

ANÁLISE DAS CONDIÇÕES DE ESTRESSE NA FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA PELO PARÂMETRO DE AGITAÇÃO MECÂNICA SOBRE A VIABILIDADE DA LEVEDURA *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

Raiane Cerqueira Soares¹ (IC), Thais Suzane Milessi Esteves (PQ)^{1,2}

¹Universidade Federal de Itajubá, ²Universidade Federal de São Carlos.

Palavras-chave: Cisalhamento. Imobilização. Viabilidade celular.

Introdução

Historicamente, o crescimento açodado da população pune a demanda de energia, consolidando a sua obtenção tradicional por origens fósseis. Como consequências da ampla utilização desses recursos finitos, surgem mudanças climáticas e problemas socioambientais (GOLDEMBERG *et al.*, 2008; SILVA, 2012). Dito isso, apoiadas por protocolos climáticos globais, preza-se nesta demanda incisiva a transição energética de recursos fósseis para recursos renováveis (NIELSEN, 2016). Portanto, tendo em vista que o setor de transportes tem historicamente um alto impacto nas emissões de gases de efeito estufa, para atender as normas vigentes, tem-se pelos biocombustíveis o destaque no cenário mundial, aplicando fontes renováveis e de menor impacto ambiental (GARRET-PELTIER, 2016; ROBAK & BALCEREK, 2018).

Desse modo, no embate contra o bioetanol de primeira geração (1G) de tecnologias clássicas, açúcares fermentescíveis de culturas alimentares (sacaríneas ou amiláceas), o bioetanol de segunda geração (2G) é produzido a partir de biomassa lignocelulósica, intrinsecamente sustentável, defrontando o debate ético entre a produção de combustíveis e a alimentação global devido a matérias-primas mais complexas que no lugar de serem descartadas são implementadas à bioconversão (BELLISSIMI *et al.*, 2009; NIELSEN, 2016).

Analisando o impacto desta complexidade, o segundo processo arca com baixas eficiência de conversão e rendimento, decorrentes da dificuldade na disponibilidade de monômeros fermentescíveis, necessitando de melhorias nas concessões metabólicas do microrganismo, no processo de fermentação e no manejo da biomassa (NIELSEN, 2016; ROBAK & BALCEREK, 2018). Observa-se então, a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, que carrega consigo relevância científico-industrial no setor sucroenergético, sujeita às mais diversas condições de operação, mas incapaz de metabolizar nativamente a xilose, resultante da hemicelulose na fração de biomassas lignocelulósicas.

No entanto, através de um processo mediado pela enzima xilose isomerase (XI, E.C. 5.3.1.5), a qual converte xilose em xilulose, é possível a assimilação da xilose pela levedura em um processo chamado de Isomerização e Fermentação Simultâneas (SIF) (SILVA *et al.*, 2012).

Para tanto, a tecnologia SIF está em desenvolvimento e necessita de otimização significativa e abrangente das condições ótimas de enzimas e leveduras, mesmo que distintas (SILVA *et al.*, 2012). Logo, a adequação do microrganismo no ambiente fermentativo implica em respostas circunstanciais aos parâmetros operacionais, alterando as vias bioquímicas e a quantidade de metabólitos sintetizados (BATISTOTE & SANTOS, 2020). Ressalta-se a importância da interação parâmetros-metabolismo, que visa explicitar por meio de um número reduzido de ensaios tais respostas bioquímicas (THÉODORE & PANDA, 1995). Assim, a garantia de integridade e confiabilidade dos dados obtidos, para as condições utilizadas em escala laboratorial, deve prezar pelo desenvolvimento de processos não prejudiciais às células.

