Rodrigo Setem Carvalho
Biólogo

Obtenção de *Saccharomyces cerevisiae* hexokinases-deficientes por cruzamento visando a produção de frutose e etanol à partir de cana-de-açúcar

Orientador:

Prof. Dr. **LUIZ GONZAGA DO PRADO FILHO**

Tese apresentada para obtenção do título de
Doutor em Agronomia. Área de concentração:
Microbiologia Agrícola

PIRACICABA

2006

ERRATA

CARVALHO, R.S. **Obtenção de *Saccharomyces cerevisiae* hexokinases-deficientes por cruzamento visando a produção de frutose e etanol à partir de cana-de-açúcar.** Piracicaba, 2006. 118p. Tese (Doutorado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.

Página	Linha	Onde se lê	Leia-se
17	13	produzir açúcar	extrair açúcar
17	14	produção	extração
22	10	grandiosidade	extensão
36	6	utilizando-se	neste trabalho, utilizando-se
39	31	P-enolpiruvato	fosfo-enolpiruvato
44	11	sobre	sob
61	14	selvagem	comercial
61	20	meios sintéticos	meios complexos: YEP:
64	14	120°C	111°C
65	13	H ₂ PO ₄	H ₃ PO ₄
84	Figura 20	da frutose obtida	do xarope de frutose obtido

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP

Carvalho, Rodrigo Setem

Obtenção de *Saccharomyces cerevisiae* hexokinases-deficientes por cruzamento visando a produção de frutose e etanol à partir de cana-de-açúcar / Rodrigo Setem Carvalho. - Piracicaba, 2006.

118 p. : il.

Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2006.
Bibliografia.

1. Cana-de-açúcar 2. Etanol 3. Fermentação alcoólica 4. Frutose 5. Indústria sucro-alcooleira 6. *Saccharomyces* I. Título

CDD 633.61

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

**Aos meus pais,
Júlio e Inês,**

Ofereço

“Antes que chamem, responderei; e enquanto ainda estão falando, ouvirei”

“Ore. Em tudo dê graças”

À Deus
Agradeço

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Luiz Gonzaga do Prado Filho pela orientação, transmissão de conhecimentos e pela amizade durante a realização deste trabalho.

Ao Dr. Luiz Humberto Gomes pela co-orientação no dia a dia, amizade e incentivo durante a realização deste trabalho.

Ao Coordenador do curso Prof. Dr. Flávio César Almeida Tavares pelo apoio na realização deste trabalho.

À Dra. Keila Maria Roncato Duarte pela convivência e pelas inúmeras correções.

À Ana Maria Brancalion Giacomelli pela convivência no dia a dia, apoio e enorme auxílio nas análises.

Aos colegas do laboratório de genética Luiz Fernando, Alessandro (gaúcho), Jupará, Simone, Daniele, Marina.

Aos meus pais Júlio e Inês pelo incentivo, eterna ajuda e por tornar possível chegar até aqui.

À Josilaine pelo companheirismo, carinho e compreensão.

Aos meus familiares, pelo apoio, incentivo e compreensão.

Às secretárias da PG Giovana e Sara.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro (bolsa de estudos).

À todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização desse trabalho.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS.....	7
LISTA DE TABELAS.....	9
LISTA DE QUADROS.....	10
RESUMO	11
ABSTRACT	13
1 INTRODUÇÃO	15
1.1 Objetivos.....	15
2 DESENVOLVIMENTO.....	17
2.1 A importância da cana-de-açúcar e da indústria sucroalcooleira.....	17
2.2 A produção de etanol.....	18
2.3 A diversificação na indústria sucroalcooleira.....	22
2.4 Frutose.....	23
2.5 A produção de frutose.....	26
2.6 Outros processos usados para a produção de frutose.....	29
2.7 Separação da frutose.....	33
2.8 Separação da frutose através da fermentação seletiva da glicose.....	34
2.9 A fermentação em <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	36
2.10 Aspectos do metabolismo de carboidratos em <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	38
2.11 As hexokinases.....	43
2.12 A técnica de deleção de genes baseada em PCR para modificação de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	45
2.13 O cruzamento de leveduras <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	47
2.14 Matérias-primas utilizadas na fermentação alcoólica.....	51
2.15 Agente de fermentação.....	54
2.16 Sistemas de fermentação alcoólica.....	55
2.17 Aspectos econômicos.....	57
2.18 Produção de etanol e frutose como alternativa para a indústria de etanol.....	59
2.19 Material e métodos.....	61
2.19.1 Microrganismos.....	61

2.19.2 Meios de cultura usados.....	61
2.19.3 Métodos genéticos.....	62
2.19.4 Análise das linhagens (confirmação do duplo mutante).....	63
2.19.5 Crescimento das linhagens.....	63
2.19.6 Ensaaios de fermentação.....	63
2.19.7 Métodos analíticos.....	65
2.19.8 Análise estatística.....	65
2.19.9 Recuperação da frutose.....	66
2.19.10 Avaliação econômica preliminar.....	66
2.20 Resultados.....	67
2.20.1 Análise das linhagens.....	67
2.20.2 Crescimento das linhagens.....	67
2.20.3 Ensaaios de fermentação.....	70
2.20.4 Recuperação da frutose.....	82
2.20.5 Caracterização físico-química da frutose.....	84
3 CONCLUSÕES.....	89
REFERÊNCIAS.....	90
APÊNDICES.....	104

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1 - Mitigação do efeito estufa através da remoção de CO ₂ da atmosfera pela cultura da cana-de-açúcar.....	22
Figura 2 - Cromossomo VI de <i>S. cerevisiae</i> (de 243579 até 265036 bp) contendo o gene <i>HXK1</i> (a) e cromossomo VII de <i>S. cerevisiae</i> (de 13935 até 35395 bp) contendo o gene <i>HXK2</i> (b).....	40
Figura 3 - Diferentes formas de representação das enzimas hexokinases.....	44
Figura 4 - Micromanipulador de células acoplado à um microscópio óptico pertencente ao Laboratório de Genética de leveduras – ESALQ/USP.....	49
Figura 5 - Produção de HFCS por diferentes países em 2004.....	48
Figura 6 - Crescimento (Absorção à 600 nm) da linhagem controle PE (A) e da linhagem mutante I1 (B) em meios YEP tendo como fonte de carbono 2% de açúcar: glicose (Gli); frutose (Fru) ou sacarose (Sac).....	68
Figura 7 - Crescimento (Absorção à 600 nm) das linhagens mutantes J3 (A) e U1 (B) em meios YEP tendo como fonte de carbono 2% de açúcar: glicose (Gli); frutose (Fru) ou sacarose (Sac).....	69
Figura 8 - Teores de ART (g.L ⁻¹) consumidos e de etanol (g.L ⁻¹) produzidos pelas linhagens PE, U1, J3 e I1 em 16 horas de fermentação em meio YEP tendo como fonte de carbono 125,5 g.L ⁻¹ de frutose (A) e 139,1 g.L ⁻¹ de glicose (B).....	71
Figura 9 - Açúcares presentes no vinho após fermentação com a levedura U1. G (15%) = padrão preparado contendo 15% de glicose e F (15%) = padrão com 15% de frutose. Os números correspondem aos tempos (em horas), por exemplo G0 = meio com glicose no tempo zero e F0 = meio com frutose no tempo zero.....	72
Figura 10 - Açúcares presentes no vinho após fermentação com a levedura PE. G (15%) = padrão preparado contendo 15% de glicose e F (15%) = padrão preparado contendo 15% de frutose. Os números correspondem aos tempos (em horas), por exemplo G0 = meio com glicose no tempo zero.....	73
Figura 11 - Valores de etanol (A) e frutose (B) após fermentação em meio de sacarose ao longo de 9 ciclos fermentativos.....	74
Figura 12 - Biomassa produzida (A) e viabilidade das leveduras (B) após fermentação em	

meio de sacarose ao longo de 9 ciclos fermentativos.....	75
Figura 13 - Eficiência da fermentação, levando-se em conta os carboidratos disponíveis em meio de sacarose ao longo de 9 ciclos fermentativos.....	76
Figura 14 - Cromatografia dos vinhos após um ciclo fermentativo de mosto (M) de sacarose. Nota-se a cor verde correspondente a sacarose (S), a amarela correspondente a frutose (F) e a azul correspondente a glicose (G). Enquanto as linhagens PE, Y0 e Y1 consumiram todo o mosto, as linhagens I1 e J3 não metabolizaram a frutose.....	77
Figura 15 - Teores de ART (g.L^{-1}) consumidos (A) e de etanol (g.L^{-1}) produzidos (B) pela linhagem I1 em 27 horas de fermentação em meio de caldo de cana puro (com 263 g.L^{-1} de ART) e diluído (com 164 g.L^{-1} de ART).....	78
Figura 16 - Açúcares presentes no caldo de cana puro e diluído e nos respectivos vinhos após fermentação com a levedura I1. S=sacarose, G=glicose, F=frutose. S (15%) é um padrão preparado contendo 15% de sacarose; F (15%) contendo 15% de frutose e G (15%) contendo 15% de glicose.....	79
Figura 17 - Teores de ART (g.L^{-1}) consumidos (A) e de etanol (g.L^{-1}) produzidos (B) pelas linhagens I1 e PE em 52 horas de fermentação em meio de melaço de cana (PE = linhagem Pedra; I1 = linhagem I1; m1 = melaço com 406 g.L^{-1} de ART; m2 = melaço com 264 g.L^{-1} de ART).....	80
Figura 18 - Açúcares presentes no melaço de cana (M1 = melaço com 406 g.L^{-1} de ART; M2 = melaço com 246 g.L^{-1} de ART) e nos respectivos vinhos após fermentação com as leveduras PE e I1. S=sacarose, G=glicose, F=frutose. S (15%) é um padrão preparado contendo 15% de sacarose; F (15%) contendo 15% de frutose e G (15%) contendo 15% de glicose.....	82
Figura 19 - Esquema proposto para a produção de frutose e etanol à partir de leveduras hexokinases-deficientes.....	83
Figura 20 - Foto da frutose obtida.....	84

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1 - Formulações de etanol utilizadas em combustíveis para motores.....	19
Tabela 2 - Grau de doçura relativa de compostos em relação a sacarose (=100).....	24
Tabela 3 - Índice glicêmico.....	25
Tabela 4 - Componentes do xarope de frutose (em 100 g de matéria seca).....	85

LISTA DE QUADROS

	Página
Quadro 1 - Características físico-químicas da frutose obtida e dos parâmetros exigidos pela legislação em vigor para o melado de cana.....	86
Quadro 2 - Preços do álcool e de açúcares em agosto/2005.....	86

RESUMO

Obtenção de *Saccharomyces cerevisiae* hexokinases-deficientes por cruzamento visando a produção de frutose e etanol à partir de cana-de-açúcar

