UNESP – Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"
Instituto de Química de Araraquara

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

HELOISY SUZES BARBOSA

FERMENTAÇÃO DE MOSTO COM ALTO TEOR DE SACAROSE PARA A PRODUÇÃO DE BIOETANOL COMBUSTÍVEL POR DIFERENTES LINHAGENS DE *Saccharomyces cerevisiae* USANDO ALTA DENSIDADE CELULAR

ARARAQUARA
2013

Heloisy Suzes Barbosa

Fermentação de mosto com alto teor de sacarose para a produção de Bioetanol combustível por diferentes linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* usando alta densidade celular.

Dissertação apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. José Roberto Ernandes

Araraquara
2013

FICHA CATALOGRÁFICA

Barbosa, Heloisy Suzes
B238f Fermentação de mosto com alto teor de sacarose para a produção de bioetanol combustível por diferentes linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* usando alta densidade celular / Heloisy Suzes Barbosa. – Araraquara : [s.n], 2013
91 f. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química
Orientador: José Roberto Ernandes

1. Biotecnologia. 2. *Saccharomyces cerevisiae*.
3. Fermentação alcoólica. 4. Trealose. I. Título.

Elaboração: Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação do Instituto de Química de Araraquara
Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação

HELOISY SUZES BARBOSA

Dissertação apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestra em Biotecnologia.

Araraquara, 09 de dezembro de 2013.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. José Roberto Ernandes (Orientador)
Instituto de Química – UNESP, Araraquara

Prof. Dr. Rubens Monti
Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP, Araraquara

Prof. Dr. João Atílio Jorge
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras - USP, Ribeirão Preto

Dados Curriculares

Heloisy Suzes Barbosa

1. Dados pessoais

Nascimento: 24 de Fevereiro de 1987
Nacionalidade: brasileira
Naturalidade: Araraquara - SP
Estado civil: solteira
Filiação: Katia Aparecida Suzes Barbosa e Geraldo Luiz Dias Barbosa

Profissão: Biotecnologista
Documento de identidade: 41.808.920-6
Cadastro de pessoa física: 366.961.758-22
Endereço: Av. Dr. Leite de Moraes, 1129. Apto. 141
CEP: 14.810-120
Araraquara-SP

Endereço profissional: Instituto de Química de Araraquara - UNESP
Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química
Rua Prof. Francisco Degni nº 55
CEP: 14800-900 - Araraquara – SP

2. Formação acadêmica

Bacharela em Biotecnologia, concluído em 2010, Universidade Federal de Alfenas – UNIFAL-MG, Alfenas-MG.

Mestra em Biotecnologia, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Instituto de Química de Araraquara, UNESP, Araraquara - SP.

3. Atividades de pesquisa

3.1. Trabalhos apresentados em congressos

Barbosa, H.S.; Silveira, E.A.; Miranda Jr. M.; Ernandes, J.R. Very high gravity sucrose fermentation by fuel-bioethanol producing yeast strains. 27° Congresso Brasileiro de Mi*crobiologia e II SIFEA – Simpósio de Fermentação Alcoólica – NATAL-RN (2013)*

Silveira, E.A.; Barbosa, H.S.; Ernandes, J.R. Biochemical characterization of industrial ethanol-producing yeast grown on different sugars and in stressing conditions. 27° Congresso Brasileiro *de Microbiologia e II SIFEA – Simpósio de Fermentação Alcoólica – NATAL-RN (2013)*

Ernandes, J.R; Barbosa, H.S. Fermentação em alta concentração de sacarose. Very high gravity fermentation. 27° Congresso Brasileiro *de Microbiologia e II SIFEA – Simpósio de Fermentação Alcoólica – NATAL-RN (2012)*

Barbosa, H.S.; Silveira, E.A.; Miranda, M.; Ernandes, J.R. Fermentação de mosto com alto teor de sacarose para a produção de bioetanol combustível por diferentes linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* usando alta densidade celular. *XXI Congresso Latino americano de Microbiologia e I SIFEA – Simpósio de Fermentação Alcoólica – SANTOS-SP (2012)*

Silveira, E.A.; Barbosa, H.S.; Ernandes, J.R. Caracterização bioquímica de leveduras industriais produtoras de etanol cultivadas em diferentes açúcares. *XXI Congresso Latino americano de Microbiologia e I SIFEA – Simpósio de Fermentação Alcoólica – SANTOS-SP (2012)*

Barbosa, H.S.; Silveira, E.A.; Ernandes, J.R. Fermentação alcoólica de mosto de caldo de cana-de-açúcar com alta concentração de sacarose (very high gravity fermentation) pelas linhagens industriais de *Saccharomyces cerevisiae*. *III Jornada de Biotecnologia – UNIFAL-MG (2012)*

3.2. Participação em congressos, simpósios e demais eventos científicos

27° CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 2013. (Congresso)

II SIFEA – Simpósio de Fermentação Alcoólica, 2013. (Simpósio)

XXI CONGRESSO LATINOAMERICANO DE MICROBIOLOGIA, 2012. (Congresso)

SIFEA - Simpósio de Fermentação Alcoólica, 2012. (Simpósio).

III JORNADA CIENTÍFICA DE BIOTECNOLOGIA - III JOBITU, 2012. (Outra).

II CICLO DE PALESTRAS – Realizado pelo Instituto Butantan, 2010. (Seminários)

FOUR BIOTEC – QUATRO DIAS PELA BIOTECNOLOGIA, 2009. (Seminários)

I JORNADA CIENTÍFICA DE BIOTECNOLOGIA DE ALFENAS – I JOBITU, 2008. (Outra)

I CICLO DE PALESTRAS EM BIOTECNOLOGIA, 2007. (Seminários)

VIII SEMANA DA BIOLOGIA, 2007. (Seminários)

3.3. Organização de eventos

Hasui, E.; Carvalho, E.J.O.; Barbosa, H.S. VIII Jornada Científica de Biologia. 2007.

Barbosa, S.; E. A.; Ariosa, M. F. C.; Marques, M. J.; Barbosa, H.S. Primeira JOBITU - Primeira Jornada Científica de Biotecnologia de Alfenas. 2008.

Aos meus pais, Geraldo e Kátia

A minha avó e a minha prima Cleyde e Rafaela

Ao meus avós Adalto, José e Lola "in memory"

E ao meu companheiro Samuel...

Obrigada pela compreensão, pelos ensinamentos, pelas oportunidades, pelo amor e respeito que tiveram comigo durante toda a minha vida.

Aprendi com vocês a ter coragem para enfrentar os desafios e alcançar todos os meus objetivos.

E por isso agradeço por me fazerem ser o que sou hoje.

Jamais teria chegado onde estou sem o apoio de vocês e sem os terem por perto.

A todos vocês dedico!

Agradecimentos

Agradeço a Deus pela força e perseverança para alcançar minhas metas.

Ao Prof. Dr. José Roberto Ernandes pela orientação e pela oportunidade de desenvolvimento profissional e também pessoal.

À Profa. Dra Maria Célia Bertolini.

Aos Professores João Atílio Jorge, Luiz Henrique Guimarães e Rubens Monti pelas valiosas sugestões e discussão durante o trabalho.

A CAPES e a FACTE pelo apoio financeiro concedido.

A UNESP pela formação profissional proporcionada.

Ao meu amigo Erick de Abreu Silveira, por quem tenho grande consideração, não somente pela ajuda na pesquisa, mas também por todos os anos de amizade e companheirismo desde os tempos da faculdade.

A todo o pessoal do laboratório, Thiago, Rodrigo, Flávia, Eliane, Stela, Susi, Ana Carolina, Fernanda Cupertino, Fernanda Zanoli, Gabi, Ana Laura, Mari, Tarcísio e Sandra.

A Mestra Vivia Betite pelo apoio na pesquisa.

Ao CEMPECQ pela ajuda na realização de parte deste trabalho. Em especial, meus sinceros agradecimentos ao Dr. Rodrigo Sequinel pela paciência e pela compreensão durante a execução dos procedimentos laboratoriais.

E a todos que contribuíram para esta conquista!

"O começo de todas as ciências é o espanto de as coisas serem o que são"

Aristóteles

Resumo

RESUMO

A produção de etanol combustível no Brasil é atualmente obtida através da fermentação de mostos de cana de açúcar que apresentam em torno de 20% de sólidos dissolvidos, levando a um rendimento alcoólico abaixo do desejado, gerando grandes volumes de vinhaça, induzindo a um grande consumo de energia na destilação. Com o interesse renovado na melhoria do processo para a obtenção de níveis mais altos de etanol e diminuição de gastos associados ao processo, novos estudos estão sendo realizados para verificar a adequação de linhagens industriais de *Saccharomyces cerevisiae* na fermentação de meios concentrados em açúcares fermentescíveis. Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo estudar o perfil fermentativo de quatro linhagens industriais brasileiras; PE-2, CAT-1, SA-1 e BG, além da Ethanol RED™, usada preferencialmente na produção de etanol a partir do milho. Neste trabalho os processos de fermentação foram conduzidos em batelada simples, a 30°C E 37°C e com rotação de 250 rpm, a concentração de sacarose no meio de fermentação variou entre 21, 30 e 35% (m/v), com ênfase às condições de Very High Gravity Fermentation Technology - Tecnologia de Fermentação de Mostos com Altos Teores de Açúcares Fermentescíveis, com ou sem suplementação com peptona e extrato de levedo, e com alta densidade celular. O perfil fermentativo foi avaliado determinando parâmetros de etanol e produção de trealose. Vinhos com teores de etanol variando de 16 a 20% (v/v) foram obtidos ao final da fermentação de mostos contendo sacarose de 30 a 35% (m/v). A completa utilização da sacarose e manutenção da viabilidade celular em experimentos com reciclo celular mostrou ser viável a aplicação da fermentação de mostos concentrados para a produção de bioetanol, pelo menos com sacarose 30%, a 30° C. A suplementação com fonte de nitrogênio pode induzir a melhoria no desempenho fermentativo das leveduras industriais. E uma das respostas ao processo fermentativo foi produção de altos níveis de trealose quando comparada com as células na fase estacionária, utilizadas na preparação do inóculo, sugerindo que as linhagens industriais tiveram habilidade para adaptarem-se ás condições de estresse fermentativo. Os resultados apresentados têm relevância industrial, principalmente os de reciclo celular, pois indicam eficiência na conversão do açúcar com altos níveis de etanol obtidos a partir da fermentação de mostos com altos teores de açúcares fermentescíveis, sugerindo a possibilidade de aplicação desta tecnologia em destilarias brasileiras, desde que se ajustem condições operacionais que minimizem os efeitos de estresse fermentativo, preservando a viabilidade e vitalidade celular.

Palavras-chave: *Saccharomyces cerevisiae.* VHGF. Fermentação Alcoólica. Trealose. Etanol.

Abstract

ABSTRACT

The production of fuel ethanol in Brazil is currently obtained by fermentation of sugar cane juices and/or molasses which have around 20% of dissolved solids leading the alcoholic yield to be smaller than that desired. Thus, large volumes of vinasse are generated, leading to high energy consumption in distillation. Taking into account the renewed interest in improving the process to obtain higher levels of ethanol, and reduce expenses associated with the process, new studies are being conducted to determine the adequacy of industrial strains of *Saccharomyces cerevisiae* in the fermentation of concentrated media with fermentable sugars. In this context the present work aims to study the fermentation characteristics of five industrial strains, four used in Brazilian industries PE-2, CAT-1, SA-1 and BG, and a Ethanol RED™, used in corn bioethanol production. The fermentation process was carried out in simple batch at 30° and 37°C with 250 rpm rotation. The sucrose concentration in the fermentation medium varied between 21 and 30% (w/v) focusing on Very High Gravity Fermentation Technology conditions - musts with high levels of fermentable sugars, with or without supplementation with peptone and yeast extract at pH 5.0; and with high cell density. The fermentation profile was assessed by determining parameters such as biomass, cell viability, consumption of carbon source, ethanol and production of used for trehalose. Wine with ethanol content ranging between 17 to 20% (v/v) was obtained at the end of the fermentation musts which had sucrose 30 to 35% (w/v). Supplementation with nitrogen source led to an improvement in the performance of industrial yeasts fermentation. High levels of trehalose were observed during the fermentation process as compared to the cells in stationary phase used as inoculum, as well as growing cells, suggesting that industrial strains have the ability to adapt to the stressing conditions of caused by high gravity fermentations. Therefore the results presented have industrial relevance, since they indicate efficiency in sugar utilization, resulting in high levels of ethanol, suggesting the possibility of using musts with high levels of fermentable sugars, however industrial operational improvements should be introduced in order to minimize the stressing conditions.

Keywords: *Saccharomyces cerevisiae.* VHGF. Fermentation. Trehalose. Ethanol.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fotomicrografia da levedura *Saacharomyces cerevisiae* 25
Figura 2 - Representação das vias de utilização de açúcares por leveduras 31
Figura 3 - Metabolismo de levedura sobre condições aeróbias e anaeróbias 33
Figura 4 - Processo de Melle-Boinot 34
Figura 5 - Produção de biomassa, consumo de açúcar e acúmulo de trealose pelas linhagens industriais em meio YPGlic2% a 30°C (A) e a 37°C (B) sob agitação de 250 rpm e pH inicial 5,0. 50
Figura 6 - Produção de biomassa, consumo de açúcar e acúmulo de trealose pelas linhagens industriais em meio YPGlic2%-Etanol10% a 30°C (A) e a 37°C (B) sob agitação de 250 rpm e pH inicial 5,0. 52
Figura 7 - Produção de biomassa, consumo de açúcar e acúmulo de trealose pelas linhagens industriais em meio YPGlic20% a 30°C (A) e a 37°C (B) sob agitação de 250 rpm e pH inicial 5,0. 55
Figura 8 - Produção de biomassa (A) consumo de açúcar e produção de etanol (B) acúmulo de trealose e viabilidade celular (C) pelas linhagens industriais na fermentação de meio a base de caldo de cana-de-açúcar contendo 30% de sacarose (m/v), a 30°C, 250 rpm e pH inicial 5,0. 58
Figura 9 - Produção de biomassa (A) consumo de açúcar e produção de etanol (B) acúmulo de trealose e viabilidade celular (C) pelas linhagens industriais na fermentação de meio a base de caldo de cana-de-açúcar contendo 30% de sacarose (m/v), a 37°C, 250 rpm e pH inicial 5,0. 60
Figura 10 - Produção de biomassa (A) viabilidade celular (B) acúmulo de trealose (C) consumo de açúcar (D) para as linhagens industriais ETHANOL RED ™, PE-2, SA-1, CAT-1 e BG durante o primeiro ciclo de fermentação em meio YPSac30%, a 30°C, 250 rpm e pH inicial 5,0. 63
Figura 11 - Produção de biomassa (A) viabilidade celular (B) acúmulo de trealose (C) consumo de açúcar (D) para as linhagens industriais ETHANOL RED™, PE-2, SA-1, CAT-1 e BG durante dez ciclos de fermentação de dez horas em meio YPSac30%, a 30°C, 250 rpm e pH inicial 5,0. 64
Figura 12 - Produção de biomassa (A) viabilidade celular (B) acúmulo de trealose (C) consumo de açúcar (D) para a linhagem CAT-1 durante o primeiro ciclo de fermentação em meio a base de caldo de cana-de-açúcar com 21% de sacarose (m/v), sem e com 2% de fonte de nitrogênio (m/v), a 30°C, 250 rpm e pH inicial 5,0. 67

Figura 13 - Produção de biomassa, viabilidade celular e consumo de açúcar (A) acúmulo de trealose (B) para a linhagem CAT-1 durante dez ciclos de seis horas em meio a base de caldo de cana-de-açúcar com 21% de sacarose (m/v), sem e com 2% de fonte de nitrogênio (m/v), a 30°C, 250 rpm e pH inicial 5. 68

Figura 14 - Produção de biomassa (A) viabilidade celular (B) acúmulo de trealose (C) consumo de açúcar (D) para a linhagem CAT-1 durante o primeiro ciclo de fermentação em meio a base de caldo de cana-de-açúcar com 30% de sacarose (m/v), sem e com 2% de fonte de nitrogênio (m/v), a 30°C, 250 rpm e pH inicial 5,0. 72

Figura 15 - Produção de biomassa (A) viabilidade celular (B) acúmulo de trealose (C) consumo de açúcar (D) para a linhagem industrial CAT-1 durante dez ciclos de fermentação de dez horas em meio a base de caldo de cana-de-açúcar com 30% de sacarose (m/v), sem e com 2% de fonte de nitrogênio (m/v), a 30°C, 250 rpm e pH inicial 5,0. 73

Figura 16 - Produção de biomassa (A) viabilidade celular (B) acúmulo de trealose (C) consumo de açúcar (D) pela linhagem CAT-1 durante o primeiro ciclo de fermentação em meio a base de caldo de cana-de-açúcar com 35% de sacarose (m/v), sem e com 2% de fonte de nitrogênio (m/v), a 30°C, 250 rpm e pH inicial 5,0. 76

Figura 17 - Produção de biomassa (A) viabilidade celular (B) acúmulo de trealose (C) consumo de açúcar (D) para a linhagem CAT-1 durante dez ciclos de fermentação de doze horas em meio a base de caldo de cana-de-açúcar com 35% de sacarose (m/v), sem e com 2% de fonte de nitrogênio (m/v), a 30°C, 250 rpm e pH inicial 5,0. 77

Figura 18 - Produção de biomassa (A) viabilidde celular (B) acúmulo de trealose (C) consumo de açúcar (D) para a linhagem CAT-1 durante o primeiro ciclo de fermentação em meio a base de caldo de cana-de-açúcar com 30% de sacarose (m/v), sem e com 2% de fonte de nitrogênio (m/v), a 37°C, 250 rpm e pH inicial 5,0. 80

Figura 19 - Produção de biomassa (A) viabilidade celular (B) acúmulo de trealose (C) consumo de açúcar (D) para a linhagem CAT-1 durante oito ciclos de fermentação de dez horas em meio a base de caldo de cana-de-açúcar com 30% de sacarose (m/v), sem e com 2% de fonte de nitrogênio (m/v), a 37°C, 250 rpm e pH inicial 5,0. 81

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Viabilidade celular das linhagens industriais em meio YPGlic2% a 30°C e a 37°C sob agitação de 250 rpm e pH inicial 5,0. 51

Tabela 2 - Viabilidade celular das linhagens industriais em meio YPGlic2%-Etanol10%a 30°C e a 37°C sob agitação de 250 rpm e pH inicial 5,0. 53

Tabela 3 - Viabilidade celular das linhagens industriais em meio YPGlic20% a 30°C e a 37°C sob agitação de 250 rpm e pH inicial 5,0. 56

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 22

1.1. A tecnologia de mostos concentrados: Very high gravity (VGH) 23

1.2. *Saccharomyces cerevisiae* 24

1.3. Nutrição das leveduras 26

1.3.1. Fonte de carbono 26

1.3.2. Fonte de nitrogênio 28

1.3.3. Composição das matérias-primas utilizadas em de fermentações industriais 29

1.4. O transporte de nutrientes 29

1.4.1. Transporte de açúcares 29

1.4.2. Transporte de fontes nitrogenadas 31

1.5. Bioquímica da fermentação etanólica 32

1.6. Os processos industriais de fermentação 33

1.6.1. Processo em batelada alimentada 33

1.6.2. Processo de Melle-Boinot 34

1.6.3. Processo contínuo 35

1.7. Metabólito indicativo de estresse na levedura - Trealose 35

2. OBJETIVOS 38

2.1. Objetivo geral 38

2.2. Objetivos específicos 38

3. MATERIAIS E MÉTODOS 40

3.1. Microrganismos utilizados 40

3.2. Manutenção da cultura 40

3.3. Preparo do inóculo 40

3.4. Meios e condições de cultivo 40

3.5. Determinação dos parâmetros fermentativos 43

3.5.1. Determinação do crescimento celular 43

3.5.2. Determinação da viabilidade celular 43

3.5.2.1. Coloração com azul de metileno 43

3.5.3. Determinação do consumo de açúcar 44

3.5.4. Determinação da produção de etanol 44

3.6. Produção de trealase semi-purificada, extração e quantificação de trealose (Neves et al., 1994). 45

3.6.1. Manutenção do fungo 45

3.6.2. Extração de trealose ácida e ensaio de atividade 45

3.6.3. Extração e quantificação de trealose 46

3.7. Reprodutibilidade 46

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO 48

4.1. Estudo do perfil de biossíntese de trealose pelas linhagens industriais PE-2, CAT-1 e ETHANOL RED™ e em diferentes condições de cultivo. 48

4.1.1. Perfil de biossíntese de trealose pelas linhagens PE-2, CAT-1 e ETHANOL RED™ em meio YPGlic2% a 30° e 37°C. 48

4.1.2. Perfil da biossíntese de trealose pelas linhagens PE-2, CAT-1 e ETHANOL RED™ em meio YPGlic2%-Etanol10% a 30° e 37°C. 51

4.1.3. Perfil fermentativo e de biossíntese de trealose pelas linhagens PE-2, CAT-1 e ETHANOL RED™ em meio YPGlic20% a 30° e 37°C. 53

4.2. Estudo do comportamento fermentativo das linhagens industriais PE-2, CAT-1 e ETHANO RED™ em mosto a base de caldo de cana-de-açúcar contendo 30% de sacarose (m/v) a 30° e 37°C. 56

4.2.1. Comportamento fermentativo das linhagens PE-2, CAT-1 e ETHANOL RED™ em mosto a base de caldo de cana-de-açúcar ajustado para concentração de 30% de sacarose (m/v) a 30°C. 56

4.2.2. Comportamento fermentativo das linhagens PE-2, CAT-1 e ETHANOL RED™ em mosto 30% a base de caldo de cana-de-açúcar ajustado para concentração de 30% de sacarose (m/v) a 37°C. 59

4.3. Estudo do perfil fermentativo das linhagens industriais de *Saccharomyces cerevisiae* durante reciclos celulares: em meio YPSac30% e em mostos a base de caldo de cana-de-açúcar ajustado com diferentes concentrações de sacarose 21, 30 e 35% (m/v) a diferentes temperaturas de cultivo 30° e 37°C. 61

4.3.1. Perfil fermentativo das linhagens ETHANOL RED™, PE-2, SA-1, CAT-1 e BG em meio YPSac30% a 30°C..... 61

4.3.2. Perfil fermentativo da linhagem CAT-1 em meio a base de mosto de caldo de cana ajustado para 21% de sacarose (m/v) sem e com suplementação nutricional de 2% de peptona (m/v) e 2% de extrato de levedo (m/v) a 30°C. 65

4.3.3 Perfil fermentativo da linhagem CAT-1 em meio a base de mosto de caldo de cana ajustado para 30% de sacarose (m/v) sem e com suplementação nutricional de 2% de peptona (m/v) e 2% de extrato de levedo (m/v) a 30°C. 69

4.3.4. Perfil fermentativo da linhagem CAT-1 em meio a base de mosto de caldo de cana ajustado para 35% de sacarose (m/v) sem e com suplementação nutricional de 2% de peptona (m/v) e 2% de extrato de levedo (m/v) a 30°C. 74

4.3.5. Perfil fermentativo da linhagem CAT-1 em meio a base de mosto de caldo de cana ajustado para 30% de sacarose (m/v) sem e com suplementação nutricional de 2% de peptona (m/v) e 2% de extrato de levedo (m/v) a 37°C. 78

5. CONCLUSÃO 83

REFERÊNCIAS 87

LISTA DE ABREVIATURAS

DNS - ácido 3,5-dinitrosalicílico.

g - gramas.

mg - miligramas.

h – hora.

