



XXII CONGRESSO
BRASILEIRO DE
ENGENHARIA QUÍMICA
23 a 26 de Setembro de 2018
Hotel Maksoud Plaza
São Paulo – SP



XVII ENCONTRO BRASILEIRO
SOBRE O ENSINO DE
ENGENHARIA QUÍMICA
27 a 28 de Setembro de 2018
USP
São Paulo – SP

FERMENTAÇÃO DA XILOSE POR *S. CEREVISIAE* RECOMBINANTE: TOLERÂNCIA AO ETANOL

SANDRI J P¹, PEREZ C L¹, MESQUITA T J B¹, MILESSI T S S¹, GIORDANO R L C^{1,2},
ZANGIROLAMI T C^{1,2}

¹Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos,

² Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos

E-mail para contato: juliana.sandri@hotmail.com

RESUMO – *O efeito de diferentes concentrações de etanol sobre a fermentação de xilose pela levedura recombinante S. cerevisiae MDS 130 foi avaliado. Os experimentos foram realizados em meio complexo YPX isento de etanol e suplementado com 20, 40 e 60 g/L de etanol (concentrações iniciais). As fermentações foram acompanhadas pelo perfil de produção de CO₂. As suspensões obtidas ao final de todas as fermentações foram caracterizadas quanto à densidade óptica, viabilidade e concentrações de etanol, subprodutos e xilose.*

1. INTRODUÇÃO

O processamento da cana-de-açúcar em Biorrefinaria flexível, capaz de direcionar frações do bagaço para a produção de etanol 2G ou energia elétrica de acordo com as flutuações dos preços no mercado, é um requisito importante para a viabilidade econômica do negócio (FURLAN et al., 2013). Para a otimização do processo de produção de etanol 2G as cepas industriais devem ser capazes de utilizar eficientemente as hexoses e pentoses, apresentar rápidas velocidades de fermentação, produtividade e rendimento em etanol elevados, além de tolerância ao produto de interesse, açúcares e inibidores de processo (PASHA et al., 2007).

Nos últimos anos, muitas linhagens de *S. cerevisiae* recombinantes capazes de metabolizar pentoses vêm sendo desenvolvidas e disponibilizadas. Porém, uma das desvantagens do emprego de microrganismos geneticamente modificados é a possibilidade de perda de características importantes após a modificação genética, resultando em cepas menos robustas que as industriais, com menor tolerância ao etanol e aos inibidores normalmente presentes em hidrolisados de hemicelulose (DEMEKE et al., 2013; BÜCKER, 2014).

O efeito inibidor do crescimento de microrganismos pelo etanol é bem conhecido. Porém, sua ação sobre as células pode causar danos maiores do que a simples inibição. Estudos relatam que esse composto pode danificar o DNA mitocondrial de leveduras, além de afetar a assimilação de glicose e outros nutrientes por *S. cerevisiae*, sugerindo interferência do etanol nos mecanismos de transporte relacionados à membrana (THOMAS et al., 1978; IBEAS e JIMENEZ, 1997).

Assim, esse estudo teve como objetivo avaliar a influência do etanol sobre o desempenho do processo fermentativo utilizando levedura geneticamente modificada capaz de assimilar xilose.



XXII CONGRESSO
BRASILEIRO DE
ENGENHARIA QUÍMICA
23 a 26 de Setembro de 2018
Hotel Maksoud Plaza
São Paulo - SP



XVII ENCONTRO BRASILEIRO
SOBRE O ENSINO DE
ENGENHARIA QUÍMICA
27 a 28 de Setembro de 2018
USP
São Paulo - SP

2. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados com a linhagem geneticamente modificada da levedura *S. cerevisiae* MDS130, gentilmente cedida pelo grupo de pesquisa do Prof. Johan M. Thevelein (UK Leuven, Bélgica). Todas as fermentações foram conduzidas em micro-reatores de 5 mL (MILESSI, 2017), dotados de saída para o CO₂, incubados a 35°C em condição estática. Todos os experimentos foram realizados em meio YPX (20 g/L de xilose, 20 g/L de peptona e 10 g/L de extrato de levedura), em pH inicial de 5,6, suplementado ou não com etanol nas concentrações de 20, 40 e 60 g/L. Para inocular as fermentações, o inóculo foi preparado em condições aeróbias (frascos de 250 mL com 30 mL de meio, mantidos a 300 rpm e 35°C) em meio YPX e transferido na fase exponencial de crescimento em volume calculado previamente de forma que a densidade ótica inicial fosse 0,1 em todas as fermentações.

