



PQI 5888

Fisiologia e Biotecnologia de Leveduras

Prof. Thiago Basso

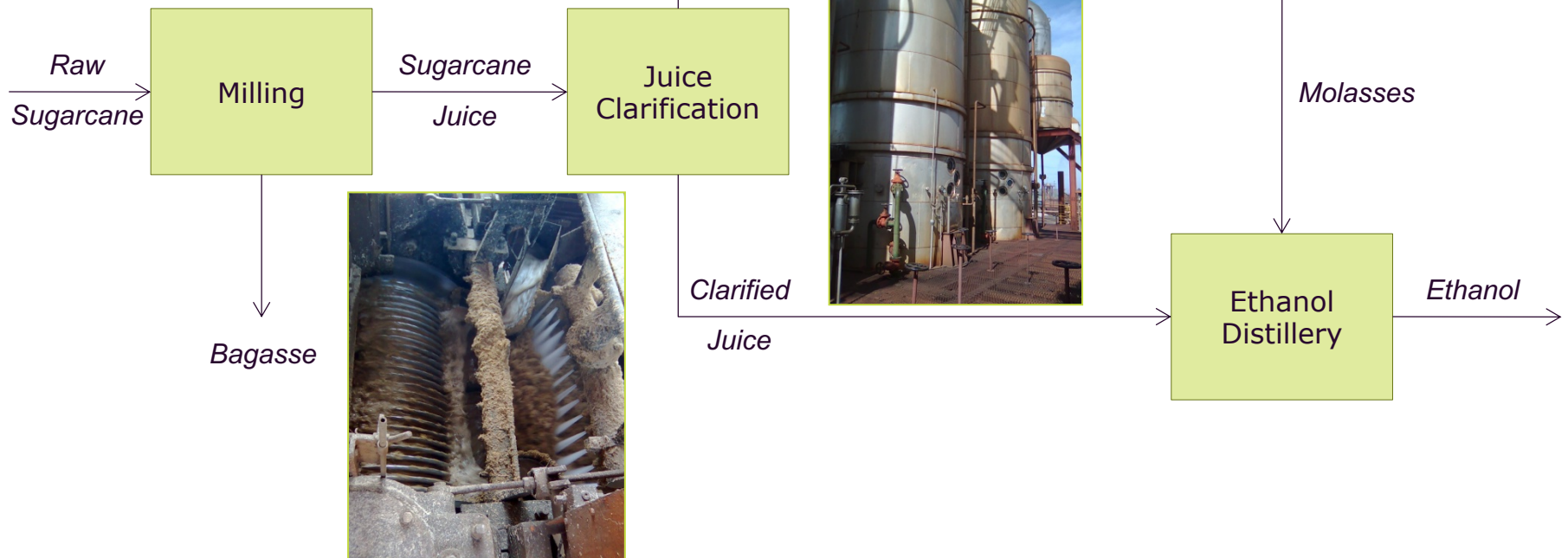
8 de abril de 2020

[Aula 2 EaD]

**Leveduras – Aplicações Industriais
(exemplo de Engenharia Metabólica)**



A indústria sucroalcooleira



FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA

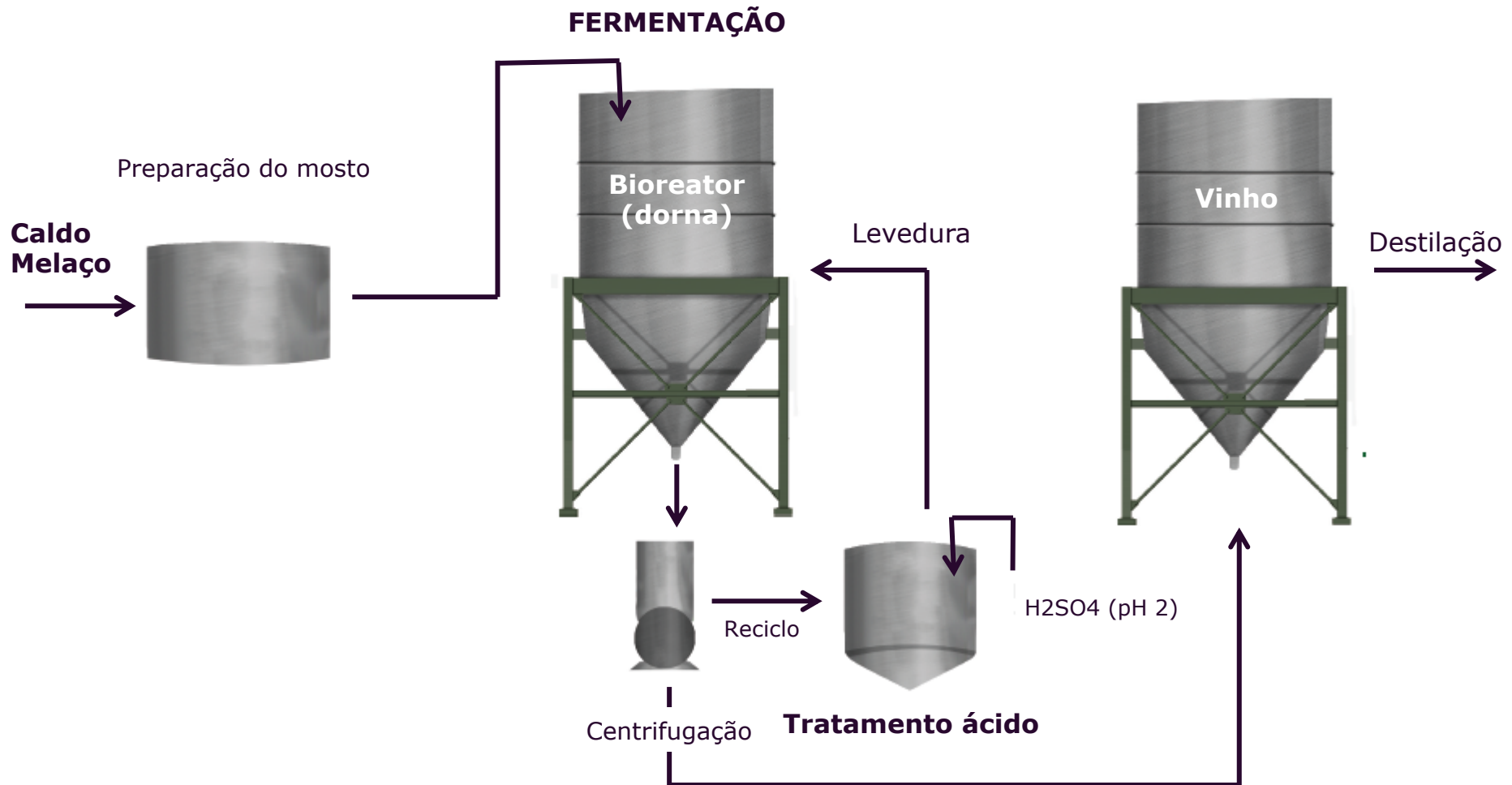


Table 1

Basic parameters adopted in the simulation of the first generation ethanol production plant.

Parameter	Value	Unit
Sugarcane crushing rate	500	TC/h ^a
Days of operation	167	days/year
Sugarcane sugars content	15	wt.%
Sugarcane fiber content	14	wt.%
Sugarcane trash produced in the field	140	kg/TC
Sugars losses on sugarcane cleaning	0.8	kg/TC
Sugars recovery on the mills	96	%
Sugars recovery on juice treatment	99.5	%
Fermentation yield	90	%
Ethanol recovery on distillation and dehydration	99.7	%
2.5 bar steam consumption – azeotropic distillation	1.5	kg/L ^b
6 bar steam consumption – molecular sieves	0.65	kg/L ^b

^a TC: tons of sugarcane.

^b Steam consumption based on the amount of anhydrous ethanol produced.

