

### ESTUDO DA FERMENTAÇÃO SUBMERSA NÃO AERADA POR *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* PARA DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS DE CONSUMO DE GLICOSE E PRODUÇÃO DE GLICEROL E ETANOL

Maria Elisa Marciano Martinez<sup>(1)</sup>, e-mail: melisa@inpi.gov.br

Patricia Carvalho dos Reis<sup>(1)</sup>, e-mail: pcreis@inpi.gov.br

Douglas Alves Santos<sup>(1)</sup>, e-mail: dsaints@inpi.gov.br

Willibaldo Schmidell Netto<sup>(2)</sup>, e-mail: wschmidell@enq.ufsc.br

(1) Diretoria de Patentes – Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI)

Rua Mayrink Veiga, nº 9 (19º andar) - Centro - Rio de Janeiro/RJ - 20090-910

(2) Universidade Federal de Santa Catarina

Campus Universitário: Trindade - Caixa Postal:476 – Florianópolis/SC - 88010-970

**Resumo:** Um estudo da fermentação submersa não aerada por *Saccharomyces cerevisiae* foi realizado avaliando a influência do pH nos coeficientes: (I) da equação de Pirt; e, (II) do modelo de Garden. Nos ensaios realizados, o aumento do pH retardou o consumo da glicose, e, o crescimento celular e a produção de etanol diminuíram com o aumento do pH de 4,5 para 8,0. Especificamente, em relação ao etanol, os elevados valores de coeficiente associado ao crescimento em relação ao coeficiente não associados ao crescimento indicam produção associada ao crescimento. Entretanto, para a produção máxima de glicerol houve uma queda nos valores de coeficiente associado ao crescimento e um aumento nos valores de coeficiente não associado ao crescimento. O consumo de glicose para manutenção celular foi significativo ( $0,2g_{\text{glicose}}/(g_{\text{celula}} \cdot h)$ ) para pH 7,0 e 7,5, onde houve a maior produção de glicerol. Como conclusão foi possível observar a existência de uma relação entre o stress salino e osmótico no metabolismo da *Saccharomyces cerevisiae* através do aumento do consumo de glicose para manutenção celular, e a desassociação da produção do glicerol ao crescimento celular, indicando o acúmulo de glicerol intra e extra celular.

**Palavras-Chave:** fermentação, parâmetros, glicerol, etanol, *Saccharomyces cerevisiae*.

**Abstract:** A study of non-aerated submerged fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* was carried out evaluating the effect of pH on the coefficients: (I) of Pirt equation; and (II) of Garden model. In the tests performed, increasing the pH slowed glucose consumption, and, cell growth and ethanol production decreased with increasing pH from 4.5 to 8.0. Specifically, with regard to ethanol, the high coefficient values associated with the growth from the non-associated growth factor production associated indicate growth. However, for maximum production of glycerol there was a decrease in the coefficient values associated with growth and an increase in coefficient values not associated with the growth. Glucose consumption for cellular maintenance was significant ( $0,2g_{\text{glucose}} / (g_{\text{cell}} \cdot h)$ ) to pH 7.0 and 7.5, where there was a greater production of glycerol. In conclusion it was possible to observe the existence of a relationship between the saline and osmotic stress in the metabolism of *Saccharomyces cerevisiae* by increasing the maintaining glucose consumption, and glycerol production disassociation cell growth, indicating the intra and extracellular glycerol accumulation.

**Keywords:** fermentation, parameters, glycerol, ethanol, *Saccharomyces cerevisiae*.

## INTRODUÇÃO

A produção de glicerol é fundamental para o microrganismo, pois regenera o NAD<sup>+</sup>, recicla o fosfato inorgânico, protege contra choque osmótico e seu precursor (glicerol-3-fosfato) é um intermediário essencial na síntese de lipídios de membranas [1].

Durante o crescimento, a célula produz e excreta substâncias que abaixam o pH do meio, gerando assim a necessidade, em fermentações realizadas em pH elevado, de adicionar soluções básicas para neutralizar as substâncias excretadas pela célula, acarretando um acúmulo de sais no meio. Na literatura, este acúmulo é denominado “stress” salino, e seus efeitos são: toxicidade de íons intracelulares e “stress” osmótico (variação da pressão de turgor, ou seja, pressão exercida na parede celular e perda de água). As leveduras respondem ao “stress” salino sintetizando substâncias osmolíticas e pela exclusão do íon sódio através da bomba sódio/potássio [2]. Por exemplo, o *Saccharomyces cerevisiae* acumula glicerol (intracelular) em resposta ao “stress” osmótico [3] [4].

A produção e o acúmulo intracelular de glicerol é uma resposta fisiológica ao “stress” osmótico. O glicerol serve como soluto compatível no controle da pressão osmótica do citoplasma em relação ao meio. Em leveduras osmotolerantes a relação entre a concentração de glicerol intra/extra celular pode chegar a 10, indicando uma grande capacidade para manter o glicerol intracelular [1].

