

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Rafael Barros de Souza

**Análise do desempenho fermentativo da levedura
Saccharomyces cerevisiae em resposta a composição
mineral do meio.**

Recife, 2012

Rafael Barros de Souza

Análise do desempenho fermentativo da levedura *Saccharomyces cerevisiae* em resposta a composição mineral do meio.

Dissertação de Mestrado apresentada à Coordenação do Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos à obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas, área de concentração: Biotecnologia.

Prof. Dr. Marcos Antonio de Moraes Junior
Orientador

Recife, 2012

Catálogo na Fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB-4/1788

S729a Souza, Rafael Barros de

Análise do desempenho fermentativo da levedura *Sacchormyces cerevisiae* em resposta a composição mineral do meio / Rafael Barros de Souza. – Recife: O Autor, 2012.

66 folhas: il., fig., tab.

Orientador: Marcos Antônio de Moraes Junior

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências Biológicas. Pós-graduação em Ciências Biológicas, 2012.

Inclui referências

1. Fermentação 2. Leveduras (fungos) 3. Cana-de-açúcar I. Moraes Júnior, Marcos Antonio de (orientador) II. Título.

572.49

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2013-004

Rafael Barros de Souza

Análise do desempenho fermentativo da levedura *Saccharomyces cerevisiae* em resposta a composição mineral do meio.

Dissertação de Mestrado apresentada à Coordenação do Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos à obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas, área de concentração: Biotecnologia. Tendo a menção de Aprovado.

Data da Aprovação_24_/08/_2012_

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. MARCOS ANTONIO DE MORAIS JUNIOR

Departamento de Genética – UFPE

Profa. Dra. ANA PAULA SILVEIRA PAIM

Departamento de Química Fundamental – UFPE

Prof. Dr. FLÁVIO LUIZ HONORATO DA SILVA

Departamento de Engenharia Química – UFPB

Recife, 2012

“O único homem que está isento de erros é
aquele que não arrisca acertar”.

(Albert Einstein)

AGRADECIMENTOS

A orientação e amizade do Professor Marcos Antonio de Moraes Junior.

Ao apoio dos meus colegas do laboratório do CETENE e do núcleo de engenharia metabólica (NEM).

A minha família e noiva pelo grande apoio e companheirismo.

As empresas GENETECH e FERMENTA no apoio a minha formação.

A Destilaria Miriri - PB pela disponibilidade dos dados industriais.

A FACEPE, CNPq e CAPES pelo suporte financeiro recebido.

RESUMO

Apesar dos grandes avanços para melhorar as características das variedades de cana-de-açúcar, pouco se sabe sobre o impacto da qualidade do caldo da cana-de-açúcar no processo de fermentação industrial, mais especificamente sobre o metabolismo fermentativo da levedura. No presente trabalho analisamos a relação entre a variação da composição mineral do caldo de cana e a capacidade fermentativa das células de *Saccharomyces cerevisiae*, determinando a cinética de consumo de sacarose e produção de etanol e glicerol, bem como o efeito cumulativo desses minerais ao longo de ciclos fermentativos. Foram utilizados meios de fermentação suplementados com os principais macro e micronutrientes encontrados no caldo de cana de açúcar. Entre os minerais avaliados todos os meios suplementados apresentaram um resultado superior ao meio padrão (meio controle), exceto o meio com cobre. Os meios com maior influência no rendimento em etanol foram os meios com ureia, magnésio e manganês que apresentaram um aumento de 18,4% em relação ao meio padrão. O meio com cobre apresentou o menor valor em comparação a todos os meios analisados, contudo, sem diferenciar na viabilidade celular. Esses resultados sugerem que de fato os minerais desempenham importantes papéis no metabolismo fermentativo das células de *S. cerevisiae* e que determinados minerais como nitrogênio na forma de ureia, magnésio e manganês são mais significativos para o aumento do rendimento em etanol do que os outros minerais.

Palavras chaves: Cana de açúcar, Composição mineral, rendimento em etanol, Linhagem industrial

ABSTRACT

Despite great advances to improve the characteristics of the varieties of sugar cane, less is known about the impact of the sugar cane juice quality in the fermentation industry, more specifically on the fermentative metabolism of yeast. In this study we analyzed the relationship between variation of mineral composition of sugarcane juice and fermentative ability of *Saccharomyces cerevisiae* cells, determining the kinetics of sucrose intake and ethanol and glycerol production, as well as the cumulative effect of these minerals along recyclings fermentation. Fermentation media were supplemented with the main macro and micro nutrients found in sugar cane juice. Among the minerals examined all media supplemented showed a superior result to the standard medium (control medium), except the medium with excess copper. The medium with the greatest influence on the yield of ethanol was medium with urea, magnesium and manganese in which showed an 18.4% increase over the standard medium. The medium with copper with the lowest value compared to all the medium types, however, no difference in cell viability. These results suggest that in fact the minerals play important roles in the fermentative metabolism of the *S. cerevisiae* cells and that certain minerals, such as nitrogen as urea, magnesium and manganese are the most significant increase in ethanol yield than other minerals.

Keywords: Sugar cane, mineral composition, ethanol yield, industrial strain

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1

Figura 1. Perfil fermentativo da linhagem industrial JP1 nos meios sintéticos suplementados com diferentes concentrações de minerais. Os dados de consumo dos açúcares, produção de etanol, glicerol e CO₂ são apresentados. Gráfico **A**: meio padrão 1º batelada; **B**: meio com uréia 1º batelada; **C**: meio padrão 2º batelada; **D**: meio com manganês 2º batelada; **E**: meio padrão 3º batelada; **F**: meio com amônio 3º batelada. Os gráficos das demais fermentações estão no anexo.46

Figura 2. Comparação gráfica dos parâmetros fermentativos entre as três bateladas nos diferentes meios enriquecidos com os macronutrientes e o meio Padrão (sem suplementação de minerais). $Y_{(p/s)}$: rendimento em etanol (grama de açúcar consumido por grama de etanol produzido).50

Figura 3. Comparação gráfica dos parâmetros fermentativos entre as três bateladas nos diferentes meios enriquecidos com os micronutrientes e o meio Padrão (sem suplementação de minerais). $Y_{(p/s)}$: rendimento em etanol (grama de açúcar consumido por grama de etanol produzido).50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Números finais da produção de cana de açúcar e etanol do setor sucroalcooleiro brasileiro. Adaptado (SINDAÇÚCAR, 2012).	15
Tabela 2. Custo da produção de etanol, adaptado de Walker (2011).....	17
Tabela 3. Resumo da diversidade de fontes de carbono para os processos de fermentação industrial (Walker, 2004).	21
Capítulo 1	
Tabela 1. Concentração dos minerais nos meios utilizados para os ensaios de fermentação.	37
Tabela 2. Composição mineral de caldos de cana de açúcar oriundos da destilaria Miriri-PB de diferentes fazendas.	40
Tabela 3. Parâmetros fermentativos da primeira batelada dos diferentes meios testados utilizando a linhagem industrial JP1 a 33°C durante 6 horas em condições estáticas....	42
Tabela 4. Parâmetros fermentativos da segunda batelada dos diferentes meios testados utilizando a linhagem industrial JP1 a 33°C durante 6 horas em condições estáticas...	43
Tabela 5. Parâmetros fermentativos da terceira batelada dos diferentes meios testados utilizando a linhagem industrial JP1 a 33°C durante 6 horas em condições estáticas...	43
Tabela 6. Viabilidade celular no final de cada batelada. No início da primeira batelada todas as viabilidades estavam em 100%. A viabilidade inicial da primeira batelada é a final da primeira e a inicial da terceira é a final da segunda.	44
Tabela 7. Resultados de produtividade volumétrica de glicerol, CO ₂ e Etanol em gramas por litro por hora de fermentação na primeira batelada.	47
Tabela 8. Resultados de produtividade volumétrica de glicerol, CO ₂ e Etanol em gramas por litro por hora de fermentação na segunda batelada.	48
Tabela 9. Resultados de produtividade volumétrica de glicerol, CO ₂ e Etanol em gramas por litro por hora de fermentação na terceira batelada.	48

LISTA DE ABREVIATURAS

Proálcool	Plano de Nacional do Álcool
UNICA	União da Indústria de Cana-de-Açúcar
ATP	Adenosina trifosfato
Kcal	Quilocaloria
NAD	Nicotinamida adenina de nucleotídeo
YPD	Yeast (Extrato de levedura), Peptona e Dextrose
HPLC	Cromatografia líquida de alta pressão (High-performance liquid chromatography)
Qp	Produtividade volumétrica
Y_(p/s)	Rendimento em etanol
ECA	Eficiência de conversão do açúcar em etanol
JP1	Linhagem Industrial de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
YNB	Yeast Nitrogen base

SUMÁRIO

	Pág.
AGRADECIMENTOS	
RESUMO	
ABSTRACT	
LISTA DE FIGURAS	
LISTA DE TABELAS	
LISTA DE ABREVIATURAS	
1. INTRODUÇÃO GERAL	14
2. REFERENCIAL TEÓRICO	
2.1 Produção de etanol no Brasil	14
2.2 Fermentação Industrial	16
2.2.1 Matéria Prima	16
2.2.2 Processos Industriais	18
2.3 Fermentação Alcoólica	19
2.4 Nutrição da levedura na fermentação	20
2.4.1 Importância dos minerais para as células de levedura	22
2.5 Considerações	25
3. OBJETIVOS	26
4. Referências bibliográficas	26
CAPÍTULO I	
Análise do desempenho fermentativo da levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> em resposta a composição mineral do meio.	33

RESUMO	34
INTRODUÇÃO	35
MATERIAIS E MÉTODOS	36
Microorganismo e condições de crescimento	36
Análise Mineral do caldo de cana	36
Meio para a fermentação	37
Condições da fermentação	38
Determinação da viabilidade celular e pH	38
Determinação dos metabólitos da fermentação	38
Parâmetros fermentativos	40
Análise estatística	40
RESULTADOS	40
Análise Mineral do caldo de cana	40
Análise dos parâmetros fermentativos	41
Análise do perfil cinético da fermentação	44
Análise do reciclo celular no desempenho fermentativo	49
DISCUSSÃO	51
Influência dos minerais no metabolismo fermentativo	51
Perfil cinético da fermentação	54
Efeito do reciclo celular no desempenho fermentativo	55
CONCLUSÃO	56
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56

MATERIAL SUPLEMENTAR

Gráficos de cinética das fermentações

1. INTRODUÇÃO GERAL

O Brasil utiliza a cana-de-açúcar como matéria-prima para a produção de álcool combustível e isso vem proporcionando ao setor sucroalcooleiro o menor custo de produção frente a outras matérias-primas (Walker, 2011). Todavia, mesmo com essa importante vantagem econômica o setor constantemente se depara com desafios para manter-se competitivo no mercado e isso lhe obriga a sempre estar desenvolvendo novas tecnologias e conhecendo cada vez mais as particularidades do processo. Em resposta a esses desafios o setor necessita expandir e novas variedades de cana-de-açúcar são desenvolvidas, o que significa que o Brasil, atualmente, conta com cerca de 80 variedades adaptadas aos diversos tipos de estresse ambiental (Menezes, 2012). Apesar dos grandes avanços para melhor as características dessas variedades pouco se sabe sobre o impacto da qualidade do caldo da cana-de-açúcar no processo de fermentação industrial, mais especificamente, no metabolismo fermentativo das células de levedura.

Na tentativa de se explicar diminuição no rendimento industrial de algumas destilarias do nordeste brasileiro, o grupo de engenharia metabólica da UFPE (NEM) decidiu analisar duas variáveis importantes na produção de álcool combustível, a massa de célula presente nas dornas de fermentação e o mosto de alimentação (caldo de cana-de-açúcar diluído). Através dos ensaios de fermentação e de determinações dos minerais no caldo de cana-de-açúcar foi possível observar que existe uma correlação entre a queda do rendimento fermentativo da biomassa e a chamada “fermentabilidade” do mosto de alimentação, que consiste na capacidade desse mosto em ser fermentado pelas células de levedura. Nessas amostras foram detectada ausência de contaminação tanto por levedura selvagem como também por bactérias. Portanto, esses resultados, gerados na safra 2009-2010, sugeriram que a composição mineral do mosto de alimentação estaria interferindo no metabolismo celular. Então, o presente trabalho teve como objetivo geral avaliar a influência da composição mineral do mosto de alimentação sobre o estado metabólico das células de levedura durante a fermentação alcoólica, analisando a cinética do consumo dos açúcares, da produção de etanol, gás carbônico e glicerol, analisando o rendimento e eficiência do processo e identificar quais os minerais, que isoladamente, mais influenciam no desempenho fermentativo das células de levedura.

1. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. Produção de Etanol no Brasil

O etanol é o biocombustível mais consumido no mundo. O Brasil é o primeiro país que introduziu esse combustível renovável na sua matriz energética e atualmente detém o processo economicamente mais viável para a produção de etanol e é um dos maiores produtores do mundo (Basso *et al.* 2011). Todo esse avanço Brasileiro é devido, principalmente, ao lançamento do Plano Nacional do Álcool (PROÁLCOOL) na década de 70 que visava estimular a produção de etanol pelos empresários do setor proporcionando-os empréstimos a juros baixos e alto preço de venda do produto (Mutton *et al.*, 2006). Atualmente, a maior parte da produção de etanol é consumida internamente. De todos os automóveis utilizados no Brasil, oito a cada dez são veículos do tipo “flex-fuel” que podem utilizar tanto gasolina como álcool puro, ou a combinação dos dois combustíveis em qualquer proporção (Pilgrim, 2009).

O cenário de produção de etanol no Brasil é bastante divergente entre as regiões C/Sul e Norte/Nordeste (Tabela 1). Apesar da baixa produção em comparação ao C/Sul do país o setor sucroalcooleiro nordestino apresenta competitividade no mercado externo, visto que, o seu custo de produção fica acima apenas do obtido nesta região. O crescimento da produção da Zona da Mata nordestina depende dos níveis de produtividade da cultura da cana por meio da ampliação da área irrigada e do aumento no rendimento industrial (Vidal *et al*, 2006).

Tabela 1. Números finais da produção de cana-de-açúcar e etanol do setor sucroalcooleiro brasileiro. Adaptado (SINDAÇÚCAR, 2012).

Safr/Região	N/NE		C/SUL		BRASIL	
	Cana(t)	Etanol(m ³)	Cana(t)	Etanol(m ³)	Cana(t)	Etanol(m ³)
2008/2009	64.218,30	2.418,50	509.422,7	25.270,20	573.641,1	27.688,80
2009/2010	59.917,90	2.005,10	541.961,7	23.685,70	601.879,7	25.690,90
2010/2011	63.139,00	1.987,30	560.544,3	25.612,50	623.683,3	27.599,80
2011/2012*	63.120,30	2.030,70	493.263,3	20.546,10	556.383,6	22.576,80

*dados parciais antes do fechamento da safra.

Em 2008, empurrado pela crise econômica mundial, que resultou em menos investimento e também pelo fator clima que apresentou excesso de chuva em 2009 e seca em 2010, resultando numa lavoura de baixa produtividade, o setor sucroalcooleiro vem passando por vários desafios (ÚNICA, 2012). O etanol perdeu competitividade para a gasolina, os custos aumentaram e o setor precisa ganhar em produtividade. Todavia, mesmo com esse cenário desfavorável o setor acredita que terá 1,2 bilhão de toneladas de cana até 2020, o que demandará 120 novos projetos para implantação de destilarias (ÚNICA, 2012).

2.2. Fermentação Industrial

2.2.1. Matéria-Prima

Tecnicamente, o etanol pode ser produzido de uma ampla variedade de matérias-primas renovável que podem ser classificadas em três principais grupos: Aqueles que contem quantidades consideráveis de açúcares facilmente fermentáveis (cana-de-açúcar, beterraba sacarina, sorgo sacarino), por fontes de amido e polímeros de frutose (milho, batata, arroz, trigo, agave) e por fonte celulósica (palha, capim, sabugo de milho, madeira, bagaço de cana) (Basso *et al.*, 2011).

O processamento da cana-de-açúcar para a produção de etanol é dominado pelo Brasil, onde a contínua colheita da cana tem a duração de cerca de 200 dias. Entretanto, as regiões de grande produção estão concentradas em apenas alguns estados da região Nordeste, Sudeste e Centro-Oeste, sendo o estado de São Paulo o maior produtor nacional (ÚNICA, 2011). No Brasil, a matéria-prima para a produção de etanol não se restringe somente ao caldo de cana-de-açúcar. O mel final ou melaço é um subproduto da produção do açúcar e também é utilizado associado ao caldo de cana-de-açúcar ou simplesmente diluído como substrato do processo fermentativo.

A matéria-prima tem um impacto significativo no custo da produção do etanol, no qual é influenciado pela região e o processamento. A Tabela 2 mostra que o custo de produção de etanol varia dependendo da matéria-prima que será utilizada. Essa análise de custo é muito simplista devido basicamente às flutuações dos preços da gasolina e

dos custos da matéria-prima. A adição de mel na produção de etanol ocorre também com o intuito de diminuir os custos da matéria-prima, em particular a fonte orgânica de carbono diretamente da cana, a qual pode incidir em 38 a 73% no custo total do etanol final (Schmidell, 2005).

Tabela 2. Custo da produção de etanol a partir de diferentes matérias-primas (adaptado de Walker (2011)).