Produtos da fermentação industrial

Tabela 1.1 — Proporção dos diversos produtos da fermentação alcoólica, em g/100g de glicose metabolizada, de acordo com várias fontes e para diferentes eficiências fermentativas

Produto da fermentação	Pasteur 95%	Jackman, 1987 90—95%	Basso et al. 1996 85—92 %
Etanol	48,5	45,0—49,0	43,0—47,0
Gas carbonico	46,4	43,0—47,0	41,0—45,0
Glicerol	3,3	2,0—5,0	3,0—6,0
Ácido succínico	0,6	0,5—1,5	0,3—1,2
Ácido acético	—	0,0—1,4	0,1—0,7
Óleo fúsel	—	0,2—0,6	—
Butilenoglicol	—	0,2—0,6	—
Biomassa (massa seca)	1,2	0,7—1,7	1,0—2,0

FATORES LIMITANTES DA PRODUTIVIDADE

Alta densidade de células (10-14%) : deficiências minerais-N,P,Mg,Mn,Zn

Fermentação rápida (6-10 h)

Pressão osmótica (sais, açúcar)

Etanol (7-11%)

Acidez ($\text{pH}=1.8-2.5$)

Temperatura ($32 - 40^{\circ}\text{C}$)

Contaminação bacteriana

Sulfito, Alumínio, excesso K, Ca, etc



Engenharia Metabólica

(Exemplo #1 – Estudo Dirigido)

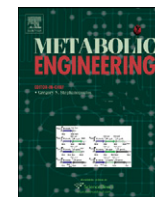
Metabolic Engineering 13 (2011) 694–703



Contents lists available at [SciVerse ScienceDirect](http://SciVerse.ScienceDirect)

Metabolic Engineering

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ymben



Engineering topology and kinetics of sucrose metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* for improved ethanol yield

Thiago O. Basso^{a,b,c,1}, Stefan de Kok^{a,1}, Marcelo Dario^{c,d}, Júlio César A. do Espírito-Santo^d, Gabriela Müller^d, Paulo S. Schlögl^d, Carlos P. Silva^d, Aldo Tonso^b, Jean-Marc Daran^a, Andreas K. Gombert^b, Antonius J.A. van Maris^a, Jack T. Pronk^{a,*}, Boris U. Stambuk^{c,d}

^a Department of Biotechnology, Delft University of Technology and Kluyver Centre for Genomics of Industrial Fermentation, Delft, The Netherlands

^b Department of Chemical Engineering, University of Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil

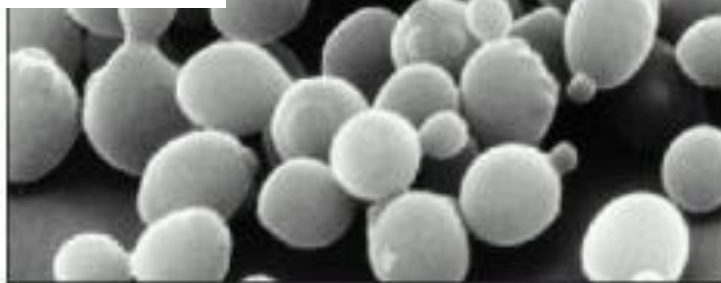
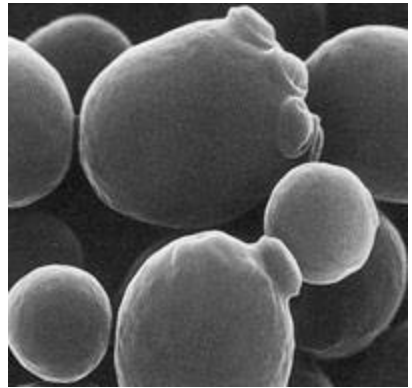
^c PPG Interunidades em Biotecnologia, University of Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil

^d Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianopolis, Brazil

Objetivo

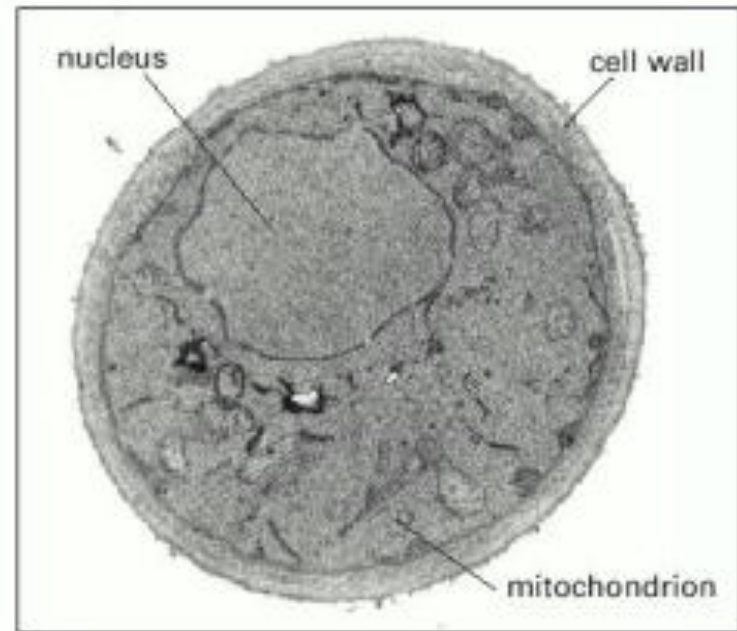
**Aumentar o rendimento em etanol pela
modificação do metabolismo da sacarose
em leveduras**

Levedura (*Saccharomyces cerevisiae*)



(A)

10 μm

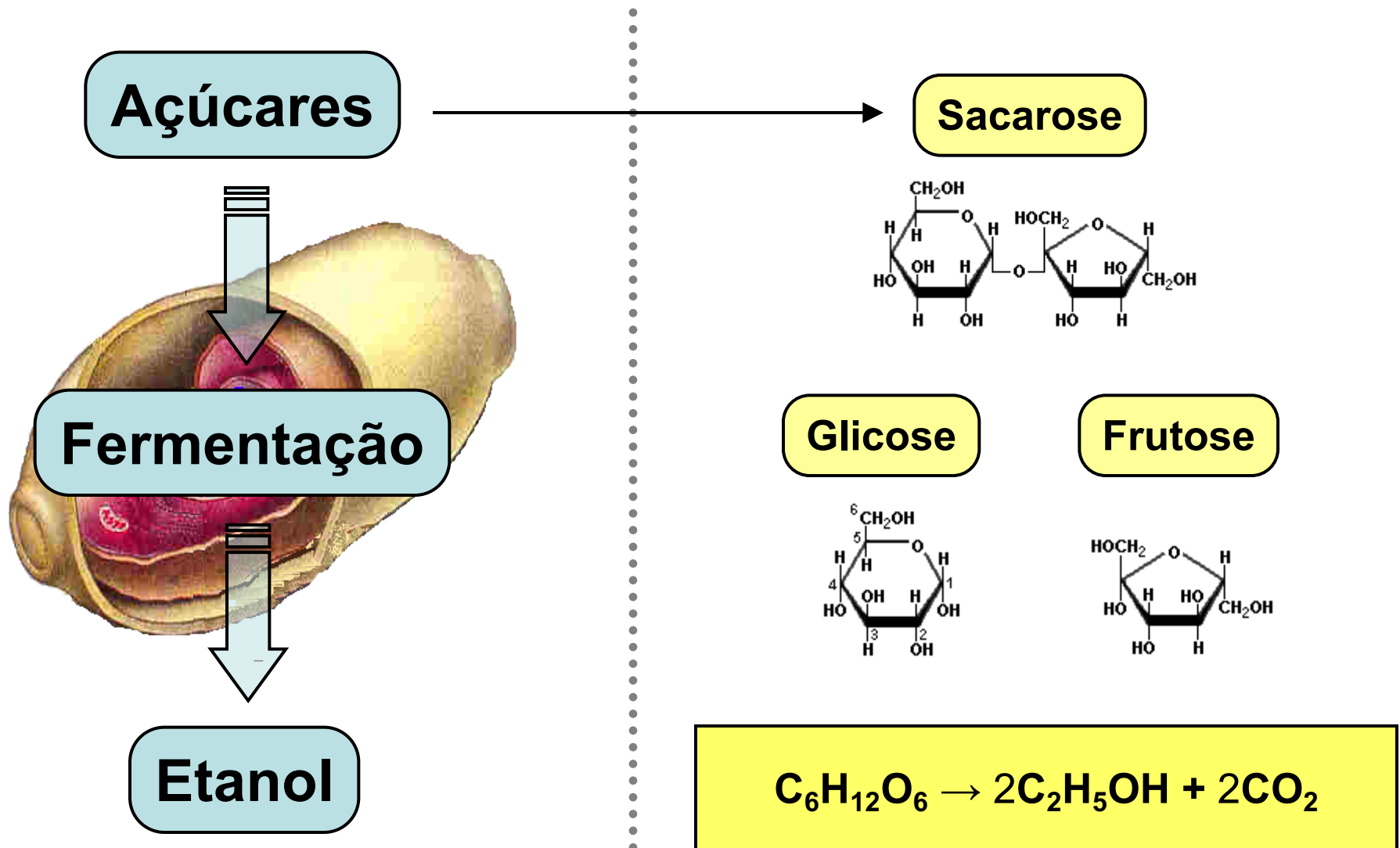


(B)

