanece maior até o período de 12 horas após a aplicação da pressão (Figura 13), descrita anteriormente (Bravim, 2012) apenas até a oitava hora de crescimento. As concentrações de glicerol permaneceram sem diferença estatística (Figura 14) mostrando que até o momento de 12 horas pós-pressão não houve alteração da velocidade de glicerol formado. Essa regulação ajuda a célula a não perder eficiência na sua fermentação alcoólica, visto que a quantidade final de etanol não é afetada pelo tratamento descrito.

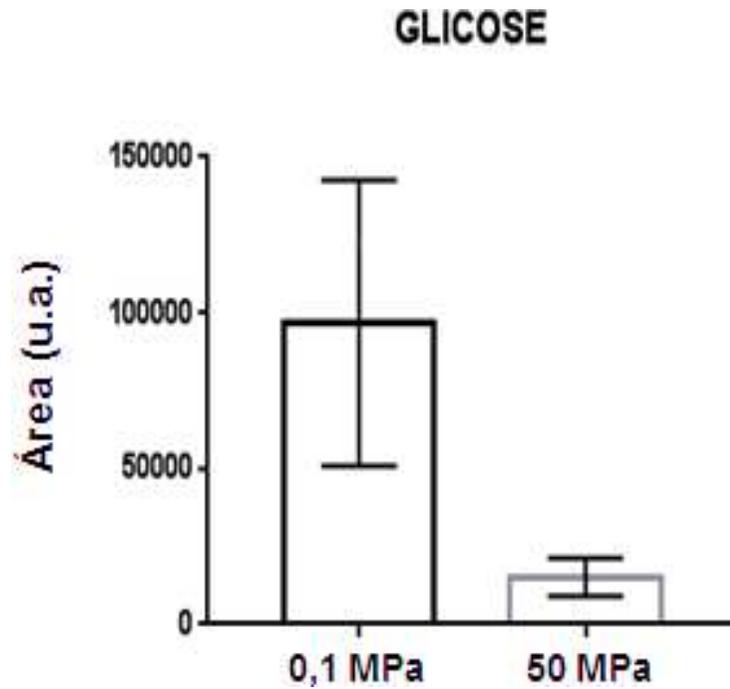


Figura 12. Glicose presente no meio YEPD, 12 horas após o tratamento com alta pressão hidrostática, identificada pela área do pico no cromatograma.

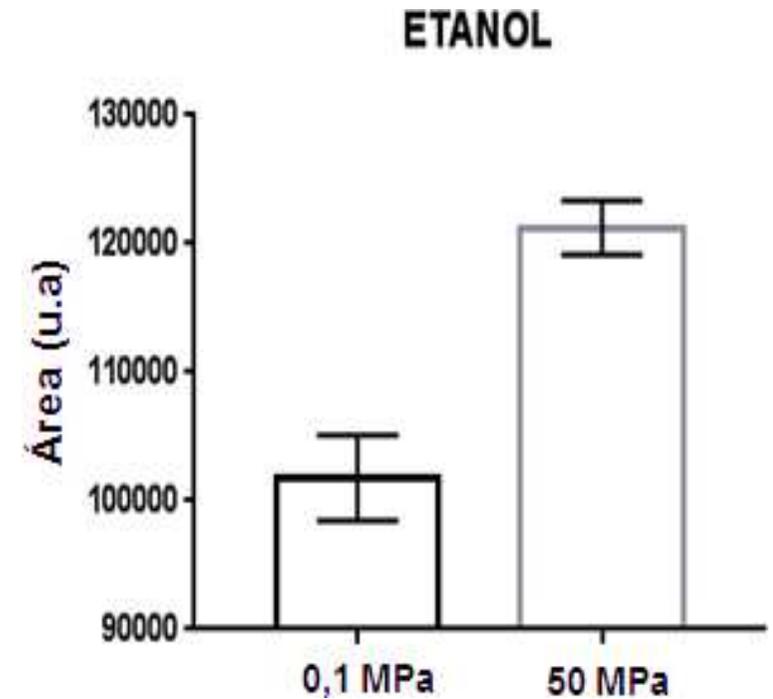


Figura 13. Etanol no meio YEPD, 12 horas após tratamento com alta pressão hidrostática, identificada pela área do pico no cromatograma..