M – molar (mols/L).

mM – mili molar (mmol/L).

µmol - micromol.

min - minutos.

mL - mililitros.

µL - microlitros.

ηm – nanômetros

rpm - rotações por minuto.

ETHANOL RED™, PE-2, SA-1, CAT-1 e BG - linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*.

YP - meio contendo extrato de levedo e peptona.

VHGF – Very High Gravity Fermentation

Introdução

1. INTRODUÇÃO

Em seu livro, Amorim e Leão (2005) relatou que a história do maior programa de substituição de petróleo por energia de biomassa implantado no mundo, em escala nacional, começou em 1975, quando o governo brasileiro decidiu estimular a produção de etanol combustível no país, para tanto, recomendava que se atentasse a dois fatores: a abertura de mercado e a valorização do preço do produto. Pressionado pela extraordinária elevação do preço do petróleo no Oriente Médio, que, até então, garantia o abastecimento interno, o governo lançou o Programa Nacional do Álcool.

Após a criação do programa, ocorreu uma diversificação na atuação da indústria açucareira com grandes investimentos apoiados pelo Banco Mundial, possibilitando a ampliação da área plantada com cana-de-açúcar e a implantação de destilarias de etanol. A experiência serviu como alternativa para diminuir a vulnerabilidade energética do País, devido à crise mundial do petróleo (UNICA, 2012). Além disso, a grande preocupação em reduzir a emissão dos gases do efeito estufa, responsáveis pelo aquecimento global, fez-se buscar a substituição dos combustíveis fósseis por novas fontes de energia mais limpa e que permitam um desenvolvimento sustentável (AZEVEDO et al., 2012).

O processamento industrial da cana-de-açúcar para etanol, como realizado hoje, é uma tecnologia que já atingiu sua maturidade plena e tem como principais características a alta densidade celular, o curto tempo de processo e reciclo de células. Atualmente, trabalha-se com mosto que apresentam em torno de 21° BRIX (aproximadamente 21% de sólidos dissolvidos), levando a um processo com baixo teor alcoólico, gerando grandes volumes de vinhaça (10-15 litros/litro de álcool) o que pode levar a um grave impacto ambiental. De acordo com Silva et al., (2007), a vinhaça possui maior carga poluidora, apresentando DBO variando de 20.000 a 35.000 $mg.L^{-1}$. E, além disso, grandes volumes de vinhaça induzem a um grande consumo de energia na destilação e no processo.

Dessa forma, o setor industrial deverá evoluir de forma mais destacada para gerar melhorias no processo, incorporando tecnologias diferentes. E é baseado nessa ideia de incorporação de novas tecnologias diferentes ao processo industrial que a Tecnologia de Fermentação de Mostos com Altos Teores de Açúcares

Fermentescíveis (Very High Gravity Fermentation Technology) impõe a sua importância.

1.1. A tecnologia de mostos concentrados: Very high gravity (VGH)

Segundo Puligundla et al., (2011), a Very High Gravity Fermentation Technology que foi defina como fermentação de meios completos contendo 27 gramas ou mais de sólidos dissolvidos por 100 mL de mistura e é uma técnica que traz uma série de benefícios potenciais sobre as abordagens convencionais, incluindo; considerável economia de água, maior produtividade de etanol, redução de custos associados com o tratamento do efluente (vinhaça), bem como uma considerável economia de energia para a etapa de destilação, menor custo de capital e também por minimizar a contaminação bacteriana.

No entanto, estas fermentações são raramente completas devido a alterações fisiológicas nas células microbianas. O açúcar elevado no meio de fermentação causa um aumento da pressão osmótica, o que tem um efeito prejudicial sobre as células além do estresse etanólico, gerado no final do processo, devido a altas concentrações de etanol produzidas (PEREIRA et al., 2010).

Entretanto, como já foi mencionada, a fermentação em VHGF tem um grande potencial para a produção de etanol. Mas isso somente se torna possível desde que as consequências negativas relacionadas às diferentes situações de estresse geradas durante o processo fermentativo sejam eliminadas. E para tanto, a tensão das células pode ser minimizada adicionando suplementos de nutrientes como fontes de nitrogênio que estimulem respostas ao estresse (PULIGUNDLA et al., 2011). Em alguns trabalhos citados por Puligundla et al., (2011) afirma-se que em certas fermentações a fonte de nitrogênio pode substituir a necessidade de oxigênio. E que em mostos concentrados a taxa de dissolução de oxigênio fica prejudicada o qual é necessário em pequenas quantidades para manter a integridade e a função da membrana celular.

Em laboratório, esta tecnologia deu origem a uma produção de 23,8% (v/v) de etanol a partir de Mostos de Trigo contendo 38% (p/v) de sólidos dissolvidos, e está sendo gradualmente aplicada na indústria onde os objetivos de 15-16% (v/v) ou mais de álcool estão sendo definidos. Em cervejarias, a tecnologia VHG foi testada

com sucesso em plantas-piloto para a produção de cervejas com maior teor de álcool que, de acordo com os painéis sensoriais, eram de qualidade extremamente aceitável. Toda grande cervejaria do mundo está produzindo ou experimentando a produção de cervejas de gravidades superiores. E dizem ser uma técnica considerada possível, do ponto de vista industrial (GIBSON, 2011).

Apesar de muitos microrganismos terem sido explorados para a produção de etanol, a levedura *Saccharomyces cerevisiae* é o microrganismo mais amplamente utilizado em grande escala para fermentação e produção do bioetanol devido à sua capacidade de fermentar uma vasta gama de açúcares e desenvolver os mecanismos adequados para lidar com as condições de estresses encontrados nos processos de VHGF (BAI et al., 2008).

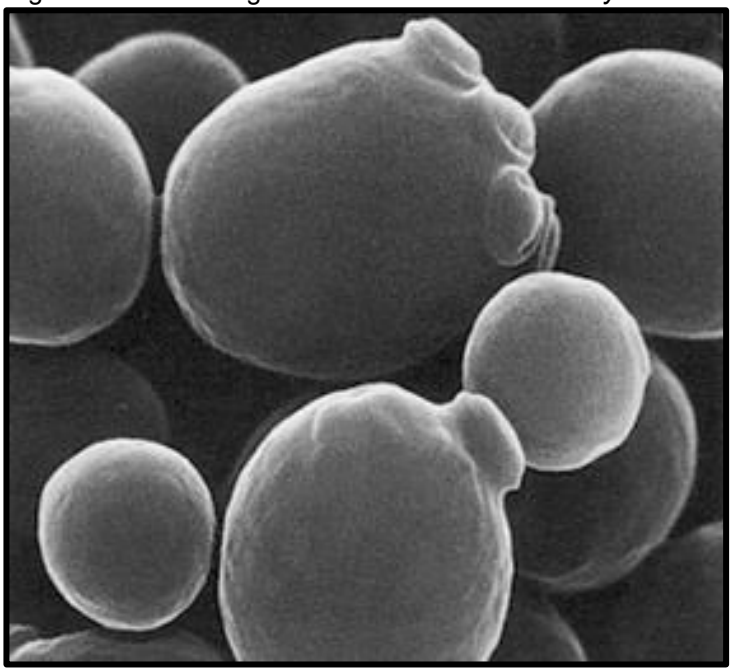
1.2. *Saccharomyces cerevisiae*

O reino dos fungos é um dos mais numerosos, são organismos unicelulares ou filamentosos, de vida livre e algumas espécies são importantes devido a sua grande biodiversidade no planeta. Por isso há um enorme potencial a ser explorado nesses microrganismos que possuem uma das mais fascinantes e importantes propriedades, que é a habilidade de converter substratos em produtos de interesse biotecnológico (OSTERGAARD et al., 2000). E neste universo estão inseridas as leveduras as quais representam aproximadamente 700 espécies descritas, sendo que somente algumas têm sido bem caracterizadas, fazendo com que este grupo de microrganismos seja qualitativamente e economicamente importante nos processos industriais (STEWART; RUSSELL, 1998).

Leveduras são células eucarióticas unicelulares contendo núcleo, mitocôndria, aparelho de Golgi, vesículas de secreção, reticulo endoplasmático, vacúolos, ribossomos, membrana plasmática, periplasma, parede celular e outras organelas, são organismos, facilmente manipuláveis, não patogênicos, capazes de crescer em várias fontes de carbono e de fornecer grande quantidade de células em um tempo relativamente curto. Tais características tornam esses microrganismos um dos mais adequados para estudos de processos biológicos peculiares aos organismos eucarióticos, pois eles apresentam características estruturais e funcionais de eucariotos superiores (SILVA, 2010).

Esses microrganismos são células bastantes pequenas variando entre 5 e 10 micrômetros, essas células são invisíveis a olho nu e requerem um microscópio para serem detectadas como é mostrado na figura 1 abaixo. A células é limitada por uma densa parede celular e dentro é impossível reconhecer muitas das características de uma célula típica como plasmalema ou membrana plasmática, núcleo, mitocôndria, reticulo endoplasmático, vacúolos, vesículas e grânulos (STEWART; RUSSELL, 1998).

Figura 1 - Fotomicrografia da levedura *Saacharomyces cerevisiae*



Fonte: Miranda Junior, 2008.

Ainda mediante o mencionado por STEWART e RUSSELL (1998), a característica distintiva para uma população crescente de células de leveduras é a presença do broto que são produzidos na parede celular quando as células se dividem em consequência à condição ambiental favorável ao crescimento. As células filhas são iniciadas como um broto pequeno que aumenta de tamanho durante todo o ciclo celular até elas estarem com o mesmo tamanho da mãe. Todo o crescimento na levedura ocorre durante a formação do broto até que atinja aproximadamente o tamanho das células maduras para que depois sejam separadas. A separação das células usualmente ocorre logo que as células entram em divisão e o sitio de separação celular é marcado na célula mãe por uma estrutura referida como uma cicatriz de broto e na célula filha por uma cicatriz de nascença.

1.3. Nutrição das leveduras

As leveduras são compostas principalmente de C, H, O, N, S e P presentes em macromoléculas (proteínas, polissacarídeos, ácidos nucléicos e lipídios) juntos com íons inorgânicos (K^+, Mg^{2+}, entre outros) e elementos traço, necessários em pequenas quantidades, e que desempenham papel estrutural e funcional no metabolismo celular. Esses microrganismos também necessitam de fatores de crescimento como vitaminas, purinas e pirimidinas, nucleosídeos e nucleotídeos, aminoácidos, ácidos graxos e esteróis. Quando uma espécie de levedura necessita de um fator de crescimento e não ocorre a adição deste fator ao meio de cultura, ocorre um crescimento pobre e diminuição da velocidade dos processos metabólicos (SILVA, 2010).

Em todos os processos industriais em que se utiliza a levedura *Saccharomyces cerevisiae* os meios de cultivo devem conter necessariamente uma fonte de nitrogênio, uma fonte de carbono, além de sais e vitaminas. Por esse motivo, os principais nutrientes utilizados pelas leveduras, quanto à quantidade, são o carbono e nitrogênio. Isso implica que os fluxos de carbono e nitrogênio tanto quanto suas interações constituem parâmetros importantes na regulação do crescimento celular (HORAK, 1997). As coordenações dos fluxos de carbono e nitrogênio podem ser reguladas na assimilação ou no metabolismo, dependendo das condições de crescimento e da natureza da fonte de carbono e nitrogênio (TER SCHURE et al., 1995; SCHNEPER et al., 2004).

1.3.1. Fonte de carbono

De acordo com Barnett (1976), as moléculas utilizadas como fonte de carbono pelas leveduras são os monossacarídeos (glicose, frutose e galactose) ou dissacarídeos (maltose e sacarose). Esses microrganismos desenvolveram complexos mecanismos celulares que regulam a utilização de nutrientes, principalmente, os que se relacionam com as fontes de carbono e de nitrogênio. O mais estudado é conhecido como repressão catabólica induzida pelo carbono, e impõe ao microrganismo uma sequência ordenada de fontes de carbono, sendo a glicose e a frutose preferencialmente utilizadas, em relação a outros açúcares como

a galactose e aos dissacarídeos sacarose e maltose. Na levedura *Saccharomyces cerevisiae*, a repressão pela glicose regula a expressão dos genes envolvidos com a produção de enzimas necessárias para o metabolismo da sacarose, maltose e galactose, e também das enzimas da gliconeogênese, da cadeia respiratória e da via fermentativa (PETER et al., 2006). Além da glicose, outros açúcares fermentescíveis como a frutose e a manose também desencadeiam o processo de repressão catabólica (HOLZER, 1976). Em leveduras, a regulação das enzimas submetidas ao controle da repressão catabólica é complexa e além do controle da expressão gênica, envolve também o fenômeno de inativação catabólica e o nível da atividade enzimática (GANCEDO, 1998).

Portanto, quando as leveduras são crescidas na presença de oxigênio, com baixa concentração de açúcar, ou quando a captação de açúcar pelas células é lenta, o complexo da enzima piruvato desidrogenase direciona o fluxo glicolítico à respiração, já em anaerobiose ou em altas concentrações de açúcar a fermentação é favorecida, pois o carbono excedente não direcionado para a respiração é metabolizado pela enzima piruvato descarboxilase, favorecendo a fermentação (BADOTTI, 2005).

Dessa forma, a concentração de açúcar no caldo de cana-de-açúcar deve ser diferente nas duas etapas distintas do processo fermentativo. A primeira está relacionada com a propagação de *Sacharomyces cerevisiae* que é feita sob intensa aeração. Normalmente é recomendado que o teor de açúcar não seja superior a 2-3% (p/v), já que concentrações mais altas prejudicam a respiração da célula, que é indispensável para um crescimento eficiente. Já a segunda etapa está relacionada com a fermentação propriamente dita, ou seja, a conversão de açúcar em etanol e CO_2. Nesta etapa, o teor médio de açúcar tolerado pela levedura é em torno de 15% (p/v). Este limite pode ser variável de acordo com a levedura e as demais condições do processo fermentativo (MALTA, 2006).

Além do mais, quando a levedura é cultivada em meio contendo uma mistura de glicose e outros açúcares como sacarose, maltose ou galactose, o metabolismo é diauxico, ou seja, a glicose é preferencialmente utilizada, enquanto que os outros açúcares somente serão metabolizados quando após a exaustão da glicose. Este comportamento diauxico ocorre devido ao fenômeno de repressão catabólica, ou repressão exercida pela glicose (THEVELEIN, 1994). A redução ou remoção da

glicose do meio de cultura alivia a célula da repressão catabólica, e ocorre importantes alterações fisiológicas permitindo a expressão de enzimas necessárias para a utilização de outras fontes de carbono (PETER et al., 2006).

1.3.2. Fonte de nitrogênio

Peter at al., (2006) ressalta ainda que, similarmente à fonte de carbono, outros mecanismos foram desenvolvidos para a utilização da fonte de nitrogênio ("Repressão Catabólica Exercida pelo Nitrogênio"), que também impõe a levedura uma sequência ordenada de utilização de fontes de nitrogênio consideradas preferenciais.

Segundo MALTA (2006), as leveduras geralmente podem sintetizar todos os aminoácidos e bases nitrogenadas necessárias para seu crescimento celular a partir do íon amônio. O crescimento é acelerado quando estão disponíveis no meio de crescimento "unidades de construção", como aminoácidos, para a síntese de enzimas celulares e componentes estruturais. O crescimento se torna mais rápido quando se usa nitrogênio orgânico no meio.

As leveduras *Saccharomyces cerevisiae* necessitam relativamente de grande quantidade de nutrientes para completar a fermentação e produzir de 12-15% (v/v) de etanol. O nitrogênio assimilável é identificado como um nutriente essencial para completar o processo fermentativo de forma eficiente. As principais fontes de nitrogênio assimiláveis por leveduras são aminoácidos, íon amônio e pequenos peptídeos (VILANOVA et al., 2007). Wang et al., (2007) relata que o Mg^{2+}, o extrato de levedura, a glicina, a biotina e a peptona possuem efeito indutor sobre o crescimento e a viabilidade das leveduras, principalmente em processos que geram vários efeitos estressantes sobre as células, como a VHGF.

O nitrogênio proteico original do caldo de cana é praticamente todo consumido pelas cepas, o que significa estar em forma assimilável pela levedura. Do ponto de vista nutricional da levedura o N proteico, presente no caldo, é insuficiente para suprir a nutrição da levedura em fermentação e tornando-se necessária a sua suplementação (JERONIMO, 2004).

1.3.3. Composição das matérias-primas utilizadas em de fermentações industriais.

O mosto utilizado na fabricação do etanol combustível é feito a partir do melaço e do caldo de cana-de-açúcar clarificado. Este meio apresenta uma alta concentração de fontes de carbono, mas pobre em fontes de nitrogênio. Nas usinas é comum a adição de suplementos nutricionais na fermentação para suprir essa carência (CECCATO-ANTONINI, 2008).

Na cana, o açúcar predominante é a sacarose. Os açúcares redutores compõem–se primordialmente de glicose e frutose. O caldo obtido da cana-de-açúcar encerra entre 78 e 86% de água, 10 e 20% de sacarose, 0,1 e 2% de açúcares redutores, 0,3 e 0,5% de cinzas e entre 0,5 e 1% de componentes nitrogenados. O mosto utilizado como meio de fermentação na fabricação do etanol combustível nas indústrias é feito a partir do melaço (resíduos da fabricação de açúcar que não são mais utilizados para a separação da sacarose, se originam nas usinas de açúcar, da centrifugação das massas cozidas para a separação dos cristais de açúcar) e do caldo de cana-de-açúcar clarificado cujo açúcar predominante é a sacarose (LIMA, 2001).

1.4. O transporte de nutrientes

1.4.1. Transporte de açúcares

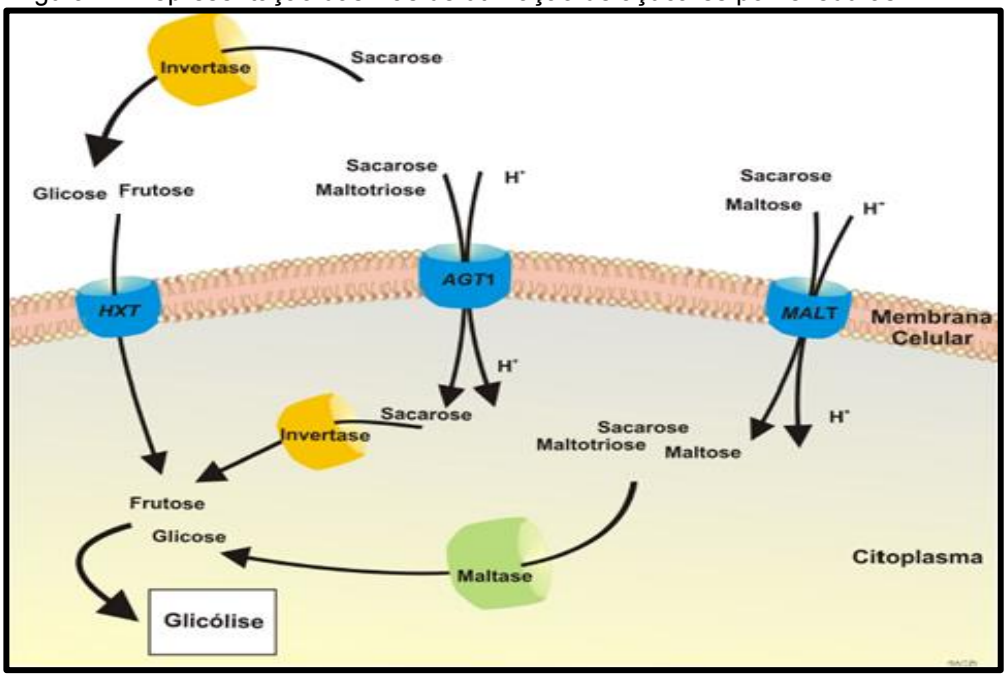
Glicose e frutose são transportadas pelos mesmos transportadores de hexose (Hxt) na membrana plasmática. Hxt6 e Hxt7 são transportadores de alta afinidade, e Hxt1 e Hxt3 são transportadores de baixa afinidade (OZCAN; JOHNSTON, 1999). Existem vários outros transportadores Hxt com afinidade intermediária, porém não está bem estabelecido que esses transportadores contribuam para o transporte de açúcares (BERTHELS et al., 2008).

Para utilizar a sacarose do mosto como fonte de carbono, as células de *Saccharomyces cerevisiae* possuem uma enzima denominada sacarase ou invertase (β-frutofuranosidase, EC 3.2.1.26) que hidrolisa a sacarose (açúcar não redutor) em glicose e frutose (dois açúcares redutores) em quantidades iguais. Elas

possuem dois tipos de invertase: uma forma extracelular (ou periplasmática) e outra intracelular (GASCON et al., 1981). A invertase externa é localizada na parede celular e associada à manana, e sua secreção é reprimida por altas concentrações de sacarose ou pelos seus produtos de hidrólise. Já a invertase interna é localizada no citoplasma. Ambas as enzimas são derivadas de um ou mais genes SUC (SUC1 a SUC5 e SUC7) (NAUMOV et al., 1996). E enquanto que a primeira reprimida por altas concentrações de sacarose ou por seus produtos de hidrólise (glicose e frutose), a invertase intracelular é expressa constitutivamente (CARLSON; BOTSTEIN, 1982).

Mediante Lagunas (1993), a utilização dos açúcares pela levedura envolve inicialmente o seu transporte para o interior da célula. É comumente aceito que a primeira etapa de utilização da sacarose por *Saccharomyces cervisiae* é a completa hidrólise desta, pela enzima extracelular, em glicose e frutose os quais serão transportados para o interior da célula através da difusão facilitada via transportadores de hexoses e então metabolizados. Porém evidencias contraditórias são reportadas na literatura e dizem que a sacarose pode ser hidrolisada, extracelularmente, pela invertase externa ou ser transportada diretamente para o citoplasma através de transporte ativo onde a sacarose será captada diretamente por um co-transporte com prótons H^+ onde serão hidrolisadas pela invertase intracelular, liberando moléculas de glicose e frutose que serão posteriormente metabolizados pela via glicolítica, como é mostrado abaixo na figura 2.

Figura 2 - Representação das vias de utilização de açúcares por leveduras



Fonte: Salvato, 2010.