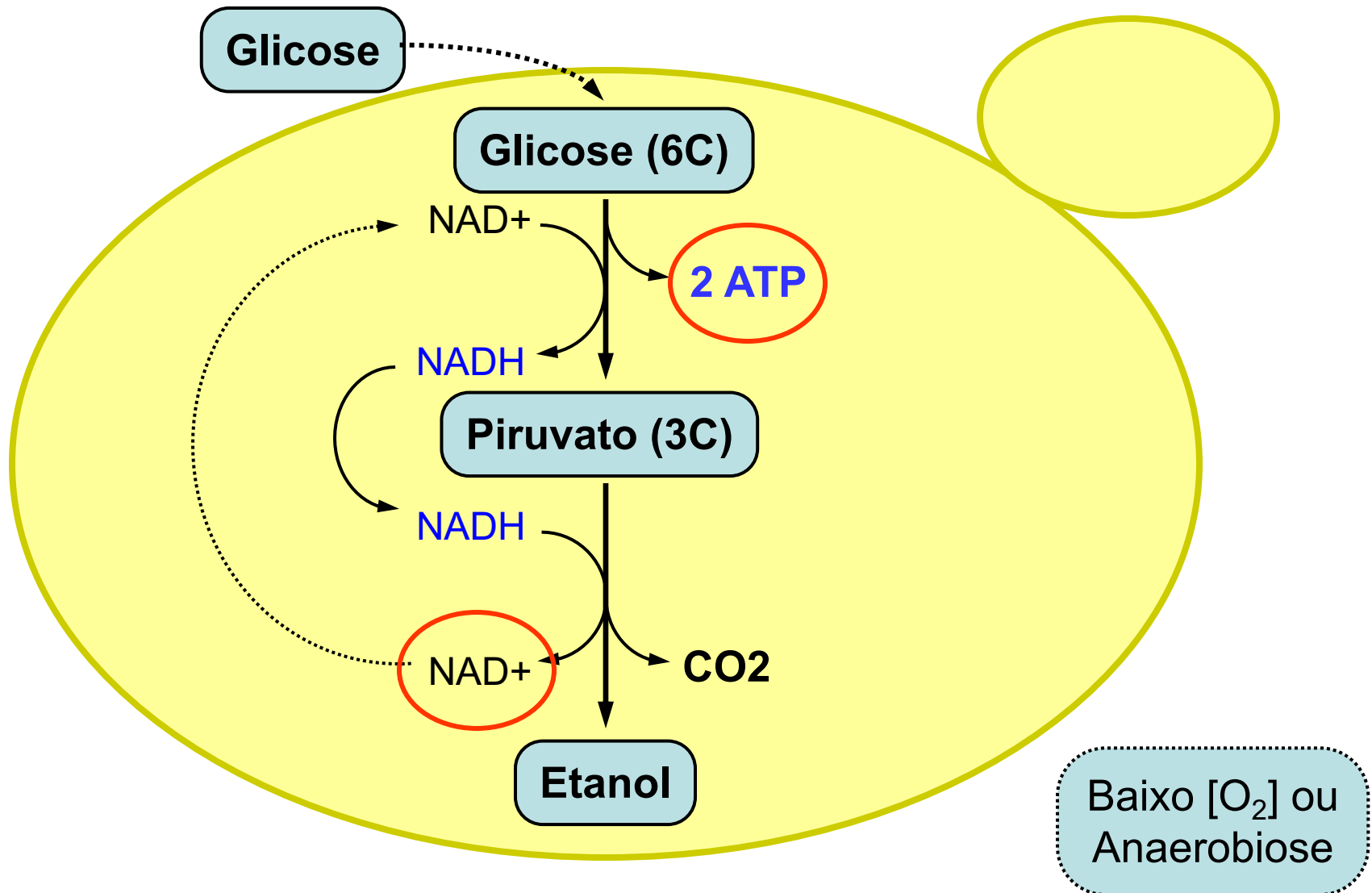
2 μm

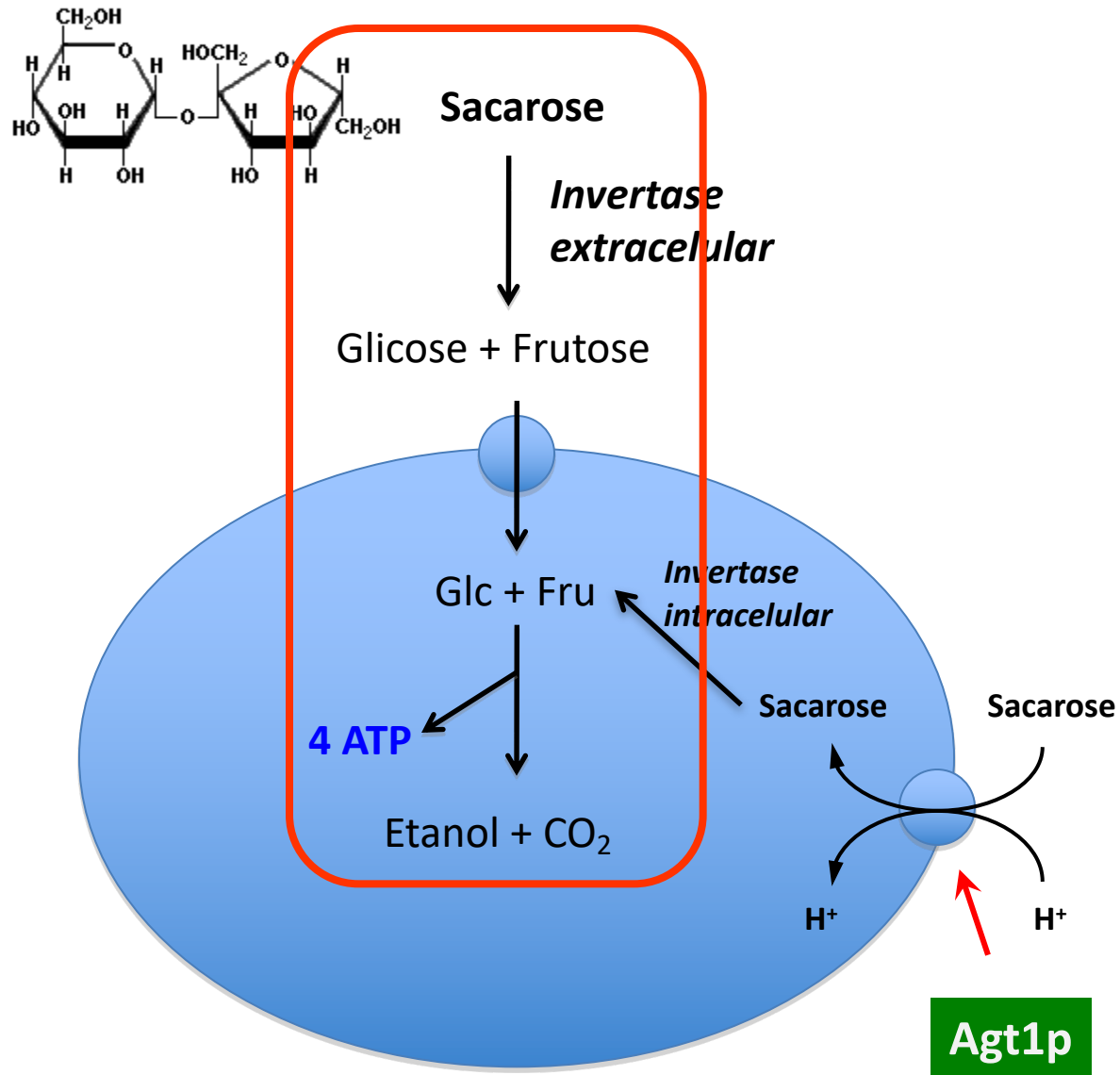


Levedura e a Fermentação Alcoólica



Fermentação Alcoólica

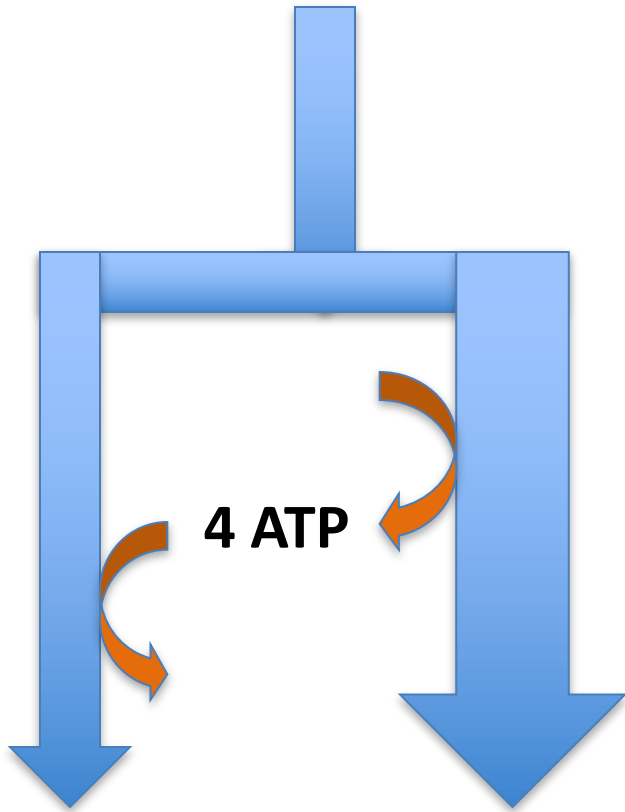