Matéria-Prima	Custo de Produção (R\$/litro)
Milho (EUA)	1,06
Palha de milho	1,14 - 1,46
Trigo (UE)	0,68 - 1,09
Beterraba sacarina (UE)	0,81 - 1,36
Cana-de-açúcar (Brasil)	0,4 - 0,71
Melaço (China)	0,61
Sorgo Sacarino (China)	0,56
Fibra de Milho (EUA)	1,03
Palha de Trigo (EUA)	1,11

Desde muito tempo o controle da matéria-prima nas fábricas de açúcar e álcool vem sendo motivo de muita atenção para a qualidade no manejo em campo e indústria (Caldas, 1998). A composição do caldo de cana-de-açúcar pode variar e essa variação é um dos fatores que afetam as diversas operações unitárias de um processo industrial, como a purificação do caldo e o rendimento da fermentação alcoólica (Cezar *et al.*, 1987). Destaca-se a influência de inúmeros parâmetros na formação do perfil do caldo de cana. Entre eles: a variedade da cana, tipo de solo, adubação, condições climáticas, grau de maturidade da cana, tipo de colheita, tempo entre a queima, corte e processamento, conteúdo de pontas e palhas e também pela utilização ou não de vinhaça para a irrigação (Souza, 1988, Santos, 2008).

Os teores de minerais são os que mais variam nas composições dos caldos de cana-de-açúcar. Para tentar minimizar essas diferenças muitas destilarias acrescentam o melaço ao caldo. Essa mistura é a mais recomendada uma vez que alguns caldos apresentam deficiência nutricional e o melaço contém minerais concentrados no sua composição (Basso *et al.*, 2011).

Infelizmente, na literatura não é encontrado muitos dados de composição mineral de forma quantitativa e qualitativa nos caldos de cana-de-açúcar e melaço utilizados nas destilarias do Brasil.

2.2.2 Processos Industriais

Processos de fermentação alcoólica no Brasil são concebidos de forma semelhantes aos encontrados em outros países. Eles são constituídos por três unidades básicas: Unidades de fermentação (Dornas de fermentação); as unidades de separação das células de levedura (Centrifugas) e as unidades de tratamento das células recicladas (Pré-fermentadores) (Andrietta, *et al.*, 2011). Em 75% das destilarias do país o processo é conduzido pelo método Melle-Boinot, normalmente chamado de batelada alimentada, ou no modelo contínuo, ambos utilizando o reciclo de células de levedura (Basso *et al.*, 2011).

O processo de batelada alimentada consiste basicamente na transferência do fermento tratado para as dornas de fermentação através de bombeamento ou gravidade. Com a transferência concluída, o substrato a ser fermentado começa a alimentar a dorna até preencher o volume adequado para o processo. No final da fermentação, caracterizada inicialmente pelo consumo total do açúcar, o mosto fermentado é enviado para centrífugas, onde ocorrerá a separação das células de levedura do vinho (sobrenadante). A massa de células é enviada para os pré-fermentadores onde serão diluídas e tratadas, geralmente, com ácido sulfúrico para o controle de bactérias e depois iniciarem uma nova fermentação (Andrietta *et al.*, 2011).

O processo contínuo de fermentação é caracterizado pela utilização de várias dornas de fermentação conectadas em série no qual tanto o substrato de alimentação quanto as células de levedura tratadas são simultaneamente adicionados às dornas de fermentação de uma maneira contínua e controlados (Andrietta *et al.*, 2011).

Em ambos os processos descritos acima no final da fermentação ocorre à coleta das células de levedura pela centrifugação e a reutilização para os próximos ciclos de fermentação. Cerca de 90 a 95% das células são recicladas resultando em células de alta densidade nas dornas. Essa reutilização reduz a necessidade de intensificar a propagação da levedura e diminui o desvio do açúcar para a formação de biomassa. E estima-se que durante o ciclo de fermentação ocorre o aumento de célula entre 5 a 10%, recuperando

as células perdidas na centrifugação. A reutilização da biomassa de levedura ocorre até ser identificada alguma queda no rendimento fermentativo causada por contaminação microbiológica incontrolável por biocidas ou queda na viabilidade celular. Um ciclo de fermentação dura em torno de 6 a 10 horas e normalmente a temperatura é mantida entre 32 a 35°C (Basso *et al.*, 2011).

2.3. Fermentação Alcoólica

A fermentação alcoólica é um processo anaeróbico que consiste na transformação dos açúcares em etanol e CO₂, catalisado por enzimas. Esse processo é realizado, principalmente por leveduras, com o objetivo de produzir adenosina trifosfato (ATP), a qual será empregada na realização das atividades fisiológicas, para crescimento e reprodução, sendo o etanol, tão somente, um subproduto desse processo (Lima *et al.*, 2001).

A equação de Gay-Lussac estabelece que 1 mol de glicose (180 g) produz 2 moles de etanol (92 g), 2 moles de dióxido de carbono (88 g) e 57 Kcal de energia (Lehninger *et al.*, 1995; Kolb, 2002). Isto corresponde ao rendimento teórico ($Y_{P/S}$) máximo de 0,511 g de etanol produzido por grama de glicose consumida. Na prática industrial, valores de rendimento de 0,46 g etanol/g glicose, correspondente a 90% do máximo teórico, são considerados bons visto que parte do açúcar metabolizado pela levedura é desviada para gerar produtos como glicerol, alcoóis superiores e outros, além do necessário para manutenção celular (Lima *et al.*, 2001).

As células de *S. cerevisiae* são as mais empregadas nesse tipo de processo, devido a sua maior capacidade fermentativa comparada a todos os outros microrganismos. Essa levedura é considerada como tendo o metabolismo do tipo Crabtree positivo, no qual a presença de glicose ou de outros açúcares fermentáveis acima de certa concentração induz o metabolismo fermentativo mesmo na presença de oxigênio (Postma *et al.*, 1989). Isso se dá pelo fato de que o excesso de glicose aumenta o fluxo pela via glicolítica e eleva a concentração de NADH. As leveduras que possuem esse metabolismo parecem apresentar um “gargalo” fisiológico que limita a re-oxidação desse NADH excedente pela cadeia respiratória, e leva ao redirecionamento da metabolização do piruvato pela via fermentativa (Pronk *et al.*, 1996). Além do etanol, outros produtos podem ser gerados durante o processo, diminuindo essa eficiência e

comprometendo o rendimento da fermentação. Desta forma, os metabolismos centrais do carbono em *S. cerevisiae* têm sido amplamente quantificados, sendo os mais importantes os subprodutos do tipo C1 (CO₂), C2 (acetato), C3 (piruvato e glicerol) e C4 (ácidos orgânicos, abrangendo fumárico, ácido málico e succínico) (Otero *et al.*, 2007). Além da dissimilação do carbono e da energia a partir da formação dos subprodutos, outros fatores podem concorrer para a diminuição da capacidade fermentativa da levedura, tais como os fatores que inibem a atividade das enzimas da via glicolítica, tais como a escassez ou excesso de nutrientes e ativadores alostéricos (vitaminas e minerais) e a presença de substâncias inibidoras (minerais e substâncias orgânicas) (Santos, 2008).

Durante o processo de fermentação industrial as células de levedura se deparam constantemente com condições de estresse tais como estresse oxidativo, osmótico, elevadas temperaturas, estresse etanólico e limitações ou excessos de nutrientes. Todos esses estresses podem afetar o desempenho fermentativo das leveduras, fazendo com que as células não consigam consumir todos os açúcares disponíveis no tempo ideal ou que a produção de etanol fique abaixo do rendimento esperado. Dentre esses fatores, a nutrição da levedura se torna um fator muito importante, a qual remete a qualidade da matéria-prima utilizada no processo (Walker, 2003).

2.4. Nutrição da levedura na fermentação

As leveduras são microrganismos saprófitas que exigem uma fonte de carbono elaborada, glicose ou outro açúcar, que fornece a energia química e o esqueleto carbônico de suas estruturas celulares, constituídas predominantemente de carbono, oxigênio e hidrogênio (Santos, 2008).

Durante o processo de fermentação industrial os metabolitos secretados pelas células são meramente produtos residuais para manter o equilíbrio redox. Muitos desses metabolitos são valiosos produtos de fermentação, um importante exemplo é o etanol, o qual é produzido quando as células regeneram NAD⁺ na tentativa de manter o curso da glicólise e para gerar ATP suficiente para biossíntese celular (Walker, 2004).

A maioria das leveduras empregadas em fermentações industriais, normalmente cepas de *Saccharomyces cerevisiae*, utilizam eficazmente açúcares tais como sacarose, glicose e frutose para seu crescimento e metabolismo. Leveduras de outras espécies

podem utilizar uma gama mais ampla de fontes de carbono para o processo industrial e estes incluem lactose, xilose, metanol, amido, inulina e n-alcanos (Walker, 2004). A tabela 4 resume a diversidade de fonte de carbono para as leveduras no processo de fermentação industrial.

Além das fontes de carbono também estão presentes no caldo de cana compostos orgânicos tais como vitaminas (A, B1 e B6), aminoácidos e ácidos orgânicos. O caldo pode conter vários aminoácidos tais como ácido aspártico, glutâmico, alanina, leucina, glicina, lisina, tiroxina, etc. O aminoácido arginina, por exemplo, quando adicionado ao mosto de alimentação incrementa a produção de CO₂, logo induz um maior vigor fermentativo nas células de levedura (Butzke e Seung, 2011). Os ácidos orgânicos presentes no caldo como acético, cis-acronpítico, fórmico, fumárico, itacônico, láctico, maleico, oxálico, trans-aconítico, succínico, shikimico, são responsáveis pelo pH do caldo de cana. Os ácidos acético e láctico são resultantes do processo de deterioração da cana pós-corte (Menezes, 2012). Esses compostos orgânicos podem fazer parte da lista dos potenciais inibidores da fermentação alcoólica.

Tabela 3. Diversidade de fontes de carbono para os processos de fermentação industrial por células de leveduras (Walker, 2004).

Forma do carbono	Exemplos	Fontes Industriais	Leveduras	Produtos
Pentose	Xilose e Arabinose	Hidrolizado de madeira/celulose e steep corn	<i>Pichia stipitis</i> e <i>Candida shehatae</i>	Etanol e Biomassa
Dissacarídeos	Sacarose, Maltose e Lactose	Caldo de cana-de-açúcar e beterraba, melão, cereais e soro de queijo	<i>S. cerevisiae</i> e <i>Kluyveromyces marxianus</i>	Etanol, Leveduras de panificação, extrato de alimentos, cerveja, bebidas destiladas e biomassa
Polissacarídeos	Amido e Inulina	Cereais, Tubérculos (Agave)	<i>Schwanniomyces</i> e <i>Kluyveromyces</i>	Etanol, biomassa e enzimas
Álcoois Alfáticos	Etanol e Metanol	Resíduos de destilados	<i>Candida utilis</i> , <i>Pichia pastoris</i> , <i>Hansenula polymorpha</i>	Biomassa e proteínas recombinantes
Hidrocarbonetos	n-alcanos	Petroquímicas	<i>Yarrowia lipolytica</i>	Biomassa e proteínas

Os minerais também são de muita importância para a nutrição das leveduras e é necessário que o caldo de cana tenha disponíveis íons como amônio, fósforo, enxofre, potássio, magnésio, cálcio, zinco, manganês, cobre, ferro e outros elementos (Lima *et al.*, 2001). Para a fermentação alcoólica os metais considerados mais importantes são potássio, magnésio, cálcio, manganês, ferro, zinco e cobre (Walker, 2004).

2.4.1 Importância dos minerais para as células de levedura

Infelizmente, os minerais são negligenciados como um fator determinante para o desempenho fermentativo. As leveduras requerem uma vasta gama de metais para seu crescimento e suas funções metabólicas. A nutrição mineral da célula é, portanto, muito importante para garantir o sucesso da fermentação, particularmente no processo de produção de álcool (Walker, 2003).

Os nutrientes como magnésio, manganês, zinco, cobre, ferro entre outros são muito importantes como cofatores de muitas enzimas. Íons metálicos são vitais para todos os organismos, e desta forma, transportadores destes íons têm um papel crucial na manutenção da homeostase (Stehlik-Thomas *et al.*, 2004). Todavia, quantidades excessivas desses íons podem ser tóxicas e causar danos às funções que se prestam. Por exemplo, em níveis elevados alguns sais como potássio, cálcio e magnésio presentes no melaço de caldo de cana-de-açúcar podem causar estresse osmótico das células de levedura e comprometem o desempenho da fermentação (Basso *et al.*, 2011).

O nitrogênio pode ser assimilado por *Saccharomyces cerevisiae* nas formas amoniacal (NH_4^+), amídica (Ureia) ou amínica (na forma de aminoácidos), mas não em forma de nitrato e com pouquíssima ou nenhuma capacidade de assimilar as proteínas do meio (Roitman *et al.*, 1988). Todavia, recentemente foi identificada uma espécie de levedura, *Dekkera bruxellensis*, a qual é constantemente encontrada nos processos industriais de fermentação alcoólica, que apresenta a habilidade de assimilar nitrogênio na forma de nitrato, podendo conferir-lhe uma vantagem competitiva no processo (De Barros Pita *et al.*, 2011). O nitrogênio influi sobre o brotamento da levedura e na taxa de multiplicação de células e também desempenha um importante papel para a fermentação alcoólica. Durante a fermentação, o nitrogênio é responsável pela ativação de sistemas de transporte de açúcares pelas células, aumentando a entrada de açúcares no interior da célula (Lagunas *et al.*, 1982).

O magnésio é o cátion divalente intracelular mais abundante e constitui algo em torno de 0,3% do peso seco da levedura e atua como cofator enzimático para mais 300 enzimas envolvidas em diferentes vias metabólicas e bioenergéticas (síntese de DNA e ATP). O magnésio desempenha papéis multifacetados na fisiologia das células de levedura nos níveis citológicos, bioquímicos e biofísico. É muito importante no processo de fermentação industrial sendo necessário para ativação de várias enzimas glicolíticas (Walker, 2003), na proteção de estresses ambientais durante a fermentação, tais como aquelas causadas por etanol (Dombek, 1986), temperaturas elevadas, ou pressão osmótica elevada (D'Amore et al., 1988). Portanto, a biodisponibilidade no meio, a absorção celular e a utilização metabólica posterior de íons de Mg^{2+} pelas células parece ser um pré-requisito para a realização da atividade fermentativa da célula de levedura (Walker, 1997).

Diferentemente do magnésio, o cálcio apresenta relativamente poucas e específicas funções bioquímicas, sendo exigido em quantidades muito menores pela célula (Youatt, 1993). Embora o cálcio não seja aparentemente necessário para o crescimento de células de levedura (Vasconcelos, 1987), ele é importante na fermentação estando envolvido na proteção celular ao estresse causado pela elevada concentração de etanol (Chourchesne et al., 2010) e quando se liga na parede celular da levedura, causando a floculação, sendo importante em fermentações de cerveja (Walker, 2003). Recentemente, foi sugerido que a assimilação de cálcio poderia auxiliar na proteção e tolerância ao pH ácido do meio (Mendonça *et al.*, 2012), já que este mineral atua como um sinalizador intracelular da regulação homeostática (Cyert, 2003).

O potássio é o cátion celular mais abundante em leveduras, constituindo 1-2% do peso seco da célula (Walker, 2003), sendo importante na osmorregulação, equilíbrio de carga de macromoléculas, regulação de fosfato e absorção de cátions divalente (Jones e Greenfield, 1994). O potássio atua como ativador de uma série de reações na glicólise e em outros passos do metabolismo e está envolvido no balanço iônico. A quantidade de potássio absorvida pela célula durante a fermentação é o dobro da quantidade exigida na sua multiplicação e crescimento (Santos, 2008).

O fósforo é essencial para o metabolismo energético e na síntese de ácidos nucleicos. Esse elemento é considerado indispensável à absorção de carboidratos e na transformação do açúcar em álcool e na produção de ATP, tanto na glicólise quanto na cadeia respiratória (Amorim, 1985, Vasconcelos, 1987).

O alumínio é um metal tóxico que inibe a produtividade de muitas culturas, contudo, informações detalhadas são encontradas somente com relação a seus efeitos sob as plantas (Haug, 1984). Recentemente, foi identificado como elemento estressante da levedura, em condições de fermentação industrial, acarretando queda simultânea da viabilidade e dos teores de trealose da levedura (Santos, 2008).

O zinco é um elemento essencial para o crescimento normal, o metabolismo e a fisiologia da célula de levedura, além de atuar como cofator para muitas proteínas (Zhao *et al.*, 2011). Ele também desempenha um importante papel no metabolismo fermentativo da levedura, porque é essencial para a atividade da álcool desidrogenase (Magonet *et al.*, 1992), apresentando também um papel crucial na estrutura de enzimas e proteínas não catalítica (Berg *et al.*, 2002). Íons de zinco em quantidades adequadas no meio promove aumento na taxa de crescimento de células de levedura, bem como a produção de etanol (Jones e Gadd, 1990). Em contraste, deficiência de íons de zinco paralisa o crescimento celular e a atividade fermentativa, por outro lado, concentrações elevadas de zinco podem ser tóxicas para a célula afetando a permeabilidade da membrana ao potássio causando diminuição no crescimento celular e na atividade fermentativa (Stehlik-Thomas *et al.*, 2004).

Outros metais podem influenciar a fermentação, tais como: ferro, manganês e cobre. Estes são exigidos como cofatores de enzimas (especialmente Mn^{+2}) e nas vias respiratórias de leveduras como componentes de pigmentos redox (Cu^{+2} e Fe^{+2}) (De Freitas *et al.*, 2003). O cobre é um cátion divalente vital para células de leveduras na qualidade de um cofator de algumas enzimas, tais como: citocromo C oxidase, lactase e Cu, Zn-superóxido dismutase (Stehlik-Thomas *et al.*, 2004). O manganês é essencial para a célula de levedura como um elemento traço, desempenhando também funções importantes no metabolismo da *Saccharomyces cerevisiae*, como parte de algumas enzimas, por exemplo, a piruvato carboxilase (Stehlik-Thomas *et al.*, 2004), sendo necessário em concentrações bem menores do que o magnésio, que apresenta uma conhecida concorrência intracelular pelas ligações enzimáticas, ATP e de ácidos nucleicos que requerem magnésio. Essa concorrência ocorre, principalmente, pelas suas propriedades químicas semelhantes (Blackwell *et al.*, 1997). Inversamente, certas enzimas que têm uma exigência por manganês não podem ser atendidas por magnésio (Walker, 1994). A competição entre os dois íons pode ocorrer em resposta à

disponibilidade desses minerais e ter uma grande importância regulatória (Blackwell *et al.*, 1997).

