



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO TECNOLÓGICO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA
QUÍMICA**

MYLENA FERNANDES

**AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO FERMENTATIVO DE
LEVEDURAS GENETICAMENTE MODIFICADAS NA
METABOLIZAÇÃO DE SACAROSE**

**Florianópolis
2013**

Mylena Fernandes

**AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO FERMENTATIVO DE
LEVEDURAS GENETICAMENTE MODIFICADAS NA
METABOLIZAÇÃO DE SACAROSE**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Química.

Orientador: Prof. Dr. Agenor Furigo Junior

Coorientadora: Dr^a. Julieta Barbosa Monteiro

Coorientador: Prof. Dr. Boris Ugarte Stambuk

Florianópolis
2013

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da
UFSC.

Fernandes, Mylena

Avaliação do desempenho fermentativo de leveduras geneticamente modificadas na metabolização de sacarose / Mylena Fernandes; orientador, Agenor Furigo Junior; coorientadora, Julieta Barbosa Monteiro; coorientador, Boris Ugarte Stambuk. - Florianópolis, SC, 2013.

93 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química.

Inclui referências

1. Engenharia Química. 2. Fermentação alcoólica. 3. *Saccharomyces cerevisiae*. 4. Modificação genética. 5. Captação de sacarose. I. Furigo Junior, Agenor. II. Barbosa Monteiro, Julieta. III. Ugarte Stambuk, Boris. IV. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. V. Título.

Mylena Fernandes

**AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO FERMENTATIVO DE
LEVEDURAS GENETICAMENTE MODIFICADAS NA
METABOLIZAÇÃO DE SACAROSE**

Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de “Mestre em Engenharia Química”, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-graduação em Engenharia Química.

Florianópolis, 20 de junho de 2013.

Prof. Dr. Ricardo Antônio Francisco Machado
Coordenador do Curso

Prof. Dr. Agenor Furigo Junior
Orientador

Dr.^a. Julieta Barbosa Monteiro
Coorientadora

Prof. Dr. Boris Ugarte Stambuk
Coorientador

Banca Examinadora:

Prof.^a Dr.^a Maria de Lourdes Borba Magalhães
Universidade do Estado de Santa Catarina

Prof. Dr. Willibaldo Schmidell Netto
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.^a Dr.^a Débora de Oliveira
Universidade Federal de Santa Catarina

Dedico este trabalho aos que eu amo.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, à minha mãe Mércia Conceição Vargas por contribuir ora de forma direta, ora de forma indireta, na minha formação social e acadêmica.

Ao professor Agenor Furigo Júnior pela orientação, compreensão, incentivo e sugestões para a realização deste trabalho.

À Dr^a. Julieta Barbosa Monteiro pela coorientação, discussões sobre o tema e amizade ao longo destes dois anos.

Ao professor Boris Ugarte Stambuk pela coorientação e disponibilização das dependências de seu laboratório LBMBL/UFSC para a realização deste trabalho.

Ao meu noivo Everton Skoronski pelo carinho, compreensão, amizade e conforto e pelos incentivos para realização deste trabalho, para a vida acadêmica e em todos os momentos.

Aos colegas do laboratório LBMBL/UFSC pela colaboração e pelas discussões sobre o tema.

À colega Gabriela Müller pelo desenvolvimento das leveduras utilizadas neste trabalho.

Ao Departamento de Engenharia Mecânica, LEPTEN/UFSC, pela oportunidade de participação do projeto SUCET envolvendo o tema abordado neste trabalho.

À Cerradinho Bioenergia S/A e a CAPES pelo financiamento e bolsas concedidas.

Aos amigos Diego Bittencourt Machado e Heloisa Aguiar Cardoso pela amizade, incentivo e momentos de descontração.

Aos professores Maria de Lourdes Borba Magalhães, Willibaldo Schmidell Netto e Débora de Oliveira por aceitarem participar da avaliação deste trabalho.

Por fim, a todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da UFSC pela contribuição na minha formação.

“Ora, Micky dizia que a luta só acabava ao soar do gongo. Ainda não ouvimos o gongo, certo?”

(Rocky Balboa)

RESUMO

O bioetanol brasileiro é obtido a partir da fermentação da sacarose, um dissacarídeo presente no caldo de cana-de-açúcar, utilizando a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, principal microorganismo utilizado pelas usinas produtoras de etanol no Brasil. Entre estas leveduras, a linhagem mais amplamente utilizada é a diplóide CAT-1. Esta linhagem de levedura foi isolada do processo industrial de produção de etanol a partir de sacarose da cana-de-açúcar, portanto, adaptada às condições de estresse fermentativo tais como altas concentrações de açúcar e de etanol, temperatura, pH, pressão hidrostática e osmótica, etc. Com estas leveduras, a sacarose é primeiro hidrolisada pela invertase extracelular e/ou periplasmática codificada pelo gene *SUC2*, gerando glicose e frutose, que são transportados do meio fermentativo para o interior da célula via transporte facilitado por transportadores de hexoses *HXT*. O processo de hidrólise da sacarose é mais rápido que o transporte das hexoses, o que leva a um acúmulo destes açúcares no meio, causando efeitos negativos à levedura e ao processo industrial. Dentre estes efeitos, destacam-se as perdas de açúcar devido à utilização dos monossacarídeos por bactérias e leveduras selvagens, já presentes no mosto de alimentação da dorna, e o estresse osmótico. Com a propagação de bactérias, é necessário o uso de antibióticos e ajuste do pH devido à produção de ácidos orgânicos no meio. No sentido de evitar a hidrólise extracelular da sacarose e mudar o modo da sua captação pela célula, onde a sacarose passaria a ser transportada ativamente, para o interior da célula, pela *permease* de alta afinidade *AGTI*, modificações genéticas no gene *SUC2* da levedura industrial CAT-1 foram realizadas visando sobre-expressar a invertase intracelular. A levedura industrial geneticamente modificada passou a ser capaz de captar a sacarose (via co-transporte sacarose- H^+ mediado pela *permease* *AGTI*) diretamente para o interior da célula, onde é hidrolisada e então fermentada. Duas linhagens geneticamente modificadas com características fenotípicas distintas foram testadas e analisadas neste trabalho. Nas condições testadas, os resultados apresentados mostram que é possível fermentar a sacarose eficientemente via sua captação para o interior da célula, além da grande vantagem da ausência de glicose e frutose no meio fermentativo. Além disso, espera-se outros ganhos como menor estresse osmótico e menor grau de contaminação, com a futura aplicação industrial destas leveduras. Estes ganhos trazem como consequência uma menor utilização de antibiótico e ácido sulfúrico, menor floculação e maior manutenção da viabilidade celular.

Palavras-chave: Fermentação alcoólica; *Saccharomyces cerevisiae*; modificação genética; captação de sacarose.

ABSTRACT

Brazilian bioethanol is obtained from the fermentation of sucrose, a disaccharide present in sugarcane juice, using *Saccharomyces cerevisiae*. This yeast is the microorganism most commonly used industrially to produce ethanol in Brazil. The most widely used strain is diploid CAT-1, which was isolated from the industrial ethanol production process from sugarcane sucrose, and it is therefore adapted to the harsh fermentation conditions, such as high concentrations of sugar and ethanol, temperature, pH, and osmotic and hydrostatic pressures. With the use of this yeast, the sucrose is first hydrolyzed by extracellular and/or periplasmic invertase encoded by the *SUC2* gene, producing glucose and fructose, which are transported from the fermentation medium into the cell, a process facilitated by hexose transporters (*HXT*). The hydrolysis of sucrose is faster than the transport of hexoses, leading to an accumulation of these sugars in the medium, which has negative effects on the yeast cells and the industrial process. These effects include a loss of sugar due to the use of monosaccharides by bacteria and wild yeast strains, present in the wort fed to the tank, and osmotic stress. With the propagation of bacteria it is necessary to use antibiotics and adjust the pH due to the production of organic acids in the medium. In order to avoid the extracellular hydrolysis of sucrose and change the mode of its uptake by the yeast cell, where the sucrose would be transported actively by the high-affinity *permease* *AGT1*, the modification of the *SUC2* gene from of industrial yeast was performed to over-express intracellular invertase. The genetically modified industrial yeast was analyzed in this study and found to be able to carry out sucrose uptake (via sucrose-H⁺ co-transport mediated by *AGT1* permease) directly to the cell interior, where it is hydrolyzed and then fermented. Two genetically modified strains with phenotypically distinct characteristics were tested and analyzed. Under the conditions tested, the results presented by the genetically modified yeasts showed that it is possible to efficiently ferment sucrose via its uptake into the interior of the cell, in addition to obtaining the advantage of the absence of glucose and fructose in the medium. Furthermore, it is expected that with the future industrial application of these yeast strains, other benefits will be verified such as a lower osmotic stress and degree of contamination. These gains lead to a lower demand for antibiotics and sulfuric acid, less flocculation and greater maintenance of cell viability.

Keywords: Ethanol fermentation; *Saccharomyces cerevisiae*; genetic modification; sucrose uptake.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Participação das fontes renováveis na matriz energética brasileira e mundial.	32
Figura 2 – Ilustração simplificada das principais etapas de produção industrial de etanol.	34
Figura 3 – Velocidade de transporte do soluto através da difusão facilitada e difusão simples.	38
Figura 4 – Transporte de moléculas através da membrana celular.	39
Figura 5 – Direção do fluxo de moléculas e íons transportados.	40
Figura 6 – Estrutura da sacarose e de seus produtos de hidrólise (glicose e frutose).	41
Figura 7 – Representação dos transportadores responsáveis pela captação de açúcares em <i>S. cerevisiae</i>	43
Figura 8 – Representação da capacidade de captação da glicose e da frutose.	44
Figura 9 – Representação de um fermentador operando em modo batelada alimentada.	55
Figura 10 – Perfil fermentativo das linhagens GMY15 e CAT-1, em ensaios em frascos agitados, a 28 °C.	61
Figura 11 – Fatores de conversão em células, em etanol e em glicerol para as linhagens GMY15 e CAT-1.	62
Figura 12 – Relação entre massa de células e glicerol formados e o etanol produzido para as linhagens GMY15 e CAT-1.	64
Figura 13 – Perfil de alimentação do biorreator ao longo do tempo.	65
Figura 14 – Perfil fermentativo da linhagem CAT-1 em batelada alimentada.	67
Figura 15 – Fatores de conversão em células, em etanol e em glicerol para linhagem CAT-1, valores experimentais.	69
Figura 16 – Fatores de conversão em células, em etanol e em glicerol para linhagem CAT-1, valores ajustados.	71
Figura 17 – Perfil fermentativo das linhagens GMY15, GMY16wo e CAT-1 em batelada alimentada.	74

Figura 18 – Massa de células, de etanol e de glicerol no meio fermentativo para as linhagens GMY15, GMY16wo e CAT-1 em modo batelada alimentada.....	77
Figura 19 – Fatores de conversão em células, em etanol e em glicerol para as linhagens GMY15, GMY16wo e CAT-1, valores experimentais.	79
Figura 20 – Fatores de conversão em células, etanol e glicerol para as linhagens GMY15, GMY16wo e CAT-1, valores ajustados.	81
Figura 21 – Velocidade específica de crescimento celular, durante a alimentação do fermentador.....	82

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Características genóticas e fenóticas das leveduras industriais utilizadas neste trabalho.....	48
Tabela 2 – Características das linhagens CAT-1, GMY15 e GMY16wo.	49
Tabela 3 – Grau de redução dos componentes presentes no biorreator e a massa equivalente a um mol de carbono.	58
Tabela 4 – Velocidade de consumo de substrato e formação dos produtos, etanol e glicerol, no período entre 3 e 9 h.	62
Tabela 5 – Velocidade de formação de produtos e consumo de substrato, no período entre 2 e 6 h.	69
Tabela 6 – Fatores de conversão em células, em etanol e em glicerol, valores ajustados.	71
Tabela 7 – Velocidade de formação de produtos e consumo de substrato no, período entre 2 e 6 h.	78
Tabela 8 – Balanço de elétrons de ART disponíveis para formação de produtos.....	79
Tabela 9 – Fatores de conversão em células, em etanol e em glicerol para GMY15, GMY16wo e CAT-1, valores ajustados.	80

LISTA DE ABREVIATURAS

Abs	Absorbância
ADP	Adenosina difosfato
ART	Açúcares Redutores Totais
ATP	Adenosina trifosfato
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
D.O.	Densidade óptica
<i>p</i> NF α G	<i>p</i> -nitrofenil- α -D-glucopiranosídeo
rpm	rotações por minuto
YP	meio complexo (extrato de levedura e peptona bacteriológica)
YPD	meio complexo contendo glicose (extrato de levedura, peptona bacteriológica e glicose)
YPS	meio complexo contendo sacarose (extrato de levedura, peptona bacteriológica e sacarose)

LISTA DE SÍMBOLOS

K_d	Constante de morte celular, [h^{-1}]
M_i	Massa da espécie i , [g]
S_{in}	Concentração de substrato na alimentação, [g L^{-1}]
V_i	Volume inicial no fermentador, [L]
X_{in}	Concentração de células na alimentação, [g L^{-1}]
\bar{Y}	Fator de conversão, [C-mol C-mol^{-1}]
Y^*	Fator de conversão ajustado, [g g^{-1}]
f_c	fator de cálculo
f_d	fator de diluição
f_{ep}	fração de elétrons dos produtos em excesso
r_d	Velocidade de morte celular, [$\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$]
r_i	Velocidade de formação ou consumo da espécie i , [$\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$]
γ_i	grau de redução da espécie i
μ_X	Velocidade específica de crescimento celular, [h^{-1}]
ρ_e	Densidade do meio de alimentação, [g cm^3]
D	Vazão específica de alimentação [h^{-1}]
F	Vazão de alimentação, [L h^{-1}]
G	Concentração de glicerol, [g L^{-1}]
P	Concentração de etanol, [g L^{-1}]
S	Concentração de substrato, [g L^{-1}]
t	Tempo de fermentação, [h]
V	Volume de meio fermentativo, [L]
X	Concentração de células, [g L^{-1}]
Y	Fator de conversão, [g g^{-1}]
ρ	Densidade do meio fermentativo, [g cm^3]

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	27
1.1 OBJETIVOS	29
1.1.1 Objetivo Geral.....	29
1.1.2 Objetivos Específicos.....	29
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	31
2.1 O BIOETANOL NA MATRIZ ENERGÉTICA BRASILEIRA ..	31
2.2 PROCESSO FERMENTATIVO INDUSTRIAL BRASILEIRO.	32
2.2.1 Levedura utilizada no processo industrial.....	36
2.3. TRANSPORTE DE AÇÚCARES ATRAVÉS DA MEMBRANA CELULAR.....	37
2.3.1 Utilização de açúcares por <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	40
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	47
3.1 MATERIAIS.....	47
3.1.1 Linhagens de leveduras industriais utilizadas	47
3.2 MÉTODOS EXPERIMENTAIS.....	49
3.2.1 Manutenção das linhagens durante o estudo.....	49
3.2.2 Pré-inóculo e crescimento celular.....	50
3.2.2.1 Meio de cultura	50
3.2.2.2 Condições de cultivo.....	50
3.2.3 Fermentação.....	50
3.2.3.1 Meio fermentativo.....	50
3.2.3.2 Fermentação em frasco agitado.....	51
3.2.3.3 Fermentação em batelada alimentada	51
3.3 MÉTODOS ANALÍTICOS	52
3.3.1 Determinação da concentração celular.....	52
3.3.2 Determinação de açúcares, etanol e glicerol	52
3.4 MODELAGEM MATEMÁTICA.....	53
3.4.1 Batelada (frasco agitado).....	53
3.4.2 Batelada alimentada	54
3.5 BALANÇO DE ELÉTRONS MACROMOLECULAR.....	57
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	59
4.1 DESEMPENHO FERMENTATIVO EM BATELADA (FRASCO AGITADO).....	59
4.2 DESEMPENHO FERMENTATIVO EM BIORREATOR TIPO BATELADA ALIMENTADA	64

4.2.1 Condições de operação do biorreator.....	65
4.2.2 Desempenho fermentativo da levedura padrão, CAT-1.....	65
4.2.3 Desempenho fermentativo das leveduras modificadas geneticamente	72
4.2.3.1 Avaliação dos fatores de conversão e rendimento obtidos	76
4.2.3.2 Velocidade específica de crescimento celular (μ_x).....	81
5 CONCLUSÕES.....	83
5.1 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	84
REFERÊNCIAS.....	87
ANEXO A – CROMATOGRAMA (CLAE).....	93

1 INTRODUÇÃO

A preocupação com a redução das emissões dos gases do efeito estufa, gerados pela queima dos combustíveis fósseis, e os impactos ambientais negativos referentes à obtenção dos mesmos tem aumentado nas últimas décadas. Medidas visando à redução do consumo de combustíveis fósseis, como a utilização de energéticos obtidos a partir de fontes renováveis, vêm sendo discutidas em todo o mundo e adotadas por aqueles que têm recursos renováveis disponíveis.

Dentre as fontes renováveis de energia disponíveis no Brasil, destacam-se a cana-de-açúcar, matéria-prima utilizada na produção do bioetanol, e seu resíduo, o bagaço utilizado na geração de energia. Medidas como reduções de custos, por meio de ganhos de eficiência e produtividade e do desenvolvimento, e introdução de novas tecnologias deverão vir do setor produtivo, tanto agrícola quanto industrial. O Brasil apresenta vantagens competitivas devido aos investimentos em pesquisa na área agrícola, há 35 anos, e mais recentemente, atenção vem sendo dada também à área industrial. As condições climáticas e territoriais favoráveis encontradas no país, para o cultivo da cana-de-açúcar também contribuem para a posição favorável em que o Brasil se encontra. A política nacional para a produção da cana-de-açúcar direciona sua expansão de forma sustentável, com base em critérios econômicos, ambientais e sociais, com o objetivo de aumentar a produção de etanol, a cada ano, e atender a demanda do mercado nacional e internacional. A demanda do mercado nacional corresponde, basicamente, à metade do combustível utilizado por veículos leves (etanol hidratado) e ao percentual de etanol anidro adicionado à gasolina, além do utilizado para a produção do biodiesel (rota etflica).

O etanol combustível pode ser obtido a partir de diversas matérias-primas sacaríneas (açucaradas), amiláceas e lignocelulósicas (Pereira *et al.*, 2008). As leveduras utilizadas nestes processos fermentativos devem ser capazes de fermentar açúcares, pois, a matéria-prima utilizada, a cana-de-açúcar, é composta principalmente de sacarose. Como o etanol é um produto derivado diretamente do metabolismo central do carbono (metabólito primário), realizado por leveduras *Saccharomyces cerevisiae*, muitas estratégias para aumentar o rendimento e a produtividade do processo fermentativo baseiam-se em aumentar a proporção de fontes de carbono convertido em etanol e/ou aumentar a velocidade desta conversão (Basso *et al.*, 2011).