4 ATP para cada sacarose

Invertase extracelular

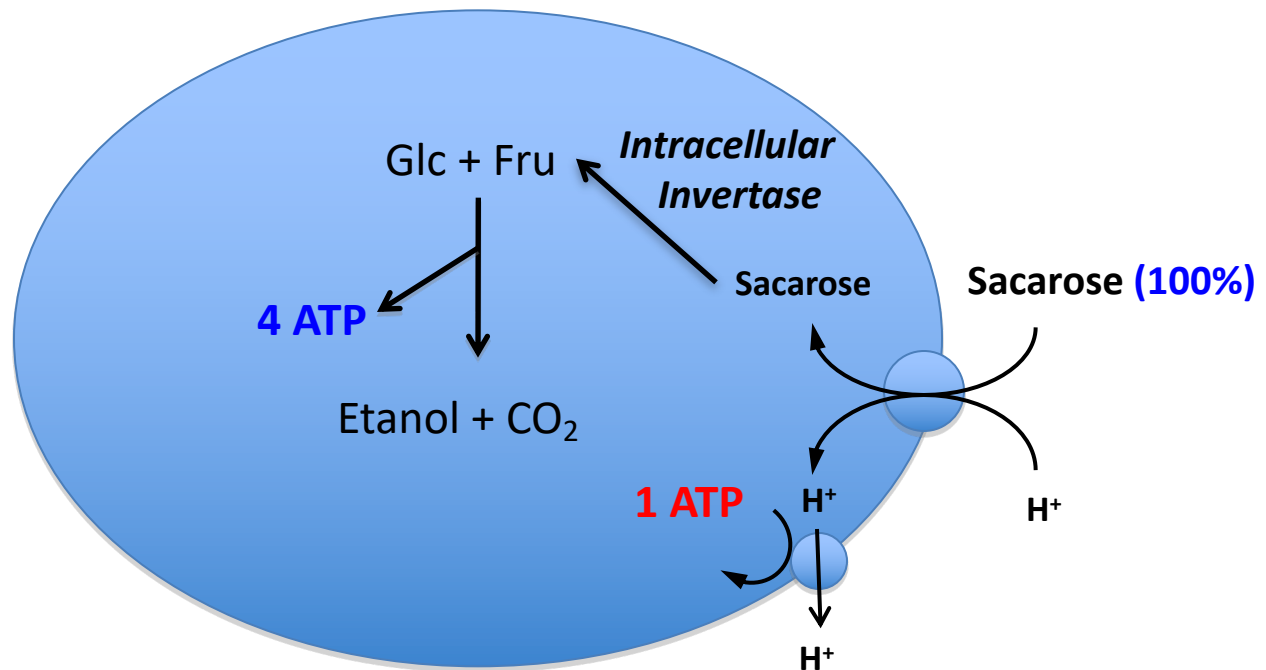
Sacarose



Biomassa

Etanol
CO₂

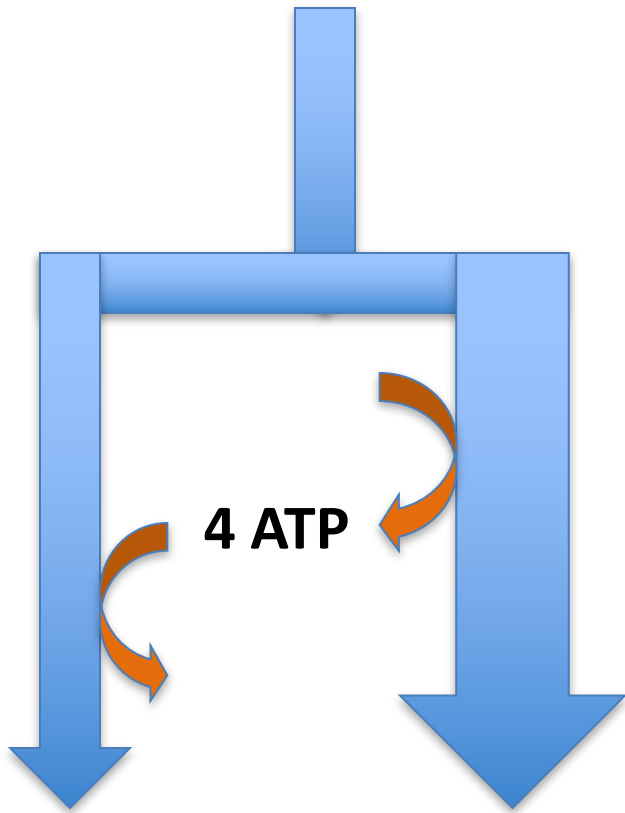
E se...