O glicerol produzido por leveduras pode passar pela membrana citoplasmática, ser reutilizado como fonte de carbono ou acumulado como osmoprotetor [1]. A conversão de glicerol é influenciada

pela alcalinidade do meio e no seu valor ótimo pode atingir a conversão de 20 a 25% do açúcar a glicerol [5].

O “stress” salino, induzido com adição cloreto de sódio no meio de cultura do *Saccharomyces cerevisiae*, resulta num decréscimo da concentração intracelular do íon potássio e um aumento na concentração intracelular do íon sódio. No entanto, a quantidade total de íons não é suficiente para balancear a pressão osmótica com o meio, sendo necessária a produção de glicerol [6].

Segundo Bellinger [7], o cultivo de *Saccharomyces cerevisiae* em meio contendo 1,5M de cloreto de sódio resulta num aumento na concentração de glicerol intracelular em 50 vezes e na extra celular em 9 vezes.

A célula gasta uma parcela do substrato para se manter viável, ou seja para síntese de ácidos nucleicos, proteínas e constituintes celulares, bem como, para manter o gradiente de concentração interior/exterior. A equação que considera esta parcela é a equação devida a Pirt [8], ou seja:

$$\mu_s = \frac{1}{Y_G} \mu_{ATM} \quad \text{Equação 1}$$

Segundo o modelo proposto por Gaden [9] a formação de produtos pode ou não estar associada ao crescimento segundo a equação:

$$\mu_p = \alpha \mu + \beta \quad \text{Equação 2}$$

Neste trabalho foi realizado um estudo da fermentação submersa não aerada por *Saccharomyces cerevisiae*, avaliando a influência do pH nos coeficientes:

- (I) da equação de Pirt: fator conversão verdadeiro ( $Y_G$ ) e velocidade específica de consumo de glicose para manutenção ( $m_s$ ); e,
- (II) do modelo de Garden: fatores de produção associados ( $\alpha$ ) e não associados ( $\beta$ ) ao crescimento, respectivamente tanto para o glicerol quanto para o etanol.

## PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

### Microrganismo

Nos ensaios foi utilizada a levedura *Saccharomyces cerevisiae* isolada do fermento biológico fresco, fermento Fleischmann®.

### Meio de cultivo

Nos ensaios em fermentador, empregou-se o meio de cultivo líquido glicosado [10], com a seguinte composição: 100g/L de glicose; 0,375g/L de  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 1,5g/L de  $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ , 4,5g/L de extrato de levedura, 2,73g/L de uréia e pH aproximado de 4,5.

### *Fermentação*

A fermentação foi realizada em fermentadores Biolafitte® de 15L de capacidade, com volume útil de 10L, equipados com três turbinas “flat-blade” (com quatro pás cada uma) e quatro chicanas. O fermentador dispunha de sondas de medida de pH, temperatura, pressão e oxigênio dissolvido, além dos módulos de controle de agitação (300 rpm), temperatura (30 °C) e pH (conforme o ensaio a ser realizado). O pH foi mantido constante pela adição de NaOH ou HCl.

### *Metodologias analíticas*

As amostras retiradas periodicamente do fermentador eram resfriadas em banho de água e gelo e mensurado o pH. Após filtrado a vácuo, o sedimento era seco em microondas por 15min a 180W e permanecendo mais 15min no dessecador antes de ser pesado e se determinar a concentração celular (X).

O filtrado era dividido em 3 partes. A primeira parte do filtrado era destilada por 4min em destilador de arraste, depois reagida com solução de dicromato de potássio (33,678g K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>; 325mL H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado e 500mL água destilada) por 30min a 60°C, resfriada e medido a transmitância em 600nm e determinado a concentração de etanol (E). A segunda parte do filtrado era utilizada na determinação da concentração de glicose (S) pelo o método enzimático da glicose oxidase implantado em um aparelho Technicon Auto-Analyzer II®. E com a terceira parte do filtrado era determinado a concentração de glicerol (G) com o uso do Kit Merck 1.19706.

### *Cálculo das velocidades específicas de crescimento, consumo de glicose, produção de glicerol e etanol*

Os dados utilizados para o cálculo foram obtidos pela equação polinomial de 4o grau que melhor se ajustava aos dados experimentais. As velocidades específicas, poderiam ter sido calculadas por derivação da equação polinomial, mas foram calculadas segundo as equações do método geométrico de cálculo de derivadas proposto por Le Duy & Zajic [11].

$$\mu_M = \frac{1}{X} \frac{dM}{dt} \quad \text{Equação 3}$$

### *Cálculo do fator de conversão verdadeiro e da velocidade específica de consumo de glicose para manutenção*

Para este calculo foi utilizada a equação 1 onde, foi realizado o ajuste linear dos valores de  $\square_s$  em função de  $\square$ , permitindo a obtenção dos parâmetros Y<sub>G</sub> e m<sub>S</sub>.