A *Saccharomyces cerevisiae* é o principal microorganismo utilizado pelas usinas produtoras de etanol no Brasil, e uma das mais

amplamente utilizadas é a linhagem industrial diplóide CAT-1. Esta levedura foi isolada de processo industrial de produção de etanol a partir de açúcares presentes no caldo de cana-de-açúcar e/ou melaço, portanto, está adaptada às condições de estresse fermentativo como altas concentrações de açúcar, de etanol, variação de temperatura e pH, elevada pressão hidrostática e osmótica, etc. (Basso *et al.*, 2008). Com esta levedura, a sacarose presente no meio fermentativo é primeiramente hidrolisada pela invertase extracelular, gerando glicose e frutose que são transportadas do meio fermentativo para o interior da célula. Esta transferência é realizada via transporte facilitado mediado por transportadores de hexoses (Lagunas, 1993). No entanto, como a hidrólise da sacarose é mais rápida que o transporte das hexoses, isto gera um acúmulo destes açúcares no meio, causando efeitos negativos à levedura e ao processo industrial. Dentre estes efeitos, os principais são as perdas de açúcar devido à utilização dos monossacarídeos por bactérias e leveduras selvagens já presentes no mosto de alimentação da dorna, e o estresse osmótico. Com a propagação de bactérias, é necessário o uso de antibióticos e ajuste do pH devido à produção de ácidos orgânicos no meio.

Outro inconveniente causado pelas bactérias é a floculação das leveduras (Ludwig *et al.*, 2001), afetando a cinética do processo e as operações de recuperação do produto como a centrifugação em centrífugas contínuas, podendo causar entupimento dos pratos, e consequentemente a interrupção do processo. Já o efeito osmótico pode causar estresse sobre as células e normalmente está associado à presença de glicerol no meio podendo ser outra forma de desvio de açúcar e queda da viabilidade celular. Estes efeitos podem ser potencializados pela elevação da temperatura, normalmente difícil de ser controlada, em escala industrial.

No sentido de evitar a hidrólise extracelular da sacarose e mudar o modo da sua captação pela célula, em que a sacarose passaria a ser transportada ativamente com alta afinidade (Stambuk *et al.*, 2000), modificações genéticas em leveduras de laboratório foram realizadas visando sobre-expressar a invertase intracelular (Basso *et al.*, 2011). Com o mesmo objetivo, modificações genéticas foram introduzidas na linhagem industrial selecionada CAT-1 (Müller, 2013), tais como, a deleção de uma cópia do gene *SUC2* (*suc2Δ*), a modificação de outra cópia de forma a sobre-expressar a invertase intracelular (*iSUC2*) e sobre-expressão do transportador de sacarose por possuir cópias do gene *AGT1* (sobre o controle do promotor constitutivo GPD) inseridos em regiões LTR do transposon Ty1, originando a linhagem GMY15; e a

modificação de uma cópia do gene *SUC2* presente em um dos cromossomas IX de forma a sobre-expressar a invertase intracelular (*iSUC2*) e a sobre-expressão do transportador de sacarose por possuir o gene *AGT1* (sobre o controle do promotor constitutivo GPD) inserido no lugar da segunda cópia do gene *SUC2* presente no outro cromossoma IX do genoma da CAT-1, originando a linhagem GMY16wo. A avaliação do desempenho fermentativo destas linhagens geneticamente modificadas foi realizada neste trabalho.

Tradicionalmente, nos processos fermentativos industriais são utilizadas altas concentrações de açúcares a fim de obter uma maior produção de etanol. Esta exposição passa a ser o fator limitante da fermentação devido à resposta fisiológica apresentada pelas leveduras. As elevadas concentrações de açúcares podem submeter as células ao fenômeno de estresse osmótico prejudicando, assim, o processo de fermentação (Lagunas, 1993). No entanto, esta condição pode ser controlada, por meio de ajuste na vazão de alimentação dos açúcares, pois trabalha-se com modo batelada alimentada que permite um melhor controle do processo. Desta forma, diversos estudos tecnológicos estão sendo realizados, de forma a contribuir para o desenvolvimento do setor sucroenergético, aliados a investimentos em soluções mais modernas que propiciem um aumento do aproveitamento energético, ocasionando uma maior produção industrial e um aumento da eficiência global do processo.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

O objetivo geral deste trabalho é avaliar o desempenho fermentativo de diferentes linhagens geneticamente modificadas, obtidas a partir de uma linhagem industrial de *Saccharomyces cerevisiae*, em condições fermentativas e operacionais similares às utilizadas na indústria.

1.1.2 Objetivos Específicos

Diante do objetivo geral, são desdobrados os seguintes objetivos específicos, a saber:

- ✓ avaliar as leveduras geneticamente modificadas na forma de captação da sacarose sem hidrólise extracelular mas, pela sobre-expressão da invertase intracelular e da permease *AGT1*;
- ✓ avaliar o perfil de captação de açúcares e de produção de metabólitos pelas leveduras durante fermentações em modo batelada simples;
- ✓ avaliar o perfil de captação de açúcares e de produção de metabólitos pelas leveduras durante fermentações conduzidas em modo batelada alimentada;
- ✓ correlacionar as características fenotípicas das leveduras com o desempenho no processo fermentativo e a presença de açúcares redutores no meio;
- ✓ obter e avaliar os parâmetros cinéticos e estequiométricos das diferentes linhagens.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

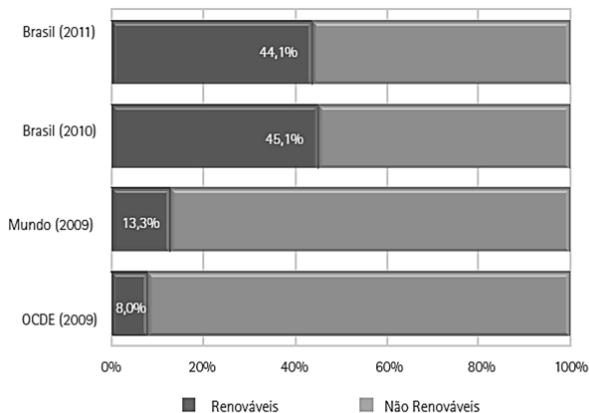
2.1 O BIOETANOL NA MATRIZ ENERGÉTICA BRASILEIRA

A matriz energética brasileira é composta principalmente pelo petróleo e seus derivados, pelo gás natural, pelo carvão mineral e pelo urânio, que representam aproximadamente mais da metade da matriz energética, representando as fontes não renováveis e altamente poluentes (Pacheco, 2011; Malzoni, 2012). No cenário mundial, o Brasil se destaca por possuir a matriz energética mais renovável e mais limpa com participação de energias provenientes de fontes como os recursos hídricos, a biomassa da cana-de-açúcar, além das energias eólica e solar (Malzoni, 2012; Sítio: Portal Brasil).

No Brasil, a participação das fontes renováveis é de 44,1 %, enquanto que a média mundial é de apenas 13,3 %, segundo informações da Agência Nacional de Energia (BEN 2012, EPE/MME), Figura 1. Deste total, a biomassa da cana-de-açúcar, atualmente representada pelo bagaço e a sacarose contida no caldo de cana, responde por 15,7 %. Este percentual ainda pode aumentar, caso o etanol de segunda geração, proveniente do material lignocelulósico, o bagaço e a palha, venha ser introduzido, podendo quase que dobrar a produção de etanol sem aumentar a área plantada.

Apesar da sua diversificação, a matriz energética brasileira está ancorada principalmente na produção de etanol a partir da cana-de-açúcar, e a utilização da biomassa residual, o bagaço da cana, na geração de energia para consumo próprio das usinas produtoras de etanol e/ou açúcar, sendo o excedente, 2/3 desta energia, comercializado (BNDES e CGEE, 2008). O destaque dado ao etanol brasileiro deve-se a outros fatores, tais como: ampla área cultivável, mão-de-obra barata e a competitividade em relação ao etanol produzido a partir do milho (Segura, 2012). Além disso, a produção do etanol a partir de cana-de-açúcar demanda menos de 1 % das terras cultiváveis do país, podendo facilmente ser expandida sem representar competição com a produção de alimentos (UNICA, 2011).

Figura 1 – Participação das fontes renováveis na matriz energética brasileira e mundial.



Fonte: BEN 2012, EPE/MME.

Segundo projeções da União da Indústria de Cana-de-Açúcar (UNICA), o setor sucroenergético brasileiro poderá até 2020 dobrar sua capacidade produtiva (1,2 bilhão de toneladas de cana de açúcar por ano). Para melhorar as condições do setor e beneficiar toda a cadeia produtiva, o setor privado tem investido na tentativa de atender plenamente o mercado interno. No setor industrial, a fermentação do açúcar contido no caldo de cana e/ou melaço pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* vem sendo objeto de pesquisa visando otimizar o processo fermentativo. Os fatores que mais interferem no desempenho da levedura são a concentração de açúcar e a temperatura do meio fermentativo. Para controlar a temperatura do meio, um recente estudo visando aumentar a capacidade de resfriamento do sistema, atualmente em uso nas usinas, foi realizado por Magazoni e colaboradores (2010) em que trata-se da introdução de um *chiller* de absorção movido por calores residuais de processo.

2.2 PROCESSO FERMENTATIVO INDUSTRIAL BRASILEIRO

O processo atual de fermentação foi desenvolvido em 1930 por Fimino Boinot, em destilarias francesas na região do Melle, sendo patenteado em 1937 e denominado processo Melle-Boinot. O processo é constituído por três unidades básicas: a fermentação, a unidade de separação de células e a unidade de tratamento de reciclagem de

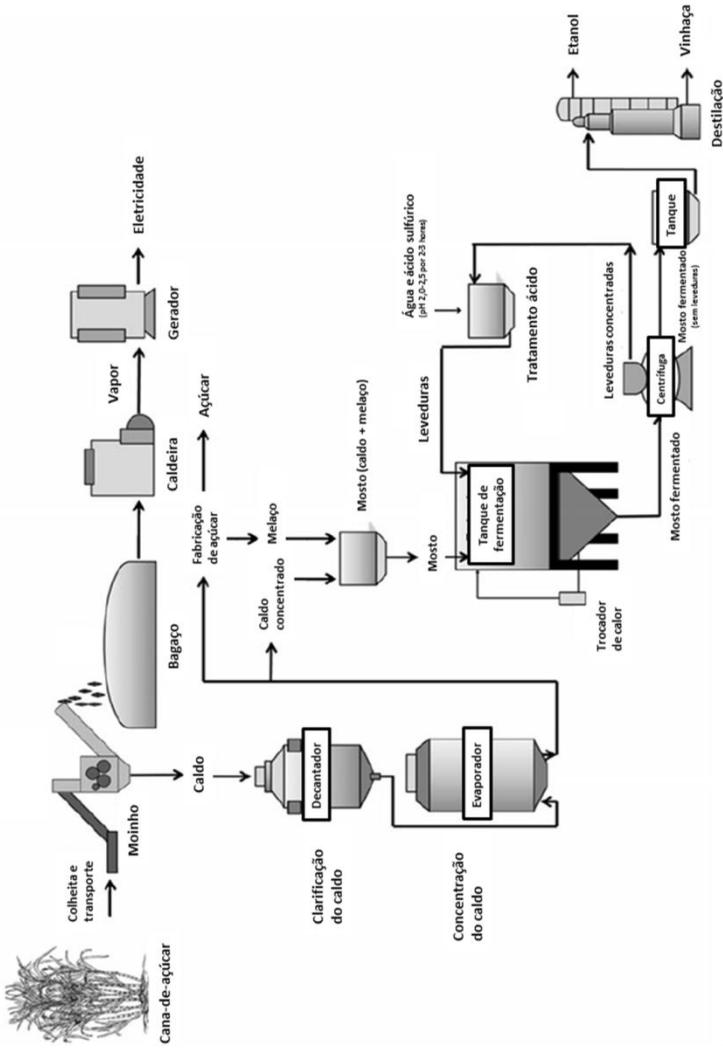
levedura, conforme descrito por Andrietta e colaboradores (2011) e ilustrado na Figura 2:

✓ a fermentação propriamente dita é constituída de fermentadores (dornas), onde os açúcares são convertidos em etanol. Estas dornas de fermentação são geralmente construídas em aço carbono com revestimento, adequadamente pintado, para prevenir a corrosão e tornar as paredes menos enrugadas, tornando assim, a limpeza mais fácil. São equipados com trocadores de calor externos e um sistema de agitação, que utiliza a energia cinética do meio de fermentação para a recirculação passando pelos trocadores de calor. As dornas de fermentação são fechadas permitindo um ambiente totalmente anaeróbio e os gases produzidos durante a fermentação são enviados para uma coluna de lavagem, onde o etanol arrastado é recuperado;

✓ a unidade de separação de células é constituída por centrífugas. O meio de fermentação contendo entre 10 e 13 % (v/v) de células de levedura é enviado para as centrífugas, que geram duas linhas de produtos, o vinho centrifugado cuja concentração de células varia entre 0,2 e 1 %, e o creme de levedura, cuja concentração de células varia entre 60 e 75 %. O vinho centrifugado é enviado para um tanque pulmão que alimenta a unidade de destilação e o creme é enviado para os tanques de tratamento;

✓ a unidade de tratamento consiste em tanques equipados com um sistema de aeração e construído do mesmo modo que as dornas de fermentação, ou seja, em aço carbono e com revestimento, para evitar corrosão e obter paredes menos enrugadas, de forma a facilitar a limpeza. No tanque, é adicionada água tratada ao creme de levedura, para ajustar a concentração celular entre 30 e 40 % (v/v), seguida da adição de ácido sulfúrico concentrado para ajustar o pH entre 2 a 2,5. As células permanecem neste tratamento durante 1 a 2 horas e depois retornam às dornas de fermentação.

Figura 2 – Ilustração simplificada das principais etapas de produção industrial de etanol.



Fonte: Adaptado de Amorim *et al.*, 2011.

Na operação em modo batelada alimentada, as fermentações são realizadas com mosto preparado de caldo e/ou melaço, com tempo de alimentação variando de 6 a 12 h. No final da fermentação, a concentração de álcool atinge entre 7 a 11 % (v/v), e os níveis de açúcares residuais no vinho são inferiores a 0,1 %. Este processo leva 200 a 300 dias, dependendo de vários fatores, tais como: a região, as condições climáticas, a variedade de cana-de-açúcar e a demanda do mercado. As células de levedura são recicladas de 400 a 600 vezes durante a safra, que ocorre de abril a novembro ou setembro a março nas regiões Centro-Sul ou Nordeste do Brasil, respectivamente.

De acordo com Amorim e colaboradores (2011), nos últimos 30 anos, este processo foi melhorado para permitir que as usinas brasileiras alcançassem rendimentos em etanol entre 92 e 93 % do rendimento teórico. Na prática os valores máximos teóricos não são obtidos, pois, o substrato também é convertido em células e em outros subprodutos do metabolismo (Shuler, 1992).

Conforme descrito por Andrietta e colaboradores (2011), o processo de fermentação em batelada alimentada foi concebido para ser usado nos casos em que os microrganismos são submetidos à inibição acentuada pelo substrato. Neste caso, a fim de obter concentrações mais elevadas de produtos finais, o substrato é adicionado ao fermentador de forma controlada para diminuir a inibição (Shuler, 1992). Em geral, em indústrias que utilizam este tipo de processo, as vazões de alimentação de substrato são exponenciais e visam manter a concentração de substrato constante dentro do tanque de fermentação e inferior àquela que apresenta efeitos inibitórios (Weusthuis *et al.*, 1994). Contudo, nas usinas brasileiras, as vazões de alimentação diferem deste padrão, e são geralmente constantes durante todo o tempo de enchimento. Isto acontece porque as linhagens de leveduras utilizadas nos processos já estão adaptadas a essas condições. Estas linhagens suportam altas concentrações de glicose e frutose que são dificilmente obtidas em operações comuns.

Muitas estratégias de operação podem ser utilizadas na condução do processo fermentativo de plantas que operam em batelada alimentada (Amorim *et al.*, 2011). Geralmente a escolha da forma de operação é definida pelos próprios operadores e visam oferecer o maior conforto operacional possível, sendo que as variações na estratégia de operação podem ocorrer na concentração de inóculo utilizado, na forma de alimentação das dornas e no número de dornas que estão sendo alimentadas ao mesmo tempo. A adoção da estratégia de operação

adequada à planta é de fundamental importância para evitar problemas operacionais e estresse para a levedura.

2.2.1 Levedura utilizada no processo industrial

Todos os microorganismos, especialmente eucariontes unicelulares, como leveduras, desenvolveram mecanismos sofisticados para ajustar seu metabolismo e atuarem em diferentes condições ambientais, principalmente aquelas que podem ser reproduzidas em ambiente industrial.

As leveduras do gênero *Saccharomyces* são largamente utilizadas em processos fermentativos em que se deseja como produto final o etanol. Essas leveduras fazem parte de um dos principais grupos de microorganismos mais estudados pela comunidade científica em virtude de sua ampla aplicação em processos biotecnológicos. Esta ampla aplicação deve-se ao fato desta levedura reunir os atributos necessários para condução de um processo com produção de etanol, seja para fins alimentícios ou ser utilizado como combustível. A *S. cerevisiae*, por exemplo, se adaptou bem às condições da fermentação alcoólica, em que as concentrações dos açúcares diminuem ao longo do tempo, enquanto o teor de etanol aumenta. Esse comportamento é uma das principais justificativas para a sua ampla utilização. Além disso, estas leveduras apresentam capacidade de transformar açúcares em etanol com uma cinética favorável, comparada a outros microorganismos, além de apresentar alta tolerância ao produto formado (teor alcoólico em torno de 7 a 10%), às substâncias dissolvidas (cerca de 20 – 22 °Brix) e às variações de temperatura (30 a 40 °C). Ainda, apresenta atividade celular em ambiente ácido (pH em torno de 4,5 e 5) que são as principais características desejáveis para uma linhagem de uso industrial (Lagunas, 1986; Sherman, 2002). Esta capacidade de se adaptar e dominar o ambiente se deve à habilidade de utilizar os açúcares presentes no meio e produzir altas concentrações de etanol, fazendo com que este ambiente se torne impróprio para a sobrevivência de outros microorganismos, como bactérias contaminantes, já presentes no mosto de alimentação.