$$4 \text{ ATP} - 1 \text{ ATP} = 3 \text{ ATP para cada sacarose}$$

Invertase extracelular

Sacarose

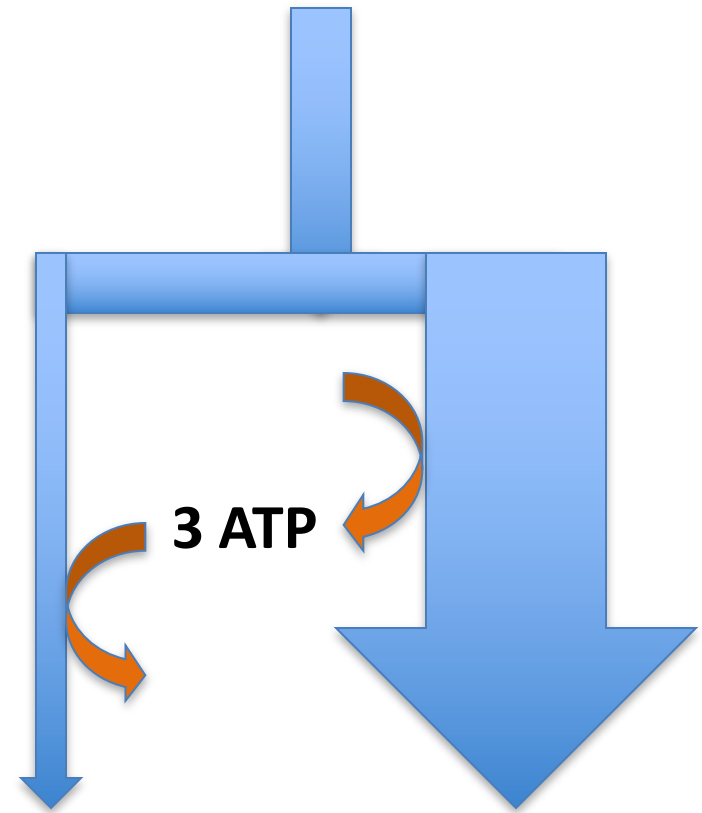


Biomassa

**Etanol
CO₂**

Invertase intracelular

Sacarose



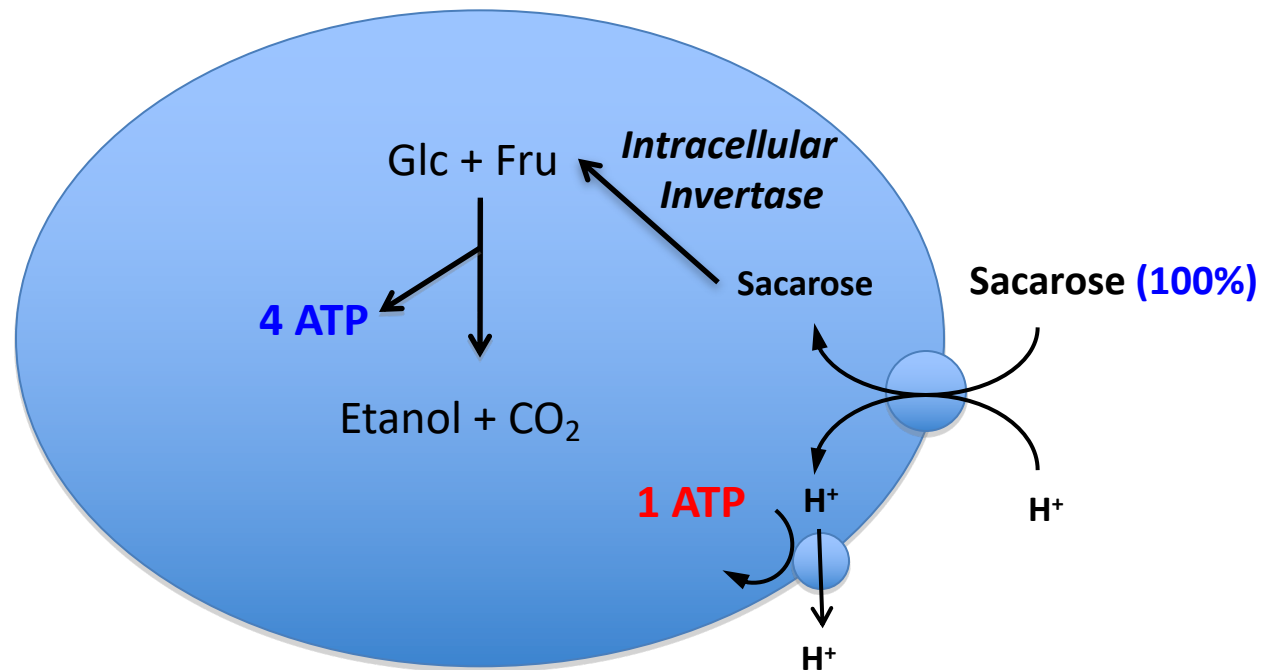
Biomassa

**Etanol
CO₂**

Quanto será o aumento do **rendimento** em etanol sobre sacarose (**Yeth/s**) da linhagem com hidrólise intracelular em relação à situação normal (hidrólise extracelular)?



Hidrólise intracelular da Sacarose



$$4 \text{ ATP} - 1 \text{ ATP} = 3 \text{ ATP para cada sacarose}$$

Previsão dos parâmetros fisiológicos

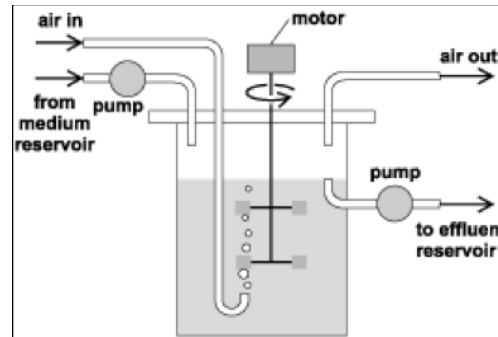
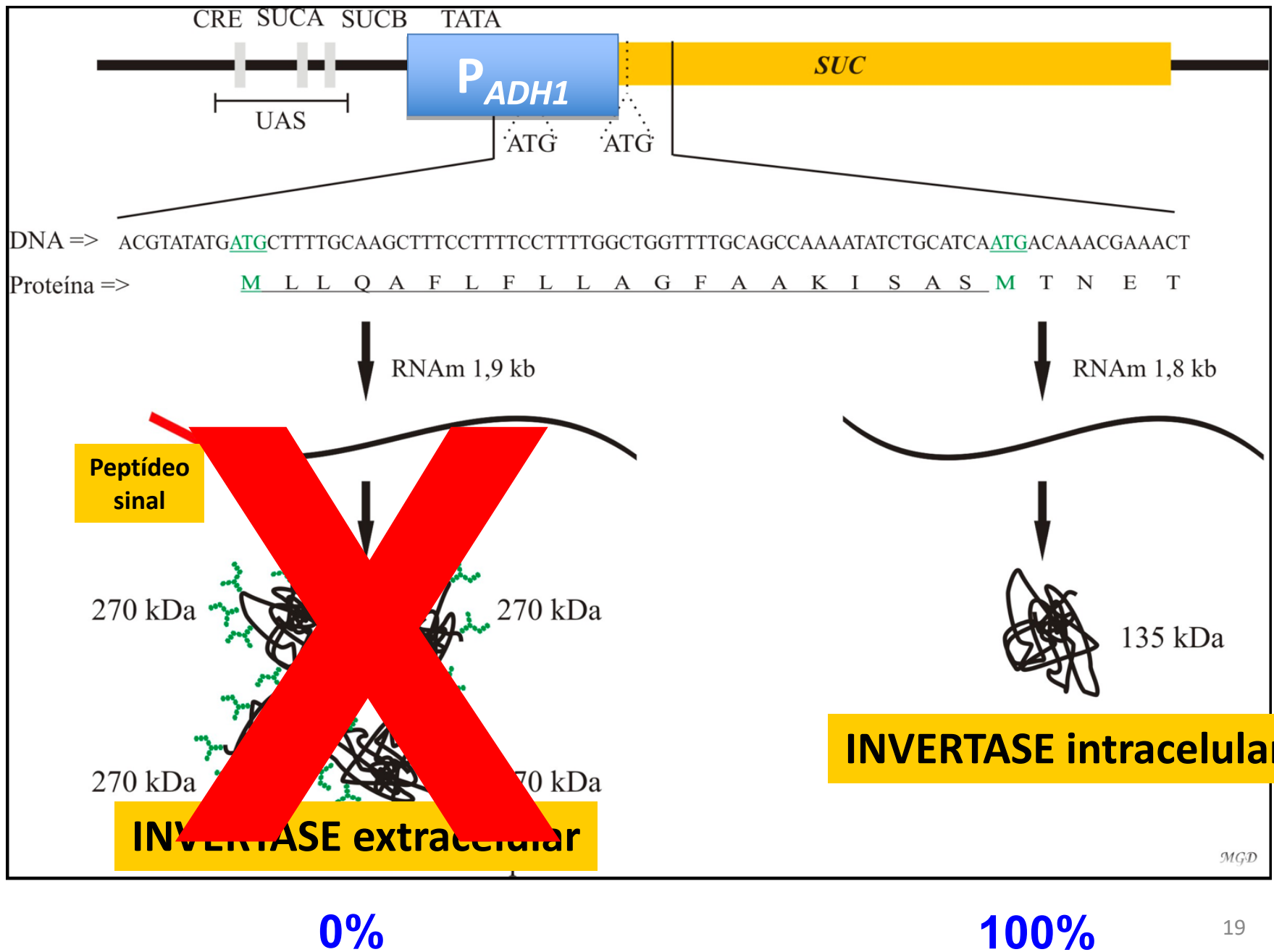
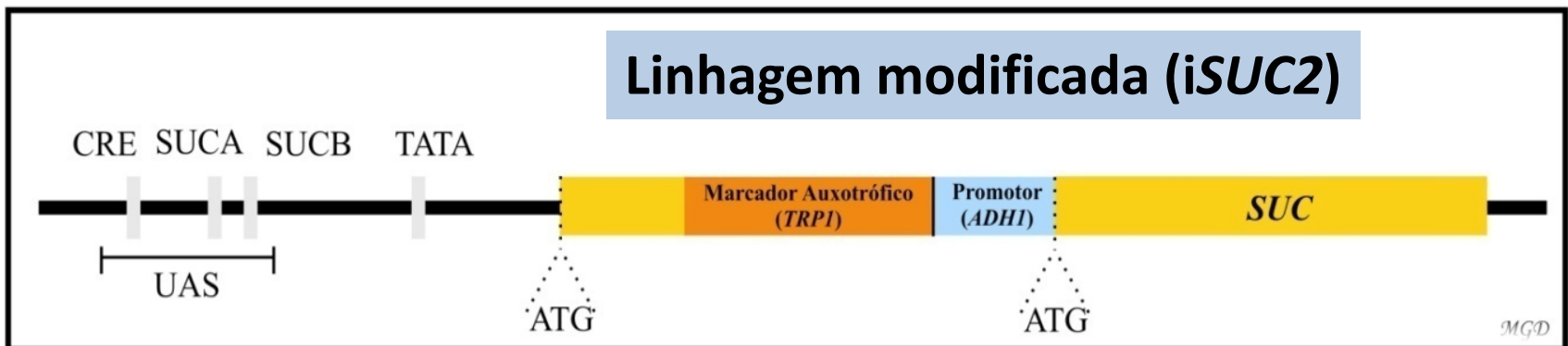
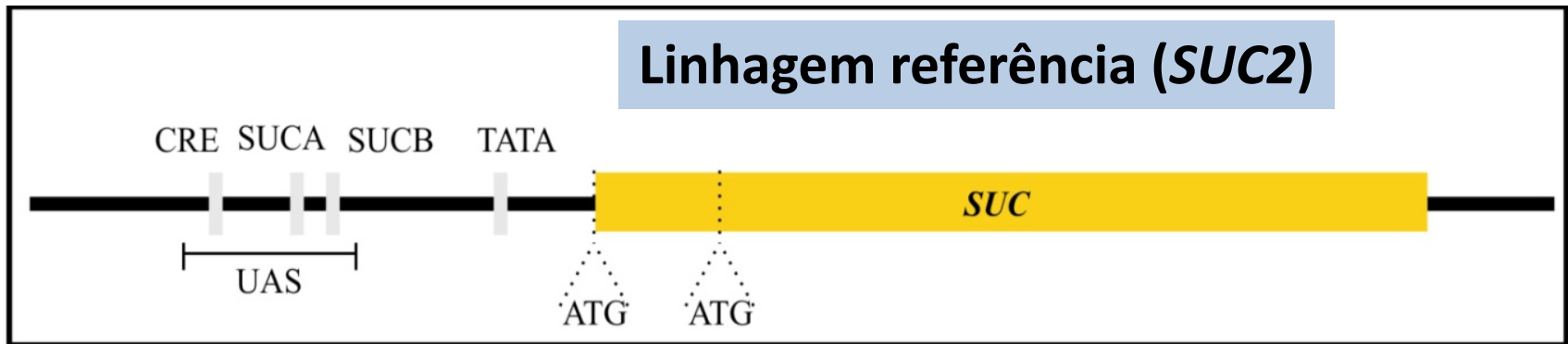