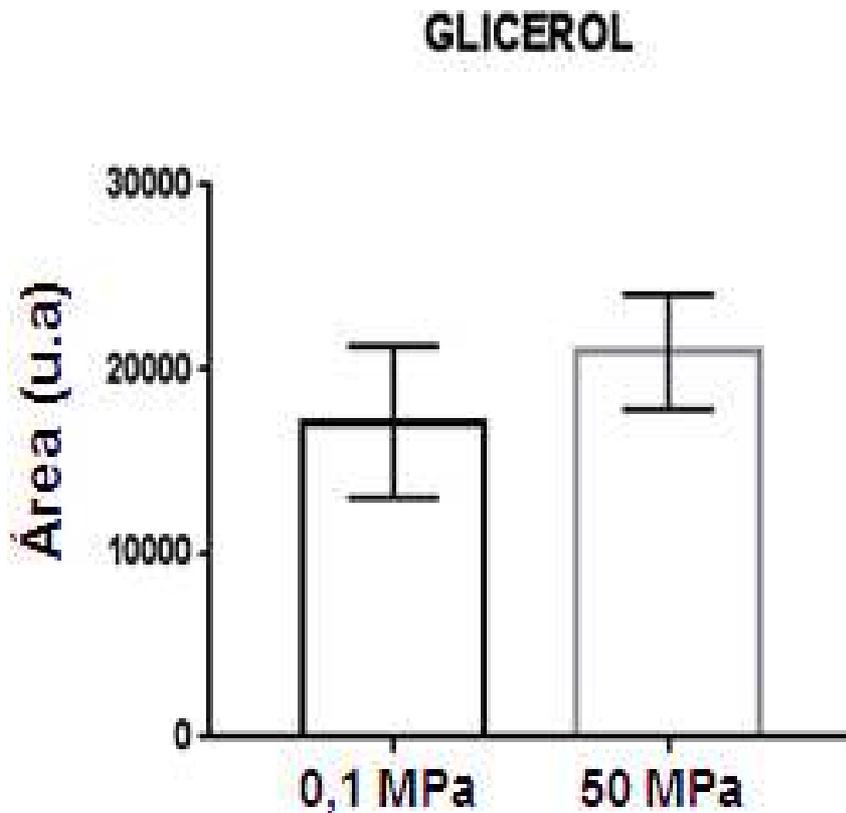


Figura 14. Glicerol presente no meio YEPD, 12 horas após a aplicação da alta pressão.

5.1.2 Pós diauxia

BRAVIM (2016) em suas análises de microarranjo evidenciou uma indução na regulação de genes relacionados com ciclo do ácido cítrico (Figura 4). Com o açúcar exaurido do meio a *S. cerevisiae* começa a sua segunda fase de proliferação (pós diauxia), e assim é evidenciado que a influência das respostas obtidas na microanálise perdura até sua atividade respiratória.

A quantidade de etanol presente no meio extracelular das células tratadas com alta pressão hidrostática e células não tratadas com HHP mostrou uma completa metabolização do etanol no período 36 horas após o tratamento com alta pressão. (Figura 13)