A frutose é o açúcar mais doce encontrado na natureza, sendo 1,8 vezes mais doce que a sacarose. Apesar do Brasil ser o maior produtor mundial de cana-de-açúcar, açúcar e álcool, ele não é um tradicional produtor de frutose. A frutose consumida no Brasil é importada e chega a custar 30 vezes mais que a sacarose, em supermercados. A conversão da sacarose em produtos com maiores valores agregados é uma opção para a indústria açucareira. Enquanto alguns desses produtos já estão no mercado, outros possuem um mercado em potencial, destacando-se produtos da área de química fina e de alimentos. Como a sacarose, derivada da cana-de-açúcar, é formada por glicose + frutose, para produzir frutose à partir dela é necessário separar esses dois açúcares e como eles são isômeros de mesmo peso molecular, a sua separação é difícil. O aumento do teor de frutose é feito normalmente através de processos cromatográficos, que envolvem custos elevados e alta complexidade operacional, o que encarece o produto final, incentivando-se a busca de rotas alternativas para a separação dos açúcares. Uma técnica que vem sendo estudada com este propósito, é a fermentação seletiva, baseada na utilização de microrganismos. Neste trabalho, linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* hexokinases-deficientes, modificadas geneticamente, mas não-transgênicas, obtidas por cruzamento, foram utilizadas para estudar a produção de etanol e frutose à partir de sacarose. Essas linhagens não possuem as hexokinases A e B (enzimas que fosforilam glicose, manose e frutose), e foram obtidas após o cruzamento entre as linhagens Acc n^o: Y05867 (com bloqueio no gene *HXK1*, responsável pela produção da enzima hexokinase A) e Acc n^o: Y14620 (com bloqueio do gene *HXK2*, responsável pela produção da enzima hexokinase B), ambas adquiridas da EUROSCARF. Essas linhagens apresentam crescimento em glicose mas não crescem em meio com frutose como única fonte de carbono. De 23 linhagens obtidas, três (U1, I1 e J3) foram selecionadas por apresentarem menor crescimento em meio YEPF. Este trabalho teve por finalidade avaliar o comportamento dessas linhagens em condições de fermentação, para tanto foram usados como substratos meios sintéticos com glicose, frutose e sacarose. Essas leveduras, em fermentação em meio de frutose (125,5 g.L⁻¹) não consumiram esse açúcar nem produziram etanol, porém, quando a fonte de carbono utilizada foi a glicose (139,1 g.L⁻¹), esse açúcar foi completamente consumido em doze

horas, sendo transformado em etanol (até 71 g.L⁻¹). Utilizando-se meio de sacarose (180,3 g.L⁻¹) em fermentações com ciclos de células, pode-se observar a tolerância dessas linhagens aos estresses provocados pelos ciclos fermentativos, onde houve produção de frutose (até 90 g.L⁻¹) e etanol (até 42,3 g.L⁻¹) em ciclos de doze horas, nos quais as leveduras hexokinases-deficientes conseguiram manter alto crescimento (até 51,2% de biomassa úmida) e viabilidade (até 77% de células viáveis) após 9 ciclos consecutivos. Em caldo de cana puro (com 263 g.L⁻¹ de ART) e diluído (com 164 g.L⁻¹ de ART) verificou-se a habilidade dessas leveduras em fermentar a glicose até etanol, com alta eficiência, deixando a frutose no meio. Quando o substrato utilizado foi melaço de cana-de-açúcar, notou-se que as leveduras foram hábeis em fermentar a glicose de melaços com até 406 g.L⁻¹ de ART. Após a fermentação o etanol e a frutose puderam ser recuperados, sendo a frutose (obtida à partir do caldo de cana) submetida à análises físico-químicas.

Palavras-chave: Cana-de-açúcar; Frutose; Etanol; Fermentação; *Saccharomyces cerevisiae*.

ABSTRACT

Acquirement of *Saccharomyces cerevisiae* hexokinases-less by crossing aiming the production of fructose and ethanol from sugar cane

Fructose is the sweetest sugar found in nature, being 1.8 times sweeter than sucrose. Although Brazil is the greatest worldwide producer of sugar cane, sugar and alcohol, it isn't a traditional fructose producer. The fructose consumed in Brazil is imported and it can be 30 times more expensive than sucrose in the supermarkets. In the other hands, the conversion of sucrose into products with higher aggregate values is an option for the sugar cane industry. While some of these products are already in the market, others, specially products in the area of fine chemistry and food, have a potential market. As sucrose, derivated from sugar cane, is formed by glucose + fructose, in order to produce fructose from itself it is necessary to separate these two sugars, and as they both are isomers of the same molecular weight, its separation is difficult. The increase of fructose content is done normally through difficult chromatographic techniques, which have a high price as well as a very complex operation, therefore rising the final price of the product, promoting the search for different ways in separating the sugars. A technique that is being studied with this purpose, is the selective fermentation, based in the usage of a microorganism. In this study, hexokinases-less strains of *S. cerevisiae*, modified genetically, mas not transgenics, obtained by match, were used in order to study the production of ethanol and fructose from sucrose. These strains don't have A and B hexokinases (enzymes that phosphorate glucose, manose and fructose), and were obtained by crossing between the strains Acc number: Y05867 (strain with a blockage in gene HXK1, responsible for the production of hexokinase enzyme A) and Acc number: Y14620 (strain with a blockage in gene HXK2, responsible for the production of hexokinase enzyme B), both obtained from EUROSCARF. These strains present glucose growth but they don't grow in fructose as the sole source of carbon. From the 23 strains obtained, three (U1, I1 and J3) were selected for presenting a smaller growth in YEFP. This study was done in order to evaluate these strains behavior in fermentation conditions, and for this reason it was used as substract synthetic medium with glucose, fructose and sucrose. These yeasts, in fermentation em medium of fructose (125,5 g.L⁻¹) didn't consume these sugars neither produced ethanol, but, when the carbon source used was glucose (139,1 g.L⁻¹), this sugar was completely consumed in twelve hours, being transformed into ethanol (until 71 g.L⁻¹). Using

sucrose medium (180.3 g.L^{-1}) in fermentations with cell recycles, it could be observed a tolerance of these strains to the stresses incited by fermentative recycles, where there was a fructose production (until 90 g.L^{-1}) and ethanol (until 42.3 g.L^{-1}) in twelve hours cycles, in which the hexokinase-less yeasts were able to keep a high growth (until 51.2% of humid biomass) and viability (until 77% of viable cells) after 9 consecutive cycles. In pure sugar cane juice (with 263 g.L^{-1} de ART) and diluted (with 164 g.L^{-1} de ART) one could see the ability of these yeasts in fermenting glucose until ethanol, highly efficient, leaving fructose in medium. When the substrate used was sugar cane molasses, one could see that the yeasts were capable in fermenting molasses glucose up 406 g.L^{-1} of ART. After fermentation, ethanol and fructose could be recovered, being the fructose (obtained from sugar cane juice) submitted to physical-chemical analyses.

Keywords: Sugar Cane; Fructose; Ethanol; Fermentation; *Saccharomyces cerevisiae*.

1 INTRODUÇÃO

Passados cinco séculos de sua introdução no Brasil e descontados alguns refluxos verificados em determinados períodos históricos, a cana-de-açúcar mantém o *status* de produto agrícola com maior safra no país – 389.928.614 t, em 2003, sendo uma das principais atividades econômicas do Brasil, tanto em termos de balança comercial (o Brasil exportou, entre 1996 e 2002, um total de 63,2 milhões de toneladas de açúcar resultando em uma receita de US\$ 11,7 bilhões, que equivale a 3,1% do total da receita obtida pelo país, no período, com exportações) como de geração de empregos, sendo gerados 1 milhão de empregos diretos e 4 milhões de empregos indiretos.

Apesar do Brasil ser o maior produtor mundial de açúcar, a maior parte da cana plantada no país destina-se à produção de álcool combustível, que absorve 55% da produção, sendo que a produção total de álcool oscilou, entre 1986 e 2003, entre 10 e 14 bilhões de litros anuais.

A produção de etanol é feita através da fermentação realizada por microrganismos, denominados taxonomicamente como leveduras. Entre essas, o gênero *Saccharomyces*, representado por linhagens da espécie *Saccharomyces cerevisiae*, tem se adaptado às condições industriais.

Portanto, como toda a produção de etanol (e de aguardente), no Brasil, ocorre por via fermentativa, torna-se fundamental o conhecimento e estudo desse processo, e de aspectos relacionados à ele, como um todo.

1.1 Objetivos

No presente trabalho buscou-se obter linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* hexokinases-deficientes para estudar a produção de frutose e etanol à partir da sacarose presente na cana-de-açúcar. Para isso, duas linhagens mutantes dessa levedura foram cruzadas obtendo-se segregantes deficientes em ambas as hexokinases que foram selecionados e após isso utilizados em ensaios de fermentação com diferentes substratos onde procurou-se simular o processo industrial de produção de etanol.

Como informações a respeito do comportamento de leveduras hexokinases-deficientes em condições de fermentação ainda são raras, procurou-se, nesse trabalho, avaliar o comportamento dessas linhagens analisando a sua tolerância aos estresses promovidos pelos ciclos celulares,

onde foi medida a capacidade das leveduras mutantes crescerem, manterem-se vivas e fermentarem adequadamente a glicose até etanol (deixando a frutose no meio) em fermentações usando sacarose como substrato e constando de nove ciclos fermentativos consecutivos.

Também o comportamento dessas leveduras foi avaliado em ensaios de fermentação utilizando-se como substrato diferentes concentrações de caldo e melaço de cana-de-açúcar. Posteriormente foram realizados experimentos com o objetivo de separar e purificar os produtos da fermentação. A frutose obtida à partir de caldo de cana foi submetida à análises físico-químicas e, para finalizar, foi apresentada uma avaliação econômica preliminar do processo.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 A importância da cana-de-açúcar e da indústria sucroalcooleira

O agronegócio da cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) possui grande importância no cenário socioeconômico brasileiro, tanto no que diz respeito à geração de renda, quanto no que se refere à geração de divisas e empregos. Segundo Bacchi (2004) e Rodrigues (2004) o Produto Interno Bruto do setor sucroalcooleiro representa 8% do Produto Interno Bruto agrícola nacional, gerando em produto final US\$ 10 bilhões/ano e mais de 1 milhão de empregos diretos no país, sendo o Brasil o maior produtor de cana-de-açúcar do mundo, com o menor custo do planeta (RODRIGUES, 2004; SCHMITZ et al., 2003).

Ao contrário de outros países, os produtores brasileiros contam com uma grande flexibilidade na escolha dos produtos para os quais direcionam a matéria-prima, podendo produzir tanto açúcar quanto álcool (BACCHI, 2004), após a extração do caldo da cana, este pode ser fermentado para produzir etanol, ou tratado e evaporado para produzir açúcar. Se, todavia, a produção do açúcar torna-se menos atrativa devido a preços reduzidos no mercado internacional, pode ser mais rentável conduzir o processo para a obtenção de etanol, ou vice-versa, nos últimos anos o açúcar tem absorvido 45% do total da cana nacional (de acordo com o artigo MODERNIZADA ..., 2004).

O Brasil é o maior produtor mundial de álcool e de açúcar e desde 1995 é o maior exportador mundial de açúcar (BACCHI, 2004; SCHMITZ et al., 2003), sendo que 58% da produção nacional é destinada à exportação (de acordo com o artigo O AÇÚCAR ..., 2004). O açúcar produzido no Brasil, e exportado, representa um terço do mercado internacional livre correspondendo a 13,5 milhões de toneladas (de acordo com o artigo O AÇÚCAR ..., 2004), sendo exportado para mais de cem países em todo o mundo. A cultura da cana-de-açúcar ocupou cerca de 5,57 milhões de hectares de área colhida no Brasil, com produção de 411 milhões de toneladas de cana em 2004 (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 2004). Todo esse êxito é, em parte, justificado pela fácil adaptação dessa gramínea ao clima e solo nacional.

Enquanto o mercado internacional do açúcar tem 500 anos, o do álcool está se iniciando. Dos 12 bilhões de litros anuais de álcool produzidos pelo Brasil, apenas 8% da produção segue para outros países (de acordo com o artigo O AÇÚCAR ..., 2004), porém, esse quadro tende a

mudar; desde a assinatura do Protocolo de Kyoto, diversos países desenvolvidos estão procurando alternativas menos poluentes que o petróleo, de forma a reduzirem suas emissões de CO₂, o que abre excelentes oportunidades para o álcool combustível no cenário internacional (MORAES, 2004).

Portanto, a criação do mercado internacional do álcool, juntamente com as questões ambientais, o mercado de carbono (atualmente a cana é responsável pelo seqüestro de 20% das emissões de carbono que o setor de combustíveis fósseis emite no Brasil (RODRIGUES, 2004)) e a criação do carro bicomustível em 2002 são excelentes para o setor, podendo representar um novo ciclo de crescimento para o agronegócio da cana-de-açúcar (MORAES, 2004).

De acordo com Rípoli et al. (2004) a dependência da sociedade moderna em relação ao petróleo, associada às incertezas de ordem político-militar na principal região produtora mundial, tem levado inúmeros países à criação de programas buscando novas fontes alternativas de energia.

Nesse contexto o Brasil insere-se com os derivados da cana-de-açúcar, que, além do álcool fornece o bagaço, o qual tem potencial para gerar 20% da energia que o Brasil consome anualmente, e com ganhos ambientais, uma vez que a agroindústria canavieira contribui com uma redução líquida de 46,6 milhões de toneladas de gás carbônico ao ano, reduzindo o efeito estufa, o que a credencia a captar recursos no âmbito do MDL (Mecanismo de Desenvolvimento Limpo), criado pelo protocolo de Kyoto (de acordo com o artigo MODERNIZADA ..., 2004).

