

RESPOSTA AO ESTRESSE TÉRMICO E ETANÓLICO EM CEPAS INDUSTRIAIS DE SACCHAROMYCES CEREVISIAE: EFEITOS SOBRE O CRESCIMENTO CELULAR E A PRODUÇÃO DE PROTEÍNAS



<https://doi.org/10.56238/arev7n2-222>

Data de submissão: 19/01/2025

Data de publicação: 19/02/2025

Vanessa Correia Mota Tobias

Doutoranda do Programa de Pós-Graduação de Recursos Naturais,
Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul – Mato Grosso do Sul, Brasil.

E-mail: vanessacorreiamota@gmail.com

Orcid: <https://orcid.org/0009-0004-8682-1658>

Lattes: <http://lattes.cnpq.br/3643458296586577>

Maria do Socorro Mascarenhas

Doutor em Recursos Naturais pela Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul,
Mato Grosso do Sul, Brasil,

E-mail: maria_mascarenhas@outlook.com

Orcid: <http://orcid.org/0000-0002-5343-4502>

Lattes: <http://lattes.cnpq.br/3984651130316253>

Margareth Batistote

Professora Sênior do Programa de Pós-Graduação em Recursos Naturais da
Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, Brasil

E-mail: margarethbatistote@gmail.com

Orcid: <https://orcid.org/0000-0001-9865-2362>

Lattes: <http://lattes.cnpq.br/2473361189009328>

RESUMO

O sinergismo entre o estresse térmico e o etanol afeta diretamente a funcionalidade e a sobrevivência das leveduras em ambientes industriais, comprometendo sua fisiologia celular. Portanto, este estudo tem como objetivo comparar as proteínas associadas ao estresse térmico e etanólico, bem como investigar os impactos desses fatores no crescimento celular e na produção total de proteínas. As leveduras Fleischmann®, Santa Adélia e Pedra-2 foram cultivadas em meio YPD a 2%. A biomassa foi recuperada por centrifugação e inoculada em caldo de cana-de-açúcar a 22°Brix, pH 5,0, e incubada a 30 e 40°C, com concentrações de etanol variando de 0, 5, 12 e 16% (v.v-1). A lise ocorreu em Tris-HCl e esferas de vidro, e a quantificação da proteína total foi realizada pelo método de Bradford, seguida de leituras em espectrofotômetro a 595 nm. As proteínas de choque térmico (HSPs), especialmente HSP70 e HSP104, desempenham um papel crucial na proteção e manutenção celular em condições adversas. A linhagem Fleischmann® apresentou menor tolerância, com redução significativa no crescimento celular. Por outro lado, a linhagem Pedra-2 demonstrou maior robustez, destacando-se por sua maior produção de biomassa e tolerância ao estresse. A análise de componentes principais (PCA) confirmou a correlação entre a produção total de proteínas e a tolerância ao estresse, consolidando a linhagem Pedra-2 como a mais promissora para aplicações industriais. Este estudo fornece contribuições valiosas para a compreensão da interação de proteínas de choque térmico com fatores de estresse severos em leveduras industriais, com o objetivo de melhorar a eficiência e promover a sustentabilidade nos processos de fermentação.

Palavras-chave: Quantificação de Proteínas. Crescimento celular. Leveduras Industriais.

1 INTRODUÇÃO

Saccharomyces cerevisiae é amplamente utilizada em processos biotecnológicos devido à sua versatilidade e adaptabilidade, sendo uma das principais leveduras utilizadas na produção de bioetanol em larga escala (AZHAR et al., 2017). Essa levedura também desempenha um papel importante na viabilização do etanol de segunda geração, alinhando-se aos Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS), que incentivam o uso de energia renovável e a inovação industrial. Apesar de sua eficiência, o ambiente fermentativo apresenta desafios significativos, como altas concentrações de etanol, variações térmicas e estresses osmóticos, que impactam diretamente o metabolismo celular, a integridade da membrana plasmática e a viabilidade celular (WALKER & BASSO, 2020).

De acordo com Lairón-Peris et al. (2021), fatores de estresse como variações de temperatura, altas concentrações de etanol, estresse osmótico, flutuações de pH e presença de agentes contaminantes exercem pressão negativa sobre os mecanismos bioquímicos, fisiológicos e genéticos da levedura. Esses fatores podem causar alterações no metabolismo celular, impactando na formação de metabólitos indesejáveis e reduzindo a eficiência da fermentação (COERTJENS et al., 2023). Paradoxalmente, embora o etanol seja um produto natural do metabolismo da levedura, sua alta concentração no meio de fermentação torna-se tóxica para esses microrganismos. Essa toxicidade provoca alterações nas vias metabólicas e compartimentos celulares, comprometendo o potencial biotecnológico das leveduras (MUELLER et al., 2020). Tendo em vista que o etanol tem a capacidade de atravessar a membrana celular, aumentando sua fluidez e permeabilidade, essas alterações nos tempos de fermentação prolongados e altas temperaturas podem levar à perda de viabilidade e apoptose (JIN et al., 2022).