1.4.2. Transporte de fontes nitrogenadas

Como no caso dos açúcares, o transporte de compostos nitrogenados em *Saccharomyces* também é um processo complexo, pois envolve um grande número de transportadores e um conjunto ainda maior de substratos que são estruturalmente diferentes: variando de um simples sal inorgânico, como o íon amônio, até compostos como os aminoácidos e peptídeos de diferentes tamanhos e sequências. O transporte do íon amônio, assim como no caso de aminoácidos e peptídeos, é um processo ativo secundário (HORÁK, 1997).

Estudos com mutantes indicaram a existência de três permeases para o íon amônio, codificada respectivamente, pelos genes *MEP1*, *MEP2* e *MEP3*. Uma vez dentro da célula, a amônia pode reagir com α-cetoglutarato e NADPH para formar glutamato ou com glutamato e ATP formando glutamina que parece ser o destino final dos grupos aminos (CRUZ, 2002). A utilização de aminoácidos por uma célula de levedura é determinada pela sua capacidade de transportá-lo através da membrana plasmática, seguida pela sua incorporação direta nas proteínas que estejam sendo sintetizadas, além disso, cada transportador é específico para um ou alguns L-aminoácidos e que *Saccharomyces cerevisiae* possuem um sistema de

transporte geral de aminoácido, o transportador Gap ("general amino acid permease"), codificado pelo gene *GAP1.* (JAUNIAUX; GRENSON, 1990).

Ainda segundo Horák (1997), os peptídeos constituem outra fonte importante de nitrogênio para as leveduras. O transporte de peptídeos deve envolver pelo menos três genes: *PTR1, PTR2* e *PTR3* no qual o seus produtos gênicos pertencem a um grupo de proteínas transportadoras de peptídeos. No entanto, alguns estudos sugerem a existência de uma permeasse geral para peptídeo (Gpp) que transportaria di- e tripeptídeo (e talvez oligopeptídeos), com preferência para resíduos hidrofóbicos e estereoespecífica para L-isômeros.

1.5. Bioquímica da fermentação etanólica

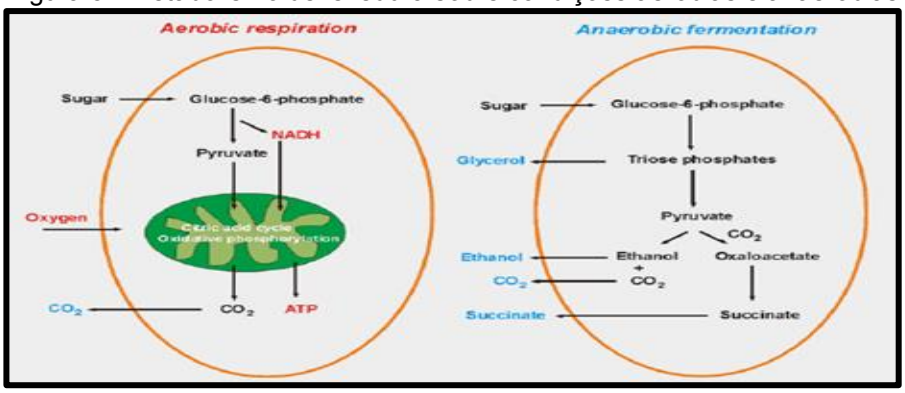
Existem dois ciclos distintos que definem o processo de transformação de açúcares solúveis em moléculas menores pela ação de levedura. O primeiro denominado glicólise tem a função de quebrar a molécula de glicose até ácido pirúvico, através de uma série de reações catalisadas por enzimas específicas, que se situam na parede celular e no interior da célula. Os dois principais modos de utilização do piruvato na produção de energia são distinguidos como respiração e fermentação como demonstrado na figura 3. Na ausência de oxigênio (fermentação) há uma tendência para a atuação das enzimas piruvato descarboxilase e álcool desidrogenase, produzindo etanol e água a partir do ácido pirúvico. Porém, na presença de oxigênio (respiração) há um deslocamento reacional de parte do ácido pirúvico para o ciclo de Krebs, onde será oxidado enzimaticamente a dióxido de carbono e água (LEHNINGER, et al, 2002).

Em condições anaeróbicas, o piruvato é convertido a etanol com desprendimento de CO_2. Dois ATPs produzidos na glicólise são usados na condução da biossíntese das leveduras, que envolve diversas biorreações que requerem energia. Portanto, a produção de etanol está fortemente relacionada com o crescimento das leveduras, o que significa que leveduras devem ser produzidas como subproduto (PACHECO, 2010).

Ainda segundo Cruz (2002) a *Saccharomyces cerevisiae* é o microrganismos mais estudado, com comportamento típico de uma levedura Crabtree positivo. Como é um organismo aeróbio facultativo, o seu metabolismo só vai ser totalmente

oxidativo em baixas concentrações de glicose. Em concentrações mais altas, devido ao fenômeno de repressão catabólica, o metabolismo de glicose é desviado para a produção de etanol, mesmo em condições totalmente aeróbias. A produção de etanol em condições plenamente aeróbica é conhecida como Efeito Crabtree. Este efeito é explicado como um fenômeno de saturação da capacidade respiratória da levedeura, mesmo em condições totalmente aeróbias.

Figura 3 - Metabolismo de levedura sobre condições aeróbias e anaeróbias



Fonte: Salvato, 2010.

1.6. Os processos industriais de fermentação

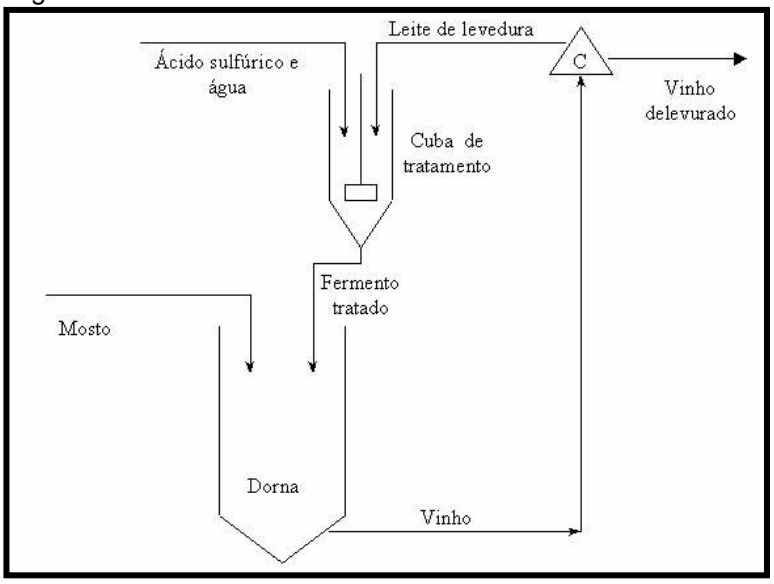
1.6.1. Processo em batelada alimentada

O processo descontínuo alimentado ou batelada alimentada é definido como uma técnica onde um ou mais nutrientes são adicionados ao fermentador durante o cultivo e os produtos permanecem no fermentador até o final da fermentação. Em alguns casos, todos os nutrientes são gradualmente adicionados à dorna. A vazão de alimentação pode ser constante ou variar com o tempo e a adição de mosto pode ser de forma contínua ou intermitente. Mudanças de volume podem ou não ocorrer, dependendo da concentração de substrato e da taxa de evaporação do sistema (CARVALHO; SATO, 1975). Devido à flexibilidade de utilização de diferentes vazões de enchimento de dornas com o meio nutriente, é possível controlar a concentração de substrato no fermentador, de modo que o metabolismo seja deslocado para uma determinada via metabólica, levando ao acumulo de um produto específico (KELLER; DUNN, 1978).

1.6.2. Processo de Melle-Boinot

O processo de batelada alimentada ou contínuo para a produção de álcool, no Brasil, se utiliza da técnica conhecida como Melle-Boinot, que está baseado no reaproveitamento das células de levedura de uma fermentação anterior. A separação das leveduras do mosto fermentado é feita em centrífugas através da diferença de dimensões e densidades. Assim, durante a centrifugação, a quase totalidade das bactérias presente no mosto é arrastada com o vinho, conferindo, desse modo, uma elevada pureza ao leite de levedura resultante. Ao deixar a centrífuga, o fermento sofre um tratamento seletivo com ácido sulfúrico em recipiente adequado, denominado "cuba de tratamento". Nesta, o leite de levedura é convenientemente diluído com água, na proporção de 1 parte do mesmo para 1- 1,5 parte de água e, a seguir, recebe ácido sulfúrico até pH 2,5 - 3,0, aí permanecendo cerca de 4 horas. As bactérias remanescentes não conseguem sobreviver à alta concentração de íons hidrogênio, ocorrendo o mesmo com as células velhas de leveduras, enquanto que as células jovens resistem muito bem ao baixo pH. Após o tratamento ácido, o fermento retorna ao processo de fermentação na forma de um pé-de-cuba. O processo de Melle-Boinot encontra-se esquematizado abaixo, na figura 4 (NOGUEIRA; FILHO, 2005).

Figura 4 - Processo de Melle-Boinot



Fonte: Nogueira e Filho, 2005.

1.6.3. Processo contínuo

No processo contínuo, o material nutriente (o qual contém a fonte de carbono e outros nutrientes) é bombeado continuamente dentro de um frasco agitado, onde os microrganismos estão ativos e ao mesmo tempo, o produto é retirado do sistema. Nesse tipo de processo, é essencial manter um volume de cultura constante. O produto, o qual é retirado do topo de um biorreator, contém etanol, células e açúcar residual. A manutenção de volume constante de líquido no reator é de primordial importância, a fim de que o sistema atinja a condição de estado estacionário, condição na qual as variáveis de estado (concentração de célula, de substrato limitando e de produto) permanecem constantes ao longo do tempo de operação do sistema (SOUZA, 2009).

1.7. Metabólito indicativo de estresse na levedura - Trealose

Durante o processo industrial de produção de etanol combustível, as células de leveduras são expostas a diversos tipos de estresse fermentativo. Altas concentrações de açúcar no início e altos níveis de etanol no final da fermentação expõem as leveduras a estresses fisiológicos, e para isso é necessário a utilização de linhagens robustas, que mantenham a viabilidade celular e vitalidade fermentativa durante os ciclos fermentativos. Além do estresse osmótico e etanólico, as leveduras são submetidas outros tipos de estresses, incluindo lavagens com ácido e da contaminação com outros micro-organismos e temperatura. Consequentemente o estado fisiológico e a performance fermentativa das leveduras podem se alterar e não permanecer constantes durante os vários ciclos de fermentação. Alguns metabólitos produzidos por *Saccharomyces cerevisiae* como a trealose servem como um indicador de estresse da levedura e então precisam ser monitorados durante todo o processo.

As estirpes que possuem a capacidade de fermentar em meios com alta concentração de sacarose acumulam concentrações elevadas de trealose. Esse dissacarídeo não redutor que atua com função estrutural ou ainda ser sintetizado em resposta ao estresse, atuando como um protetor. Originalmente, a trealose, juntamente com o glicogênio, era considerada substâncias de reserva energética

para a levedura, porém, recentemente, vários autores sugerem que a trealose possua função de proteção para a célula de levedura durante processos de estresse.

Na proteção protéica, por exemplo, a trealose pode preservar proteínas lábeis durante a desidratação, assim como, proteger enzimas da inativação por calor ou pela presença de etanol in vitro reduzindo a formação de agregados protéicos (BARROS, 2011).

Há também modelos que explicam o efeito de proteção da trealose na membrana da célula de levedura. E o modelo mais aceito é o proposto por Crowe et al., (1984) onde explica que a trealose interage com os grupos polares das cadeias fosfolipídicas existentes na membrana, substituindo a água, com isso não há alteração do espaçamento entre os fosfolipídios evitando as separações laterais dos componentes da membrana. Portanto, com a substituição das moléculas de água pela trealose não há passagem da fase fluida para a fase gel da membrana, mantendo-se a integridade e a fluidez da mesma, e assim, a viabilidade celular.

Dessa forma, é concebível que níveis elevados de trealose em leveduras podem estar associados com o aumento da osmotolerância e etanol tolerância (D'AMOREet al., 1991).

Objetivos

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

O objetivo deste trabalho foi estabelecer e aprimorar o processo de produção do bioetanol por leveduras industriais, principalmente ao que se refere à obtenção de vinhos com maiores conteúdos de etanol, através da fermentação de mostos com alta concentração de sacarose.

2.2. Objetivos específicos

- Verificar o efeito do acúmulo de trealose nos processos de fermentação e durante o crescimento celular.
- Analisar a capacidade fermentativa de linhagens selecionadas em mostos industriais com concentração de sacarose de 30% (m/v) a 30° e 37°C, durante um ciclo.
- Analisar a capacidade fermentativa de diferentes linhagens industriais de *Saccharomyces cerevisiae*, PE-2, SA-1, CAT-1 e BG (brasileiras) e a ETHANOL RED^{TM} (francesa), utilizando meio sintético, com concentração elevada de sacarose em condições de alta densidade celular e com reciclo celular.
- Analisar a capacidade fermentativa da linhagem CAT-1 em mostos industriais com concentração de sacarose de 21, 30 e 35% (m/v) a 30°C e em mostos industriais com concentração de sacarose de 30% (m/v) a 37°C, durante ciclos de fermentação.
- Verificar o efeito da suplementação em mostos concentrados em sacarose com fontes complexas de nitrogênio, como extrato de levêdo e peptona.
- Verificar condições nutricionais que possibilitem a manutenção das condições fisiológicas adequadas das leveduras, que permitam que ao longo de reciclos celulares sucessivos seja preservada a viabilidade celular e a vitalidade fermentativa.

Materiais e Métodos

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Microrganismos utilizados

Neste estudo foram utilizadas cinco linhagens industriais de *Saccharomyces cerevisiae*: **EthanolRed™** (gentilmente cedida pela empresa Fermentis/Lasaffre), **PE-2** (Usina da Pedra), **SA-1** (Usina Santa Adélia), **CAT-1** (Usina de Catanduva) e **BG** (Usina da Barra Grande) isoladas nessas diferentes unidades produtoras de etanol combustível (Basso et al., 2008), e comercializadas pela empresa LNF Latino Americana.

3.2. Manutenção da cultura

As culturas estoques de células leveduriformes foram mantidas no meio sólido YPD ágar contendo 1,0% (m/v) de extrato de levedo, 2,0% (m/v) de peptona, 2,0% (m/v) de glicose, 2,0% (m/v) de ágar e 100 mL de água destilada. Após a incubação por 48 horas a 30ºC, as culturas foram armazenadas a 4ºC, sendo utilizadas no máximo após 10 dias.

3.3. Preparo do inóculo

O inóculo foi preparado a partir das leveduras coletadas da cultura estoque com alça de platina e transferida para tubos de ensaio contendo 4 mL de água destilada estéril, e 1 mL desta suspensão de células (~0,025 mg de células/mL), foi adicionado aos frascos com meio contendo 1% de peptona (m/v), 1% de extrato de levedo (m/v) e 10% de sacarose (m/v) com pH 5,0; crescidas a 30°C e com agitação de 250 rpm, em mesa agitadora *New Brunswich Scientific Co. Inc*, por 20 horas a fim de se obter uma concentração de células necessária para realizar fermentação com alta densidade celular.

3.4. Meios e condições de cultivo

Para analisar o perfil da biossíntese da trealose por três linhagens industriais de *Saccharomyces cerevisiae* PE-2, CAT-1 e ETHANOL RED™, foi preparado três composições diferentes de meios de cultivo. Para as três composições o meio básico continha 1% de peptona (m/v) e 1% de extrato de levedo (m/v). Em uma condição foi acrescentado à composição 2% de glicose (m/v) ao meio – YPGlic2%, para outra foi adicionado 2% de glicose (m/v) e 10% de etanol (v/v) – YPGlic2%-Etanol10% e para a terceira condição foi acrescentado 20% de glicose (m/v) – YPGlic20%. As células inoculadas foram cultivadas a 30° e 37°C com agitação de 250 rpm por quatro horas (cultivo com baixa concentração de açúcar) e oito horas (cultivo com alta concentração de açúcar). Nos três casos o pH inicial do meio foi ajustado para 5,0 e os meios foram esterilizados. Os parâmetros fermentativos (crescimento celular, açúcar residual, produção de trealose e viabilidade celular) foram avaliados a cada hora para o cultivo em baixa concentração de açúcar e a cada duas horas para o cultivo em alta concentração de açúcar.

Parar avaliar o comportamento fermentativo das linhagens industriais de *Saccharomyces cerevisiae* PE-2, CAT-1 e ETHANOL RED™ em meio completo, foi preparado meio a base de mosto de caldo de cana-de-açúcar com sacarose ajustada para 30% (m/v). As células inoculadas foram cultivadas a 30° e 37°C com agitação de 250 rpm por 10 horas. Nos dois casos o pH inicial do meio foi ajustado para 5,0 e os meios foram esterilizados. Os parâmetros fermentativos (crescimento celular, açúcar residual, produção de etanol, produção de trealose e viabilidade celular) foram avaliados a cada duas horas.

Um meio de fermentação contendo 1% de extrato de levêdo (m/v), 1% de peptona (m/v) e 30% de sacarose (m/v) – YPSac30% foi preparado para avaliar o comportamento fermentativo das linhagens industriais de *Saccharomyces cerevisiae* ETHANOL RED™, PE-2, SA-1, CAT-1 e BG durante reciclos fermentativos. As células inoculadas foram cultivadas a 30° com agitação de 250 rpm por 10 ciclos consecutivos de 10 horas. O pH inicial do meio em cada ciclo foi ajustado para 5,0 e todos os meios foram esterilizados. No primeiro ciclo os parâmetros fermentativos (crescimento celular, açúcar residual, viabilidade celular e produção de trealose) foram avaliados a cada duas horas e meia. E nos ciclos subsequentes, para todas as linhagens, foram avaliados os mesmos parâmetros, no tempo inicial e ao final de dez horas de fermentação. A linhagem que obteve maior resistência à condição de

VHGF, em termos de vitalidade celular, foi escolhida para ser cultivada sob as condições de VHGF em meio completo.

Alguns experimentos foram realizados em meio à base de mosto de caldo de cana-de-açúcar ajustado com diferentes concentrações de sacarose 21, 30 e 35% (m/v) para avaliar o comportamento fermentativo da linhagem industrial de *Saccharomyces cerevisiae* CAT-1 durante reciclos fermentativos. Nestes estudos, com a finalidade de encontrar melhores condições nutricionais para manter a vitalidade fermentativa das células durante os reciclos, foram estabelecidas três condições: Duas com suplementação nutricional (com 2% de peptona ou 2% de extrato de levedo (m/v) e outra sem suplementação (controle em relação à fonte de nitrogênio)). As células inoculadas foram cultivadas a 30°C com agitação de 250 rpm por 10 ciclos consecutivos de 6, 10 e 12 horas, respectivamente, nas concentrações de sacarose 21, 30 e 35% (m/v). O pH inicial do meio em cada ciclo foi ajustado para 5,0 e todos os meios foram esterilizados. No primeiro ciclo fermentativo, as amostras foram coletadas de tempo em tempo para a determinação dos parâmetros fermentativos (crescimento celular, açúcar residual, viabilidade celular e produção de trealose). E nos ciclos subseqüentes, os mesmos parâmetros fermentativos foram avaliados somente no tempo inicial e no final após a completa utilização da sacarose.

A linhagem CAT-1 também foi utilizada na fermentação de mosto de caldo de cana-de-açúcar ajustado com 30% de sacarose (m/v) a 37°C, nas três condições anteriormente descritas. Oito ciclos foram realizados. No primeiro ciclo fermentativo, amostras foram coletadas a cada duas horas e meia, avaliando-se os mesmos parâmetros fermentativos, sendo que nos ciclos subsequentes, os parâmetros foram avaliados somente no tempo inicial e final, após10 horas de fermentação, onde foi observado ocorrer o consumo total de sacarose.

Nos experimentos com reciclos, no final de cada ciclo, o meio de fermentação foi centrifugado o vinho guardado para análises de etanol. O “pellet”, contendo as células, passou por processo de lavagem e reinoculado no ciclo seguinte. Em alguns experimentos foi feito um ajuste da concentração de células para que fosse possível iniciar o ciclo seguinte com a concentração celular próxima a inicial do ciclo anterior (sangria).

Para análise dos parâmetros fermentativos foram coletadas, periodicamente, amostras de 0,6 mL, e a partir deste volume, alíquotas foram retiradas para determinar a biomassa e a viabilidade celular. O restante do material foi centrifugado e o sobrenadante foi armazenado a -5°C para análises posteriores do pH, da utilização da fonte de carbono e produção de etanol. As células (pellet) foram utilizadas para a determinação da trealose.

3.5. Determinação dos parâmetros fermentativos

3.5.1. Determinação do crescimento celular

O acompanhamento do crescimento celular foi feito através de medidas turbidimétricas a 570 nm, em espectofotômetro *Micronal B395*, de uma suspensão de células com diluição de 121 vezes, relacionando-a com a massa celular, através da seguinte equação:

$$[\text{células}]\ (\text{mg/mL}) = \Delta A_{570} \times \text{Diluição} \times f$$

onde f, fator de conversão de absorbância em massa seca, para a levedura *Saccharomyces cerevisiae* é 0,6711 ± 0,0469. O fator f foi determinado a partir da medida de absorbância de suspensões com diferentes concentrações de células comparada coma massa seca obtida após a secagem a 100ºC de 1 mL de cada suspensão filtrada em membrana *Milipore* por duas horas.

3.5.2. Determinação da viabilidade celular

A determinação da viabilidade celular será rotineiramente realizada através do método de coloração com azul de metileno Lee et al., (1981) com contagem de células em câmara de Neubauer BOECO, com 1/10 nm de profundidade, em microscópio *Carl Zeiss* com aumento de 40x.

3.5.2.1. Coloração com azul de metileno

20 µL de amostra foram transferidos para 450 µL da solução padrão de azul de metileno (0,025 g azul de metileno; 0,9 g NaCl; 0,042 g KCl; 0,048 g $CaCl_2.6H_2O$; 0,02 g $NaHCO_3$ para 100 mL de solução aquosa). Após 10 minutos, tempo requerido para que as células não-viáveis absorvam o corante, iniciou-se a contagem em câmara de Neubauer. As células viáveis são incolores, enquanto que as não-viáveis são coloridas.

3.5.3. Determinação do consumo de açúcar

O consumo de açúcar residual foi medido, utilizando o método do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), descrito por Miller (1959), que se baseia no poder redutor de açúcares, originando um composto colorido, 3-amino 5-nitro salicílico. A reação colorimétrica entre o ácido 3,5 – dinitrosalicilico e o açúcar redutor é uma reação de oxirredução na qual o grupo nitro do ácido é reduzido a um grupo amino.