Potencialmente, as leveduras *S. cerevisiae* são capazes de fermentar diversos açúcares a etanol, sendo que no Brasil a sacarose é a maior e mais utilizada fonte de carbono, oriunda da principal matéria-prima disponível, a cana-de-açúcar (*Saccharum* sp.). Entretanto, as leveduras fermentam glicose ou frutose em detrimento de outros mono-

di-, e trissacarídeos, mesmo para aqueles di- ou trissacarídeos, como a sacarose, que podem ser convertido diretamente em glicose e frutose (Broach *et al.*, 2008). É diante desta seletividade e capacidade fermentativa da *S. cerevisiae* em metabolizar vários açúcares a etanol, que os setores industriais estão investindo na obtenção de linhagens com modificações genéticas que sejam mais adequadas aos seus interesses.

2.3. TRANSPORTE DE AÇÚCARES ATRAVÉS DA MEMBRANA CELULAR

De uma forma geral, quase todos os processos envolvendo microorganismos começam na superfície da célula, a membrana celular, cuja característica fundamental é a permeabilidade seletiva, uma propriedade funcional que permite a regulação quantitativa, qualitativa e direcional do transporte de substâncias (Lehninger *et al.*, 2000; Alberts, 2004). A membrana celular também é um sítio de recepção e transdução de sinais químicos e físicos do meio ambiente e das condições metabólicas internas do microorganismo, além de abrigar enzimas e proteínas responsáveis por processos biossintéticos vitais.

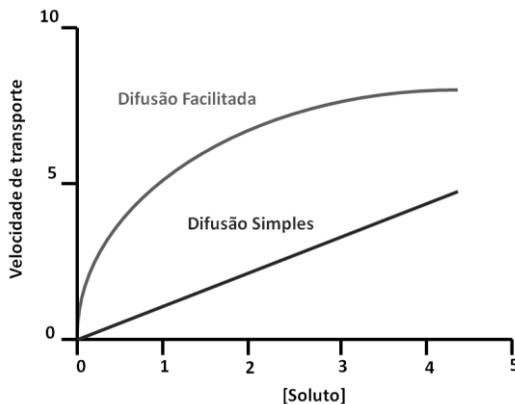
A estrutura básica da membrana celular consiste em uma bicamada lipídica na qual estão localizadas proteínas. Essas proteínas são responsáveis pela enorme diversidade funcional que as membranas celulares apresentam, pois elas podem ser estruturais e atuar como enzimas, como receptores, como transportadores, canais ou bombas eletrogênicas (Alberts, 2004).

Entender como certas substâncias são transportadas pela membrana celular exige que sejam primeiramente observadas suas propriedades físico-químicas, pois o transporte depende de sua natureza. Moléculas de pequeno diâmetro, apolares, como O₂ (oxigênio) e CO₂ (dióxido de carbono), polares, como H₂O (água), moléculas sem carga e moléculas de natureza hidrofóbica, o transporte através da membrana é por difusão simples. Por outro lado, moléculas polares de maior diâmetro e carregadas eletricamente, essenciais para o metabolismo das células, como a glicose, a frutose e a sacarose, são impedidas de circular livremente através da membrana, pois necessitam ser mediadas por proteínas para serem transportadas. Os canais são proteínas complexas que possuem sítios de translocação (poros que atravessam as membranas) para moléculas/íons específicos, os quais podem ser abertos ou fechados por alterações na conformação da proteína, possibilitando a

passagem de um grande número de moléculas/íons como se fosse realmente um canal (Alberts, 2004).

A velocidade de transporte depende do tipo de difusão e é baseado na natureza das substâncias a serem transportadas. Quando o transporte é feito por difusão simples, a velocidade de transporte tende a aumentar linearmente de acordo com a concentração do soluto, ou seja, quanto maior a concentração do soluto maior será a velocidade da difusão (Figura 3), obedecendo ao gradiente de concentração. Por outro lado, quando o transporte é feito por difusão facilitada, a velocidade de transporte é maior do que na difusão simples, porém, não é proporcional à concentração da substância, de forma que, ao aumentar a concentração da substância atinge-se um ponto de saturação (Figura 3), onde, a velocidade de transporte é máxima, característico de cada transportador.

Figura 3 – Velocidade de transporte do soluto através da difusão facilitada e difusão simples.



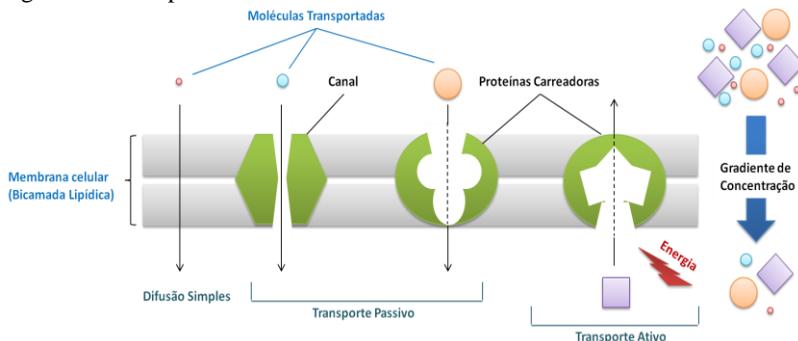
Fonte: Adaptado de Alberts, 2004.

O transporte através da membrana celular pode ocorrer, de forma passiva (Figura 4), ou seja, sem gasto direto de energia, na forma de consumo de ATP (adenosina trifosfato) no momento do transporte, há um deslocamento de moléculas a favor de seus gradientes de concentração (Cirillo, 1961).

Entretanto, o transporte também pode ser realizado de forma ativa, ou seja, é um transporte contra um gradiente de potencial químico ou eletroquímico (íons), motivado pelo gasto de energia (ATP), como mostrado na Figura 4. Este transporte ativo é subdividido de acordo com a fonte de energia utilizada para o transporte. Pode ser caracterizado

como primário, quando a energia é derivada diretamente da degradação do ATP ou de qualquer outra fonte de fosfato rica em energia; ou como secundário, quando a energia é derivada secundariamente da energia estocada na forma de diferença de concentração iônica, entre os dois lados da membrana celular, criada originalmente pelo transporte ativo primário (Alberts, 2004).

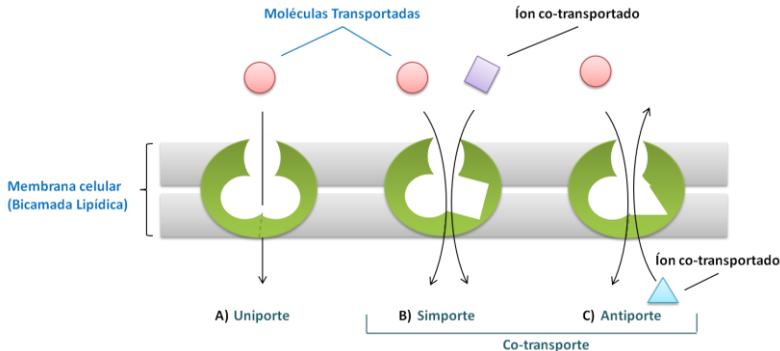
Figura 4 – Transporte de moléculas através da membrana celular.



Fonte: Adaptado de Alberts, 2004.

No transporte ativo secundário esta energia de difusão iônica pode carregar outra substância, recebendo o nome de co-transporte. Em ambos os casos, o transporte depende de proteínas transportadoras, presentes na membrana, de modo semelhante à difusão facilitada. No entanto, no transporte ativo, a proteína transportadora funciona de modo distinto, pois ela é capaz de transferir energia para a substância transportada, com o objetivo de que possa mover-se contra um gradiente eletroquímico. No processo de co-transporte os íons tendem a se difundir para o interior da célula, com um fluxo de direção dado pelo intenso gradiente de concentração, como pode ser representado pela Figura 5.

Figura 5 – Direção do fluxo de moléculas e íons transportados. A) Uniporte: refere-se ao transporte de um único elemento num determinado sentido com ou sem gasto de energia; B) Simporte: refere-se ao transporte de duas substâncias num mesmo sentido (exemplo: H^+ -molécula); C) Antiporte: transporte de duas substâncias em sentidos contrários.



Fonte: Adaptado de Alberts, 2004.

2.3.1 Utilização de açúcares por *Saccharomyces cerevisiae*

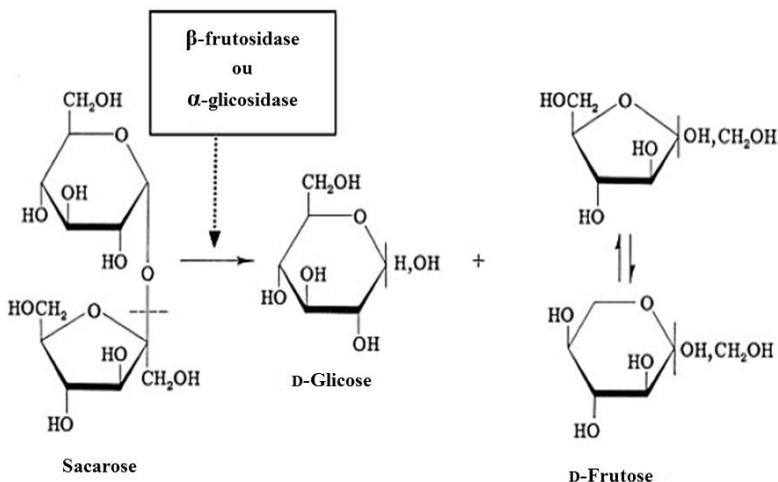
Pela necessidade de manutenção, toda célula capta fontes de nutrientes necessárias à biosíntese e produção de energia, e conseqüentemente precisa liberar os subprodutos de seu metabolismo. Para que estes nutrientes (como por exemplo, os açúcares que são utilizados como fonte de carbono) possam ser metabolizados, eles primeiramente precisam ser transportados para o interior das células (Lagunas, 1993).

O transporte de açúcares através da membrana celular, como visto anteriormente, é mediado por proteínas transportadoras que possuem especificidades de acordo com as propriedades físico-químicas de cada molécula. Em *Saccharomyces cerevisiae* dois mecanismos diferentes de transporte de açúcares já foram descritos: uma difusão facilitada mediada por transportadores, responsável pela captação de hexoses e outra por transporte ativo com simporte de prótons, responsável pela captação de glicosídeos (Cirillo, 1961; Lagunas, 1993; Barnett, 2008).

Na década de 1960, Gertrudis de la Fuente e Alberto Sols mostraram que diversas leveduras, tais como *S. cerevisiae*, que utilizam glicosídeos em seu metabolismo, apesar de captarem de forma direta alguns deles, como a sacarose, inicialmente promovem sua hidrólise

fora da membrana plasmática. A sacarose, por sua vez, é um dissacarídeo formado por uma molécula de α -D-glicose ligada a uma de β -D-frutose, através de uma ligação glicosídica. Quando este dissacarídeo é exposto a condições de hidrólise, a clivagem pode ocorrer tanto na ligação osídica “ α ”, pela maltase (α -D-glicosidase), quanto na ligação “ β ”, neste caso catalisada pela enzima invertase ou β -D-frutosidase, tendo como produto da hidrólise, a glicose e a frutose, conforme mostra a Figura 6. Em solução aquosa, estas hexoses, na forma acíclica, sofrem uma interação intramolecular formando uma estrutura cíclica, na forma de pentanel (forma furanosídica) ou na forma de hexanel (forma piranosídica). No equilíbrio tautomérico, as duas formas tautoméricas da D-frutose, das quatro existentes, predominantes são a β -D-frutopiranosose e a β -D-frutofuranose, na proporção de 68,23 % e 22,35 %, respectivamente (Barclay *et al.*, 2012). Em solução hidroalcoólica (água-etanol), a forma furanosídica é a predominante (Flood *et al.*, 1996). Este fenômeno de mutarotação pode explicar a diferença na velocidade de consumo da frutose em relação à glicose, mostrado na Figura 8.

Figura 6 – Estrutura da sacarose e de seus produtos de hidrólise (glicose e frutose).



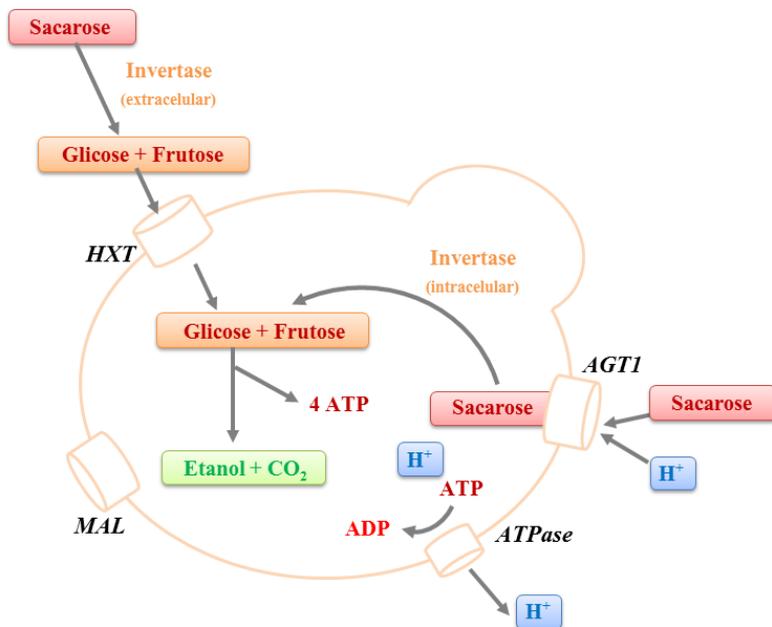
Fonte: Adaptado de Barnett, 2008.

Sob o ponto de vista bioquímico, nas leveduras *S. cerevisiae*, a enzima invertase tem sido extensivamente caracterizada, juntamente

com os genes responsáveis por sua síntese, os genes *SUC*. As leveduras *Saccharomyces* apresentam os genes *SUC1–SUC5* e *SUC7* que codificam para dois tipos de invertase: uma extracelular (regulada pela presença de glicose) e outra intracelular (expressa constitutivamente), sendo que o gene *SUC2* codifica para os dois tipos de invertase (Carlson e Taussig, 1983; Carlson e Vallier, 1991). Quando expressa de forma extracelular (no espaço periplasmático) a invertase é o catalisador responsável pela hidrólise da sacarose gerando duas hexoses, a glicose e a frutose (Figura 6).

A glicose e a frutose são monossacarídeos cuja captação ocorre por difusão facilitada, mediada por transportadores de hexoses codificados pelos genes *HXT* (Figura 7). Uma diversidade incomum de genes transportadores de hexose evoluiu em leveduras *S. cerevisiae*, que compreende uma família que codifica aproximadamente 20 genes transportadores de hexoses e diferentes proteínas relacionadas (Hxtp), envolvidos no transporte e na sua regulamentação de açúcares (Boles e Hollenberg, 1997). Os principais transportadores de hexoses em *S. cerevisiae* são os Hxt1-7p e Gal2p, cada um agindo por difusão facilitada (Lagunas, 1993; Boles e Hollenberg, 1997; Barnett, 2008). A transcrição dos genes *HXT*, que codificam os sete carreadores Hxt, é controlada tanto pela repressão quanto pela indução de glicose, sendo que a indução de glicose envolve dois sensores Snf3p e Rgt2p (Boles e Hollenberg, 1997; Özcan e Johnston, 1999). Na presença de glicose, os sensores enviam sinais para o núcleo através de diversas proteínas, de modo a efetuar a transcrição dos genes transportadores de hexose, ou seja, a adição de glicose desencadeia uma ampla variedade de processos de regulação (Boles e Hollenberg, 1997; Özcan e Johnston, 1999; Barnett, 2008). Por sua forma versátil, a *S. cerevisiae* é capaz de lidar com amplos intervalos de concentrações de glicose de forma eficaz, desde concentrações superiores a $1,5 \text{ mol L}^{-1}$ até concentrações em $\mu\text{mol L}^{-1}$ (Weusthuis *et al.*, 1994). Desta forma, isso implica na presença de um sistema de captação de glicose altamente complexo e regulado (Barnett, 2008).

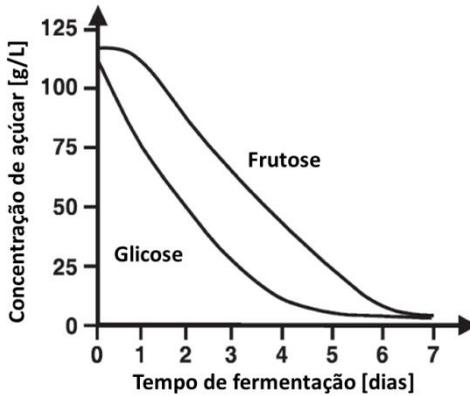
Figura 7 – Representação dos transportadores responsáveis pela captação de açúcares em *S. cerevisiae*.



Estudos realizados por Reifenberger e colaboradores (1995) mostraram que qualquer um dos genes *HXT1* a *HXT7* é suficiente para permitir a captação substancial de glicose, embora ocorram com cinéticas diferentes para cada transportador. Isso indica que apenas as proteínas transportadoras de hexoses, codificadas por esses genes, estão envolvidos no transporte da glicose para dentro das células (Boles e Hollenberg, 1997).

Da mesma forma que a glicose, todas as proteínas Hxtp são capazes de transportar frutose. No entanto, a captação de glicose e frutose envolve dois tipos diferentes de sistema, diferenciados com base na afinidade aparente para cada açúcar, ou seja, sistemas de altos e baixos valores de constante de saturação (K_m) para os transportadores envolvidos. Boles e Hollenberg (1997) mostraram em seus experimentos, menores afinidades para a captação de frutose frente à glicose, o que leva a uma captação mais lenta de frutose em comparação à glicose, conforme é representado pela Figura 8.

Figura 8 – Representação da capacidade de captação da glicose e da frutose.



Fonte: Adaptado de Rodicio e Heinisch, 2009.

No entanto, algumas leveduras *S. cerevisiae* também são capazes de captar a sacarose diretamente através do co-transporte com H^+ e hidrolisá-la internamente (Mwesigye e Barford, 1996). Este fenômeno pode ser demonstrado por Batista e colaboradores (2004), em leveduras incapazes de crescer ou fermentar glicose e frutose devido à ausência dos principais transportadores de hexoses. Tais leveduras apresentaram capacidade de captar a sacarose diretamente para o interior da célula devido à presença de transportador de sacarose, conforme representado na Figura 7.