Em altas concentrações, o etanol pode gerar efeitos drásticos, como o acúmulo de fosfolipídios na membrana plasmática. Nesse ambiente, interage com ácidos graxos insaturados e proteínas localizadas na membrana, alterando sua dinâmica estrutural e funcional (CHETTY et al., 2022). Essas interações comprometem a mobilidade das cadeias de ácidos graxos e proteínas de membrana, aumentando a polaridade da região e dificultando a troca de moléculas polares entre o ambiente extracelular e intracelular (BERTRAND et al., 2020). Essas alterações afetam diretamente o posicionamento de proteínas e fosfolipídios, prejudicando a capacidade da levedura de manter o gradiente de concentração de compostos essenciais presentes na membrana plasmática. Esse comprometimento resulta na inibição do metabolismo da glicose, fundamental para o crescimento e sobrevivência celular (FRALLICCIARDI et al., 2022).

Dentre as respostas adaptativas da levedura, as condições de estresse desencadeiam mecanismos de produção de proteínas, que desempenham um papel crucial na proteção contra danos causados pelo estresse térmico e etanol. Essas proteínas permitem que as células recuperem seu

metabolismo e integridade, mantendo processos fisiológicos essenciais, mesmo em condições adversas. De acordo com Rosenzweig et al. (2019), as Proteínas de Choque Térmico (HSPs) funcionam como "chaperonas moleculares", impedindo a agregação de proteínas desnaturadas em altas temperaturas, dentre as quais se destacam as proteínas HSP40, HSP60, HSP70 e HSP90. Além disso, como observado por Auesukaree (2017), as HSPs contribuem para a recuperação de proteínas danificadas, garantindo a manutenção da homeostase celular em condições de estresse.

Durante o processo de fermentação, *S. cerevisiae* apresenta respostas adaptativas específicas para enfrentar o estresse causado pelo etanol. Este composto afeta a fluidez da membrana plasmática, além de danificar macromoléculas como proteínas e ácido desoxirribonucléico. Para minimizar os efeitos adversos do etanol, a levedura ativa mecanismos de defesa que envolvem um conjunto de proteínas, como Hsp122, Ssb1, Ssb24, HSP106, Gpd18 e Hsp318, que auxiliam em diversos mecanismos. As PHEs podem atuar em associação, visando a preservação e manutenção da integridade celular na presença de estresse térmico e etanólico. De acordo com Ajmal (2023), as proteínas de estresse por calor e etanol formam uma família de proteínas cuja expressão é desencadeada e regulada positivamente em resposta a várias condições de estresse.

O sinergismo entre os fatores de estresse desempenha um papel crítico no funcionamento celular. Dentre esses fatores, a variação de temperatura é particularmente significativa, pois pode causar desnaturação de proteínas, levando ao dobramento e agregação inadequados dessas moléculas. Esse processo compromete a estabilidade da parede celular, estrutura fundamental para manter a vitalidade e integridade da célula. Estudos sobre o perfil de produção de proteínas geradas em resposta ao estresse térmico e etanólico podem aprofundar nossa compreensão dos desafios enfrentados pelas leveduras em condições industriais. Esse conhecimento é crucial para a identificação de cepas mais robustas e capazes de otimizar a eficiência na produção de bioetanol, contribuindo para a sustentabilidade dos processos industriais e a preservação dos recursos naturais. Nesse contexto, o estudo tem como objetivo comparar as proteínas associadas à resposta ao estresse térmico e etanólico em linhagens industriais de *Saccharomyces cerevisiae*, bem como avaliar o crescimento celular e a produção total de proteínas sob diferentes concentrações de etanol.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 LOCAL DE DESENVOLVIMENTO DO ESTUDO

O estudo foi realizado no Laboratório de Biotecnologia, Bioquímica e Biotransformação localizado no Centro de Estudos de Recursos Naturais – CERNA da Universidade do Estado de Mato Grosso do Sul, Dourados/MS.

2.2 PROTEÍNAS ASSOCIADAS AO ESTRESSE TÉRMICO E ETANÓLICO

Para coletar informações sobre proteínas de choque de calor e etanol e suas estruturas conformacionais, foi realizada uma pesquisa em sites, artigos científicos e bancos de dados de proteínas online. Os dados foram coletados, analisados, ordenados e tabulados de acordo com as informações relevantes para o estudo.

2.3 MICRORGANISMOS UTILIZADOS

As leveduras utilizadas neste estudo foram *S. cerevisiae* Fleischmann® (FLEI),® adquirida em lojas locais, e as linhagens selecionadas Santa Adélia 1 (SA-1) e Pedra-2 (PE-2), disponíveis no Laboratório de Biotecnologia, Bioquímica e Biotransformação, localizado no Centro de Estudos de Recursos Naturais – CERNA da Universidade do Estado de Mato Grosso do Sul, Dourados/MS.

2.4 CONDIÇÕES DE CULTIVO

Para a obtenção da biomassa celular, as leveduras foram cultivadas em meio líquido YPD a 2%, contendo 1,0% (p.v-1) de extrato de levedura, 1,0% (p.v-1) de peptona e 2,0% (p.v-1) de glicose. Os frascos foram autoclavados a 120 °C por 20 minutos, aos quais foram adicionados 0,10 gramas de levedura liofilizada e incubados a 30 °C por 10 horas a 250 rpm. Após o crescimento, as células foram coletadas e centrifugadas (800 x g por 20 min), ressuspensas e lavadas três vezes consecutivas em solução salina estéril (0,85%), e a biomassa obtida foi utilizada nos testes de fermentação.