Tabela: Rendimentos teóricos durante cultivo em quimiostato limitado por sacarose em anaerobiose com *S. cerevisiae* a $D = 0,10 \text{ h}^{-1}$.

Rendimento	Modo de consumo de sacarose		Variação
	Invertase Extracelular	Invertase Intracelular	
$Y_{X/S}$ (g DW/g glc eq.)	0,103	0,077	- 25 %
$Y_{ETH/S}$ (g /g glc eq.)	0,39	0,42	+ 8 %

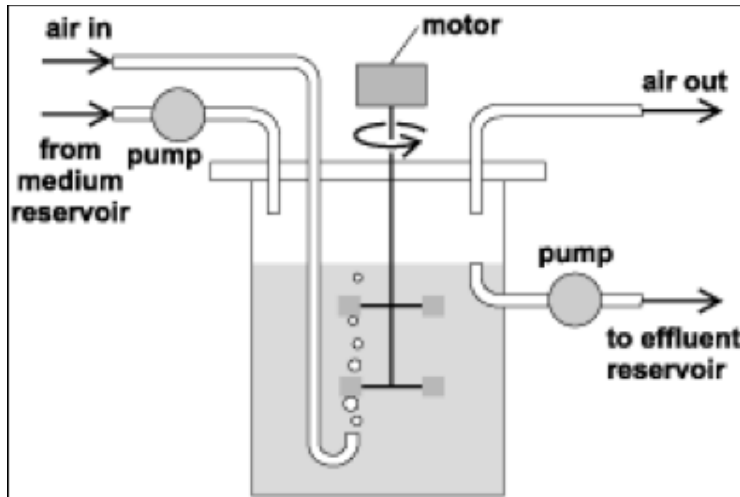


Linhagens utilizadas no estudo



Comparação do metabolismo da sacarose em cultivos contínuos

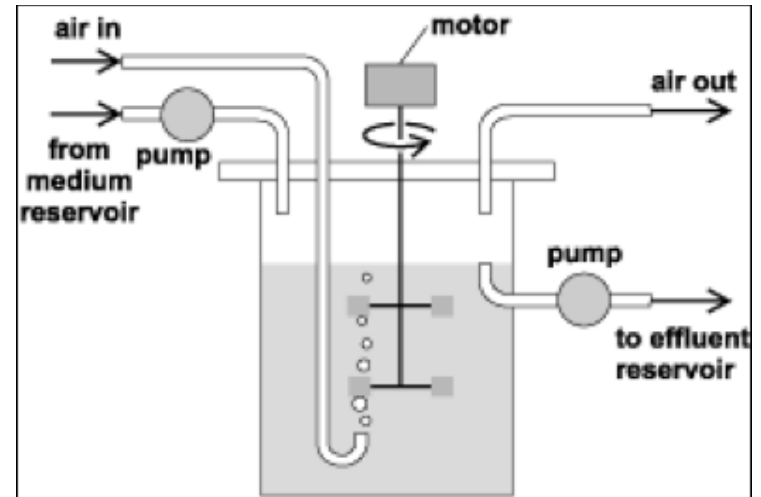
SUC2



*INVERTASE
EXTRACELULAR*

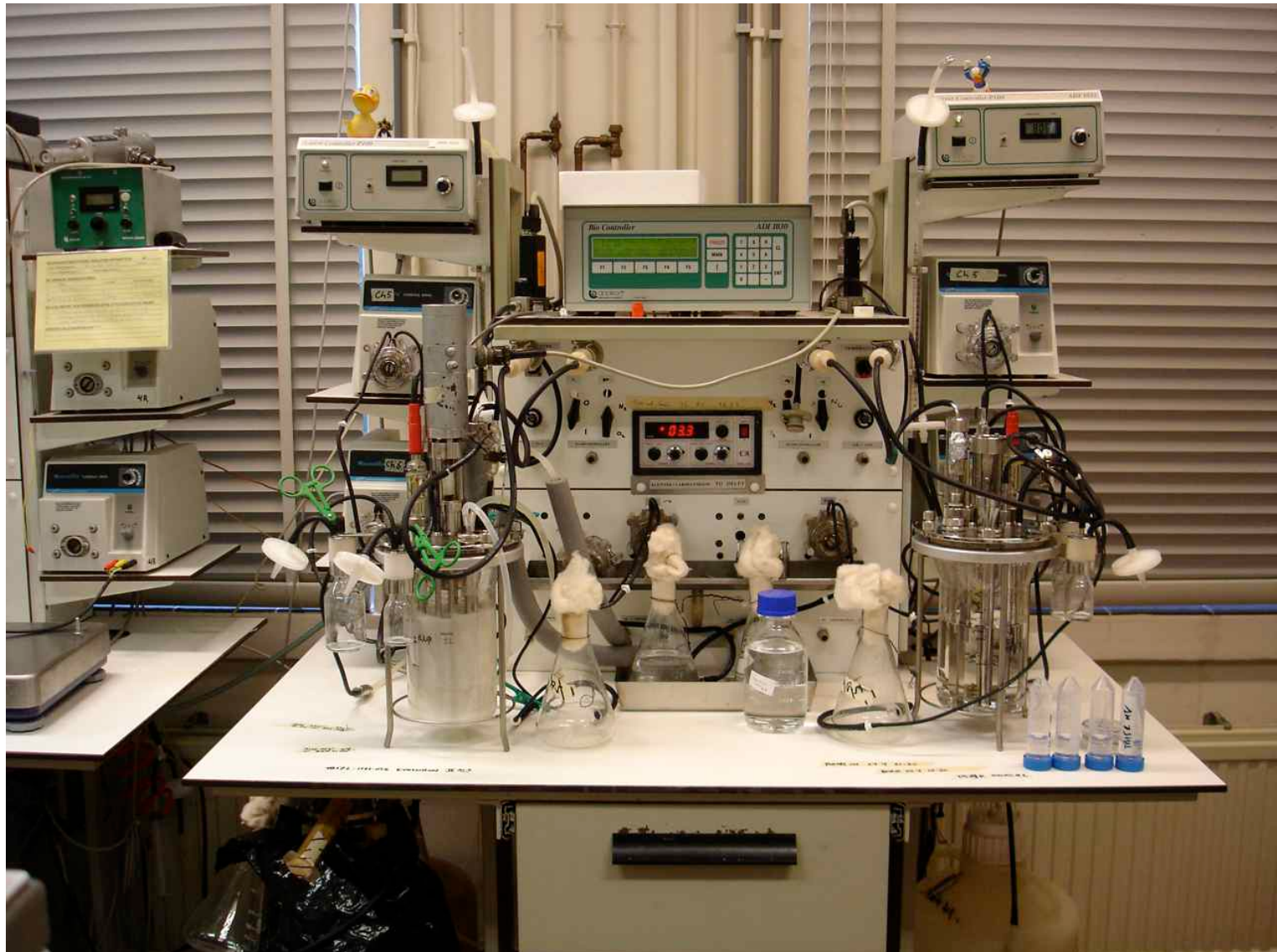
VS.