De acordo com Stambuk e colaboradores (1999), o co-transporte de α -glicosídeos foi caracterizado por duas permeases diferentes: o simporte maltose- H^+ codificado por *MALxT* e o simporte glicosídeo- H^+ codificado pelo *AGTI*. Essa permease é um co-transportador de α -glicosídeos- H^+ capaz de transportar trealose (Stambuk *et al.*, 1996) e sacarose com alta afinidade (Stambuk *et al.*, 2000). Stambuk e colaboradores (2000) mostraram que o gene *AGTI* codifica para um simporte sacarose- H^+ de alta afinidade ($K_m=7,9 \pm 0,08$ mM), enquanto que a maltose permease codificada pelos genes *MALxT* contribui para um simporte sacarose- H^+ de baixa afinidade ($K_m=120 \pm 20$ mM). Desta forma, o transporte ativo de sacarose justificaria a existência de invertase intracelular constitutiva, embora a sacarose também possa ser hidrolisada por outras glicosidades intracelulares.

Em estudos realizados por Weusthuis e colaboradores (1993, 1994) utilizando a maltose como fonte de carbono, os autores mostraram que estes açúcares, quando transportados através do co-transporte com

próton H^+ são hidrolisados de forma intracelular pela maltase gerando duas moléculas glicose, que são metabolizadas na via glicolítica. No transporte ativo de maltose- H^+ , há um gasto energético de ATP envolvendo a extrusão do próton H^+ do interior da célula, ou seja, para cada molécula de maltase transportada para o interior da célula, é necessário o consumo de uma molécula de ATP. Desta forma, o gasto de uma molécula de ATP diminui em 25 % a energia gerada durante a fermentação, quando comparadas com células cultivadas em glicose.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MATERIAIS

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico (*Sigma-Aldrich*).

3.1.1 Linhagens de leveduras industriais utilizadas

As leveduras geneticamente modificadas utilizadas neste estudo e as respectivas características genótípicas e fenotípicas estão apresentadas na Tabela 1. As técnicas de modificação genômica, bem como testes preliminares de respiração celular e fermentação, em frascos agitados (batelada) estão apresentadas em Müller (2013). As leveduras geneticamente modificadas por Müller, GMY15 e GMY16wo, foram obtidas a partir da levedura industrial padrão (testemunha), CAT-1 uma levedura industrial, isolada do meio de produção de etanol combustível a partir do caldo de cana-de-açúcar e/ou melaço, adaptada às condições de estresse fermentativo, como altas concentrações de açúcar (substrato) e etanol, temperatura, pH, pressão hidrostática e osmótica, etc. É uma levedura que apresenta bom desempenho fermentativo e dominância nas dornas de fermentação (Basso *et al.*, 2008).

As linhagens modificadas geneticamente, por Müller (2013), foram obtidas a partir da CAT-1, conforme descrito:

- ✓ a linhagem GMY15 possui uma cópia do gene *SUC2* deletada (*suc2Δ*), a outra cópia modificada de forma a sobre-expressar a invertase intracelular (*iSUC2*) e sobre-expressão do transportador de sacarose por possuir cópias do gene *AGT1* (sobre o controle do promotor constitutivo GPD) inseridos em regiões LTR do transposon Ty1;
- ✓ a linhagem GMY16wo possui uma cópia do gene *SUC2* presente num dos cromossomas IX modificada de forma a sobre-expressar a invertase intracelular (*iSUC2*) e sobre-expressão do transportador de sacarose por possuir o gene *AGT1* (sobre o controle do promotor constitutivo GPD) inserido no lugar da segunda cópia do gene *SUC2* presente no outro cromossoma IX do genoma da CAT-1, portanto deletando a maior parte deste gene (*suc2::pGPD-AGT1-tPGK*).

Tabela 1 – Características genotípicas e fenotípicas das leveduras industriais utilizadas neste trabalho.

Linhagem	Genótipo relevante	Atividade ^a (nmol mg ⁻¹ min ⁻¹)			Referência
		Invertase		Transporte de pNFαG	
		Total	Periplasmática		
CAT-1	<i>SUC2/SUC2 AGT1(?)^b</i>	330 ± 6	260 ± 8	0,0	Basso <i>et al.</i> , (2008)
GMY15	<i>iSUC2/suc2Δ Ty-AGT1-oe^c</i>	4300 ± 50	80 ± 3	3,1 ± 0,1	Müller (2013)
GMY16wo	<i>iSUC2/suc2::AGT1-oe^d</i>	1149 ± 5	39 ± 1	7,3 ± 0,0	Müller (2013)

^aDeterminado em células crescidas em meio rico contendo 20 g.L⁻¹ sacarose. ^bIndica um gene *AGT1* não funcional ou não expresso. ^cIndica sobre-expressão da permease *AGT1* pela transformação com o módulo integrativo nos elementos *Ty (TY-pGPD::AGT1::tPGK-TY)*. ^dIndica deleção do gene *SUC2* pela substituição com o gene *AGT1* sobre-expresso (*pGPD-AGT1-tPGK*).

Fonte: Adaptado de Müller, 2013.

Após as modificações, as leveduras GMY15 e GMY16wo passaram a apresentar as características apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2 – Características das linhagens CAT-1, GMY15 e GMY16wo.

Linhagem	Características
CAT-1	- atividade de invertase intracelular e extracelular; - atividade de transporte de glicose e frutose; - atividade de transporte ativo de sacarose ausente ou não funcional.
GMY15	- ausência de atividade de invertase extracelular; - alta atividade de invertase intracelular; - atividade de transporte de glicose e frutose; - atividade de transporte ativo de sacarose.
GMY16wo	- ausência de atividade de invertase extracelular; - atividade de invertase intracelular; - atividade de transporte de glicose e frutose; - alta atividade de transporte ativo de sacarose.

A escolha destas leveduras foi baseada nas diferentes características fenotípicas apresentadas após a modificação genética. A GMY15 possui uma atividade invertase intracelular 3,8 vezes a da GMY16wo e uma atividade transporte 2,3 vezes menor da GMY16wo.

3.2 MÉTODOS EXPERIMENTAIS

3.2.1 Manutenção das linhagens durante o estudo

As linhagens geneticamente modificadas, juntamente com a padrão, foram mantidas em *slants*, contendo meio YPD e ágar (10 g L^{-1} de extrato de levedura, 20 g L^{-1} de peptona, 20 g L^{-1} de glicose e 20 g L^{-1} de ágar em água destilada), sob refrigeração em geladeira à temperatura de $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$. As linhagens foram repicadas a cada 3 meses, em novo *slant*.

3.2.2 Pré-inóculo e crescimento celular

3.2.2.1 Meio de cultura

Foi utilizado meio rico, complexo, YP (10 g L⁻¹ de extrato de levedura e 20 g L⁻¹ de peptona em água destilada) e adicionado 20 g L⁻¹ de sacarose, como fonte de carbono. O pH do meio foi ajustado para $5,0 \pm 0,1$ com adição de solução de HCl, sendo o monitoramento do pH realizado por um pHmetro (SP990M, Sensoglass) e posteriormente autoclavado à 120 °C por 20 min.

3.2.2.2 Condições de cultivo

Os pré-inóculos foram preparados em tubos de ensaio contendo 3 mL do meio de cultura e inoculados com uma alçada de cada linhagem de células, retirada dos *slants*. Os tubos foram cultivados em incubadora rotatória (Innova 44, New Brunswick Scientific) a 160 rpm e 28 °C por um período de 24 h. Os pré-inóculos foram transferidos para Erlenmeyers contendo meio de cultura, na proporção 1:4 da capacidade do frasco, e novamente cultivados em incubadora rotatória (160 rpm) à 28 °C por um período de 24 h. Após este período, as células foram separadas por centrifugação a 4.500g por 5 minutos, lavadas três vezes com água destilada a 4 °C, e ressuspensas em água destilada a 4 °C de forma a atingir a concentração celular desejada para o ensaio fermentativo.

3.2.3 Fermentação

3.2.3.1 Meio fermentativo

Foi utilizado meio rico, complexo, YP (10 g L⁻¹ de extrato de levedura; 20 g L⁻¹ de peptona em água destilada) com 180 ou 200 g L⁻¹ de sacarose, como fonte de carbono, conforme as condições desejadas. O pH do meio foi ajustado para $5,0 \pm 0,1$ com adição de solução de HCl. Nos ensaios de fermentação o meio de cultura não foi autoclavado.

3.2.3.2 Fermentação em frasco agitado

Para estes ensaios fermentativos foram preparados meios de cultura e suspensão celular duas vezes concentrados, como realizado por Dário (2007). Volumes iguais de meio de cultura e suspensão celular foram misturados, em Erlenmeyers, de forma a obter uma concentração inicial de 200 g L^{-1} de sacarose no meio de cultura e 10 g L^{-1} da suspensão celular, conforme protocolo utilizado no laboratório, Laboratório de Biologia Molecular e Biotecnologia de Leveduras – LBMBL/UFSC, onde foram realizados os experimentos. Os Erlenmeyers foram incubados em incubadora rotatória (160 rpm) a temperatura de $28 \text{ }^\circ\text{C}$ por um período de 9 h. Foram coletadas alíquotas em intervalos de tempo pré-determinados para posterior análise.

3.2.3.3 Fermentação em batelada alimentada

Os ensaios fermentativos foram realizados em um biorreator de 1,3 L (BioFlo 115, New Brunswick Scientific), dotado de agitação mecânica, sensores para controle de temperatura e pH. A temperatura no fermentador era controlada por meio de um banho termostatizado com recirculação externa, que promovia a circulação de água pela camisa do fermentador a uma temperatura determinada. As condições de operação, em modo batelada alimentada, foram definidas de forma similar às utilizadas na Cerradinho Bioenergia S/A, empresa parceira neste trabalho. Foi utilizado um volume inicial, pé-de-cuba, de 180 ou 200 mL de suspensão celular a uma concentração de $82,5 \text{ g L}^{-1}$ (massa seca). A alimentação foi feita com meio de cultura YP contendo 180 g L^{-1} de sacarose a uma vazão constante de 0,07 ou $0,075 \text{ L h}^{-1}$, por um período de 6 h. A fermentação foi conduzida a $32 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 9 h, e o pH do meio ajustado automaticamente ao $\text{pH } 5,0 \pm 0,1$ com adição de KOH 3 mol L^{-1} . Foram coletadas alíquotas de 1 mL do meio fermentativo, em intervalo de tempo pré-determinado, para posterior análise.

Após o término do ensaio fermentativo, as células foram separadas do meio de cultura por centrifugação a 4.500 g por 5 minutos, lavadas três vezes com água destilada a $4 \text{ }^\circ\text{C}$, ressuspensas em água destilada a $4 \text{ }^\circ\text{C}$ e a concentração celular ajustada a $82,5 \text{ g L}^{-1}$ (massa seca) para ser reutilizada em um segundo ensaio fermentativo.

3.3 MÉTODOS ANALÍTICOS

3.3.1 Determinação da concentração celular

A concentração celular, em massa seca (g L^{-1}), foi determinada através da relação entre a massa seca, obtida por gravimetria e a densidade óptica (D.O.), obtida por leitura de absorbância em espectrofotômetro a 570 nm, conforme descrito por Dário (2007). Para linhagens de *S. cerevisiae* foi encontrado, para o fator de cálculo, um valor médio igual a 0,27 dentro de uma faixa linear de absorbância (0,030 – 0,300). Desta forma, a concentração celular pode ser obtida conforme mostra a Equação 1.

$$X_{\text{gL}^{-1}} = \text{Abs} \cdot f_c \cdot f_d \quad (1)$$

Onde, *Abs* é o valor da leitura de absorbância a 570 nm; f_c é o fator de cálculo igual a 0,27 e f_d é o fator de diluição, utilizado quando necessário para respeitar a faixa de linearidade de absorbância, segundo a lei de Lambert-Beer (Vogel, 2002).

3.3.2 Determinação de açúcares, etanol e glicerol

As alíquotas coletadas ao longo da fermentação foram centrifugadas a 10.000g por 3 min. O sobrenadante foi separado para determinação dos açúcares (sacarose, glicose e frutose), etanol e glicerol. A quantificação dos componentes foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência – CLAE (LC-2000 Plus, Jasco), com detector por índice de refração (RI-2031 plus, Jasco). Foi utilizada uma coluna HyperREZ XP Organic Acid Column (Thermo Scientific) a 20 °C, com solução de H_2SO_4 5 mmol L^{-1} , como fase móvel, a uma vazão de 0,3 mL min^{-1} e tempo de análise de 25 minutos para cada amostra. A curva de calibração utilizada foi obtida utilizando três diferentes concentrações para cada produto analisado, sendo 5, 10 e 20 g L^{-1} para sacarose, glicose e frutose e 2,5, 5 e 10 g L^{-1} para etanol e glicerol. O cromatograma com os picos dos componentes identificados é mostrado no Anexo A.

3.4 MODELAGEM MATEMÁTICA

3.4.1 Batelada (frasco agitado)

Para a modelagem da fermentação em modo batelada (frasco agitado) foram assumidas as seguintes hipóteses:

- reator de mistura perfeita;
- densidade constante ($\rho \approx \rho_e$);
- volume constante.

✓ **Balço de massa para células:**

$$\frac{dX}{dt} = r_X \quad (2)$$

onde, X é a concentração de células [g L^{-1}]; t é o tempo de fermentação [h] e $r_X = \mu_X \cdot X$ é a velocidade de produção de células [$\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$], sendo μ_X a velocidade específica de crescimento celular [h^{-1}].

✓ **Balço de massa para o substrato:**

$$\frac{dS}{dt} = -r_S \quad (3)$$

onde, S é a concentração de substrato no meio [g L^{-1}] e $r_S = \mu_S \cdot X$ é a velocidade de consumo de substrato [$\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$], sendo μ_S a velocidade específica de consumo de substrato [$\text{g}_{\text{substrato}} \text{g}_{\text{célula}}^{-1} \text{h}^{-1}$].

✓ **Balço de massa para o produto:**

$$\frac{dP}{dt} = r_P \quad (4)$$

onde, P é a concentração de produto [g L^{-1}] e $r_P = \mu_P \cdot X$ é a velocidade de formação do produto [$\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$], sendo μ_P a velocidade específica de formação de produto [$\text{g}_{\text{produto}} \text{g}_{\text{célula}}^{-1} \text{h}^{-1}$].

Em um determinado intervalo de tempo (t) de fermentação, os valores correspondentes de X , S e P podem ser relacionados entre si,

através dos fatores de conversão (massa de produto formado por massa de substrato consumido) (Schmidell, 2001). Considerando as definições de velocidades, Equações 2 a 4, os fatores de conversão podem ser definidos como:

$$Y_{X/S} = \frac{r_X}{r_S} \quad (5)$$

$$Y_{P/S} = \frac{r_P}{r_S} \quad (6)$$

onde, $Y_{X/S}$ é o fator de conversão do substrato consumido em células formadas [$\text{g}_{\text{célula}} \text{g}_{\text{substrato}}^{-1}$] e $Y_{P/S}$ é o fator de conversão do substrato consumido em produto formado [$\text{g}_{\text{produto}} \text{g}_{\text{substrato}}^{-1}$].

Considerando o consumo de substrato e de formação de produto constantes, no processo em batelada, as velocidades foram, então, determinadas através dos coeficientes angulares obtidos no ajuste do modelo de regressão linear, Equação 7, para cada conjunto de dados (massa de células, produto e substrato pelo tempo). Para o ajuste do modelo aos dados experimentais foi utilizado o software SigmaPlot 12.

$$y = a \cdot x + b \quad (7)$$

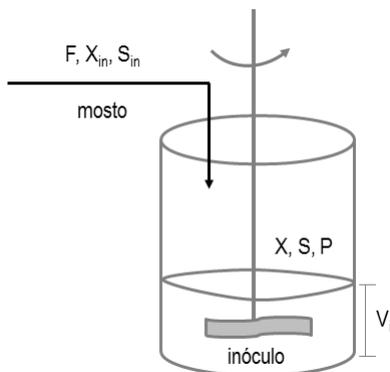
onde, y representa os valores em massa de células, de produtos formados e de substrato consumido; a é o coeficiente angular que representa o valor das velocidades; x representa o tempo e b é o coeficiente linear.

3.4.2 Batelada alimentada

Para a modelagem da fermentação em modo batelada alimentada, Figura 9, foram assumidas as seguintes hipóteses:

- alimentação estéril ($X_{in} = 0$);
- reator de mistura perfeita;
- densidade constante ($\rho \approx \rho_e$);
- variação do volume influenciada somente pela vazão de alimentação.

Figura 9 – Representação de um fermentador operando em modo batelada alimentada.



✓ **Balço global:**

$$\frac{dV}{dt} = F \quad (8)$$

onde, V é o volume de meio [L]; t é o tempo de fermentação [h] e F é a vazão de alimentação [$L h^{-1}$].

Como a vazão de alimentação é constante e o volume aumenta ao longo do tempo, tem-se

$$V = V_i + F \cdot t \quad (9)$$

onde, V_i é o volume inicial no fermentador [L].

✓ **Balço de massa para células:**

$$\frac{d(VX)}{dt} = F \cdot X_{in} + r_X \cdot V - r_d \cdot V \quad (10)$$

onde, X é a concentração de células [$g L^{-1}$]; X_{in} é a concentração de células na alimentação [$g L^{-1}$]; r_X é a velocidade de produção de células [$g L^{-1} h^{-1}$]; r_d é a velocidade de morte celular [$g L^{-1} h^{-1}$].

Como a alimentação é estéril ($X_{in} = 0$) e o volume variável a Equação 10 pode ser reescrita na forma da Equação 11.

$$\frac{F}{V} \cdot X + \frac{dX}{dt} = r_X - r_d \quad (11)$$

Como $r_X = \mu_X \cdot X$ e $r_d = K_d \cdot X$

$$\frac{dX}{dt} = \mu_X \cdot X - \frac{F}{V} X - K_d \cdot X \quad (12)$$

Considerando: $K_d \ll \mu_X$;

$$\frac{dX}{dt} = \mu_X \cdot X - \frac{F}{V} X \quad (13)$$

Sendo F/V a vazão específica de alimentação, D :

$$\frac{dX}{dt} = (\mu_X - D) \cdot X \quad (14)$$

✓ **Balço de massa para o substrato:**

$$\frac{d(V \cdot S)}{dt} = F \cdot S_{in} - r_S \cdot V \quad (15)$$

onde, S é a concentração de substrato no fermentador [g L^{-1}]; S_{in} é a concentração de substrato na alimentação [g L^{-1}]; r_S é a velocidade de consumo de substrato [$\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$].