2.5 AÇÃO DO SINERGISMO DOS FATORES DE ESTRESSE

Para determinar o sinergismo do estresse etanólico e térmico, a biomassa de 10 mg.mL⁻¹ foi inoculada em frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo 50 mL de caldo de cana estéril na concentração de 22 °Brix e pH 5,0, ajustado com HCl 1N. As concentrações de etanol utilizadas foram 0, 5, 12 e 16% (v.v-1) de álcool etílico (PA 99%). Os frascos foram incubados nas temperaturas de 30 °C e 40 °C a 250 rpm por 8 horas de cultivo.

2.6 QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS

Para quantificar as proteínas totais, alíquotas de 1000 µL das amostras foram coletadas, centrifugadas a (800 spins x 10 minutos) e lavadas três vezes consecutivas com solução salina estéril (0,85%). O precipitado foi ressuspenso em 500 µL de tampão Tris-HCl (pH 7,0) e submetido à lise celular por ciclos alternados de vórtice e ultrassom, monitorados com microscópio. A quantificação de proteínas foi realizada pelo método de Bradford (1976), empregando 100 µL de amostras lisadas, 1000

μL de água destilada e 2500 μL de reagente de Bradford. A concentração foi determinada por medidas em espectrofotômetro a 595 nm, com base em uma curva padrão (0,10 a 0,70 $\mu\text{ g.mL}^{-1}$) gerada com Albumina de Soro Bovino (BSA).

2.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise dos dados foi realizada por meio do software Excel 2019 e consistiu na avaliação da média e do desvio padrão. O software RStudio 4.4.2 foi utilizado para realizar a Análise de Componentes Principais (PCA).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Durante o processo de fermentação, as leveduras encontram várias condições de estresse, particularmente estresse térmico e etanólico, que induzem mudanças fisiológicas e bioquímicas significativas, afetando negativamente a produção de etanol. As proteínas de choque térmico (HSPs) desempenham um papel crítico na proteção e manutenção da integridade de *S. cerevisiae* em condições adversas. Essas proteínas ajudam a manter a funcionalidade celular dissolvendo agregados de proteínas, auxiliando no dobramento e estabilização de proteínas e participando da síntese de carboidratos de reserva. Como acompanhantes, eles também desempenham um papel vital na proteção das proteínas da membrana plasmática dos efeitos do estresse térmico. Sob estresse do etanol, as HSPs respondem a danos na membrana celular, participam dos mecanismos de biogênese do ribossomo, atuam como co-chaperonas e auxiliam na regulação osmótica e na redução da toxicidade celular. Coletivamente, essas proteínas garantem a vitalidade e funcionalidade de *S. cerevisiae* em ambientes hostis, apoiando sua sobrevivência e adaptabilidade, conforme detalhado na Tabela 1.

Dentre as proteínas de choque térmico (HSPs) em *S. cerevisiae*, destaca-se a HSP40, trabalhando em conjunto com a HSP70 para facilitar o dobramento adequado de proteínas. Essa interação é essencial para a reativação e reestruturação de proteínas desnaturadas ou agregadas, processo regulado pela ativação da ATPase associada à HSP40, que desempenha um papel fundamental na reconformação de polipeptídeos (Geng et al., 2024). Da mesma forma, o HSP60 previne especificamente o desdobramento e a agregação de proteínas após exposição a condições de estresse térmico, garantindo a integridade estrutural e funcional dessas moléculas (Bandyopadhyay; Bose; Chattopadhyay, 2019).

Tabela 1. Proteínas de choque térmico (HSPs) ativadas na presença de estresse térmico e etanol e suas respectivas funções em *S. cerevisiae*.

Proteína de estresse térmico	Proteína de estresse do etanol	Referência
HSP40, HSP601, atua como chaperonas moleculares, auxiliando no correto dobramento de proteínas e impedindo a integridade celular.	GPD12, glicerol-3-fosfato desidrogenase, envolvida na regulação osmótica HSP31, chaperona molecular envolvida na desintoxicação.	¹ Hu et al. (2022) ² Hubmann; Guillouet e Nevoigt. (2011)
HSP701 Dobramento de proteínas e prevenção de agregação.	Ssb1, Ssb22, Chaperonas envolvidas na biogênese do ribossomo.	¹ Usman et al. (2017) ² Rodrigues et al. (2023)
HSP90 (HSP82) ¹ , Dobramento e estabilização de proteínas sob estresse.	HSP1102, Co-acompanhante da família envolvida na resposta ao estresse.	¹ Rios; Hunsberger e Johnson (2024) ² Masser et al. (2019)
Hsp1041, Dissolução de agregados de proteínas desnaturadas.	HSP122, Proteção da membrana plasmática contra danos.	¹ Knier et al. (2022) ² Horianopoulos e Kronstad (2021)
TPS1 e TPS21, responsáveis pela síntese da trealose, um dissacarídeo que atua como reserva e protetor.	AHP1, é uma peroxirredoxina envolvida na proteção contra danos oxidativos, protegendo a célula contra subprodutos tóxicos gerados no processo de fermentação.	¹ Hu et al. (2022) ² Picazo e Molin (2021)

Fonte: Elaborado pelos autores.

Outra chaperona essencial é a HSP90, cuja presença aumenta significativamente em situações de estresse celular, passando de 1-2% para até 4-6% do total de proteínas citoplasmáticas. Essa proteína é responsável pelo correto dobramento, degradação de proteínas danificadas e prevenção de agregados, além de atuar no transporte de proteínas para organelas específicas. Essas funções tornam o HSP90 um jogador-chave na adaptação celular a ambientes hostis (MCnutt et al., 2024).