A suspensão de microrganismos no meio, sujeita-os às tensões hidrodinâmicas que culminam tanto em mudanças reológicas no caldo fermentativo quanto na morfologia celular (LANGE *et al.*, 2001). Nesse sentido, a investigação sobre as condições de estresse em que a levedura *S. cerevisiae* pode ser submetida confronta a estabilidade celular em condições de processo, o que é interessante para o projeto de biorreatores industriais, além do aperfeiçoamento genético a fim de linhagens robustas (ZHAO & BAI, 2009). Destarte, este trabalho aborda a interferência de múltiplos sistemas de agitação na viabilidade da levedura *S. cerevisiae*, dado a presença de partículas sólidas da enzima xilose isomerase, na determinação das condições mais adequadas para estudos de otimização do processo SIF.

Metodologia

Os experimentos de cultivo, agitação e análise microscópica foram realizados no Laboratório de

Processos Fermentativos e Enzimáticos (LPFenz) da Universidade Federal de Itajubá (UNIFEI), MG. Para avaliar a influência da agitação e das partículas sólidas enzimáticas na viabilidade celular foram avaliados três sistemas de agitação: agitação mecânica usando barra magnética e agitação de agitador rotativo usando mini-reatores cilíndricos e frascos de Erlenmeyer. Avaliou-se o efeito das partículas da enzima XI comercializada em sua forma imobilizada.

A enzima comercial Gensweet® IGI-HF (500U/mg, 60°C, pH 7,0) de *Streptomyces rubiginosus* foi gentilmente doada pela Dupont/Genencor International Inc (Palo Alto/Estados Unidos). Tem-se que ela é uma enzima granular imobilizada de xilose isomerase de diâmetro equivalente a 800µm. A levedura *Saccharomyces cerevisiae* (Itaiquara®, Brasil) foi utilizada em todos os experimentos.

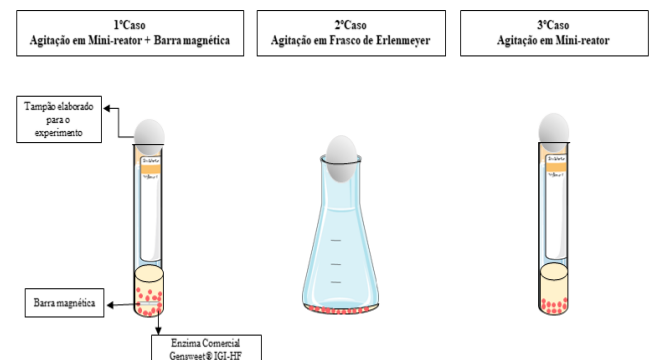
Para preparação do pré-inóculo, utilizou-se a levedura liofilizada Itaiquara®, que foi inicialmente hidratada nas condições pré-estabelecidas por Ramos *et al.* (2022) em meio YPD e mantida sob 200rpm por 12h a 30°C. A preparação do meio SIF conta com a suplementação do meio de fermentação, que consistiu de sais de fosfato monopotássico (KH₂PO₄) 5g/L, sulfato de magnésio (MgSO₄) 2g/L, cloreto de cobalto hexahidratado (CoCl₂.6H₂O) 0,1g/L e ureia 1,2g/L, semelhante à metodologia utilizado por Silva *et al.* (2012), mas também contendo 20g/L de glicose. Portanto, o pH inicial do meio foi ajustado para 5,5 com a adição de HCl (1mol/L) ou NaOH (1mol/L), se necessário. Os meios de cultura não foram esterilizados para esta experiência.

Os experimentos foram realizados com concentração celular inicial de 50g/L (densidade óptica inicial, DO = 100). A concentração celular foi determinada em espectrofotômetro a 600nm (Biospectro SP-22, UV-vis 325 – 1000nm) e correlacionada com uma curva de peso seco previamente determinada (dados não mostrados). O inóculo foi realizado em meio YPD (extrato de levedura 10g/L, peptona 20g/L, glicose 40g/L) 300mL e pH 5,5, a 30°C e 150rpm por 6 h. Posteriormente, as células foram recuperadas por centrifugação (4500rpm por 10min) e ressuspensos com meio SIF (pH 5,5) 2mL por frasco. As comparações de agitação mecânica foram realizadas com os sistemas: agitação de uma barra magnética em mini-reatores (10mL), e apenas com a agitação da incubadora usando mini-reatores ou Erlenmeyer. Além disso, avaliou-se 0,4g de Gensweet® IGI-HF, sendo estas grandes e rígidas (Figura 1). Assim, a Figura 2 ilustra a situação descrita nos casos estudados. Todos os experimentos foram realizados a 35°C, 150rpm, pH 5,5 com 2mL de solução por 6h.