Dessa forma, para a dosagem do açúcar, as amostras obtidas foram adequadamente diluídas e a 200 µL dessa amostra adicionou-se 100 µL de HCl 6M e 150 µL de água destilada seguido de banho de água a 60°C por 7 minutos para a hidrólise da sacarose. Em seguida, foi acrescentado 500 µL de NaOH 2,4M e 1 mL do reagente DNS nos respectivos tubos de ensaio. O controle (branco) foi preparado seguindo todas as etapas mencionadas adicionando-se 200 µL de água no lugar da amostra. Os tubos foram transferidos para banho de água a 100°C por 5 minutos. Após foram transferidos para um banho de gelo para resfriamento. As leituras de absorbância foram realizadas a 546 nm. A quantidade de sacarose foi expressa em % de açúcar residual.

3.5.4. Determinação da produção de etanol

A concentração de etanol foi determinada como proposto por Zanon et al., (2007). O método utilizado baseou-se na conversão enzimática do álcool etílico a acetaldeído e NADH, através de reação de óxido-redução, tendo o NAD+ como aceptor de elétron. O NADH formado pela reação é quantificado com leituras de aborbância a 340 nm.

Para tanto, amostra de 100 µL de vinho final foram transferidos para tubos R (tubos de reação) onde, foi acrescentado 1 mL de solução tampão pirofosfato de sódio 130 mM contendo semicarbazida 79 mM e glicina 24 mM em pH 8.8 e 200 µL de solução de NAD^+ 15 mM. A reação foi iniciada, a temperatura ambiente, pela adição de 100 µL da preparação enzimática da álcool desidrogenase (5,7 U/mL) de *Saccharomyce cerevisiae*. O tempo de reação foi de 15 minutos e juntamente com as amostras foi montado um tubo P e B contendo solução padrão de etanol 15% (300 vezes diluído) e água mili-Q ao invés da amostra, respectivamente. A curva de calibração foi obtida com soluções de etanol de 3 a 15% (v/v).

Além do método enzimático, para alguns experimentos, a concentração de etanol fora também determinada por cromatografia gasosa. Em um cromatógrafo CG, modelo 37-022, acoplado a um integrador - processador CG - 300, utilizando-se coluna cromatográfica CG nº PAD/2499, operada isotermicamente a 90ºC. A temperatura do detector de ionização de chama e do vaporizador foi de 135ºC. Utilizou-se o nitrogênio como gás de arraste, com vazão de 30 mL/mim. A vazão do hidrogênio foi de 30 mL/min e do ar sintético de 300 mL/min. Utilizou-se uma solução de etanol como padrão e a curva de calibração foi obtida com soluções de etanol 0,5 e 1% (v/v).

3.6. Produção de trealase semi-purificada, extração e quantificação de trealose (Neves et al., 1994).

3.6.1. Manutenção do fungo

O fungo termófilo *Humicola grisea* foi inoculado em meio sólido contendo; 4% (m/v) de aveia e 2% (m/v) de ágar e incubado a temperatura de 37°C por aproximadamente 10 dias. Após o período de incubação, as culturas foram transferidas para a câmara fria a 4°C por 5 dias.

3.6.2. Extração de trealose ácida e ensaio de atividade

Com auxílio de um bastão de vidro, a superfície da cultura de células foi raspada e ressuspendeu-se os conídios em 10 mL de água destilada gelada. A

suspensão conidial foi colocada em banho de gelo por 30 minutos, sob agitação e aquecida em banho de água a 60°C por 30 minutos. A suspensão foi então filtrada e dialisada em água destilada over night. A atividade enzimática presente no extrato bruto foi de 2,71 U e a atividade enzima trealase foi determinada a partir do extrato cru (lisado celular) através de uma solução de reação contendo 25 µL de solução padrão de trealose 50mM preparada em tampão acetato de sódio 300 mM para trealase em pH 5,5 e a reação foi iniciada com 10 µL da solução enzimática por 15 minutos a 50ºC.

3.6.3. Extração e quantificação de trealose

Para a determinação da quantidade de trealose 500 µL da cultura foram coletados, a células separadas por centrifugação e lavadas por 3 vezes com 1 mL de solução salina de NaCl 0,85%.

Para a extração da trealose as células foram ressuspensas em 500 µL de Na_2CO_3 0,25M e a suspensão incubada por 20 minutos em banho fervente. A seguir, as amostras foram centrifugadas e a uma alíquota de 25 µL do sobrenadante será adicionada 12,5 µL de ácido acético 1M e 12,5 µL de tampão acetato de sódio 300 mM, contendo 15 mM de $CaCl_2$ em pH 5,5. Inicia-se a reação enzimática com 50µL da enzima trealase extraída. A mistura da reação foi incubada a 50°C. A glicose proveniente da hidrólise da trealose foi dosada pelo kit comercial (Labtest, Brasil) contendo o sistema enzimático Glicose oxidade/Peroxidase em espectrofotômetro *Beckman coulter DV 640 Nucleic acid and protein analyzer*. Foi utilizada uma solução de trealose como padrão e a quantidade de trealose foi expressa em nmoles de trealose/mg de células secas através de uma curva de calibração obtida com soluções de trealose 5mM de 15 a 125 nmol.

3.7. Reprodutibilidade

Os dados referentes aos parâmetros fermentativos representam a média de três experimentos repetidos de forma idêntica.

Resultados e Discussão

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste trabalho estão descritos três conjuntos de resultados:

I. Estudo dos perfis de biossíntese de trealose de três linhagens industriais, em três diferentes meios de cultivos a 30° e 37°C.

II. Estudo dos perfis fermentativos de três linhagens industriais nas condições de VHG, aproximadamente 30% (m/v) de sacarose e nas temperaturas de 30° e 37°C.

III. Estudo dos perfis fermentativos de uma linhagem industrial de *Saccharomyces cerevisiae* em ciclos fermentativos, com reutilização de células e com concentrações de sacarose variando entre 21, 30 e 35% (m/v) nas temperaturas de 30° e 37°C em meios 'quimicamente' definido (YPSac) e em mosto a base de caldo de cana-de-açúcar.

4.1. Estudo do perfil de biossíntese de trealose pelas linhagens industriais PE-2, CAT-1 e ETHANOL RED^{TM} e em diferentes condições de cultivo.

Os estudos que avaliaram a biossíntese de trealose pelas linhagens PE-2, CAT-1 e ETHANOL RED^{TM} foram realizados a 30° e 37°C em três composições diferentes de meios de fermentação: meio YPGli2% (favorecendo preferencialmente o crescimento); meio YPGli2%-Etanol 10% (v/v) (causando estresse etanólico) e meio YPGli20% (causando estresse osmótico e fermentativo).

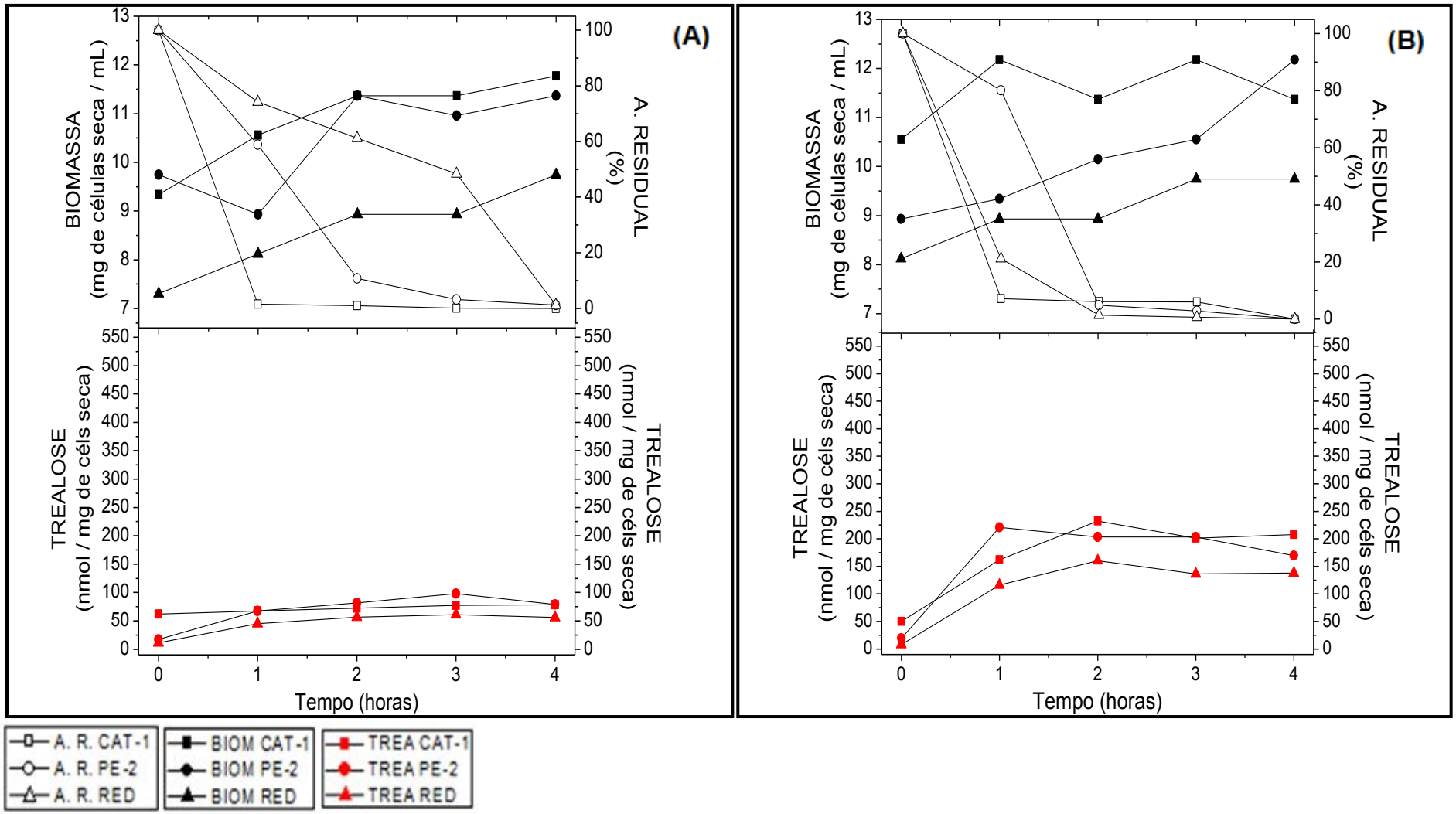
4.1.1. Perfil de biossíntese de trealose pelas linhagens PE-2, CAT-1 e ETHANOL RED^{TM} em meio YPGlic2% a 30° e 37°C.

Na figura 5 podemos observar que no crescimento em baixa concentração de fontes de carbono, como em 2% de glicose (m/v), o acúmulo de trealose variou entre linhagens. No entanto quando submetida ao estresse causado pelo aumento da temperatura (figura 5B), existiu um aumento significativo da concentração de trealose para as três linhagens em estudo. A 30°C (figura 5A), a concentração de trealose permaneceu na faixa de 50 a 100 nmol de trealose/mg de célula seca,

enquanto a 37°C a concentração máxima ficou na faixa de 100 a 200 nmol de trealose/mg de célula seca, aumentado a concentração de trealose em torno de duas vezes. A linhagem ETHANOL RED^{TM} foi a linhagem que acumulou menor concentração de trealose nas duas condições estudadas.

Como mostrou a tabela 1, a viabilidade foi mantida em torno de 98% quando as linhagens crescem em baixa concentração de glicose a 30°C (tabela 1A) e que embora não seja uma queda significativa a 37° C (tabela 1B) foi observado diminuição da porcentagem de células vivas.

Figura 5 - Produção de biomassa, consumo de açúcar e acúmulo de trealose pelas linhagens industriais em meio YPGlic2% a 30°C **(A)** e a 37°C **(B)** sob agitação de 250 rpm e pH inicial 5,0.



Fonte: elaborada pelo autor.

Tabela 1 - Viabilidade celular das linhagens industriais em meio YPGlic2% a 30°C e a 37°C sob agitação de 250 rpm e pH inicial 5,0.

Viabilidade celular (% de células vivas)				
		PE-2	**CAT-1**	**ETHANOL RED™**
30°C	**1 h**	93,00	100	100
	2 h	98,01	100	100
	3 h	97,74	100	100
	4 h	99,03	100	100
37°C	**1 h**	98,90	100	94,59
	2 h	97,67	100	94,59
	3 h	92,36	96,19	92,44
	4 h	93,49	94,59	92,44

Fonte: elaborada pelo autor.

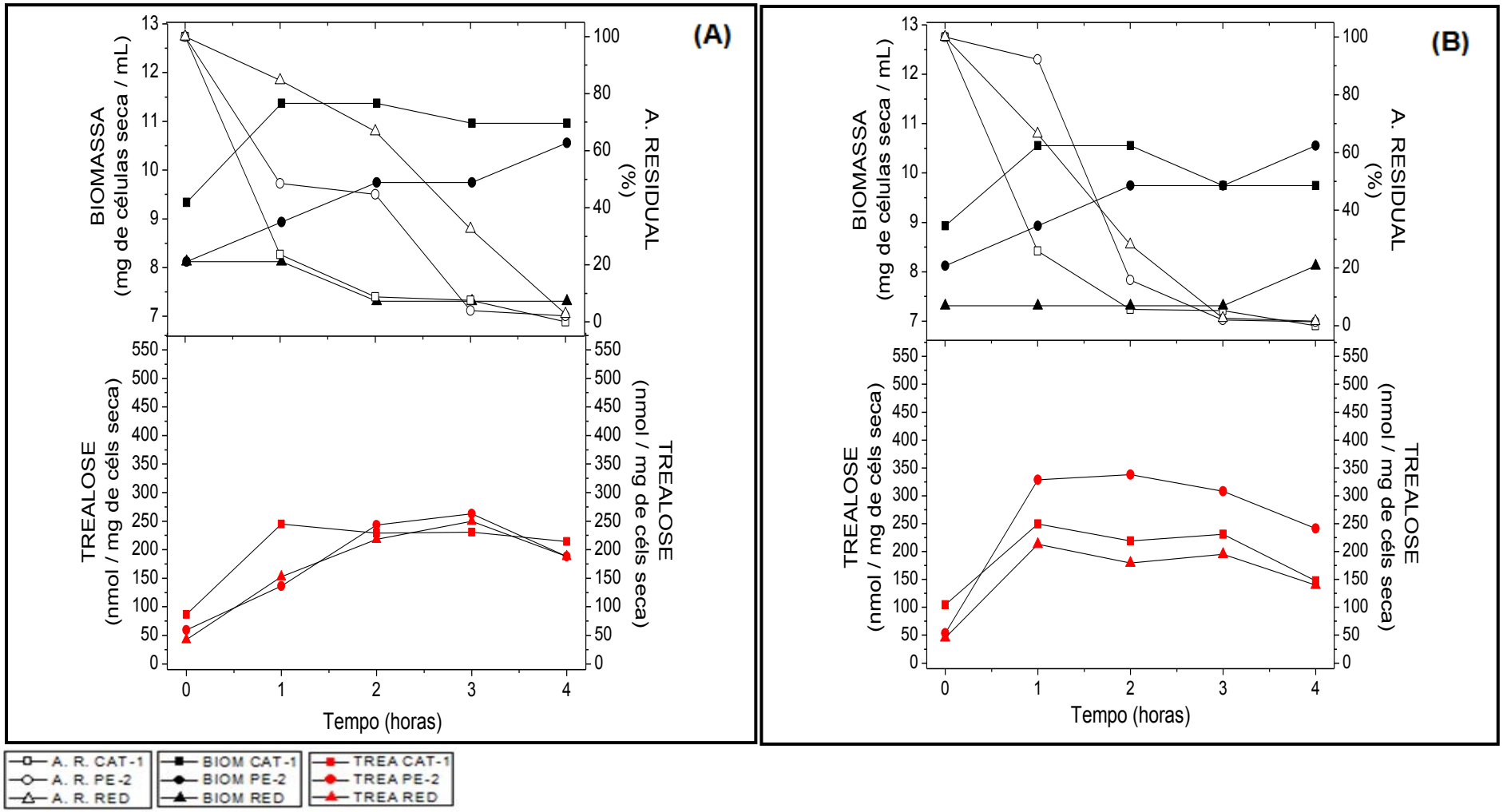
4.1.2. Perfil da biossíntese de trealose pelas linhagens PE-2, CAT-1 e ETHANOL RED™ em meio YPGlic2%-Etanol10% a 30° e 37°C.

Na figura 6 podemos observar que o açúcar residual foi consumido mais lentamente quando comparado com a primeira condição (item 4.1.1.), no qual o meio propicia o crescimento celular e que o crescimento das três linhagens analisadas mostrou ser inibido, possivelmente devido à presença de etanol no meio.

Os níveis de trealose aumentaram quando comparados com a condição anterior (Figura 5) ficando na faixa entre 100 a 200 nmol de trealose/mg de células seca na temperatura de 30°C (figura 6A) e entre 150 a 300 nmol de trealose/mg de células seca na temperatura de 37°C (figura 6B). Quando a biossíntese de trealose na condição de estresse causado pelo etanol nas duas temperaturas estudadas são comparadas, para 37°C; além de ter ocorrido maior acúmulo desse carboidrato foi possível observar diferença entre as espécies PE-2, CAT-1 e ETHANOL RED™ sendo que a linhagem CAT-1 apesar de ter apresentado níveis intermediários de concentração de trealose, consumiu mais eficientemente a fonte de carbono. A linhagem ETHANOL RED™ foi a espécie que se mostrou mais sensível, produzindo menores níveis de trealose e que consumiu lentamente a fonte de carbono

Como mostra a tabela 2, a viabilidade foi mantida em torno de 80% nesta condição de estudo. No entanto, quando as linhagens crescem em baixa concentração de glicose, na presença de etanol e a 37°C foi possível observar que a linhagem ETHANOL RED™ no tempo final do processo mostrou uma acentuada queda da viabilidade ficando com 64% das células viáveis.

Figura 6 - Produção de biomassa, consumo de açúcar e acúmulo de trealose pelas linhagens industriais em meio YPGlic2%-Etanol10% a 30°C **(A)** e a 37°C **(B)** sob agitação de 250 rpm e pH inicial 5,0.



Fonte: elaborada pelo autor.

Tabela 2 - Viabilidade celular das linhagens industriais em meio YPGlic2%-Etanol10%a 30°C e a 37°C sob agitação de 250 rpm e pH inicial 5,0.

Viabilidade celular (% de células vivas)				
		PE-2	**CAT-1**	**ETHANOL RED™**
30°C	**1 h**	90	89,90	100
	2 h	90,80	98,10	92,70
	3 h	87,32	100	81,67
	4 h	92,13	100	81,25
37°C	**1 h**	87,50	98,70	94,89
	2 h	90,54	94,60	93,27
	3 h	86,30	94,60	86,15
	4 h	93,75	98,62	63,93

Fonte: elaborada pelo autor.

4.1.3. Perfil fermentativo e de biossíntese de trealose pelas linhagens PE-2, CAT-1 e ETHANOL RED™ em meio YPGlic20% a 30° e 37°C.

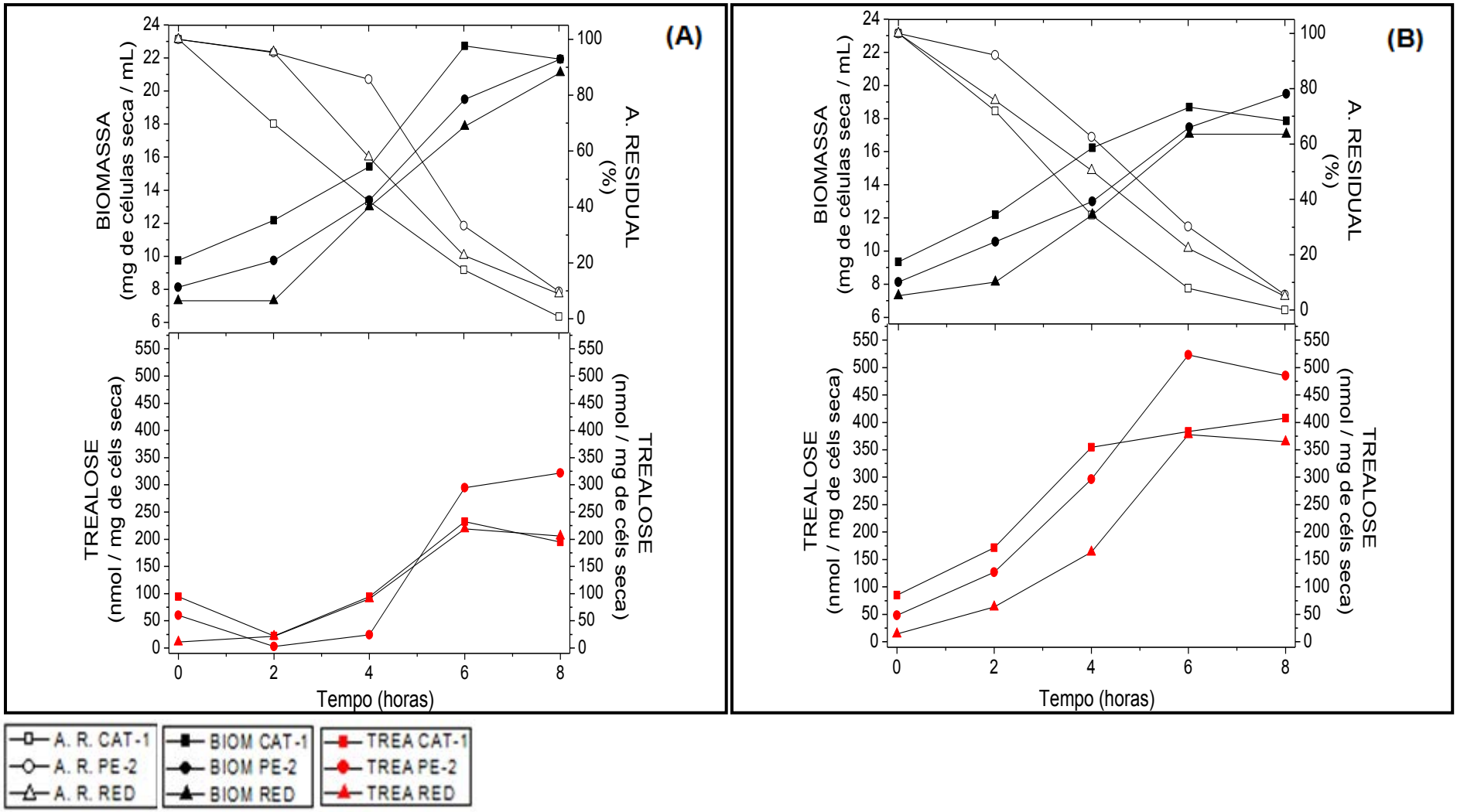
Nesta condição, na qual a alta concentração de fonte de carbono no meio favorece a via bioquímica da fermentação, foi mostrado que ocorreu crescimento celular para todas as linhagens em estudo e que o aumento da concentração de biomassa ficou mais evidente no caso em que a temperatura foi menor (figura 7A).