A HSP104, por sua vez, é uma ATPase hexamérica localizada no citoplasma que forma uma estrutura de anel assimétrica, permitindo a solubilização de proteínas agregadas. Trabalhando em sinergia com outras chaperonas, como HSP40, HSP70 e HSP90, a HSP104 reativa agregados proteicos essenciais para a recuperação celular após estresses térmicos e etanólicos. A ausência dessas proteínas resulta em uma queda significativa na viabilidade celular em condições extremas, destacando sua importância na sobrevivência das leveduras (Segal-Kischinevsky et al., 2022).

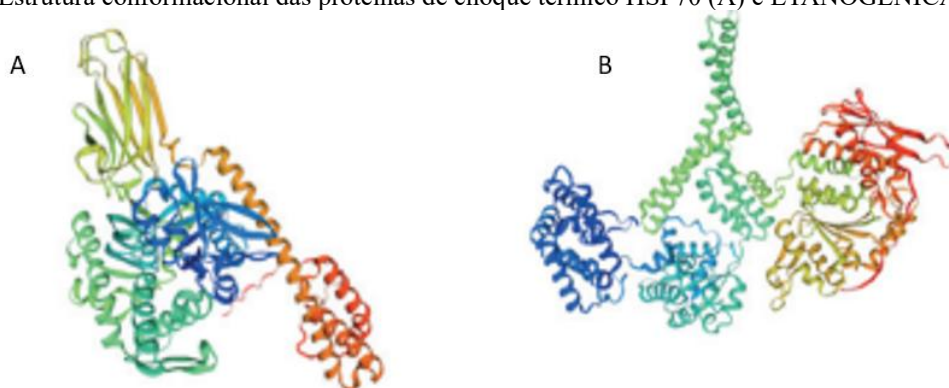
Além dessas proteínas, outras desempenham papéis complementares. A HSP12, por exemplo, está associada à membrana plasmática e sua expressão é amplificada em resposta ao etanol, contribuindo para a integridade da membrana e ajudando a manter a homeostase celular. As chaperonas Ssb1 e Ssb2 desempenham papéis críticos na biogênese do ribossomo, garantindo a eficiência da síntese proteica em situações de estresse (Jay-Garcia et al., 2023; Rodrigues et al., 2023). A co-chaperona Sse1 aumenta a atividade da HSP70, auxiliando no dobramento de proteínas e mantendo a funcionalidade celular em ambientes adversos (Bhattacharya; Picard, 2021).

Por fim, a proteína GPD1 desempenha um papel crucial na regulação osmótica e tolerância ao etanol, sendo responsável por promover a síntese de glicerol. Esse composto atua como osmoprotetor,

ajudando a minimizar os danos causados pelo etanol à membrana plasmática e ao metabolismo celular, garantindo maior resistência celular em condições adversas. Além disso, a proteína HSP31, uma chaperona multifuncional, contribui significativamente para a proteção celular ao neutralizar os efeitos de subprodutos tóxicos gerados durante o processo de fermentação, como o próprio etanol (Nava-Ramírez; Gutiérrez-Terrazas; Hansberg, 2023). Sua ação é essencial para a desintoxicação celular e para a manutenção da viabilidade celular, reforçando a capacidade adaptativa das células em ambientes estressantes (Shen et al., 2022).

A interação entre as proteínas HSP70 e HSP104 é essencial para a proteção e manutenção celular em condições de estresse térmico e etanólico (Figura 1). A HSP70, com peso molecular de 70 kDa e 642 aminoácidos, atua no desdobramento e estabilização de proteínas, enquanto a HSP104, com peso molecular de 104 kDa e 908 aminoácidos, solubiliza agregados proteicos, reativando-os a estados funcionais. Juntas, essas chaperonas trabalham sinergicamente para prevenir a desnaturação e agregação de proteínas, promovendo a fluidez da membrana plasmática, garantindo a adaptação celular e a resiliência a estresses térmicos, etanólicos e outros. Eles desempenham um papel fundamental nos processos de fermentação, mantendo a integridade celular e apoiando a sobrevivência da levedura, tornando-os alvos-chave para o desenvolvimento de cepas com desempenho aprimorado em aplicações biotecnológicas.

Figura 1. Estrutura conformacional das proteínas de choque térmico HSP70 (A) e ETANOGÊNICA HSP104 (B).



Fonte: Adaptado do banco de dados online do NIH da National Library of Medicine (2024). Modelo criado usando SWISS-MODELL.