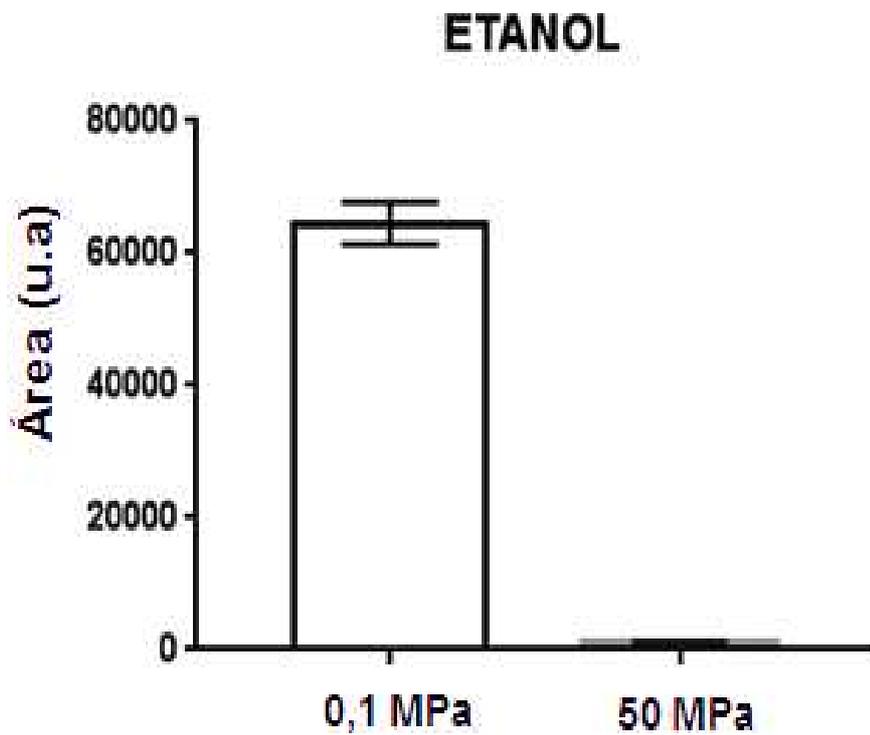


Figura 13. Etanol em meio YEPD, 36 horas após o tratamento com alta pressão hidrostática.

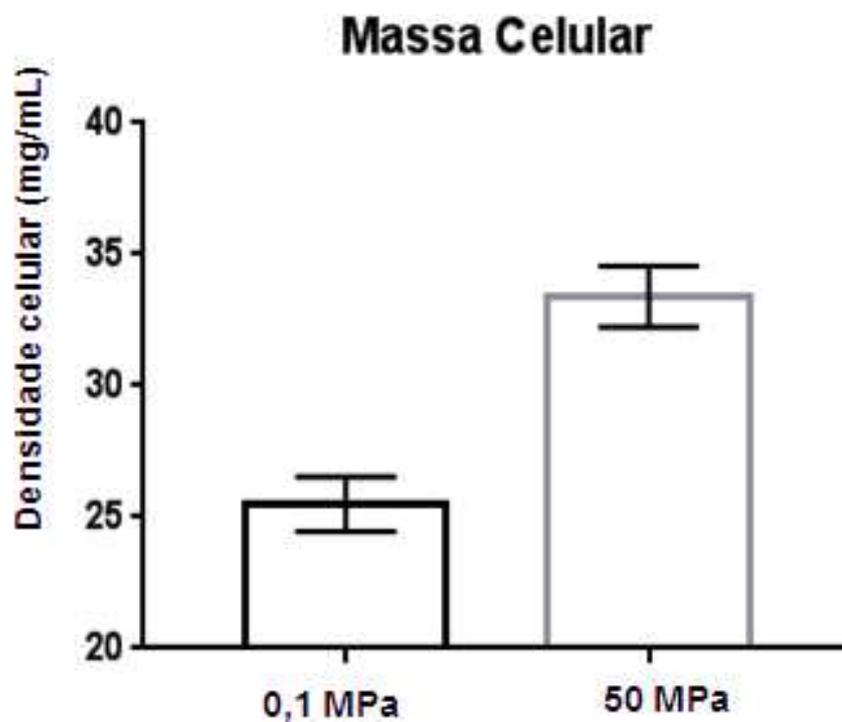


Figura 14. Massa celular de *S. cerevisiae*, 36 horas após o tratamento alta com pressão hidrostática.

Em conjunto com os dados do consumo de etanol foram feitas pesagens dos pellets (Figura 14) no mesmo momento da quantificação anterior, corroborando a ausência de etanol nas amostras que passaram sob piezotratamento. Indicando assim que a velocidade em que o consumo do etanol foi feito pelas células tratadas com a alta pressão hidrostática foi maior do que as células controle, pois a maior metabolização do etanol indica maior metabolismo aeróbico, conseqüentemente mostrando uma maior velocidade na divisão celular. As células tratadas com alta pressão apresentaram maior produção de massa celular (que variam de 19,7 a 29,6 % mais massa celular produzida em 36 horas de crescimento).