O consumo da fonte de carbono não diferiu consideravelmente com a temperatura sob o efeito da menor temperatura (figura 7A). A linhagem PE-2 foi a espécie que acumulou maiores concentrações de trealose chegando a 325 e 525 nmol de trealose/mg de células seca para ambas as condições estudadas a 30°C e 37°C (figura 7A e 7B), respectivamente. Também para ambas as condições em análise, a linhagem CAT-1 terminou o processo com níveis intermediários de trealose, enquanto a ETHANOL RED™ com níveis inferiores.

Em relação à biossíntese de trealose os dados indicaram que apesar do etanol e da temperatura induzirem a síntese do dissacarídeo, aparentemente, na presença de glicose 20%, condição na qual o processo fermentativo é predominante, ocorreu maior acúmulo de trealose e isto aconteceu nas etapas finais de fermentação, quando a concentração de etanol é máxima. O acúmulo de trealose foi maior quando estas células foram fermentadas em temperaturas mais altas, evidenciando sua função protetora, pois é produzido nas células de *Saccharomyces cerevisiae* em condições de estresse ambiental, como já proposto em muitos trabalhos na literatura. Essa função ficou também comprovada pela análise dos

dados mostrados na tabela 3, onde a viabilidade para as duas condições em estudo não foi inferior a 90% de células viáveis.

Figura 7 - Produção de biomassa, consumo de açúcar e acúmulo de trealose pelas linhagens industriais em meio YPGlic20% a 30°C **(A)** e a 37°C **(B)** sob agitação de 250 rpm e pH inicial 5,0.



Fonte: elaborada pelo autor.

Tabela 3 - Viabilidade celular das linhagens industriais em meio YPGlic20% a 30°C e a 37°C sob agitação de 250 rpm e pH inicial 5,0.

		Viabilidade celular (% de células vivas)		
		PE-2	**CAT-1**	**ETHANOL RED™**
30°C	**2h**	98,24	100	93,89
	4h	97,10	100	95,49
	6h	96,53	100	95,49
	8h	92,59	100	95,49
37°C	**2h**	95,45	100	94,41
	4h	96,00	100	94,41
	6h	91,84	98,97	94,41
	8h	94,49	96,87	90,91

Fonte: elaborada pelo autor.

4.2. Estudo do comportamento fermentativo das linhagens industriais PE-2, CAT-1 e ETHANO RED™ em mosto a base de caldo de cana-de-açúcar contendo 30% de sacarose (m/v) a 30° e 37°C.

4.2.1. Comportamento fermentativo das linhagens PE-2, CAT-1 e ETHANOL RED™ em mosto a base de caldo de cana-de-açúcar ajustado para concentração de 30% de sacarose (m/v) a 30°C.

A fermentação foi conduzida em alta concentração de sacarose e o ciclo foi iniciado com alta densidade celular para que a maior parte da fonte de carbono seja desviada exclusivamente para a via bioquímica da fermentação

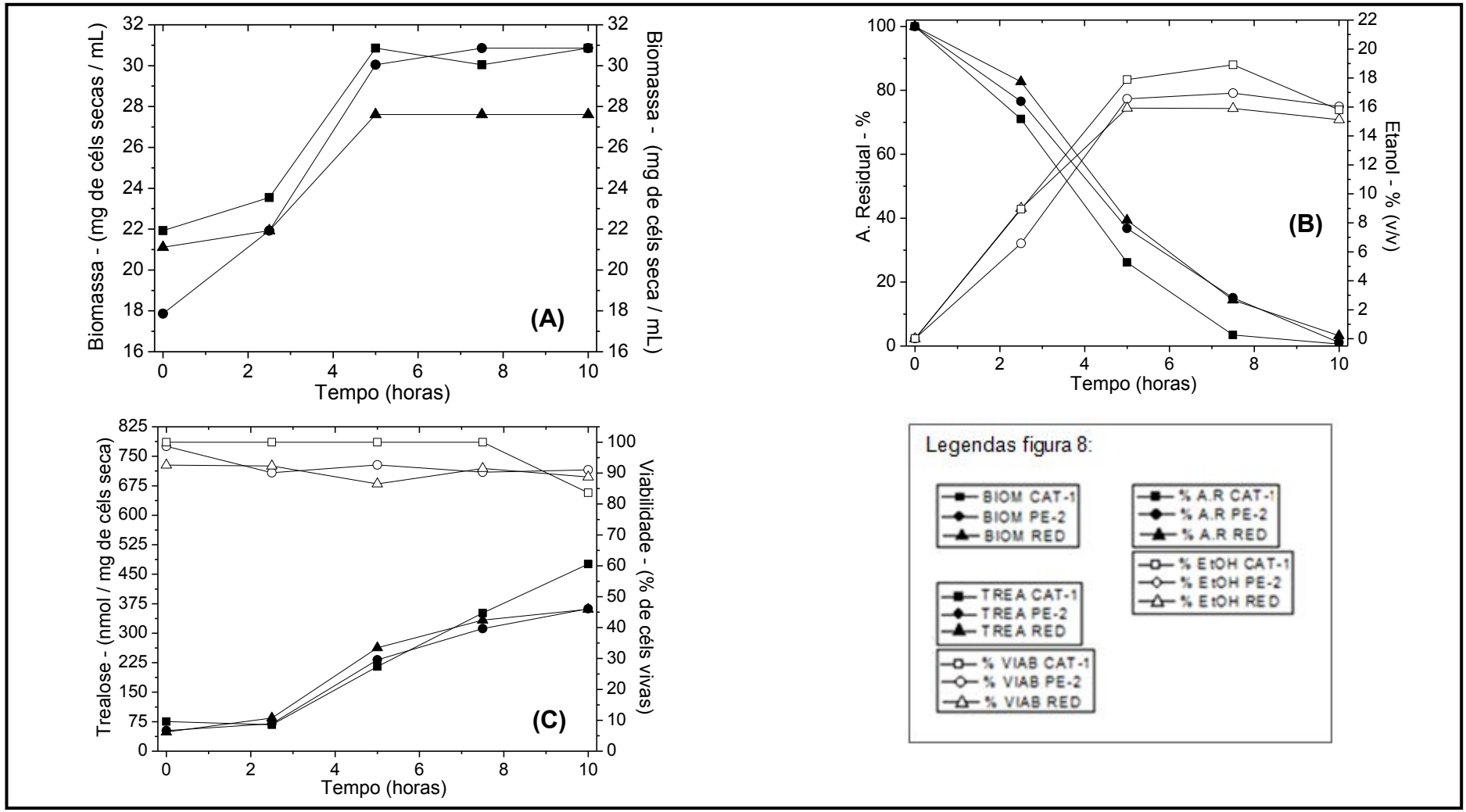
Durante o ciclo a 30°C, figura 8, foi observado que apesar da inoculação de alta densidade celular (~21 mg céls/ml), ocorreu um pequeno aumento da biomassa ao longo do ciclo, atingindo um valor final de aproximadamente, 31 mg céls/ml, e que a linhagem ETHANO RED™ é a espécie mais sensível, apresentado um crescimento menor (figura 8 A).

Em relação ao consumo da fonte de carbono e a produção de etanol, a figura 8B mostrou que no tempo aproximado de 8 horas, quando quase toda a fonte de carbono foi assimilada, houve produção de etanol chegando a níveis de 17% (v/v), não distantes ao valor teórico calculado para a fermentação de 30% de sacarose 19,6% (v/v). Deve-se considerar que estudo controle, na condição de 30°C, indicou a possibilidade de ocorrer a perda por evaporação até 2,2% de etanol

produzido por hora, o que é um indicativo de obtenção de níveis de etanol mais elevados que os mostrados na figura 8B.

A figura 8C mostrou que a concentração de trealose aumentou gradativamente durante o ciclo chegando a níveis próximos a 375 nmol/mg de células seca, próximo ao tempo final de fermentação, indicando a resposta das linhagens ao estresse fermentativo. A porcentagem de células viáveis foi superior a 85%.

Figura 8 - Produção de biomassa **(A)** consumo de açúcar e produção de etanol **(B)** acúmulo de trealose e viabilidade celular **(C)** pelas linhagens industriais na fermentação de meio a base de caldo de cana-de-açúcar contendo 30% de sacarose (m/v), a 30°C, 250 rpm e pH inicial 5,0.



Fonte: elaborada pelo autor.

4.2.2. Comportamento fermentativo das linhagens PE-2, CAT-1 e ETHANOL RED™ em mosto 30% a base de caldo de cana-de-açúcar ajustado para concentração de 30% de sacarose (m/v) a 37°C.

Assim como ocorrido para o experimento a 30°C a fermentação foi conduzida em alta concentração de sacarose e o ciclo foi iniciado com alta densidade celular para que a maior parte da fonte de carbono seja desviada exclusivamente para a via bioquímica da fermentação.

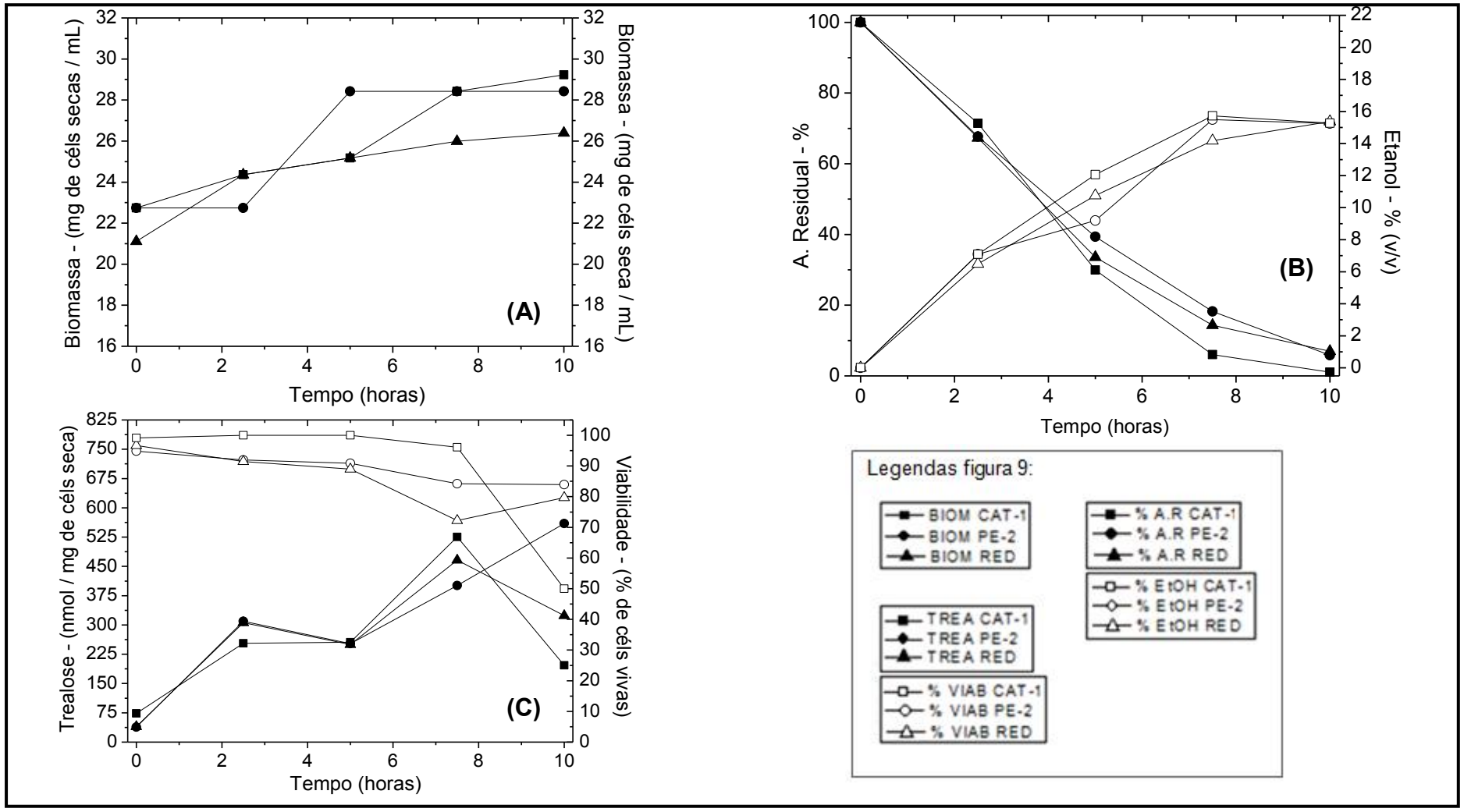
Durante o ciclo a 37°C, figura 9, foi observado que apesar da inoculação de alta densidade celular (~22 mg céls/ml), ocorreu um pequeno aumento da biomassa ao longo do ciclo, atingindo um valor final de, aproximadamente, 28 mg céls/ml. E que a linhagem ETHANOL RED™ foi a espécie mais sensível com a condição em estudo tendo o seu crescimento prejudicado (figura 9A), quando comparado com o crescimento a 30°C.

Em relação ao consumo da fonte de carbono e a produção de etanol (figura 9B), apesar do consumo de açúcar ter chegado próximo a exaustão não foi consumido totalmente pelas linhagens PE-2 e ETHANOL RED™ em ambos os casos. A produção de etanol, em relação a fermentação em temperaturas inferiores ficou prejudicada atingindo níveis próximos a 15% (v/v) para todas as espécies estudadas, estudos controles mostram que quando as células são fermentadas a 37°C ocorre perda por evaporação de aproximadamente 3,3% de etanol produzido por hora.

A figura 9C mostrou a viabilidade celular e o acúmulo de trealose pelas linhagens durante o ciclo. A concentração de trealose aumentou próximo ao tempo de 2,5 e 7,5 horas atingindo níveis de 300 a 525 nmol/mg de células seca, respectivamente, níveis maiores do que na condição de 30°C (figura 8C). A viabilidade, apesar das condições estressantes ocasionadas pelo meio, manteve-se alta próximo a 80% de células viáveis.

Os resultados obtidos em diferentes temperaturas mostraram que as células de *Saccharomyces* conseguem fermentar altas concentrações de fonte de carbono em altas temperaturas, pois possui mecanismos de defesa, como a produção de trealose, que mantém as células em condições fisiológicas adequadas.

Figura 9 - Produção de biomassa **(A)** consumo de açúcar e produção de etanol **(B)** acúmulo de trealose e viabilidade celular **(C)** pelas linhagens industriais na fermentação de meio a base de caldo de cana-de-açúcar contendo 30% de sacarose (m/v), a 37°C, 250 rpm e pH inicial 5,0.



Fonte: elaborada pelo autor.

4.3. Estudo do perfil fermentativo das linhagens industriais de *Saccharomyces cerevisiae* durante reciclos celulares: em meio YPSac30% e em mostos a base de caldo de cana-de-açúcar ajustado com diferentes concentrações de sacarose 21, 30 e 35% (m/v) a diferentes temperaturas de cultivo 30° e 37°C.

4.3.1. Perfil fermentativo das linhagens ETHANOL RED™, PE-2, SA-1, CAT-1 e BG em meio YPSac30% a 30°C.

Nas figuras 10 e 11 estão representados os perfis fermentativos das linhagens ETHANOL RED™, PE-2, SA-1, CAT-1 e BG quando cultivadas por 10 horas em meio YPSac30%, e durante 10 ciclos consecutivos de 10 horas cada.

A análise da figura 10 mostra a variação dos parâmetros fermentativos das linhagens durante o primeiro ciclo, indicando que apesar de iniciar o experimento com alta densidade celular, ocorreu considerável acúmulo adicional de biomassa, que variou entre as linhagens, e foi maior para a linhagem BG e menor para a ETHANOL RED™. Mesmo com as diferenças de biomassa, o consumo de sacarose foi similar entre as leveduras (figura 10D) e a utilização total do açúcar ocorreu entre 8 e 10 horas de fermentação, e foi atingindo teores de etanol que variaram, em um valor médio de 15% (v/v), sendo que o rendimento teórico de etanol para o consumo total de 30% de sacarose (m/v) é de 19,6% (m/v). A viabilidade celular também variou, e a ETHANOL RED™ foi a que apresentou maior sensibilidade ao estresse fermentativo. Os dados da Figura 10C mostram considerável aumento do acúmulo de trealose, indicando a resposta das linhagens frente ao estresse osmótico e etanólico.

Na figura 11A é possível observar que não houve grande variação de crescimento microbiano de um ciclo para outro, exceto no caso em que durante os ciclos a viabilidade atingiu valores próximos a 50%. Nesta condição, conforme sugerido por Pereira et al., (2012), o cultivo foi submetido a um procedimento com o objetivo de recuperar a viabilidade celular, e que consistiu em diminuir pela metade a biomassa, permitindo que a linhagem entrasse em um novo processo de crescimento celular. Este procedimento, conhecido como sangria, foi realizado no final dos ciclos 4, 6, 7, 8 e 9 com as linhagens CAT-1, SA-1, ETHANOL RED™, CAT-1 e SA-1, respectivamente e mostrou que a biomassa foi recuperada partindo-

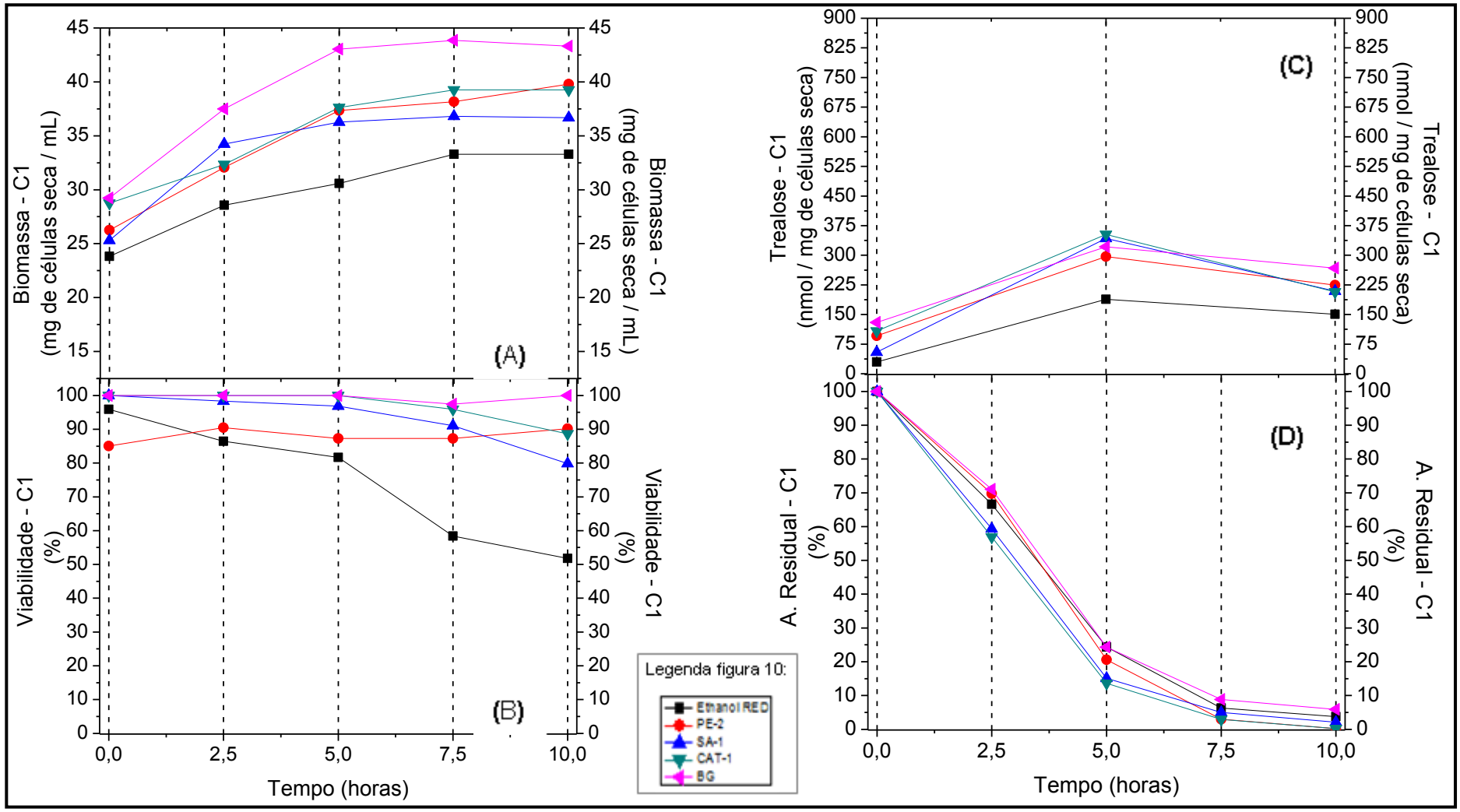
se de uma concentração menor de células, até por existir maior disponibilidade de nutrientes para uma quantidade menor de células.

Com análise da figura 11B verificou-se uma queda continua da viabilidade celular até próximo ao quinto ciclo, mais característica para algumas linhagens como a PE-2 e a SA-1. A linhagem ETHANOL RED^{TM} mostrou queda na viabilidade até o segundo ciclo e a partir de então um aumento progressivo desta, talvez refletindo um processo de adaptação. A linhagem BG mostrou ser a que menos sofreu com o ambiente estressante, pois tem uma diminuição mais lenta na viabilidade ao longo dos ciclos, sendo desnecessárias estratégias de recuperação da viabilidade celular.

A análise da figura 11C indicou o aumento da quantidade intracelular de trealose para as linhagens quando submetidas à fermentação como forma de proteção ao estresse metabólico induzido por altas concentrações de açúcar e de etanol, como descrito em vários trabalhos na literatura, refletindo uma forma de proteção celular. A análise da figura também sugere que quando ocorreu recuperação da viabilidade houve também acúmulo de trealose, após uma pequena queda da mesma.