O ferro é essencial para as leveduras, mas em excesso também pode ser tóxico. Por este motivo, a incorporação e utilização do ferro pelas leveduras são bem reguladas (Pas *et al.*, 2007). A levedura *S. cerevisiae* pode facilmente desenvolver-se em meios de cultura nos quais o ferro esteja muito escasso ou muito abundante, e também pode sobreviver a flutuações da disponibilidade de ferro no meio. As células de levedura também conseguem crescer em meio isento de ferro por várias gerações, indicando que elas expressam mecanismos eficientes de armazenamento e mobilização de ferro (Philpott e Protchenko, 2008).

1.5. Considerações

O grupo de pesquisa em Biologia Molecular e Engenharia Metabólica da UFPE vem executando atividades de pesquisa na investigação dos fatores microbiológicos associados com a produção de etanol combustível em destilarias da região Nordeste do Brasil há mais de uma década, gerando resultados sobre a composição e dinâmica da população de leveduras (Silva-Filho *et al.*, 2005a,b; Liberal *et al.*, 2007; Basílio *et al.*, 2008) e de bactérias (Lucena *et al.* 2010). O possível efeito dos contaminantes biológicos sobre o rendimento industrial já está bem relatado. Entretanto, ao longo desses anos foram observados momentos de queda nos rendimentos industriais em várias destilarias sem que houvesse relação direta com a presença dos agentes biológicos. Assim, iniciou-se uma linha de pesquisa para investigação dos parâmetros físico-químicos sobre a produção de etanol. Recentemente, um trabalho de dissertação de mestrado (Menezes JAS. Aspectos físicos e químicos do caldo de cana-de-açúcar que afetam a capacidade fermentativa das células de levedura. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, UFPE. 2012) conclui que o tipo de solo no qual a cana-de-açúcar é cultivada afeta mais a sua composição mineral do que a variedade genética da cana. Como relatado acima, pouco se sabe sobre o efeito da composição mineral do caldo de cana sobre o rendimento fermentativo industrial, mesmo com as informações da literatura mostrando que esses podem agir como ativadores e/ou inibidores da fermentação. Portanto, em continuidade ao primeiro trabalho relatado, o presente trabalho busca aprofundar as investigações sobre o efeito que alguns dos minerais que

são encontrados em excesso no caldo de cana coletada em diferentes fazendas na zona da mata do Nordeste podem exercer sobre a capacidade fermentativa da levedura no intuito de contribuir com o aprimoramento deste setor industrial de grande relevância socioeconômica para o Brasil.

2. Objetivos

3.1. Objetivo Geral

- O presente trabalho teve como objetivo geral avaliar a influência da composição mineral do meio sob o desempenho fermentativo das células de *Saccharomyces cerevisiae* (JP1) ao longo dos ciclos.

3.2. Objetivos específicos

- Determinar os parâmetros fermentativos como consumo dos açúcares, a produção de etanol, glicerol e gás carbônico;
- Analisar o rendimento em etanol e o perfil cinético da fermentação;
- Analisar o efeito do ciclo celular no desempenho fermentativo.

3. Referencias bibliográficas

Alfenore, S.; Cameleyre, X.; Benbadis, L.; Bideaux, C., Uribeleerrea, J. L.; Goma, G.; Molina-Jouve, C.; Guillouet, S. E. Aeration strategy: a need for very high ethanol performance. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **2004**, 63: 537-542.

Amorim, H.V. Nutrição mineral da levedura, aspectos teóricos e práticos. In: Semana de fermentação alcoólica “Jaime Rocha de Almeida”, Anais. Piracicaba: ESALQ, **1985**. p. 144 – 148.

Andrietta, M. G. S.; Andrietta, S. R.; Stupiello, E. N. A. Bioethanol – What has Brazil learned about yeast inhabiting the ethanol production processes from sugar cane? In:

Biofuel production – Recent developments and prospects. Ed. 1. Bernardes, M. A. S. Janeza Trdine, Rijeka, Croatia, **2011**, vol. 1, pp. 68-84.

Bai, F. W.; Anderson, W. A.; Moo-Yong, M. Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks. *Biotechnology Advances*. **2008**, 26: 89-105.

Básilio, A. C. M. Araújo, P. R. L. Morais, J. O. F. Silva-Filho, E. A. Morais, M. A. Jr. Simões, D. A. Detection and identification of wild yeast contaminants of the industrial fuel ethanol fermentation process. *Currently Microbiology*. **2008**, 56: 322-326.

Basso, L. C.; Basso, T. O.; Rocha, S. N. Ethanol production in Brazil: The industrial process and its impact on yeast fermentation. In: *Biofuel production – Recent developments and prospects*. Ed. 1. Bernardes, M. A. S. Janeza Trdine, Rijeka, Croatia, **2011**, vol. 1, pp. 85-100.

Basso, L. C. e Rosa, C. A.. Sugar cane for potable and fuel ethanol. In: *Worldwide Distilled Spirits Conference – New Horizons: energy, environment and enlightenment*. Walker GM and Hughes PS (eds). Nottingham University Press. **2010**, p.1-7.

Berg, J. M.; Tymoczko, J. L.; Stryer, L. *Biochemistry*, WH Free-man and company, New York. **2002**, pp. 270, 465, 687.

Blackwell, K. J. Tobin, J. M. Avery, S. V. Manganese uptake and toxicity in magnesium-supplemented and unsupplemented *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **1997**, 180 – 184.

Burnquist, H. L. Por que o Brasil deve apoiar a internacionalização do etanol? *Revista Opiniões*, Jan-Mar. **2007**, p.22-23.

Caldas, C. Manual de análises selecionadas: para indústrias sucroalcooleiras. Sindicato da Indústria do Açúcar e Álcool no Estado de Alagoas. **1998**, p. 424.

Cyert, M.S. Calcineurin signaling in *Saccharomyces cerevisiae*: how yeast go crazy in response to stress. *Biochemical Biophysical Research Communications*. **2003**, 311, 1143-1150.

Courchesne, W. E.; Vlasek, C.; Klukovich, R.; Coffee, S. Ethanol induces calcium influx via the Cch1-Mid1 transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch Microbiol*. **2010**, p. 1 – 12.

D'amore, T.; Panchal, C. J.; Russell, I.; Stewart, G. G. Osmotic pressure effects and intracellular accumulation of ethanol in yeast during fermentation. *Journal Industrial Microbiology*. **1988**, 2: 365 – 372.

De Barros Pita, W.; Leite, F. C.; De Souza Liberal, A. T.; Simões, D. A.; De Morais, M. A.. The ability to use nitrate confers advantage to *Dekkera bruxellensis* over *S. cerevisiae* and can explain its adaptation to industrial fermentation processes. *Antonie van Leeuwenhoek*. **2011**, 100:99 – 107.

De Freitas, J. Wintz, H. Kim, J. H. Poynton, H. Fox, T. Vulpe, C. Yeast a model organism for iron and copper metabolism studies. *Biometals*. **2003**, 16: 185 – 197.

Dombek, K. M. and Ingram, L. O. Magnesium limitation and its role in apparent toxicity of ethanol during yeast fermentation. *Applied Environmental Microbiology*. **1986**, 52: 975 – 981.

Haug, A. Molecular aspects of aluminum toxicity. *Critical Reviews in Plant Sciences*. **1984**, 1:345 – 373.

Jones, R. P. and Greenfield, P. F. A review of yeast ionic nutrition, I.: Growth and fermentative requirements. *Process Biochemistry*. **1994**, 4:48-59.

Jones, R. P., Gadd, G. M. Ionic nutrition of yeast physiological mechanisms involved and implications for biotechnology *Enzyme Microb. Technol*. **1990**, 12: 1 – 17.

Lagunas, R.; Dominguez, C.; Busturia, A.; Sáez, M. J. Mechanisms of Appearance of the Pasteur Effect in *Saccharomyces cerevisiae*: Inactivation of sugar transport systems. *Journal of Bacteriology*. **1982**, 152: 19-25.

Lehninger, A. L. Nelson, D. L. Cox, M. M. Princípios de Bioquímica. Traduzido por Simões, A. A. Lode, W. R. N. São Paulo: Ed. SAVIER, 2ed^a. Tradução de: Principles of Biochemistry. **1995**.

Liberal, A. T. S. Basílio, A. C. M. Brasileiro, B. T. R. V. Silva-Filho, E. A. Simões, D. A. Morais, M. A. Jr. Identification of the yeast *Dekkera bruxellensis* as major contaminant in continuous fuel ethanol fermentation. *Journal Applied Microbiology*. **2007**, 102: 538-547.

Lima, U. A.; Basso, L. C.; Amorim, H. V. *Produção de etanol*. In: Lima, U. A. *et al.* (coord.). *Biotecnologia Industrial: Processos Fermentativos e Enzimáticos*. São Paulo, Edgar Blücher, **2001**. 3: 1 – 43.

Lucena, B. T. L. Santos, B. M. Moreira, J. L. S. Moreira, A. P. B. Nunes, A. C. Azevedo, V. Miyoshi, A. Thompson, F. L. Morais, M. A. Jr. Diversity of lactic acid bacteria of the bioethanol process. *BMC Microbiol*. **2010**, 10: e298.

Magonet, E., Hayen, P., Delforge, D., Delaive, E. and Remacle, J. Importance of the structural zinc atom for the stability of yeast alcohol dehydrogenase. *Journal of Biochemistry*. **1992**, 287: 361-365.

Menezes, J. A. S.; Morais Júnior, M. A. Aspectos físicos e químicos do caldo de cana que afetam a capacidade fermentativa das células de levedura. Dissertação (Mestrado Ciências Biológicas). Universidade Federal de Pernambuco – PE. **2012**.

Mutton, M. A.; Azania, A. A. P. M.; Tasso Júnior, L. C.; Nogueira, G. A.; Vale, D. W. In: Marques, M. O. *Tópicos em tecnologia sucroalcooleira*. Jaboticabal: Ed. UNESP, **2006**, p. 191.

Otero, J. M., Olsson, L., Nielsen J. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* microbial cell factories for succinic acid production. *Journal of Biotechnology*. **2007** pp. 196– 210.

Pas, M.; Piskur, B.; Sustaric, M. e Raspor, P. Iron enriched yeast biomass a promising mineral feed supplement. *Bioresource Technology*. **2007**, v.98, p.1622-8.

Pereira, A. F. Suplementação de Nitrogênio sobre a fermentação alcoólica para a produção de cachaça, cerveja e vinho. Dissertação (Mestrado Ciência e tecnologia de alimentos). Universidade Federal de Viçosa – MG. **2007**.

Petrou, E. C. and Pappis, C. P., Biofuels: a survey on pros and cons. *Energy Fuels*, **2009**, 23: 1055-1066.

Philpott, C. C. e Protchenko, O. Response to iron deprivation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot. Cell*. **2008**, 7: 7-20.

Pilgrim, C. Status of the worldwide fuel alcohol industry. In: *The alcohol Text Book* (5th edition), Inglebew, WM, Kelsall, DR, Austin, GD and Kluhspies, C (ed.), Nottingham University Press, Nottingham. **2009**, p. 541.

Postma, E.; Verduyn, C.; Scheffers, W. W.; van Dijken, J.P. Enzymic analysis of the crabtree effect in glucose-limited chemostat cultures of *saccharomyces cerevisiae*. *Applied and environmental microbiology*. **1989**, v. 55, n. 2, p. 468.

Pronk, J.T.; Steensma, H.Y.; van Dijken, J.P. Pyruvate metabolism in *saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*. **1996**, v. 12, n. 16, p. 1607-1633.

Roitman, I.; Travassos, L.; Azevedo, J. L. Tradado de Microbiologia, São Paulo, Ed. Manole LTDA, **1988**, v. 1.

Santos, A. M. Estudo da influência da complementação de nutrientes no mosto sobre o processo de fermentação alcoólica em batelada. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Universidade Federal de Alagoas. **2008**.

Schmidell, W. Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica. Edgar Blucher. **2005**, 2:541.

Silva-Filho, E. A.; Santos, S. K. B.; Resende, A.; M., Morais, J O. F.; Morais Jr, M. A.; Simões, D. A. Yeast population dynamics of industrial fuel-ethanol fermentation process assessed by PCR-fingerprinting. *Antonie van Leeuwenhoek*. **2005a**, 88:13-23.

Silva Filho, E. A., de Melo, H. F., Antunes, D. F., dos Santos, S. K., do Monte Resende, A., Simões, D. A. and de Morais, M. A. Jr. Isolation by genetic and physiological characteristics of a fuel-ethanol fermentative *Saccharomyces cerevisiae* strain with potential for genetic manipulation. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. **2005b**, 32, 481-486.

Stehlik-Thomas, V.; Zetic, V. G.; Stanzer, D.; Grba, S.; Vahcic, N. Zn, Cu, and Mn Enrichment in *S. cerevisiae*. *Food Technology Biotechnology*. **2004**, 42 (2): 115 – 120.

ÚNICA, União das Indústrias de cana de açúcar. Disponível em: <http://www.unica.com.br/dadosCotacao/estatistica/>. Acessado em 15/12/2011.

Walker, M. G. Fuel Alcohol: Current Production and Future Challenges. *Journal of The Institute of Brewing*. **2011**, 117:3-22.

Walker, G. M. Metals in Yeast Fermentation Processes. *Advances in Applied microbiology*. **2003** 197 – 229.

Walker, G. M. and Maynard, A. L. Accumulation of magnesium ions during fermentative metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. **1997**, 18: 1 – 3.

Walker, G. M. The roles of magnesium in biotechnology. *Critical Reviews in Biotechnology*. **1994**, 14: 311-354.

Wheals, A. E.; Basso, L. C., Alves, D. M. G.; Amorim, H. V. Fuel ethanol after 25 years. *Trends in Biotechnology*. **1999**. 17:482-487.

Youatt, J. Calcium and microorganisms. *Critical Reviews in Microbiology*, Boca Raton, **1993**, 19: 83 – 97.

Zhao, X. Q. Bai, F. W.. Zinc and yeast stress tolerance: Micronutrient plays a big role. *Journal of Biotechnology*. **2011**, p.8.

4. CAPITULO 1

Análise do desempenho fermentativo da levedura *Saccharomyces cerevisiae* em resposta a composição mineral do meio

Rafael Barros de Souza¹ & Marcos Antonio de Morais Junior^{1,2}

¹ Grupo Interdepartamental de Pesquisa em Engenharia Metabólica e ² Departamento de Genética, Universidade Federal de Pernambuco. Av. Moraes Rego, 1235, 50670-901, Recife, PE, Brasil.

Artigo científico a ser submetido à revista *Journal of Agricultural and Food chemistry*, editora ACS Publications Washington, EUA, fator de impacto: 2.823.

Resumo

Apesar dos grandes avanços para melhorar as características das variedades de cana-de-açúcar, pouco se sabe sobre o impacto da qualidade do caldo da cana-de-açúcar no processo de fermentação industrial, mais especificamente sobre o metabolismo fermentativo da levedura. O presente trabalho analisa a relação entre a variação da composição mineral do caldo de cana e a capacidade fermentativa das células de *Saccharomyces cerevisiae*, determinando a cinética de consumo de sacarose e produção de etanol e glicerol, bem como o efeito cumulativo desses minerais ao longo de ciclos fermentativos. Foram utilizados meios de fermentação suplementados com os principais macro e micronutrientes encontrados no caldo de cana-de-açúcar. Entre os minerais avaliados todos os meios suplementados apresentaram um resultado superior ao meio padrão (meio controle), exceto o meio contendo cobre. Os meios com maior influência no rendimento em etanol foram os meios com ureia, magnésio e manganês que apresentaram um aumento de 18,4% em relação ao meio padrão. O meio com cobre apresentou o menor valor de rendimento em etanol em comparação a todos os meios analisados, contudo, sem diferenciar na viabilidade celular. Esses resultados sugerem que de fato os minerais desempenham importantes papéis no metabolismo fermentativo das células de *S. cerevisiae* e que determinados elementos químicos como nitrogênio na forma de ureia, magnésio e manganês são mais significativos para o aumento do rendimento em etanol do que os outros minerais.

Palavras chaves: Cana-de-açúcar, Composição mineral, rendimento em etanol, Linhagem Industrial

Introdução

O setor sucroalcooleiro constantemente se depara com desafios para manter-se competitivo no mercado e isso lhe obriga a sempre estar desenvolvendo novas tecnologias e conhecendo cada vez mais as peculiaridades de todas as etapas do processo. Entre estas etapas se destaca a fermentação alcoólica que apesar de toda a gama de conhecimento sobre o tema, ainda são necessários mais esclarecimentos quando relacionado à fermentação industrial. Em resposta a esses desafios, novas variedades de cana-de-açúcar são desenvolvidas, no Brasil, atualmente, ale das cerca de 80 variedades adaptadas aos diversos tipos de estresse ambiental (Menezes, 2012). Apesar dos grandes avanços para melhorar as características dessas variedades pouco se sabe sobre o impacto da qualidade do caldo da cana-de-açúcar no processo de fermentação industrial, mais especificamente, no metabolismo fermentativo da levedura.