Segundo Rodrigues (2004) os atuais excedentes da agricultura de alimentos se transformarão, nesse novo século, na agricultura energética, em função do interesse ambiental e do esgotamento do petróleo, ou seja, enquanto o século XX foi caracterizado como o reinado do petróleo, o século XXI será, sem dúvida, o reinado da agroenergia (derivada da cana-de-açúcar, dos óleos vegetais, da madeira, etc.) ambientalmente limpa, geradora de empregos permanentes, de renda e de riqueza para o Brasil.

2.2 A produção de etanol

A cana-de-açúcar é uma cultura com um grande potencial para utilização como fonte de energia, e seu uso voltado exclusivamente para produção de açúcar implica na limitação de seu potencial. O etanol produzido à partir da cana no Brasil é usado principalmente como aditivo da gasolina e como combustível (na forma hidratada) de veículos, sendo também utilizado como

agente desinfetante e como intermediário na indústria de alimentos e na produção de fármacos. O etanol é considerado um combustível muito menos prejudicial ao meio ambiente do que os derivados do petróleo, que são os principais causadores da poluição urbana e do aquecimento global (MOREIRA; GOLDEMBERG, 1999). A crescente preocupação com a qualidade do meio ambiente aliada à escassez de recursos energéticos não-renováveis e também aliada à elevação constante do preço do petróleo no mercado mundial tem aumentado o interesse de vários países pelo etanol.

Embora o álcool seja utilizado como combustível desde que os primeiros motores de combustão foram inventados, em 1903, somente em épocas mais recentes e de forma cada vez mais intensa, é que nota-se um aumento do uso de compostos oxigenados como aditivos à gasolina com o objetivo de reduzir seus índices de poluição ambiental. Como aditivo, o etanol compete com o metanol e com dois derivados do petróleo MTBE (metil terciário butil éter) e ETBE (etil terciário butil éter). A utilização do etanol permitiu ao Brasil eliminar o tetraetilenos de chumbo como aditivo para combustíveis, reduzindo emissões de poluentes dos veículos. Atualmente a proporção de etanol anidro adicionado à gasolina é cerca de 22-24% (v/v) (ZANIN et al., 2000), mas esse valor pode variar (Tabela 1). Nos EUA (segundo maior produtor mundial de etanol) existe um considerável aumento na produção de E10.

Tabela 1 – Formulações de etanol utilizadas em combustíveis para motores

Combustível	Conteúdo de etanol (%v/v)
Etanol hidratado (Brasil)	95.5
E85 (América do Norte)	85
Gasolina (Brasil)	24
E10 (gasohol) (América do Norte)	10
Combustível oxigenado (USA)	7.6
Gasolina reformulada (USA)	5.7
‘Biodiesel’ (Sweden)	15

Fonte: Wheals et al. (1999)

O etanol já é considerado um “commodity” sendo um excelente combustível para motores, uma vez que tem um número de octanagem maior que a gasolina. Ele apresenta ainda uma pressão de vapor menor que a gasolina, o que resulta numa menor emissão por evaporação. A flamabilidade do etanol no ar é também muito menor que a da gasolina, diminuindo o risco de incêndios em veículos acidentados e em áreas de risco (MOREIRA; GOLDEMBERG, 1999).

O etanol produz menos CO, NO_x e poluentes fotoquímicos que a gasolina. A poluição causada pela gasolina pode ser reduzida tanto pela substituição da gasolina pelo etanol como pelo uso do etanol como aditivo. A combustão do etanol produz acetaldeído e, por isso, a sua pressão de vapor é mais baixa. Como resultado da reunião da USA Clean Air Act Amendments (1990) foi sugerida a adição de no mínimo 2% de aditivos oxigenados (MTBE, ETBE ou etanol) à gasolina com o objetivo de reduzir a emissão de CO, NO_x e de compostos orgânicos voláteis (WHEALS et al., 1999).

Nos últimos 25 anos o custo da produção do etanol vem diminuindo progressivamente, conforme o esperado, uma vez que normalmente o aumento da demanda de um determinado produto leva à queda de seu preço, refletindo ainda um ganho devido ao progresso tecnológico e economias de escala (ROSILLO-CALLE; CORTEZ, 1998). Atualmente o preço do etanol é altamente competitivo com o da gasolina (isso devido também à alta do preço do petróleo), o que resulta no aumento da procura por carros flexíveis (bicom bustíveis), que podem ser abastecidos com álcool, gasolina, ou com a mistura de ambos e que foram lançados em 2003. Atualmente esse tipo de veículo responde por 70% do mercado, superando em venda os modelos à gasolina e já ultrapassando a marca de um milhão de unidades, sendo que essa frota, em quatro anos, deve chegar a cinco milhões de unidades (ASSOCIAÇÃO NACIONAL DOS FABRICANTES DE VEÍCULOS AUTOMOTIVOS, 2005).

Porém, ao longo de algumas décadas, diversos estudos têm sido direcionados com o objetivo de tornar a produção do etanol mais economicamente rentável, afinal subsídios governamentais foram normalmente necessários para tornar o preço do etanol competitivo em relação aos dos combustíveis fósseis (ROSILLO-CALLE; CORTEZ, 1998). Para tornar possível a produção de etanol no Brasil, desde o início do proálcool até 1997, já tinham sido investidos cerca de US\$ 11,7 bilhões. Todo esse investimento tornou possível evitar a importação de 220 mil barris de petróleo por dia, o que representou uma economia de divisas da ordem de US\$ 30 bilhões ao longo dos primeiros 20 anos de existência do PROÁLCOOL (iniciado no Brasil em

1975), valor esse acrescido de US\$1,5 bilhão a cada ano. Os impactos positivos do Programa Nacional do Alcool, tanto para a proteção do meio ambiente, quanto para o mercado de açúcar, serão ainda mais significativos se outros países também optarem pela mistura do álcool à gasolina (ASSOCIAÇÃO DE PRODUTORES DA INDÚSTRIA DO ALCÓOL, 1997).

Como nos EUA, grande parte do petróleo utilizado é importado e como o uso, e portanto a demanda por combustíveis vem aumentando, a produção de etanol vem contribuindo (com US\$ 1,5 bilhões por ano) para a balança comercial americana. O Brasil, até 1998, havia deixado de enviar para o exterior ao redor de US\$ 35 bilhões de dólares devido à produção de etanol e conseqüente redução de importação de petróleo (WHEALS et al, 1999).

Desde 1990, o etanol provém aproximadamente 13% da energia total usada pelo Brasil. Paralelamente, os custos de produção do etanol tem sido reduzidos ao redor de 2 a 3% ao ano desde a introdução do PROÁLCOOL, isso devido ao surgimento de novas variedades de cana, ao melhoramento das técnicas de cultivo e à melhora do processamento industrial (extração, fermentação e destilação). Ganhos similares tem sido observados nos EUA, devido à implementação de novas tecnologias e instalação de novas plantas de fermentações, que causaram uma redução de custos na produção do etanol de aproximadamente 40% nos últimos 15 anos (WHEALS et al, 1999).

Apesar da concorrência com os combustíveis fósseis e da competição com a produção de açúcar, que normalmente tem sido mais vantajosa, existem alguns motivos de grande relevância para a produção do etanol. Ele, além de ser uma fonte energética renovável, apresenta balanço favorável entre a fotossíntese e a combustão, através da remoção de dióxido de carbono da atmosfera e da geração de oxigênio, durante a cultura da cana-de-açúcar (Figura 1); é um excelente combustível para motores; além do fato de que a combustão de etanol resulta em uma menor emissão de monóxido de carbono, hidrocarbonetos, compostos nitrados e aldeídos do que a combustão da gasolina. As emissões de acetaldeído oriundas da combustão de etanol são ainda menos agressivas à saúde e ao meio-ambiente, do que o formaldeído produzido quando a gasolina é utilizada.

Figura 1 – Mitigação do efeito estufa através da remoção de CO_2 da atmosfera pela cultura da cana-de-açúcar.

2.3 A diversificação na indústria sucroalcooleira

Embora a história da cana-de-açúcar, ao longo dos últimos sete séculos esteja associada principalmente à produção do açúcar, a cana-de-açúcar como matéria-prima ganha importância econômica a cada dia, com novas descobertas, novos posicionamentos empresariais e novos fatores sócio-econômicos, políticos e ambientais (HORII, 2004).

A conversão da sacarose em produtos com maiores valores agregados é promissora para a indústria açucareira. Enquanto alguns desses produtos já estão no mercado, outros possuem um mercado em potencial (GODSHALL, 2001). Dentre esses destacam-se produtos da área de química fina e de alimentos.

Diante da grandiosidade do agronegócio da cana-de-açúcar juntamente com boas perspectivas futuras é esperado que novos produtos surjam, promovendo uma diversificação de itens extraídos da cana. Horii (2004) descreve os açúcares, gerados sob as mais diversas formas: VHP (Very High Polarization), VVHP, cristal branco, açúcar líquido e açúcar invertido; e sob as mais diversas denominações, em função das formas de obtenção (de orgânico a natural), de purificação (de mascavo a refinado) e de concentração (de xarope, melado ao subproduto melaço). Os álcoois vão de hidratado a anidro carburante, de álcool industrial (para a alcoquímica), a álcool neutro ou extraneutro (usado na fabricação de bebidas, perfumaria e

fármacos). Deve ser considerado ainda o potencial da cana para a geração de fertilizantes, proteínas unicelulares, ração animal e produção de biogás. Os materiais lignocelulósicos extraídos da cana podem ser utilizados como combustíveis para a geração de vapor e energia elétrica. A produção de excedentes continua na comercialização do bagaço como o *commodity* energia elétrica; na geração de hidrolisado para ração animal; na geração de xarope do hidrolisado resultante; na produção de etanol; na geração de fertilizantes, com muitos outros subprodutos e resíduos; na obtenção de celulose, lignina e hemicelulose e produtos derivados de seu processamento – papéis; aglomerados e similares para a indústria moveleira; diversos produtos químicos; materiais de construção, como blocos mais leves; substrato para cultivo de cogumelos; e substrato orgânico para muitas culturas.

Outros produtos da cana, de acordo com o artigo Modernizada... (2004) são: o ácido cítrico e o ácido láctico, extraídos do melaço; e o ácido acético (vinagre) produzido à partir do álcool e também a frutose, como sugere o presente trabalho, uma vez que a frutose cristalina consumida no Brasil é importada (VUILLEUMEIR, 1993) e chega a custar 30 vezes mais que a sacarose, em supermercados. Em solução aquosa, este açúcar é amplamente utilizado como edulcorante na indústria de bebidas do mundo todo. Como a frutose pode ser obtida como um co-produto da fermentação seletiva da sacarose, a produção desse açúcar pelo Brasil pode representar assim, um produto altamente tecnológico que poderia substituir a importação e, devido ao baixo custo da matéria-prima, tornar-se um produto a ser exportado, resultando em um aumento de divisas para o país.

2.4 Frutose

Os carboidratos (ou hidratos de carbono) são moléculas orgânicas constituídas geralmente por carbono, hidrogênio e oxigênio e são classificados de acordo com o número de unidades de aldeídos ou cetonas polihidroxílicas em: monossacarídeos, oligossacarídeos e polissacarídeos (GUTIERREZ, 1991); a frutose pertence ao grupo dos monossacarídeos, ou seja, é um carboidrato constituído por apenas uma unidade. Outro critério classifica os carboidratos em açúcares e polissacarídeos, sendo os açúcares carboidratos doces, cristalinos e solúveis em água. São de peso molecular bem conhecido e invariável. Já os polissacarídeos são carboidratos amorfos e insolúveis em água com peso molecular variável dependendo do tamanho da cadeia. A frutose pertence ao grupo dos açúcares.

A frutose é o açúcar mais doce encontrado na natureza, sendo 1,8 vezes mais doce que a sacarose (SHALLENBERGER, 1963). Ela pode ser industrialmente produzida à partir do açúcar invertido derivado da sacarose ou na forma de xaropes com alto conteúdo de frutose (HFCS), derivados do milho (LONG, 1991).