A Equação 15 pode ser reescrita, considerando que o volume é variável, conforme Equação 16.

$$\frac{dS}{dt} = D \cdot (S_{in} - S) - r_S \quad (16)$$

✓ **Balço de massa para o produto:**

$$\frac{d(V.P)}{dt} = r_p \cdot V \quad (17)$$

onde, P é a concentração de produto [g L^{-1}] e r_p é a velocidade de formação do produto [$\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$].

Considerando que o volume variável, a Equação 17 pode ser reescrita na forma da Equação 18.

$$\frac{dP}{dt} = r_p \cdot V - D \cdot P \quad (18)$$

As velocidades de crescimento celular, formação de produto e consumo de substrato podem ser descritas como:

$$r_X = \frac{dM_X}{dt} \quad (19)$$

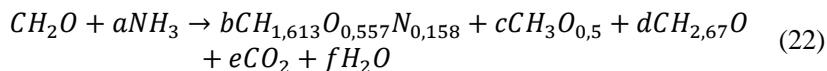
$$r_S = F \cdot S_{in} - \frac{dM_S}{dt} \quad (20)$$

$$r_P = \frac{dM_P}{dt} \quad (21)$$

onde, M_X , M_P e M_S correspondem aos valores mássicos [g] de células, produto e substrato, respectivamente.

3.5 BALANÇO DE ELÉTRONS MACROMOLECULAR

De forma geral, a Equação 22 foi utilizada para representar os componentes que participam do processo fermentativo, considerando ausência de O_2 .



Onde, CH_2O é a fonte de principal de carbono (ART), NH_3 é a fonte de nitrogênio, $CH_{1,613}O_{0,557}N_{0,158}$ é a fórmula elementar para *S. cerevisiae*, de acordo com a utilizada por von Stockar (1999), $CH_3O_{0,5}$ é o etanol, $CH_{2,67}O$ é o glicerol, CO_2 é o dióxido de carbono e H_2O a água.

Para o balanço de elétrons disponíveis para oxidação (Equações 23 a 25), utilizaram-se os fatores de conversão expressos em C-mol C-mol⁻¹ e os graus de redução apresentados na Tabela 3. Definiu-se o grau de redução (γ) para NH_3 , CO_2 e H_2O igual à zero.

$$\gamma_S = b\gamma_X + c\gamma_P + d\gamma_G \quad (23)$$

$$1 = b \frac{\gamma_X}{\gamma_S} + c \frac{\gamma_P}{\gamma_S} + d \frac{\gamma_G}{\gamma_S} \quad (24)$$

$$1 = \bar{Y}_{X/S} \frac{\gamma_X}{\gamma_S} + \bar{Y}_{P/S} \frac{\gamma_P}{\gamma_S} + \bar{Y}_{G/S} \frac{\gamma_G}{\gamma_S} \quad (25)$$

Tabela 3 – Grau de redução dos componentes presentes no biorreator e a massa equivalente a um mol de carbono.

Componente	Fórmula elementar	Massa, g.C-mol ⁻¹	Grau de redução, γ	Referência
Células	$CH_{1,613}O_{0,557}N_{0,158}$	24,737	4,5	von Stockar, 1999.
Glicose ^a	CH_2O	30	4	Shuler, 2002.
Etanol	$CH_3O_{0,5}$	23	6	Shuler, 2002.
Glicerol	$CH_{2,67}O$	30,69	4,67	Shuler, 2002.
Amônia	NH_3	-	0	Shuler, 2002.
Dióxido de carbono	CO_2	-	0	Shuler, 2002.
Água	H_2O	-	0	Shuler, 2002.

^aRepresenta os açúcares redutores totais.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 DESEMPENHO FERMENTATIVO EM BATELADA (FRASCO AGITADO)

Os perfis fermentativos para as linhagens GMY15 e CAT-1 estão apresentados na Figura 10. As Figuras 10 (a)-(c) mostram a diferença no transporte de sacarose, glicose e frutose apresentado pela levedura geneticamente modificada (GMY15) e a levedura padrão (CAT-1).

Na fermentação com a levedura geneticamente modificada GMY15, a sacarose é transportada lentamente, Figura 10 (a), sem hidrólise extracelular, apresentando apenas quantidades residuais de glicose e frutose, $1,7 \text{ g L}^{-1}$ e $6,5 \text{ g L}^{-1}$, respectivamente (Figura 10 (b)). Enquanto que na fermentação com a CAT-1 a sacarose é rapidamente hidrolisada pela invertase extracelular, em aproximadamente 4 h (Figura 10 (a)), acumulando glicose e frutose no meio (Figura 10 (b)). O perfil de consumo dos açúcares redutores totais, para as duas fermentações, são semelhantes (Figura 10 (c)), assim como para a produção de etanol, (Figura 10 (e)). As duas leveduras não consumiram todo o açúcar, com uma concentração residual, em 9 h de fermentação, de $131 \text{ e } 98,8 \text{ g L}^{-1}$ para a GMY15 e CAT-1, respectivamente, conforme Figura 10 (c). Isto mostra que a concentração inicial de açúcar de 200 g L^{-1} é elevada para as duas leveduras indicando que há inibição pelo excesso de substrato, pois não há crescimento.

Entretanto, as duas leveduras possuem transportadores de hexoses *HXT* que atuam no transporte de glicose e frutose tanto para o interior quanto para o exterior da célula. A sacarose uma vez transportada para o interior da célula, é hidrolisada pela invertase intracelular. A levedura que apresenta uma elevada atividade invertase intracelular pode gerar uma quantidade de glicose e frutose em excesso, que ao não serem fosforiladas pela enzima hexoquinase, podem ser transportadas para o exterior na célula de forma facilitada (da mesma forma que entram). A enzima hexoquinase atua na primeira etapa da glicólise, a fosforilação da glicose e da frutose, permitindo que esses açúcares sejam metabolizados através da via glicolítica e impedindo que se difundam para fora da célula (Barnett, 2008).

Na Figura 10 (c), é possível observar pelo perfil de concentração dos açúcares redutores totais (glicose e frutose) que o consumo dos açúcares pela linhagem CAT-1 foi mais rápido do que o observado para linhagem GMY15. Isto indica que na fermentação com a GMY15, a

etapa limitante no processo fermentativo é o transporte da sacarose, como reportado por Lagunas (1993). Vale ressaltar que, como mostrado na Figura 10 (b), a glicose é consumida preferencialmente à frutose, isto deve-se à afinidade seletiva dos transportadores pelos açúcares (Boles e Hollenberg, 1997). Esta seletividade pode também ser decorrente da predominância da forma furanosídica da D-frutose (β -D-frutofuranose), em meio água-etanol, conforme apresentado no item 2.3.1. A forma piranosídica é a mais facilmente metabolizada pelos seres vivos, como a β -D-glicopiranosose. Por meio destes ensaios pode-se mostrar que, nas condições testadas, a levedura modificada geneticamente GMY15, mesmo em presença de uma concentração inicial elevada de sacarose, não apresentou glicose e frutose no meio. O mesmo comportamento, tanto no transporte de sacarose quanto no de glicose e frutose, é esperado pela levedura geneticamente modificada GMY16wo, pois ambas, as leveduras geneticamente modificadas, apresentam alta atividade de transporte ativo de sacarose e atividade de transporte de glicose e frutose.

As velocidades de consumo de substrato e de formação dos produtos, etanol e glicerol, apresentadas na Tabela 4, foram determinadas no intervalo de tempo entre 3 e 9 h, onde os dados expressos em massa (gramas) ao longo do tempo apresentaram linearidade, utilizando o módulo dos coeficientes angulares gerados pelo modelo de regressão linear, Equação 7. Os fatores de conversão para célula, para etanol e para glicerol foram determinados utilizando as Equações 5 e 6 e estão apresentados na Figura 11.

Figura 10 – Perfil fermentativo das linhagens GMY15 e CAT-1, em ensaios em frascos agitados, a 28 °C. (a) Concentração de sacarose; (b) Concentração de glicose e frutose; (c) Concentração de açúcares redutores totais (ART); (d) Concentração de células; (e) Concentração de etanol e glicerol.

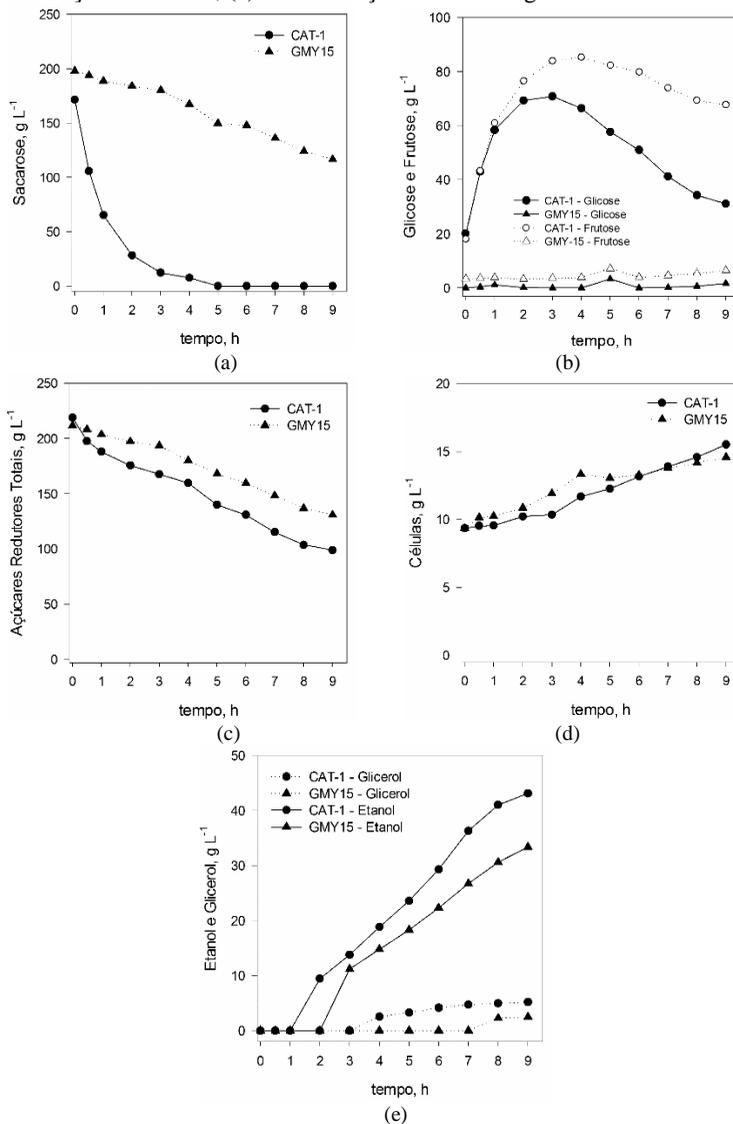
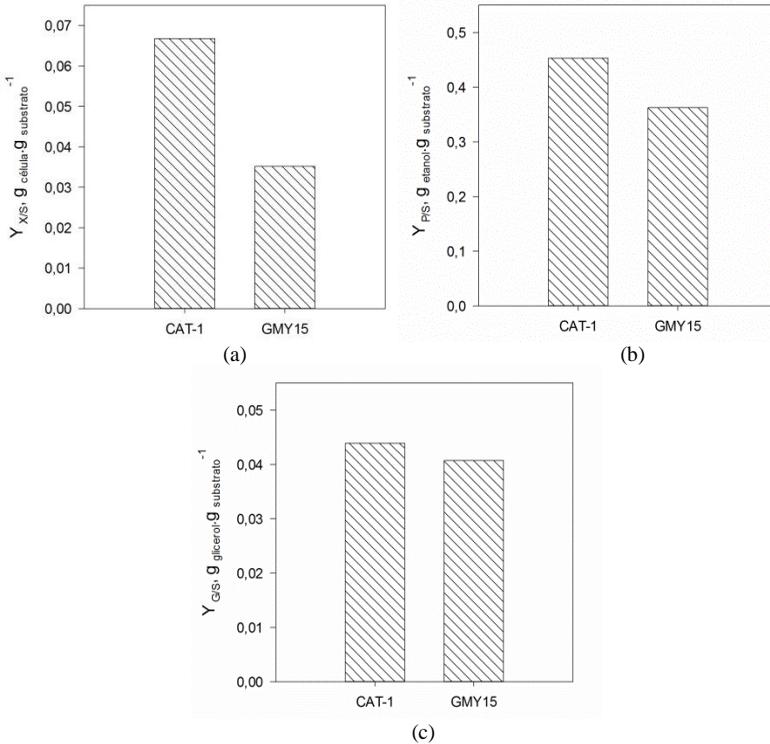


Tabela 4 – Velocidade de consumo de substrato e formação dos produtos, etanol e glicerol, no período entre 3 e 9 h.

Linagem		Velocidade, g h ⁻¹	R ²
CAT-1	Células	0,041	0,992
	Etanol	0,277	0,996
	Glicerol	0,027	0,939
	ART	0,612	0,984
GMY15	Células	0,018	0,862
	Etanol	0,191	0,998
	Glicerol	0,022	0,634
	ART	0,525	0,993

Figura 11 – Fatores de conversão em células, em etanol e em glicerol para as linhagens GMY15 e CAT-1. (a) $Y_{X/S}$ expresso em g célula g substrato⁻¹; (b) $Y_{P/S}$ expresso em g etanol g substrato⁻¹; (c) $Y_{G/S}$ expresso em g glicerol g substrato⁻¹.

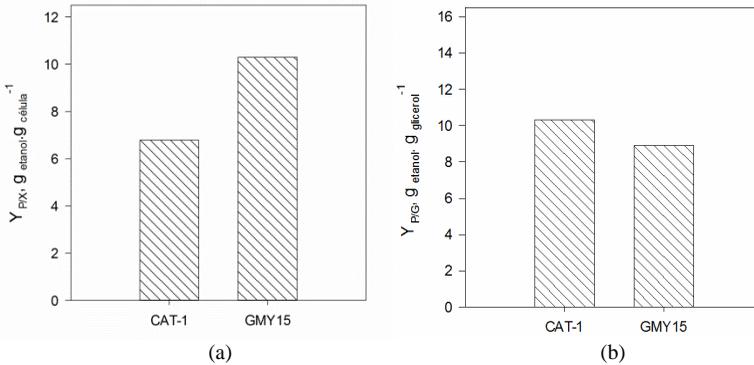


Como apresentado no referencial teórico, item 2.3.1, as leveduras *Saccharomyces cerevisiae* apresentam dois mecanismos diferentes de

transporte de açúcares: uma difusão facilitada mediada por transportadores, responsáveis pela captação de hexoses e outra por transporte ativo com simporte de prótons, responsável pela captação de dissacarídeos (Cirillo, 1961; Lagunas, 1993; Barnett, 2008). Neste trabalho, o substrato utilizado é a sacarose, que é hidrolisada em glicose e frutose. Estas hexoses são transportadas, de forma facilitada, para o interior da célula, onde são fermentadas a etanol, no caso da linhagem CAT-1. Por este mecanismo de transporte, obtém-se como balanço energético final da fermentação 4 moléculas de ATP. Para o caso das linhagens modificadas geneticamente, a sacarose é transportada de forma ativa para o interior da célula via co-transporte sacarose- H^+ . Para manter o potencial hidrogeniônico (pH), o próton H^+ é extrudado via H^+ -ATPase de membrana, mecanismo este que envolve a hidrólise de uma molécula de ATP (Figura 7). Portanto, para cada molécula de sacarose transportada para o interior da célula (sacarose- H^+) é requerida uma molécula de ATP (1:1). Desta forma, o balanço energético final da fermentação, com a levedura modificada, resulta em 3 moléculas de ATP. Nesta situação espera-se que, para uma determinada quantidade de sacarose inicial, a produção de células seja 25 % menor que na situação de hidrólise extracelular, encontrada na levedura padrão (Basso *et al.*, 2011).

Pelos fatores de conversão calculados e mostrados na Figura 11 (a) pode-se observar que houve menor crescimento celular em relação ao substrato consumido para linhagem GMY15, conforme exposto acima, obtendo-se 0,067 e 0,035 $g_{célula} g_{substrato}^{-1}$ para CAT-1 e GMY15, respectivamente. Para o intervalo de tempo de 9 horas de fermentação, a relação entre o $Y_{X/S}$ da GMY15 e da CAT-1 foi de 52 % e não 75 % como esperado. O fator de conversão $Y_{P/S}$ apresentou o valor de 0,453 e 0,363 $g_{etanol} g_{substrato}^{-1}$ para CAT-1 e GMY15, respectivamente. Pode-se observar, ainda, que o fator de conversão $Y_{G/S}$ foi de 0,044 $g_{glicérol} g_{substrato}^{-1}$ para CAT-1 e ligeira diminuição para a GMY15 apresentando o valor de 0,041 $g_{glicérol} g_{substrato}^{-1}$. Foram também obtidas as relações entre a massa de célula e glicérol pelo etanol, como mostrado na Figura 12.

Figura 12 – Relação entre massa de células e glicerol formados e o etanol produzido para as linhagens GMY15 e CAT-1. (a) $Y_{P/X}$ expresso em $\text{g etanol g célula}^{-1}$. (b) $Y_{P/G}$ expresso em $\text{g etanol g glicerol}^{-1}$.



Verifica-se, através da Figura 12 (a), que a GMY15 produziu mais etanol em relação a massa de célula obtida. O etanol é um metabólito primário, associado ao crescimento celular, em *Saccharomyces cerevisiae*. A levedura modificada, GMY 15, produz mais etanol por grama de células obtido. Para a produção de etanol em relação ao glicerol obtido, os resultados não foram muito diferentes, para as duas linhagens, apenas uma discreta diminuição para a GMY15. Na fermentação com a GMY15, houve formação de glicose e frutose no meio, o suficiente para causar um efeito osmótico, conhecido também como estresse osmótico, causando o aparecimento de glicerol no meio. Este glicerol pode ser um glicerol endógeno, que já existia dentro da célula, produzido no crescimento celular, ou um glicerol produzido durante a fermentação a partir do açúcar redutor presente, causando uma perda de ART.

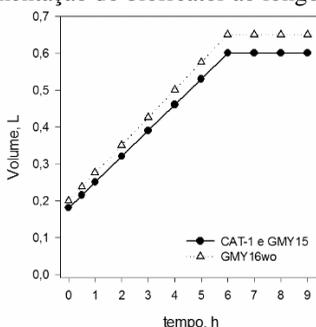
4.2 DESEMPENHO FERMENTATIVO EM BIORREATOR TIPO BATELADA ALIMENTADA

Testes em batelada alimentada com as linhagens modificadas GMY15 e GMY16wo e a padrão CAT-1 foram realizados em condições similares às utilizadas na usina, conforme descrito no item 4.2.1.