### *Cálculo dos fatores de produção associado e não associado ao crescimento*

Para este cálculo foi utilizada a equação 2 onde, foi realizado o ajuste linear dos valores de  $\square_P$  em função de  $\square$ , permitindo a obtenção dos parâmetros  $\square_P$  e  $\square_P$ ; onde P pode ser glicerol ou etanol.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Foram realizados ensaios com aeração em diferentes valores de pH, são estes: 4,5 (FN1); 6,0 (FN2); 6,5 (FN3); 7,0 (FN4); 7,5 (FN5) e 8,0 (FN6).

Nestes experimentos foram obtidos os dados de concentração celular (X), de etanol (E), de glicose (S) e de glicerol (G) em função do tempo, mostrado na Figura 1.

A variação da concentração celular em ensaios não aerados, ao longo do tempo conforme apresentada na Figura 1, foi semelhante para valores de pH entre 4,5 e 6,5, apresentando crescimento menor para valores de pH 7,0 e 8,0. Para pH=7,5, contrariamente ao esperado, foram observados valores surpreendentemente elevados. O aumento do pH favorece o crescimento celular para valores de pH entre 4,5 e 7,0. Já para valores de pH superiores a 7,0 o aumento do valor do pH acarreta uma diminuição no crescimento celular devido a um maior consumo de energia para manter a célula viável.

### FIGURA 1

O perfil do consumo de glicose, Figura 1, foi o mesmo para valores de pH entre 4,5 e 6,5 sendo totalmente consumida entre 16 e 18 horas. Entretanto, para pH entre 7,0 e 8,0 o consumo de glicose foi mais lento terminando entre 26 e 28 horas. Pode-se observar também que o término da fonte de carbono (glicose) coincide com a fase estacionária do crescimento celular. Isto demonstra que o aumento do pH torna o consumo de glicose mais lento.

Em relação ao etanol, sua maior concentração ocorreu a pH 4,5 (cerca de 37g/L) e menor a pH 7,5 e 8,0 (cerca de 27g/L). Com o aumento do pH houve diminuição na produção de etanol. A fase estacionária em relação a produção de etanol ocorreu juntamente com o término da glicose.

Já para o glicerol, a menor concentração foi obtida a pH=4,5 e a maior para valores de pH entre 6,5 e 7,5 (em torno de 16g/L). A fase estacionária em relação a produção de glicerol ocorreu juntamente com o término da glicose .

Para valores de pH 7,0 e 7,5 a fase estacionária de produção de glicerol ocorre posteriormente a fase estacionária do crescimento celular, indicando produção de glicerol parcialmente não associada ao crescimento.

Dos experimentos representados na Figura 1 foram obtidos os seguintes dados: tempo final de fermentação ( $t_f$ ), concentração de células e glicose, inicial e final; tempo máximo ( $t_m$ ), concentração inicial e máxima de glicerol e etanol; apresentados na Tabela 1 e ilustrados na Figura 2.

#### TABELA 1

Os resultados apresentaram tendências de comportamento bem definidas, apesar de terem sido utilizados valores de pH diferentes durante a fermentação, como pode-se observar os valores apresentados na Tabela 1 e na Figura 2. No que se refere ao etanol houve uma clara tendência de declínio com o aumento do pH. Quanto à concentração celular, pode-se dizer que se mantém constante com ligeiro declínio para valores de pH superiores a 6,5. Para o glicerol, a tendência foi aumento na produção de glicerol até pH=7,0-7,5 seguido de declínio a pH=8,0. A produção de etanol caiu de 36,8g/L (pH=4,5) para 26,0g/L (pH=8,0) enquanto que concentração celular caiu de 6,9g/L a 4,2g/L e a produção de glicerol teve seu máximo de 15,9g/L (pH=7,0).

#### FIGURA 2

A partir dos dados da Figura 1 foram calculadas as velocidades específicas de crescimento celular ( $\mu_x$ ), consumo de glicose experimental ( $\mu_s$ ), formação de etanol ( $\mu_E$ ) e glicerol ( $\mu_G$ ) permitindo, assim, obter os valores do fator conversão verdadeiro ( $Y_G$ ), velocidade específica de consumo de glicose para manutenção ( $m_s$ ), fatores de produção associados ( $\alpha$ ) e não associados ( $\beta$ ) ao crescimento, respectivamente, para o glicerol e etanol.

Pode-se observar a tendência linear entre a velocidade específica de crescimento ( $\mu_x$ ) e as velocidades específicas de consumo de glicose ( $\mu_s$ ), produção de glicerol ( $\mu_G$ ) e etanol ( $\mu_E$ ), ilustrada pela Figura 3. Foi realizado o ajuste linear e obtido as equações lineares incorporadas, por exemplo, na Figura 3, permitindo a obtenção dos valores de  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $m_s$  e  $Y_G$  que são mostrados na Tabela 2.

#### FIGURA 3

#### TABELA 2

#### FIGURA 4

#### FIGURA 5

Na Figura 4 observa-se que a produção de etanol e glicerol foi associada ao crescimento, uma vez que  $\mu$  é bem maior que  $\mu_G$ . Exceto para pH 7,0 e 7,5 nos quais  $\mu_G$  é maior que  $\mu$ , concluindo que a produção de glicerol, nestes casos, é não associada ao crescimento.