iSUC2



*INVERTASE
INTRACELULAR*

TU Delft - Applikon



Quimiostato limitado por sacarose em anaerobiose

$D = 0,10 \text{ h}^{-1}$

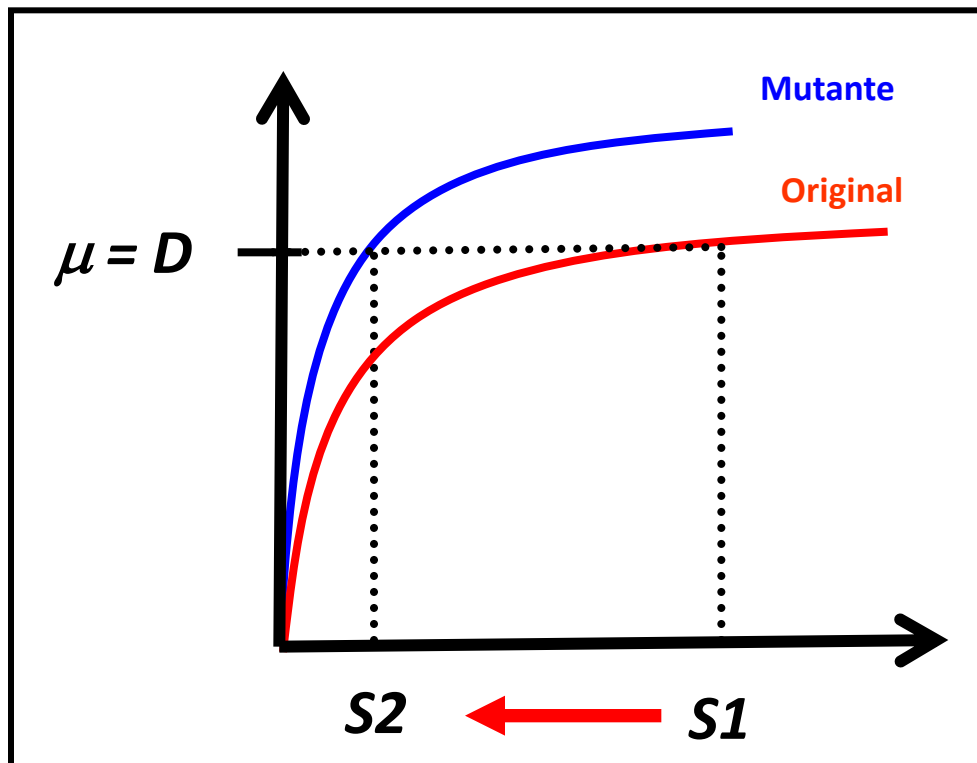
Parâmetros	Linhagens		Comparação	
	<i>SUC2</i>	<i>iSUC2</i>	Observado	Teórico
$Y_{X/S}$ (g.g glc eq, $^{-1}$)	$0,092 \pm 0,001$	$0,088 \pm 0,001$	- 5%	- 25 %
$Y_{ETH/S}$ (g.g glc eq, $^{-1}$)	$0,384 \pm 0,005$	$0,399 \pm 0,002$	+ 4%	+ 8 %
Residual (g.l $^{-1}$)	$0,05 \pm 0$ (glc) $0,11 \pm 0,03$ (fru) $0,00$ (suc)	$0,09 \pm 0,04$ (glc) $0,16 \pm 0,03$ (fru) $1,79 \pm 0,23$ (suc)	---	---

Baixa capacidade de
transporte

Quimiostato como ferramenta para se aumentar o transporte de sacarose

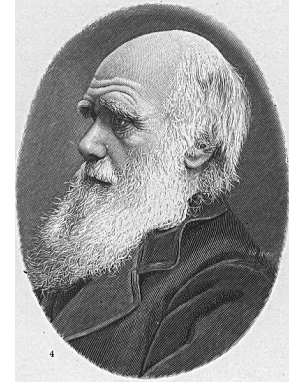
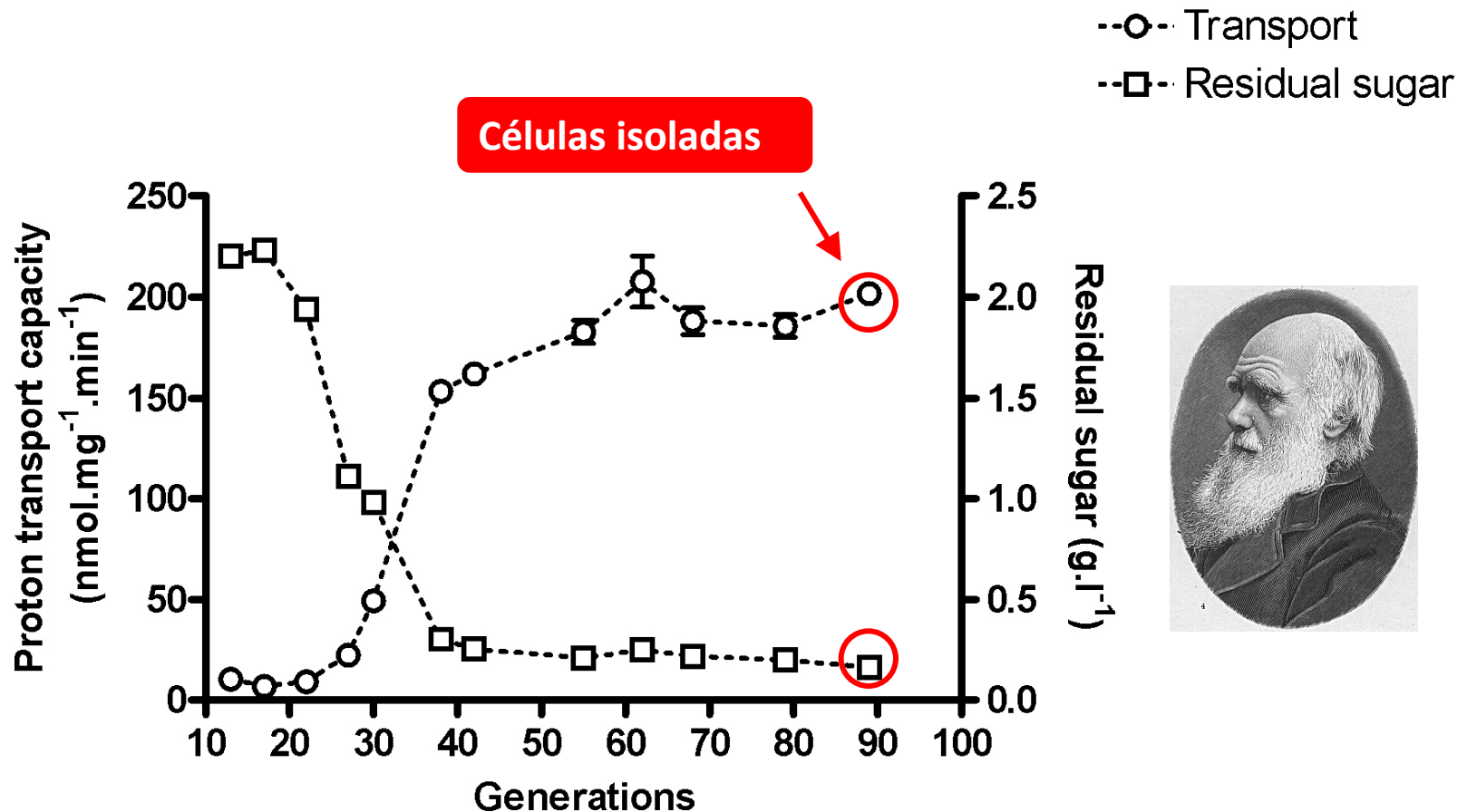
Pressão seletiva favorecendo maior afinidade para o substrato limitante (sacarose)