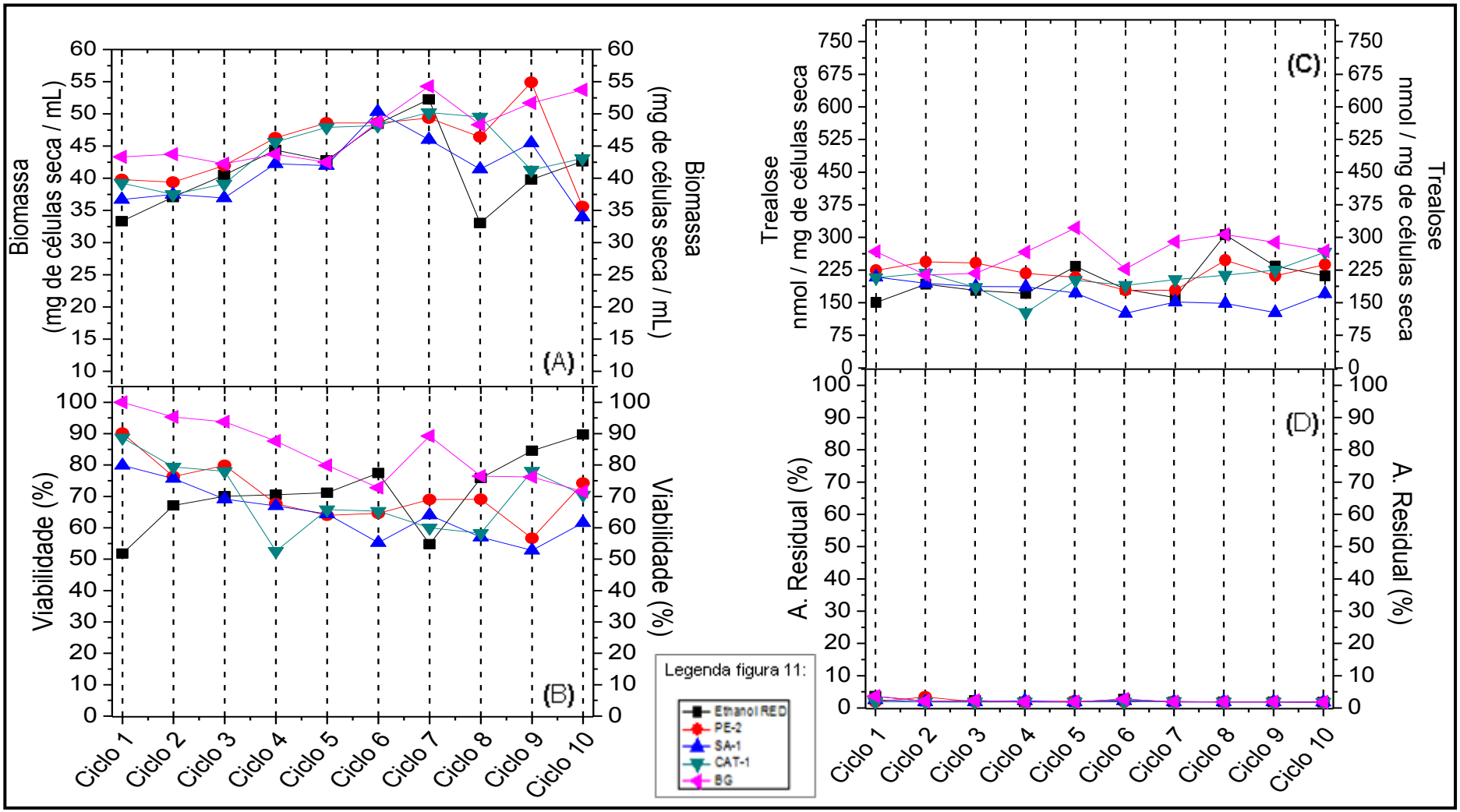
A figura 11D mostra o perfil de consumo de açúcar pelas linhagens durante os ciclos indicando que todas consumiram todo o açúcar disponível no meio de fermentação. Apesar do consumo eficiente da fonte de carbono durante os ciclos sucessivos, os níveis de etanol obtidos experimentalmente por cromatografia gasosa foi entre 15,5 e 16,0 % (v/v). Esperar-se-ia obtenção de vinhos em torno de 19% (v/v) prevista pelo rendimento teórico. Parte desta perda deve se atribuída a perdas por evaporação, que ocorre durante o processo fermentativo e também devido ao tempo de armazenamento. Estudos controles indicam que pode haver a perda por evaporação de até 2,2% de etanol produzido por hora a 30°C.

Figura 10 - Produção de biomassa **(A)** viabilidade celular **(B)** acúmulo de trealose **(C)** consumo de açúcar **(D)** para as linhagens industriais ETHANOL RED ™, PE-2, SA-1, CAT-1 e BG durante o primeiro ciclo de fermentação em meio YPSac30%, a 30°C, 250 rpm e pH inicial 5,0.



Fonte: elaborada pelo autor.

Figura 11 - Produção de biomassa (A) viabilidade celular (B) acúmulo de trealose (C) consumo de açúcar (D) para as linhagens industriais ETHANOL RED™, PE-2, SA-1, CAT-1 e BG durante dez ciclos de fermentação de dez horas em meio YPSac30%, a 30°C, 250 rpm e pH inicial 5,0.



Fonte: elaborada pelo autor.

4.3.2. Perfil fermentativo da linhagem CAT-1 em meio a base de mosto de caldo de cana ajustado para 21% de sacarose (m/v) sem e com suplementação nutricional de 2% de peptona (m/v) e 2% de extrato de levedo (m/v) a 30°C.

As figuras 12 e 13 representam o perfil fermentativo da linhagem CAT-1 quando cultivadas por 6 horas, em mosto a base de caldo de cana-de-açúcar, contendo 21% de sacarose (m/v), com e sem suplementação de 2% de peptona (m/v) e 2% de extrato de levedo (m/v).

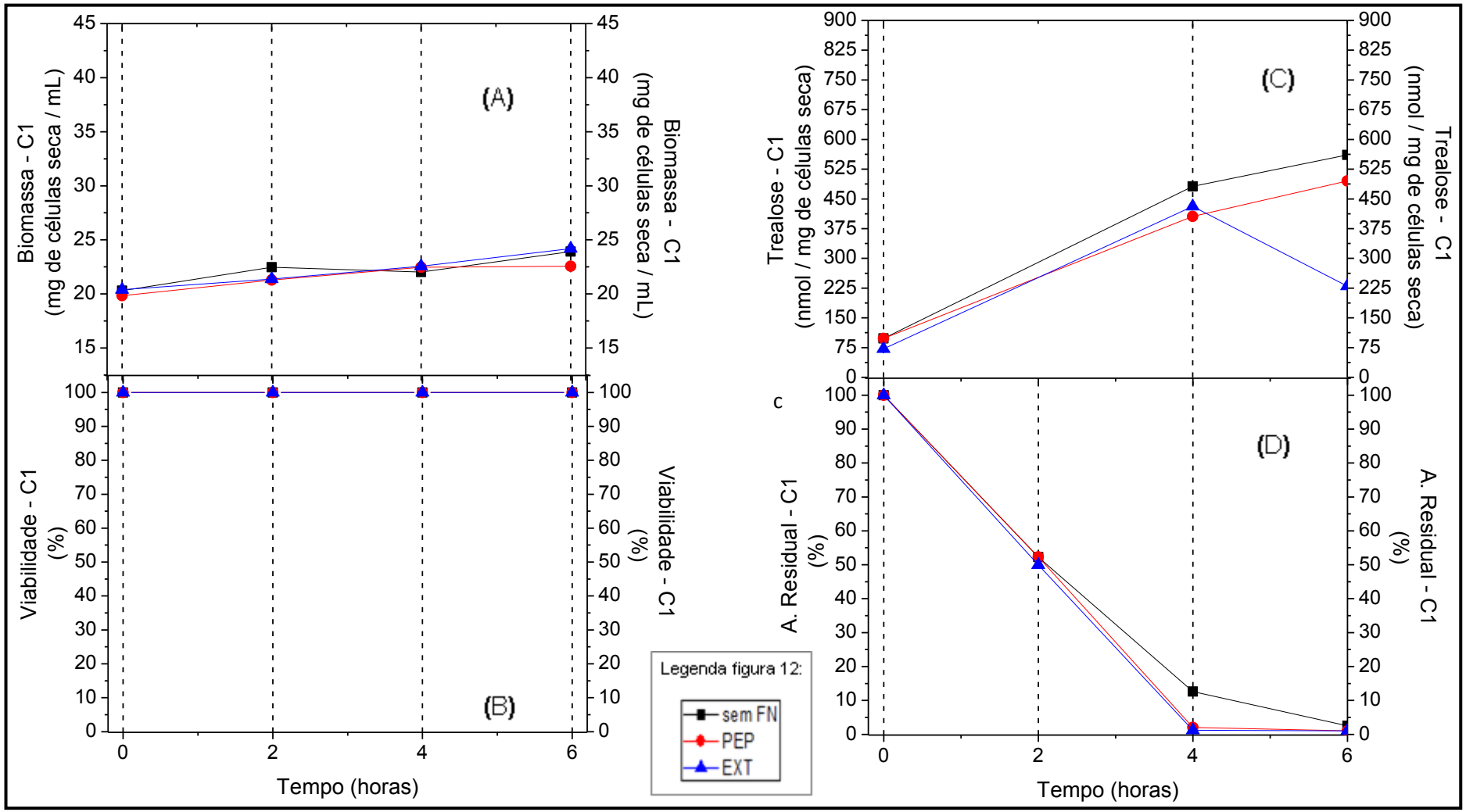
Como apresentado na figura 12D, no primeiro ciclo, houve todo o consumo do açúcar entre 4 e 5,5 horas de processo, e quando fermentada em meio suplementado com fontes de nitrogênio (peptona e extrato de levedo) o consumo foi um pouco mais eficiente. Da mesma forma como aconteceu para o estudo com YPSac30%, o consumo da fonte de carbono foi total nas três condições estudadas portanto esperaria-se um rendimento etanólico de 13,6% (v/v), rendimento teórico para o consumo total de 21% de sacarose (m/v). Ademais, houve pequena variação no crescimento celular, figura 12A, a viabilidade foi mantida nas três condições (figura 12B), e o acúmulo de trealose foi expressivo, indicando que houve uma resposta das células frente à situação de estresse gerada pelo processo fermentativo (figura 12C).

Durante os ciclos, nos pontos finais, também foram analisados os mesmos parâmetros já descritos e estão mostrados nos gráficos da figura 13. Como no experimento com o meio YPSac30% não houve uma grande variação na produção de biomassa de um ciclo para o outro. E da mesma forma aconteceu para essa fermentação em mosto com 21% de sacarose, figura 13A, exceto para os três primeiros ciclos. A partir do quarto ciclo a quantidade de biomassa permaneceu aproximadamente constante as três condições fermentativas.

Quanto a viabilidade, as células mantiveram-se viáveis (em torno de 95% de células vivas) durante os 10 ciclos analisados nas três condições fermentativas, figura 13A. Assim, a manutenção da viabilidade celular neste experimento sugeriu indicar a robustez fermentativa da levedura.

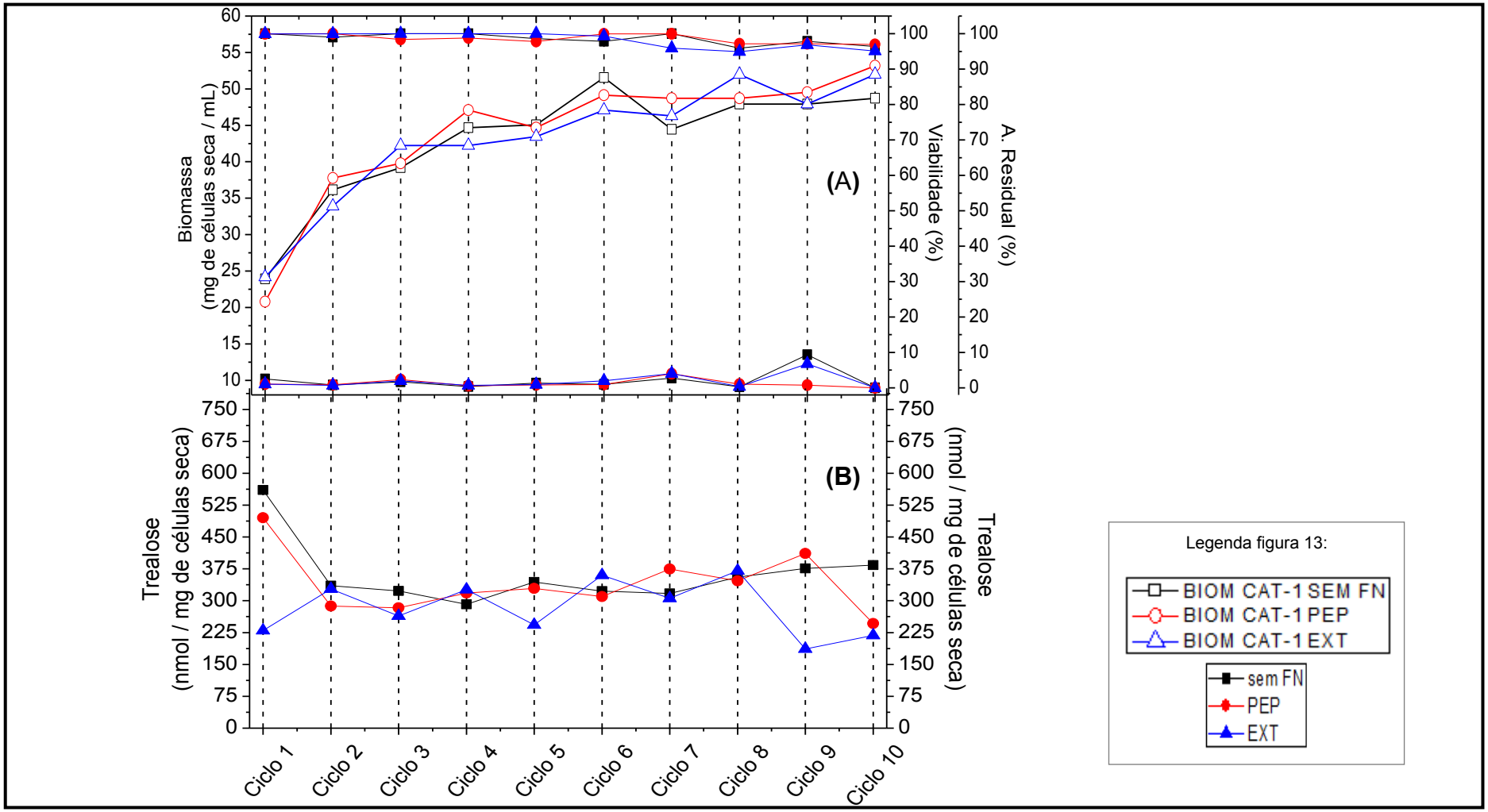
O acúmulo de trealose, como já observado na figura 11C ficou mais evidenciado quando as células foram transferidas da fase estacionária do pré-inóculo para o meio de fermentação com alta concentração de açúcar. Durante os ciclos são observados pequenas quedas e recuperações da trealose como mostrado na figura 13C. Pequenas oscilações podem resultar do processo de extração da trealose, mas os resultados indicam que o processo fermentativo sempre induz considerável aumento na quantidade deste dissacarídeo.

Figura 12 - Produção de biomassa **(A)** viabilidade celular **(B)** acúmulo de trealose **(C)** consumo de açúcar **(D)** para a linhagem CAT-1 durante o primeiro ciclo de fermentação em meio a base de caldo de cana-de-açúcar com 21% de sacarose (m/v), sem e com 2% de fonte de nitrogênio (m/v), a 30°C, 250 rpm e pH inicial 5,0.



Fonte: elaborada pelo autor.

Figura 13 - Produção de biomassa, viabilidade celular e consumo de açúcar **(A)** acúmulo de trealose **(B)** para a linhagem CAT-1 durante dez ciclos de seis horas em meio a base de caldo de cana-de-açúcar com 21% de sacarose (m/v), sem e com 2% de fonte de nitrogênio (m/v), a 30°C, 250 rpm e pH inicial 5.



Fonte: elaborada pelo autor.

4.3.3 Perfil fermentativo da linhagem CAT-1 em meio a base de mosto de caldo de cana ajustado para 30% de sacarose (m/v) sem e com suplementação nutricional de 2% de peptona (m/v) e 2% de extrato de levedo (m/v) a 30°C.

A figura 14 mostra os perfis fermentativos do primeiro ciclo da linhagem CAT-1 em meio suplementado com 2% de peptona (m/v) ou com 2% de extrato de levedo (m/v), e sem suplementação nutricional. Observa-se que apesar da inoculação de alta densidade celular (~25 mgcéls/ml), ocorreu um aumento da biomassa ao longo do ciclo, atingindo um valor final de, aproximadamente, 38 mg céls/ml. A análise da figura 14D indica que houve consumo total da sacarose após 10 horas de cultivo, com a manutenção da viabilidade celular, apesar de ter atingindo teores de etanol que variaram na faixa de 15,5 a 16,5% (v/v). E como nos experimentos anteriores, o processo fermentativo induziu o acúmulo de trealose (figura 14C).

A figura 15A mostra a concentração final de biomassa pela linhagem CAT-1 em dez ciclos de fermentação em meio com e sem suplementação nutricional. Observa-se que não ocorreu grande variação da quantidade de biomassa de um ciclo para outro, o que revela um aspecto favorável, pois indica que a utilização da sacarose é preferencialmente canalizada para a produção de etanol, e não de biomassa.

A figura 15B mostra a variação da viabilidade celular pela linhagem CAT-1 durante os dez ciclos de fermentação em meio suplementado ou sem suplementação nutricional. E através do perfil apresentado pôde-se observar que existiu uma diminuição lenta e gradativa da viabilidade celular, o que se acentuou no quinto ciclo, principalmente no meio sem suplementação nutricional, atingindo um valor em torno de 50%.

Seguindo o sugerido por Pereira et al., (2012) durante os ciclos, quando a viabilidade celular atingiu 50%, estratégia para recuperar a vitalidade celular para prosseguir os ciclos foi adotada. Assim sendo, como na fermentação com meio YPSac com 30% de sacarose, a sangria foi realizada quando as linhagens atingiram viabilidade em torno de 50%. No meio sem suplementação foi feita sangria celular no final do quinto, isto é, a biomassa inicial do sexto ciclo foi reduzida a aproximadamente 20 mg de massa seca/mL. Como a viabilidade celular, apesar

desta estratégia, continuou baixa (45% no sexto ciclo, e 53,8%, no sétimo ciclo), no início do oitavo ciclo, a fração sem suplementação foi dividida em duas, e a elas foi adicionado extrato de levedo em uma e peptona na outra. Observando os gráficos da figura 15 é possível identificar que suplementação nutricional induziu a uma nova fase de crescimento, com a concomitante recuperação da vitalidade fermentativa, elevação da viabilidade celular e exaustão da fonte de carbono. Esses dados indicam a importância da suplementação nutricional no desempenho fermentativo das leveduras industriais em mostos com alta concentração de sacarose.

A sangria celular também foi realizada para o meio suplementado com extrato de levedo, no final do sétimo ciclo, mas não houve recuperação significativa do desempenho fermentativo da levedura, inclusive com acentuada perda da viabilidade celular ao final do décimo ciclo.

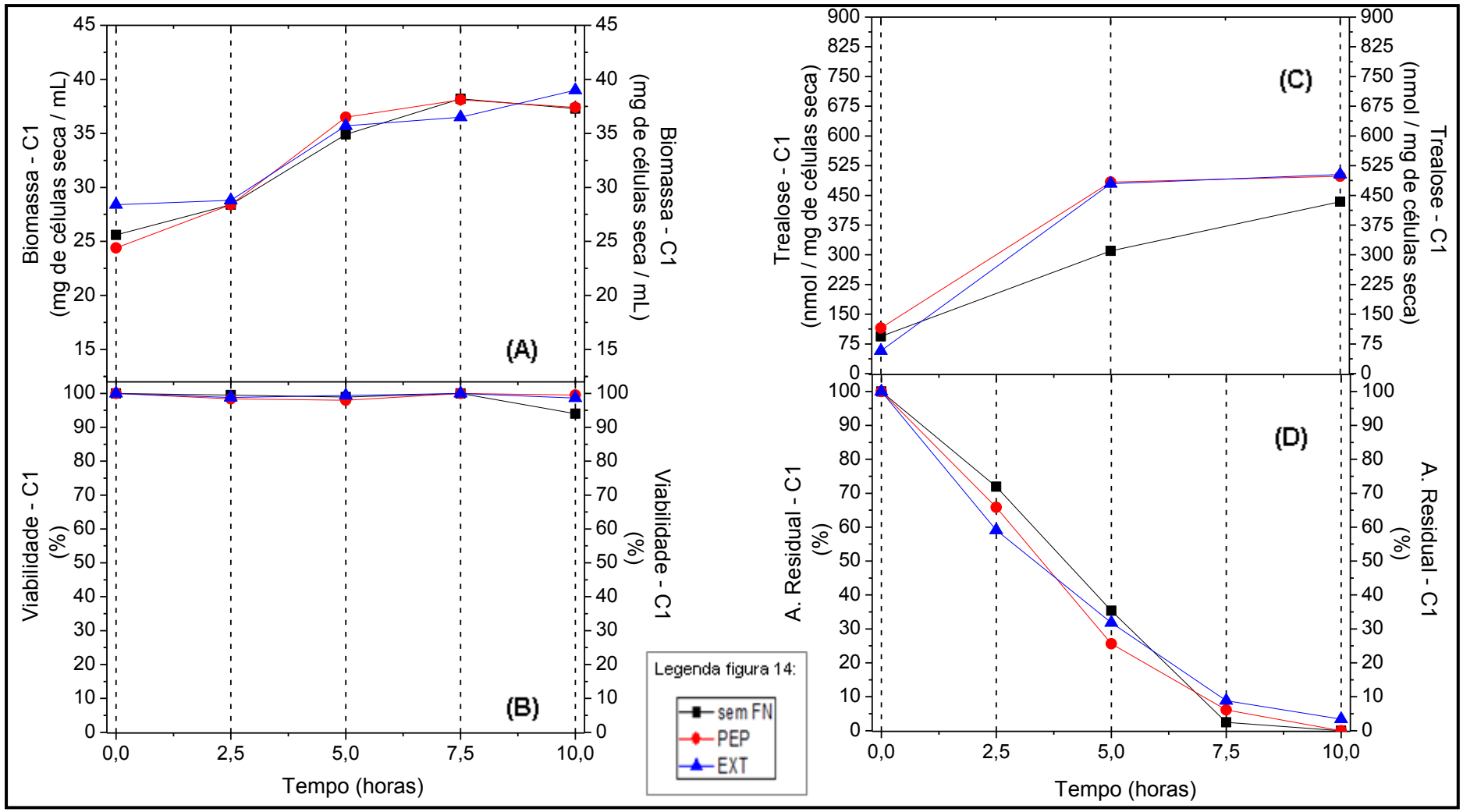
A figura 15C mostra a concentração final de trealose produzida pela linhagem durante os dez ciclos de fermentação em meio suplementado ou sem suplementação nutricional. É possível concluir que durante o primeiro ciclo, para todas as condições, houve um aumento considerável de trealose produzida pelas células, quando comparado com o inóculo (figura 14C). De maneira similar ao que foi observado com YPSac30% e em mosto contendo sacarose 30% e 21% (m/v), as leveduras industriais parecem responder ao estresse fermentativo através da síntese do dissacarídeo. Resultado este que justificou o que já fora mencionado na literatura por Neves et al., (1994) no qual relatou que em fungos a presença de trealose não está associada somente com reserva de energia, mas também como resultado do desenvolvimento de processos de adaptação para condições ambientais estressantes.