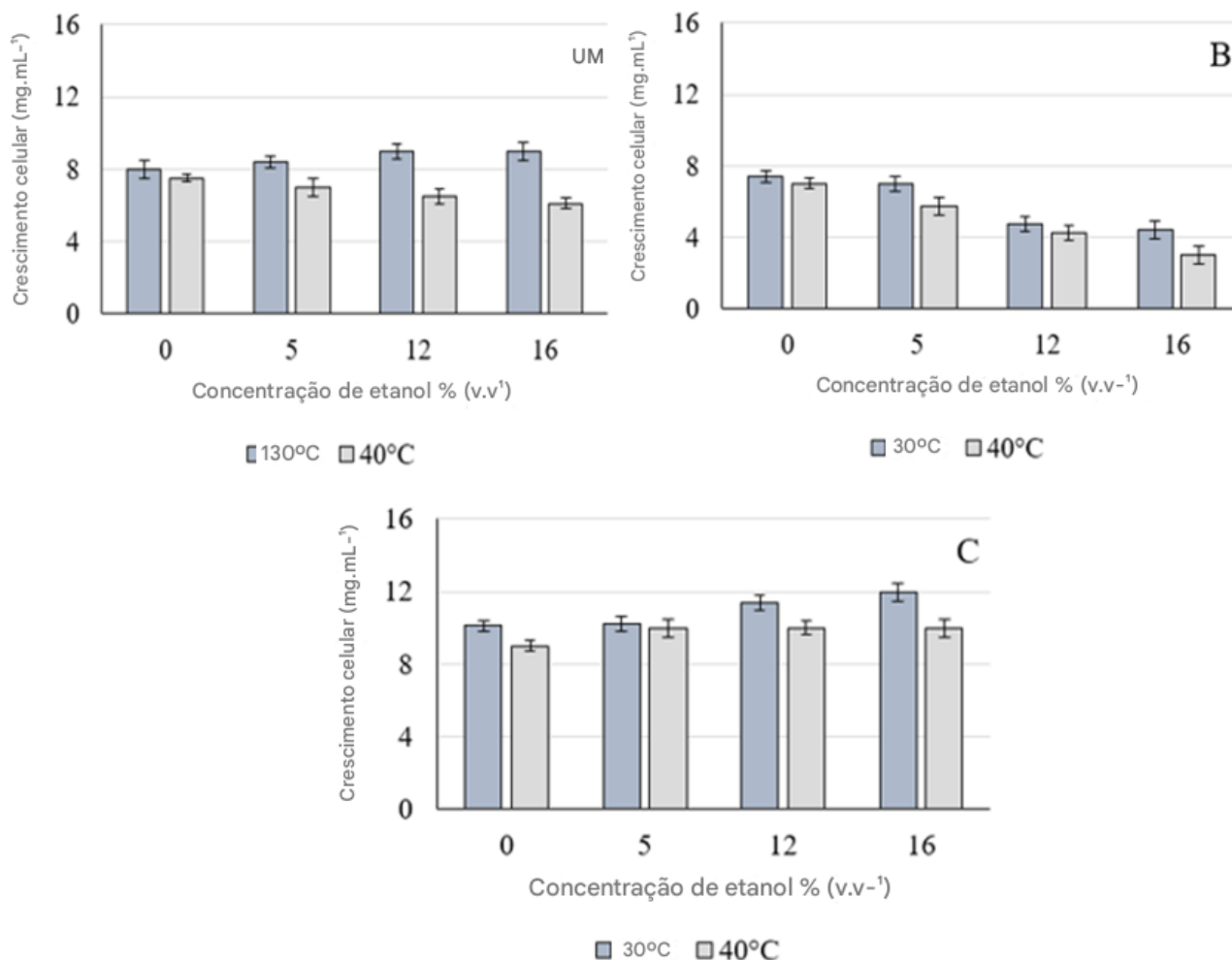
A resposta de *S. cerevisiae* ao estresse do etanol envolve uma complexa rede de proteínas, que ajudam a proteger e reparar proteínas danificadas, bem como proteínas envolvidas na manutenção da integridade da membrana e do equilíbrio osmótico. Essa resposta permite que a levedura sobreviva e continue a crescer mesmo em altas concentrações de etanol, como ocorre durante a fermentação alcoólica (Jhariya et al., 2021; Liszkowska; Berlowska, 2021; Da Silva Fernandes et al., 2022).

Ao avaliar o crescimento celular sob estresse térmico e etanólico, os resultados indicam que as leveduras analisadas experimentaram sinergismo de estresse, exibindo comportamentos de crescimento distintos, provavelmente devido às suas capacidades variadas de suportar as condições de estresse impostas. A cepa Fleischmann® (Figura 2A) exibiu a maior sensibilidade entre as leveduras testadas, mostrando uma redução significativa no crescimento celular em ambas as temperaturas, particularmente sob altas concentrações de etanol. A 30 ° C, o aumento progressivo na concentração de etanol impactou negativamente o desempenho da célula, enquanto a 40 ° C, os efeitos combinados do estresse térmico e etanólico limitaram ainda mais o crescimento. Essa resposta sugere que Fleischmann® tem menor tolerância às condições aplicadas.

Em contraste, a cepa Santa Adélia (Figura 2B) apresentou uma resposta intermediária ao estresse. A 30°C, manteve um crescimento gradual apesar do aumento das concentrações de etanol; no entanto, a 40 ° C, a temperatura mais alta intensificou a sensibilidade, levando a um declínio mais pronunciado no crescimento celular a 12% e 16% de etanol. Embora tenha demonstrado alguma tolerância ao estresse, Santa Adélia exibiu crescimento eficiente e resiliência relativamente maior. A linhagem Pedra-2 (Figura 2C) emergiu como a mais tolerante, apresentando crescimento superior nas condições de estresse testadas. A 30 ° C, o crescimento celular permaneceu estável mesmo em concentrações mais altas de etanol. A 40°C, enquanto uma redução gradual no crescimento foi observada, a Pedra-2 ainda manteve os maiores níveis de biomassa entre as três linhagens. Isso sugere que a Pedra-2 exibe uma interação mais efetiva de proteínas de choque térmico relacionadas ao estresse térmico e etanólico, tornando-a uma cepa ideal para processos de fermentação que operam sob condições severas.