No que se refere aos parâmetros da equação de Pirt (Equação 1), verifica-se na Figura 5 que para valores de pH entre 7,0 e 8,0 houve um elevado consumo para manutenção, com os valores máximos de 0,6 a 0,7  $\text{g}_{\text{glicose}}/(\text{g}_{\text{célula}}\cdot\text{h})$ . Para valores de pH entre 4,5 e 6,5 o fator de conversão verdadeiro ( $Y_G$ ) foi próximo ao fator de conversão substrato a célula ( $Y_{X/S}$ ), confirmando o baixo consumo para manutenção celular (valores inferiores a 0,2  $\text{g}_{\text{glicose}}/(\text{g}_{\text{célula}}\cdot\text{h})$ ).

## CONCLUSÃO

Nos ensaios realizados em fermentador sem aeração, o aumento do pH retardou o consumo da glicose. Para valores de pH entre 4,5 e 6,5 a glicose foi totalmente consumida em torno 18 horas e para valores de pH entre 7,0 e 8,0 em torno de 26 horas.

De uma forma geral, o crescimento celular e a produção de etanol diminuíram com o aumento do pH de 4,5 para 8,0. Entretanto, a concentração celular atingiu seu menor valor a pH 7,0, no qual houve maior produção de glicerol.

As velocidades específicas de produção de glicerol e crescimento celular são lineares, para cada ensaio em valores de pH 4,5 a 8,0, com exceção do ensaio realizado a pH 7,5. Para os demais valores de pH, a produção de glicerol é parcialmente associada ao crescimento, pois os valores de  $\mu$  e  $\mu_G$  são da mesma ordem de grandeza.

Em relação ao etanol, os elevados valores de  $\mu$  (coeficiente associado ao crescimento) em relação a  $\mu_G$  (coeficientes não associados ao crescimento) indicam produção associada ao crescimento. Já para valores de pH 7,0 e 7,5 (valores para produção máxima de glicerol) houve uma queda nos valores de  $\mu$  e um aumento nos valores de  $\mu_G$ .

O consumo de glicose para manutenção celular foi significativo (0,2  $\text{g}_{\text{glicose}}/(\text{g}_{\text{celula}}\cdot\text{h})$ ) para pH 7,0 e 7,5, onde houve a maior produção de glicerol.

O estudo realizado através da fermentação submersa não aerada por *Saccharomyces cerevisiae* em consequência a determinação dos parâmetros de consumo de glicose e produção de glicerol e etanol mostra que existe uma relação entre o stress salino e osmótico no metabolismo da *Saccharomyces cerevisiae* através do aumento do consumo de glicose para manutenção celular, e a desassociação da produção do glicerol ao crescimento celular, indicando o acúmulo de glicerol intra e extra celular.

## LISTA NOMENCLATURA

E (g/L):	concentração de etanol
G (g/L):	concentração de glicerol
$m_s$ (gS/(gX.h)):	velocidade específica de consumo de glicose para a manutenção
S (g/L):	concentração de glicose
t (h):	tempo
X (g/L):	concentração celular
$Y_G$ (gS/gX):	fator de conversão verdadeiro
$\square$ :	coeficiente de produção de P associado ao crescimento
$\square$ :	coeficiente de produção de P não associado ao crescimento
$\square$ (h-1):	velocidade específica de crescimento celular
$\square$ (h-1):	velocidade específica de crescimento celular
$\square_M$ (gM/(gX.h)):	velocidade específica de variação de M com o tempo
$\square_P$ (gP/(gX.h)):	velocidade específica de produção de P
$\square_s$ (gS/(gX.h)):	velocidade específica de consumo de glicose com o tempo

sub-escrito:

0:	inicial
E:	etanol
f:	final
G:	glicerol
M (g/L):	pode ser concentração celular (X), glicose (S), glicerol (G) e etanol (E)
m:	máximo
P:	pode ser glicerol ou etanol
S:	glicose