Portanto, as superexpressões de PYC1, CIT1, IDH2, MDH1, SDH4, NDI1, CYC7, COX15, indicam uma possível aceleração no metabolismo respiratório. Em adicional outro dois genes da fase respiratória foram identificados superexpressos no presente trabalho (ICL1 e ACO1). (Figura 4).

Outro importante fator que relaciona o consumo do etanol evidenciado é a identificação no presente trabalho de dois genes, ALD4 e ACS1, além dos que já foram descritos na literatura, responsáveis na via de degradação do etanol (Figura 4). O gene ALD4 formador de uma enzima (aldeído desidrogenase), com o papel na transformação de acetaldeído em acetato, que conseqüentemente sofrerá a ação de acetilCoA sintase (formado pela expressão de ACS1) . Essa resposta no microarranjo em conjunto com os dados produzidos pela técnica de cromatografia demonstra a modulação da atividade respiratória exercida pelo tratamento com alta pressão hidrostática. Os resultados mostraram que a eficiência respiratória culminou em uma maior massa celular formada (36 horas pós-pressão). Assim as células que sofreram tratamento com a alta pressão hidrostática chegaram mais rapidamente a sua fase estacionária.

5.1.3 Fase estacionária.

O completo consumo do etanol nas células controle só foi evidenciado 12 horas depois da quantificação da fase pós-diauxia. Com isso a massa celular foi também mensurada (Figura 17), mostrando que tanto a célula tratada com a alta pressão hidrostática como a células controle atingem no fim do consumo de seus nutrientes,

a mesma massa celular. Indicando, portanto, que o aumento da pressão trabalha de forma a acelerar os processos fermentativos e respiratórios.

Os resultados indicam, portanto, uma provável utilização da alta pressão hidrostática em processos industriais para obtenção de massa celular de *S.cerevisiae*. Com isso, se fez necessário à variação da quantidade de açúcar no meio, pois ambientes industriais utilizam melaço para produção de massa celular (Ex: fermento biológico).

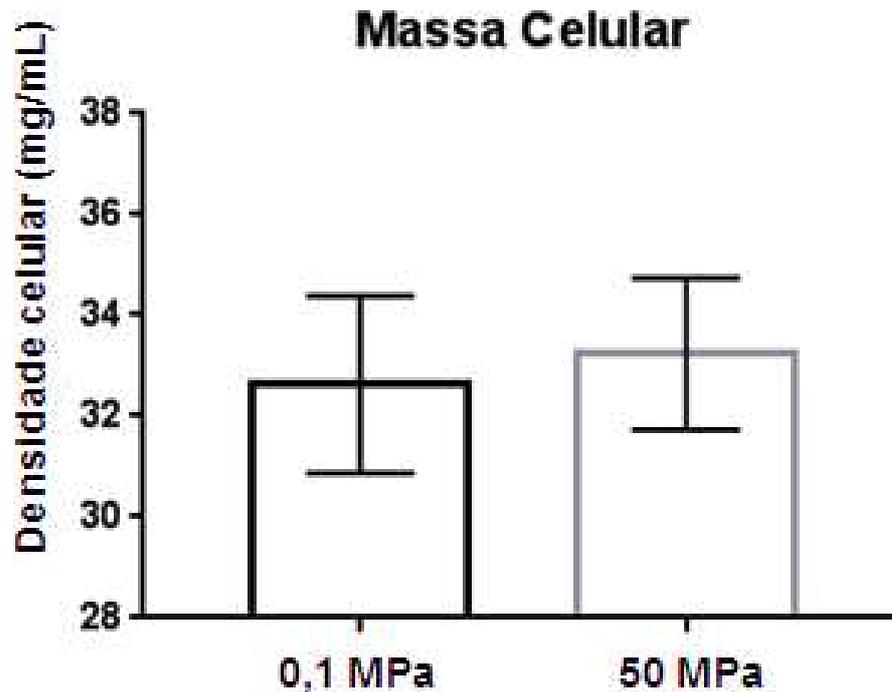


Figura 15. Massa celular obtida 60 horas após a aplicação de alta pressão hidrostática.