As fermentações foram acompanhadas por meio da massa de CO₂ liberado (equivalente à perda de massa do micro-reator), a qual foi correlacionada com a densidade ótica correspondente.

As suspensões obtidas ao final das fermentações foram caracterizadas em termos de densidade ótica (leitura em espectrofotômetro a 600 nm) e viabilidade (coloração com azul de metileno e contagem em câmara de Neubauer, descrito por Milessi (2017)). A concentração de etanol foi determinada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), utilizando o cromatógrafo Waters e2695 com detectores de índice de refração (MILESSI, 2017).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Avaliação do efeito do Etanol

A Figura 1 apresenta os dados de massa de gás carbônico liberada em função do tempo de fermentação. Observa-se que a velocidade de produção de CO₂ dos experimentos suplementados com 40 e 60 g/L de etanol é bem menor que a observada no experimento contendo inicialmente 20 g/L ou do meio YPX isento do álcool. Segundo Ansanay-Galeote (2001), esse comportamento ocorre porque o etanol, em altas concentrações, pode desnaturar proteínas celulares, alterar a permeabilidade da membrana plasmática e inibir a função mitocondrial, fatores que consequentemente prejudicam o processo fermentativo.

Consequências da adição do etanol ao meio de cultivo também podem ser observadas pelos resultados de produtividade em etanol calculados a partir dos dados da figura 1. Para os cultivos YPX, 20, 40 e 60 g/L de suplementação, obtiveram-se produtividades de 0,189; 0,180; 0,092 e 0,0302 g/L.h, respectivamente. Portanto, os valores decrescem significativamente para os meios contendo mais etanol. Li et al. (2017) obteve 0,271 g/L.h de produtividade, para a levedura *S. cerevisiae* O7E15 em meio YPX 4%, valor superior ao encontrado no presente estudo para o meio YPX 2% sem etanol, porém seus experimentos foram realizados em condições microaeróbias, sob 120 rpm de agitação. Bucker (2014) analisou a influência de diferentes concentrações de etanol na velocidade de crescimento da linhagem recombinante de *S. cerevisiae* ABH-4 em meio YPS (2%) e observou que a mesma é afetada pelo composto, com a cessação do crescimento na presença de 10% (v/v) de etanol no meio.

Assim, a comparação entre os perfis de liberação de CO₂ na fermentação conduzida no meio contendo a menor concentração de etanol e no meio YPX sem etanol sugere que as células apresentam tolerância ao etanol na concentração de 20 g/L.

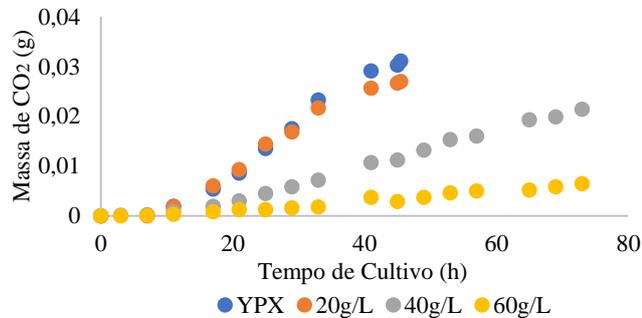


Figura 1 – Dados de massa de CO₂ em função do tempo de fermentação para as quatro condições analisadas.

O efeito da exposição prolongada ao etanol na concentração de 20 g/L foi então avaliado (Figura 2). O experimento foi conduzido em três bateladas repetidas, com duração total de 120 h e os dados de massa de CO₂ liberada são apresentados na forma normalizada em relação ao valor máximo obtido ao final da fermentação para facilitar a visualização da inclinação das curvas.

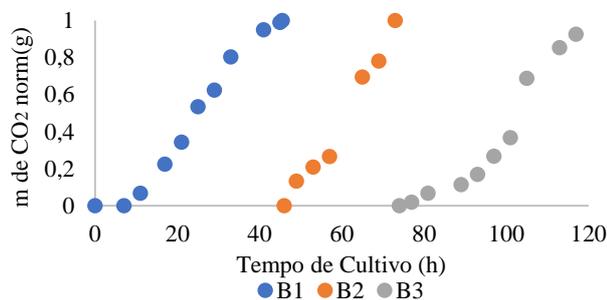


Figura 2 – Dados de massa de CO₂ versus tempo de cultivo para as bateladas repetidas 1, 2 e 3 realizadas na concentração de 20 g/L de etanol. B1- Batelada 1; B2- Batelada 2; B3- Batelada 3

Observou-se que mesmo com a exposição por mais tempo ao etanol, o perfil da velocidade de fermentação não sofreu mudanças significativas (Figura 2), concluindo-se que o álcool presente no meio em concentrações inferiores a 20 g/L não atua de forma inibitória ou tóxica sobre o metabolismo celular. Adicionalmente, os resultados de produtividade para as bateladas 1, 2 e 3 dessa condição foram 0,180; 0,175; 0,171 g/L.h, respectivamente, entre os quais não se observa variações significativas.