## REFERÊNCIAS

- [1] ZIMMERMANN, F.K., Eutian, K.D., et. al.; Yeast Sugar Metabolism; pág. 313-337; 1997.
- [2] GARCÍA, M.J.; Ríos, G.; Ali, R. e Bellis, J.M.; “Comparative physiology of salt tolerance in *Candida tropicalis* and *Saccharomyces cerevisiae*”; Microbiology; vol 143(4); pág 1125-1131; 1997.
- [3] ANDRÉ, L.; Hemming, A. e Adler, L. ; “Osmoregulation in *Saccharomyces cerevisiae*, Studies on the osmotic induction of glycerol production and glycerol 3-phosphate dehydrogenase (NAD<sup>+</sup>)”; FEBS letters; vol 286, no 1,2; pág 13-17; 1991.
- [4] BRUMM, P. J. e Hebeda, R. E. ; “Glycerol Production in Industrial Alcohol Fermentation”; Biotechnology Letters; vol 10; no 9; pág 677-682; 1988.
- [5] VIJAIKISHORE, P. e Karanth, N.G. ; “Glycerol production from glucose in alkaline medium”; Biotechnology Letters; vol 6(2); pág 103-108; 1984.
- [6] SUNDER, S. ; Sengh, A.J.; Gill, S. e Singh, B.; “Regulation of intracellular level of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> and glycerol in *Saccharomyces cerevisiae* under osmotic stress”; Molecular and Cellular Biochemistry; vol 158; pág 121-124; 1996.
- [7] BELLINGER, Y. e Larher, J.; “A <sup>13</sup>C comparative nuclear magnetic resonance study of organic solute production and excretion by the yeasts *Hansenula anomala* and *Saccharomyces cerevisiae* in saline media”; Canadian Journal of Microbiology; vol 34(5), pág 605-612; 1998.
- [8] PIRT, S.J.; “Principles of Microbe and Cell Cltivation”; Blackwell Scientific Publication; 1975.
- [9] AIBA, S., Heimphrey, A.E., Millis, N.F.; “Biochemical Engineering”; Academic Press; 1973.
- [10] ABOUTBOUL, H.; “Estudo cinético da fermentação alcóolica de hidrolisado de farinha de mandioca – modelo matemático para o processo descontínuo”; Tese de Mestrado na Área de Engenharia Química; USP-SP; 1984
- [11] LE DUY and J.E. ZAJIC; A geometrical approach for differentiation of an experimental function: a point applied to growth and product formation; Biotechnol. Bioengng 15, pág. 805–815, 1973

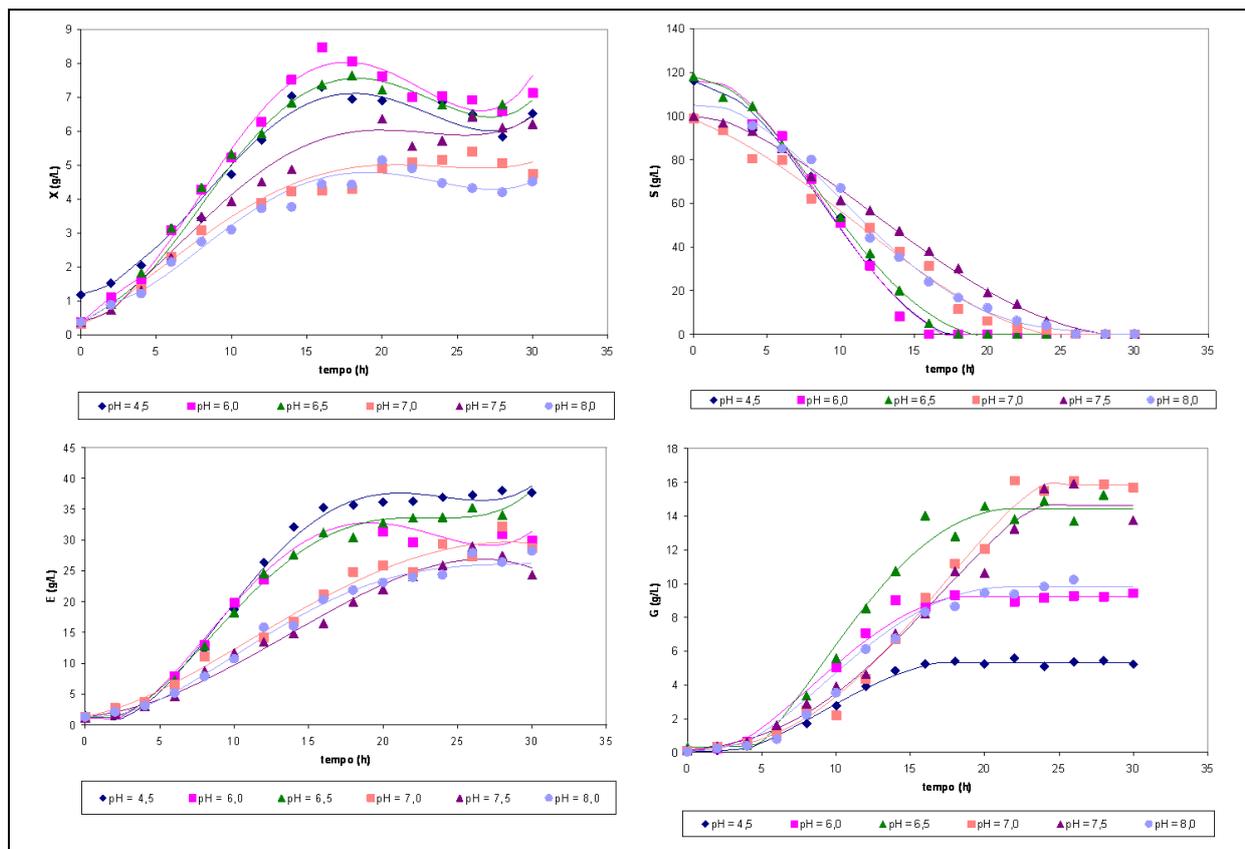


Figura 1: concentração celular (X), de etanol (E), de glicose (S) e de glicerol (G) versus tempo

