

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS – UFAL
INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA – IQB
QUÍMICA TECNOLÓGICA E INDUSTRIAL**

PATRÍCIA MURIEL SANTOS DA SILVA

**CAPTAÇÃO DE AÇÚCARES NA LEVEDURA COM REVISÃO NA
LITERATURA DE THIAGO O. BASSO (ENGINEERING TOPOLOGY AND
KINETICS OF SUCROSE METABOLISM IN SACCHAROMYCES
CEREVISIAE FOR IMPROVED ETHANOL YIELD) VISANDO A
POSSIBILIDADE DE AUMENTO NO RENDIMENTO NA PRODUÇÃO DE
ETANOL.**

**MACEIÓ- AL
2024**

PATRICIA MURIEL SANTOS DA SILVA

**CAPTAÇÃO DE AÇÚCARES NA LEVEDURA COM REVISÃO NA
LITERATURA DE THIAGO O. BASSO (ENGINEERING TOPOLOGY AND
KINETICS OF SUCROSE METABOLISM IN SACCHAROMYCES
CEREVISIAE FOR IMPROVED ETHANOL YIELD) VISANDO A
POSSIBILIDADE DE AUMENTO NO RENDIMENTO NA PRODUÇÃO DE
ETANOL.**

Orientador: Prof.Drº Vítor Lopes de Abreu Lima

MACEIÓ- AL

2024

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico
Bibliotecária: Taciana Sousa dos Santos – CRB-4 – 2062

S586e Silva, Patricia Muriel Santos da.
Captação de açúcares na levedura com revisão na literatura de Thiago O. Basso (Engineering topology and kinetics of sucrose metabolism in *saccharomyces cerevisiae* for improved ethanol yield) visando a possibilidade de aumento no rendimento na produção de etanol / Patricia Muriel Santos da Silva. – 2024.
35 f. : il. color.

Orientador: Vitor Lopes de Abreu Lima.
Monografia (Trabalho de Conclusão de Curso em Química Tecnológica e Industrial) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia. Maceió, 2024.

Bibliografia: f. 34-35.

1. Etanol. 2. Leveduras. 3. *Saccharomyces cerevisiae*. 4. Captação - Sacarose. I. Título.

CDU: 661.722

TERMO DE APROVAÇÃO

PATRÍCIA MUREL SANTOS DA SILVA

**CAPTAÇÃO DE AÇÚCARES NA LEVEDURA COM REVISÃO NA
LITERATURA DE THIAGO O. BASSO (ENGINEERING TOPOLOGY AND
KINETICS OF SUCROSE METABOLISM IN SACCHAROMYCES
CEREVISIAE FOR IMPROVED ETHANOL YIELD) VISANDO A
POSSIBILIDADE DE AUMENTO NO RENDIMENTO NA PRODUÇÃO DE
ETANOL.**

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Drº Vitor Lopes de Abreu Lima
Orientador: Instituto de Química e Biotecnologia – IQB
Universidade Federal de Alagoas - AL

Prof. Drº José Edmundo Accioly de Souza
Instituto de Química e Biotecnologia – IQB
Universidade Federal de Alagoas - AL

Profa. Drª Sônia
Instituto de Química e Biotecnologia – IQB
Universidade Federal de Alagoas - UFAL

Documento assinado digitalmente



SONIA SALGUEIRO MACHADO

Data: 11/03/2024 12:54:57-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Documento assinado digitalmente



JOSE EDMUNDO ACCIOLY DE SOUZA

Data: 12/03/2024 07:02:50-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Documento assinado digitalmente



VITOR LOPES DE ABREU LIMA

Data: 14/03/2024 10:35:06-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Aos meus filhos, Eyshila Muriel e Willams Gleybson, e minha mãe, Tânia, que
são o motivo da busca para realização dos meus sonhos.

AGRADECIMENTOS

Grata a Deus, por seu cuidado e amor, dando-me saúde e forças para prosseguir em busca dos meus sonhos.

À minha mãe por todo suporte a mim dado para que pudesse idealizar meus anseios e aos meus filhos por ser o combustível que rege minhas conquistas; e a todos os familiares que confiam no meu potencial.

Aos amigos, Alexandre Lopes, Izaura Marinho, Milton Cristian e Thayná Terezinha pela troca de conhecimento, companheirismo, pelos momentos de descontração e por me suportar em meus momentos mais difíceis nesses longos anos de convívio.

À Universidade Federal de Alagoas por meio dos professores que me ajudaram a adquirir conhecimento teórico para que eu venha ser uma profissional qualificada no mercado de trabalho e uma cidadã mais consciente de seus deveres.

Ao meu orientador, professor Vítor Lopes de Abreu Lima por toda disponibilidade, paciência, por sua dedicação e participação direta na realização desse trabalho para que ele fosse concluído com êxito.

“... Não há limites para fazer livros, e o muito estudar enfado é da carne.”
Eclesiastes 12;12b (Bíblia Sagrada)

RESUMO

Muitos microrganismos já foram pesquisados para a produção de etanol, mas a levedura *Saccharomyces cerevisiae* é a mais utilizada em grande escala para fermentação e produção do etanol, pois tem capacidade de fermentar com eficiência a sacarose. Há uma busca por novas linhagens e melhorias das características de microrganismos que garantam alta eficiência fermentativa, melhore o desempenho dos processos e contribua para o aumento na produção de etanol. A *Saccharomyces* apresenta duas vias de captação para esse dissacarídeo: Hidrólise Extracelular e Hidrólise Intracelular. A hidrólise extracelular por ação da invertase extracelular capta a Sacarose e metaboliza em glicose e frutose através do transporte passivo, por difusão facilitada; já na hidrólise intracelular, a invertase intracelular capta a sacarose e outros açúcares por via simporte sacarose-próton através do transporte ativo onde são hidrolisadas pela invertase, liberando moléculas de glicose e frutose que serão metabolizadas pela via glicolítica. Pesquisas envolvendo leveduras capazes de realizar transporte ativo indicaram um aumento de 11% de rendimento na produção de etanol. Este trabalho faz uma revisão na pesquisa de Thiago O. Basso (ENGINEERING TOPOLOGY AND KINETICS OF SUCROSE METABOLISM IN *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* FOR IMPROVED ETHANOL YIELD) com base na levedura CEN.PK113 – 7D, onde a cepa evoluída (IMI056) foi usada para melhorar a absorção da sacarose através de cepas que expressem apenas a hidrólise intracelular.

Palavras-chave: Leveduras, Captação, aumento de rendimento, etanol, transporte ativo.

ABSTRACT

Many microorganisms have already been researched for the production of ethanol, but the yeast *Saccharomyces cerevisiae* is the most used on a large scale for fermentation and production of ethanol, as it has the capacity to efficiently ferment sucrose. There is a search for new strains and improvements in characteristics of microorganisms that guarantee high fermentative efficiency, improve process performance and contribute to an increase in ethanol production. *Saccharomyces* has two uptake pathways for this disaccharide: Extracellular Hydrolysis and Intracellular Hydrolysis. Extracellular hydrolysis by the action of extracellular invertase captures sucrose and metabolizes it into glucose and fructose through passive transport, by facilitated diffusion; In intracellular hydrolysis, intracellular invertase captures sucrose and other sugars via sucrose-proton symport through active transport where they are hydrolyzed by invertase, releasing glucose and fructose molecules that will be metabolized via the glycolytic pathway. Research involving yeast capable of active transport indicated an 11% increase in ethanol production yield. This work reviews the research of Thiago O.Basso (ENGINEERING TOPOLOGY AND KINETICS OF SUCROSE METABOLISM IN *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* FOR IMPROVED ETHANOL YIELD) based on the yeast CEN.PK113 – 7D, where the evolved strain (IMI056) was used to improve the absorption of sucrose through strains that express only intracellular hydrolysis.

Keywords: Yeasts, Uptake, yield increase, ethanol, active transport.

LISTA DE ILUTRAÇÕES

FIGURA 1 - Os maiores produtores de biocombustível no mundo – 2019.

FIGURA 2 – Ácido Pirúvico reduzido a Ácido láctico e descarboxilado gerando Acetaldeído.