A frutose é mais doce que a glicose e a sacarose e embora ela possua a mesma fórmula química da glicose, ($C_6H_{12}O_6$), ela possui um arranjo estrutural de átomos ao redor do primeiro e segundo carbonos diferente, o que resulta na diferença de doçura (SCHENCK, 2000). Na tabela 2 é apresentado o grau de doçura de alguns carboidratos e outros compostos (GUTIERREZ, 1991; BLANCHARD; GEIGER, 1984):

Tabela 2 - Grau de doçura relativa de compostos em relação a sacarose (=100).

Composto	Doçura relativa
Lactose	16
Maltose	32
Glicose	74
Sacarose	100
HFCS - 42	100
HFCS - 55	105
HFCS - 90	140
Açúcar invertido	130
Frutose	173

Fonte: Gutierrez, 1991; Blanchard; Geiger, 1984

Embora a propriedade da frutose que mais a distingue dos outros carboidratos comestíveis seja o seu alto poder adoçante ela também apresenta como vantagens superioridade metabólica e rápida solubilidade, sendo por isso muito indicada para o uso em refrigerantes (NABORS; GELARDI, 1991).

Por possuir um baixo índice glicêmico (Tabela 3), a ingestão de frutose causa uma menor variação nos níveis de insulina, glucagon e hormônio de crescimento no sangue em relação à

sacarose ou glicose (BOHANNON et al., 1980) tornando-a mais adequada para diabéticos (TALBOT; FISHER, 1978) e hipoglicêmicos (CRAPO et al., 1982) por seu metabolismo não ser insulino-dependente (ROCH-NORLUND et al., 1972).

Tabela 3 - Índice glicêmico

Composto	Índice glicêmico
Glicose	100
Sacarose	59 ± 10
Frutose	20 ± 5
Maltose	105 ± 12
Mel	87 ± 8
Maçã	39 ± 3
Uva seca	64 ± 11
Pão	69 ± 5
Arroz	72 ± 9
Leite	34 ± 6

Fonte: Jenkins et al., 1981.

Além disso, a frutose produz menos estragos nos dentes do que outros açúcares (SCHEININ et al., 1976), aumenta a absorção intestinal de ferro e acelera o metabolismo do etanol. Ela possui como propriedades tecnológicas: ser mais solúvel em água e etanol e apresentar uma menor tendência de cristalizar que a sacarose (PASCHALIDIS, 1990). Ela também possui propriedades higroscópicas e antioxidantes e capacidade de reter ânions (GUIRAUD; GALZY, 1989).

Outra capacidade da frutose é a de ser percebida pelo paladar mais rápida e intensamente que a sacarose ou glicose, sendo que a percepção do gosto de frutose desaparece antes do máximo de percepção da sacarose. A frutose possui sinergismo de capacidade edulcorante. Quando se utiliza esse composto combinado com outros açúcares como a sacarose, a capacidade edulcorante aumenta. A frutose, quando comparada com a sacarose, reage mais facilmente com muitos amidos, resultando na formação mais rápida de géis, que também possuem melhor consistência e estabilidade do que os de sacarose. Outra propriedade favorável à utilização da

frutose na indústria de alimentos é a sua maior afinidade com a água. Desta forma ela pode ser usada como agente umectante, evitando a adição de outros agentes umectantes ao alimento. A solubilidade em água da frutose também é maior que a solubilidade da sacarose, permitindo se obter xaropes contendo até 83% de sólidos, contra no máximo 71% obtido com a sacarose. Uma propriedade que tem sido bastante explorada é a redução calórica obtida pela utilização de frutose como edulcorante. Devido à sua maior capacidade edulcorante, necessita-se de menor quantidade de frutose para se obter o mesmo efeito que a sacarose, com menos calorias no produto final. Reduções calóricas mais eficientes podem ser conseguidas utilizando-se a propriedade do sinergismo existente entre sacarose e frutose. Por exemplo, um suco de morango formulado com 100% de frutose em quantidade suficiente para atingir o mesmo efeito edulcorante da sacarose, possui 12% a menos de calorias do que se fosse formulado com sacarose. Uma mistura 1:1 dos dois açúcares forneceria, entretanto, uma redução de 22% das calorias no produto final (STALEY, 1987; HANOVER; WHITE, 1993).

Em resumo pode-se dizer que a frutose contribui em vários atributos físicos e funcionais de alimentos e bebidas onde se inclui aumento da doçura, realce do sabor, aumento da cor e do aroma, depressão do ponto de congelamento e estabilidade osmótica (HANOVER; WHITE, 1993).

Como a frutose é um edulcorante natural, não existe contra-indicação a respeito do consumo moderado de alimentos adoçados com esse composto. Em 1986, o FDA (Food and Drug Administration Center) nos Estados Unidos reconheceu que não existem provas definitivas de que a frutose seja prejudicial à saúde (FDA, 1997). O uso de frutose por diabéticos tem sido, então, objeto de pesquisa durante muito tempo. Sabe-se que nem o transporte de frutose para o interior das células, nem o seu metabolismo subsequente, dependem do aumento da concentração de insulina no sangue, mostrando que este edulcorante pode ser utilizado com moderação por diabéticos. No entanto, seu uso indiscriminado, principalmente em conjunto com a cafeína, pode influenciar as rotas de catabolismo de adenina, podendo levar a hiperucemia (aumento do nível de ácido úrico no sangue) e outras complicações (FUKAGAWA et al., 1995)

2.5 A produção de frutose

A frutose pode ser extraída diretamente de frutas e também pela oxidação de manitol ou sorbitol (PILNIK, 1973), pela hidrólise da inulina, pela isomerização da glicose e pela inversão da sacarose (KIERSTAN, 1980; WILLAMAN, 1920).

As primeiras tentativas de extração de frutose se centralizaram no carboidrato de reserva inulina (formada por resíduos de frutose), que é encontrado nos bulbos de certas plantas como dalias, chicórias e alcachofras de Jerusalém. Embora consideráveis tentativas tenham sido feitas, a frutose obtida da inulina nunca foi competitiva com a obtida de outras fontes (NABORS; GELARDI, 1991).

O sucesso comercial do xarope de frutose derivado do milho (HFCS) iniciou-se na década de 1970, com os altos preços do açúcar e, atualmente, é grande, sendo um dos principais adoçantes produzidos e consumidos nos Estados Unidos. O HFCS é feito à partir do amido de milho: o amido extraído do milho é liqüefeito em altas temperaturas pela α -amilase resultando em um xarope com 10 a 20% de dextrose equivalente (D.E.) o qual é sacarificado com glicoamilase até 94-96% de dextrose. Esse xarope é filtrado e 45% da glicose é convertida em frutose pela glicose-isomerase resultando em um xarope com 42% de frutose (42 HFCS). Esse xarope pode ser comercializado, ou encaminhado para uma coluna de fragmentação composta por cálcio e capaz de reter a frutose enquanto a dextrose e outros sacarídeos não são retidos; após esse fracionamento a frutose pode ser liberada originando um xarope com 70-80% de frutose. Enquanto uma pequena soma desse xarope é comercializada, a maior parte retorna ao processo e é misturada com o 42 HFCS resultando em um xarope com 55% de frutose (55 HFCS) um pouco mais doce que a sacarose (Tabela 2) (NABORS; GELARDI, 1991). Xaropes com maiores concentrações de frutose são desejáveis, pois possuem maior capacidade edulcorante. Para isso, normalmente faz-se o enriquecimento do teor de frutose por via cromatográfica, o que não é economicamente viável (HASHIMOTO et al., 1983; NILSSON et al, 1991).

Para produzir frutose cristalina, seca, é necessário um passo a mais: a cristalização (HANOVER; WHITE, 1993; HEIKKILA; KURULA, 1990; DWIVEDI; RANIWALA, 1980; KUSCH et al., 1970).

A frutose pura, cristalina, possui um mercado em expansão (HANOVER; WHITE, 1993), além de ser mais doce (Tabela 2) que os HFCS, ela é mais facilmente comercializável (HODGKIN, 1987), sendo ideal quando o objetivo é exportar. São necessárias concentrações de

90-95% de frutose para que a cristalização possa ocorrer (FORSBERG et al., 1975; COKER; VENKATASUBRAMANIAN, 1987; BATEMAN et al., 1984; LILLARD et al., 1994).

Os HFCS são resultado de investimentos em pesquisas que envolvem principalmente a área de biotecnologia, mais precisamente a área de enzimologia. A primeira produção, em nível comercial, bem sucedida de HFCS a partir do hidrolisado de milho, utilizando a enzima glicose-isomerase, foi realizado pela Clinton Corn Processing Co. (CCP), divisão da Standard Brands (hoje Nabisco Brands.). O processo da CCP baseava-se no trabalho de Takasaki (CARASIK; CARROL, 1983), usando o microorganismo *Streptomyces sp.* para produzir a enzima glicose-isomerase. A companhia Novo Laboratórios selecionou o microorganismo *Bacillus coagulans* para a produção de glicose-isomerase, baseada no trabalho de Yoshimura (CARASIK; CARROL, 1983). Este microorganismo termofílico tem diversas vantagens sobre os demais na produção de glicose-isomerase. A primeira série comercial desta enzima (sob o nome de “Sweetzyme”) foi lançada em 1973, e consistia de enzima solúvel seca por "spray-drier". A primeira forma imobilizada desta enzima surgiu em 1974, com vantagens sobre a forma seca, que foi logo extinta do mercado. A enzima imobilizada era destinada ao uso e reuso em reatores em batelada. Esta era adicionada ao tanque contendo o xarope de milho purificado, com mais que 93% de glicose em base seca, em condições de pH previamente ajustado. Uma reação típica durava de 20 a 24 horas, depois das quais, a enzima era recuperada, por decantação. Esta técnica tinha limitações, pois com o tempo, as partículas contendo enzima reduziam gradativamente seu tamanho, diminuindo a velocidade de precipitação.

Outro processo de imobilização ainda executado pela Novo Laboratórios Inc. foi a extrusão de uma massa de enzima reticulada através de um pequeno orifício. Esse tipo de enzima foi utilizado em reatores de leito fixo. Porém, novos problemas surgiram, devido à alta queda de pressão que se desenvolvia no interior do reator devido à compactação do leito, diminuindo drasticamente o fluxo. Tal limitação foi contornada mais tarde com o desenvolvimento de novos métodos de reticulação da enzima. A produtividade do processo utilizado, para uma conversão de 45%, foi cerca de 4.000 Kg de sólidos secos/Kg de enzima. Para a obtenção deste resultado, é necessário controlar a queda de atividade da enzima e o grau de pureza do substrato, além de um controle rigoroso do pH e da temperatura do processo (CARASIK; CARROL, 1983).

Durante o desenvolvimento de processos baseado na isomerização da glicose pela glicose-isomerase, outros procedimentos surgiram, como o desenvolvido por Barker et al. (1975), que

consistia na isomerização da glicose ou manose em solução alcalina, contendo um ácido aril-bórico. Dependendo do conteúdo de álcali, da temperatura e da natureza do ácido aril-bórico adicionado, pode-se obter rendimentos da ordem de 80% para a produção de frutose. Foi observado que o processo pode ser conduzido com concentrações de glicose de até 40% (p/p) em soluções contendo apenas glicose ou xaropes de açúcar invertido. Sproull et al. (1976), posteriormente, desenvolveu e verificou experimentalmente um modelo matemático para descrever a conversão enzimática de D-glicose a D-frutose e para a inativação da enzima glicose-isomerase. Foram investigados o efeito do pH, da temperatura e a estabilidade da enzima. Conseguiu-se chegar a um modelo que previa com bastante precisão a conversão de glicose em frutose, chegando, por exemplo, a valores experimentais e calculados de concentração de equilíbrio de glicose de 54,7% a 30 °C. A enzima utilizada nos experimentos era imobilizada no interior de células de *Streptomyces albus* permeabilizadas.

2.6 Outros processos usados para a produção de frutose

Embora a produção de xarope com alto teor de frutose catalisada pela enzima glicose-isomerase seja o processo mais utilizado (CARASIK; CARROL, 1983; VISURI; KLIBANOV, 1986), consistindo na maior aplicação de uso de enzimas imobilizadas ao redor do mundo, outros processos tem sido propostos para a produção de frutose.