Nos últimos anos, nosso grupo de pesquisa tem se dedicado a análise do processo industrial em diferentes destilarias do Nordeste do Brasil, identificando potenciais microrganismos contaminantes entre leveduras (De Souza Liberal *et al.*, 2005; Basílio *et al.*, 2008) e bactérias (Lucena *et al.*, 2010) que podem afetar negativamente o processo. Além disso, a instalação no processo de populações de linhagens de *S. cerevisiae* com menor capacidade fermentativa pode também levar a essas quedas na produção de etanol (Silva-Filho *et al.*, 2005a; Basso *et al.*, 2008). Embora algumas evidências mostraram que a presença desses microrganismos impõe queda no rendimento fermentativo, essa relação ainda não está bem definida (Pereira *et al.*, 2011; De Souza *et al.*, 2012). Também ficou evidente ao longo desses anos que redução nos rendimentos industriais não estavam relacionados a episódios de contaminação microbiana (dados não publicados). A partir disso, decidimos voltar as atenções para fatores não-bióticos como possíveis causas desses problemas industriais. Fatores físicos como a variação de temperatura e do pH do meio estão entre os principais agentes promotores de queda da viabilidade celular no processo, levando a diminuição do rendimento fermentativo de inibição (Carmelo *et al.*, 1998; Silva-Filho *et al.*, 2005b; Melo *et al.*, 2010). Além disso, fatores químicos como a presença de certos minerais, ácidos orgânicos e compostos fenólicos também afetam a viabilidade celular e/ou inibem a atividade de enzimas-chave do metabolismo central das leveduras, promovendo quedas no rendimento fermentativo.

Minerais como magnésio, manganês, zinco, cobre, ferro entre outros são importantes por atuarem como cofatores de muitas enzimas. Íons metálicos são vitais para todos os organismos, e desta forma, transportadores destes íons têm um papel crucial na manutenção da homeostase (Stehlik-Thomas *et al.*, 2004). Todavia, quantidades excessivas desses íons podem ser tóxicas e causar danos às funções que se prestam. Por exemplo, em níveis elevados alguns sais como potássio, cálcio e magnésio presentes no melaço de caldo de cana-de-açúcar podem causar estresse osmótico das células de levedura comprometendo o desempenho da fermentação (Basso *et al.*, 2011).

O presente trabalho tem como objetivo geral avaliar a influência da composição mineral do mosto de alimentação sobre o estado metabólico das células de levedura durante a fermentação alcoólica, analisar a cinética do consumo dos açúcares, a produção de etanol, gás carbônico e glicerol, bem como o rendimento e eficiência do processo e o efeito dos ciclos fermentativos no desempenho das células de levedura.

MATERIAIS E MÉTODOS

Microrganismo e condições de crescimento

A linhagem industrial *S. cerevisiae* JP1 foi isolada e identificada do processo fermentativo em destilaria de álcool na região Nordeste (Silva-Filho *et al.*, 2005a) e vem sendo utilizada em vários estudos genéticos (Silva-Filho *et al.*, 2005b) e fisiológicos (Pereira *et al.*, 2011; De Souza *et al.*, 2012). As células foram mantidas em meio YPD (extrato de levedura a 10 gL⁻¹, glicose a 20 gL⁻¹, peptona bacteriológica a 20 gL⁻¹ e agar bacteriológico a 20 gL⁻¹). As células foram cultivadas em meio YPD líquido sob agitação de 140 rpm em shaker orbital a 33°C em até alcançar a concentração celular desejada. As células foram coletadas, lavadas com água estéril e armazenadas em água até o momento do uso.

Análise mineral do caldo de cana

Amostras de caldo de cana provenientes de diferentes fazendas localizadas no estado da Paraíba as quais fornecem cana para a destilaria Miriri foram analisadas quanto à composição mineral na Central Analítica Ltda, Maceió, Alagoas. As amostras foram submetidas à digestão nítrica-perclórica para posterior aferição da concentração

dos elementos nitrogênio total, fósforo utilizando fotômetro de chama e sódio, cálcio, magnésio, potássio, ferro, zinco, cobre e manganês através do método de espectrometria de absorção atômica com chama.

Meio para a fermentação

Foram elaborados 12 meios para a fermentação baseados no meio sintético YNB (Yeast Nitrogen Base, Difco) numa concentração de $1,6 \text{ gL}^{-1}$ sem sulfato de amônia e sem aminoácidos e sacarose na concentração de 160 gL^{-1} . A solução estoque de sacarose foi autoclavada durante 15 minutos a 120°C ; já as soluções estoque de YNB e dos minerais foram filtrados em membrana Millipore de $0,22 \mu\text{m}$. Foram utilizados duas faixas de concentração dos minerais de acordo com o que foi encontrado nos resultados de composição mineral dos caldos de cana, correspondentes a menor e maior concentração e a composição de cada meio está apresentada na Tabela 1. O pH inicial do meio ficou em 4,5.

Tabela 1. Composição dos meios sintéticos de fermentação contendo diferentes concentrações dos minerais testados.

Minerais (mgL^{-1})	Meios de fermentação*											
	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10	M11	M12
Ureia	80,0	900,0	80,0	80,0	80,0	80,0	80,0	80,0	80,0	80,0	80,0	80,0
NH ₄	40,0	40,0	360,0	40,0	40,0	40,0	40,0	40,0	40,0	40,0	40,0	40,0
P	17,9	17,9	17,9	269,7	17,9	17,9	17,9	17,9	17,9	17,9	17,9	17,9
K	150,0	150,0	150,0	150,0	750,0	150,0	150,0	150,0	150,0	150,0	150,0	150,0
Ca	24,4	24,4	24,4	24,4	24,4	262,0	24,4	24,4	24,4	24,4	24,4	24,4
Mg	26,0	26,0	26,0	26,0	26,0	26,0	400,0	26,0	26,0	26,0	26,0	26,0
Al	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7	3,7	0,7	0,7	0,7	0,7
Cu	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	1,0	0,2	0,2	0,2
Zn	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	5,9	1,2	1,2
Mn	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	29,9	1,2
Fe	4,4	4,4	4,4	4,4	4,4	4,4	4,4	4,4	4,4	4,4	4,4	68,0

*M1: meio denominado Padrão por conter as mais baixas concentrações dos minerais; M2: enriquecido com Ureia; M3: enriquecido com NH₄Cl; M4: enriquecido com KH₂PO₄ como fonte de fósforo; M5: enriquecido com KCl; M6: enriquecido com CaCl₂*2H₂O; M7: enriquecido com MgSO₄*2H₂O; M8: enriquecido com AlCl₃; M9: enriquecido com CuSO₄*5H₂O; M10: enriquecido com ZnSO₄*7H₂O; M11: enriquecido com MnSO₄*H₂O; M12: enriquecido com FeSO₄*H₂O.

Condições da fermentação

As fermentações foram conduzidas no sistema de batelada simples com três bateladas subsequentes (reciclos), reutilizando a massa celular (Pereira *et al.*, 2011). Os ensaios foram conduzidos em frascos de Erlenmeyer de 150 mL. A biomassa úmida cultivada em meio YPD foi adicionada na quantidade equivalente a 10 g e o meio de fermentação foi adicionado para o volume final de 100 mL, resultando na massa celular inicial de 10% (m/v) (aproximadamente 10^8 cel/mL). Os frascos foram incubados por 6 horas a 33°C sem agitação. Amostras de 1 mL foram coletadas a cada hora e ao final do ensaio as células foram coletadas por centrifugação, lavadas com solução salina e estocadas em geladeira a 4°C. No dia seguinte, as células foram ressuspensas no meio de fermentação na concentração de 10% (m/v) para a nova batelada.

Determinação da viabilidade celular e pH

No início e no final de cada fermentação foi determinado o pH do meio utilizando potenciômetro de bancada e a viabilidade e concentração celular por inspeção em microscópio óptico utilizando câmara de Neubauer de células coradas com azul de metileno (Pereira *et al.*, 2011).

Determinação dos metabólitos da fermentação

Antes de cada amostragem, os frascos foram pesados, em balança analítica para cálculo da produção de CO₂ por perda de massa (Basílio *et al.*, 2008). As amostras coletadas foram centrifugadas e o sobrenadante foi utilizado para determinação da concentração de açúcares (sacarose, frutose e glicose), glicerol, etanol e acetato. Essa análise foi realizada por cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) em equipamento Agilent Technologies 1200 Series com a coluna modelo HPX87H (BioRad) em fase móvel de ácido sulfúrico a 5 mmolL^{-1} , por índice de refração (RI) a 45°C. A identificação dos metabólitos foi feita por comparação dos tempos de retenção com soluções-padrão e a concentração de cada metabólito foi determinada por integração de picos do cromatograma e relação da área de cada pico com o fator de calibração de cada solução-padrão, através da metodologia adaptada de Zhao *et al* (2009).

Parâmetros fermentativos

A partir dos resultados obtidos das determinações analíticas no mosto fermentado, foram realizados os cálculos dos seguintes parâmetros de fermentação: açúcar consumido, etanol produzido, rendimento da fermentação e eficiência do processo. Para esses cálculos foram utilizados as seguintes equações:

- **Açúcar consumido (S)**

$$S = -(Sf - S0)$$

Onde: S = açúcar consumido (gL^{-1})

Sf = concentração final de açúcares (gL^{-1})

$S0$ = concentração inicial de açúcares (gL^{-1})

- **Etanol produzido (P)**

$$P = Pf - Pi$$

Onde: P = Etanol produzido

Pf = concentração final de etanol (gL^{-1})

Pi = concentração inicial (gL^{-1}) = 0

- **Rendimento:** Conversão do substrato em etanol

$$Y = \frac{P}{S}$$

P = Etanol produzido

S = açúcar consumido (gL^{-1})

Onde: $Y_{P/S}$ = Fator de conversão do substrato em etanol (g/g)

- **Produtividade Volumétrica (Qp):**

$$Qp (\text{g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}) = \frac{P}{T} \quad (1)$$

Onde: P = Concentração do substrato analisado (gL^{-1}).

T = Tempo de fermentação (h).

Análise estatística

O desenho experimental utilizado foi inteiramente casualizado e todas as determinações analíticas foram realizadas em duplicata. Os resultados obtidos para produção de etanol, glicerol, gás carbônico, rendimento e eficiência foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey a um nível de significância de $p \leq 0,05$ usando o Software ASSISTAT (Silva e Azevedo, 2002).

RESULTADOS

Análise mineral do caldo de cana

A Tabela 2 mostra a composição mineral das amostras que foi utilizada para auxiliar na formulação dos diferentes meios sintéticos de fermentação do presente trabalho. Todos os elementos analisados apresentam uma variação na sua concentração nos caldos das diferentes fazendas. Essa variação em alguns elementos pode ser mais do que o dobro, como por exemplo, o potássio, magnésio, alumínio, ferro.

Tabela 2. Composição mineral de caldos de cana-de-açúcar oriundos da destilaria Miriri-PB de diferentes fazendas.

Composição (mgL ⁻¹)	Fazendas da destilaria*				
	St ^a Helena	Faz. Miriri	Califórnia	Sítio Marau	Os Poços
Nitrogênio Total	844	826	836	333	356
Nitrogênio (NH ₄)	336	347	338	150	160,5
Fósforo	332	365	412	95	309
Potássio	740	788	712	445	1,050
Cálcio	123	151	217	259	49,7
Magnésio	1,228	310	1,585	311	76
Alumínio	4	5	2	4	2
Cobre	1,1	0,7	0,6	1,4	0,8
Zinco	7,5	8,6	3,7	6,4	5
Manganês	24	19	10	19,6	2,86
Ferro	110	60	38	17,7	16,6

Análises dos parâmetros fermentativos

A partir dos ensaios de fermentação foram determinados os principais parâmetros fermentativos relacionados com o consumo do açúcar e a produção dos principais produtos de fermentação. O meio considerado padrão foi utilizado como referência para a determinação do efeito da presença desses minerais. O pH de todas as fermentações ficou entre 4,5 no início da fermentação e 2,5 no final. Dos metabólitos analisados, não foi detectada a presença de acetato no meio em nenhum dos ensaios, indicando a ausência de oxigênio no meio e confirmando o metabolismo puramente fermentativo das células de *Saccharomyces cerevisiae* nos ensaios realizados.

Na primeira batelada não houve diferença significativa na produção de etanol nem no rendimento fermentativo em função do excesso dos minerais testados. No entanto, diferenças significativas foram detectadas para o consumo da sacarose e na produção de CO₂ e de glicerol (Tabela 3). Menos sacarose foi consumida nos meios enriquecidos com cálcio (-19,8%), ureia (-19,2%), cobre (-17,1%) e ferro (-14,5%). Em relação à produção de CO₂, os meios com excesso de cobre (-26%), cálcio (-16%) e potássio (-16%) apresentaram quedas significativas em relação ao meio de referência. Já na produção de glicerol houve redução significativa nos meios com excesso de cálcio (-52%), ureia (-37,5%), ferro (-20,8%) e cobre (-20,1%). Quando as células foram submetidas à segunda batelada não foram observadas as quedas no consumo de sacarose e produção de CO₂ que foram verificadas na primeira batelada (Tabela 4). Nos meios contendo excesso de cobre e potássio foram detectadas quedas na produção de etanol (-16,6% e 13%, respectivamente) com consequente queda no rendimento fermentativo (-10% e 2,6%, respectivamente) e também na produção de glicerol (-42% e 34%, respectivamente). Houve ainda queda no rendimento fermentativo nos meios com excesso de amônio (-7,9%) e alumínio (-2,6%) e na produção de glicerol nos meios com excesso de ferro (-22%) e cálcio (-20%). Na terceira batelada foi observado aumento significativo na produção de etanol pelas células de levedura, exceto para o cobre, onde houve pequena redução. Como não houve diferenças no consumo de sacarose e nem na produção de CO₂, este aumento na produção de etanol resultou em aumento significativo no rendimento fermentativo para os meios com ureia, manganês e magnésio (+18,4%, +15,8% e +18,4%, respectivamente). Houve ainda aumento no rendimento fermentativo no meio com excesso de alumínio (+13,1) e diminuição na produção de glicerol nos meios com excesso de cálcio (-34,6%), cobre (-34,6%), ferro (-

30,7%) e potássio (-28,8%) (Tabela 5). Na Tabela 6 verificou-se que a viabilidade celular ao final de cada fermentação variou em torno de 95% a 82% em relação ao número de células viáveis no início de cada batelada. Essa variação de viabilidade celular dentro de um contexto fermentativo com reciclo de células é normal diante dos vários estresses que as leveduras enfrentam.

Tabela 3: Parâmetros fermentativos da primeira batelada para os diferentes meios testados utilizando a linhagem industrial JP1 a 33°C durante 6 horas de ensaios em condições estáticas.

1ª Batelada					
Meio*	Sacarose consumido (gL⁻¹)	Glicerol (gL⁻¹)	CO₂ (gL⁻¹)	Etanol (gL⁻¹)	Y_{ETOH} (g/g)
M1 (Padrão)	145 ± 3,4 abc	4,8 ± 0,07 ab	50 ± 0,9 abc	48,5 ± 3,8 a	0,34 ± 0,01 a
M2 (Ureia)	117 ± 3,8 bc	3,0 ± 0,1 cd	45 ± 0,7 abc	45 ± 1,7 a	0,38 ± 0,01 a
M3 (NH₄)	150 ± 3,8 a	3,0 ± 0,7 cd	61 ± 4,9 a	50,3 ± 4,8 a	0,34 ± 0,02 a
M4 (P)	135 ± 2,3 abc	4,6 ± 0,07 abc	47 ± 0,7 abc	46,1 ± 0,6 a	0,34 ± 0,0 a
M5 (K)	126 ± 2,0 abc	2,4 ± 0,1 d	42 ± 1,6 bc	41,6 ± 2,4 a	0,33 ± 0,01 a
M6 (Ca)	116 ± 3,1c	2,3 ± 0,3 d	42 ± 5,1 bc	41,6 ± 3,4 a	0,36 ± 0,0 a
M7 (Mg)	133 ± 3,7 abc	4,8 ± 0,07 ab	57 ± 5,1 ab	51 ± 3,2 a	0,38 ± 0,01 a
M8 (Al)	130 ± 2,8 abc	2,4 ± 0,6 d	51 ± 6,1 abc	45 ± 5,8 a	0,35 ± 0,02 a
M9 (Cu)	120 ± 3,9 bc	1,9 ± 0,2 d	37 ± 1,0 c	39 ± 2,1 a	0,32 ± 0,02 a
M10 (Zn)	143 ± 3,2 abc	5,0 ± 0,3 a	49 ± 1,5 abc	49 ± 4,6 a	0,34 ± 0,01 a
M11 (Mn)	147 ± 3,4 ab	3,2 ± 0,2 bcd	61 ± 2,5 a	54,2 ± 2,5 a	0,37 ± 0,0 a
M12 (Fe)	124 ± 3,3 bc	2,8 ± 1,0 d	46 ± 5,7 abc	43,5 ± 5,2 a	0,35 ± 0,01 a

*valores para n=4. Y_{ETOH}: rendimento de etanol por grama de açúcar consumido: Média com mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Tabela 4: Parâmetros fermentativos da segunda batelada para os diferentes meios testados utilizando a linhagem industrial JP1 a 33°C durante 6 horas de ensaios em condições estáticas.