FIGURA 3 - Possibilidades biológicas da fermentação.

FIGURA 4 - Componentes químicos e tecnológicos da cana-de-açúcar.

FIGURA 5 - Bactérias contaminantes e leveduras competindo pelos açúcares da fermentação, afetando rendimento.

FIGURA 6 – Organelas da levedura *Sacharomyces Cerevisiae*.

FIGURA 7 – Vias de Captação de açúcares pela levedura.

TABELA 1 - Cepas de *S.Cerevisiae* utilizadas no estudo.

TABELA 2 - Fisiologia de *Saccharomyces*, cepas CEN.PK113-7D (SUC2), IMI056(iSUC2), IMM007(evluído do iSUC2) e IMM009 (Evoluiu do iSUC2 agt1D/agt1D) em culturas limitadas por sacarose.

1.INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior produtor de cana-de-açúcar são 720 milhões de toneladas que correspondem a 40% do cultivo em todo o mundo. A produção de cana no Brasil cresceu de forma acelerada após o estabelecimento do Proálcool, em novembro de 1975, desde o plantio até a produção de açúcar, etanol e bioeletricidade, esse aumento tem colaborado para novas tecnologias (Álcool de Segunda Geração) e aumento de diversas plantas industriais em todo o país. (Embrapa, 2020).

A maior produção de etanol da história foi de 35,6 bilhões de litros (cana-de-açúcar e do milho) na safra 2019/2020, aumento de 7,5% sobre a safra 2018/2019. (Conab, 2020). O etanol feito da cana-de-açúcar totalizou 34 bilhões de litros, desse total, 10,1 bilhões corresponderam ao etanol anidro, usado na composição com a gasolina, e 23,89 bilhões de litros ao etanol hidratado; já o etanol feito a partir do milho totalizou 1,64 bilhão de litros ante 791,4 milhões em 2018/2019. (Conab, 2020).

Estados Unidos e Brasil estão no topo da lista dos maiores produtores de etanol do mundo; cerca de 90% da oferta mundial é originária desses países. Nas últimas décadas, o Brasil tem sido visto como referência mundial na produção sustentável e eficiente do biocombustível, pois minimiza a dependência externa do preço do petróleo e também pelo fato de ser mais sustentável, onde praticamente todos os resíduos da agroindústria canavieira são reaproveitados. Também avança na utilização do milho, principalmente na região centro-oeste do país, destaque para Mato Grosso, onde se encontra a maior produtora de etanol de milho do país. (Embrapa, 2020).

2.OBJETIVOS

- Evidenciar a importância da captação da sacarose no rendimento da produção industrial de etanol por fermentação utilizando a levedura *Saccharomyces cerevisiae*.
- Descrever duas vias para a captação de sacarose pela levedura: por transporte ativo e por difusão facilitada
- Mostrar as vantagens da via de captação por transporte ativo para o rendimento da fermentação.
- Fazer uma breve discussão sobre o assunto com base nas informações reunidas para esse trabalho.

3.PRODUÇÃO DE ETANOL

O etanol não é um produto encontrado na natureza de forma pura é necessário obtê-lo a partir das moléculas de açúcar encontradas em vegetais como cana-de-açúcar, milho, beterraba, trigo, mandioca, e também através de material lignocelulósico, como a palha da cana e o bagaço da mesma.

A liderança na geração deste biocombustível é dos Estados Unidos; no entanto, diferentemente do Brasil, eles produzem etanol tendo como matéria prima o milho. Além desses, são referência na fabricação do álcool países como Canadá, que tem como matéria-prima o milho e trigo; China, que tem a mandioca, sorgo e milho e Índia que usa apenas a cana-de-açúcar. (Figura 1).

Figura 1: Os maiores produtores de biocombustível no mundo – 2019 – Segundo o British Petroleum (BP) Statistical Review of World Energy.

Fonte: Adaptado de British Petroleum (BP) Statistical Review of World Energy (www.engenheironaweb.com)

4.REVISÃO DA LITERATURA

4.1 FERMENTAÇÃO

A fermentação é um processo catabólico, anaeróbico onde há degradação de moléculas de açúcar (glicose e frutose) no interior das células de microrganismos, até a formação de etanol e gás carbônico (CO₂), havendo liberação de energia química e térmica.

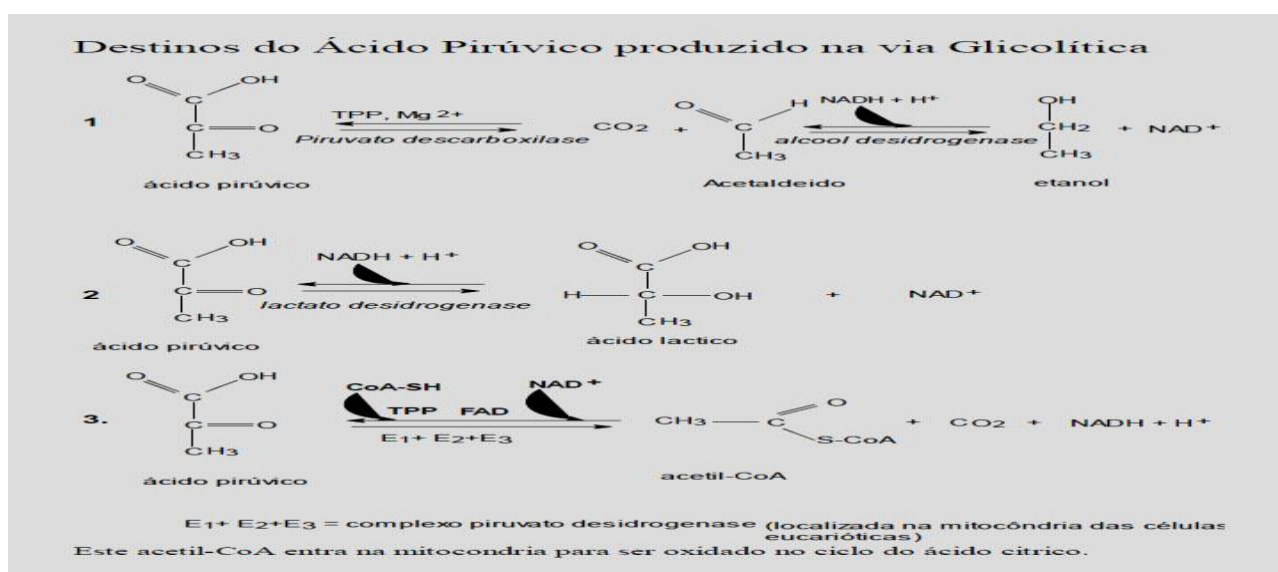
Implica na utilização de microrganismos na transformação da matéria orgânica catalisada por enzimas; onde as leveduras são os microrganismos mais importantes na obtenção do álcool por via fermentativa. É realizada de forma anaeróbica e nesse processo biológico que utiliza matéria orgânica para produção de energia são utilizados açúcares: Glicose, Frutose e Sacarose.

É importante se atentar aos conceitos biológicos associados à decomposição desses açúcares (glicólise). A via glicolítica envolve uma sequência de reações químicas nas quais duas moléculas de ATP e duas de NADH são produzidas como saldo energético final para cada molécula degradada de glicose.

O NADH atua como portador de elétrons na glicólise; essa molécula deve ser reconstituída para que haja continuidade na via glicolítica. Quando o oxigênio está disponível (aerobiose), o ácido pirúvico entra em uma série de reações químicas, conhecidas como ciclo do ácido tricarboxílico, e prossegue para a cadeia respiratória na mitocôndria, como resultado da respiração, as células produzem 38 moléculas de ATP para cada molécula de glicose oxidada.