Qualquer modificação/mutação que leve a uma maior velocidade de crescimento em uma dada concentração de substrato pode resultar numa maior competitividade



Engenharia Evolutiva

(Cultivo contínuo limitado por sacarose)

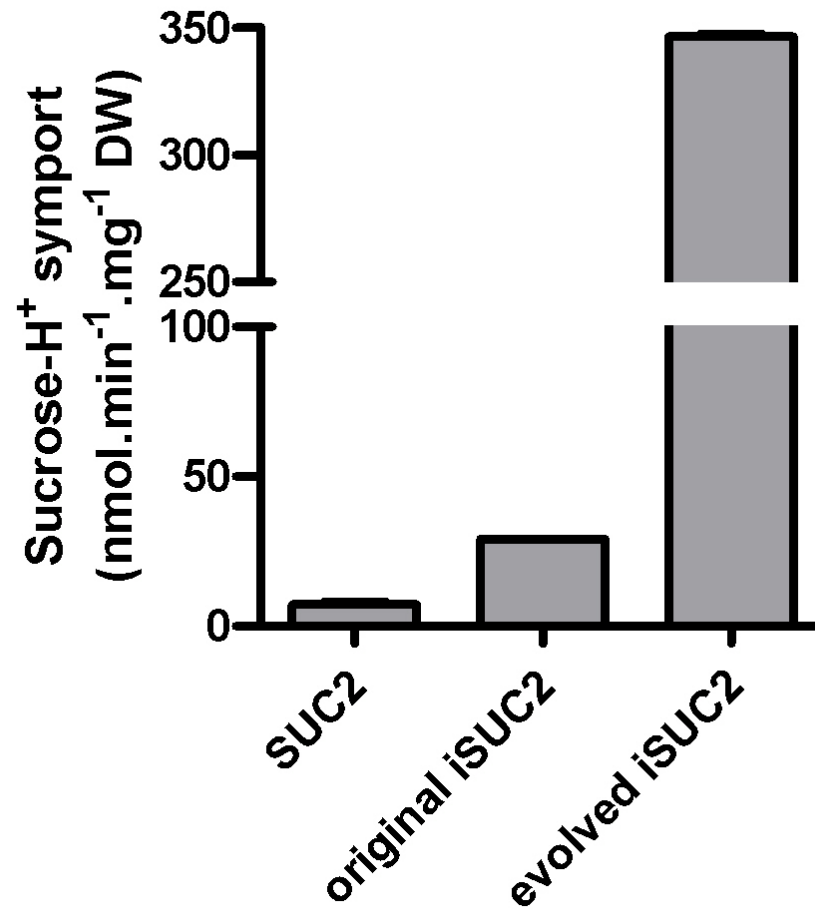


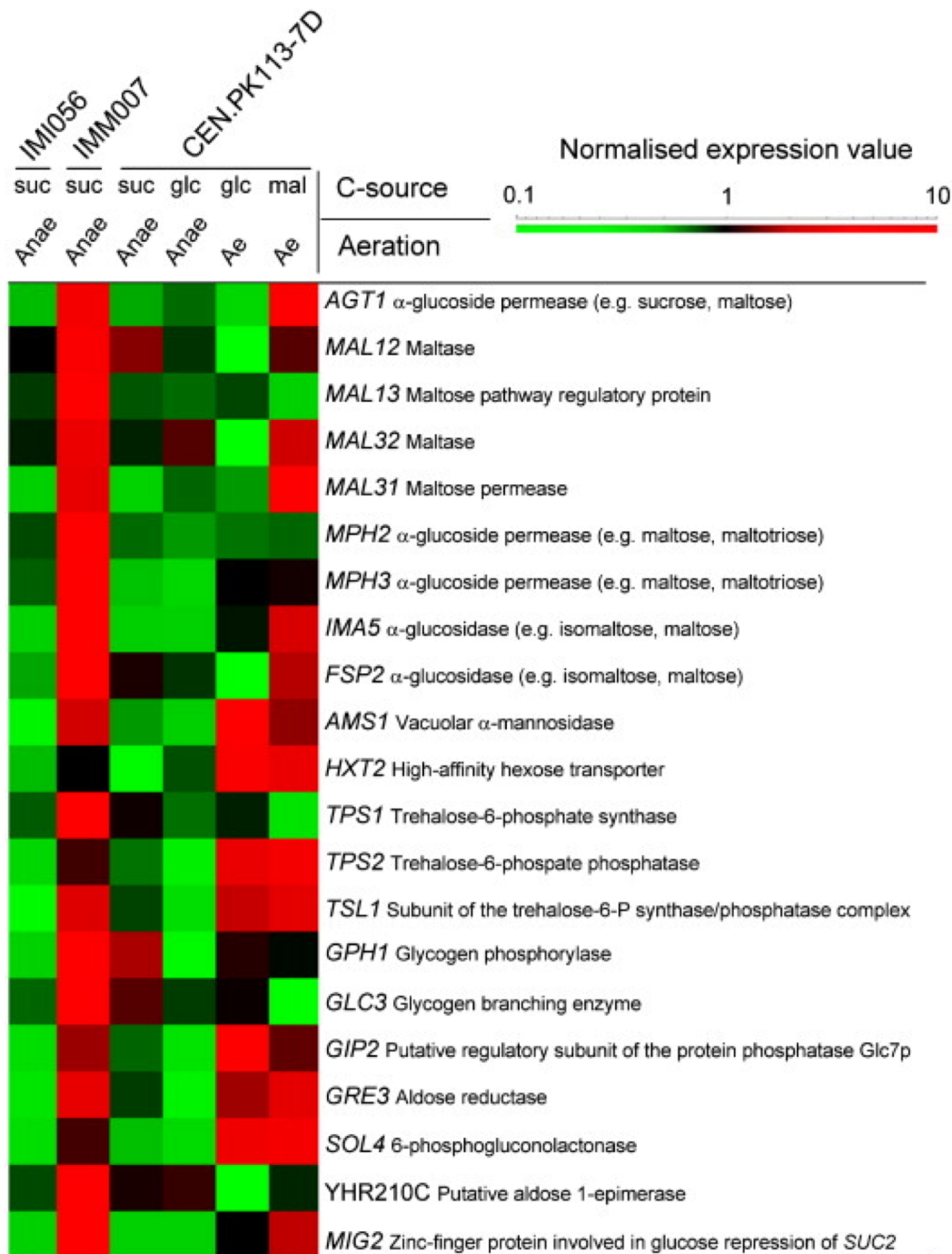
Quimiostato limitado por sacarose em anaerobiose

$D = 0,10 \text{ h}^{-1}$

Parâmetros	Linhagens			Variação	
	<i>SUC2</i> referência	<i>iSUC2</i> original	<i>iSUC2</i> evoluída	Observada	Teorética
$Y_{X/S}$ (g,g glc eq, $^{-1}$)	$0,092 \pm 0,001$	$0,088 \pm 0,001$	$0,066 \pm 0,001$	- 27 %	- 25 %
$Y_{\text{ETHANOL}/S}$ (g,g glc eq, $^{-1}$)	$0,384 \pm 0,005$	$0,399 \pm 0,002$	$0,421 \pm 0,005$	+ 11 %	+ 8 %
Residual sugars (g,l $^{-1}$)	$0,05 \pm 0$ (glc) $0,11 \pm 0,03$ (fru) $0,00$ (suc)	$0,09 \pm 0,04$ (glc) $0,16 \pm 0,03$ (fru) $1,79 \pm 0,23$ (suc)	$< 0,01 \pm 0$ (glc) $0,06 \pm 0$ (fru) $0,08 \pm 0$ (suc)	---	---

O que mudou?





IMI056 = iSUC2
 IMI-007 = iSUC2 evolved
 CEN.PK113-7D = wild type

- ❖ carbohydrate **metabolism** and **transport** were expressed in the evolved strain
- ❖ **9 out of 11** genes involved in **maltose metabolism** showed a strongly increased transcript level in the evolved strain

Conclusões

- Através de uma combinação entre engenharia metabólica e engenharia evolutiva foi possível aumentar em **11% o rendimento em etanol** sobre sacarose