Heady (1981, 1983) propôs um processo para produção de frutose a partir de sacarose, por meio da formação de um polímero de frutose. Este autor teve como objetivo o desenvolvimento de uma técnica onde não fosse necessária uma etapa de concentração do xarope após sua isomerização. No processo proposto, submete-se a solução de sacarose à ação de um preparado enzimático de frutossil-transferase, capaz de converter sacarose a um produto contendo glicose livre, uma pequena quantidade de frutose livre e polímeros de frutose, contendo pelo menos 66% de monômeros de frutose. A esse preparado enzimático, é ainda adicionada a enzima glicose-isomerase, para transformar a glicose em frutose e aumentar o rendimento do processo. Os polissacarídeos, então, são facilmente separados do meio por processos de separação convencionais como ultrafiltração, precipitação por adição de solventes, ou outros, e posteriormente são hidrolisados enzimaticamente pela ação da invertase ou por via ácida, sob condições brandas. Como resultado, pode ser obtido um xarope com mais de 55% de frutose, em base seca.

Uma modificação deste processo, proposta também por Heady (1982a), consiste em promover a hidrólise da sacarose, isomerização da glicose e polimerização da frutose. O produto resultante é então fermentado utilizando leveduras sem invertase, que consomem a glicose do meio, deixando o polímero de frutose intacto. Após a fermentação, procede-se com a separação das células e do etanol, e hidrólise dos polímeros de frutose obtidos. Utilizando-se esse processo é possível obter-se xaropes com mais de 66% de frutose em base seca, dependendo da composição de sacarose no substrato. Este processo pode também ser conduzido utilizando-se melaço, realizando-se ainda a etapa de hidrólise, isomerização e fermentação simultaneamente (HEADY, 1982b).

Hatcher et al. (1988) também propôs um processo baseado na conversão da frutose em levana utilizando *Zymomonas mobilis*, seguido de purificação da levana por processo de dia-ultrafiltração e posterior hidrólise da levana purificada, recuperando-se um xarope de frutose com alta pureza.

Visuri e Klibanov (1986) propuseram uma modificação ao processo de isomerização enzimática tradicional. Ao invés de utilizar um meio aquoso para conduzir a reação, foi utilizado um meio orgânico. Por razões de segurança e compatibilidade com os requerimentos da indústria alimentícia, o solvente escolhido foi o etanol. Foram testadas enzimas de quatro diferentes microorganismos e com diferentes tipos de imobilização. Concluiu-se que a concentração de equilíbrio de frutose em soluções alcoólicas pode chegar a 55% em base seca. Sob as mesmas condições de reação o sistema aquoso fornece no máximo 46% de frutose. Concentrações de etanol maiores que 80% (p/p) levam à desativação da enzima, provavelmente devido à desnaturação desta. Um trabalho semelhante foi publicado por Nilsson et al. (1991), que obtiveram um xarope com 55% de frutose, utilizando xilose isomerase termofílica em soluções contendo 40% de etanol, a 60°C.

Outros autores se concentraram mais no processo de adsorção para o enriquecimento da mistura de glicose e frutose. Hashimoto et al (1983), por exemplo, estudaram um sistema combinando a adsorção em zeólita Y, na forma Ca^{+2} , com a isomerização pela glicose isomerase imobilizada. O sistema consistia de 16 colunas empacotadas com a zeólita, intercaladas com colunas contendo enzima imobilizada. As colunas eram acopladas a dois discos rotatórios, para simular o movimento de contracorrente dos fluidos percolantes. Esse é um sistema bem complexo, pois além de variáveis como vazão de fluido e temperatura, o intervalo de rotação dos

discos pode afetar significativamente a eficiência do processo. Assim, é necessária a elaboração de um modelo matemático do sistema para se obter as condições ótimas de operação. A vantagem deste processo, segundo os autores, é que muito menos dessorvente (água destilada) precisa ser utilizado, diminuindo a diluição do produto final, e os custos com sua concentração.

Outro processo para produção de frutose que vem sendo bastante estudado é o baseado na hidrólise de extratos vegetais ricos em inulina, um polímero de frutose. Este polímero é um carboidrato de reserva de diversas plantas, como a alcachofra, dália e chicória. Ele é composto de uma cadeia linear de unidades de frutose formada por ligações β -(2,1), iniciada por uma molécula de sacarose. O tamanho da cadeia destes polímeros depende da espécie e da idade da planta em questão. As frutanas com grau de polimerização maior que 30, são denominadas de inulina. Este composto tem potencial como matéria-prima tanto na produção de álcool, como na produção de frutose. Estes polímeros são facilmente hidrolisáveis por ácidos, fornecendo xaropes contendo cerca de 75 a 98% de frutose. Embora o custo de ácidos minerais seja pequeno, a utilização destes, na hidrólise, leva à formação de uma grande quantidade de co-produtos, oriundos da degradação dos carboidratos presentes na solução, que fornecem cor e sabor indesejáveis ao produto final. A remoção destes co-produtos é ainda complicada e apresenta custo elevado (BAJPAI; BAJPAI, 1991).

Uma opção à hidrólise ácida da inulina é a hidrólise enzimática, que pode ser realizada tanto pela invertase, como pela inulinase (ou inulase). Ambas são capazes de hidrolisar a sacarose e a inulina, embora a inulinase seja bem mais específica para a inulina (KERKHOFFS; STAMICARBON, 1979). Workman e Day (1984) utilizaram inulinase de células de *Kluyveromyces fragilis* imobilizadas permeabilizadas. Conseguiu-se hidrólise de 96% de uma solução aquosa 10% (p/p) de inulina de dália em 10,5 horas de reação. O tratamento de imobilização das células foi eficiente para manter a estabilidade e resistências química e mecânica. A hidrólise de inulina de extrato de alcachofra foi também testada, produzindo um xarope com 75% de frutose, com base nos açúcares totais. Outra vantagem desse sistema, segundo os autores, é que ele permite operar a temperaturas mais elevadas, diferentemente de sistemas microbianos ativos, onde a temperatura de operação deve ser igual à temperatura ótima para a sobrevivência do microorganismo.

Kim e Rhee (1989) investigaram a produção de frutose a partir de extrato de alcachofra hidrolisado com inulinase obtida de *Aspergillus ficuum*. A enzima foi imobilizada em quitina, e

foram estudados processos com operação em batelada e contínua. Foi observado que durante a imobilização houve perda de até 67% da atividade enzimática. Foram feitos também estudos sobre a estabilidade da enzima inulinase imobilizada a altas temperaturas, e observou-se que esta permanecia estável até 40°C. Foi obtido um grau de hidrólise de até 90% no máximo, após 10 horas de reação, obtendo um produto com cerca de 80% de frutose (em base seca), não se conseguindo obter hidrólise completa mesmo após 24 horas de operação. Concluiu-se também que o reator contínuo pode ser operado durante duas semanas, sem que haja perda significativa da atividade da enzima, com uma produtividade de 75 g de frutose/L.h.

Brevnova e colaboradores (1998) clonaram o gene da inulinase de *Kluyveromyces marxianus* (*INU1_{Km}*) na levedura inulinase-negativa *Saccharomyces cerevisiae*. As células transformadas com esse gene adquiriram atividade de inulinase extracelular tornando-se hábeis a crescer otimamente em meio com inulina como única fonte de carbono. Foram construídas duas linhagens, uma delas, YBS618/INU, capaz de secretar a inulinase e utilizar a inulina para produzir etanol e a outra, YBS695/INU, uma linhagem hexokinase-deficiente, incapaz de absorver a frutose, tornou-se uma linhagem útil para hidrolisar a inulina e fermentar somente os resíduos de glicose (até etanol) deixando a frutose no meio, sendo útil para produzir frutose à partir de materiais ricos em inulina.

Estudos sobre inulinase contida em células permeabilizadas foram conduzidos por Geitel et al. (1993). Foram investigadas quatro diferentes cepas produtoras de inulinase. As células eram cultivadas em meio contendo suco de alcachofra e depois de 24 horas eram separadas do meio e tratadas com uma solução 96% de etanol. Os melhores resultados obtidos foram com *Kluyveromyces marxianus*, quando se obteve um grau de hidrólise de 93% após 24 horas de reação, atingindo uma produtividade de 2,1 g de açúcares redutores/L.h. Os autores não fizeram, no entanto, distinção entre o conteúdo de glicose e frutose em cada experimento, medindo apenas o valor total de açúcares redutores, o que prejudica a interpretação dos resultados. Schorr-Galindo et al. (1995a, 1995b) realizaram um trabalho semelhante, procurando microorganismos que tenham capacidade de fermentar sacarose e inulinas de baixo peso molecular, assim as inulinas de maior peso molecular permaneceriam no meio, podendo ser purificadas e posteriormente hidrolisadas, obtendo-se xaropes com alta concentração de frutose. No entanto, o rendimento de frutose em relação à concentração de substrato inicial é normalmente mais baixo do que em

outros processos que utilizam inulina, pois o microorganismo acaba consumindo parte da frutose que é despolimerizada.

Como se pode notar, existem diversos processos na literatura para a obtenção de xaropes com alto teor de frutose (HFS) propostos como alternativas aos processos mais utilizados comercialmente (que se baseiam na hidrólise de amido de milho, seguida da isomerização da glicose e concentração da frutose utilizando processos cromatográficos). Muitos ainda se baseiam no processo cromatográfico, que é uma alternativa onerosa. Os processos baseados na hidrólise de inulina também apresentam potencial, pois são processos mais simples e fornecem produtos com altíssimo teor de frutose, uma vez que não dependem do equilíbrio da reação de isomerização. No entanto, cabe ressaltar que as matérias-primas adequadas para esse tipo de processo não são culturas bem estabelecidas no Brasil.

2.7 Separação da frutose

A frutose cristalina pode ser produzida a partir dos HFCS ou da sacarose extraída da cana-de-açúcar ou da beterraba. Como a sacarose é formada por glicose + frutose, para produzir frutose a partir dela é necessário separar esses dois açúcares e como eles são isômeros de mesmo peso molecular, sua separação é difícil. Na produção derivada da sacarose, o processo envolve a inversão da sacarose através da quebra da ligação glicosídica e liberação dos monossacarídeos glicose e frutose a partir do dissacarídeo. Isto constitui a parte simples do processo. A subsequente separação e purificação dos açúcares glicose e frutose, oriundos da sacarose invertida ou do HFCS, baseada em métodos cromatográficos, constitui a parte onerosa e demorada do processo e que envolve alta complexidade operacional (NABORS; GELARDI, 1991; COKER; VENKATASUBRAMANIAN, 1987), o que encarece o produto final (COKER; VENKATASUBRAMANIAN, 1987), incentivando-se a busca de rotas alternativas para a separação dos açúcares (BHATT, 1993a,b).

Portanto, a dificuldade para separar a glicose da frutose existe porque esses açúcares são isômeros muito semelhantes (COKER; VENKATASUBRAMANIAN, 1987). Para essa separação podem ser utilizadas técnicas cromatográficas e não-cromatográficas.

A separação da glicose e frutose baseada em métodos cromatográficos é possível devido à reações químicas seletivas, quelação com íons metálicos ou interações com grupos funcionais na superfície de um adsorvente. Vários adsorventes inorgânicos têm sido testados usando colunas

cromatográficas, mas somente zeólitas e alumínio pareceram promissores para a separação de glicose e frutose. Separação cromatográfica usando resinas orgânicas de troca iônicas também tem sido exaustivamente estudada em detalhes, analisando-se a influência: das características da resina, da temperatura de operação, do solvente, da razão de escoamento. Resinas de troca catiônica de cálcio também constituem um excelente meio para a separação da glicose e frutose (BHATT, 1993b).

Métodos não-cromatográficos para a obtenção de frutose à partir de misturas de glicose/frutose são baseados em diferenças de propriedades físicas, químicas ou bioquímicas existentes entre os dois açúcares. A cristalização seletiva é baseada na diferença de solubilidade dos açúcares em água ou em misturas de água com álcool. A precipitação com cálcio envolve a formação de quelatos de beta-D-frutopiranosose com íons metálicos. Métodos envolvendo a transformação química da glicose incluem oxidação seletiva da glicose para ácido glucônico e conversão seletiva da glicose em polióis furânicos. Separações bioquímicas envolvem oxidação enzimática da glicose ou fermentação seletiva da glicose. A separação baseada em osmose reversa é possível devido à diferença de permeabilidade entre os dois açúcares em membranas de acetato de celulose, sendo que, em escala comercial a coluna de membrana pode ser contínua (BHATT, 1993a).