Na ausência de oxigênio (Anaerobiose), o ácido pirúvico pode seguir duas rotas diferentes no citoplasma, dependendo do tipo de célula, pode ser convertido em etanol (álcool) e dióxido de carbono (CO₂) através da fermentação alcoólica, ou pode ser convertido em lactato através da via de fermentação do ácido láctico (ALBA-LOIS, L. & SEGALKISCHINEVZKY, 2010; BARNETT, 2003).(Figura 2)

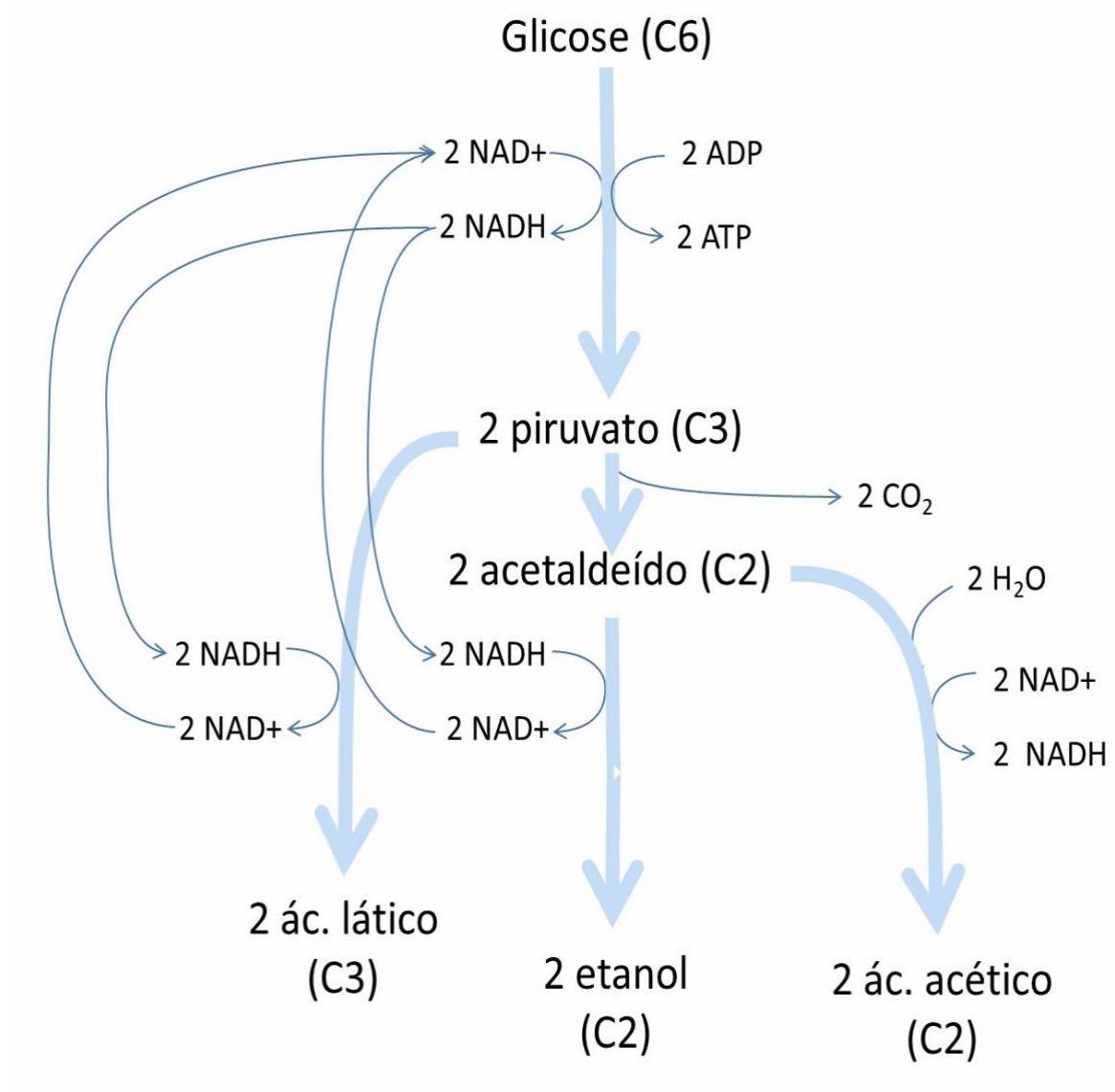
Figura 2: ácido pirúvico reduzido a ácido láctico e descarboxilado gerando acetaldeído



Fonte: Livro de Bioquímica (www.bibliotecaagptea.org.br)

A glicose é clivada em duas moléculas de piruvato, a energia liberada é capturada na forma de ATP. O piruvato, posteriormente, pode ser reduzido, gerando ácido láctico ou descarboxilado, gerando acetaldeído. O acetaldeído, por sua vez, pode ser reduzido, gerando etanol ou oxidado, gerando ácido acético (Figura 3).

Figura 3: possibilidades biológicas da fermentação



Fonte: adaptado a partir do Educa Brasil (www.educabrasil.com), 2022.

4.2 POTENCIALIZAÇÃO DA FERMENTAÇÃO

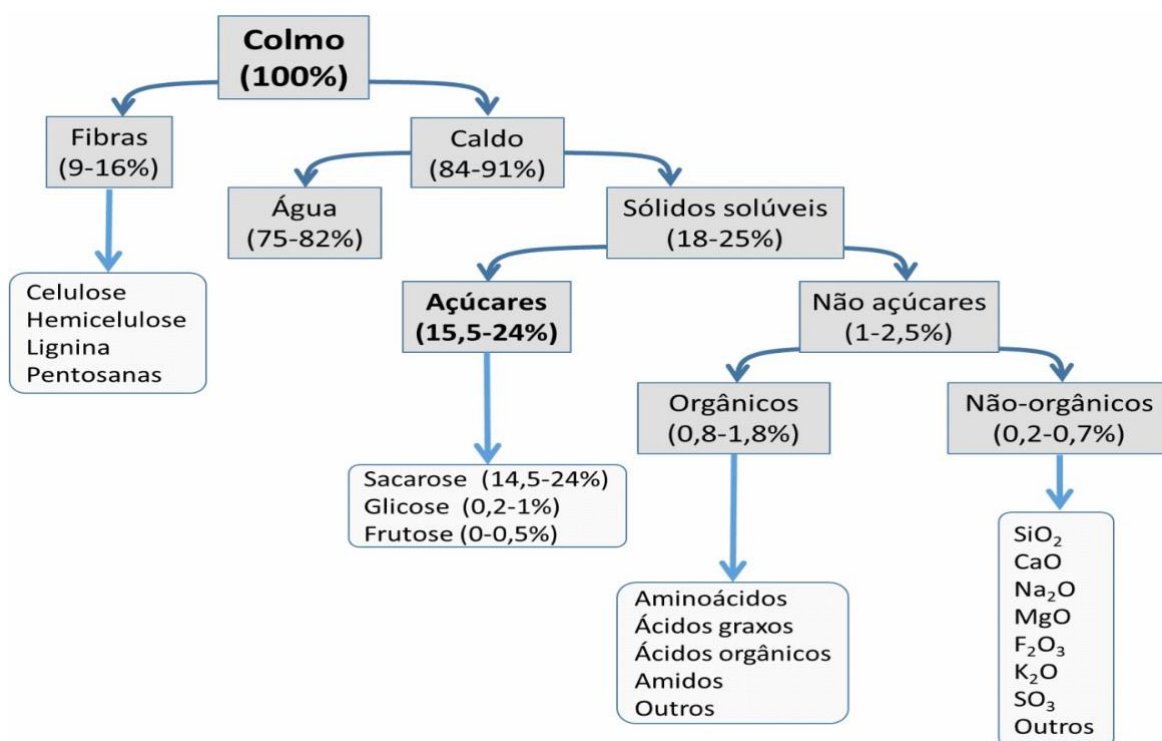
Para que a fermentação ocorra de forma otimizada é necessário aprimorar e aperfeiçoar os processos fermentativos para minimizar perdas que possam interferir na maior produção de etanol. Diversos fatores físicos, químicos e microbiológicos afetam o rendimento da fermentação e a eficiência da conversão de açúcar em etanol. Esses fatores são referidos como “estresse” da levedura e entre os principais fatores destacam-se: matéria-prima, água, substratos, assepsia, bactéria, antibiótico, temperatura, pH etc...