2° batelada					
Meio*	Açúcar consumido (g/L ⁻¹)	Glicerol (g/L ⁻¹)	CO ₂ (g/L ⁻¹)	Etanol (g/L ⁻¹)	Y _{ETOH} (g/g)
M1 (Padrão)	140 ± 3,8 a	5,0 ± 0,7 ab	51 ± 4,3 a	54 ± 4,9 ab	0,38 ± 0,01 abcd
M2 (Ureia)	141 ± 3,7 a	4,7 ± 0,1 ab	53 ± 7,1 a	61 ± 2,3 a	0,43 ± 0,0 a
M3 (NH₄)	146 ± 3,8 a	4,2 ± 0,1 abc	55 ± 3,7 a	51 ± 1,1 ab	0,35 ± 0,01 cd
M4 (P)	130 ± 3,6 a	5,0 ± 0,1 ab	50 ± 4,4 a	52 ± 3,6 ab	0,4 ± 0,0 abc
M5 (K)	126 ± 3,3 a	3,3 ± 0,5 cd	42 ± 6,5 a	47 ± 5,5 b	0,37 ± 0,01 bcd
M6 (Ca)	134 ± 0,2 a	4,0 ± 0,1 bcd	51 ± 3,0 a	55 ± 2,1 ab	0,41 ± 0,01 ab
M7 (Mg)	130 ± 1,9 a	5,2 ± 0,1 a	57 ± 0,5 a	56 ± 3,1 ab	0,43 ± 0,03 a
M8 (Al)	136 ± 3,2 a	4,2 ± 0,3 abc	54 ± 4,8 a	50 ± 4,7 ab	0,37 ± 0,02 bcd
M9 (Cu)	131 ± 2,5 a	2,9 ± 0,2 d	41 ± 0,8 a	45 ± 2,9 b	0,34 ± 0,01 d
M10 (Zn)	135 ± 2,5 a	4,9 ± 0,0 ab	49 ± 0,9 a	51 ± 0,7 ab	0,38 ± 0,0 abcd
M11 (Mn)	141 ± 3,2 a	4,6 ± 0,2 ab	61 ± 0,1 a	57 ± 2,0 ab	0,4 ± 0,0 abc
M12 (Fe)	136 ± 3,8 a	3,9 ± 0,1 bcd	51 ± 6,1 a	53 ± 4,0 ab	0,39 ± 0,01 abcd

*valores para n=2. Y_{ETOH}: rendimento de etanol por grama de açúcar consumido: Média com mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Tabela 5: Parâmetros fermentativos da terceira batelada para os diferentes meios testados utilizando a linhagem industrial JP1 a 33°C durante 6 horas de ensaios em condições estáticas.

3° Batelada					
Meio*	Açúcar consumido (g/l)	Glicerol (g/l)	CO ₂ (g/l)	Etanol (g/l)	Y _{ETOH} (g/g)
M1 (Padrão)	141 ± 0,2 ab	5,2 ± 0,2 ab	52 ± 0,4 a	54 ± 2,5 cde	0,38 ± 0,0 de
M2 (Ureia)	144 ± 0,6 ab	5,4 ± 0,2 a	67 ± 0,8 a	65 ± 2,3 a	0,45 ± 0,0 a
M3 (NH₄)	149 ± 0,4 a	5,0 ± 0,2 ab	73 ± 4,3 a	60 ± 0,4 abc	0,4 ± 0,0 cde
M4 (P)	136 ± 3,5 ab	4,9 ± 0,1 ab	53 ± 5,6 a	53 ± 0,3 cde	0,39 ± 0,0 cde
M5 (K)	142 ± 0,7 ab	3,7 ± 0,1 cd	52 ± 0,0 a	56 ± 0,2 bcde	0,4 ± 0,0 cde
M6 (Ca)	127 ± 3,5 b	3,4 ± 0,5 d	54 ± 5,2 a	52 ± 4,0 de	0,41 ± 0,0 bcd
M7 (Mg)	133 ± 3,0 ab	5,4 ± 0,2 a	57 ± 4,7 a	60 ± 0,2 abc	0,45 ± 0,0 a
M8 (Al)	138 ± 3,7 ab	4,4 ± 0,2 bc	57 ± 0,7 a	59 ± 1,7 abcd	0,43 ± 0,0 abc
M9 (Cu)	139 ± 3,2 ab	3,4 ± 0,3 d	57 ± 3,2 a	52 ± 0,0 e	0,37 ± 0,0 e
M10 (Zn)	137 ± 1,8 ab	5,1 ± 0,1 ab	49 ± 0,2 a	54 ± 0,1 cde	0,39 ± 0,0 cde
M11 (Mn)	143 ± 1,2 ab	4,7 ± 0,1 ab	64 ± 0,9 a	62 ± 0,1 ab	0,44 ± 0,0 ab
M12 (Fe)	128 ± 3,1 b	3,6 ± 0,0 cd	57 ± 4,1 a	52 ± 2,3 de	0,41 ± 0,0 bcd

*valores para n=2. Y_{p/s}: rendimento de etanol por grama de açúcar consumido: Média com mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Tabela 6: Viabilidade celular no final de cada batelada. No início da primeira batelada todas as viabilidades estavam em 100%. A viabilidade inicial da primeira batelada é a final da primeira e a inicial da terceira é a final da segunda.

Meios	Viabilidade Celular (%)		
	1ª batelada	2ª batelada	3ª batelada
M1 (Padrão)	95	97	87
M2 (Ureia)	97	93	95
M3 (NH₄)	97	92	83
M4 (P)	96	94	82
M5 (K)	97	92	89
M6 (Ca)	95	96	92
M7 (Mg)	96	100	94
M8 (Al)	95	90	88
M9 (Cu)	97	89	95
M10 (Zn)	96	90	85
M11 (Mn)	96	85	88
M12 (Fe)	96	94	88

Análise do perfil cinético da fermentação

Foram realizadas 36 fermentações no total, de forma que na Figura 1 somente estão apresentados os perfis cinéticos mais representativos quanto ao consumo da sacarose, glicose e frutose em comparação ao meio padrão. Os restantes dos gráficos estão disponíveis no material suplementar.

Na primeira hora de fermentação a sacarose foi totalmente convertida em glicose e frutose pela invertase extracelular da JP1, aumentando assim a concentração desses monossacarídeos na primeira hora de fermentação (Figura 1A). Durante a primeira batelada, o perfil do consumo dos açúcares de todos os ensaios foi muito semelhante. Contudo, no meio com excesso de ureia ainda foi encontrado 3,5 gL⁻¹ de sacarose na primeira hora (Figura 1B). Nessa primeira batelada os demais parâmetros não tiveram diferenças significativas com o meio padrão. Na segunda batelada alguns meios apresentaram um resíduo de sacarose ainda na primeira hora, como por exemplo, os meios com excesso de alumínio (2,3 gL⁻¹), magnésio (4,7 gL⁻¹), amônio (3,8 gL⁻¹),

manganês ($1,7 \text{ gL}^{-1}$) (Figura 1D), zinco ($3,5 \text{ gL}^{-1}$) e o meio Padrão ($5,7 \text{ gL}^{-1}$) (Figura 1C). Os únicos que conseguiram consumir toda a glicose nas seis horas de fermentação foram os meios com excesso de cálcio, ferro e ureia. Na terceira batelada os mesmos meios citados anteriormente, novamente apresentam um resíduo de sacarose na primeira hora de fermentação, inclusive o meio padrão (Figura E), contudo, nos meios com magnésio e amônio (Figura 1F) ainda foi encontrado sacarose na terceira ($2,8 \text{ gL}^{-1}$) e na quinta hora ($1,7 \text{ gL}^{-1}$), respectivamente.

Em todas as fermentações a sacarose foi totalmente consumida e somente os meios com ureia, manganês, ferro e cálcio conseguiram consumir toda a glicose, todavia, a frutose foi encontrada como residual em todas as fermentações.

A produtividade volumétrica dos principais produtos da fermentação foi analisada em comparação ao meio padrão para determinar o efeito do excesso dos minerais. Durante a primeira batelada foi evidenciado diferenças significativas entre os meios para a produtividade volumétrica de etanol, CO_2 e glicerol. O meio com excesso de manganês apresentou o maior aumento tanto na produtividade em etanol (+10,5%) como em CO_2 (+21%). Os meios com amônio e magnésio também obtiveram aumentos em etanol (3,7% e 5%, respectivamente) e em CO_2 (21% e 19%, respectivamente). Contudo, no meio com cobre houve diminuição tanto em etanol (-24%) como em CO_2 (-27%).

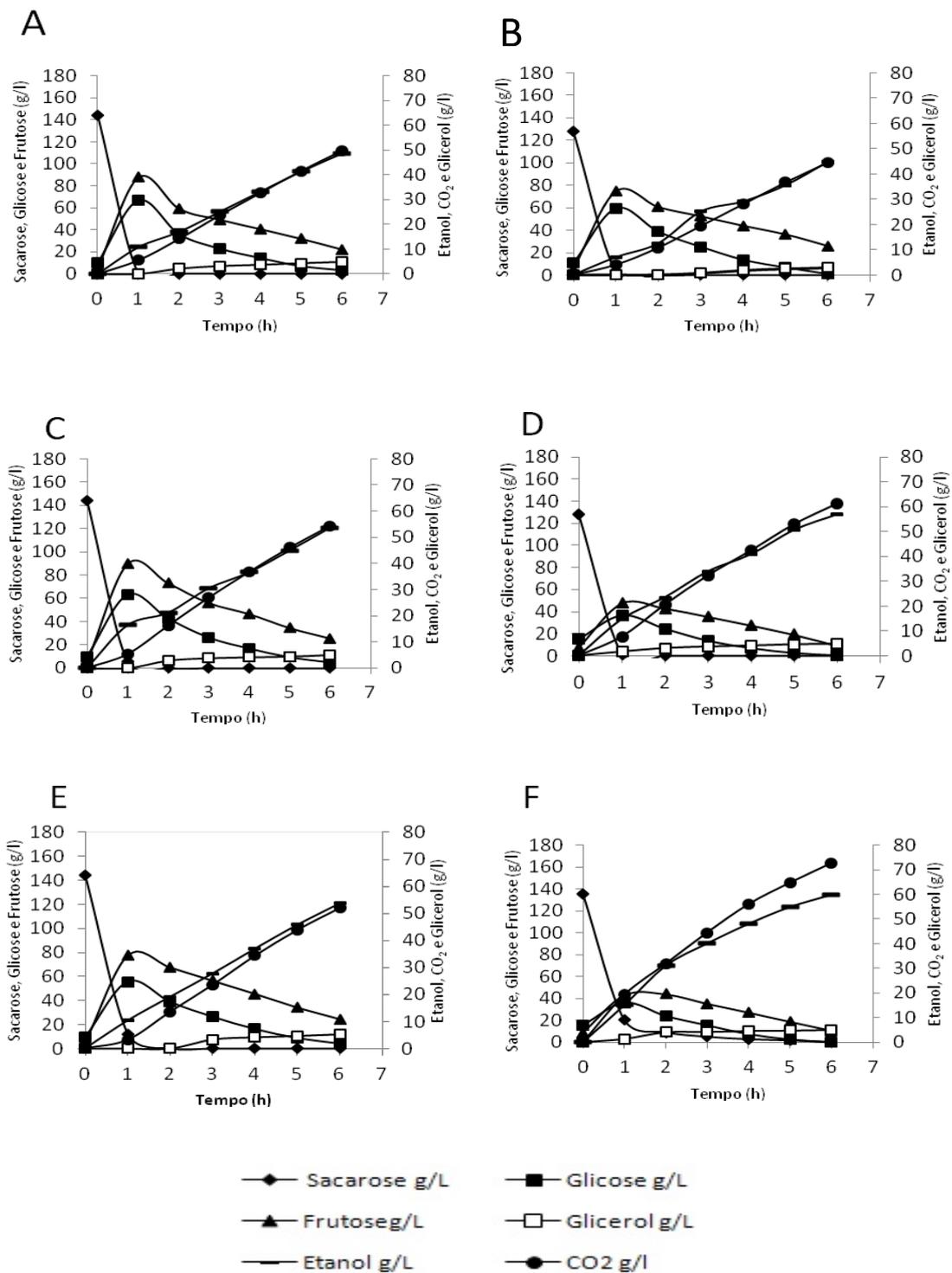


Figura 1: Perfil fermentativo da linhagem industrial JP1 nos meios sintéticos suplementados com diferentes concentrações de minerais. Os dados de consumo dos açúcares, produção de etanol, glicerol e CO₂ são apresentados. Gráfico **A**: meio padrão 1^o batelada; **B**: meio com ureia 1^o batelada; **C**: meio padrão 2^o batelada; **D**: meio com manganês 2^o batelada; **E**: meio padrão 3^o batelada; **F**: meio com amônio 3^o batelada. Os gráficos das demais fermentações estão no anexo.

Os meios com potássio e cálcio tiveram uma diminuição na produtividade em etanol (ambos -16,5%). Já na produtividade volumétrica de glicerol foram evidenciadas as diferenças mais significativas. Somente no meio com zinco teve aumento de 3,6%. Os restantes dos meios apresentaram uma significativa diminuição, principalmente, nos meios com excesso de cobre (-60%) e cálcio (-52,5%) (Tabela 7). Na segunda batelada não houve diferença significativa na produtividade volumétrica de CO₂. Por outro lado, a produtividade em etanol apresentou diferenças no meio com ureia (+11%) e no meio com cobre (-20%). A produtividade em glicerol apresentou uma significativa diminuição no meio com cobre (-70%) e um aumento no meio com magnésio (+4,5%) (Tabela 8). Na terceira batelada o meio com excesso de ureia teve um aumento significativo na produtividade em glicerol (+3,2%), etanol (+21%) e CO₂ (+29%). O meio com amônio teve um aumento em CO₂ (+28%) e etanol (+11%). Os meios suplementados com magnésio e manganês tiveram um aumento na produtividade em etanol de 11% e 15%, respectivamente. Por outro lado, no meio com excesso de cobre ocorreu uma diminuição na produtividade tanto de etanol (-4%) como de glicerol (-35%), assim como no meio com cálcio houve uma diminuição significativa na produtividade de glicerol (-34%) (Tabela 9).

Tabela 7: Resultados de produtividade volumétrica de glicerol, CO₂ e Etanol na primeira batelada.

Meio	1º Batelada		
	Qp (Glicerol)	Qp (CO ₂)	Qp (Etanol)
M1 (Padrão)	0,80 ± 0,01 ab	8,3 ± 0,2 ab	8,08 ± 0,6 ab
M2 (Ureia)	0,50 ± 0,02 cd	7,4 ± 0,1 ab	7,48 ± 0,3 ab
M3 (NH₄)	0,50 ± 0,12 cd	10,1 ± 0,8 a	8,38 ± 1,1 a
M4 (P)	0,77 ± 0,01 abc	7,5 ± 0,6 ab	7,68 ± 0,1 ab
M5 (K)	0,40 ± 0,02 d	7,0 ± 0,3 ab	6,93 ± 0,4 b
M6 (Ca)	0,38 ± 0,04 d	6,9 ± 0,8 ab	6,93 ± 0,6 b
M7 (Mg)	0,80 ± 0,01 ab	9,5 ± 0,8 a	8,49 ± 0,5 a
M8 (Al)	0,40 ± 0,1 d	8,5 ± 2,1 ab	7,46 ± 1,2 ab
M9 (Cu)	0,32 ± 0,04 d	6,1 ± 0,1 b	6,48 ± 0,3 b
M10 (Zn)	0,83 ± 0,04 a	8,1 ± 0,3 ab	8,17 ± 0,8 ab
M11 (Mn)	0,53 ± 0,04 bcd	10,1 ± 0,4 a	9,03 ± 0,4 a
M12 (Fe)	0,47 ± 0,16 d	7,6 ± 1,0 ab	7,24 ± 1,3 ab

*valores para n=2. Q_p: Produtividade volumétrica em g.L⁻¹.h⁻¹. Médias com mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Tabela 8: Resultados de produtividade volumétrica de glicerol, CO₂ e Etanol na segunda batelada.

Meio	2° Batelada		
	Qp (Glicerol)	Qp (CO ₂)	Qp (Etanol)
M1 (Padrão)	0,83 ± 0,1 ab	8,5 ± 0,7 a	9,0 ± 0,8 ab
M2 (Ureia)	0,79 ± 0,01 ab	8,3 ± 1,1 a	10,1 ± 0,3 a
M3 (NH₄)	0,71 ± 0,01 abc	9,2 ± 0,6 a	8,6 ± 0,2 ab
M4 (P)	0,83 ± 0,03 ab	8,4 ± 0,8 a	8,7 ± 0,6 ab
M5 (K)	0,56 ± 0,1 cd	6,9 ± 1,3 a	7,8 ± 0,9 b
M6 (Ca)	0,67 ± 0,02 bcd	8,5 ± 0,5 a	9,2 ± 0,3 ab
M7 (Mg)	0,87 ± 0,02 a	9,4 ± 0,1 a	9,4 ± 0,5 ab
M8 (Al)	0,71 ± 0,1 abc	9,0 ± 0,8 a	8,3 ± 0,8 ab
M9 (Cu)	0,49 ± 0,04 d	6,8 ± 0,1 a	7,5 ± 0,5 b
M10 (Zn)	0,82 ± 0,0 ab	8,1 ± 0,1 a	8,5 ± 0,1 ab
M11 (Mn)	0,78 ± 0,04 ab	10,2 ± 0,0 a	9,5 ± 0,3 ab
M12 (Fe)	0,65 ± 0,02 bcd	8,4 ± 1,0 a	8,8 ± 0,6 ab

*valores para n=2. Q_p: Produtividade volumétrica em g.L⁻¹.h⁻¹. Médias com mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Tabela 9: Resultados de produtividade volumétrica de glicerol, CO₂ e Etanol na terceira batelada.