De acordo com Tobias, Mascarenhas e Batistote (2024), ao avaliar o sinergismo do estresse térmico e etanólico em cepas industriais de *S. cerevisiae*, incluindo a Pedra-2, destaca-se a importância da seleção de leveduras com alta capacidade fermentativa para melhorar a eficiência da fermentação industrial, garantindo a sustentabilidade da produção de etanol. Iwuozor et al. (2014) reforçam que o uso de cepas tolerantes a condições extremas no processo de fermentação pode reduzir os custos operacionais, minimizando a necessidade de controle rigoroso para manter o parâmetro do processo.

Figura 2. Avaliação do crescimento celular das leveduras Fleischmann® (A), Santa Adélia (B) e Pedra-2 (C), cultivadas em caldo de cana-de-açúcar na concentração de 22 °Brix, sob a ação de estresses térmicos e etanólicos durante 8 horas de fermentação.

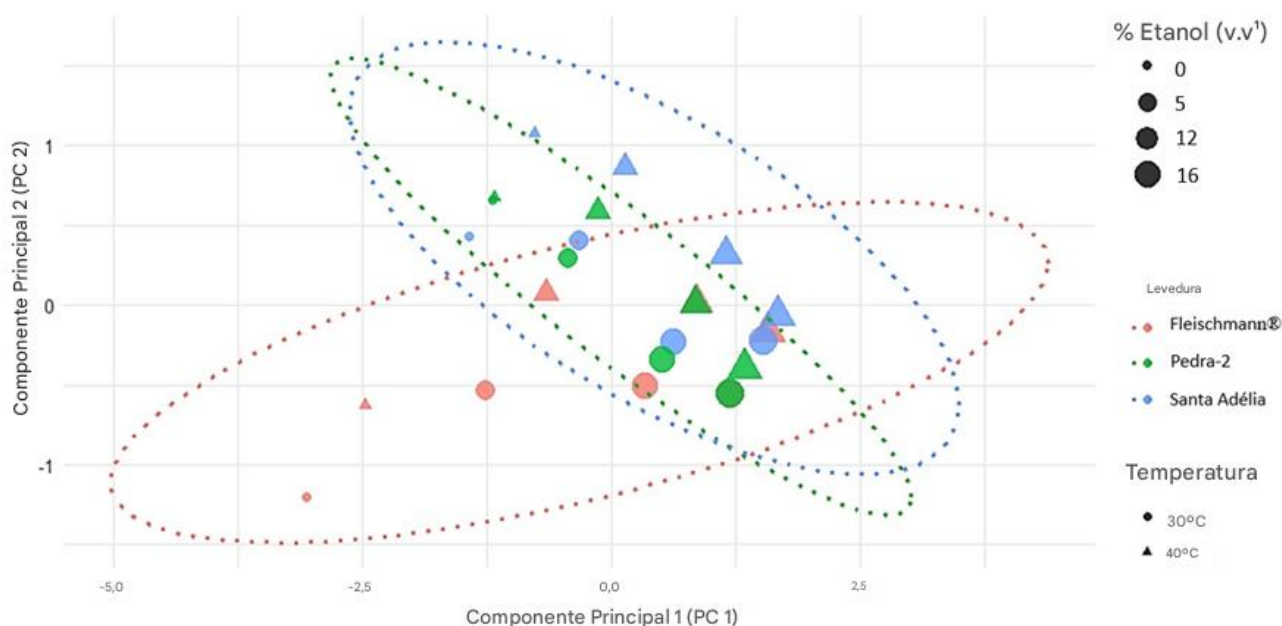


Fonte: Dados da pesquisa

A Análise de Componentes Principais (PCA) indicou a formação de clusters que representam a distribuição das leveduras de acordo com seus perfis de produção de proteínas, associados à tolerância ao estresse térmico e etanólico (Figura 3). A linhagem Fleischmann® apresentou o menor perfil de produção de proteínas nas condições avaliadas, caracterizada por maior dispersão no gráfico, o que destaca sua sensibilidade ao estresse associado. No entanto, a linhagem Santa Adélia apresentou uma produção intermediária de proteínas. A linhagem Pedra-2 destacou-se por formar um cluster bem definido, refletindo um alto perfil de produção de proteínas em relação às demais linhagens, o que a torna mais adequada para aplicações industriais extremas, onde o estresse térmico e etanólico estão presentes.

Estudos focados na ação de proteínas de choque térmico (HSPs) envolvidas no estresse térmico e etanol são fundamentais para a obtenção de conhecimento e compreensão dessa complexa rede de proteínas que mantêm a integridade celular e garantem a produção de etanol. A capacidade de manter a adaptação e sobrevivência da levedura sob condições severas de estresse envolve inúmeras funções das proteínas de choque térmico. Durante o processo de fermentação, na presença de altas temperaturas e altas concentrações de etanol, existe uma possibilidade significativa de criação de um ambiente hostil, o que aciona inúmeras HSPs para combater esses estresses, desempenhando um papel crucial (Kumar et al., 2024). Esses mecanismos garantem que as leveduras permaneçam ativas e produtivas durante todo o processo de fermentação.

Figura 3. Análise de Componentes Principais (PCA) do perfil de produção de proteína total em *linhagens de S. cerevisiae*, cultivadas em caldo de cana-de-açúcar na concentração de 22 °Brix, sob a ação de estresse térmico e etanólico em 8 horas de fermentação a uma temperatura de 30 °C (A) e 40 °C (B).



Fonte: Dados da pesquisa.