4.3 FATORES QUE INTERFEREM NA FERMENTAÇÃO

Alguns fatores que interferem na fermentação e suas principais fontes de contaminação são:

- **MATÉRIA-PRIMA:** a qualidade da matéria-prima é o principal fator a ser levado em conta para o melhor desempenho da fermentação alcoólica, sendo a razão fundamental da obtenção de altos rendimentos e da qualidade do produto final. As alterações fisiológicas influem na composição química da cana e, conseqüentemente nos parâmetros tecnológicos. (Visão Agrícola, 2004); (Figura 4).

Figura 4: Componentes químicos e tecnológicos da cana-de-açúcar.



Fonte: A qualidade da matéria-prima, na visão industrial; Visão Agrícola N°1; 2004.

- **ÁGUA:** de vital importância para produção desde a utilizada na lavagem da cana até a utilizada no mosto de alimentação. Como também as utilizadas para limpeza em geral (100°C). Conseqüentemente essa água deve ser de boa qualidade isenta de interferentes; e para que isso ocorra são analisados alguns fatores como: DBO, resíduo total, sólidos sedimentáveis, pH e oxigênio dissolvido.

- SUBSTRATOS: caldo, melaço e mosto de alimentação são ótimos substratos para o crescimento de microrganismos, em especial as bactérias, devido ao elevado conteúdo de nutrientes orgânicos e inorgânicos, presença de água, pH favorável e ótima temperatura para o desenvolvimento de microrganismos (LIMA et al, 2001).

- ASSEPSIA: para que não haja formação de biofilme (várias espécies de microrganismos que crescem aderidos a uma superfície) principalmente nas esteiras, moendas, peneiras, trocadores de calor, nas linhas que transportam mosto de alimentação e também nas próprias dornas; a assepsia é fundamental, para que haja uma redução nos índices bacterianos. As alternativas mais viáveis e eficientes são o hidróxido de sódio E(NaOH) e óxido de cálcio (CaO), utilizados como medida preventiva para assepsia dos equipamentos e aparelhos no processo. Essas abordagens podem vir associadas à adição de antibióticos ou de sanitizantes ou mesmo bactericidas e biocidas naturais. Não havendo esse controle haverá aumento no uso de insumos, acarretando custos para o processo (Cana Online, 2015).

- BACTÉRIA: Ao longo do processo fermentativo do álcool, várias interações ocorrem entre leveduras e bactérias, e podem ocasionar aumento da contaminação bacteriana na fermentação e causar danos ao processo, tais como: consumo de açúcar, formação de goma, floculação do fermento, queda na viabilidade das leveduras devido às toxinas e ácidos orgânicos que são lançados no meio, e, por consequência, redução no rendimento e produtividade da fermentação; principalmente se a contaminação atingir valores superiores a 10^6 ou 10^7 células / mL de mosto (ALCARDE E WALDER, 1997).

Estes contaminantes favorecem a floculação (interação entre as bactérias e a levedura), tais condições levam as bactérias a aderirem nas paredes das leveduras fazendo com que toda biomassa se precipite. Os principais contaminantes já identificados no processo fermentativo pertencem aos gêneros *Lactobacillus*, *Bacillus* e *Leuconostoc*, sendo responsáveis por uma queda bastante significativa na produção do etanol (10 a 40%) (NOBRE 2007).

Enquanto as leveduras são microrganismos eucariotos unicelulares, as bactérias são procariotos unicelulares, menores que as leveduras, podendo

variar entre 0,2 por 8µm até 10 por 25µm; precisando de aproximadamente 20 minutos para se duplicar enquanto que a levedura leva 90 minutos, suas células podem se apresentar na forma de bastonetes ou cocos e competem com as leveduras pela glicose como substrato para realizar o seu crescimento celular.

Sem controle, a contaminação bacteriana afeta o rendimento da fermentação, ou seja, a eficiência de converter esses açúcares em etanol. A contaminação resulta na formação de produtos secundários, como glicerol e ácidos orgânicos (ácido acético, ácido fórmico, ácido láctico, succínico, hidroximetilfurfural (HMF) e furfural) provocando perdas irreparáveis no rendimento como também interfere negativamente na qualidade do produto final. (Figura 5).

- ANTIBIÓTICOS: na produção de etanol é comum a aplicação de um ou mais antibióticos no controle de contaminação bacteriana. Os antibióticos mais utilizados no setor são: penicilina, cloranfenicol, tetraciclina, clorotetraciclina, oxitetraciclina, virginiamicina e monensina. Antibióticos não prejudicam as leveduras, não interfere na fermentação e atua numa faixa de pH entre 2,0 e 7,0, seu uso é recomendado em todas as fases do processo.

Os antibióticos são eficazes no combate às bactérias, no entanto seu uso sistemático implica em uma série de questões como contaminação ambiental (solo, água, animais, alimentos...) e o desenvolvimento de bactérias resistentes. Isso, obviamente, tem levantado questionamentos sobre a sustentabilidade do uso de antibióticos na produção de etanol e tem sido objeto de regulamentação.

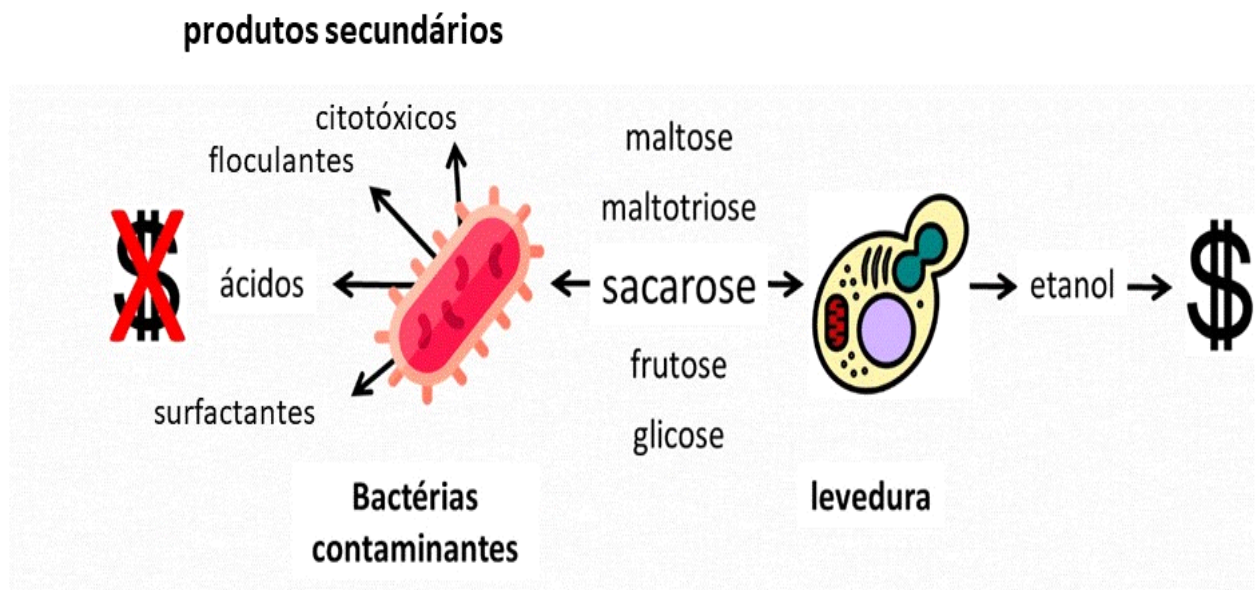
- TEMPERATURA: A temperatura “ideal” para se trabalhar tanto no pré-fermentador quanto na dorna é de 32°C. Ao exceder essa temperatura há um enfraquecimento na levedura que reduz seu crescimento, ficando vulnerável aos contaminantes; podendo resultar em floculação, como também uma variante mutante da própria levedura e também a multiplicação de leveduras selvagens vindas do campo que influenciará diretamente em uma menor produção de etanol ou na morte das leveduras. Já em temperaturas abaixo de 25°C, apresentarão menor atividade de crescimento e consequentemente baixo rendimento na formação do produto (NAVES et al.,2010).

- PH: o potencial hidrogeniônico (indica a atividade do íon H_3O^+ em uma solução). Embora as fermentações alcoólicas, possam se desenvolver em ampla faixa de pH, a considerada ideal para o crescimento da levedura situa-se entre 4,0 a 5,0.