5.2.4. Alteração na concentração de glicose

Com o intuito de adequar o ambiente fermentativo industrial (em termos energéticos), tendo em vista que a produção industrial de massa celular é preparada com melaço de cana, que apresenta maior disponibilidade de glicose no meio, um experimento adicional foi realizado para avaliar se o efeito na aceleração da produção de massa celular se mantém em quantidades maiores de açúcar. A mesma metodologia de cultura foi realizada, porém em um meio YEPD contendo 10% de glicose. Após o tratamento com alta pressão hidrostática (50 Mpa por 30 minutos) as células mostraram uma velocidade no crescimento similar ao trabalho realizado em YEPD 2% (36 horas pós-pressão). Entretanto a diferença na massa celular continuou evidenciada em 60 horas após o tratamento com alta pressão, indicando que o aumento da quantidade de açúcar prolonga o efeito de aceleração do crescimento celular de células tratadas com alta pressão hidrostática.

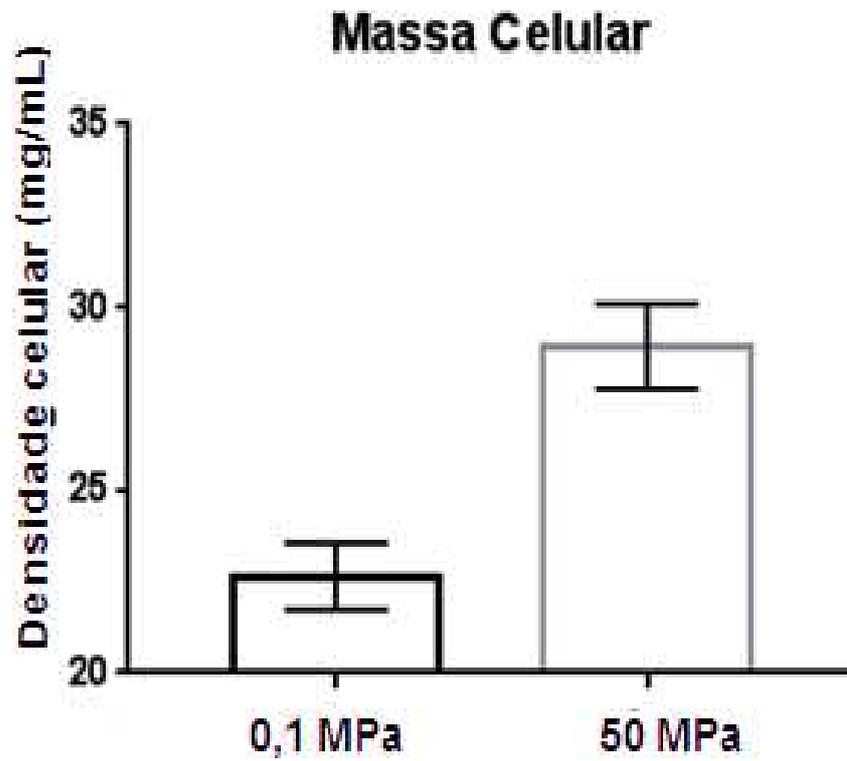


Figura 18. Massa celular após 36 horas de crescimento em meio YEPD com 10% de glicose.