Meio	3° Batelada		
	Qp (Glicerol)	Qp (CO ₂)	Qp (Etanol)
M1 (Padrão)	0,88 ± 0,04 ab	8,7 ± 0,1 ab	9,0 ± 0,9 bc
M2 (Ureia)	0,91 ± 0,04 a	11,2 ± 0,1 a	10,9 ± 0,4 a
M3 (NH₄)	0,84 ± 0,04 ab	11,1 ± 1,6 a	10 ± 0,07 abc
M4 (P)	0,83 ± 0,01 ab	8,8 ± 0,9 ab	8,8 ± 0,04 c
M5 (K)	0,63 ± 0,01 cd	8,6 ± 0,0 ab	9,3 ± 0,04 bc
M6 (Ca)	0,58 ± 0,1 d	9,0 ± 1,4 ab	8,7 ± 0,6 c
M7 (Mg)	0,91 ± 0,04 a	9,6 ± 0,8 ab	10 ± 0,04 abc
M8 (Al)	0,74 ± 0,04 bc	9,5 ± 0,1 ab	9,8 ± 0,3 abc
M9 (Cu)	0,57 ± 0,05 d	9,5 ± 0,6 ab	8,6 ± 0,0 c
M10 (Zn)	0,86 ± 0,01 ab	8,2 ± 0,1 b	8,9 ± 0,01 bc
M11 (Mn)	0,78 ± 0,1 ab	10,6 ± 0,1 a	10 ± 0,01 ab
M12 (Fe)	0,60 ± 0,0 cd	9,6 ± 0,7 ab	8,7 ± 0,4 c

*valores para n=2. Q_p: Produtividade volumétrica em g.L⁻¹.h⁻¹. Médias com mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Análise do reciclo celular no desempenho fermentativo

Os meios foram divididos em dois grupos, aqueles meios enriquecidos com macronutrientes (Ureia, NH_4 , P, K, Mg) e os meios enriquecidos com micronutrientes (Zn, Ca, Mn, Cu, Fe, Al). Essa divisão foi feita para facilitar a visualização dos gráficos e comparação dos resultados. Os gráficos representam o aumento ou estabilidade de cada parâmetro analisado em relação aos reciclos, portanto, os resultados representam se o efeito de reciclo celular proporcionou um aumento ou não na produção de algum metabólito.

O meio padrão em todos os parâmetros analisados sob o efeito dos reciclos não apresentou nenhuma diferença significativa entre as bateladas. Para todos os parâmetros analisados não foi evidenciado diminuição na produção dos metabolitos e no consumo da sacarose para nenhum meio. Para o consumo dos açúcares não foi observado diferenças significativas nos meios, exceto, no meio suplementado com ureia que aumentou de 81%, na primeira batelada, para 96% na terceira (Figura 2).

Os meios com excesso de fósforo (+12%), potássio (+24%), cálcio (+28%) e ferro (+25%) tiveram um aumento na produção de CO_2 , contudo, os mais significativos foram nos meios com cobre (+54%) e ureia (+50%) (Figura 2 e 3). Foi observado um aumento significativo na produção de etanol nos meios com excesso de ureia (+45%) e potássio (36%). Contudo, mesmo sem diferenças no consumo dos açúcares os meios com cobre, alumínio e cálcio também obtiveram um aumento na produção de etanol de 32,9%, 31,4% e 25,5%, respectivamente. O restante dos meios não apresentaram diferenças significativas (Figura 2 e 3). No rendimento em etanol todos os meios apresentaram um aumento superior a 10%, todavia, os meios com maior incremento no rendimento foram os com excesso de alumínio (+23%) e potássio (+21%).

Na produção de glicerol a grande maioria dos meios apresentaram um aumento significativo, e os meios com excesso de alumínio (+85%), ureia (+82%) e cobre (+79%) foram os que apresentaram o maior aumento. Os meios enriquecidos com fósforo e zinco, assim como o meio padrão não apresentaram diferenças significativas (Figura 2 e 3).

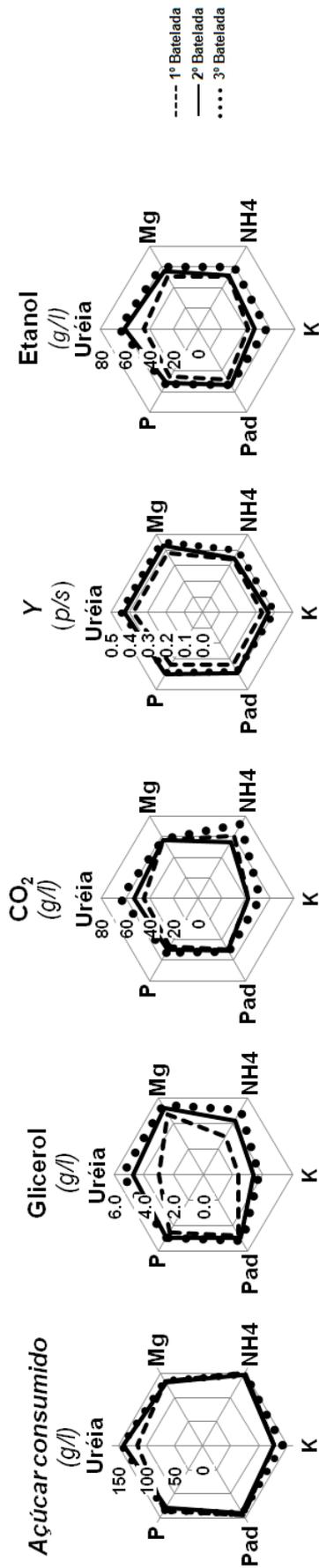


Figura 2: Comparação gráfica dos parâmetros fermentativos entre as três bateladas nos diferentes meios enriquecidos com os macronutrientes e o meio Padrão (sem suplementação de minerais). $Y_{(p/s)}$: rendimento em etanol (grama de açúcar consumido por grama de etanol produzido).

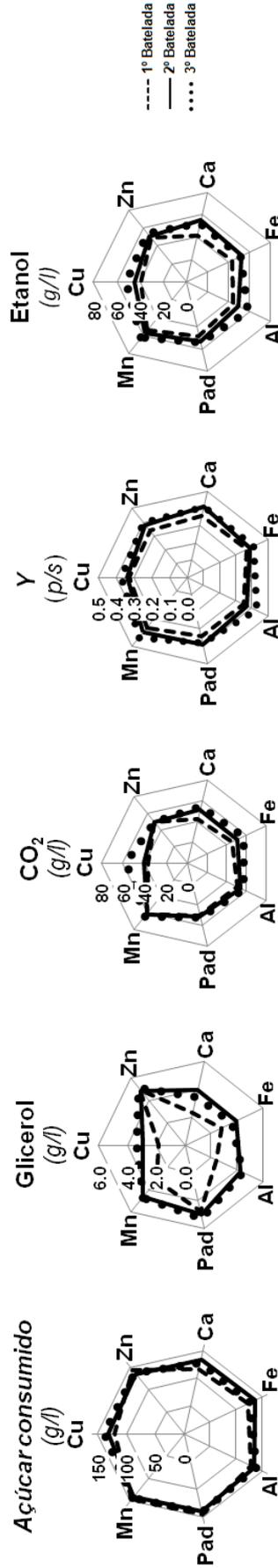


Figura 3: Comparação gráfica dos parâmetros fermentativos entre as três bateladas nos diferentes meios enriquecidos com os micronutrientes e o meio Padrão (sem suplementação de minerais). $Y_{(p/s)}$: rendimento em etanol (grama de açúcar consumido por grama de etanol produzido).

DISCUSSÃO

Influência dos minerais no metabolismo fermentativo

A linhagem de *S. cerevisiae* JP1 utilizada nesse trabalho é citada em trabalhos anteriores como uma linhagem com qualidades interessantes no processo fermentativo (Silva-Filho *et al.*, 2005). Ensaio realizado com a JP1 em meio sintético completo (YNB) e em condições de fermentação muito similares a do presente trabalho, apresentaram rendimento em etanol de 0,47 g de etanol por grama de sacarose (Pereira *et al.*, 2011). Esse rendimento é considerado excelente em condições industriais. Contudo, no meio Padrão, elaborado com YNB (sem aminoácidos e sulfatos de amônio) apenas com adição de concentrações baixas dos minerais avaliados, o rendimento em etanol foi de 0,38 g de etanol. Essa diferença de rendimento evidencia uma deficiência no meio padrão para a produção de etanol. Todos os meios suplementados com algum mineral tiveram um rendimento maior ao do meio padrão, exceto o meio suplementado com cobre que apresentou um rendimento um pouco abaixo.

Para o cobre e outros micronutrientes existe uma estreita faixa de concentração ótima para os organismos e em altas concentrações ele pode ter um efeito tóxico, como também, em baixas concentrações pode afetar as vias biossintéticas para aminoácidos ramificados, lisina, arginina e metionina (Azenha *et al.*, 2000; Hughes *et al.*, 2000). A concentração de cobre no meio suplementado foi de 0,99 mgL⁻¹ enquanto que no meio padrão foi de 0,2 mgL⁻¹. Essa diferença de quase cinco vezes fez com que a levedura apresentasse uma pequena redução no rendimento em etanol. Contudo, no trabalho de Azenha *et al.* (2000) a produção de etanol dobrou quando a concentração de cobre aumentou de 11,43 mgL⁻¹ para 43,2 mgL⁻¹, porém, as fermentações tornaram-se mais lentas. O transporte do cobre é realizado por proteínas transportadoras de alta afinidade (Ctr1p e Ctr3p) e baixa afinidade (Ctr2p). A disponibilidade do cobre no meio modula a expressão destas proteínas. Em concentrações baixas de cobre a síntese de Ctr1p e Ctr3p é maior, facilitando a absorção de cobre. Por outro lado, células sobrecarregadas de cobre diminuem a síntese de Ctr1p e Ctr3p diminuindo a absorção de cobre (De Freitas *et al.*, 2002). O metabolismo do piruvato, o ciclo do ácido cítrico e a cadeia respiratória utilizam ferro e proteínas contendo cobre, de forma que estas vias são susceptíveis de serem mais vulneráveis a perturbações na homeostase de ferro e cobre (De Freitas *et al.*, 2002). A explicação bioquímica do efeito do cobre na produção de etanol é um tema de

pesquisa ainda em aberto, contudo, de acordo com Azenha *et al* (2000) é possível que exista uma ligação entre o efeito do cobre com a disponibilidade de íons de ferro e a exigência de cobre para o transporte de ferro em células de levedura (Moehle *et al.*, 1994 e Eide, 1998).

Corroborando o resultado do presente trabalho de aumento na produção de etanol no meio suplementado com ferro, Stehlik-Thomas *et al* (2003) encontrou no seu trabalho aumento na produção de etanol utilizando uma concentração de ferro de 80 mgL⁻¹. A *S. cerevisiae* pode facilmente desenvolver-se em meios de cultura nos quais o ferro esteja muito escasso ou muito abundante, e também pode sobreviver a flutuações da disponibilidade de ferro no meio (Philpott e Protchenko, 2008).

O zinco desempenha importantes papéis no metabolismo da levedura, principalmente como cofator catalítico da álcool desidrogenase (Pankiewicz e Jamroz, 2011). Apesar disso, o meio enriquecido com cinco vezes mais zinco (5,9 mgL⁻¹ concentração final) apresentou um discreto aumento no rendimento em etanol. Contudo, de acordo com Zhao *et al* (2009) melhores rendimentos em etanol foi alcançado com concentrações de zinco em torno de 50 mgL⁻¹. Isso sugere que possa existir uma deficiência de zinco nos caldos de cana-de-açúcar.

O meio suplementado com cálcio apresentou um aumento na produção de etanol isso pode ser relacionado com o seu importante função na diminuição do estresse causado pela alta concentração do etanol (Courchesne *et al.*, 2010). Contudo, este mineral também está envolvido num efeito antagônico com a absorção do magnésio podendo bloquear os essenciais processos metabólicos dependentes de magnésio (Walker, 2003). Esse antagonismo pode ter evitado uma maior produção de etanol.

Apesar de *Saccharomyces cerevisiae* ser sensível ao alumínio (MacDiarmid e Gardner, 1998), não foi observado nenhuma característica estressante nos parâmetros fermentativos avaliados no meio suplementado com o mesmo. Pelo contrário, no meio enriquecido com alumínio o rendimento em etanol foi maior. A concentração de alumínio no meio foi de 3,7 mgL⁻¹. Essa concentração, nessas condições, parece não ser suficiente para causar estresse no metabolismo da levedura, uma vez que, de acordo com Oliveria *et al* (2009) na concentração de 54 mgL⁻¹ o alumínio apresenta um efeito drástico na viabilidade celular.

O meio suplementado com manganês, nas três bateladas, sempre se manteve entre os três melhores resultados de rendimento em etanol. O manganês é um elemento traço essencial para a levedura e apresenta uma conhecida concorrência intracelular

pelas reações enzimáticas, síntese de ATP e de ácidos nucleicos que requerem magnésio. Essa concorrência ocorre, principalmente, pelas suas propriedades químicas semelhantes (Blackwell *et al.*, 1997). Inversamente, certas enzimas que tem uma exigência por manganês não pode ser atendidas por magnésio (Walker, 1994). A competição entre os dois íons pode ocorrer em resposta à disponibilidade desses minerais e a sua grande importância regulatória (Blackwell *et al.*, 1997). O magnésio é altamente exigido pelas células, principalmente, devido ao seu papel como cofator de mais de 300 enzimas (Walker, 1994), por isso, é possível que o ótimo desempenho das células de levedura no meio enriquecido com manganês seja em detrimento da competição entre esses dois íons e a substituição do magnésio pelo manganês em determinadas atividades enzimáticas. No meio enriquecido com magnésio, o rendimento em etanol apresentou o melhor resultado comparado com todos os outros meios, alcançando 0,45 g/g, valor esse próximo ao obtido em fermentações com meios completos, como descrito no trabalho de Pereira *et al* (2011). Esse resultado corrobora a importância do magnésio no metabolismo fermentativo da levedura.

O fósforo é essencial no metabolismo energético e na síntese de ácidos nucleicos. Esse elemento é considerado indispensável à absorção de carboidratos e na transformação do açúcar em álcool e na produção de ATP, tanto na glicólise quanto na cadeia respiratória (Amorim, 1985, Vasconcelos, 1987). Todavia, no meio com excesso de fósforo não foi observado diferenças significativas no perfil fermentativo com relação ao meio padrão.

Diferentemente do fósforo, no meio enriquecido com potássio foi evidenciado diferenças significativas, principalmente, no rendimento em etanol. O potássio atua como ativador de uma série de reações na glicólise e em outros passos do metabolismo e está envolvido no balanço iônico. A quantidade de potássio absorvida pela célula durante a fermentação é o dobro da quantidade exigida na sua multiplicação e crescimento (Santos, 2008).

Nos meios enriquecidos com diferentes fontes de nitrogênio, foi observada uma diferença significativa entre os meios com ureia e amônio. Ambos tiveram um maior rendimento em etanol comparado com meio padrão. Contudo, o meio com ureia, ao longo das bateladas, obteve um rendimento em etanol de 0,45 g/g enquanto que o meio com amônio obteve 0,4 g/g. O nitrogênio desempenha papeis cruciais em diversas funções metabólicas e processos biológicos (Jiménez-Martí *et al.*, 2007). O metabolismo do nitrogênio está sujeito a um ajustado controle dependendo do tipo e

fonte de nitrogênio presente no meio (Espinosa Vidal, 2012). O nitrogênio pode ser assimilado por *Saccharomyces cerevisiae* nas formas amoniacal (NH_4^+), amídica (Ureia) ou amínica (na forma de aminoácidos). De acordo com Walker (1998) o transporte de íons de amônio pela *S. cerevisiae* é realizado através de transportadores de alta afinidade (K_T 0.2 mmolL^{-1}). Já o transporte de ureia pode ser realizado tanto por um transportador de alta afinidade (K_T 14 μmolL^{-1}) como também por um transportador de baixa afinidade (K_T 2.5 mmolL^{-1}). O sistema de baixa afinidade funciona por difusão facilitada quando a ureia está presente em excesso ($> 30.03 \text{ mgL}^{-1}$). Portanto, tanto no meio suplementado com amônio quanto no meio com ureia, as células de *S. cerevisiae* não tiveram dificuldades em absorver esses minerais. Contudo, para degradar ureia as células de *S. cerevisiae* necessitam gastar ATP (Magasanik, 1992). Portanto, devido à necessidade de gerar mais ATP para degradar a ureia é possível sugerir que a *S. cerevisiae* necessite aumentar seu rendimento em etanol para suprir a demanda energética. Isso pode explicar o motivo pelo qual o rendimento em etanol do meio suplementado com ureia foi maior do que no meio suplementado com amônio.

O glicerol é considerado o principal sub-produto da fermentação alcoólica e sua síntese está diretamente relacionada com o aumento da biomassa durante a fermentação (Cronwright *et al.*, 2002). É o mais efetivo osmorregulador presente em *S. cerevisiae* e sua produção aumenta em situações de estresse osmótico. O glicerol também inibe ou limita a fermentação alcoólica, afetando a produtividade específica máxima de etanol (Converti *et al.*, 1995). Todavia, não foi possível correlacionar produção de glicerol com aumento ou diminuição da produção de etanol nesse trabalho. Os meios com maior produção de etanol também obtiveram a maior produção de glicerol. Portanto, é possível concluir que o efeito individual de cada mineral, nas concentrações testadas, não provoca um estresse osmótico suficiente ao ponto de influenciar na produção de glicerol e na produção de etanol.

Perfil cinético da fermentação

O consumo dos açúcares ao longo da fermentação evidencia a rápida inversão da sacarose em glicose e frutose. Isso ocorre devido à hidrólise no ambiente extracelular pela enzima invertase, gerando glicose e frutose, que são subsequentemente transportados para o interior da célula através das permeases Hxtp (Lagunas, 1993). Existe outra forma de assimilar sacarose que é o transporte direto pela membrana

plasmática e hidrolisada no interior da célula. Esse transporte ocorre via co-transporte de íons H^+ , portanto, implica num gasto de energia para a célula e o consumo da sacarose ocorre de forma mais lenta (Stambuk *et al.*, 2000). Neste trabalho, a sacarose foi rapidamente convertida na primeira hora de fermentação, entretanto, no meio com amônio foi encontrado sacarose ainda nas últimas horas de fermentação. De acordo com Takeshige e Ouchi (1995) excesso de sais, falta de nutrientes ou alta osmolaridade do meio podem exercer um efeito inibitório sob a invertase. A concentração de glicose e frutose pode causar essa osmolaridade. Contudo, a concentração de glicose e frutose foi baixa no meio com excesso de amônio em relação ao meio padrão. Possivelmente, deve existir algum efeito da adição de amônio na velocidade de hidrólise da sacarose causado pelo reciclo da biomassa, já que só foi observado esse acúmulo de sacarose na terceira batelada.