Após os primeiros ciclos, a concentração de trealose diminuiu gradativamente sendo que a queda foi mais acentuada para as células em meio sem suplementação nutricional e em meio contendo extrato de levedo. A figura 15C também mostra que a partir do oitavo ciclo, quando foi adicionado suplemento no meio sem suplementação, ocorreu um aumento significativo da concentração de trealose, indicando que esta estratégia pode ajudar as células a recuperarem sua vitalidade fermantativa, ao que se refere à viabilidade celular, consumo de açúcar e produção de etanol.

Os parâmetros fermentativos sugerem ocorrer uma queda gradativa no desempenho fermentativo ao longo dos ciclos. A queda da concentração da trealose ao longo dos ciclos, associada à perda da viabilidade celular, pareceu ser uma indicação adicional da perda da vitalidade fermentativa pelas leveduras industriais.

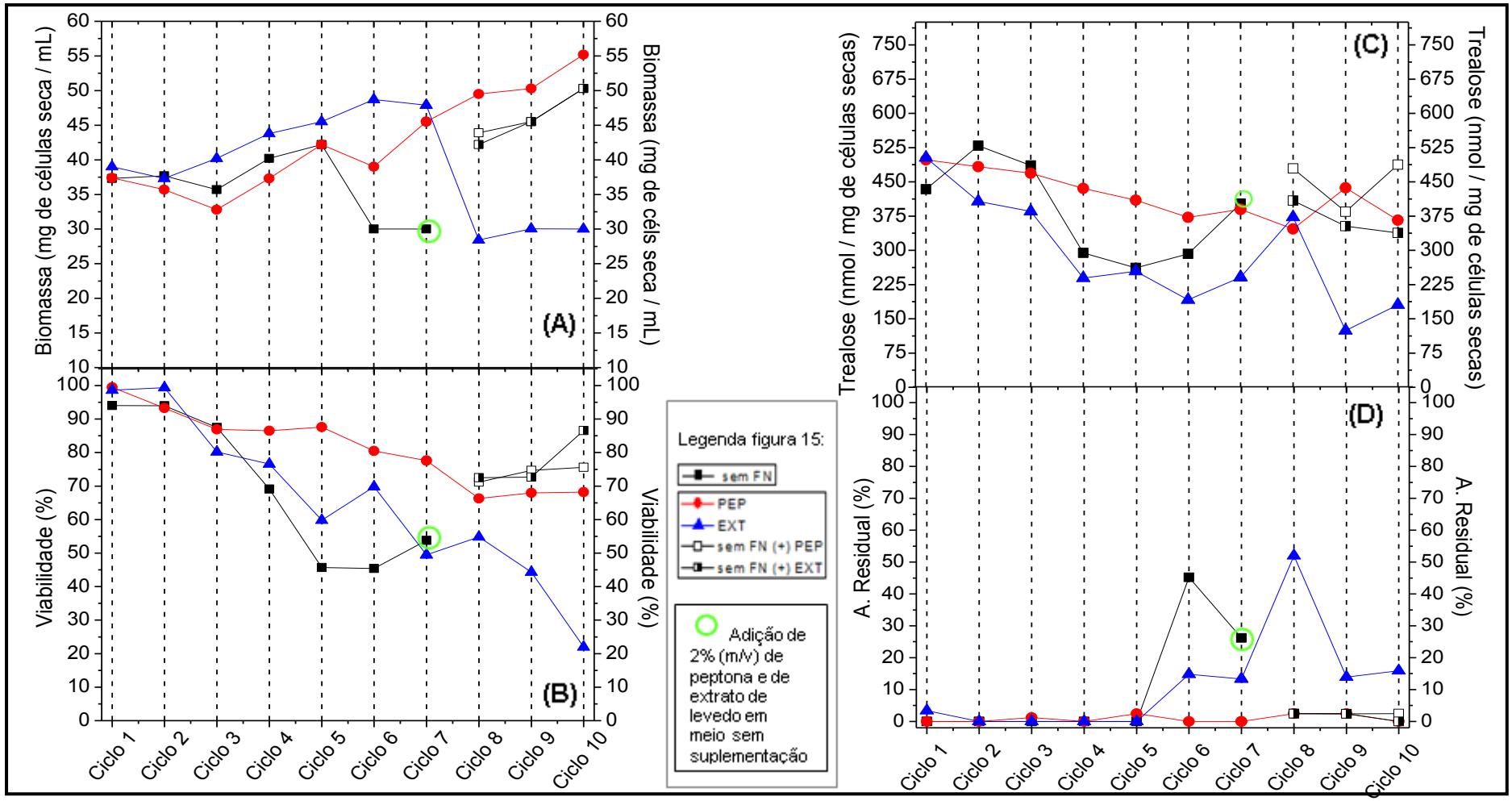
A figura 15D mostra o consumo de açúcar pela linhagem CAT-1 nos dez ciclos de fermentação em meio com e sem suplementação nutricional. Assim, através da analise da figura é possível concluir que houve consumo dos açúcares fermentescíveis, exceto nos casos em que foi realizado algum tipo de estratégia para a recuperação da vitalidade celular. Os níveis de etanol ficaram em torno de 16% (v/v), abaixo do rendimento teórico, resultado que pode ser decorrente da evaporação devido a agitação, temperatura e tempo de armazenamento, como já mencionado anteriormente.

Figura 14 - Produção de biomassa **(A)** viabilidade celular **(B)** acúmulo de trealose **(C)** consumo de açúcar **(D)** para a linhagem CAT-1 durante o primeiro ciclo de fermentação em meio a base de caldo de cana-de-açúcar com 30% de sacarose (m/v), sem e com 2% de fonte de nitrogênio (m/v), a 30°C, 250 rpm e pH inicial 5,0.



Fonte: elaborada pelo autor.

Figura 15 - Produção de biomassa **(A)** viabilidade celular **(B)** acúmulo de trealose **(C)** consumo de açúcar **(D)** para a linhagem industrial CAT-1 durante dez ciclos de fermentação de dez horas em meio a base de caldo de cana-de-açúcar com 30% de sacarose (m/v), sem e com 2% de fonte de nitrogênio (m/v), a 30°C, 250 rpm e pH inicial 5,0.



Fonte: elaborada pelo autor.

4.3.4. Perfil fermentativo da linhagem CAT-1 em meio a base de mosto de caldo de cana ajustado para 35% de sacarose (m/v) sem e com suplementação nutricional de 2% de peptona (m/v) e 2% de extrato de levedo (m/v) a 30°C.

A figura 16 mostra os perfis fermentativos do primeiro ciclo da linhagem CAT-1 em meio suplementado com 2% de peptona (m/v) ou com 2% de extrato de levedo (m/v), e sem suplementação nutricional. Observa-se que apesar da inoculação de alta densidade celular (~22mgcéls/ml), ocorreu aumento da biomassa ao longo do ciclo, atingindo um valor final de, aproximadamente, 32,5 mg céls/ml. A análise da figura 16D indica que houve consumo total da sacarose após 12 horas de cultivo, com a manutenção da viabilidade celular figura 15B, atingindo teores de etanol equivalentes ao teórico (22,7) que variaram na faixa de 22,5% (v/v). Como nos experimentos anteriores, o processo fermentativo induziu o acúmulo de trealose (figura 16C).

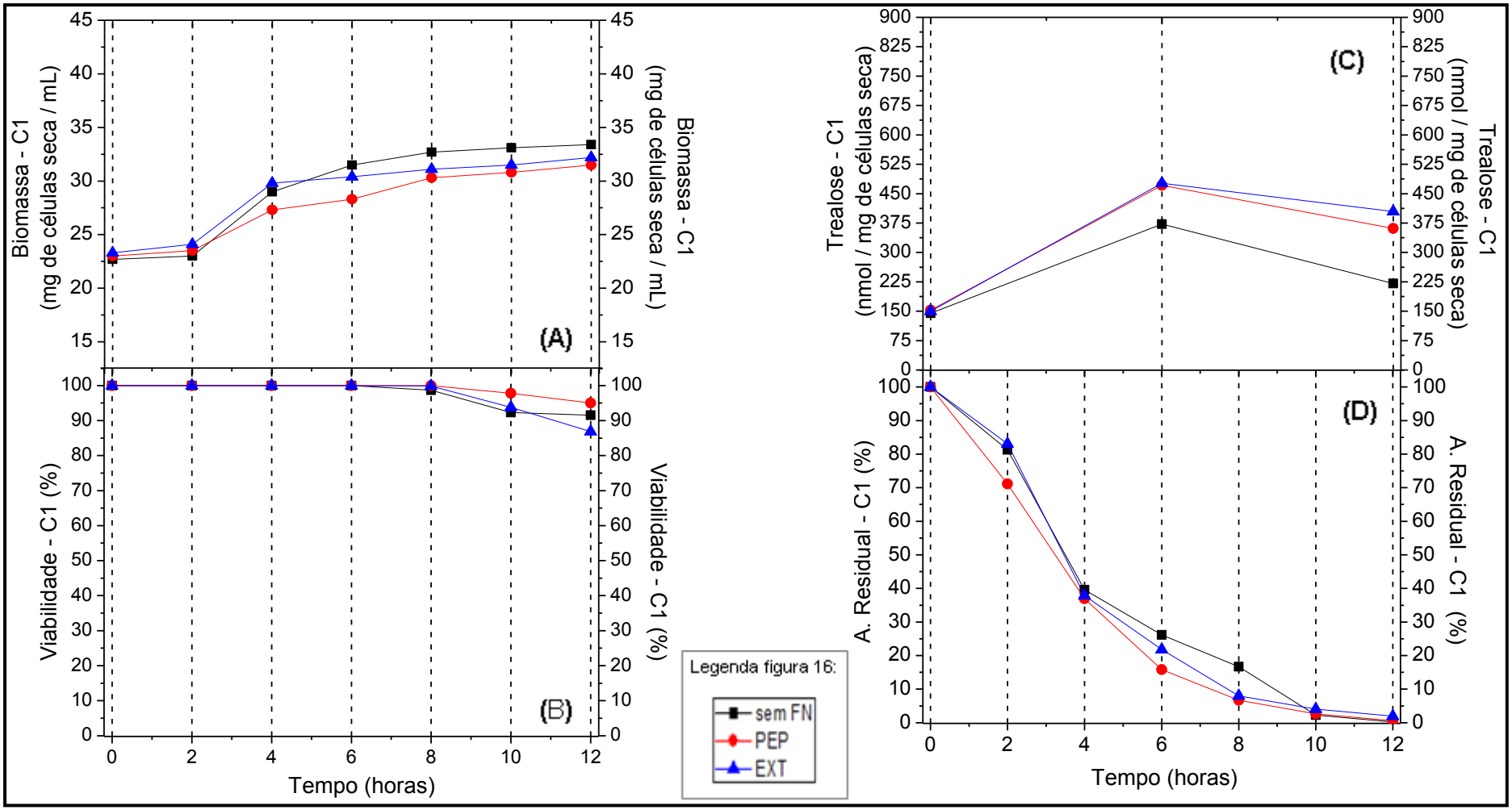
A figura 17A mostra a concentração final de biomassa pela linhagem CAT-1 em dez ciclos de fermentação em meio com e sem suplementação nutricional. Observa-se que não houve grande variação da quantidade de biomassa de um ciclo para outro.

Nesta condição, onde a concentração de sacarose no meio foi aumentada para valores finais de 35% (m/v), a viabilidade das células diminuiu durante os ciclos ficando mais evidente para as células em meio suplementado, figura 17B, chegando a valores inferiores a 50% de células vivas. Essa diminuição pode ser explicada devido ao conjunto de estresse causado pelo meio nutricional, como a possibilidade de ocorrência de produção mais eficiente de etanol.

A figura 17C mostra a concentração final de trealose. Nos primeiros ciclos ocorreu aumento considerável de trealose nas células crescidas em meio sem suplementação nutricional, e o acúmulo de trealose é sempre acentuado nas condições de fermentação, e muito mais acentuado que o determinado no inoculo. Após o quinto ciclo, a concentração de trealose se manteve constante, em torno de 450 nmol/mg de células seca. Níveis mais baixos de trealose foram encontrados nas células em meio suplementado com peptona e extrato de levêdo após o quarto ciclo em torno de 290 e 280 450 nmol/mg de células seca, respectivamente, talvez como reflexo da perda de viabilidade celular.

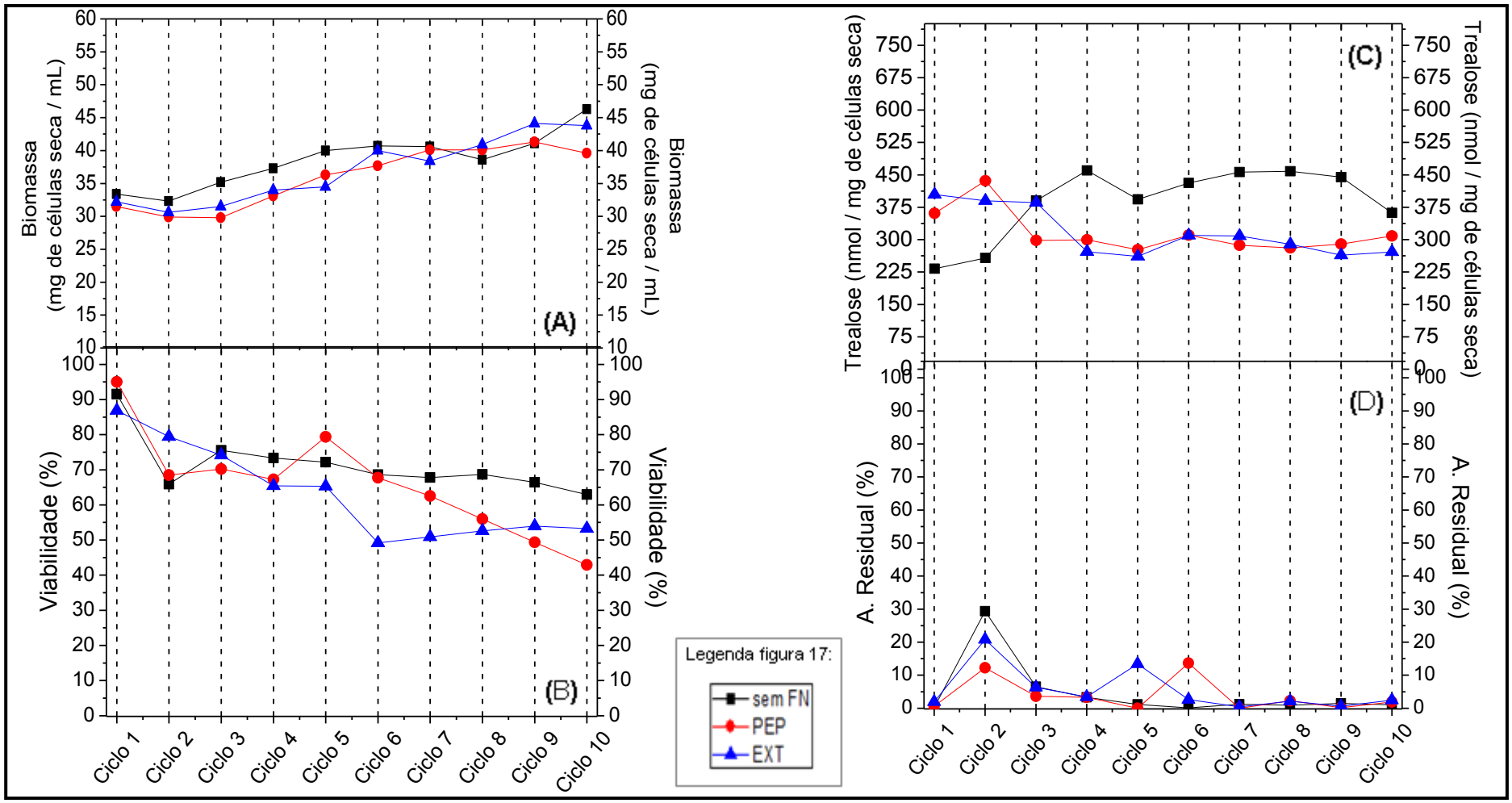
A figura 17D mostra que houve consumo total dos açúcares fermentescíveis a partir do terceiro ciclo pela linhagem CAT-1, nos ciclos de fermentação, em meio com e sem suplementação nutricional, o que sugere ser possível conduzir a fermentação de mosto contendo sacarose com até 35% (m/v), exceto pelo fato desta condição induzir considerável perda de viabilidade (figura 17B).

Figura 16 - Produção de biomassa **(A)** viabilidade celular **(B)** acúmulo de trealose **(C)** consumo de açúcar **(D)** pela linhagem CAT-1 durante o primeiro ciclo de fermentação em meio a base de caldo de cana-de-açúcar com 35% de sacarose (m/v), sem e com 2% de fonte de nitrogênio (m/v), a 30°C, 250 rpm e pH inicial 5,0.



Fonte: elaborada pelo autor.

Figura 17 - Produção de biomassa **(A)** viabilidade celular **(B)** acúmulo de trealose **(C)** consumo de açúcar **(D)** para a linhagem CAT-1 durante dez ciclos de fermentação de doze horas em meio a base de caldo de cana-de-açúcar com 35% de sacarose (m/v), sem e com 2% de fonte de nitrogênio (m/v), a 30°C, 250 rpm e pH inicial 5,0.



Fonte: elaborada pelo autor.

4.3.5. Perfil fermentativo da linhagem CAT-1 em meio a base de mosto de caldo de cana ajustado para 30% de sacarose (m/v) sem e com suplementação nutricional de 2% de peptona (m/v) e 2% de extrato de levedo (m/v) a 37°C.

A figura 18 mostra os perfis fermentativos do primeiro ciclo da linhagem CAT-1 em meio suplementado com 2% de peptona (m/v) ou com 2% de extrato de levedo (m/v), e sem suplementação nutricional. Observa-se que não ocorreu considerável aumento da biomassa ao longo do ciclo. A análise da figura 18B indica que houve queda na viabilidade após cinco horas de fermentação nas três condições estudadas sendo mais acentuada nos meios suplementados. A figura 18D apresenta o perfil de consumo de açúcar que foi eficientemente utilizado em dez horas, sendo que a velocidade de consumo foi maior para as células cultivadas em meio com suplementação. Como nos experimentos anteriores, o processo fermentativo induziu o acúmulo de trealose especialmente para as células cultivadas em meio sem suplementação por fonte de nitrogênio (figura 18C).

A figura 19A mostra a concentração final de biomassa pela linhagem CAT-1 em oito ciclos de fermentação de mosto contendo sacarose 30%, a 37°C, e observa-se que não houve grande variação da quantidade de biomassa de um ciclo para outro. Nesta condição, as células perderam a viabilidade durante os ciclos ficando mais evidente para as células em meio suplementado (figura 19B). A viabilidade chegou a valores inferiores a 50% de células vivas e por isso o experimento foi interrompido no oitavo ciclo. Essa diminuição acentuada da viabilidade pode ser explicada pelo conjunto de estresses causados pelo processo fermentativo que são amplificados a 37°C.

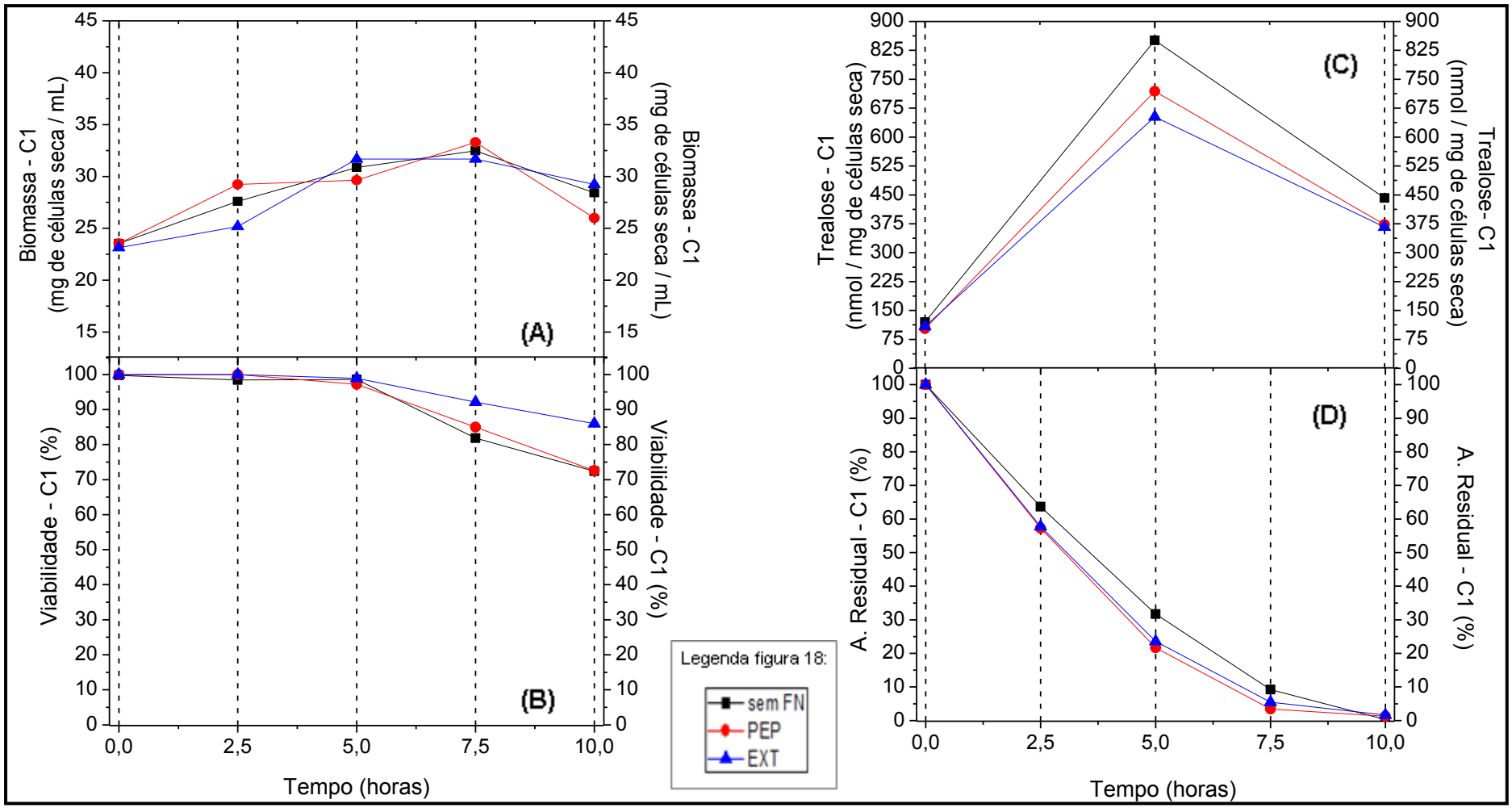
A figura 19C mostra a concentração de trealose ao final dos ciclos, e foi possível observar aumento na biossíntese de trealose nas células crescidas em meio sem e com suplementação nutricional, sendo que o acúmulo de trealose foi mais evidente para as células cultivadas em meio sem suplementação, o que pode explicar a resistência das células em relação a perda da viabilidade.