Além disso, as HSPs aumentam a resistência das células ao calor e ao estresse por etanol, estabilizando proteínas essenciais e reparando aquelas que foram danificadas (Sahana et al., 2024). Essa capacidade permite que a levedura mantenha a capacidade de fermentação mesmo em altas concentrações de etanol, reduzindo a mortalidade celular, evitando perdas metabólicas, promovendo a integridade celular e preservando a eficiência da produção de etanol (Chen et al., 2024; Elhalis, 2024). Esses estudos também são essenciais para a compreensão dos mecanismos de resposta das proteínas de choque ao calor e ao etanol envolvidas no perfil de produção de proteínas, que podem apresentar

maior tolerância e robustez fermentativa contra o estresse associado, bem como melhorar a produção de etanol em ambientes industriais desafiadores.

4 CONCLUSÃO

Saccharomyces cerevisiae demonstra uma notável capacidade de adaptação a condições adversas durante o processo de fermentação, principalmente devido à ação de proteínas de choque térmico (HSPs) que desempenham papéis cruciais na proteção e reparo da funcionalidade celular contra estresses térmicos e etanólicos.

A resposta da levedura às condições de estresse desencadeia uma complexa rede de proteínas, que desempenham funções essenciais como dobramento, oxidação, redução da toxicidade, síntese de novas macromoléculas e manutenção de membranas e organelas. No entanto, as proteínas que atuam com mais destaque são HSP70 para altas temperaturas e HSP104 para altas concentrações de etanol. A interação entre essas proteínas permite que a levedura mantenha a homeostase, a integridade e a sobrevivência celular.

Na avaliação do crescimento celular sob a ação do estresse térmico e etanólico, as leveduras apresentaram diferentes padrões de crescimento, refletindo variações na capacidade de tolerância e respostas às condições impostas. A linhagem Fleischmann® apresentou menor tolerância às condições de estresse impostas, enquanto a levedura Santa Adélia apresentou tolerância moderada, e a linhagem Pedra-2 apresentou maior tolerância em condições severas, com potencial promissor na produção industrial de bioetanol.

A análise de componentes principais (PCA) revelou um perfil diferenciado para a produção de proteínas nas leveduras analisadas. A linhagem Fleischmann® apresentou menor tolerância à ação do estresse térmico e etanólico, com baixa produção de proteínas. No entanto, a levedura Pedra-2 demonstrou maior tolerância às condições severas impostas, apresentando melhor produção de proteínas e destacando-se como uma linhagem promissora para ser utilizada em processos industriais que envolvem condições extremas de estresse.

AGRADECIMENTOS

a Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul (UEMS); Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul (FUNDECT); Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq); Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior -Brasil (CAPES) – Código de Finanças001.

REFERÊNCIAS

- AJMAL, Mohammad Rehan. Protein misfolding and aggregation in proteinopathies: causes, mechanism and cellular response. *Diseases*, v. 11, n. 1, p. 30, 2023.
- AUESUKAREE, Choowong. Molecular mechanisms of the yeast adaptive response and tolerance to stresses encountered during ethanol fermentation. *Journal of bioscience and bioengineering*, v. 124, n. 2, p. 133-142, 2017.
- AZHAR, Siti Hajar Mohd et al. Yeasts in sustainable bioethanol production: A review. *Biochemistry and biophysics reports*, v. 10, p. 52-61, 2017.
- BANDYOPADHYAY, Arnab; BOSE, Indrani; CHATTOPADHYAY, Krishnananda. Osmolytes ameliorate the effects of stress in the absence of the heat shock protein Hsp104 in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS One*, v. 14, n. 9, p. e0222723, 2019.
- BERTRAND, Brandt et al. Biophysical characterization of the insertion of two potent antimicrobial peptides-Pin2 and its variant Pin2 [GVG] in biological model membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, v. 1862, p. 183105, 2020.
- BHATTACHARYA, Kaushik; PICARD, Didier. The Hsp70–Hsp90 go-between Hop/Stip1/Sti1 is a proteostatic switch and may be a drug target in cancer and neurodegeneration. *Cellular and Molecular Life Sciences*, p. 1-17, 2021.
- BRADFORD, Marion M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.
- CHEN, Anqi et al. Osmotic Tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*: Implications for Food and Bioethanol Industries. *Food Bioscience*, p. 104451, 2024.
- CHETTY, Bronwyn Jean et al. Improvement of cell-tethered cellulase activity in recombinant strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 106, n. 18, p. 6347-6361, 2022.
- COERTJENS, Nicole Carneiro et al. Evaluation of stress factors in the metabolism of Pedra-2 yeast. *Scientific Electronic Archives*, v. 16, n. 3, 2023.
- DA SILVA FERNANDES, Flávia et al. Current ethanol production requirements for the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *International journal of microbiology*, v. 2022, n. 1, p. 7878830, 2022.
- determining factors in the permeability of membranes to small solutes. *Nature Communications*, v. 13, p. 1605, 2022.
- ELHALIS, Hosam. Expanding the Horizons of *Saccharomyces cerevisiae*: Nutrition, Oenology, and Bioethanol Production. *Sustainability*, v. 16, n. 24, p. 11151, 2024.
- FRALLICCIARDI, Jacopo et al. Membrane thickness, lipid phase and sterol type are determining factors in the permeability of membranes to small solutes. *Nature communications*, v. 13, n. 1, p. 1605, 2022.

GENG, Yuanwei et al. Genome-Wide Identification and Interaction Analysis of Turbot Heat Shock Protein 40 and 70 Families Suggest the Mechanism of Chaperone Proteins Involved in Immune Response after Bacterial Infection. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 25, n. 14, p. 7963, 2024.