Figura 1 – Enzima IGI-HF em sua forma comercial imobilizada.



Figura 2 – Representação dos sistemas de agitação.



A viabilidade celular foi avaliada pela técnica do azul de metileno em contagem pela Câmara de Neubauer ao microscópio, a proporção de amostra e corante foi de 1:1 (volume de amostra: volume de azul de metileno) em uma reação de aproximadamente 5min. A partir deste fato, a viabilidade foi definida pela razão entre células viáveis e células totais, contidas em um espaço definido da câmara de contagem, através da Equação 1 de acordo com o método proposto por Bofo (2015). Onde B é o número de células viáveis e T é o número de células totais contadas em um espaço definido da câmara de contagem.

Equação 1 – Viabilidade celular.

$$\text{Viabilidade (\%)} = \frac{B}{T} * 100$$

A análise comportamental, para com a reologia complexa do meio fermentativo, permite atribuir aspectos comportamentais do fluido e do fenômeno de transporte sob a influência direta do parâmetro de agitação mecânica (BOFO, 2015). Desse modo, estes são intrínsecos à interferência físico-química e conseqüentemente do metabolismo da levedura *S. cerevisiae*. Demonstra-se na Equação 2, pelo trabalho de Lange *et al.* (2001) assumindo o meio newtoniano, o movimento de um fluido dentro de um estreito tubular recipiente, onde $\tau_{\text{máx}}$ – tensão de cisalhamento máxima [Pa]; D – Diâmetro do tubo [m]; L – Comprimento do tubo [m]; ΔP – Queda de

pressão [Pa].

Equação 2 – Equação de Poiseuille.

$$\tau_{m\acute{a}x} = \frac{D * \Delta P}{4 * L}$$

Resultados e discussão

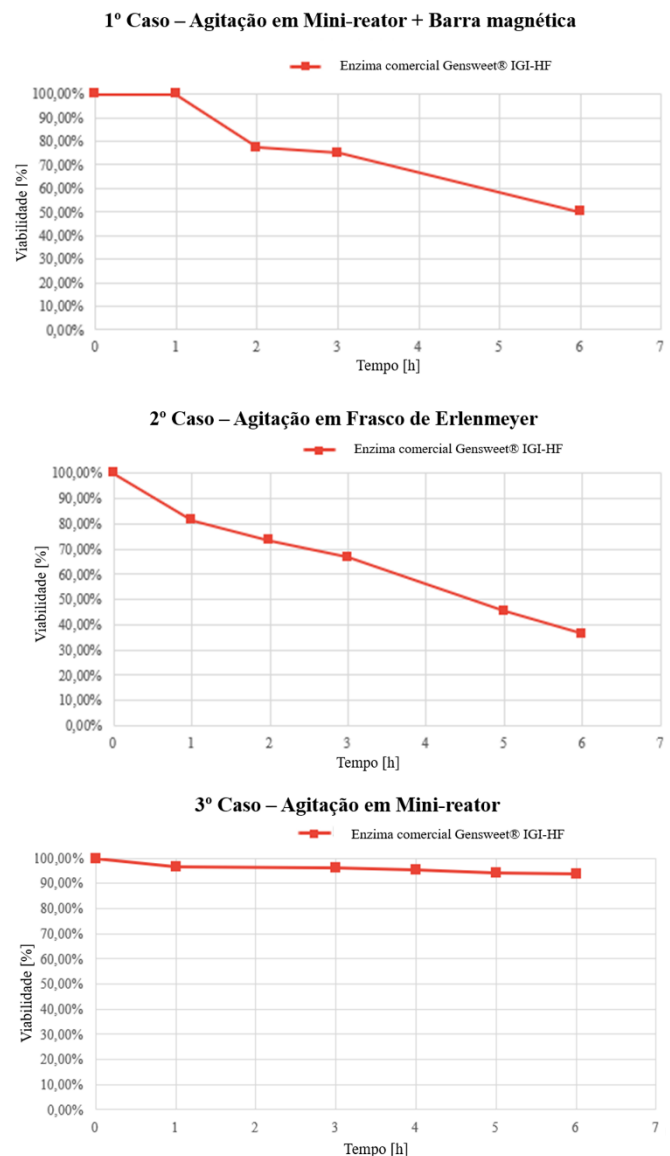
Inicialmente, sabe-se que a agitação garante a homogeneidade do meio, de modo a facilitar a transferência de massa, calor e energia destes sistemas prefixados. No entanto, ela também é responsável por tensões cisalhantes que interferem diretamente na viabilidade celular. Além disso, o arranjo dos miniorreatores também interfere na viabilidade, cujas observações hidrodinâmicas demonstram a interação fluido-partícula, sendo exemplificadas em funções da velocidade, temperatura e cisalhamento na teoria localmente isotrópica de Kolmogorov (THOMAS, 1993). Sendo assim, os sistemas de agitação adjunto a configuração dos miniorreatores impactaram na estabilidade celular e o controle destes parâmetros objetiva não comprometer a produtividade do processo.