Tabela 1: Resultados experimentais do tempo final de fermentação, concentração de células e glicose, inicial e final; tempo máximo, concentração inicial e máxima de glicerol e etanol

	pH	$S_0$ (g/L)	$S_f$ (g/L)	$X_0$ (g/L)	$X_f$ (g/L)	$t_f$ (h)	$E_m$ (g/L)	$t_{Em}$ (h)	$G_m$ (g/L)	$t_{Gm}$ (h)
<b>FN1</b>	4,5	116	0	1,18	6,94	18	36,82	16	5,32	16
<b>FN2</b>	6,0	116	0	0,37	8,06	18	32,70	18	9,23	18
<b>FN3</b>	6,5	118	0	0,36	7,64	18	33,70	22	14,43	22
<b>FN4</b>	7,0	99	0	0,32	5,16	24	29,50	26	15,86	22
<b>FN5</b>	7,5	100	0	0,37	6,11	28	26,40	26	14,64	22
<b>FN6</b>	8,0	105	0	0,37	4,20	28	26,00	26	9,80	22

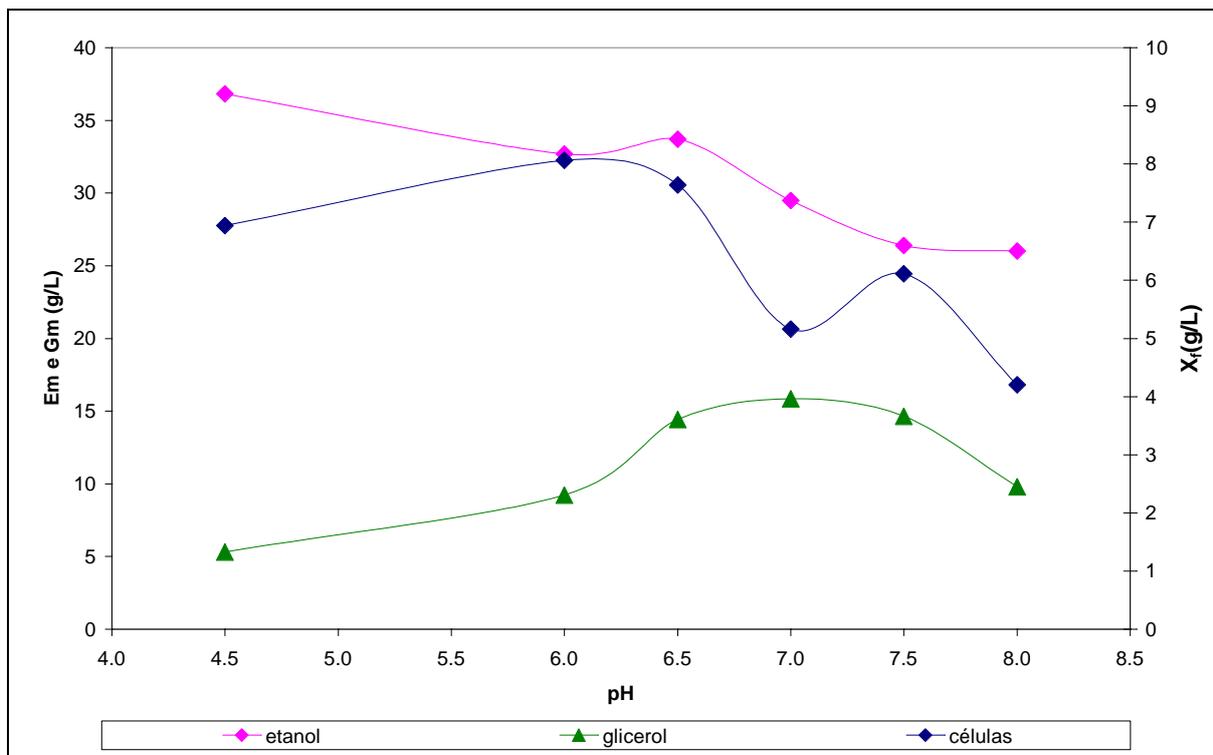


Figura 2: Concentrações máximas obtidas de células ( $X_f$ ), etanol ( $E_m$ ) e glicerol ( $G_m$ ) em função dos valores de pH