Efeito do reciclo celular no desempenho fermentativo

Adaptação a diferentes ambientes é uma característica fundamental para os microrganismos. As células de *S. cerevisiae* quando submetidas a condições de estresse, desenvolvem uma rápida resposta celular para reparar danos e proteger as estruturas (Estruch, 2000). Por ser uma característica intrínseca do gênero *Saccharomyces*, é bem provável que essa adaptação tenha ocorrido entre a primeira batelada e as outras duas bateladas, onde em todos os meios, as células de levedura melhoraram seu desempenho fermentativo. Esse efeito foi recentemente relatado por Pereira *et al.* (2011) para a linhagem JP1 utilizando caldo de cana como substrato de fermentação. Todavia, essa melhoria na fermentação não foi percebida no meio padrão, que manteve seus parâmetros fermentativos sem observar diferença significativa entre as bateladas. Isso sugere que, a adaptação necessita, não somente das ferramentas moleculares, mas também da quantidade e qualidade nutricional do mosto fermentativo utilizado no processo.

CONCLUSÃO

- A composição mineral do mosto fermentativo, de fato, apresenta um efeito no desempenho fermentativo das células de levedura, principalmente na produção de etanol.
- A ureia e o magnésio apresenta a maior influencia na produção de etanol dentre os macro e micronutrientes avaliados.
- O manganês e o alumínio são os micronutrientes que mais estimulam a produção de etanol, contudo, maiores estudos necessitam ser realizados para identificar seus papeis no metabolismo fermentativo.
- O cobre, mesmo em baixa concentração, apresenta um efeito inibitório na produção tanto de etanol com de glicerol.
- A viabilidade celular não é afetada pelos minerais nas concentrações utilizadas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Amorim, H.V. Nutrição mineral da levedura, aspectos teóricos e práticos. In: Semana de fermentação alcoólica “Jaime Rocha de Almeida”, Anais. Piracicaba: ESALQ, **1985**. p. 144 – 148.

Azenha, M.; Vasconcelos, M. T.; Moradas-Ferreira, P. The influence of Cu concentration on ethanolic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. Journal of Bioscience and Bioengineering. **2000**, 163 – 167.

Basso, L.C., de Amorim, H.V., de Oliveira, A.J. and Lopes, M.L. Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil. *FEMS Yeast Res.* **2008**, 8, 1155-1163.

Blackwell, K. J.; Tobin, J. M.; Avery, S. V. Manganese uptake and toxicity in magnesium-supplemented and unsupplemented *Saccharomyces cerevisiae*. Applied Microbiology and Biotechnology. **1997**, p. 180 – 184.

Carmelo, V., Santos, R., Viegas, C.A. and Sá-Correia, I. Modification of *Saccharomyces cerevisiae* thermotolerance following rapid exposure to acid stress. *International Journal of Food Microbiology*. **1998**, 42, 225-230.

Converti, A.; Zilli, M.; Rovatti, M. Effect of glycerol on alcohol fermentation. Inhibition mechanism and diffusion limitations. *Bioprocess Engineering*, Berlin, v. 13. n.5, **1995**, p. 257-263.

Courchesne, W. E.; Vlasek, C.; Klukovich, R.; Coffee, S. Ethanol induces calcium influx via the Cch1-Mid1 transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch Microbiology*. **2010**, p. 1 – 12.

Cronwrigth, G. R.; Rohwer, J. M.; Prior1, B. A. Metabolic Control Analysis of Glycerol Synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology*, Sept. **2002** p. 4448–4456.

Eide, D. J.: The molecular biology of metal ion transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Annual Reviews of Nutrition*. **1998**, 18: 441-469.

Espinosa Vidal, E. Influência da fonte de nitrogênio no perfil fermentativo, transcriptômico, e na produção de alcoóis superiores em *Saccharomyces cerevisiae*. Tese (Doutorado em Genética). Universidade Federal de Pernambuco. **2012**.

Estruch, F. Stress-controlled transcription factor, stress-induced genes and stress tolerance in budding yeast. *FEMS Microbiology*. Amsterdam. **2000**, 24:469-486.

Hughes T. R.; Marton M. J. *et al.* Functional discovery via a compendium of expression profiles. *Cell* **2000**, 102: 109–126.

Jimenez-Marti, E.; Aranda, A.; Mendes-Ferreira, A.; Mendes-Faia, A.; Del Olomo, M. The nature of the nitrogen source added to nitrogen depleted vinifications conducted by a *Saccharomyces cerevisiae* strain in synthetic must affects gene expression and the levels of several volatile compounds. *Antonie van Leeuwenhoek*, **2007**, 92: 61-75.

Lagunas, R. Sugar transport in *Saccharomyces cerevisiae*. FEMS Microbiology Reviews. **1993**, 42: 104-229.

Lucena, B.T., dos Santos, B.M., Moreira, J.L., Moreira, A.P., Nunes, A.C., Azevedo, V., Miyoshi, A., Thompson, F.L. and de Morais, M.A. Jr. (2010) Diversity of lactic acid bacteria of the bioethanol process. *BMC Microbiology* **10**, 298.

MacDiarmid, C. W. and Gardner, R. C. Overexpression of the *Saccharomyces cerevisiae* magnesium transport system confers resistance to aluminum ion. *The Journal Biological Chemistry*. **1998**, 273:1727–1732.

Magasanik, B. Regulation of nitrogen utilization. The molecular and cellular biology of the yeast *Saccharomyces*: gene expression. **1992**, 2: 283–317.

Menezes, J. A S.; Morais Júnior, M. A. Aspectos físicos e químicos do caldo de cana que afetam a capacidade fermentativa das células de levedura. Dissertação (Mestrado Ciências Biológicas). Universidade Federal de Pernambuco – PE. **2012**.

Melo, H.F., Bonini, B.M., Thevelein, J., Simões, D.A. and Morais, M.A. Jr. (2010) Physiological and molecular analysis of the stress response of *Saccharomyces cerevisiae* imposed by strong inorganic acid with implication to industrial fermentations. *Journal Applied Microbiology* **109**, 116-127.

Moehle, C.; Kaplan, J. and Klausner, R.: Molecular characterization of a copper transport protein in *S. cerevisiae*: an unexpected role for copper in iron transport. *Cell*, **1994**, 76: 393-402.

Pankiewicz, U.; Jamroz, J. Effect of Pulsed Electric Fields upon Accumulation of Zinc in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. **2011**, 646 – 651.

Pereira, F B.; Gomes, D. G.; Guimarães, P M.; Teixeira, J. A.; Domingues, L. Cell recycling during repeated very high gravity bio-ethanol fermentations using the industrial *Saccharomyces cerevisiae* strain PE-2. Springer. Biotechnology Letters. **2011**, 34:45–53.

Pereira, L. P.; Bassi, A. P. G.; Avansini, S. H.; Barbosa - Neto, A. G.; Brasileiro, B. T. R. V.; Ceccato-Antonini, S. R.; Morais - Jr, M. A. The Physiological characteristics of the yeast *Dekkera bruxellensis* in fully fermentative conditions with cell recycling and in mixed cultures with *Saccharomyces cerevisiae*. Antonie van Leeuwenhoek. **2011**.

Philpott, C. C. e Protchenko, O. Response to iron deprivation in *Saccharomyces cerevisiae*. Eukaryot. Cell. **2008**, 7: 7-20.

Santos, A. M. Estudo da influência da complementação de nutrientes no mosto sobre o processo de fermentação alcoólica em batelada. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Universidade Federal de Alagoas. **2008**.

Silva-Filho, E. A.; Santos, S. K. B.; Resende, A.; M., Morais, J O. F.; Morais Jr, M. A.; Simões, D. A. Yeast population dynamics of industrial fuel-ethanol fermentation process assessed by PCR-fingerprinting. Antonie van Leeuwenhoek. **2005a**, 88:13-23.

Silva Filho, E. A., de Melo, H. F., Antunes, D. F., dos Santos, S. K., do Monte Resende, A., Simões, D. A. and de Morais, M. A. Jr. Isolation by genetic and physiological characteristics of a fuel-ethanol fermentative *Saccharomyces cerevisiae* strain with potential for genetic manipulation. Journal Industrial Microbiology Biotechnology. **2005b**, 32, 481-486.

Silva, F. A. S e Azevedo, C. A. V. Versão do programa computacional Assistat para o sistema operacional Windows, Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais. **2002**, 4:71-78.

Stambuk, B. U. Batista, A. S. De Araujo, P. S. Kinetics of active sucrose transport in *Saccharomyces cerevisiae*. Journal of Bioscience and Bioengineering. **2000**, 89-212:4.

Stehlik-Thomas, V.; Zetic, V. G.; Stanzer, D.; Grba, S.; Vahcic, N. Zn, Cu, and Mn Enrichment in *S. cerevisiae*. Food Technology Biotechnology. **2004**, 42 (2): 115 – 120.

Stehlik-Thomas, V.; Zetic, V. G.; Stanzer, D.; Grba, S.; Vahcic, N. Uptake of iron by yeast cells and its impact on biomass production. Acta Aliment. **2003**, 32: 279-287.

Takehige, K. Ouchi, K. Effects of yeast invertase on ethanol production in molasses. Journal of Fermentation and Bioengineering. Amsterdam. **1995**, 79:513-515.

Vasconcelos, J. N. Influência da complementação de nutrientes nitrogenados e fosfatados sobre o processo de fermentação alcoólica industrial. Brasil açucareiro. **1987**, 105: 41 – 48.

Walker, G. M. Metals in Yeast Fermentation Processes. Advances in Applied microbiology. **2003**, 197 – 229.

Walker, G. M. The roles of magnesium in biotechnology. Critical Reviews in Biotechnology. **1994**, 14: 311-354.

Zhao, X. Q.; Xue, C.; Ge, X. M.; Yuan, W. J.; Wang, J. Y.; Bai, F. W. Impact of zinc supplementation on the improvement of ethanol tolerance and yield of selfflocculating yeast in continuous ethanol fermentation. Journal of Biotechnology. **2009**, 139: 55–60.

MATERIAL SUPLEMENTAR

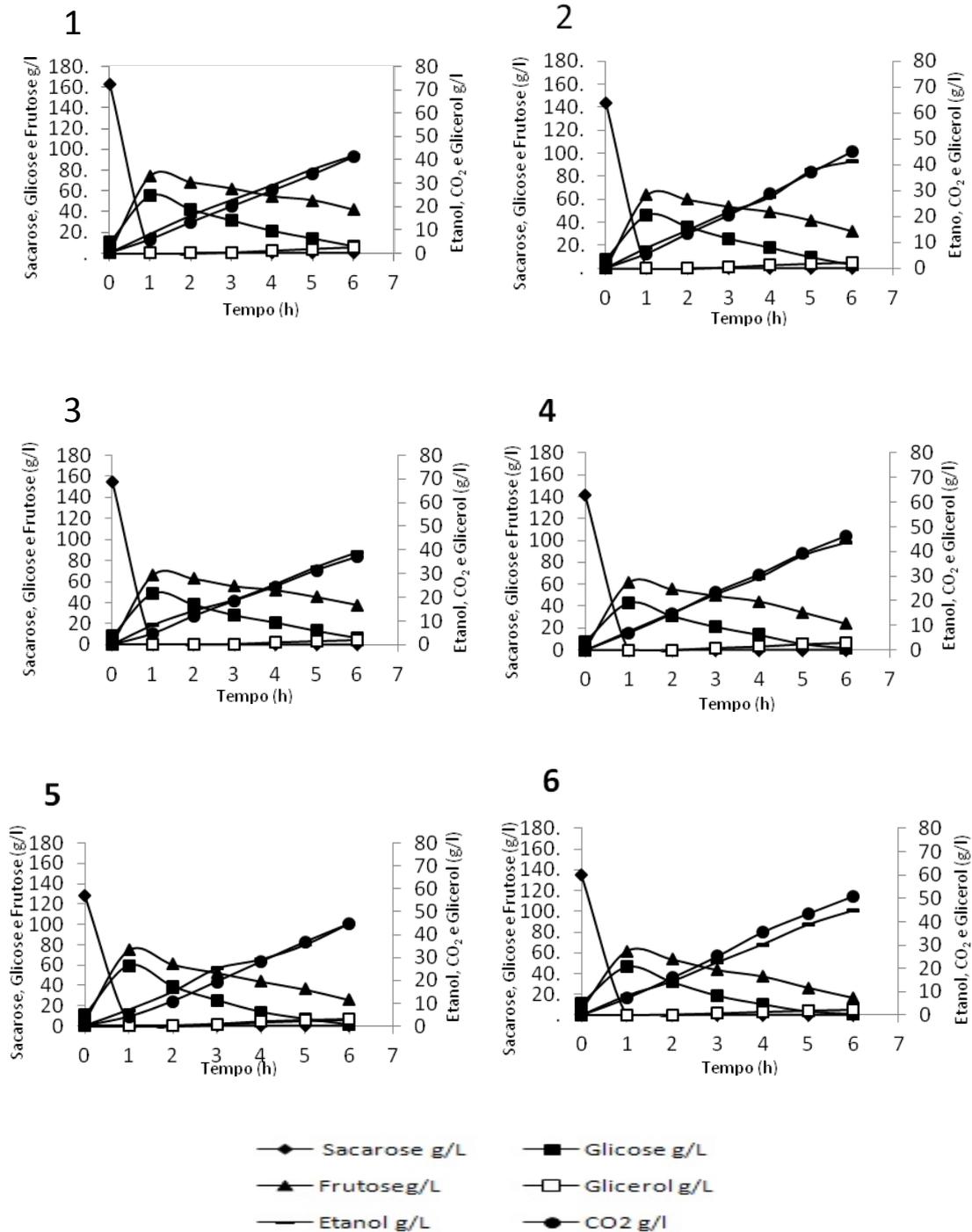


Figura 1: Perfil fermentativo da linhagem industrial JP1 nos meios sintéticos suplementados com diferentes concentrações de minerais. Os dados de consumo dos açúcares, produção de etanol, glicerol e CO₂ são apresentados. Gráfico 1: meio com potássio, 1ª batelada; 2: meio com cálcio 1ª batelada; 3: meio com cobre 1ª batelada; 4: meio com ferro 1ª batelada; 5: meio com uréia 1ª batelada; 6: meio com alumínio 1ª batelada.

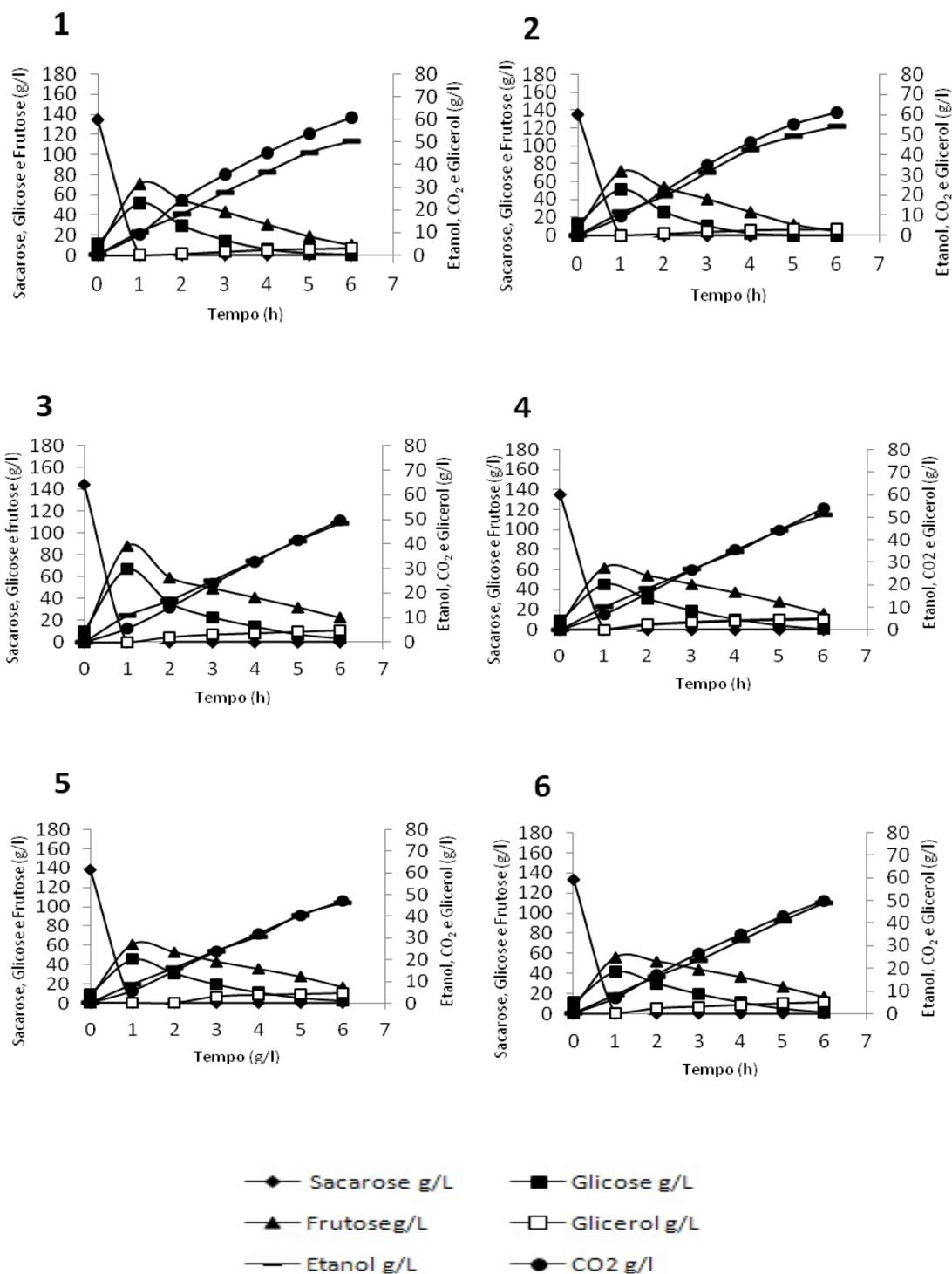


Figura 2: Perfil fermentativo da linhagem industrial JP1 nos meios sintéticos suplementados com diferentes concentrações de minerais. Os dados de consumo dos açúcares, produção de etanol, glicerol e CO₂ são apresentados. Gráfico 1: meio com amônio, 1ª batelada; 2: meio com manganês 1ª batelada; 3: meio padrão 1ª batelada; 4: meio com magnésio 1ª batelada; 5: meio fósforo 1ª batelada; 6: meio com zinco 1ª batelada.