Portanto, através da teoria supracitada em Thomas (1993), relacionou-se a dependência das interações fluido-partícula com os vórtices propiciados pela turbulência do meio, ou seja, vórtices relativamente grandes favoreceram a dinâmica interagindo pelo baixo movimento relativo, já vórtices menores não arrastaram as partículas e as danificaram na ação superficial. Em suma, a escala dos vórtices gerados sobre as células suspensas em contato com sólidos de XI imobilizados, ditou a taxa de viabilidade e, complementando com Vraná & Seichert (1988), o fato de as células estressadas perderem a capacidade de reprodução ou até mesmo terem a parede celular comprometida é resultado das cicatrizes geradas a cada brotação que acarretaram na morte sequencial do microrganismo.

Para uma apresentação mais uniforme e concisa interpretação dos dados, a Figura 3 mostra as curvas de viabilidade dos três casos representados na Figura 2. Observa-se que as células em suspensão são submetidas a tensões de cisalhamento devido à agitação mecânica (caso 1) e a tensões de cisalhamento devido à hidrodinâmica na interação fluido-partícula (caso 2), perdendo sua viabilidade. Já no caso 3, as leveduras permaneceram viáveis durante as 6h de processo. Comparando os casos usando mini-reatores (caso 1 e 3), a partir da Equação de Poiseuille, neste experimento a presença da barra magnética induzindo a agitação mecânica proporciona uma maior queda de pressão no sistema, o que implica também em maximizar a tensão

causada pelo cisalhamento. A viabilidade celular nos mini-reatores (caso 3) foi mantida em torno de 90% durante 6h, de forma que este sistema é o mais adequado para experimentos de laboratório SIF para gerar dados confiáveis para otimização de processos.

Figura 3 – Perfis de viabilidade celular da levedura *S. cerevisiae* em meio SIF na presença da enzima comercial Gensweet® IGI-HF (35° e 150rpm).



Conclusões

Este trabalho mostrou a necessidade de controlar a agitação mecânica do meio de fermentação, exigindo a determinação de condições ótimas para manter a viabilidade celular da levedura *S. cerevisiae* e garantir a geração de dados confiáveis durante a otimização do

processo. A viabilidade da levedura foi fortemente prejudicada pelas agitações mecânicas e hidrodinâmicas exacerbadas (casos 1 e 2). No caso 3, o mini-reator manteve alta viabilidade celular por 6h. Portanto, o projeto de biorreatores e mecanismos de agitação mecânica são de suma importância para o controle de fatores físico-químicos e bioquímicos, tanto em escala de bancada quanto industrial. Entre as condições estudadas, o caso 3 é o mais adequado para condução do processo. Para uma abordagem futura, propõe-se analisar e comparar diferentes mini-reatores na fermentação pela levedura imobilizada *S. cerevisiae*, uma vez que a presença do suporte poderia proteger a levedura contra forças de cisalhamento.