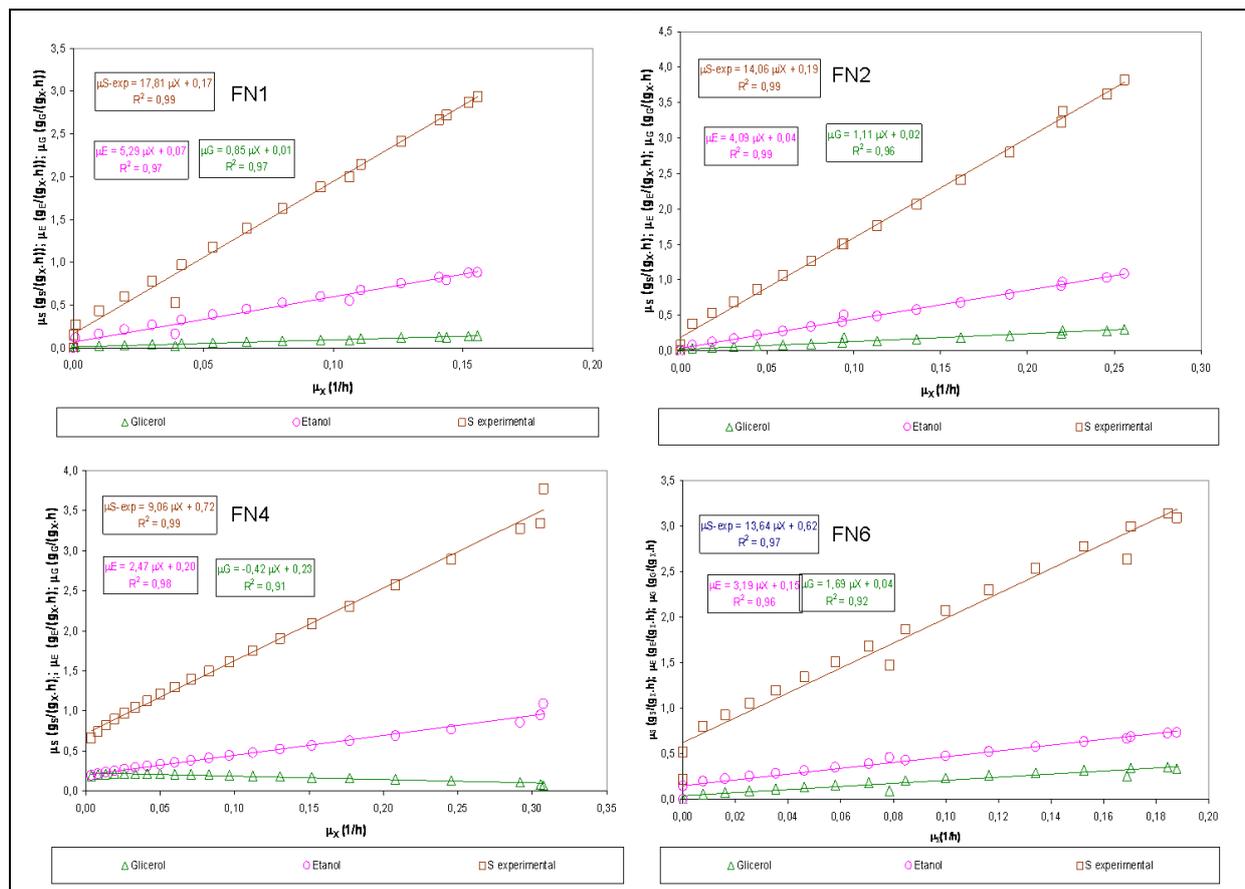


Figura 3: Velocidade específica de consumo de glicose,  $\mu_S$ , (experimental), de produção de etanol ( $\mu_E$ ) e glicerol ( $\mu_G$ ) versus velocidade específica de crescimento celular ( $\mu_X$ ) nos ensaios FN1, FN2, FN4 e FN6.

Tabela 2: Resultados globais dos ensaios não aerados em fermentador (grupo FA)

	$m_s$ experimental	$Y_G$ experimental	R2	$Y_{XS}$ (g/g)	$\beta_E$	$\alpha_E$	R2	$\beta_G$	$\alpha_G$	R2
<b>FN1</b>	0,06	0,17	0,99	0,05	0,07	5,29	0,97	0,01	0,84	0,97
<b>FN2</b>	0,07	0,19	0,99	0,07	0,04	4,09	0,99	0,02	1,11	0,96
<b>FN3</b>	0,07	0,18	0,99	0,06	0,06	3,81	0,99	0,04	1,64	0,98
<b>FN4</b>	0,11	0,72	0,99	0,05	0,2	2,47	0,98	0,23	---	0,91
<b>FN5</b>	0,16	0,62	0,99	0,06	0,21	1,03	0,99	0,16	0	0,02
<b>FN6</b>	0,07	0,62	0,97	0,04	0,15	3,19	0,96	0,04	1,69	0,92