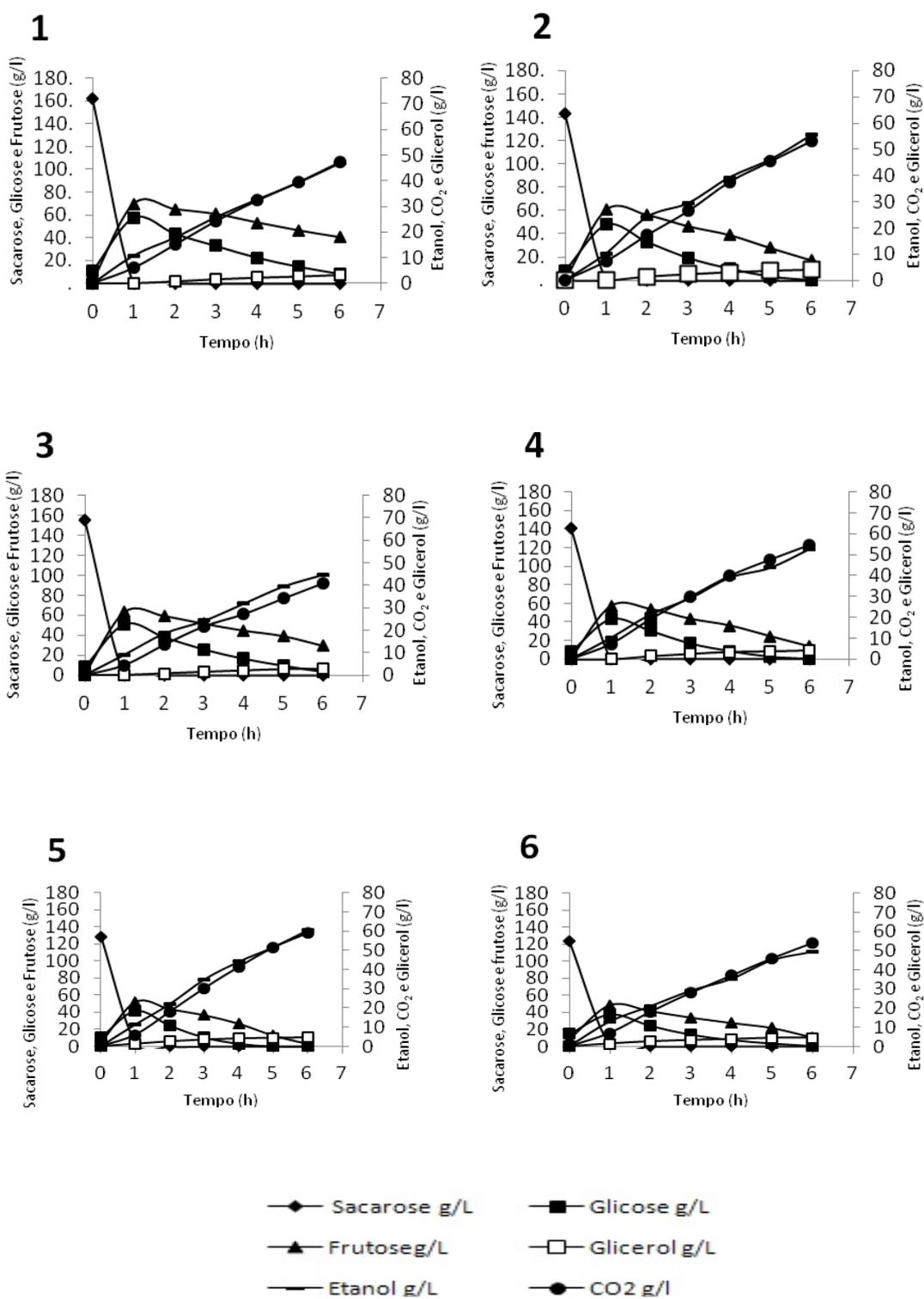


Figura 3: Perfil fermentativo da linhagem industrial JP1 nos meios sintéticos suplementados com diferentes concentrações de minerais. Os dados de consumo dos açúcares, produção de etanol, glicerol e CO₂ são apresentados. Gráfico 1: meio com potássio 2ª batelada; 2: meio com cálcio 2ª batelada; 3: meio cobre 2ª batelada; 4: meio com ferro 2ª batelada; 5: meio ureia 2ª batelada; 6: meio com alumínio 2ª batelada.

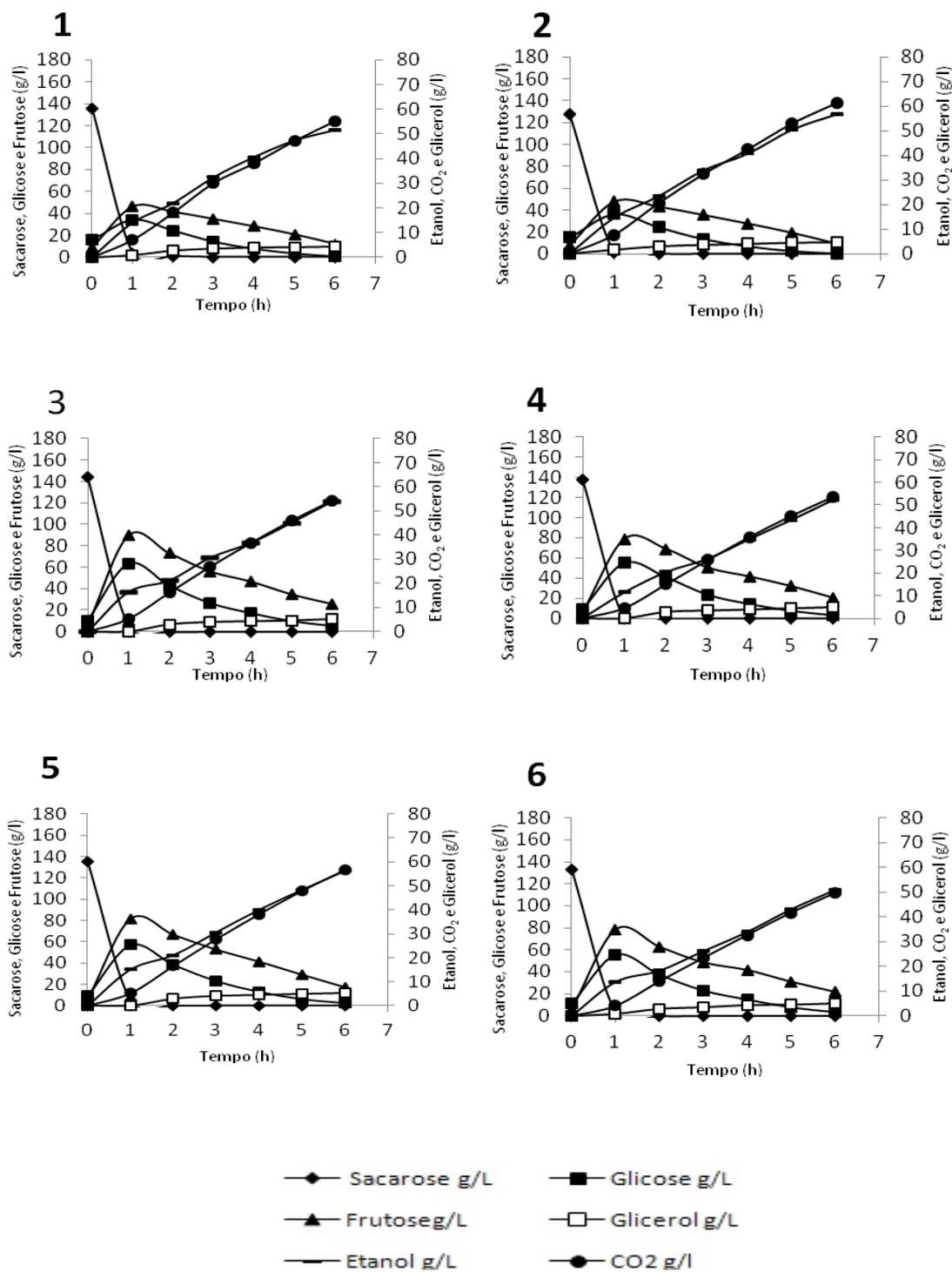


Figura 4: Perfil fermentativo da linhagem industrial JP1 nos meios sintéticos suplementados com diferentes concentrações de minerais. Os dados de consumo dos açúcares, produção de etanol, glicerol e CO₂ são apresentados. Gráfico 1: meio com amônio 2^o batelada; 2: meio com manganês 2^o batelada; 3: meio padrão 2^o batelada; 4: meio com fósforo 2^o batelada; 5: meio magnésio 2^o batelada; 6: meio com zinco 2^o batelada.

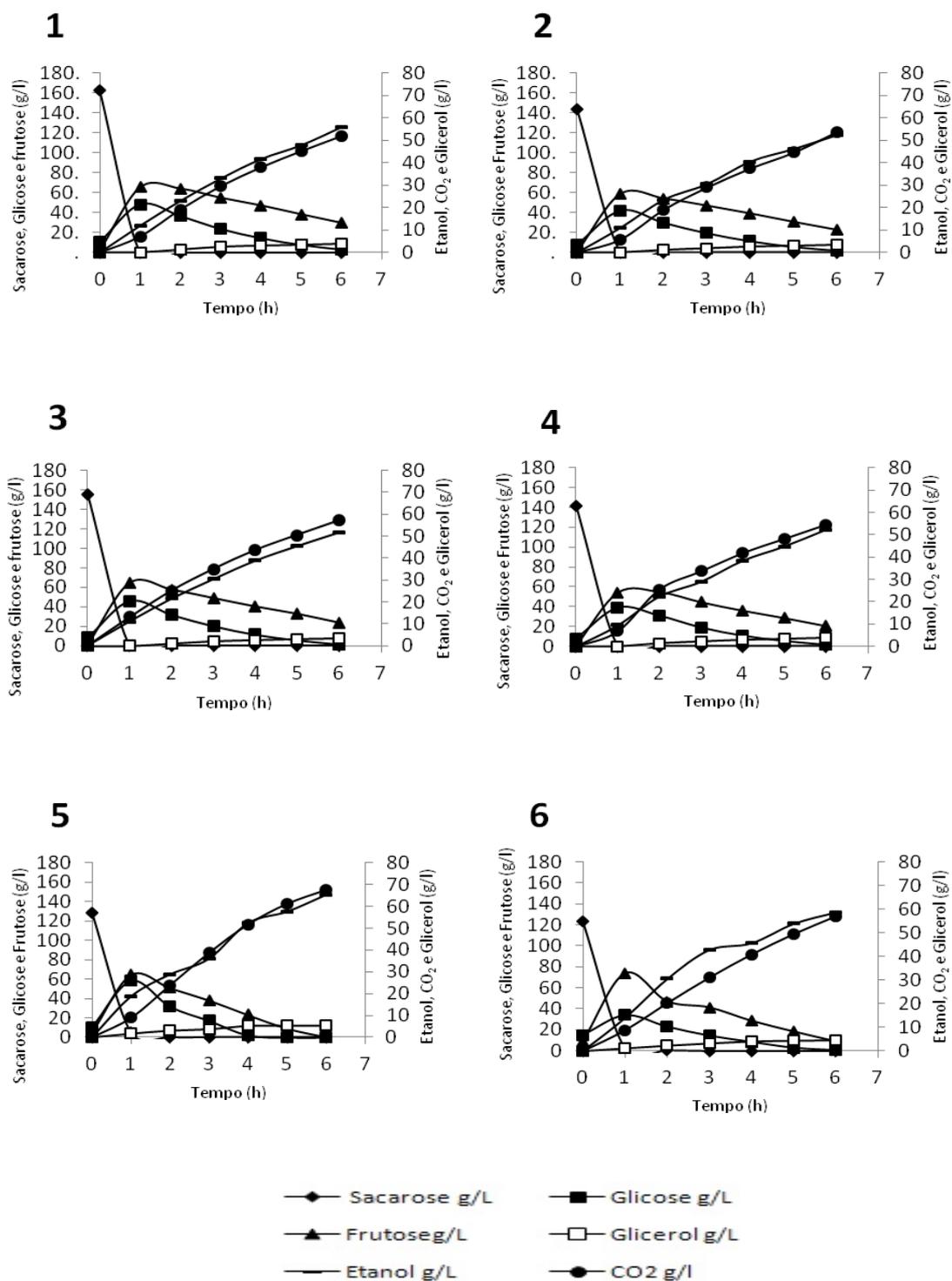


Figura 5: Perfil fermentativo da linhagem industrial JP1 nos meios sintéticos suplementados com diferentes concentrações de minerais. Os dados de consumo dos açúcares, produção de etanol, glicerol e CO₂ são apresentados. Gráfico 1: meio com potássio 3^o batelada; 2: meio com cálcio 3^o batelada; 3: meio com cobre 3^o batelada; 4: meio com ferro 3^o batelada; 5: meio com ureia 3^o batelada; 6: meio com alumínio 3^o batelada.

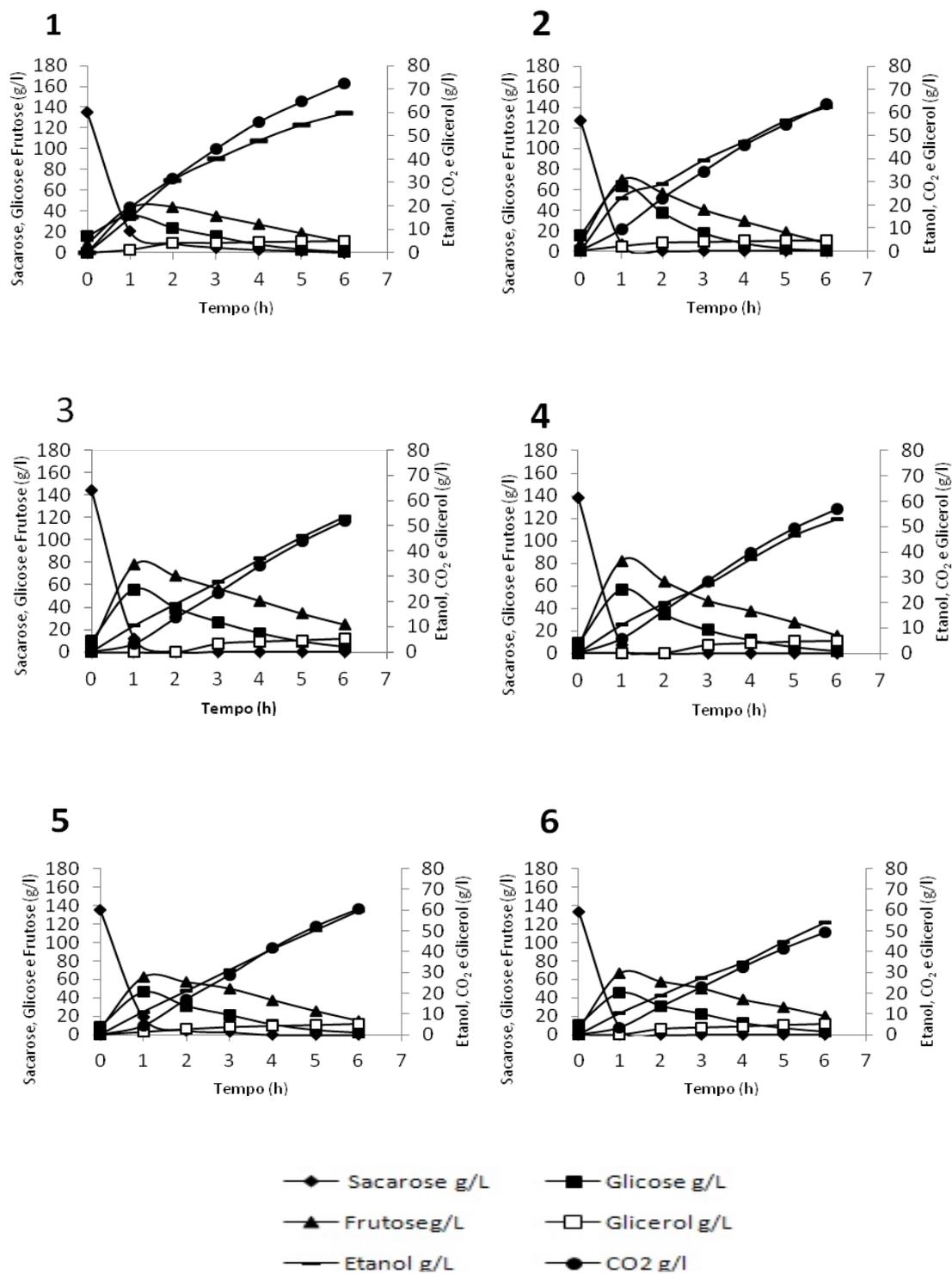


Figura 6: Perfil fermentativo da linhagem industrial JP1 nos meios sintéticos suplementados com diferentes concentrações de minerais. Os dados de consumo dos açúcares, produção de etanol, glicerol e CO₂ são apresentados. Gráfico **1**: meio com amônio 3^o batelada; **2**: meio com manganês 3^o batelada; **3**: meio padrão 3^o batelada; **4**: meio com fósforo 3^o batelada; **5**: meio com magnésio 3^o batelada; **6**: meio com zinco 3^o batelada.