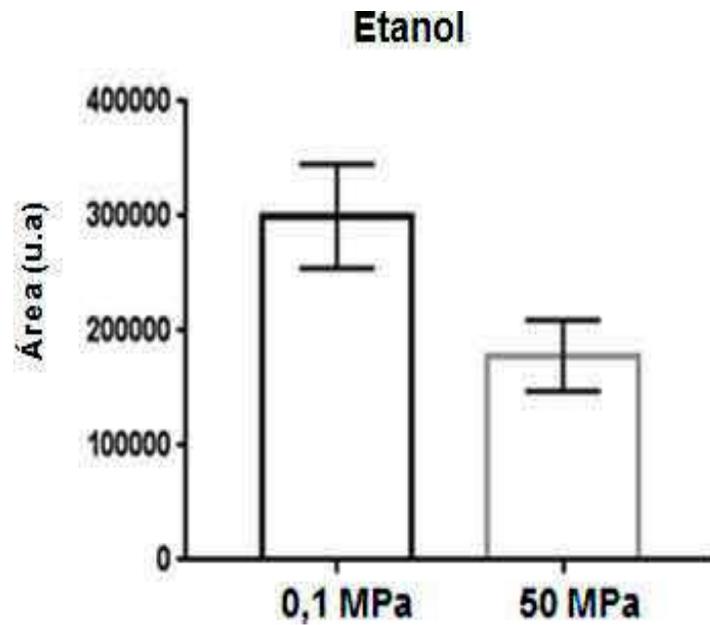


Figura 19. Etanol presente no meio YEPD após 60 horas (pós-tratamento).

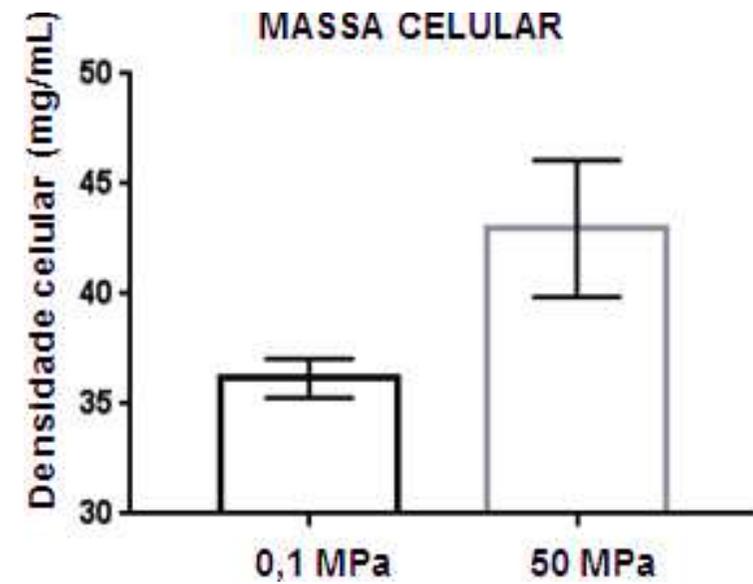
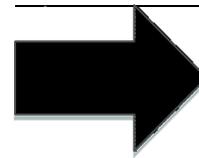


Figura 20. Densidade celular produzida após 60 horas (pós-tratamento).

6 CONCLUSÃO

Os resultados mostram que a alta pressão hidrostática altera a resistência mecânica de células de *S.cerevisiae*, que normalmente se encontram com uma homogênea distribuição de resistência não ultrapassando os 50 nN. Após o tratamento com a alta pressão esses valores são alterados, criando faixas de resistência distintas e chegando a ultrapassar os 100 nN em regiões de maior resistência.

A indução da lançadeira glicerol 3-fosfato, pode estar relacionada com uma possível formação dos subprodutos glicerol 3-fosfato e diidroxicetona para reestruturação das membranas plasmáticas, visto que as análises de quantificação de glicerol não mostraram diferença entre tratamento e controle em nenhum momento durante o acompanhamento de crescimento celular, mostrando que a superexpressão de GPD1 não alterou a formação de Glicerol.

Após a etapa fermentativa podemos perceber que as células pressurizadas consumiram o etanol produzido antes da população controle (corroborando os dados de microanálise) que evidenciam a indução das etapas do metabolismo respiratório descrita na literatura (Bravim, 2016).

Dois genes que participam da etapa da via de degradação do etanol também foram identificados superexpressados (ALD4, ACS1).

Após o tratamento com alta pressão hidrostática, foi identificado um aumento da produção de massa celular de 19,7 a 29,6 % maior que as células que não sofreram o piezotratamento. Este método também mostrou eficiência em meio de cultura com maior quantidade de glicose (10%), onde as células que sofreram com a alta pressão hidrostática apresentaram uma produção média de 15,7% mais massa celular que a população controle em 36 horas de crescimento (pós tratamento). No ambiente com maior quantidade de açúcar a produção de massa celular se manteve maior em até 60 horas pós pressão.