Agradecimento

O presente trabalho foi realizado com o apoio do Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica da Universidade Federal de Itajubá (PIBIC-UNIFEI). Agradecimentos ao CNPq (Processo 130409/2021-9 e 407716/2021-1), a CAPES (Código Financeiro 001), FAPEMIG (APQ01559-21) e a FAPESP (2016/10636-8). Agradecemos também à Dupont/Genencor International Inc. pela doação de enzimas.

Referências

BATISTOTE, M., SANTOS, M. S. M. Analysis of fermentative parameters and the importance of *Saccharomyces cerevisiae* in the development of goods and services. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 11, p. e93691110586, 2020.

BELLISSIMI, E. *et al.* Effects of acetic acid on the kinetics of xylose fermentation by an engineered, xylose-isomerase-based *Saccharomyces cerevisiae* strain. **Federation of European Microbiological Societies Yeast Research**, v. 9, n. 3, p. 358-364, 2009.

BOFO, D. C. S. **Reologia de fluidos envolvidos no processo de obtenção de bioetanol**. 2015. 170 f. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2015.

GARRETT-PELTIER, H. Green vers Green versus brown: Comparing the employment impacts of energy efficiency, renewable energy, and fossil fuels using an input-output model. **Economic Modelling**, v. 61, n. 2, p. 439-447, 2016.

GOLDEMBERG, J.; NIGRO, F. E. B.; COELHO, S. T. **Bioenergia no estado de São Paulo: situação atual, perspectivas, barreiras e propostas**. 1. Ed. São Paulo: Imprensa Oficial do Estado de São Paulo, 2008. 152 p.

LANGE, H., TAILLANDIER, P., RIBA, J.P. Effect of high shear stress on microbial viability. **Journal of Chemical**

Technology and Biotechnology, v. 76, n. 5, p. 501-505, 2001.

MADIGAN, M. T. *et al.* **Brock Biology of Microorganisms**, Ed. Pearson, 2016.

NIELSEN, F. **Process development for combined pentose and hexose fermentation**. 2016. 203 f. Doctoral Dissertation - Lund University, Sweden, 2016.

RAMOS, M. D. N. *et al.* Development of a protocol for commercial baker yeast propagation aiming its application in bioprocesses. **In: Advances in renewable and clean energy Technologies**, 2022, Itajubá.

ROBAK, K., BALCEREK, M. Review of second-generation bioethanol production from residual biomass. **Food Technology & Biotechnology**, v. 56, n. 2, p. 174-187, 2018.

SILVA, C. R. *et al.* An innovative biocatalyst for production of ethanol from xylose in a continuous bioreactor. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 50, n. 1, p. 35-42, 2012.

STODDART, M. J. Cell viability assays: Introduction, Mammalian Cell Viability. **Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology**, v. 740, n. 1, p. 1-6, 2011.

THÉODORE, K., PANDA, T. Application of response surface methodology to evaluate the influence of temperature and initial pH on the production of β -1,3-glucanase and carboxymethylcellulase from *Trichoderma harzianum*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 17, n. 1, p. 1043-1049, 1995.

THOMAS, C. R. Shear effects on cells in bioreactors, **In: SHAMLOU, P. A. (ed), Processing of Solid-Liquid**, Butterworth-Heinemann Ltd, v. 1., n. 1, p. 158-191, 1993.

VRANÁ, D., SEICHERT, L. Cytomorphological comparison of mechanical and chemical defoaming of a yeast culture. **Folia Microbiological**, v. 33, n. 1, p. 144-147, 1988.

ZHAO, X. Q., BAI, F. W. Mechanisms of yeast stress tolerance and its manipulation for efficient fuel ethanol production. **Journal of Biotechnology**, v. 144, n. 1, p. 23-30, 2009.