Os métodos de separação cromatográficos são normalmente dispendiosos, envolvendo operações complexas e instabilidade de resinas ou ou agentes de separação (VISURI; KLIBANOV, 1986; COKER; VENKATASUBRAMANIAN, 1987). Por isso os métodos não-cromatográficos surgem como opções para essa separação. Uma técnica que vem sendo estudada com este propósito é a fermentação seletiva, baseada na utilização de um microrganismo. Nesse caso, o microrganismo metaboliza preferencialmente a glicose em uma mistura de frutose e glicose, enquanto a frutose permanece no meio. O microrganismo, após consumir a glicose, excreta, normalmente, etanol, que pode ser facilmente separado da frutose utilizando-se métodos de separação mais simples.

2.8 Separação da frutose através da fermentação seletiva da glicose

Devido aos altos custos industriais dos métodos cromatográficos (VISURI; KLIBANOV, 1986; COKER; VENKATASUBRAMANIAN, 1987) que encarecem o preço da frutose, tornando-a menos competitiva perante outros adoçantes, os métodos não-cromatográficos têm

sido sugeridos para essa separação. Uma técnica que vem sendo estudada com este propósito é a fermentação seletiva, baseada na utilização de um microrganismo. Quando este microrganismo encontra-se em um meio contendo dois ou mais substratos é capaz de consumir apenas um destes. Neste caso, a glicose pode ser fermentada até etanol que pode ser mais facilmente separado da frutose. Esse processo é vantajoso por poder ser aplicado sem requerer grandes investimentos em equipamentos ou alterações de rotinas operacionais.

Essa fermentação seletiva tem sido feita em misturas de glicose/frutose usando mutantes de *Mucor sp.* M105 (UENG et al., 1982), *Zymomonas mobilis* DSM 3126 (BRINGER; SAHM, 1988), *Z. mobilis* ATCC 53431 (DOELLE; DOELLE, 1991) e *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 36859 (DUVNJAK; KOREN, 1987; KOREN; DUVNJAK, 1989; KOREN; DUVNJAK, 1990; KOREN; DUVNJAK, 1993; GUÉNETTE; DUVNJAK, 1995; GUÉNETTE; DUVNJAK, 1996; REMIZE et al., 1998; DI LUCCIO; 2001; DI LUCCIO et al; 2002). Mutantes de *Tricholoma nudum* NRRL 2371 (REUSSER et al., 1960), *Fusarium sp.* F5 (UENG et al., 1982), *Pullularia pullulans* ATCC 9348 (FAN, 1988); *Z. mobilis* ATCC 39676 (DOELLE; GREENFIELD, 1985a,b); *Z. mobilis* ATCC 53432 (SUNTINANALERT et al., 1986); *Z. mobilis* ATCC 53431 (DOELLE; DOELLE, 1991; EDYE et al., 1989; KIRK; DOELLE, 1994) e *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 36858 (ATIYEH; DUVNJAK, 2002; ATIYEH; DUVNJAK, 2003; GAGNÉ et al., 2002) foram usados em meio com sacarose.

Porém, os estudos com os microrganismos acima, exceto *Saccharomyces cerevisiae*, demonstraram um significativo consumo de frutose (até 50%) (principalmente *T. nudum* e *P. pullulans*) e/ou formação de produtos secundários, como mais de 4% de sorbitol (principalmente *Z. mobilis*) e somente uma única linhagem de levedura (ATCC 36858) produziu eficientemente etanol e frutose à partir da sacarose.

A cepa de *S. cerevisiae* ATCC 36859 (LOBO; MAITRA, 1977a) não produz invertase, sendo portanto necessário hidrolizar química ou enzimaticamente meios à base de sacarose para utilizar essa cepa, o que encareceria o produto final e, além disso, observou-se experimentalmente (DUVNJAK; KOREN, 1987; KOREN; DUVNJAK, 1989; DI LUCCIO, 2001) que essa cepa consome frutose quando a concentração de glicose no meio é muito baixa ou nula. Durante o consumo da frutose, essa cepa cresce muito lentamente, não produz etanol, e há aparecimento de sorbitol no meio, indicando que possivelmente outra via metabólica possa ser a responsável pela metabolização da frutose. Como essa cepa foi isolada após indução de mutações

via agentes mutagênicos, e por esse tipo de mutação não ser gene-específica, essa cepa teve outros genes úteis modificados, prejudicando a sua utilização. A técnica de deleção de genes utilizada para a obtenção das leveduras parentais utilizadas nesse trabalho é vantajosa justamente por que esse tipo de mutação afeta precisamente um único gene, não deixando efeitos “colaterais” em outro(s) gene(s) (BRACHMANN et al., 1998).

Além disso, utilizando-se cruzamento de leveduras pode-se obter inúmeras linhagens que fermentem seletivamente a sacarose, o que possibilitou a seleção de linhagens que produzam mais eficientemente etanol e frutose.

A opção pelo uso da levedura *Saccharomyces cerevisiae* é justificado pelo fato dela ser um microrganismo amplamente estudado. Além de ser um organismo experimental por excelência e um importante modelo de célula eucariótica para geneticistas e bioquímicos, ela é também um microrganismo reconhecidamente industrial, cujos produtos de fermentação são de grande importância (SHERMAN, 1991).

2.9 A fermentação em *Saccharomyces cerevisiae*

As leveduras têm sido amplamente utilizadas como microrganismos modelo para o estudo da biologia celular nas últimas décadas. Muitas são as razões para o interesse nestes microrganismos, dentre as principais pode-se destacar o fato destes serem microrganismos eucariotas, possibilitando-se aproveitar as informações obtidas sobre os fenômenos que ocorrem no seu interior, para a compreensão da biologia molecular de seres superiores (SHERMAN, 1991). Por outro lado, os genes de leveduras já foram mapeados (MORTIMER; SCHILD, 1981; 1985), possibilitando-se relacionar a genética celular com o seu metabolismo e fisiologia, podendo-se assim; através de técnicas modernas, adicionar ou mesmo remover características típicas de uma célula.

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* pode ser classificada como um microrganismo aeróbio facultativo, ou seja, é capaz de utilizar a glicose sob condições tanto aeróbias como anaeróbias. Durante o crescimento aeróbio, tanto a fermentação quanto a respiração contribuem para o catabolismo de glicose. Uma outra classificação também usada, depende da contribuição de cada um destes mecanismos, separando as leveduras em fermentativas e respiratórias. O gênero *Saccharomyces* pertence ao grupo das leveduras fermentativas, nas quais a respiração celular contribui bem menos para o catabolismo de glicose do que a fermentação.

Portanto, a fermentação alcoólica é a via de catabolismo de açúcares que mais ocorre em *Saccharomyces cerevisiae* mesmo durante o crescimento exponencial sob condições aeróbias. Isto ocorre em parte devido à repressão das enzimas da respiração pelos açúcares nestas espécies. Neste gênero de levedura, a respiração é responsável por menos de 10% do catabolismo de glicose. Devido a este fato, grandes mudanças nas taxas de utilização de açúcar em presença ou ausência de oxigênio não devem ser esperadas (efeito Pasteur) (GANCEDO; SERRANO, 1989).

Como a levedura *Saccharomyces cerevisiae* é capaz de fermentar em condições de aerobiose, ela é, por isso, considerada Crabtree-positiva. Essa fermentação aeróbica é consequência de um fenômeno denominado repressão pela glicose (RAAMSDONK et al., 2001). Na presença de altas concentrações de glicose a expressão dos genes envolvidos no ciclo do ácido tricarboxílico, na fosforilação oxidativa, no ciclo do glioxilato, na gliconeogênese e no metabolismo de outros açúcares é reprimida (CARLSON, 1998; GANCEDO, 1998). Adicionalmente, a expressão dos genes envolvidos na fermentação alcoólica é induzida. Este mecanismo regulatório em *S. cerevisiae* é responsável pelo consumo preferencial da glicose em relação à outros carboidratos.

Deste modo, quando *S. cerevisiae* cresce em uma mistura de glicose com outras fontes de carbono como sacarose, maltose, galactose ou etanol, o crescimento é diáuxico, isto é, a glicose é metabolizada primeiro, enquanto outras fontes de carbono só serão metabolizadas após a glicose ser exaurida e somente após todos os açúcares serem depletados, é que o etanol produzido durante a fermentação será consumido (RAAMSDONK et al., 2001). Portanto, Embora a levedura *Saccharomyces cerevisiae* utilize várias fontes de carbono para o crescimento, a glicose e hexoses relacionadas são usadas preferencialmente (PETIT et al., 2000) porque a glicose promove uma variedade de respostas que garantem seu uso preferencial, desde a modulação da atividade enzimática até a repressão ou indução de genes (CARLSON, 1999; GANCEDO, 1998).

A glicose passa por diversas transformações químicas antes de ser transformada em etanol pela levedura *S. cerevisiae*. A primeira parte dessa sequência de reações denomina-se glicólise. A glicólise pode ser definida como a sequência de reações que transforma a glicose-6-fosfato em piruvato com a concomitante produção de ATP. O piruvato pode ter vários destinos. Em condições anaeróbias este pode ser convertido em etanol. Em condições aeróbias, o piruvato formado na glicólise sofre a descarboxilação oxidativa para formar a acetil-coenzima. Esta, então, é completamente oxidada a dióxido de carbono pelo ciclo do ácido cítrico.

A glicólise é uma sequência de dez reações catalisadas por enzimas. Os estudos pioneiros da glicólise com mutantes de leveduras datam de 1968 (LUTSTORF; MEGNET, 1968) e 1971 (MAITRA, 1971).

Um grande número de proteínas participam do processo de repressão pela glicose (GANCEDO, 1998), incluindo a hexokinase II, codificada pelo gene *HXK2* (ENTIAN, 1980; ENTIAN et al., 1977).

Uma das atividades reguladas pela glicose é a absorção de açúcares. O transporte da glicose em *S. cerevisiae* é mediado por proteínas codificadas por diversos genes denominados *HXT* (REIFENBERGER et al., 1995; BOLES; HOLLENBERG, 1997; KRUCKEBERG, 1996). O transporte da glicose em leveduras exhibe cinética dupla com componentes cinéticos de alta e baixa afinidade (BISSON; FRAENKEL, 1983) cujas proporções dependem das condições de cultura (DIDERICH et al., 1999; WALSH et al., 1994). Os diferentes genes *HXT* expressam diferentes proteínas que possuem diferentes afinidades pela glicose.

O transporte de glicose em leveduras não é bem compreendido. Alguns estudos sugerem que carreadores de membranas constitutivos seriam responsáveis pela absorção de glicose, frutose, manose e análogos (CIRILO, 1968; HEREDIA et al., 1968). Como a concentração interna de glicose é baixa durante seu metabolismo, van Steveninck e Rothstein (1965) sugeriram duas hipóteses: que essa baixa concentração é devida à fosforilação logo após a entrada por difusão facilitada ou a ocorrência de uma fosforilação transiente durante a entrada ou ainda a formação do primeiro metabólico intermediário, uma hexose-6-fosfato, ocorrendo devido à uma obrigatória fosforilação vetorial (como o sistema de fosfotransferase bacteriano). Diversos experimentos têm associado o transporte ao metabolismo.

2.10 Aspectos do metabolismo de carboidratos em *Saccharomyces cerevisiae*

A primeira e mais importante etapa de uma série de mecanismos que mantém a vida de qualquer célula é a passagem de nutrientes essenciais para o seu interior e a excreção de produtos de seu metabolismo. Esses nutrientes essenciais podem ser solúveis ou insolúveis em água, ou gasosos, como no caso do oxigênio. A principal barreira entre a célula e o meio na qual ela se encontra é a membrana plasmática. A maioria das moléculas hidrofóbicas e moléculas pequenas não carregadas atravessam a membrana plasmática por difusão simples, movendo-se na direção do seu gradiente de concentração. A taxa de permeação vai depender da ordem de grandeza deste

gradiente para a espécie em questão. Para moléculas polares ou eletricamente carregadas, no entanto, a membrana bilipídica constitui uma barreira impenetrável, necessitando de outro tipo de mecanismo para que o transporte ocorra (GUSTIN et al., 1986).