4.2.1 Condições de operação do biorreator

As condições operacionais utilizadas nos ensaios em batelada alimentada foram sugeridas pela Cerradinho Bioenergia S/A, empresa parceira neste trabalho. Foi utilizada a estratégia de se trabalhar com alta densidade de células dentro do fermentador, técnica utilizada para minimizar o crescimento celular (Atala *et al.*, 2001; Amorim *et al.*, 2011; Pereira *et al.*, 2011). A vazão de alimentação foi constante de $0,07 \text{ L h}^{-1}$ para ensaios com a linhagem CAT-1 e GMY15 e de $0,075 \text{ L h}^{-1}$ para linhagem GMY16wo, e o tempo de alimentação de 6 h. O volume do pé-de-cuba corresponde a 1/3 do volume final, e os 2/3 restantes, sendo o meio de cultura alimentado (mosto). O perfil do preenchimento do biorreator (variação do volume com o tempo) pode ser observado na Figura 13.

Figura 13 – Perfil de alimentação do biorreator ao longo do tempo.

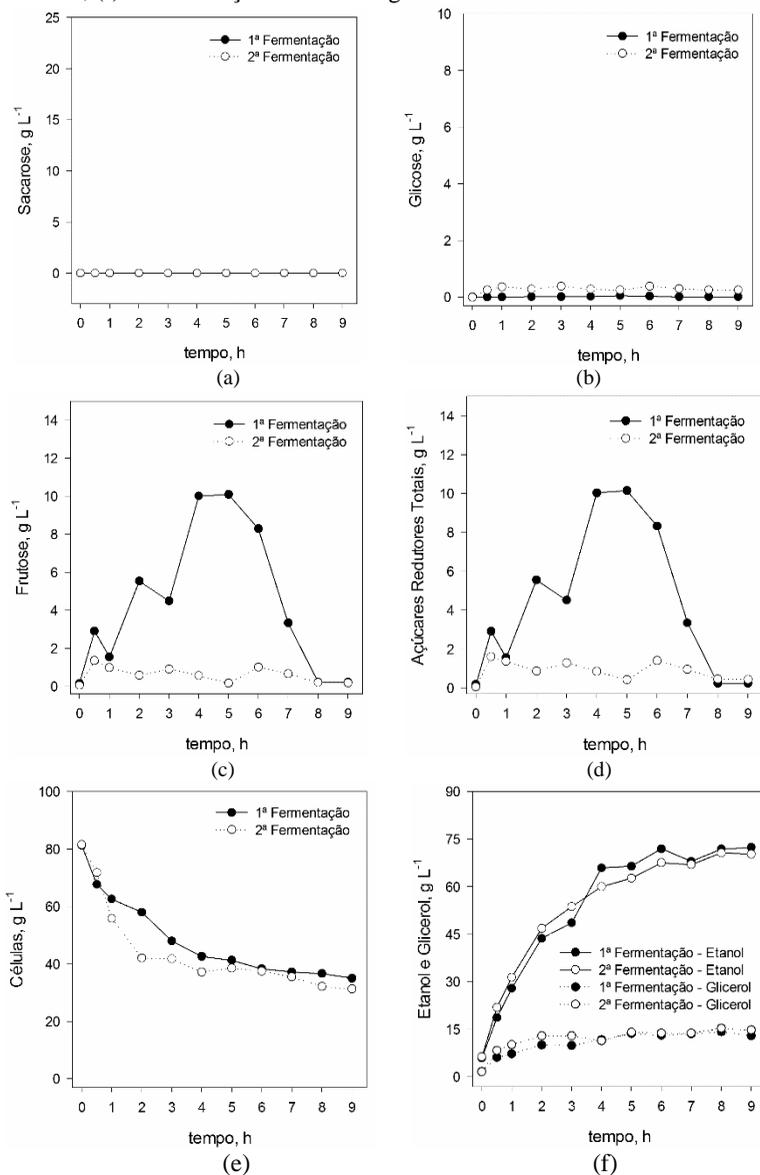


4.2.2 Desempenho fermentativo da levedura padrão, CAT-1

A Figura 14 apresenta o perfil fermentativo da linhagem padrão, CAT-1, em dois ciclos de fermentação em modo batelada alimentada, sendo o segundo com reutilização de células. Como mostrado na Figura 14 (a) não há sacarose acumulada no meio fermentativo com a CAT-1, sendo a ausência de sacarose no meio devido à alta atividade de invertase extracelular desta linhagem. Verifica-se que toda a sacarose adicionada ao meio fermentativo foi hidrolisada em glicose e frutose, que por sua vez, foram transportados para o interior da célula. As Figuras 14 (b) e (c) mostram baixas concentrações de glicose e frutose no meio, isto porque, o biorreator foi inoculado com uma alta concentração de células e a alimentação de sacarose foi constante.

Verifica-se, por estas figuras, que os perfis fermentativos para consumo do substrato, crescimento celular, produção de etanol e produção de glicerol da 1ª e da 2ª fermentações foram semelhantes. No entanto, é possível observar uma ligeira diferença no consumo de substrato, sugerindo que de um ciclo de fermentação para o outro houve uma adaptação das células aos substratos presentes, porém sem causar alterações no teor alcoólico final.

Figura 14 – Perfil fermentativo da linhagem CAT-1 em batelada alimentada. (a) Concentração de sacarose; (b) Concentração de glicose; (c) Concentração de frutose; (d) Concentração de açúcares redutores totais (ART); (e) Concentração de células; (f) Concentração de etanol e glicerol.



A fermentação foi conduzida durante 9 h e pode-se observar que na 8ª h todo o substrato disponível já havia sido consumido e na última hora de fermentação, a concentração dos produtos formados (etanol e glicerol) apresentou-se praticamente constante, conforme Figura 14 (f).

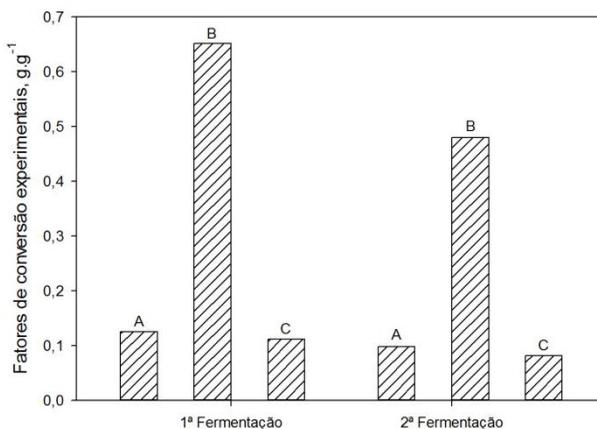
As velocidades de consumo de substrato e formação de produtos foram determinadas utilizando o módulo dos coeficientes angulares gerados pelo modelo de regressão linear, Equação 7. Utilizou-se um modelo linear devido a aparente linearidade entre os pontos experimentais quando expressos em massa ao longo do tempo. Os valores das velocidades, e as respectivas correlações obtidas do ajuste deste modelo aos pontos experimentais, para a CAT-1, estão apresentadas na Tabela 5. Vale ressaltar que foram utilizados, para este ajuste, os dados compreendidos entre 2ª h de alimentação e a 6ª h, final da alimentação. Os dados iniciais não foram utilizados devido às oscilações observadas nos valores obtidos experimentalmente para as células. A velocidade de consumo de substrato (ART) foi determinada utilizando a Equação 20 e obteve-se uma média dos valores obtidos dos experimentos realizados, entre 2 e 6 h. Esta equação foi utilizada, pois leva em consideração a concentração de substrato que está entrando no fermentador.

A partir dos valores das velocidades, pode-se, então, determinar os fatores de conversão em célula, em etanol e em glicerol. Os resultados para os dois ciclos de fermentação estão apresentados na Figura 15. Observa-se que houve uma ligeira diminuição nas células produzidas, do 1º para o 2º ciclo de fermentação, 0,13 e 0,10 $\text{g}_{\text{célula}} \text{g}_{\text{substrato}}^{-1}$, respectivamente. Isto foi observado também para o glicerol, cujos valores obtidos foram 0,11 e 0,08 $\text{g}_{\text{glicerol}} \text{g}_{\text{substrato}}^{-1}$ para o 1º e para o 2º ciclo, respectivamente. Para a produção de etanol observa-se que houve uma aparente alta conversão para a 1ª fermentação apresentado o valor de 0,65 $\text{g}_{\text{etanol}} \text{g}_{\text{substrato}}^{-1}$, superando até o valor máximo teórico de 0,511 $\text{g}_{\text{etanol}} \text{g}_{\text{substrato}}^{-1}$, se todo o substrato fosse convertido a etanol e CO_2 .

Tabela 5 – Velocidade de formação de produtos e consumo de substrato, no período entre 2 e 6 h.

CAT-1		Velocidade, g h ⁻¹	R ²
1 ^a Fermentação	Biomassa	1,436	0,966
	Etanol	7,466	0,985
	Glicerol	1,273	0,972
	ART	11,468	-
2 ^a Fermentação	Biomassa	1,295	0,785
	Etanol	6,483	0,999
	Glicerol	1,235	0,967
	ART	13,208	-

Figura 15 – Fatores de conversão em células, em etanol e em glicerol para linhagem CAT-1, valores experimentais. A - $Y_{X/S}$ expresso em g célula g substrato⁻¹; B - $Y_{P/S}$ expresso em g etanol g substrato⁻¹; C - $Y_{G/S}$ expresso em g glicerol g substrato⁻¹.



Com base nos valores de fatores de conversão em etanol apresentados, sendo um deles maior que o valor teórico, tentou-se buscar uma explicação. Sabe-se que o meio YP (extrato de levedura e peptona bacteriológica) utilizado nos experimentos, é um meio complexo, e cuja composição exata não é conhecida (Shuler, 1992). As fontes de nitrogênio utilizadas nestes meios são compostos orgânicos nitrogenados, como proteínas hidrolisadas, portanto também são fontes de carbono. Se as células estão utilizando nitrogênio, estão também

utilizando o carbono presente nestes compostos, chamada neste trabalho de fonte secundária.

Diante disto, supõe-se que o valor para o $Y_{P/S}$, etanol produzido em relação ao substrato consumido, acima do máximo teórico, seja devido à utilização desta outra fonte de carbono pela levedura.

Pelo Princípio de conservação de massa não pode haver nos produtos mais carbono do que 1 C-mol de reagente (substrato), e pelo Princípio do conservação da energia, os elétrons disponíveis do substrato devem ir obrigatoriamente para os produtos formados (Sandler, 1999). Diante disso, com o objetivo de verificar os resultados obtidos experimentalmente, utilizou-se o conceito de grau de redução no balanço de elétrons macromolecular dentro do biorreator, conforme Equação 25. O grau de redução, γ , para compostos orgânicos é definido como o número de elétrons livres por átomos de carbono na molécula (Shuler, 1992).

Os resultados obtidos mostraram que, na 1ª fermentação a igualdade estabelecida pela Equação 25 foi de 1,57, e na 2ª fermentação foi de 1,20, indicando que há mais elétrons nos produtos do que os fornecidos pelo substrato. Estes valores evidenciam que a fonte de carbono secundário influenciou nos resultados obtidos para os valores de conversão.

Para corrigir os valores obtidos dos fatores de conversão foi utilizada uma relação que leva em conta o excesso de elétrons nos produtos que vêm de outra fonte de carbono que não a sacarose (Equação 26).

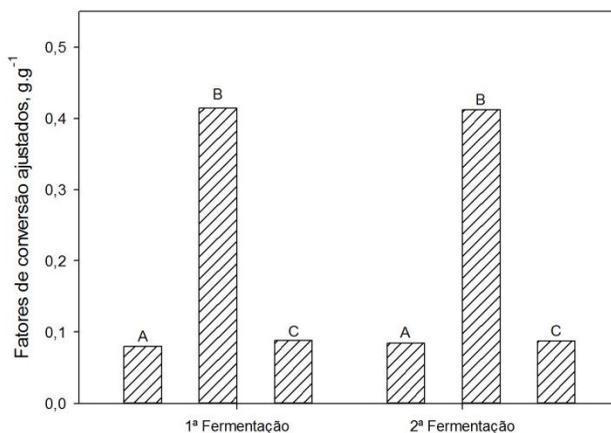
$$Y^* = Y^{EXP} \cdot \frac{1}{1 + f_{ep}} \quad (26)$$

Onde, Y^* é o fator de conversão ajustado, Y^{EXP} é o obtido experimentalmente e f_{ep} é a fração de elétrons em excesso nos produtos. Os resultados são apresentados na Tabela 6 e Figura 16.

Tabela 6 – Fatores de conversão em células, em etanol e em glicerol, valores ajustados. $Y_{X/S}^*$ expresso em $\text{g célula g substrato}^{-1}$; $Y_{P/S}^*$ expresso em $\text{g etanol g substrato}^{-1}$; $Y_{G/S}^*$ expresso em $\text{g glicerol g substrato}^{-1}$.

CAT-1	$Y_{X/S}^*$	$Y_{P/S}^*$	$Y_{G/S}^*$
1ª Fermentação	0,078	0,414	0,088
2ª Fermentação	0,084	0,412	0,087

Figura 16 – Fatores de conversão em células, em etanol e em glicerol para linhagem CAT-1, valores ajustados. A – $Y_{X/S}^*$ expresso em $\text{g célula g substrato}^{-1}$; B – $Y_{P/S}^*$ expresso em $\text{g etanol g substrato}^{-1}$; C – $Y_{G/S}^*$ expresso em $\text{g glicerol g substrato}^{-1}$.



A partir da Figura 16, observa-se que os fatores de conversão ajustados da 1ª fermentação e 2ª são muito próximos caracterizando uma boa reprodutibilidade dos experimentos. A reprodutibilidade também é esperada em ambiente industrial, visto que na indústria é utilizado o reciclo de células e é desejável que uma levedura industrial mantenha suas características fermentativas e viabilidade celular ao longo de uma safra inteira, mantendo regularidade na renovação da população de células e na produção de etanol.

4.2.3 Desempenho fermentativo das leveduras modificadas geneticamente

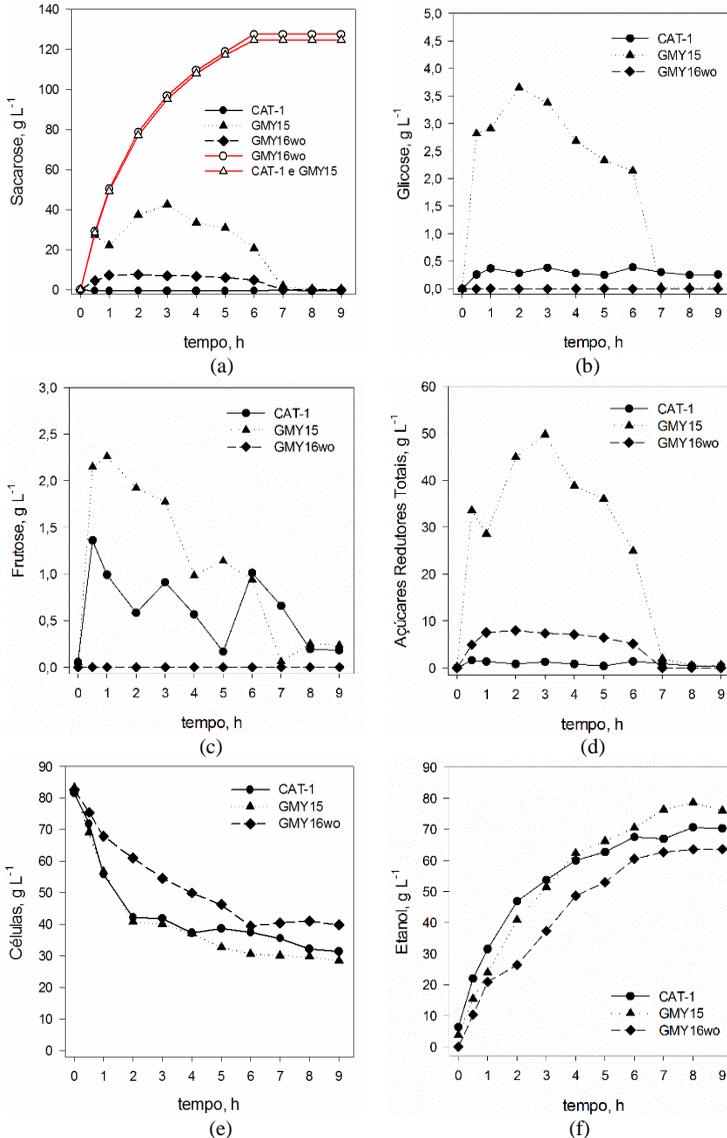
Os resultados dos ensaios fermentativos realizados em modo batelada alimentada com a CAT-1, GMY15 e GMY16wo estão na Figura 17. A análise comparativa foi feita utilizando os resultados referentes ao 2º ciclo fermentativo de cada linhagem. O 2º ciclo é mais representativo, uma vez que na usina, as células são reutilizadas. Como pode ser observado para a CAT-1, item 4.2.2, houve uma discreta mudança entre o 1º e o 2º ciclo de fermentação. No entanto, para as linhagens geneticamente modificadas, o desempenho fermentativo foi melhor no 2º ciclo. Isto indica que possivelmente as linhagens passaram por algum processo de adaptação às condições utilizadas.

Na Figura 17 (a) (linha vermelha), é apresentado o perfil de concentração de sacarose alimentada ao longo do tempo de enchimento do biorreator. Ainda nesta figura, pode-se observar a influência da atividade de transporte de sacarose para cada linhagem. Conforme apresentado na Tabela 1, as linhagens GMY15 e a GMY16wo apresentam atividade de transporte de 3,1 e 7,3 $\text{nmol mg}^{-1} \text{min}^{-1}$, respectivamente. A atividade de transporte da GMY16wo é 2,3 vezes a atividade de transporte da GMY15. A GMY15, por apresentar uma atividade transporte menor, apresentou um maior acúmulo de sacarose no meio, conforme mostrado na Figura 17 (a). A GMY15 apresenta uma atividade transporte menor, mas possui uma atividade invertase intracelular elevada, podendo levar a um excesso de glicose e frutose dentro da célula, e estes serem transportados para fora da célula, via transportadores *HXT*, conforme apresentado na Figura 17 (b) e (c), contrariando o objetivo deste trabalho. Os valores para glicose e frutose obtidos com a GMY15 chegaram a ser superiores aos valores obtidos com a levedura padrão, CAT-1. Enquanto que na levedura padrão, quem controla o processo é alguma etapa da via glicolítica, já que a hidrólise extracelular da sacarose e o transporte das hexoses são bem rápidos, na levedura modificada, a etapa limitante é o transporte da sacarose para dentro da célula. Apesar do perfil diferente de consumo de ART para a levedura modificada, GMY15, e a padrão, CAT-1, as duas apresentaram um perfil semelhante para a produção de etanol com desvio maior após 6 h, como mostrado na Figura 17 (f). Este desvio deve-se à quantidade de ART (glicose e frutose) ainda presente no meio, em torno de 25 g L^{-1} , para fermentar.