Quando conduzidas em meios mais ácidos (2,0 a 4,0) as fermentações apresentam melhores resultados pelo fato de restringir o crescimento do fermento, e conseqüentemente, a redução da produção de glicerol. Ao mesmo tempo, pH mais baixo reduz a contaminação bacteriana, e considerando que não há correção do pH durante o processo fermentativo e tão somente durante o tratamento inicial do fermento, a condução da fermentação em pH em faixa abaixo do ótimo seria benéfica ao processo (LIMA et al., 2001; SOUSA et al., 2011).

Porém, em pH muito ácido (em torno de 2,0) os ácidos orgânicos (ácido acético e ácido láctico, principalmente) que estão em seu estado não ionizado penetram na célula com mais facilidade causando inibição da levedura, podendo também propiciar a seleção de bactérias resistentes e leveduras selvagens o que implica diretamente no rendimento do etanol. (Dorta, 2006).

Figura 5: Bactérias contaminantes e leveduras competindo pelos açúcares da fermentação, afetando rendimento.



Fonte: Autora, 2024.

Todos os fatores relacionados acima se não forem observados e cuidado ao longo do processo fermentativo irá ocasionar perdas significativas, o que acarretará não só perda na biomassa (leveduras) fazendo com que a multiplicação das mesmas não ocorra de forma abundante dando espaço pras bactérias que tem como principal função “roubar” os açúcares e transformá-los em produtos contaminantes, implicando em menos lucros para a empresa e de aumentando o custo da produção.

Este trabalho mostra uma nova forma de captar esses açúcares que faz com que a levedura modificada geneticamente capte de forma ativa e capte mais açúcares dando menos possibilidade das bactérias afetar o processo fermentativo e aumentar o lucro da produção em 11% e consequentemente mais dinheiro para as empresas. (Figura5)

É bem verdade que os estudos realizados em laboratórios terão todas as condições favoráveis para que a levedura converta todos os açúcares em etanol com menor perda possível, pois na área industrial todos os fatores relacionados acima estão presentes e influenciam diretamente na levedura, por isso estudos continuam sendo realizados para que essa levedura seja utilizada em escala industrial.

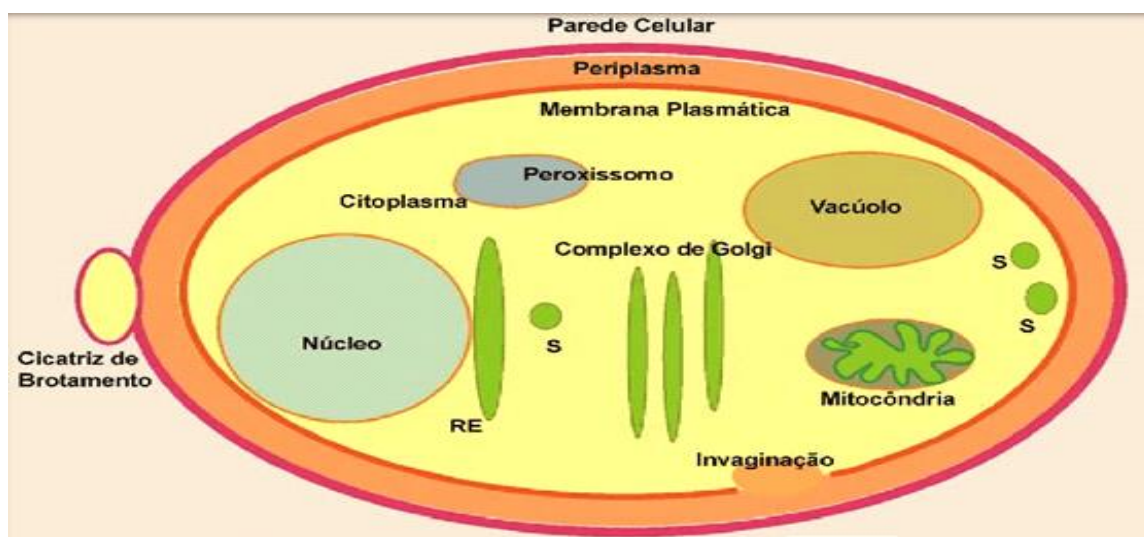
5.LEVEDURAS

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é conhecida há milhares de anos e usada em muitos processos biotecnológicos tradicionais. Por ser amplamente estudada é considerada um sistema modelo para metabolismo, análise molecular e genética de organismos eucarióticos.

São fungos geralmente unicelulares, de tamanhos (de 1-5 µm de diâmetro e 5-30 µm de comprimento) e formas variadas. Apresentam características de seres eucarióticos. Têm membrana citoplásmica lipoprotéica a qual, regula as trocas com o meio ambiente, formando uma barreira osmótica permitindo entrada e saída de água, nutrientes e outras substâncias.(Ecycle, 2020).

Possuem uma parede rígida, constituída principalmente por polissacarídeos. No citoplasma encontramos um ou mais vacúolos, mitocôndrias, retículo citoplasmático, ribossomos e, frequentemente, grânulos de material de reserva (hidratos de carbono, gorduras e proteínas), o núcleo é envolvido por uma membrana nuclear, característica dos organismos eucarióticos (Figura 6).

Figura 6: Organelas da levedura *Saccharomyces cerevisiae*.



Fonte: adaptado por Gaensky, Fernanda, 2015.

Sua reprodução pode ser desenvolvida sexuada ou assexuadamente. Dividem-se por brotamento – chamada de gemulação, reprodução assexuada, onde ocorre mitose nuclear e a formação de gemas, à medida que essas gemas crescem englobam o material citoplasmático e o núcleo resultante da mitose,

após amadurecimento o broto é liberado da célula-mãe constituindo-se um novo indivíduo.

Devido ao seu status GRAS (Generally Recognized As Safe – Geralmente conhecida como seguras), leveduras de *S. cerevisiae* também são aplicadas em grande escala em processos direcionados à biomassa, como a produção de fermento de padeiro, extrato de fermento e outros alimentos aditivos (vitaminas, proteínas, enzimas e aromatizantes agentes), bem como para a produção de proteínas heterólogas (incluindo vacinas e outros compostos terapêuticos), ou mesmo para a engenharia completamente nova vias metabólicas que levam à produção biotecnológica de importantes fármacos.

Variantes da *Sacharomyces Cerevisiae* podem ser classificadas usando características morfológicas, fisiológicas e bioquímicas específicas para diferenciar tipos isolados com características morfológicas semelhantes. Sendo que através desses critérios, há algo em torno de 18 espécies que constam na literatura. Porém, em estudos mais atuais, classificando a *S. Cerevisiae* através do estudo da homologia de seu DNA dividiu-se essas espécies em quatro tipos distintos: *S. Cerevisiae*, *S. Bayanus* (também conhecida como *S. Uvarum*), *S. Pasteurianus* (também conhecida como *S. Carlsbergensis*) e *S. Paradoxus*.