Este resultado levou a obtenção do depósito de patente intitulado "*Processo para o aumento da massa celular em leveduras utilizando altas pressões hidrostáticas*" com numero de depósito no INPI BR 10 2018 002114 1.

7 REFERÊNCIAS

- ABE, F., HORIKOSHI K. Vacuolar in *Saccharomyces cerevisiae* cells in Response to elevated Hydrostatic Pressure. **High Pressure Sci. Technol.**, v.7 p1312-1314. 1998.
- ABE, F. Effects of High Hydrostatic Pressure on Microbial Cell Membranes: Structural and Functional Perspectives. **Subcellular Biochemistry**. 2015
- AERTSEN, A. et al. Biotechnology under high pressure: applications and implications. **Trends in biotechnology**, v. 27, n. 7, p. 434-441, 2009
- ARAÚJO, F. L., DIAS, M.V.C, BRITO, E.A. & OLIVEIRA JÚNIOR, S. Enriquecimento protéico de alimentos por levedura em fermentação semissólida: alternativa na alimentação animal. **Tecnol.&Ciên.Agropec.,João Pessoa**, v.3, p.47-53, 2009.
- BARNETT J.A. A history of research on yeasts 5: the fermentation pathway. **Yeast** 20:509–543. 2003.
- BENEY, L.; GERVAIS, P. Influence of the fluidity of the membrane on the response of microorganisms to environmental stresses. **Applied of Microbiology and Biotechnology**, v. 57, n. 1-2, p. 34-42, 2001.
- BRAVIM, F. *et al.* High hydrostatic pressure activates gene expression that leads to ethanol production enhancement in a *Saccharomyces cerevisiae* distillery strain. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 97, n. 5, p. 2093-2107, 2013.
- BRAVIM, F. *et al.* High hydrostatic pressure leads to free radicals accumulation in yeast cells triggering oxidative stress. **FEMS Yeast Research**.2016.
- BITTERMAN, K.J.; MEDVEDIK, O.; SINCLAIR, D.A. Longevity regulation in *Saccharomyces cerevisiae*: Linking metabolism, genome stability, and heterochromatin. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. v. 67, n. 3, pp. 376-399. Set. 2003.
- BUTT, H.-J.; CAPPELLA, B.; KAPPL, M. Force measurements with the atomic force microscope: Technique, interpretation and applications. **Surface science reports**, v. 59, n. 1, p. 1–152, 2005.
- DAGUE, E.; BITAR, R.; RANCHON, H.; DURAND, F.; YKEN, H.M.; FRANÇOIS, J.M. An atomic force microscopy analysis of yeast mutants defective in cell wall architecture. **Yeast**. v. 27, pp. 673-684. 2010.
- De GROOT, P. W., C. RUIZ, C. R. VÁZQUEZ DE ALDANA, E. DUEÑAS. A genomic approach for the identification and classification of genes involved in cell wall formation and its regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. **Comp. Funct. Genomics** 2: 124–142. 2001.
- FELDMANN, H. (Ed.). *Yeast: molecular and cell biology*. (2. ed) John Wiley & Sons, v.1, 2012.

FERNANDES, P. M. B. How does yeast respond to pressure? *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 38, n. 8, p. 1239-45, 2005.

FERNANDES, P. M. B. *Saccharomyces cerevisiae* response to high hydrostatic pressure. In: MICHIELS, C.; BARTLETT, D. H., AERTSEN, A (Ed.). *High-pressure microbiology*. Cambridge: **American Society for Microbiology**. p. 145-166, 2008.

FERNANDES, P. M. B et al. *Levedura: do pão à biotecnologia*. Vitória, ES: Edufes, 2009.

GABORIAUD F., S. BAILET, E. DAGUE, F. JORAND, J. Surface Structure and Nanomechanical Properties of *Shewanella putrefaciens* Bacteria at Two pH values (4 and 10) Determined by Atomic Force Microscopy. **Journal of Bacteriology** 187, p.3864. 2005.

GERSHON, H.; GERSHON, D. The budding yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, as a model for aging research: a critical review. **Mechanisms of ageing and development**, v. 120, n. 1, p. 1-22, 2000.