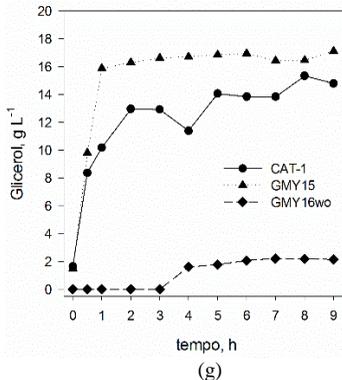
A CAT-1, por possuir atividade de invertase extracelular, apresenta glicose e frutose no meio fermentativo, como apresentado na

Figura 17 (b) e (c). Porém, nas condições testadas, foram detectadas baixas concentrações, apresentando um máximo de 0,4 e 1,4 g L⁻¹ de glicose e frutose, respectivamente. A elevada densidade celular no meio fermentativo hidrolisa rapidamente a sacarose que vai sendo alimentada. Destes açúcares redutores presentes no meio fermentativo, observou-se maior quantidade de frutose em relação à glicose. Fato este, ligado à afinidade dos transportadores pelos açúcares, conforme descrito no item 2.3.1. Por outro lado, esperava-se que no meio fermentativo com as linhagens modificadas, não fossem detectadas glicose e frutose, o que não ocorreu com a GMY15, como apresentado na Figura 17 (b) e (c). Este fato pode estar relacionado com a alta atividade de invertase intracelular apresentada pela GMY15, que é 3,8 vezes da GMY16wo. Esta por sua vez, apresentou um discreto acúmulo de sacarose (Figura 17 (a)), sem presença de glicose e frutose no meio e muito pouco glicerol, em torno de 2 g L⁻¹, contra os valores em torno de 15 g L⁻¹ apresentados com a GMY15 e CAT-1.

Figura 17 – Perfil fermentativo das linhagens GMY15, GMY16wo e CAT-1 em batelada alimentada. (a) Concentração de sacarose; (b) Concentração de glicose; (c) Concentração de frutose; (d) Concentração de ART; (e) Concentração de células; (f) Concentração de etanol; (g) Concentração de glicerol.



Continuação da Figura 17.



A presença de alta atividade de invertase intracelular faz com que a sacarose seja transportada para o interior da célula, onde é rapidamente hidrolisada, e seus produtos de hidrólise entram na via glicolítica. Porém, esta velocidade de hidrólise intracelular deve ser de forma que atenda o fluxo necessário da via glicolítica, ou seja, que atenda à atividade das hexoquinases disponíveis para a fosforilação da glicose e frutose. A GMY16wo parece atender à esta condição, pois não sobra glicose e frutose para ir para o meio extracelular, e ainda apresenta uma outra vantagem, produz pouco glicerol, bem menos que a GMY15 e CAT-1. Caso contrário, as moléculas de glicose e frutose livres no citoplasma celular poderiam ser transportadas, de forma facilitada, para o meio extracelular e detectados no meio fermentativo. Na Figura 17 (b) e (c) é possível observar, que para a linhagem GMY15 a presença de glicose em relação à frutose (máximo de 3,7 e 2,3 g L⁻¹ de glicose de frutose, respectivamente) no meio fermentativo deve-se, novamente, a afinidade destes transportadores pelos açúcares. Nas condições testadas, este fato não é observado para GMY16wo, pois, esta não apresenta presença de glicose nem frutose no meio. Isto indica que para ter glicose e frutose no meio fermentativo, com a levedura modificada geneticamente, é necessário que a hidrólise da sacarose ocorra intracelularmente para depois ser transportada para o meio extracelular. Contudo, verifica-se também que a presença de glicose e frutose no meio não depende somente das características fenotípicas da levedura, depende também das condições operacionais e fermentativas, tais como temperatura, concentração de sacarose no mosto, concentração celular no pé-de-cuba e vazão de alimentação, pois com a CAT-1, que apresenta

invertase extracelular, foram detectadas baixas concentrações de glicose e frutose no meio.

Com relação ao etanol formado, pode-se observar que a linhagem GMY15 foi capaz de produzir mais etanol (aproximadamente $72,3 \text{ g L}^{-1}$) do que a GMY16wo ($63,4 \text{ g L}^{-1}$) e a CAT-1 ($70,3 \text{ g L}^{-1}$) como mostrado na Figura 17 (f). Entre os produtos formados, pode-se destacar a baixa concentração de glicerol detectada para a linhagem GMY16wo, conforme mostrado na Figura 17 (g), em relação as outras linhagens (máximo de $15,3$ e $17,1 \text{ g L}^{-1}$ para CAT-1 e GMY15, respectivamente). A presença de glicerol no meio, para CAT-1 e GMY15, pode estar relacionada ao estresse osmótico gerado pela presença de glicose e frutose, no meio fermentativo.

4.2.3.1 Avaliação dos fatores de conversão e rendimento obtidos

A massa de etanol, de glicerol e de células obtidas em função do tempo de fermentação, sem influência da diluição durante a fase de alimentação, que foi até a 6^a hora, para as linhagens GMY15, GMY16wo e a padrão CAT-1 estão apresentadas na Figura 18.

As velocidades de formação de produtos foram obtidas através das curvas apresentadas na Figura 18. Observa-se que a formação dos produtos apresenta certa linearidade, no período compreendido entre 2 h e 6 h, tempo em que cessou a alimentação de sacarose. Após este período, até a 9^a h, a quantidade de produtos permaneceu praticamente constante, não apresentando grandes variações. No período compreendido entre 2 e 6 h o consumo de substrato também apresentou-se constante (Figura 17 (d)) e foi determinado pela média dos valores obtidos com a Equação 20. Para determinar as velocidade de formação de produtos utilizou-se um ajuste de regressão linear para os dados apresentados na Figura 18, no período entre 2 e 6 h, obtendo-se, assim, os coeficientes angulares, conforme mostrado na Tabela 7. Conhecendo as velocidades de formação e consumo dos componentes dentro do biorreator foram determinados os fatores de conversão experimental em células, em etanol e em glicerol produzidos em relação ao substrato consumido, como apresentado na Figura 19.

Figura 18 – Massa de células, de etanol e de glicerol no meio fermentativo para as linhagens GMY15, GMY16wo e CAT-1 em modo batelada alimentada. (a) Perfil de mássico de células. (b) Perfil de mássico de etanol. (c) Perfil de mássico de glicerol.

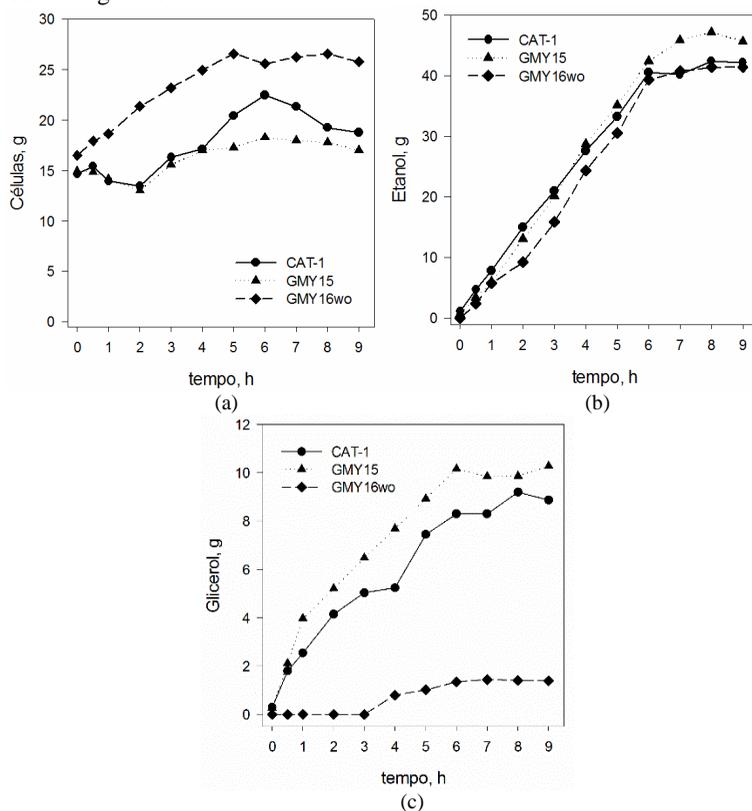
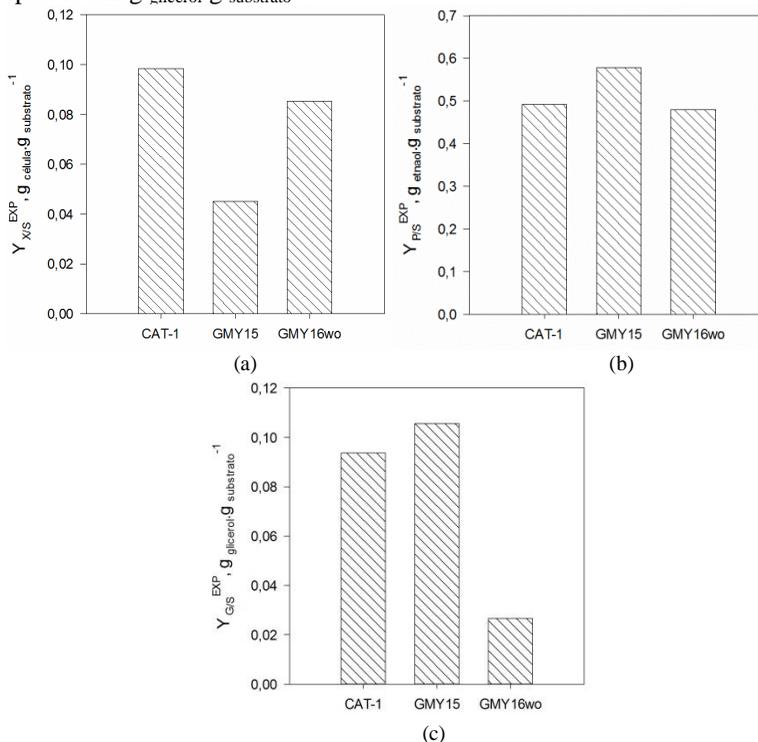


Tabela 7 – Velocidade de formação de produtos e consumo de substrato no, período entre 2 e 6 h.

Linagem		Velocidade, g h ⁻¹	R ²
CAT-1	Biomassa	1,295	0,785
	Etanol	6,483	0,999
	Glicerol	1,235	0,967
	ART	13,208	-
GMY15	Biomassa	0,665	0,681
	Etanol	6,771	0,989
	Glicerol	1,235	1
	ART	11,694	-
GMY16wo	Biomassa	1,189	0,816
	Etanol	6,695	0,980
	Glicerol	0,371	0,926
	ART	13,934	-

De acordo com o balanço energético final de ATP, as linhagens modificadas deveriam apresentar um valor correspondente a 75 % do total de células da linhagem padrão, para uma mesma quantidade de substrato. Na Figura 19 (a) observa-se que a GMY15 apresentou um valor correspondente a 46 % da CAT-1, bem abaixo do esperado, e a GMY16wo apresentou 88 % do total de células da linhagem padrão. Para o fator de conversão de substrato em etanol, não se esperava grandes alterações, como mostrado na Figura 19 (b). Porém, para a linhagem GMY15 houve um considerável aumento na conversão de substrato a etanol superando até o valor teórico máximo de $0,511 \text{ g}_{\text{etanol}} \text{ g}_{\text{substrato}}^{-1}$. Na Figura 19 (c) observou-se uma baixa formação de glicerol pela linhagem GMY16wo, contudo esta baixa conversão em glicerol não foi direcionada para o aumento na conversão a etanol. As linhagens CAT-1 e GMY15 não apresentaram grande variação entre si na produção de glicerol, porém, foram consideradas altas com relação a GMY16wo. De fato, a formação de glicerol, o mais abundante dos compostos orgânicos secundários da fermentação, está acoplada à manutenção do equilíbrio redox celular, o qual é alterado pela formação de ácidos orgânicos, biomassa e da presença de sulfito no mosto (van Dijken e Scheffers, 1986). A formação de glicerol também está relacionada a uma resposta ao estresse osmótico, quando há concentrações elevadas de açúcares ou de sais no mosto (LIMA *et al*, 2001).

Figura 19 – Fatores de conversão em células, em etanol e em glicerol para as linhagens GMY15, GMY16wo e CAT-1, valores experimentais. (a) $Y_{X/S}$ expresso em $\text{g célula g substrato}^{-1}$; (b) $Y_{P/S}$ expresso em $\text{g etanol g substrato}^{-1}$; (c) $Y_{G/S}$ expresso em $\text{g glicerol g substrato}^{-1}$.



Diante disso, da mesma forma como apresentado no item 4.2.2, utilizou-se o conceito de grau de redução no balanço de elétrons macromolecular dos componentes presentes dentro do biorreator, conforme Equação 25. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 8.

Tabela 8 – Balanço de elétrons de ART disponíveis para formação de produtos.

	CAT-1	GMY15	GMY16wo
1 =	1,20	1,31	1,09

Conforme apresentado na Tabela 8, há utilização de mais carbono no lado dos produtos que no lado do substrato, disponíveis unicamente

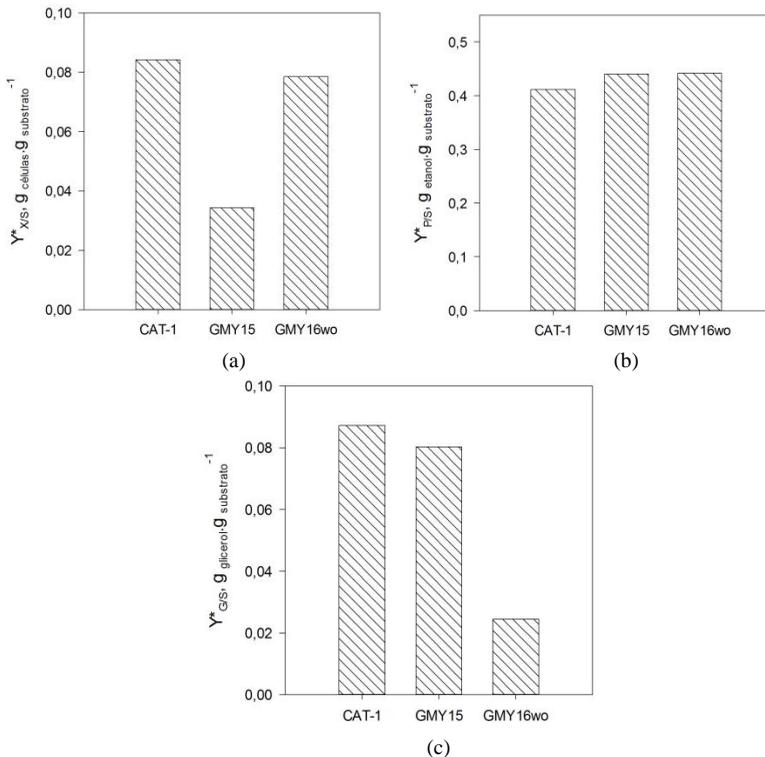
pelo ART presente no meio. Estes valores evidenciam que outras fontes de carbono, fonte secundária, foram utilizadas pelas células. Outra observação a ser feita é a proporção de utilização da fonte secundária de carbono pelas diferentes linhagens. A linhagem CAT-1 utilizou 20 %, a GMY15, 31 % e a GMY16wo, 9 % da fonte secundária. Desta forma, a comparação de um novo fator de conversão para as linhagens considerando a utilização desta fonte secundária de carbono se faz necessária.

Os resultados dos ajustes são apresentados na Figura 20 e Tabela 9, onde se observa que uma baixa produção de células pela GMY15 ganha destaque, apresentando um valor abaixo do esperado, juntamente com a baixa produção de glicerol pela GMY16wo. Com relação à produção de etanol, os valores ajustados estão próximos entre as leveduras, devendo-se considerar que erros experimentais podem estar embutidos nos resultados. Sendo, assim, os rendimento obtidos foram de 80,6 % para a CAT-1, 86,1 % para a GMY15 e 86,5 % para a GMY16wo. Pode-se observar através destes experimentos que na prática, a conversão máxima não é atingida, sendo conversão máxima cerca de 90-95 % devido à utilização do açúcar a outros produtos do metabolismo.

Tabela 9 – Fatores de conversão em células, em etanol e em glicerol para GMY15, GMY16wo e CAT-1, valores ajustados. $Y_{X/S}^*$ expresso em $\frac{\text{g célula}}{\text{g substrato}}^{-1}$; $Y_{P/S}^*$ expresso em $\frac{\text{g etanol}}{\text{g substrato}}^{-1}$; $Y_{G/S}^*$ expresso em $\frac{\text{g glicerol}}{\text{g substrato}}^{-1}$.

Linhagem	$Y_{X/S}^*$	$Y_{P/S}^*$	$Y_{G/S}^*$
CAT-1	0,084	0,412	0,087
GMY15	0,034	0,440	0,080
GMY16wo	0,078	0,442	0,025

Figura 20 – Fatores de conversão em células, etanol e glicerol para as linhagens GMY15, GMY16wo e CAT-1, valores ajustados. A – $Y_{X/S}^*$ expresso em $\text{g células g substrato}^{-1}$; B – $Y_{P/S}^*$ expresso em $\text{g etanol g substrato}^{-1}$; C – $Y_{G/S}^*$ expresso em $\text{g glicerol g substrato}^{-1}$.



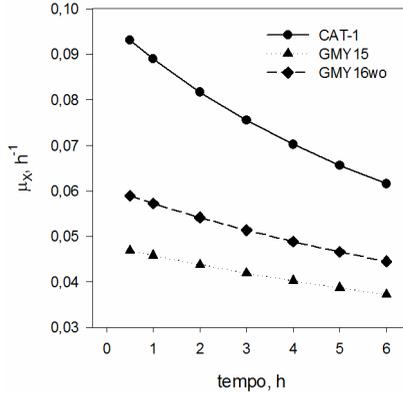
4.2.3.2 Velocidade específica de crescimento celular (μ_x)

Através da Figura 21, observa-se que, nas condições testadas, a velocidade específica de crescimento celular (μ_x), determinada pela Equação 14, para todas as linhagens é limitada pelo substrato, pois μ_x diminui ao longo do tempo.