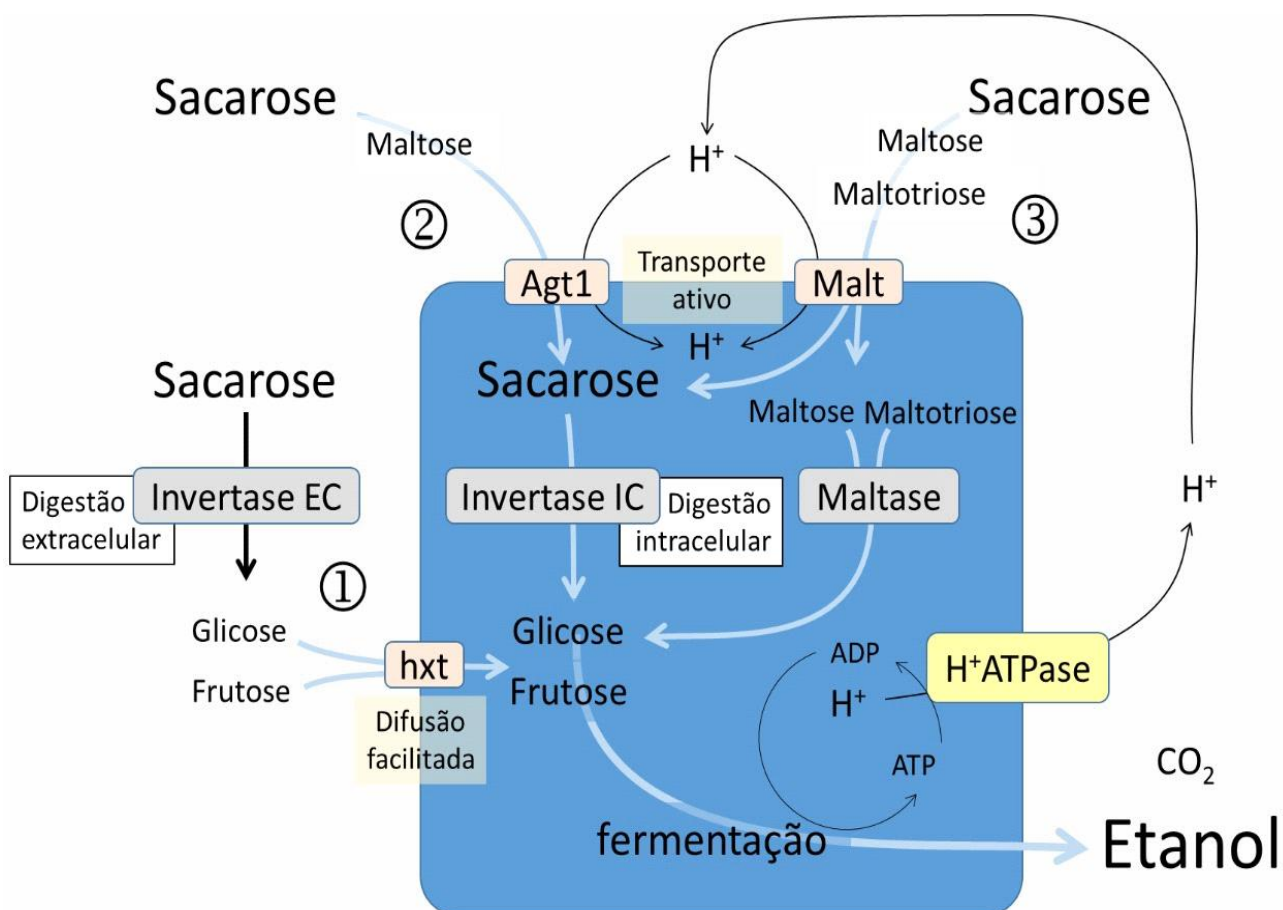
6.AÇÚCARES - VIAS DE CAPTAÇÃO

A captação da sacarose pela levedura pode ser feita por três vias, indicadas pelo número 1, 2 e 3 na figura 7.

- Nessa via ocorre a digestão da sacarose pela enzima invertase extracelular (IEC), que hidrolisa sacarose produzindo seus monossacarídeos constituintes: glicose e frutose. Estes, em seguida, são captados pelo transportador hxt num processo de difusão facilitada (transporte passivo, de um meio mais concentrado para um menos concentrado).
- A captação da segunda via envolve o transportador Agt1. Essa proteína transportadora, que capta principalmente maltose, atua através de um co-transporte.. Nesse processo de transporte ativo secundário, um gradiente de prótons, produzido por uma próton ATPase, é utilizado para impulsionar a captação de maltose.
- A terceira via de captação é também um exemplo de transporte ativo secundário, nele a sacarose é captada através de transportador Malt que também utiliza o gradiente de prótons. Esse transportador é capaz de captar maltose e maltotriose.

A sacarose captada pelo sistema de transporte ativo secundário é posteriormente digerida pela invertase intracelular (IC) resultando em glicose e frutose. Essa glicose e frutose captada pelas 3 vias descritas, vão alimentar a fermentação que vai produzir o etanol.

Figura 7: Vias de Captação de açúcares pela levedura.



Fonte: adaptado do artigo “Seleção e evolução dirigida de leveduras para a utilização nas indústrias do bioetanol e cervejeiras”; Gustavo Lorca.

Para ocorrer o transporte ativo dos açúcares é necessário um potencial eletroquímico trans-membrana, gerado pelo gradiente de pH entre o ambiente extracelular (pH próximo de 5) e intracelular (pH próximo de 7). O lançamento desses prótons ocorre com gasto de energia, derivado da quebra da molécula de ATP (Adenosina Trifosfato) em ADP (Adenosina Difosfato), com estequiometria de uma molécula de ATP por próton bombeado (STAMBUK, 2000; WEUSTHUIS et al., 1993).

H⁺ATPase: são enzimas que hidrolisam o grupo fosfato terminal do ATP (Adenosina Trifosfato), sendo amplamente distribuídas na natureza com

diferentes papéis biológicos. São chamadas de "bombas de prótons" desempenham um papel fundamental no provimento dessa energia, essencial para a vida celular. Tais enzimas utilizam a energia liberada da hidrólise do ATP para manter o processo de transporte ativo de solutos através das membranas, bem como para manter o pH dentro dos limites fisiológicos compatíveis com a vida celular. (Figura 7)

Essas enzimas são responsáveis pela acidificação do interior dos compartimentos da célula, bem como para suprir energia para o processo de transporte que ocorre através de suas membranas. Apresentam como característica comum, o fato de terem seus sítios catalíticos voltados para o espaço intracelular e terem suas funções catalíticas relacionadas a processos de utilização e/ ou transferência de energia.

Por haver um gradiente elétrico, o H^+ é extrudado da célula fazendo com que ocorra o transporte ativo secundário que é acoplado e dependente do gradiente de prótons gerados no transporte ativo primário.

7. METODOLOGIA

7.1 MODIFICAÇÃO E TRANSFORMAÇÃO DAS CEPAS DE LEVEDUR

Foram utilizadas cepas da família CEN.PK (Thiago O. Basso, 2011). Essas leveduras são referência para estudos. Cultivadas em meio sintético contendo glicose (20 g l^{-1}) como fonte de carbono com adição de glicerol (20% v/v) e armazenados a -80°C .

Podemos observar (Tabela 1) as modificações genéticas realizadas na cepa CEN.PK113-7D. As transformações foram:

- Seleção para prototrofia de triptofano na cepa CEN.PK113-7D resultando na cepa BSY021-34B;
- Restauração da prototrofia de uracila na cepa BSY021-34B resultando na cepa IMI056;
- O gene KanMX4 foi amplificado na cepa BY4741agt1D para remoção do agt1 resultando na cepa IMM007;
- Transformação e seleção de cepas IMM007 em placas de ágar contendo 200 mg l^{-1} G418 (Invivogen), antibiótico seletivo, resultando na cepa IMM008;
- Exclusão da segunda cópia de agt1 em IMM008 com gene marcador hphNT1 foi amplificado de puG-hphNt1. Transformação e seleção da cepa IMM008 em placas de ágar contendo 200 mg l^{-1} de higromicina B(Invivogen), antibiótico que inibe síntese de proteína, resultando na cepa IMM009.

7.2 CULTIVO

As pré-culturas foram cultivadas até em fase de crescimento em 30°C em meio sintético (100 mL) contendo 20 g l^{-1} de sacarose; a sacarose foi esterilizada por filtração antes de ser transferida para o meio e usado agitador (200 rpm). O meio foi suplementado com 10 ml^{-1} de ergosterol (precursor de vitamina D2) e 420 mg^{-1} Tween80 (emulsificante) dissolvidos em etanol. Emulsão antiespumante C foi autoclavado separadamente (120°C) com 20% (v/v) da solução e uma concentração final de 0.2 g l^{-1} . As fermentações foram realizadas em biorreatores (2L) com rotação (800 rpm) e 30°C . Foi mantido o pH=5 com adição de hidróxido de potássio (KOH) e minimizando a difusão de oxigênio (<10

ppm) com reatores equipados com tubos Norprene e Viton O-rings e também lavagem com gás nitrogênio.