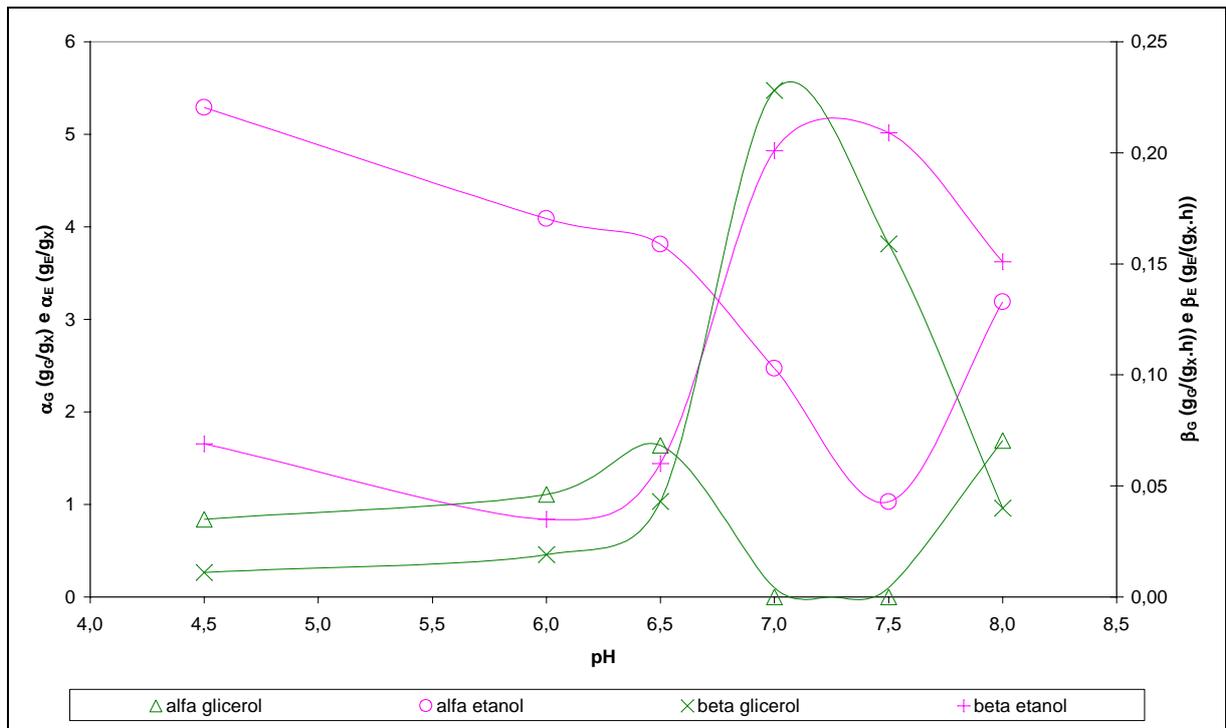


Figura 4: Parâmetros de produção de etanol e glicerol associados ao crescimento (□) e não associados ao crescimento (□) em função do pH

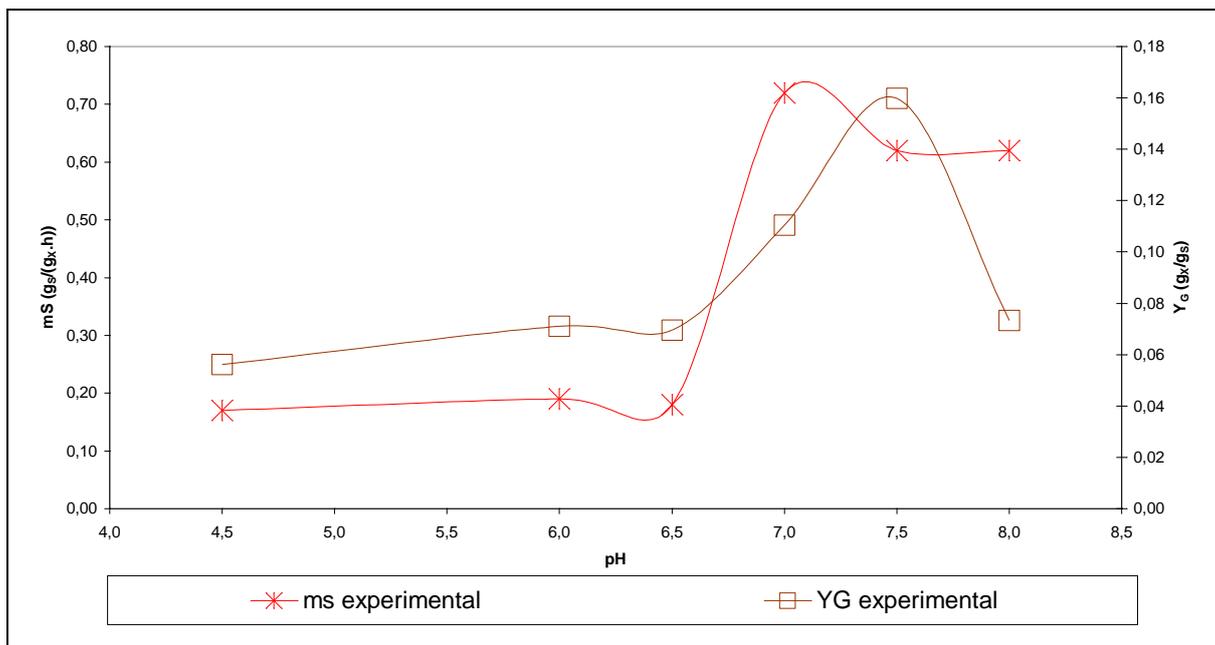


Figura 5: Velocidade específica de consumo de glicose para manutenção ( $m_s$ ) e fator de conversão verdadeiro ( $Y_G$ ) experimental em função do pH