Este comportamento apresentado por todas as linhagens sugere que as condições devem ser otimizadas, a fim de obter uma maior produção de etanol. Deve-se, portanto, estudar estratégias de alimentação de substrato a fim de manter a velocidade específica constante. No entanto, observa-se que estratégias diferentes devem ser

adotadas para cada linhagem visto que o comportamento da CAT-1 é diferente das linhagens modificadas geneticamente, GMY15 e GMY16wo.

Figura 21 – Velocidade específica de crescimento celular, durante a alimentação do fermentador.



5 CONCLUSÕES

No presente trabalho foram apresentados ensaios fermentativos em frasco agitado (batelada) e batelada alimentada, em condições similares às condições utilizadas na usina, com linhagens modificadas geneticamente por Müller (2013). As modificações genéticas conferiram as leveduras a ausência de atividade de invertase extracelular, presença de atividade de invertase intracelular e a alta atividade de transporte ativo de sacarose, sendo que, a GMY15 adquiriu atividade invertase intracelular 3,8 vezes maior que a GMY16wo e uma atividade transporte 2,3 vezes menor que a GMY16wo.

Os resultados apresentados pelas linhagens modificadas geneticamente, GMY15 e GMY16wo, mostraram que é possível captar a sacarose diretamente para o interior da célula, sem hidrólise extracelular. Esta estratégia da direta captação de sacarose para o interior da célula é vantajosa, com relação à presença de glicose e frutose no meio fermentativo, pois foram observadas baixas concentrações destes açúcares redutores.

Os desempenhos fermentativos, em batelada alimentada, das linhagens modificadas geneticamente, mostraram-se bastante interessantes, pois elas foram capazes de metabolizar a sacarose em etanol apresentando rendimentos iguais 80,6, 86,1 e 86,5 % para CAT-1, GMY15 e GMY16wo, respectivamente. As linhagens modificadas apresentaram, ainda, menor produção de glicerol quando comparados com a CAT-1. Este resultado confere outra vantagem da linhagem modificada em relação à linhagem padrão. Não é desejável a produção de glicerol em fermentações alcólicas, pois ele é considerado um osmorregulador e protetor da célula.

Os resultados apresentados mostraram também uma menor produção de células para as linhagens modificadas geneticamente, em torno de 60 % menor para a GMY15 e 7 % para a GMY16wo, confirmando que a nova forma de captação de sacarose que envolve o gasto energético de molécula de ATP.

Pelos valores dos fatores de conversão ajustados, $Y_{P/S}^*$, das duas linhagens modificadas geneticamente testadas neste trabalho, de 0,440 para a GMY15 e 0,442 GMY16wo, e pela ausência de glicose e frutose no meio fermentativo pode-se concluir que a GMY16wo, levedura que tem a atividade de transporte mais elevada e a atividade invertase intracelular menor, adequou-se melhor às condições estudadas. Esta levedura não apresentou glicose e frutose no meio fermentativo e produziu pouco glicerol.

Para que não ocorra o transporte dos açúcares redutores para o meio extracelular, a sacarose deve ser transportada e hidrolisada com uma velocidade que atenda o fluxo de ART na via glicolítica. A GMY16wo apresentou estas características. A alta expressão de atividade de invertase intracelular, como na linhagem GMY15, mostrou que dependendo das condições operacionais utilizadas, esta linhagem pode se comportar como a linhagem padrão, CAT-1, em relação à presença de glicose e frutose no meio fermentativo.

Nas condições testadas, com a linhagem GMY16wo a concentração de açúcar redutor total (glicose e frutose), no meio fermentativo não causaram inibição. Quanto à inibição pelo produto, o etanol, a concentração deste também encontra-se abaixo da concentração que normalmente é considerada de inibição para uma levedura não modificada, em torno de 80 g L^{-1} (Dorta *et al.*,2006).

Diante do exposto, as linhagens modificadas geneticamente mostraram que é possível operar com baixas concentrações de sacarose, glicose e frutose no meio fermentativo, em modo batelada alimentada, produzindo a mesma quantidade de etanol que a padrão CAT-1, podendo até alcançar rendimentos superiores. A grande vantagem da utilização destas linhagens modificadas geneticamente é o menor estresse osmótico apresentado devido às baixas concentrações ou mesmo a ausência de glicose e frutose no meio, gerando assim, a possibilidade da diminuição de contaminação durante o processo fermentativo.

5.1 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- ✓ Realizar ensaios fermentativos utilizando meio de cultura sintético e determinar os parâmetros cinéticos e de processo das linhagens modificadas geneticamente e da linhagem padrão.
- ✓ Realizar ensaios fermentativos, em modo batelada alimentada, utilizando caldo e/ou mosto empregados pela usina no processo industrial a fim de expor as linhagens modificadas geneticamente às limitações das condições industriais.
- ✓ Realizar ensaios fermentativos sequenciais, em modo batelada alimentada, com reutilização das linhagens modificadas geneticamente e avaliar a viabilidade celular ao longo dos ciclos fermentativos.

- ✓ Fazer um estudo da influência da temperatura na atividade de transporte da sacarose nas linhagens modificadas geneticamente.
- ✓ Fazer o estudo de um modelo cinético que represente o modo de captação e metabolização dos açúcares da levedura geneticamente modificada.

REFERÊNCIAS

ALBERTS, B. **Biologia molecular da célula**. Porto Alegre: Artes Médicas, 4. ed., 2004.

AMORIM, H. V.; LOPES, M. L.; DE CASTRO OLIVEIRA, J. V.; BUCKERIDGE, M. S.; GOLDMAN, G. H. **Scientific challenges of bioethanol production in Brazil**. Applied Microbiology and Biotechnology, v. 91, p. 1267, 2011.

ANDRIETTA, M^a. G. S.; ANDRIETTA, S. R. e STUPIELLO, E. N. A. **Bioethanol – What Has Brazil Learned About Yeasts Inhabiting the Ethanol Production Processes from Sugar Cane?** Biofuel Production-Recent Developments and Prospects. Dr. Marco Aurelio Dos Santos Bernardes (Ed.), InTech, 2011.

ATALA, D. I. P.; COSTA, A. C.; MACIEL, R. e MAUGERI F. **Kinetics of ethanol fermentation with high biomass concentration considering the effect of temperature**. Applied Biochemistry and Biotechnology, v. 91–93, 2001.

BARCLAY, T.; GINIC-MARKOVIC, M.; JOHNSTON, M. R.; COOPER, P.; PETROVSKY, N. **Observation of the keto tautomer of D-fructose in D2O using ¹H NMR spectroscopy**. Carbohydrate Research, v.347, p. 136–141, 2012.

BARNETT, J. A. **Review: A history of research on yeasts 13. Active transport and the uptake of various metabolites**. Yeast. v. 25, p. 689–731, 2008.

BASSO, L. C.; AMORIM, H. V.; OLIVEIRA, A. J.; LOPES, M. L. **Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil**. FEMS Yeast Research, v. 8, p.1155–1163, 2008.

BASSO, T. O.; DE KOK, S.; DÁRIO, M. G.; DO ESPIRITO-SANTO, J.C.A.; MÜLLER, G.; SCHLÖLG, P. S.; SILVA, C. P.; TONSO, A.; DARAN, J. M.; GOMBERT, A. K.; VAN MARIS, A. J. A.; PRONK, J. T. e STAMBUK, B. U. **Engineering topology and kinetics of sucrose metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* for improved ethanol yield**. Metabolic Engineering, v. 13, p. 694-703, 2011.

BATISTA, A. S.; MILETTI, L. C.; STAMBUK, B. U. **Sucrose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* lacking hexose transport**. Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology, v.8, p.26-33, 2004.

BEN, 2012. Empresa de Pesquisa Energética. **Balço Energético Nacional 2012 – Ano base 2011: Resultados Preliminares**. Rio de Janeiro: EPE, 2012.

BNDES e CGEE. **Bioetanol de cana-de-açúcar : energia para o desenvolvimento sustentável/** organização BNDES e CGEE. – Rio de Janeiro : BNDES, 2008.

BOLES, E. e HOLLENBERG, C. P. **The molecular genetics of hexose transport in yeasts**. FEMS Microbiology Reviews, v. 21, p. 85-111, 1997.

BROACH, J. R.; ZAMAN, S.; IM LIPPMAN, S.; ZHAO, X. **How *Saccharomyces* Responds to Nutrients**. Annual Review of Genetics, v. 42, p. 27-81, 2008.

CARLSON, M.; TAUSSIG, R. **Nucleotide sequence of the yeast SUC2 gene for invertase**. Nucleic Acids Research, v. 11, p. 1943–1954, 1983.

CARLSON, M.; VALLIER, L. G. **New SNF Genes, GAL11 and GRR1 Affect SUC2 Expression in *Saccharomyces cerevisiae***. Genetics Society of America, v. 159, p. 675-684, 1991.

CIRILLO, V. P. **Sugar transport in microorganisms**. Annual Review of Microbiology, v. 15, p. 197-218, 1961.

DÁRIO, M. G. **Análise molecular do metabolismo de sacarose por linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* utilizadas na produção industrial de álcool combustível**. Dissertação de mestrado, UFSC, 2007.

DÁRIO, M. G. **Efeito da alteração na captação de sacarose ao metabolismo de *Saccharomyces cerevisiae***. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 2012.

DE LA FUENTE, G.; SOLS, A. **Transport of sugars in yeasts II. Mechanisms of utilization of disaccharides and related glycosides.** *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 56, p. 49–62, 1962.

DORTA, C.; Oliva-Neto, P.; de Abreu-Neto, M. S.; Nicolau-Junior, N.; Nagashima, A. I. **Synergism among lactic acid, sulfite, pH and ethanol in alcoholic fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* (PE-2 and M-26).** *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, v. 22, p. 177–182, 2006.

FLOOD, A. E.; JOHNS, M. R.; WHITE, E. T. **Mutarotation of D-fructose in aqueous-ethanolic solutions and its influence on crystallization.** *Carbohydrate Research*, v. 288, p. 45-56, 1996.

LAGUNAS, R. **Misconceptions about the energy metabolism of *Saccharomyces cerevisiae*.** *Yeast*. v.2, p.221-228, 1986.

LAGUNAS, R. **Sugar transport in *Saccharomyces cerevisiae*.** *FEMS Microbiology Reviews*. 104, p. 229-242, 1993.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger principles of biochemistry.** 3rd. ed. New York: Worth Publishers, 2000.

LIMA, U. A.; BORZANI, W.r; SCHMIDELL, W.; AQUARONE, E. **Biotechnologia industrial: Processos fermentativos e enzimáticos.** São Paulo (SP): Edgard Blucher, v. 3, 2001.

LUDWIG, K. M.; OLIVA-NETO, P. e ANGELIS, D. F. de. **Quantificação da floculação de *Saccharomyces cerevisiae* por bactérias contaminantes da fermentação alcoólica.** *Ciência e Tecnologia de Alimentos* [online], v. 21, n.1, pp. 63-66, 2001.

MAGAZONI, F. C.; MONTEIRO, J. B.; COLLE, S.; CARDEMIL, J. M. **Cooling of ethanol fermentation process using absorption chillers.** *International Journal of Applied Thermodynamics*, v. 13, p. 111-118, 2010.

MALZONI, I. **O Brasil é o país do presente.** Nova Escola: Meio Ambiente. 2012. Disponível em:

<<http://revistaescola.abril.com.br/geografia/pratica-pedagogica/energia-brasil-pais-presente-matriz-energetica-586688.shtml?page=1>>. Acesso em 12 mai. 2013.

MÜLLER, G. **Engenharia genômica de linhagem industrial de *Saccharomyces cerevisiae* visando melhorar a fermentação de sacarose para a produção de álcool combustível no Brasil**. Tese de Doutorado, UFSC, 2013.

MWESIGYE, P. K.; BARFORD, J. P. **Mechanism of sucrose utilization by *Saccharomyces cerevisiae***. Journal of General and Applied Microbiology, v. 42, p. 209-306, 1996.

OZCAN, S.; JOHNSTON, M. **Function and regulation of yeast hexose transporters**. Microbiology and Molecular Biology Reviews, v. 63, p. 554–569, 1999.

PACHECO, T. F. **Produção de Etanol: Primeira ou Segunda Geração?** Circular Técnica 04, Brasília: EMBRAPA, 2011.

PEREIRA, Jr., N. BOM, E. P. S., FERRARA, M. A. **Tecnologia de bioprocessos**. Rio de Janeiro: Escola de Química/UFRJ, v.1, 2008.

PEREIRA, F. B.; GUIMARÃES, P. M. R.; TEIXEIRA, J. A. e DOMINGUES L. **Robust industrial *Saccharomyces cerevisiae* strains for very high gravity bio-ethanol fermentations**. Journal of Bioscience and Bioengineering, v. 112, n. 2, 130–136, 2011.

PORTAL BRASIL. **Biocombustíveis**. Disponível em: <<http://www.brasil.gov.br/cop/panorama/o-que-o-brasil-esta-fazendo/biocombustiveis>>. Acesso em: 12 mai. 2013.

_____. **Matriz energética**. Disponível em: <<http://www.brasil.gov.br/cop/panorama/o-que-o-brasil-esta-fazendo/matriz-energetica>>. Acesso em: 12 mai. 2013.

REIFENBERGER, E.; FREIDEL, K.; CIRIACY, M. **Identification of novel *HXT* genes in *Saccharomyces cerevisiae* reveals the impact of individual hexose transporters on glycolytic flux**. Molecular Microbiology, v. 16, p. 157-167, 1995.

RODICIO, R.; HEINISCH, J. J. **Sugar Metabolism by *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* Yeasts**. Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine. Chapter 6, 2009.

SANDLER, Stanley I. **Chemical, biochemical, and engineering thermodynamics**. 4th ed. New York: J. Wiley, 2006.

SCHMIDELL, W.; BORZANI, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E. **Biotecnologia industrial: Engenharia bioquímica**. São Paulo (SP): Edgard Blucher, v. 2, 2001.

SEGURA, M. L. **A evolução da matriz energética brasileira: O papel dos biocombustíveis e outras fontes alternativas**. Âmbito Jurídico, 2012. Disponível em: <http://www.ambito-juridico.com.br/site/index.php?n_link=revista_artigos_leitura&artigo_id=11039> Acesso em: 13 mai. 2013.

SHERMAN, F. **Getting started with yeast**. Methods in Enzymology, v. 350, p. 3-41, 2002.

SHULER, M. L.; KARGI F. **Bioprocess engineering: basic concepts**. Upper Saddle River: Prentice Hall PTR, 1992.

STAMBUK, B. U.; DE ARAUJO, P. S.; PANEK, A. D.; SERRANO, R. **Kinetics and Energetics of Trehalose Transport in *Saccharomyces cerevisiae***. European Journal of Biochemistry, v. 237, n. 3, p. 876-881, 1996.

STAMBUK, B. U.; DA SILVA, M. A.; PANEK, A. D.; DE ARAUJO, P. S. **Active *a*-glucoside transport in *Saccharomyces cerevisiae***. FEMS Microbiology Letters, v. 170, p. 105-110, 1999.

STAMBUK, B. U.; BATISTA, A. S.; DE ARAUJO, P. S. **Kinetics of Active Sucrose Transport in *Saccharomyces cerevisiae***. Journal of Bioscience and Bioengineering. v. 89, no. 2, p. 212-214, 2000.

STAMBUK, B. U., DUNN, B., ALVES JR. S. L., DUVAL, E. H., SHERLOCK, G. **Industrial fuel ethanol yeasts contain adaptive copy number changes in genes involved in vitamin B1 and B6 biosynthesis**. Genome Research, v. 19, p. 2271, 2009.

UNICA – União da Indústria de Cana-de-Açúcar. **Brasil poderá quase dobrar exportações de etanol para o Japão**, 2011.

VAN DIJKEN, J. P.; SCHEFFERS, W. A. **Redox balances in the metabolism of sugars by yeasts**. FEMS Microbiology Reviews, v. 32, p. 199-224, 1986.

VOGEL, A. I.; MENDHAM, J. **Análise química quantitativa**. Rio de Janeiro: LTC, 6 ed., 2002.

VOLPE, P. L. O. **Estudo da fermentação alcoólica de soluções diluídas de diferentes açúcares utilizando microcalorimetria de fluxo**. Química Nova. v. 20, no. 5, p. 528-534, 1996.

VON STOCKAR U.; LIU J. **Does microbial life always feed on negative entropy? Thermodynamic analysis of microbial growth**. Biochimica et Biophysica Acta, v. 3, p. 1412, 1999.

WEUSTHUIS, R. A.; ADAMS, H.; SCHEFFERS, W. A.; van DIJKEN, J. P. **Energetics and kinetics of maltose transport in *Saccharomyces cerevisiae*: a continuous culture study**. Applied and environmental microbiology, v. 59, p. 3102-3109, 1993.

WEUSTHUIS, R. A.; PRONK, J. T.; VAN DEN BROEK, P. J. A., VAN DIJKEN, J. P. **Chemostat cultivation as a tool for studies on sugar transport in yeasts**. Microbiological Reviews, v. 58, p. 616-630, 1994.

ANEXO A – Cromatograma (CLAE)

Figura 1 - Cromatograma com a identificação dos picos dos componentes.

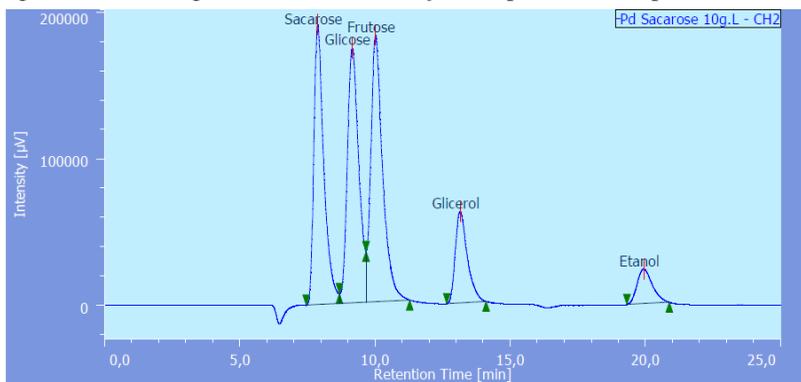


Figura 2 - Cromatograma com os padrões da curva de calibração.