Após exaustão da sacarose, observada pela diminuição de CO₂, os cultivos ficaram a modo contínuo e com taxa de diluição (0.10h⁻¹). Através da microscopia de fase foi monitorada a pureza da cultura.

7.3 MÉTODOS ANALÍTICOS

Nas culturas em estado estacionário (produção de CO₂ menos de 2%) foram determinados:

- Peso – filtração (filtros de nanocelulose);
- Açúcares residuais – HPLC;
- Acetato e Piruvato – detector UV;
- Concentração de etanol – evaporação;
- Concentração de sacarose, glicose e frutose – ensaio enzimático;

7.4 ENSAIO DE INVERTASE

A atividade de invertase extracelular foi determinada medindo a formação de glicose em 30°C e solução tampão 50mM Tris-succinato (pH 5,0) com sacarose (150 mM) e células pré-incubadas com NaF - fluoreto de sódio (50 mM) e permeabilizadas com etanol (10%v/v), Triton X-100 e tolueno (1:4:1). As análises foram realizadas em triplicatas com desvio padrão < 10%.

7.5 ENSAIO DE TRANSPORTE SACAROSE –PRÓTON

Determinado através da mudança de pH nas suspensões de leveduras absorvendo sacarose. As leveduras foram condicionadas a uma densidade celular de 25 gl⁻¹ em tampão de 25mM de K-ftalato - pH 5,0 e 30°C em agitação. Foi adicionado sacarose (concentração final 70 mM) e monitoradas com sensor de pH.

As taxas de absorção de prótons induzidas por sacarose foram calculadas a partir da inclinação da curva de captação de prótons, nos primeiros 10-20s após a adição da sacarose. As análises foram realizadas em triplicatas com desvio padrão < 15%.

7.6 ANÁLISE DE MICROARRAY

A análise cromossômica por microarray (CMA) é uma técnica que permite a detecção de alterações no número de cópias em diversas regiões cromossômicas simultaneamente e tem sido utilizada na detecção de deleções e duplicações (VNM – Variações de número de cópias).As células foram

transferidas para nitrogênio líquido e processadas no S98Yeast GeneChip, com as seguintes modificações:

- Síntese de cDNA de fita dupla usando 15µg RNA total;
- cDNA de fita dupla foi purificado antes da transcrição e marcação in vitro;
- O cRNA marcado foi purificado antes da fragmentação e hibridização de 15µg cRNA biotinilado;
- IMI056 e IMM007 foram comparadas e replicadas sob experimento de matriz com limitação de sacarose.

8. DESENVOLVIMENTO

8.1 CEPAS DE LEVEDURAS

As leveduras CEN.PK utilizadas no estudo de Thiago O. Basso de 2011 são referência para realização de estudos, e as características genéticas, o genótipo das linhagens e as modificações genéticas realizadas na cepa são apresentados na Tabela.

Tabela 1: Cepas de *Saccharomyces* utilizadas no estudo

LINHAGEM	TIPO DE LEVEDURA	GENÓTIPO RELEVANTE	VIA
CEN.PK113-7D REFERÊNCIA	PADRÃO PROTOTRÓFICA	MATa URA3 TRP1 SUC2	1
BSY021-34B	iSUC2 ura-	MATa ura3-52 trp1-289 TRP1-PADH1 ::iSUC2	2
BY4741 agt1 D	Isogênica a mutante BY4741	MATa agt::1 agt1::loxP-KanMX4 -loxP	?
IMI056	iSUC2 PROTOTRÓFICA	MATa URA3 trp1-289 TRP1-PADH1 ::iSUC2 ISOGÊNICA A BSY021-34B	2
IMM007	iSUC2 PROTOTRÓFICA EVOLUÍDA	EVOLUÍDA DA IMI056 e BY4741 agt1 D	2
IMM008	iSUC2 PROTOTRÓFICA EVOLUÍDA	EVOLUÍDA DA IMM007 agt1::loxP-KanMX4 -loxP	2
IMM009	iSUC2 PROTOTRÓFICA EVOLUÍDA	EVOLUÍDA DA IMM008 agt1::loxP-KanMX4 -loxP agt1::loxP-hphNT1 loxP	2

Fonte: Thiago O. Basso, 2011. (VIA 1: Difusão Facilitada; Via 2: transporte ativo).

As leveduras CENPK113-7D realizam o transporte por difusão facilitada (VIA 1) foram modificadas geneticamente e originaram as leveduras evoluídas que passaram a expressar apenas o transporte ativo (VIA 2).

- Consumo de Sacarose :Para que a fermentação seja potencializada é necessário que a levedura consuma maior quantidade de açúcar. Na cepa de referência CEN.PK113-7D (3,11 mmol /gDW.h) o consumo foi menor do que na modificada (4,25 mmol /gDW.h); provado que o transporte ativo faz com que a levedura IMM07 metabolize mais rápido a sacarose, ou seja, consuma mais rápido (vide Tabela 2).

-Rendimento de Biomassa: no processo industrial quanto menor a quantidade de leveduras utilizadas para consumir os açúcares disponíveis, maior será o rendimento da biomassa. Na Tabela 4 mostra que a cepa de referência CEN.PK113-7D (33,9 g / mol sacarose) tem mais biomassa que a IMM07 (23,8 g / mol sacarose) provado que essa levedura consegue consumir mais açúcar em menor quantidade.

Tabela 2: Fisiologia de Saccharomyces, cepas CEN.PK113-7D (SUC2), IMI056(iSUC2), IMM007(evoluido do iSUC2) e IMM009 (Evoluiu do iSUC2 agt1D/agt1D) em culturas limitadas por sacarose.

TRANSPORTE	CEPAS			
	DIFUSÃO FACILITADA	TRANSPORTE ATIVO		
RESULTADOS	CEN.PK113-7D (SUC)	IMI056 (iSUC2)	IMMO07 (iSUC2 evoluído)	IMMO09 (iSUC2 evoluído agt1 Δ/agt1 Δ)
CONSUMO DE SACAROSE (mmol/ g DW. h)	3,11 ± 0.03	3.15 ± 0.02	4.25 ± 0.05	2.92 ± 0.02
RENDIMENTO...				
...DE BIOMASSA (g/mol sacarose)	33.9 ± 0.40	31.7 ± 0.4	23.8 ± 0.70	34.2 ± 0.40
...RELATIVO DE BIOMASSA	1.00	0.94 ± 0.02	0.70 ± 0.02	1.01 ± 0.02
..DE ETANOL (mol/mol sacarose)	2.96 ± 0.01	3.09 ± 0.06	3.30 ± 0.06	2.97 ± 0.02
...RELATIVO DE ETANOL	1.00	1.04 ± 0.02	1.11 ± 0.02	1.01 ± 0.01
...DE GLICEROL (mol/mol sacarose)	0.25 ± 0.00	0.22 ± 0.00	0.20 ± 0.01	0.24 ± 0.00
...RELATIVO DE GLICEROL	1.00	0.88 ± 0.00	0.80 ± 0.00	0.96 ± 0.00
SACAROSE RESIDUAL (g/L)	< 0.1	1.8 ± 0.2	<0.1	1.5 ± 0.10
ATIVIDADE DE INVERTASE (mmol/ g DW. h)				
TOTAL	128 ± 7	284 ± 35	265 ± 22	N.D
EXTRACELULAR	114 ± 4	17 ± 3	25 ± 3	N.D
TRANSPORTE H ⁺	0.43 ± 0.09	1.74 ± 0.03	20.8 ± 0.01	<0.3
RECUPERAÇÃO DE CARBONO (%)	96.2 ± 0.2	97.4 ± 0.8	100.1 ± 0.8	97.4.2 ± 1.4

Fonte: Thiago O. Basso, 2011.

Rendimento de etanol: A necessidade de energia para o transporte ativo limita o rendimento de ATP para 1,5 ATP por equivalente de hexose em

comparação ao transporte por difusão facilitada que é de 2 ATP. Por isso, a sacarose adicional consumida que fornece energia ao simporte sacarose-próton é completamente convertida em etanol e dióxido de carbono. Aumentando o rendimento de etanol em cepas que empregam apenas transporte ativo.