A figura 19D mostra o consumo de açúcar pela linhagem CAT-1 nos oito ciclos de fermentação em meio com e sem suplementação nutricional. Assim, através da analise da figura é possível concluir que não houve consumo total dos açúcares fermentescíveis do segundo ciclo em diante. Mostrando que as células não recuperaram a vitalidade fermentativa nesta condição experimental. As células

cultivadas em meio sem suplementação apresentou consumo de açúcar mais eficiente do que as células crescidas em meio suplementado.

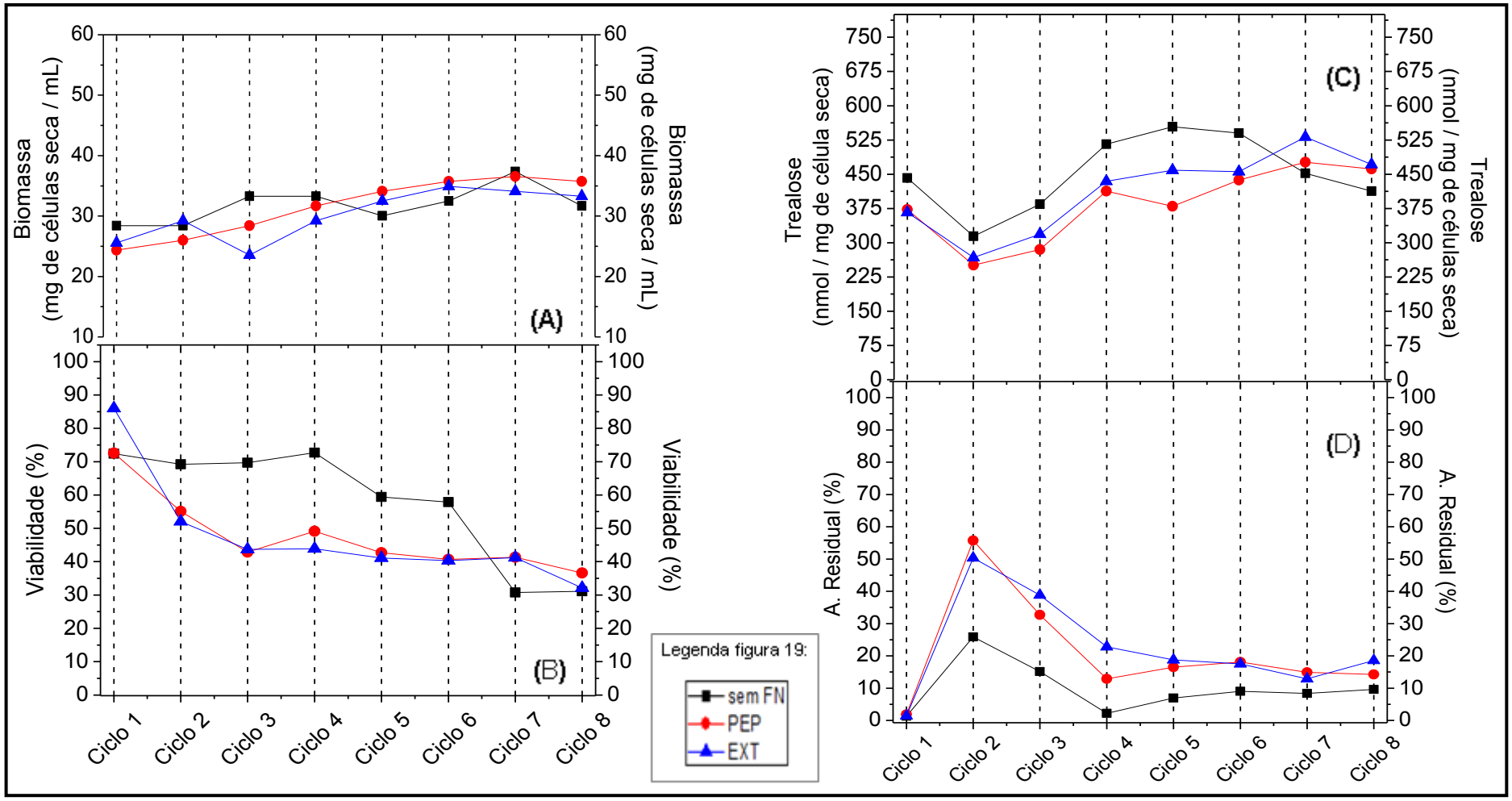
Em relação a produção de etanol, os níveis não ultrapassaram 15% (v/v) ficando abaixo do rendimento teórico esperado. Deve-se ainda considerar o que já fora mencionado anteriormente onde estudos controles mostraram a perda por evaporação de aproximadamente 3,3% de etanol produzido por hora. Além do etanol evaporado durante o processo fermentativo o tempo de armazenamento também deve influenciar na concentração final de produto.

Figura 18 - Produção de biomassa **(A)** viabilidde celular **(B)** acúmulo de trealose **(C)** consumo de açúcar **(D)** para a linhagem CAT-1 durante o primeiro ciclo de fermentação em meio a base de caldo de cana-de-açúcar com 30% de sacarose (m/v), sem e com 2% de fonte de nitrogênio (m/v), a 37°C, 250 rpm e pH inicial 5,0.



Fonte: elaborada pelo autor.

Figura 19 - Produção de biomassa **(A)** viabilidade celular **(B)** acúmulo de trealose **(C)** consumo de açúcar **(D)** para a linhagem CAT-1 durante oito ciclos de fermentação de dez horas em meio a base de caldo de cana-de-açúcar com 30% de sacarose (m/v), sem e com 2% de fonte de nitrogênio (m/v), a 37°C, 250 rpm e pH inicial 5,0.



Fonte: elaborada pelo autor.

Conclusão

5. CONCLUSÃO

Estudo dos perfis de biossíntese de trealose

Os resultados mostraram que o acúmulo de trealose se tornou mais acentuado em condições de fermentação, na presença de alta concentração de glicose, como mostrado no experimento onde as linhagens foram cultivadas em meio YPGlic20% (figura 7). Como já descrito por François et al., (2012) ficou evidenciado que um pouco antes das células entrarem na fase lag de crescimento, a trealose passa a ser acumulada sugerindo ser esta a resposta metabólica ao estresse causado por altas concentrações de etanol. Além do etanol, existe um efeito adicional que é o induzido pela temperatura, e o acúmulo de trealose em temperaturas maiores (37°C) é maior do que o detectado a 30°C, sugerindo que o dissacarídeo atua protegendo as células de agressões ambientais, como presença de etanol no meio e temperaturas mais altas. Em meios contendo baixa concentração de glicose YPGlic2% (figura 5) e a 30° e 37°C ocorreu menor acúmulo desse dissacarídeo pelas células mostrando que o açúcar em baixa concentração é direcionado para a biossíntese celular, efeito crabtree positivo, típico *Saccharomyces cerevisiae* (CRUZ, 2002) e que nestas condições o efeito estressantes são menores, não induzindo a síntese adicional de trealose. Além disso, com os resultados obtidos em meio com baixa concentração de glicose e etanol (YPGLic2%-Etanol10%) (figura 6) foi possível observar que o acúmulo de trealose foi maior do que na ausência do etanol, mostrando que as linhagens respondem ao estresse etanólico, mas parece que a resposta metabólica é mais acentuado em condições de fermentação, e o acúmulo de trealose acontece próximo ao ponto de exaustão da glicose, quando a concentração de etanol deve ser máxima (figura 7) .

Estudo dos perfis fermentativos de três linhagens industriais nas condições de VHG a 30 e 37°C

Os resultados dos perfis de fermentativos em mosto a base de caldo de cana-de-açúcar ajustado para a concentração de 30% de sacarose (m/v) a 30°C (figura 8) mostrou ser menos agressivo do que os perfis fermentativos a 37°C (figura

9) indicando que a temperatura exerce efeito no processo fermentativo, induzindo a perda da viabilidade celular, com efeito sobre vitalidade fermentativa, e na redução da produção de etanol. Sendo está informação foi importante para os estudos de reciclagem de células.

Estudo dos perfis fermentativos da linhagem industrial de *Saccharomyces cerevisiae* CAT-1 em ciclos fermentativos a diferentes concentração de sacarose e temperaturas de cultivo

Levando em consideração que a viabilidade das células fermentadas em mostos concentrados a 30°C (figura 8) foram mantidas altas durante o ciclo, foi estudado como a linhagem CAT-1 responderia aos reciclos fermentativos. A linhagem CAT-1 foi selecionada levando em consideração características fisiológicas, como resistência a altas temperaturas, descritas por Basso et al., (2008).

Os dados indicaram que em meios mais concentrados (sacarose 30%) como no meio YPSac a 30°C, houve consumo total de sacarose, ao longo de dez ciclos sucessivos de fermentação (figuras 10 e 11). Em mosto a base de caldo de cana-de-açúcar, o consumo eficiente da fonte de carbono só foi observado no meio suplementado com peptona. Nas outras condições, após o quinto ciclo (sem suplementação) e sétimo ciclo (com extrato de levedura), ocorreu queda do desempenho fermentativo das linhagens induzindo a perda da viabilidade celular e conseqüente aumento do açúcar residual (figuras 14 e 15).

Na fermentação com 35% de sacarose (m/v) a 30°C, os meios suplementados com fonte de nitrogênio podem não ter propiciado o desempenho fermentativo desejado das linhagens estudadas, sendo que nesses meios elas perderam a viabilidade ao longo dos ciclos, acumularam menores níveis de trealose e o consumo da fonte de carbono oscilou, como mostra a figura 17D. Esses resultados podem indicar que para meios com alta concentração de sacarose e superior a 30%, a suplementação pode não atuar como um fator nutricional efetivo na manutenção da vitalidade fermentativa, como ocorreu no experimento com 30% de sacarose a 30°C (figuras 14 e 15).

As células recicladas em mosto a base de caldo de cana contendo 30% de sacarose (m/v) a 37°C (figuras 18 e 19) mostraram que o aumento de temperatura induz um efeito negativo no desempenho da levedura, mesmo nos meios suplementados. Na fermentação temperatura mais elevada, as linhagens apresentaram maior dificuldade em manter a viabilidade celular e em consumir eficientemente a fonte de carbono ao longo dos ciclos. Considerando que foram obtidos níveis de etanol próximos a 16% de 20% (v/v) nas fermentações em meio contendo sacarose 30% e 35% (m/v), respectivamente, deve-se levar em conta que o aumento da temperatura atua como um amplificador dos estresses fermentativos, principalmente aos ocasionados pelo etanol, que interfere com a integridade da membrana citoplasmática, alterando as suas propriedades de transportes de solutos e a atividades de proteínas de membranas.

Os resultados obtidos sugerem ser possível utilizar as linhagens industriais em fermentação de mostos concentrados em sacarose (VHGFT), e indicam que o consumo total de açúcar e a manutenção da viabilidade celular só foram possíveis, em situações de fermentação com reciclo celular, e que a suplementação nutricional pode ser uma possibilidade de minimizar os efeitos negativos induzidos pelos estresses fermentativos.

De uma maneira geral, em todos os experimentos foi observado que os níveis de trealose em condições de fermentação aumentaram consideravelmente quando comparados com o inóculo, indicando uma possível resposta aos estresses fermentativos, como a alta concentração de açúcar e de etanol.

Na fermentação de mosto a base de caldo de cana com sacarose 21% (m/v) houve consumo total de açúcar, com manutenção da viabilidade celular, mesmo após 10 ciclos fermentativos sucessivos. Isto é uma evidência que as linhagens industriais brasileiras respondem eficientemente às condições nas quais eram foram selecionadas. Entretanto, para o emprego de mostos mais concentrados, para estas mesmas linhagens, os nossos resultados sugerem a necessidade de encontrar condições adequadas de concentração de sacarose e de aditivos nutricionais, além de aperfeiçoamentos operacionais, como tempo de fermentação, agitação e temperatura, para que o processo acorre de forma sustentável, e que propicie às células a retomada de um novo ciclo com vitalidade fermentativa e preservação da viabilidade celular.

Referências

REFERÊNCIAS

AMORIM, H. V.; LEÃO, R. M. **Fermentação alcoólica**: ciência e tecnologia. Piracicaba: Fermentec Publicações, 2005. 433 p.

AZEVEDO, M. S. de; SANTOS, R. V. de O.; MAGALHÃES, T. V. Produção de etanol no Brasil. **Revista de Divulgação do Projeto Universitário Petrobras e IF Fluminense**, v. 2, n. 1, p. 151-154, 2012.

BADOTTI, F. **Modificando o metabolismo de sacarose em *Saccharomyces cerevisiae. In:* Caracterização de populações de leveduras associadas à produção de cachaça artesanal e estudos bioquímicos do metabolismo de sacarose por linhagens de *Saccharomyces cerevisiae***. 2005. 78 f. Dissertação (Mestrado em Ciências dos Alimentos) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005.

BAI, F. W.; ANDERSON, W. A.; MOO-YOUNG, M. Ethanol fermentation technology from sugar and starch feedstocks. **Biotechnology Advances**, n. 1, p. 89-105, 2008.

BARNET, J. A. The utilization of dugars by yeast. **Advanced Carbohydrate Chemistry and Biochemistry**, v. 32, p. 125-234, 1976.

BARROS, L. M. **Metabolismo de trealose e caracterização de trealase citoplasmática em *Candida glabarata***. 2011. 65 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2011.

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

BERTHELS, N. J.; OTERO, R. R. C.; BAUER, F. F.; PRETORIUS, I. S.; THEVELEIN, J. M. Correlation between glucose/fructose discrepancy and hexokinase kinetic properties in different *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast strains. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 77, n. 5, p. 1083-1091, 2008.

CARLSON, M.; BOTSTEIN, D. Two differentially regulated mRNAs with different 5' ends encode secreted and intracellular forms of yeast invertase. **Cell**, v. 28, p. 145-154, 1982.

CARVALHO, J. C. M.; SATO, S. Fermentação descontínua alimentada. In: SHIMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. (Ed.). **Biotecnologia industrial**: engenharia bioquímica. São Paulo: Edgard Blücher, 1975. v. 1, p. 205-218.

CECCATO-ANTONINI, S. R. Biotechnological implications of filamentation in *Saccharomyces cereviseae*. **Biotechnology Letters**, v. 30, p. 1151-1161, 2008.

CROWE, J.; CROWE, L.; CHAPMAN, D. Preservation of membranes in anhydrobiotic organisms. The role of trehalose. **Science**, v. 223, p. 701-702, 1984.

CRUZ, S. H. da. **Efeito da natureza da fonte de nitrogênio no fluxo metabólico do carbono em microrganismo**: estudos enzimáticos e fisiológicos com leveduras Crabtree positivo e negativo. 2002. 133 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2002.

D'AMORE, T.; CRUMPLEN, R.; STEWART, G. G. The involvement of trehalose in yeast stress tolerance. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 7, p. 191-196, 1991.

FRANÇOIS, J. M.; WALTHER, T.; PARROU, J. L. Genetics and regultaion of glycogen and trehalose metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbioloy Stress Tolerance for Biofuels**, v. 22, p. 32-35, 2012.

GANCEDO, J. M. Yeast carbono catabolite repression. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 62, p. 334-361, 1998.

GÁSCON, S.; NEUMANN, N. P.; LAMPEN, J. O. Comparative study of the properties of the purified internal and external invertase from yeast. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 3, p. 33-35, 1981.

GIBSON, R. B. 125th anniversary review: improvement of higher gravity brewery fermentation via wort enrichment and supplementation. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 117, n. 3, p. 268-284, 2011.

HOLZER, H. Catabolite inactivation in yeast. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 1, n. 8, p. 178-181, 1976.

HORÁK, J. Yeast nutrient transporters. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1331, p. 41-79, 1997.

JAUNIAUX, J. C.; GRENSON, M. *GAP1*, the general amino acid permease gene of *Saccharomyces cereviseae*: nucleotide sequence, protein similarity with the other baker's yeast amino acid permeases, and nitrogen catabolite repression. **European Journal of Biochemistry**, v. 190, n. 1, p. 39-44, 1990.

JERONIMO, E. M. **O nitrogênio proteico na fermentação alcoólica e sua influência na qualidade da cachaça**. 2004. 130 f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.

KELLER, R.; DUNN, I. J. Fed-batch microbial culture. Models, error and application. **Journal Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 28, p. 508-514, 1978.

LAGUNAS, R. Sugar transport in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 103, p. 229-242, 1993.

LEE, S. S.; ROBINSON, F. M.; WANG, H. Y. Rapid determination of yeast viability. **Biotechnology Bioengineering Symposium**, v. 11, p. 641-649, 1981.

LIMA, U. A. Produção de etanol. In: SHIMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; MORZANI, W. (Ed.). **Biotecnologia industrial**: processos fermentativos e enzimáticos. São Paulo: Edgard Blücher, 2001. v. 2, p. 4-5.

MALTA, L. H. **Estudos de parâmetros de propagação de fermento (*Saccharomyces cereviseae*) para a produção de cachaça de alambique**. 2006. 70 f. Dissertação (Mestrado em Ciências de Alimentos) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2006.

MILLER, G. L. Dinitrosalicylic and reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.

MIRANDA JÚNIOR, M. **A utilização diferencial de glicose e frutose por leveduras vinícolas em meios contendo fontes de nitrogênio estruturalmente complexas**. 2008. 108 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2008.

NAUMOV, G. I.; NAUMOVA, E. S.; SANCHO, E. D.; KORHOLA, M. P. Polymeric *suc* genes in natural populations of *Saccharomyces cereviseae*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 135, n. 1, p. 31-35, 1996.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger**: princípios de bioquímica. 3. ed. São Paulo: Sarvier, 2002. 1206 p.

NEVES, M. J.; TERENZI, F. A.; JORGE, F. A.; JORGE, J. A. Quantification of trehalose in biological samples with a conidial trehalase from the thermophilic fungus *Humicola griseae* var. *thermoidea.* **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 10, n. 1, p. 17-19, 1994.

NOGUEIRA, A. M. P.; VENTURINI FILHO, W. G. **Aguardente de cana**. Botucatu, 2005. Disponível em: <www.fca.unesp.br/intranet/arquivos/waldemar/Aguardente%20de%20Cana%20-Completo.pdf>. Acesso em: 10 out. 2013.

OSTERGAARD, S.; OLSSON, L.; NIELSEN, J. Metabolic engineering of *Saccharomyce cereviseae*. **Microbiology and Biology Reviews**, v. 64, n. 1, p. 34-50, 2000.

OZCAN, S.; JOHNSTON, M. Function and regulation of yeast hexose transporters. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 63, n. 3, p. 554-569, 1999.

PACHECO, T. F. **Fermentação alcoólica com leveduras de características floculantes em reator tipo torre com escoamento ascendente**. 2010. 94 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlância, 2010.

PEREIRA, F. B.; GUIMARÃES, P. M. R.; TEIXEIRA, J. A.; DOMINGUES, L. Optimization of low-cost medium for very high gravity ethanol fermentation by *Saccharomyces cereviseae* using statistical experimental designs. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 7856-7863, 2010.

PEREIRA, F. B.; GUIMARÃES, P. M. R.; GOMES, D. G.; TEIXEIRA, J. A.; DOMINGUES, L. Cell recycling during repeated very high gravity bio-ethanol fermentation using the industrial *Saccharomyces cerevisiae* strain PE-2. Original research paper. **Biotechnology Letters**, v. 34, p. 45-53, 2012.

PETER, G. J.; DURING, L.; AHMED, A. A carbon catabolite repression regulates amino acid permeases in *Saccharomyces cereviseae* the Tor signaling pathway. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 9, p. 5546-5552, 2006.

PULIGUNDLA, P.; SMOGROVICOVA, D.; OBULAM, V. S. R.; KO, S. Very high gravity (VHG) ethanolic brewing and fermentation: a research update. **Journal of Industrial of Microbiology and Biotechnology**, v. 38, p. 1133-1144, 2011.

SALVATO, L. **Fermentação de mosto industrial por linhagens de *Saccharomyces cereviseae* com transportador de sacarose e sobre expressão de invertase interna**: estudo comparativo com linhagens com alta e baixa atividade de invertase externa. 2010. 93 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

SHINEPER, L.; DUEVEL, K.; BROACH, J. R. Sense and sensibility: nutricional response and signal integration in yeast. **Current Opinion in Microbiology**, v. 7, n. 6, p. 624-630, 2004.

SILVA, F. A. L. **Exigências nutricionais e operacionais para a produção de etanol pela levedura IQ-Ar/45-1 a partir do melaço em batelada alimentada**. 2010. 97 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2010.

SILVA, M. A. S. da; GRIEBELER, N. P.; BORGES, L. C. Uso da vinhaça e impactos nas propriedades do solo e lençol freático. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 11, p. 108-114, 2007.

SOUZA, S. C. **Avaliação da produção de etanol em temperaturas elevadas por uma linhagem de *Saccharomyces cereviseae***. 2004. 136 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Instituto Butantã/IPT, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

STEWART, G. G.; RUSSELL, I. **Brewer’s yeast**: an introduction to brewing science & technology. London: The Institute of Brewing, 1998. 108 p. (Série III).

TER SCHURE, E. G.; SILLJÉ, H. H. W.; REAVEN, L. J. R. M.; BOONSTRA, J.; VERKLEIJ, A. J.; VERRIPS, C. T. Nitrogen-regulated transcription and enzyme activities in continuous cultures of *Saccharomyces cereviseae*. **Microbiology**, v. 141, n. 5, p. 1101-1108, 1995.

THEVELEIN, J. M. Signal transduction in yeast. **Yeast**, v. 10, n. 13, p. 1753-1790, 1994.

UNIÃO DA INDÚSTRIA DE CANA-DE-AÇÚCAR. **O etanol**: combustível limpo e renovável. Disponível em: <http://www.unica.com.br/content/show.asp?cntCode=11891360-41CC-459C-9A22-191506941834>. Acesso em: 20 nov. 2012.

VILANOVA, M.; UGLIANO, M.; VARELA, C.; SIEBERT, T.; PRETORIUS, I. S.; HENSCKE, P. A. Assimilable nitrogen utilization and production of volatile and nonvolatile compounds in chemically defined medium by *Saccharomyces cereviseae* wine yeasts. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 77, p. 145-157, 2007.

WANG, F. Q.; GAO, C. J.; YANG, C. Y.; XU, P. Optimization of in ethanol production medium in very high gravity fermentation. Original research paper. **Biotechnology Letters**, v. 29, p. 233-236, 2007.

ZANON, J. P.; PERES, F. S.; GATTÁS, E. A. L. Colorimetric assay of ethanol using alcohol dehydrogenase from by dry baker's yeast. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, p. 466-470, 2007.