Com relação a análise de viabilidade celular ao final dos cultivos, obteve-se 98 % de viabilidade para o meio YPX sem adição de etanol e 97, 88 e 33% para 20, 40 e 60 g/L, respectivamente. As densidades óticas finais também demonstraram a diminuição da concentração de células em suspensão com o aumento da concentração do etanol, sendo 3,10; 2,32; 2,08 e 0,3 em ordem crescente de adição de etanol ao meio. Desta forma, tanto os dados de viabilidade como de densidade ótica confirmam o efeito nocivo do etanol em concentração mais elevada sobre as células. Como nota, o pH dos meios se manteve em aproximadamente 5,5 ao final das fermentações.



XXII CONGRESSO
BRASILEIRO DE
ENGENHARIA QUÍMICA
23 a 26 de Setembro de 2018
Hotel Maksoud Plaza
São Paulo - SP



XVII ENCONTRO BRASILEIRO
SOBRE O ENSINO DE
ENGENHARIA QUÍMICA
27 a 28 de Setembro de 2018
USP
São Paulo - SP

4. CONCLUSÃO

Constatou-se a expressiva influência do etanol sobre as células de *S. cerevisiae* MDS 130. Com um limite de tolerância extremamente baixo, em torno de 20 g/L, a levedura recombinante se mostrou mais suscetível aos efeitos nocivos do etanol do que as leveduras selvagens normalmente utilizadas em processos fermentativos industriais.

5. REFERÊNCIAS

ANSANAY-GALEOTE V, BLONDIN B, DEQUIN S, SABLAYROLLES J M, Stress effect of ethanol on fermentation kinetics by stationary-phase cells of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Lett.*, v 23, p 677-81, 2001.

BÜCKER A. Engenharia Genômica de linhagem industrial de *Saccharomyces cerevisiae* visando melhorar a tolerância ao etanol. Tese de Doutorado. PPG-Bioquímica, UFSC, 2014.

DEMEKE M M, DIETZ H, LI Y, FOULQUIÉ-MORENO M R, MUTTURI S, DEPREZ S, ABT T D, BONINI B M, LIDEN G, DUMORTIER F, VERPLARTSE A, BOLES E, THEVELEIN J M, Development of a D-xylose fermenting and inhibitor tolerant industrial *Saccharomyces cerevisiae* strain with high performance in lignocellulosic hydrolysates using metabolic and evolutionary engineering. *Biotechnol. Biofuels*, v 6, p 89, 2013.

FURLAN F F, FILHO R T, PINTO F H P B, COSTA C B B, CRUZ A J G, GIORDANO R L C, GIORDANO R C. Bioelectricity versus bioethanol from sugarcane bagasse: is it worth being flexible? *Biotechnol. Biofuels*, v 6, p 142, 2013.

IBEAS J I e Jimenez J. Mitochondrial DNA loss caused by ethanol in *Saccharomyces flor* yeasts. *Appl. Environ. Microbiol.* v 63, p 7-12, 1997.

LI Y, ZENG W, GOU M, SUN Z, XIA Z, TANG Y. Transcriptome changes in adaptive evolution of xylose-fermenting industrial *Saccharomyces cerevisiae* strains with δ -integration of different *xylA* genes. *Appl Microbiol Biotechnol*, 101:7741-7753, 2017.

MILESSI T S S. Produção de etanol 2G a partir de hemicelulose de bagaço de cana-de-açúcar utilizando *Saccharomyces cerevisiae* selvagem e geneticamente modificada imobilizadas. Tese doutorado. PPG-EQ/UFSCar, 2017.

PASHA C, KUHAD R C, VENKATESWAR R L. Stain improvement of thermotolerant *Saccharomyces cerevisiae* VS3 strain for better utilization of lignocellulosic substrates. *J Appl Microbiol*, v 103, p 1480-1489, 2007.

THOMAS D S, HOSSACK J A, ROSE A H. Plasma-membrane lipid composition and ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Archives of Microbiology*, v 117, p 239-245, 1978.

6. AGRADECIMENTOS

PPG-EQ/UFSCar, CAPES, FAPESP (Processo 2016/10.636-8), CNPq (Projeto Universal #409366/2016-1) e IPIRANGA AGROINDUSTRIAL - Descalvado.