Na cepa de referência CEN.PK113-7D o rendimento de etanol em sacarose foi de $2,96 \text{ mol mol}^{-1}$. Nas cepas que expressam transporte ativo houve aumento de rendimento ainda maior na (IMM07 – $3,30 \text{ mol mol}^{-1}$). (tabela 4). Provando que a cepa isolada e modificada geneticamente IMM007 teve aumento de 11% no rendimento de comparada a cepa de referência CEN.PK113-7D.

Rendimento de glicerol: O glicerol é produzido e acumulado pelas leveduras em resposta à alta osmolaridade do meio, devido à alta concentração de açúcar. A alteração na osmolaridade do ambiente extracelular induz a saída de água do interior da célula podendo causar a morte celular. As leveduras direcionam o seu metabolismo à produção e retenção do glicerol, permitindo as células manter o equilíbrio osmótico intracelular e evitar a perda d'água. No experimento houve menor rendimento de glicerol na célula modificada IMM007 ($0,20 \text{ mol / mol sacarose}$) comparado a de referência CEN.PK113-7D ($0,25 \text{ mol / mol sacarose}$).

- Atividade de invertase: na célula de referência (CEN.PK113-7D) há 90% de atividade na invertase extracelular já na cepa IMM056, 94% da atividade na invertase intracelular (Tabela 4). Isso se deve a presença do transportador agt1 (Tabela 3) que faz o transporte ativo com eficiência.

A capacidade de transporte ativo (sacarose-próton) é 7 vezes menor na cepa de referência em sacarose com concentração, hidrólise predominantemente extracelular.

9.CONCLUSÃO

Estes dados em conjunto indicam que as leveduras modificadas geneticamente IMM007 (iSUC2 evoluída) realizaram o transporte ativo e apresentaram maior rendimento na produção de etanol em relação à linhagem padrão CEN.PK113-7D (SUC2) que usa a difusão facilitada.

Como a fermentação industrial é realizada em larga escala, qualquer variação de rendimento resulta numa maior rentabilidade da operação e o transporte ativo pode aumentar essa escala em milhões de litros de etanol, viabilizando maior produção e mais lucro com menor quantidade de matéria-prima.

As cepas desenvolvidas e analisadas que foram modificadas geneticamente ainda possuem limitações do ponto de vista industrial, mas a continuidade de estudos que aprimorem a fermentação é de vital importância para as vias de utilização da sacarose por leveduras como também a adaptação dessas linhagens ao processo industrial que permite obter mais álcool sem necessidade de ampliar o plantio de cana-de-açúcar.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Cana-de-açúcar: a produção de etanol e seus benefícios. Disponível em: <<https://brt.ifsp.edu.br/phocadownload/userupload/213354/IFMAN170005%20CANA%20DE%20ACAR%20A%20PRODUO%20DE%20ETANOL%20E%20SEUS%20BENEFCIOS.pdf>> acesso em outubro de 2021; HYPERLINK
- Árvore do conhecimento – Cana-de-açúcar. Disponível em: <https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/cana-de-acucar/arvore/CONTAG01_62_22122006154840.html> acesso em dezembro de 2021;
- Árvore do conhecimento – Agroenergia. Disponível em: <<https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/agroenergia/arvore/CONT000f837cz5r0z8kfsx007poik77p5zs9.html>> acesso em dezembro de 2021;
- Companhia Nacional de Abastecimento (Conab). Acompanhamento da safra brasileira 2019/2020 – cana-de-açúcar, Abril de 2020. Disponível em: <<https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/cana/boletim-da-safra-de-cana-de-acucar>> acesso em dezembro de 2021;
- Produção mundial de cana de açúcar. Disponível em: <<https://www.yarabrasil.com.br/conteudo-agronomico/blog/producao-mundial-de-cana-de-acucar/#:~:text=Aproximadamente%201.700%20milh%C3%B5es%20de%20toneladas,cultivo%20em%20todo%20o%20mundo>> acesso em dezembro de 2021;
- A influência dos contaminantes na fermentação alcoólica. Disponível em: <<https://cepein.femanet.com.br/bdigital/arqtccs/1111360598.pdf>> acesso em dezembro de 2021;
- Avaliação da ação de antibiótico natural na fermentação alcoólica contaminada por cultura mista. Disponível em: <<https://repositorio.ufu.br/bitstream/123456789/15173/1/d.pdf>> acesso em 18 de fevereiro de 2022;
- Desenvolvimento de técnicas e avaliações de antimicrobianos visando à produção de etano carburente. Disponível em: <https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/134361/ventura_r_dr_araiq_int.pdf?sequence=4> HYPERLINK "about:blank"& HYPERLINK "about:blank"isAllowed=y%22"isAllowed=y%22"> acesso em 18 de fevereiro de 2022;

- Processo de fabricação do etanol. Disponível em: <<https://www.novacana.com/etanol/fabricacao>> acesso em 28 de março de 2021;
- Fabricação de açúcar e etanol a partir da cana-de-açúcar. Disponível em: <<https://www.portaldobiogas.com/fabricacao-de-acucar-e-etanol-partir-da-cana-de-acucar/>> acesso em 28 de março de 2021;
- Produção da cana-de-açúcar se aproxima do recorde. Disponível em: <<https://www.conab.gov.br/ultimas-noticias/3742-producao-da-cana-de-acucar-se-aproxima-do-recorde-historico-de-2015>> acesso em 28 de março de 2021;
- Seleção e evolução dirigida de leveduras para utilização nas indústrias do bioetanol e cervejarias. Disponível em: <https://repositorio.ufscar.br/bitstream/handle/ufscar/11586/Mestrado_GustavoLorca_P_pgbiotec.pdf?sequence=1 HYPERLINK
"https://repositorio.ufscar.br/bitstream/handle/ufscar/11586/Mestrado_GustavoLorca_P_pgbiotec.pdf?sequence=1" HYPERLINK
"https://repositorio.ufscar.br/bitstream/handle/ufscar/11586/Mestrado_GustavoLorca_P_pgbiotec.pdf?sequence=1&isAllowed=y%22isAllowed=y"& HYPERLINK
"https://repositorio.ufscar.br/bitstream/handle/ufscar/11586/Mestrado_GustavoLorca_P_pgbiotec.pdf?sequence=1&isAllowed=y%22isAllowed=y" isAllowed=y%22isAllowed=y"> acesso em 20 de janeiro de 2022;
- Figura 4: A qualidade da matéria-prima, na visão industrial; Visão Agrícola. Disponível em: <<https://www.esalq.usp.br/visaoagricola/sites/default/files/cana-tecnologia02.pdf%20HYPERLINK%20%22https://www.esalq.usp.br/visaoagricola/sites/default/files/cana-tecnologia02.pdf%22>> acesso em 25 de fevereiro de 2022;
- Figura 8: Identificação de proteínas relevantes para fase G1 do ciclo celular de *Sacchomyces cerevisiae* diferencialmente presentes durante desativação de EIF5A. Disponível em: <https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/192429/comar_mab_me_arafcf_par.pdf?sequence=4 HYPERLINK
"file:///C:/Users/Jo%2525E3o%252520Manuel/AppData/Roaming/Microsoft/Word/%252522https:/ HYPERLINK
"http://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/192429/comar_mab_me_arafcf_par.pdf?sequence=4&isAllowed=y%22isAllowed=y"repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/192429/comar_mab_me_arafcf_par.pdf?sequence=4 HYPERLINK
"http://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/192429/comar_mab_me_arafcf_par.pdf?sequence=4&isAllowed=y%22isAllowed=y"& HYPERLINK
"http://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/192429/comar_mab_me_arafcf_par.pdf?sequence=4&isAllowed=y%22isAllowed=y" isAllowed=y%22isAllowed=y" HYPERLINK "about:blank"> acesso em 02 de março de 2022;
- Transporte transmembrana. Disponível em: <http://www.esalq.usp.br/lepse/imgs/conteudo_thumb/Transporte-transmembrana.pdf> acesso em 10 de março de 2022;

- Leveduras. Disponível em: <<http://www.ecycle.com.br>> acesso em 2 de fevereiro de 2022.