O transporte de solutos em leveduras pode ser dividido basicamente em quatro tipos de mecanismos. O primeiro consiste na difusão simples ou livre, onde nenhuma proteína transportadora está envolvida, sendo portanto espontâneo e dependente do gradiente de concentração do soluto em questão. Outros dois tipos envolvem proteínas presentes na membrana plasmática, denominadas transportadoras e são chamados transporte por difusão facilitada e transporte ativo. A difusão facilitada define-se como o transporte de moléculas do soluto em direção a seu gradiente de concentração, facilitada pelos transportadores, não envolvendo, assim, gasto de energia metabólica. O transporte ativo envolve o transporte de espécies em sentido contrário a seu gradiente de concentração e desta forma é um processo que requer energia metabólica. O transporte de macromoléculas ocorre através de endocitose ou exocitose, onde ocorrem invaginações na membrana, contendo a substância a ser transportada, que posteriormente se rompem liberando o seu conteúdo. Estudos ainda mostram a possibilidade de existência de transporte através de poros na membrana plasmática. Tais poros seriam formados por canais iônicos que seriam seletivos quanto ao tamanho, carga e interações das espécies envolvidas com a superfície destes canais. Esta hipótese é de fundamental relevância para explicar a alta mobilidade das moléculas de água através da membrana celular (GUSTIN et al., 1986).

O transporte e assimilação de monossacarídeos para o interior da célula ainda são objeto de estudo, havendo controvérsias sobre os mecanismos envolvidos nesta etapa. Muito se tem investigado nas últimas três décadas sobre o sistema de transporte de carboidratos em células de *Saccharomyces cerevisiae*. Nas leveduras que têm capacidade de consumir sacarose, sabe-se que este substrato não é transportado para o interior da célula e sim hidrolisado fora da membrana plasmática. No entanto, observa-se que algumas cepas que não contém invertase são também capazes de consumir sacarose, pois esse dissacarídeo pode ser transportado pelo carreador da maltose para o interior da célula e hidrolisado pela maltase (GANCEDO; SERRANO, 1989).

Após o açúcar entrar na célula, a fosforilação é a primeira transformação química que ele sofre. Embora em bactérias a fosforilação do açúcar seja primariamente catalizada por um sistema multienzimático tendo P-enolpiruvato como doador de fosfato (ANDERSON; WOOD,

1969), em leveduras e em organismos superiores esta reação é mediada por kinases ATP-dependentes.

Na levedura *Saccharomyces cerevisiae* existem três enzimas que catalizam a fosforilação de açúcares: duas hexokinases (EC2.7.1.1), a hexokinase A ou P-1 (codificada pelo gene *HXK1*) e a hexokinase B ou P-II (codificada pelo gene *HXK2*) (Figura 2) (COLOWICK, 1973), e uma glicokinase (EC2.7.1.2) (codificada pelo gene *GLK1*) (MAITRA, 1970). Mutações deficientes para as três enzimas, *hxx1*, *hxx2* e *glk1* foram descritas por Mortimer e Schild (1981). Essas enzimas catalizam o primeiro passo irreversível do metabolismo intracelular da glicose. Enquanto a glicokinase fosforila somente a glicose e a manose, as hexokinases fosforilam além da glicose e da manose a frutose (LOBO; MAITRA, 1977a).

Figura 2 - Cromossomo VI de *S. cerevisiae* (de 243579 até 265036 bp) contendo o gene *HXK1* (a) e cromossomo VII de *S. cerevisiae* (de 13935 até 35395 bp) contendo o gene *HXK2* (b).

A multiplicidade dessas enzimas (LOBO; MAITRA, 1977b) dificultou os trabalhos iniciais de isolamento de mutantes deficientes na fosforilação de glicose. Mutantes deficientes em ambas as hexokinases que ainda contém a glicokinase são incapazes de crescer em frutose mas ainda crescem em glicose (MAITRA, 1975; GANCEDO et al., 1977). Esse tipo de mutante foi obtido pela primeira vez por Maitra (1970) e posteriormente por Gancedo et al. (1977) e Lobo e Maitra (1977a). Estudos de reversões mostraram que os loci *HXK1* e *HXK2* são os genes estruturais para hexokinase P-I e P-II, respectivamente (LOBO; MAITRA, 1977a). Maitra (1970) purificou e descreveu pela primeira vez algumas das propriedades da glicokinase de *S. cerevisiae*.

Lobo e Maitra (1977a), desenvolveram um longo estudo, onde isolaram e caracterizaram diversos tipos de mutantes de *Saccharomyces cerevisiae*. Eles observaram que a cepa mutante que não possuía ambas as hexoquinases, mas contendo a glicoquinase, era incapaz de crescer em meios que continham somente frutose como fonte de carbono. Ela crescia em meios contendo glicose tão bem quanto as cepas selvagens, sendo também capaz de crescer em maltose e sacarose, deixando no meio uma quantidade de frutose equivalente à quantidade desse monômero presente na sacarose utilizada. Observou-se também que a frutose não inibia o crescimento das células mutantes hexoquinases negativas. A cepa mutante sem nenhuma das três enzimas era incapaz de crescer em glicose, frutose e sacarose, sendo capaz de crescer somente em galactose. As mutantes contendo pelo menos uma das hexoquinases e sem a glicoquinase eram capazes de crescer normalmente em glicose e frutose. O isolamento dessas cepas mutantes foi baseado no fato de que células sem hexoquinases são mais resistentes ao composto 2-desoxiglicose.

A 2-desoxiglicose é um composto inibidor letal do crescimento de leveduras (HEREDIA; SOLS, 1964). A capacidade das hexoquinases de catalisar a fosforilação de 2-desoxiglicose é cerca de 10% da capacidade destas enzimas de catalisar a fosforilação da glicose, enquanto a capacidade da glicoquinase de catalisar a fosforilação da 2-desoxiglicose é cerca de 1%. Portanto, cepas com as três enzimas têm capacidade de assimilar a 2-desoxiglicose, enquanto aquelas sem as hexoquinases têm essa capacidade bem reduzida. Esse composto, depois de fosforilado, é incorporado aos nucleotídeos, formando compostos que não podem ser posteriormente metabolizados, inviabilizando estes nucleotídeos para a síntese de outras proteínas. Em altas concentrações, a 2-desoxiglicose retém, ainda, uma alta quantidade de fosfato, fazendo com que a quantidade de ATP disponível na célula diminua, prejudicando outras reações vitais à sua sobrevivência.

Foi após o trabalho de Bisson e Fraenkel (1983) que as primeiras teorias sobre o envolvimento das enzimas quinases no transporte de glicose vieram a ser estabelecidas. Estes autores estudaram a assimilação de glicose e frutose em três cepas de *Saccharomyces cerevisiae*: uma selvagem, uma cepa mutante sem as hexoquinases mas com a glicoquinase e em outra cepa mutante sem nenhuma das três enzimas. Eles ressaltam que o fato da concentração de glicose dentro da célula ser baixa durante o metabolismo pode ser causado pela fosforilação imediatamente subsequente à entrada de glicose na célula por difusão facilitada, ou por uma relação mais complexa entre o transporte de glicose e o metabolismo celular. Uma evidência para a relação do metabolismo com o transporte de glicose seria o fato de que a afinidade para o transporte é afetada por inibidores do metabolismo, como o iodoacetato, e é também diminuída com o aumento da concentração de oxigênio no meio. Esses autores mostraram que no transporte de substâncias não metabolizáveis (como o composto 6-desoxiglicose), a concentração do composto no interior da célula alcançou um valor máximo; abaixo ou equivalente ao valor da concentração externa. O mesmo ocorreu no transporte de frutose em cepas que não continham as enzimas hexoquinases (e portanto incapazes de consumir frutose) e para o transporte de glicose e frutose em cepas que não continham nenhuma enzima quinase (incapazes de consumir frutose e glicose).

As características cinéticas do transporte nas células foram determinadas expressando-se a velocidade de transporte de substrato em função da razão desta pela concentração de substrato. De acordo com esses gráficos, na cepa selvagem o transporte ocorre por dois mecanismos, um associado a uma alta afinidade aparente do sistema de transporte, pelo substrato, caracterizado por uma constante cinética (K_m) de 1 mM para a glicose e 6 mM para frutose, e outro associado a uma baixa afinidade pelo substrato, caracterizado por uma constante cinética de cerca de 20 mM e 50 mM para glicose e frutose, respectivamente. A cepa mutante deficiente em hexoquinases não apresentou o mecanismo de alta afinidade por frutose, enquanto a mutante deficiente nas três quinases apresentou baixa afinidade para os dois monossacarídeos (BISSON; FRAENKEL; 1983). Os autores concluem, assim, que a inabilidade para fosforilar parece estar associada com a perda do mecanismo de alta afinidade, alegando ainda que as abordagens anteriores feitas para explicar o transporte em leveduras foram muito simplistas e que este transporte pode ser constituído por dois mecanismos de difusão facilitada, um de baixa afinidade, dependente de um transportador, e outro de alta afinidade, dependente das quinases. Os autores

não determinaram se estas enzimas estão relacionadas com o metabolismo celular, mas sugerem, no entanto, que estas façam parte do sistema de transporte de glicose, podendo, por exemplo, estar associadas a algum componente da membrana que atue como um sensor primário de substrato presente no meio externo, influenciando, assim, a afinidade aparente da célula pelos açúcares externos.

O transporte de glicose em leveduras não é bem compreendido e ainda não se chegou a uma conclusão definitiva sobre o mecanismo desse transporte, podendo-se somente afirmar que o sistema de alta afinidade para transporte é inibido pela alta concentração de glicose e que o sistema de baixa afinidade é expresso de maneira constitutiva, ou seja, estará sempre presente na célula, independentemente das condições do meio (KO et al.; 1993; LAGUNAS, 1993).

Mutantes glicose-negativos obtidos à partir de linhagens *hxx1* e *hxx2* e deficientes também para glicokinase não crescem em maltose, sacarose ou trealose. Isto mostra que não há outras enzimas responsáveis pelo metabolismo inicial da glicose em leveduras e que os dissacarídeos são absorvidos via conversão para glicose. De qualquer forma, esse triplo mutante cresce em galactose, porém isso é devido a via a ser usada, nesse caso, ser diferente da via da glicose-6-P. Mutantes contendo somente uma das três enzimas são capazes de crescer em glicose ou manose, embora esse crescimento seja lento em relação ao tipo selvagem, sendo que a atividade de fosforilação da glicose corresponde a 25-40% do tipo selvagem (LOBO; MAITRA, 1977b,c).

Linhagens hexokinases-deficientes de *S. cerevisiae* têm sido usadas na produção de frutose e etanol à partir da sacarose (DUVNJAK; KOREN, 1987; ATIYEH; DUVNJAK, 2002).

2.11 As hexokinases

Embora as duas hexokinases (Figura 3) sejam isoenzimas, elas desempenham papéis diferentes na levedura. Através do uso de algoritmos de Smith e Waterman (SMITH; WATERMAN, 1981) notou-se que elas possuem 78% de identidade e ao redor de 90% de homologia na seqüência de aminoácidos (KOPETZKI et al., 1985; FROHLICH et al., 1985). Essas enzimas são caracterizadas como homodímeras de 52 kDa por subunidade (EASTERBY; ROSEMEYER, 1972; DERECHIN et al., 1972; SCHMIDT; COLOWICK, 1973) com estruturas terciárias muito similares (ANDERSON et al., 1978a,b; BENNETT; STEITZ, 1978) onde cada subunidade consiste de dois domínios separados por uma fenda profunda onde a glicose se liga.

A ligação da glicose promove uma rotação de 12° de um domínio em relação ao outro, fechando a fenda (BENNETT; STEITZ, 1978) e aumentando a afinidade por ATP (KAJI; COLOWICK, 1965; DELAFUENTE et al., 1970). Em pH neutro, Hxkl e Hxk2 são dímeros que podem ser dissociados em monômeros pelo aumento de pH ou por força iônica (SHILL et al., 1974; WOMACK; COLOWICK, 1978). Embora haja uma grande similaridade estrutural entre as isoenzimas hexokinases de leveduras, a ligação da glicose é fortemente cooperativa entre os dímeros na Hxkl (HOGGETT; KELLETT, 1976a,b) em contraste à Hxk2, na qual ambos os sítios são equivalentes e a ligação é não-cooperativa (HOGGETT; KELLETT, 1976b; MAYES et al., 1983). O equilíbrio de associação-dissociação das hexokinases da levedura parecem desempenhar um papel importante nas propriedades regulatórias dessas enzimas. Tem sido demonstrado que sobre condições de desrepressão ambas as hexokinases ficam predominantemente fosforiladas (VOJTEK; FRAENKEL, 1990) não sendo hábeis para dimerização. A defosforilação pode ser induzida pela adição de glicose (VOJTEK; FRAENKEL, 1990).