HORIANOPOULOS, Linda C.; KRONSTAD, James W. Chaperone networks in fungal pathogens of humans. *Journal of Fungi*, v. 7, n. 3, p. 209, 2021.

HU, Chen et al. Heat shock proteins: Biological functions, pathological roles, and therapeutic opportunities. *MedComm*, v. 3, n. 3, p. e161, 2022

HUBMANN, Georg; GUILLOUET, Stephane; NEVOIGT, Elke. Gpd1 and Gpd2 fine-tuning for sustainable reduction of glycerol formation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and environmental microbiology*, v. 77, n. 17, p. 5857-5867, 2011.

IWUOZOR, Kingsley O. et al. Advancements in high gravity fermentation strategies for optimizing ethanol production from sugarcane-based substrates. *Sugar Tech*, v. 26, n. 4, p. 1016-1032, 2024.

JAY-GARCIA, Lina M. et al. Yeast Chaperone Hsp70-Ssb Modulates a Variety of Protein-Based Heritable Elements. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 24, n. 10, p. 8660, 2023.

JHARIYA, Upasana et al. Understanding ethanol tolerance mechanism in *Saccharomyces cerevisiae* to enhance the bioethanol production: Current and future prospects. *BioEnergy Research*, v. 14, p. 670-688, 2021.

JIN, Xiaofan et al. Wheat gluten peptides enhance ethanol stress tolerance by regulating the membrane lipid composition in yeast. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 70, n. 16, p. 5057-5065, 2022.

KNIER, Adam S. et al. The yeast molecular chaperone, Hsp104, influences transthyretin aggregate formation. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, v. 15, p. 1050472, 2022.

KUMAR, Prabhat et al. Understanding heat-shock proteins' abundance and pivotal function under multiple abiotic stresses. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, p. 1-22, 2024.

LAIRÓN-PERIS, María et al. Lipid composition analysis reveals mechanisms of ethanol tolerance in the model yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 87, p. e00440-21, 2021.

LISZKOWSKA, Wiktoria; BERLOWSKA, Joanna. Yeast fermentation at low temperatures: Adaptation to changing environmental conditions and formation of volatile compounds. *Molecules*, v. 26, n. 4, p. 1035, 2021.

MASSER, Anna E. et al. Cytoplasmic protein misfolding titrates Hsp70 to activate nuclear Hsf1. *Elife*, v. 8, p. e47791, 2019.

MCNUTT, Seth W. et al. Phosphorylation-Driven Epichaperome Assembly: A Critical Regulator of Cellular Adaptability and Proliferation. *Research Square*, 2024.

MUELLER, Larissa Pires et al. The effects of thermal and ethanolic stress in industrial strains of *Saccharomyces cerevisiae*. Research, Society and Development, v. 9, p. e6819109091-e6819109091, 2020.

NAVA-RAMÍREZ, Teresa; GUTIÉRREZ-TERRAZAS, Sammy; HANSBERG, Wilhelm. The Molecular chaperone mechanism of the C-terminal domain of large-size subunit catalases. Antioxidants, v. 12, n. 4, p. 839, 2023.

PICAZO, Cecilia; MOLIN, Mikael. Impact of hydrogen peroxide on protein synthesis in yeast. Antioxidants, v. 10, n. 6, p. 952, 2021.

RIOS, Erick I.; HUNSBERGER, Isabel L.; JOHNSON, Jill L. Insights into Hsp90 mechanism and in vivo functions learned from studies in the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. Frontiers in Molecular Biosciences, v. 11, p. 1325590, 2024.

RODRIGUES, Joana I. et al. Yeast chaperones and ubiquitin ligases contribute to proteostasis during arsenite stress by preventing or clearing protein aggregates. FEBS letters, v. 597, n. 13, p. 1733-1747, 2023.

ROSENZWEIG, Rina et al. The Hsp70 chaperone network. Nature reviews molecular cell biology, v. 20, n. 11, p. 665-680, 2019.

SAHANA, Gandasi Ravikumar et al. A review on ethanol tolerance mechanisms in yeast: Current knowledge in biotechnological applications and future directions. Process Biochemistry, v. 138, p. 1-13, 2024.

SEGAL-KISCHINEVZKY, Claudia et al. Yeasts inhabiting extreme environments and their biotechnological applications. Microorganisms, v. 10, n. 4, p. 794, 2022.

SHEN, Dongxu et al. A review of yeast: High cell-density culture, molecular mechanisms of stress response and tolerance during fermentation. FEMS Yeast Research, v. 22, n. 1, p. foac050, 2022.

SWISS-MODEL Repository. Disponível em: <https://swissmodel.expasy.org/>. Acesso em 26 de janeiro de 2025.

TOBIAS, V. C. M.; MASCARENHAS, M. do S.; BATISTOTE, M. Acción del sinergismo del Estrés térmico y etanólico en cepas industriales de *Saccharomyces cerevisiae*. Contribuciones A Las Ciencias Sociales, [S. l.], v. 17, n. 12, p. e13163, 2024.

USMAN, Magaji G. et al. Molecular analysis of Hsp70 mechanisms in plants and their function in response to stress. Biotechnology and Genetic Engineering Reviews, v. 33, n. 1, p. 26-39, 2017.

WALKER, Graeme M.; BASSO, Thiago O. Mitigating stress in industrial yeasts. Fungal Biology, v. 124, p. 387-397, 2020.