GOFFEAU, A et al. Life with 6000 genes. *Science*, v. 274, n. 5287, p. 546-567, 1996.

JOSEPH L. DERISI, VISHWANATH R. IYER, PATRICK O. BROWN. Exploring the Metabolic and Genetic Control of Gene Expression on a Genomic Scale. **Science**, Vol. 278, n. 5338, pp. 680-686. 1997.

KOBORI H, SATO M, TAMEIKE A, SHIMADA S, OSUMI M. Ultrastructure effects of pressure stress to the nucleus in *Saccharomyces cerevisiae*: a study by immunoelectron microscopy using frozen thin sections. **FEMS Microbiol. Lett.**;132: 253-25. 1995.

KREGER-VAN RIJ, N. J. W. Classification of yeasts. I: ROSE A. H.; HARRISON, J. S. (Ed.) **The yeasts**. (2. ed) London: Academic Press v. 1, p. 5-61, 1987.

LARSSON, C.; PAHLMAN, I.; ANSELL, R.; RIGOULET, M.; ADLER, L.;

GUSTAFSSON, L. The importance of the glycerol 3-phosphate shuttle during aerobic growth of *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, v.14, p.347-357, 1998.

LEVIN, D. E., 2011 Regulation of cell wall biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*: the cell wall integrity signaling pathway. **Genetics** 189: 1145–1175.

LESAGE, G., AND H. BUSSEY. Cell wall assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.** 70: 317–343; 2006

LOPES, M. L. M., MESQUITA, V. L. V., CHIARADIA, A. C. N., FERNANDES, A. A. R., FERNANDES, P. M. B. High Hydrostatic Pressure Processing of 66 Tropical Fruits: Importance for maintenance of the natural food properties. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1189, p. 6 - 10, 2010

MENTRÉ, P. et al. Pressure-sensitivity of endoplasmic reticulum membrane and nucleolus as revealed by electron microscopy. **Cell Mol Biol**, v. 45, p. 353-62. 1999.

MENTRÉ, P.; HUI BON HOA, G. Effects of high hydrostatic pressures on living cells: A consequence of the properties of macromolecules and macromolecule associated water. **International Review of Cytology**, v. 201, p. 1-84, 2001.

MOTSHWENE, P. et al. LEA (late embryonic abundant)-like protein Hsp 12 (heat-shock protein 12) is present in the cell wall and enhances the barotolerance of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochem J**, v. 377, p. 769-774, fev 2004.

NEVOIGT, E. Progress in metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 72, n. 3, p. 379-412, 2008.

ORLEAN, P. Architecture and Biosynthesis of the *Saccharomyces cerevisiae* Cell Wall. **YEASTBOOK**, p. 775-780. 2012.

PALHANO, F. L. et al. Pressure response in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: from cellular to molecular approaches. **Cellular and Molecular Biology**, v. 50, n. 4, p. 447-457, 2004.

PIŠKUR J., COMPAGNO C. Molecular mechanisms in Yeast Carbon Metabolism. (2ed.).2014

KLIS, F. M., A. BOORSMA, AND P. W. DE GROOT. Cell wall construction in *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast** 23: 185–202. 2006.

KLIS, F. M., S. BRUL, AND P. W. DE GROOT. Covalently linked wall proteins in ascomycetous fungi. **Yeast** 27: 489–493. 2010.

DRANGINIS, A. M., J. M. RAUCEO, J. E. CORONADO, AND P. N. LIPKE. A biochemical guide to yeast adhesins: glycoproteins for social and antisocial occasions. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.** 71: 282–294., 2007.

SOMERO, G. N. Adaptations to high hydrostatic pressure. **Annual review of physiology**, v. 54, n. 1, p. 557-577, 1992.

ROTHSCHILD, L. J.; MANCINELLI, R. L. Life in extreme environments. **Nature**, v. 409, n. 6823, p. 1092-101. 2001.

TROTT, A.; MORANO, K. A. The yeast response to heat shock. In: HOHMANN, S.; MAGER, W. H. **Yeast stress response**. 2^a. p. 71-119. , 2003