Figura 3 – Diferentes formas de representação das enzimas hexokinases

As funções individuais dessas enzimas foram e ainda estão sendo estudadas. Propriedades cinéticas especiais da hexokinase P-II, como ativação por citrato e 3-fosfoglicerato em pH baixo, tem sido atribuída à quelação com íon alumínio, e sua significância fisiológica é incerta (WOMACK; COLOWICK, 1979). A importância individual das isoenzimas parece ser regulada de acordo com a fonte de carbono, sendo que a P-II tem papel predominantemente importante

quando o crescimento ocorre em glicose e a P-I é mais importante para crescimento em etanol (KOPPERSCHLÄGER; HOFMANN, 1969; GANCEDO et al., 1977; MURATSUBAKI; KATSUME, 1979).

2.12 A técnica de deleção de genes baseada em PCR para modificação de *Saccharomyces cerevisiae*

O seqüenciamento do genoma da levedura *Saccharomyces cerevisiae* tem revelado uma abundância de Open Reading Frames (ORFs). Embora algumas destas tenham sido previamente estudadas, a grande maioria representa genes novos (OLIVER et al., 1992). A deleção dessas ORFs é uma ferramenta conveniente para sua análise funcional.

Há anos pesquisadores têm dilacerado genes com o objetivo de estudar os fenótipos desses mutantes. Mutantes obtidos por deleção de genes são vantajosos porque nunca reverterem, porém as técnicas usadas para dilacerar genes têm sido limitadas porque o gene a ser dilacerado tem que ser clonado e, além disso, fragmentos 5' ou 3' do gene são freqüentemente deixados no genoma, deixando dúvidas a respeito do fenótipo nulo (BRACHMANN et al., 1998). Além disso, esse tipo de mutação raramente afeta precisamente um único gene; podendo haver efeitos “colaterais” em um ou mais genes adjacentes, o que pode prejudicar a análise genética. Mais recentemente, a disponibilidade da seqüência completa do genoma aliada à tecnologias recombinantes modernas como a reação de polimerase em cadeia (PCR) permitiram um desenho preciso da deleção eliminando esse tipo de problema (BRACHMANN et al., 1998).

Embora em *S. cerevisiae* a deleção de genes e modificação de genes cromossomais por recombinação homóloga sejam técnicas-padrões, somente mais recentemente técnicas baseadas em PCR, que permitem a deleção em um único passo e “etiquetagem” de genes cromossomais, têm sido desenvolvidas (LONGTINE et al., 1998).

Usualmente a inativação ou deleção de um gene requer a criação *in vitro* de um plasmídeo no qual um marcador selecionável é colocado entre as seqüências 5' e 3' da ORF alvo. Classicamente, esta estratégia requer diversos passos de clonagem. Em contraste, a deleção baseada em PCR gera essa construção baseada em um único passo de amplificação pelo PCR (BAUDIN et al., 1993).

Nesse caso, cada seqüência de deleção de oligodeoxinucleotídeos usados contém duas regiões distintas: uma que permite recombinação homóloga no *locus* alvo e é chamada seqüência

de deleção e outra que permite a amplificação via PCR do marcador selecionável. As seqüências de deleção, são seqüências 5' (oligopro) e 3' (oligoterm) da ORF, e são seguidas por um curto estiramento de 17 nucleotídeos, homólogos ao marcador selecionável (BAUDIN et al., 1993).

Este método permite uma rápida manipulação genética sem requerer clones do plasmídeo de interesse e foi denominado de deleção de genes baseado em PCR (MCELVY; WEBER, 1992; BAUDIN et al., 1993; LORENZ et al., 1995; WACH et al., 1994; 1997). Ele permite a completa deleção do gene de interesse e o substitui com o gene de um marcador auxotrófico. Este procedimento requer o conhecimento da seqüência do gene de interesse e permite a deleção precisa do gene, sua clonagem e o estudo imediato do fenótipo nulo. Com a disponibilidade da seqüência completa do genoma de *S. cerevisiae*, este método tem causado grandes avanços na genética de leveduras permitindo que os pesquisadores rapidamente descubram a possível função dos genes através da avaliação de seu fenótipo nulo e solucionem problemas relativos à análise de famílias de multi-genes.

Semelhante ao seu método predecessor, dilaceração do gene por um passo (ROTHSTEIN, 1983), a deleção de genes baseada em PCR fia-se no fato de que recombinação homóloga em levedura pode ser eficientemente mediada por fragmentos lineares de DNA. O método requer dois primers de PCR de aproximadamente 60 nucleotídeos: os 20 nucleotídeos da seqüência de terminação 3' de cada primer, que são específicos para a amplificação do gene do marcador genético selecionado (e contém seqüências que codificam a cauda) e os 40 nucleotídeos da seqüência de terminação 5', que são idênticos à seqüência genômica (direita e esquerda) do gene de interesse a ser substituído. Usando estes primers alvo, o gene com o marcador auxotrófico é amplificado e resulta num produto de PCR que contém o gene marcador e 40 pares de bases do DNA genômico contendo a seqüência direita e esquerda do gene de interesse a ser deletado. Este DNA amplificado é então transformado diretamente na levedura (ITO et al., 1983). A integração ocorre por recombinação homóloga e transformantes estáveis, cujo gene alvo foi deletado, são selecionados em meio apropriado. Estes transformantes correspondem à células nas quais dois eventos de crossover ocorreram, um em cada final das seqüências de 40 pares de bases do produto do PCR e contém uma seqüência de DNA genômico que substitui o gene de interesse pelo gene com marcador auxotrófico. O método é mais eficiente quando o marcador genético selecionado não pode sofrer recombinação homóloga com o genoma hospedeiro. Por isso, módulos de marcadores heterólogos baseados no gene *kan^r* de *Escherichia coli* que confere

resistência ao antibiótico aminoglicosídeo G418 (geneticina) (JIMENEZ; DAVIES, 1980; HADFIELD et al., 1990) ou o gene *his5⁺* de *Schizosaccharomyces pombe* (que complementa mutações *his3* de *S. cerevisiae*) tem sido desenvolvidos (WACH et al., 1994, 1997). Proteínas de finalização também tem sido usadas.

Neste trabalho mutantes *hxx1 hxx2* de *S. cerevisiae* foram obtidos após o cruzamento de uma linhagem *hxx1* com outra *hxx2*. Essas linhagens, por sua vez, foram obtidas pela técnica de deleção de genes baseada em PCR (BAUDIN et al., 1993; WACH et al., 1994). O cruzamento possibilitou a obtenção de inúmeras linhagens hexokinases-deficientes o que permitiu a seleção de linhagens mais eficientes, ou seja, melhores produtoras de etanol e frutose. Embora essas leveduras sejam geneticamente modificadas, elas não são transgênicas, pois os seus próprios genes é que foram alterados, ou melhor, foram silenciados (ou deletados).

2.13 O cruzamento de leveduras *Saccharomyces cerevisiae*.

Em se tratando de células eucarióticas, a levedura *Saccharomyces cerevisiae* é um excelente modelo e também o mais simples, apresentando núcleo verdadeiro, mitocôndrias estruturadas e um sistema intracelular limitado por membranas (ROMAN, 1981).

Por ser um microrganismo predominantemente unicelular torna-se bastante atraente e promissora para pesquisas bioquímicas e genéticas. Além disso, ela apresenta um ciclo de reprodução bastante curto, onde o tempo de geração e a facilidade de manipulação e de manutenção em condições estabelecidas proporcionam rápida produção de biomassa, o que facilita as análises (ROSE, 1975; FOWELL, 1969b).

A genética microbiana como um todo, vem sendo foco de muitas pesquisas, principalmente em função das potencialidades científicas e econômicas apresentadas por diversos microrganismos. Tendo em vista, a utilização da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, através de métodos recombinatórios por cruzamentos direcionados, torna-se essencial o conhecimento da biologia da espécie que possui características favoráveis ao estudo genético (KIDO, 1990).

• O ciclo celular de *S. cerevisiae*

O ciclo celular de *S. cerevisiae* é caracterizado por uma base vegetativa diplóide, onde a meiose precede a esporulação, formando quatro esporos haplóides, que permanecem encerrados numa estrutura denominada asco, até a fase de liberação para o meio (ESPÓSITO; KLAPHOLZ, 1981; PRINGLE; HARTWELL, 1981).

Após a liberação dos esporos, se as linhagens forem do tipo heterotáticas, a haplofase pode se estabelecer mais ou menos indefinidamente, multiplicando-se os esporos por mitoses sucessivas. Estes, quando confrontados com esporos de reação sexual contrária (a com α , ou vice-versa) formam híbridos diplóides, iniciando assim a diplofase. Tal fase pode se perpetuar através de divisões mitóticas até que condições adversas se estabeleçam, induzindo os híbridos ($2n$) a entrarem em meiose, produzindo novos ascos e esporos (n) (ROMAN, 1981).

No caso de linhagens homotáticas, as células da haplofase não são estáveis. Nas primeiras divisões, após a germinação, ocorre a modificação do tipo de reação sexual em uma das células, permitindo o cruzamento e restituindo a diplofase, que é estável e se estabelece por mitoses sucessivas. Em condições adversas essa diplofase pode ser interrompida induzindo eventos meióticos e restaurando os ascos (HERSKOWITZ; OSHIMA, 1981).

• Esporulação

A esporulação em leveduras consiste na formação de esporos dentro de um asco por um processo meiótico. Em *Saccharomyces*, o número de esporos por asco varia de um a quatro, possuindo normalmente formato esférico. As leveduras esporulam em condições adversas, sendo os esporos um pouco mais resistentes ao calor e ao álcool do que as células vegetativas (FOWELL, 1969a).

Métodos visando melhorar a eficiência da esporulação foram apresentados por Harber e Halvorson (1975).

Tanto a meiose quanto a esporulação requerem a presença dos alelos para a reação sexual (MAT a e MAT α) e ambas ocorrem quando há condições de escassez, principalmente de nitrogênio e na presença de uma fonte de carbono não fermentável, como o acetato (HARBER; HALVORSON, 1975).

A otimização da esporulação pode ser conseguida transferindo-se células diplóides, de um meio completo para um meio de esporulação, contendo 1% de acetato de potássio e os requerimentos mínimos da linhagem, permitindo algumas divisões antes da esporulação. O pH deve ser próximo da neutralidade e a temperatura ao redor de 30°C. A ausência de nitrogênio combinado com uma fonte escassa de carbono causa um desbalanço metabólico, no qual o ciclo do glioxalato falha em produzir níveis de aminoácidos suficientes para a síntese protéica, desencadeando a meiose (ESPÓSITO; KLAPHOLZ, 1981; FOWELL, 1969a).

Para estudos genéticos os esporos precisam ser isolados e para isso os ascos têm que ser rompidos. O rompimento da parede do asco pode ser físico, com uma leve pressão externa, tomando-se o cuidado para não danificar os esporos, ou enzimático (utilizando-se extrato de *Bacillus polymixa* ou extrato digestivo de *Helix pomaxia* ou protease de *Streptomyces griseus*), tomando-se o cuidado para não afetar a viabilidade dos esporos (FOWELL, 1969a; HARBER; HALVORSON, 1975).

A dissecação do asco para estudos genéticos ou análises meióticas de *Saccharomyces cerevisiae*, pode ser feita manualmente (MUNZ, 1975) ou com a ajuda de um micromanipulador (SHERMAN, 1975).

O uso de micromanipuladores (Figura 4) em estudos genéticos de leveduras é útil não somente para fins de separação de esporos dos ascos individuais, fundamentais em análises de tétrades em processos de mapeamento (MORTIMER; HAWTHORNE, 1975; MORTIMER; SHILD, 1981) como também para a separação dos zigotos da mistura de células haplóides parentais (SHERMAN, 1975). Essas metodologias tornam-se de grande valia para o melhoramento, na recuperação do híbrido e de seus esporos. Como as frequências de esporulação são variáveis, o que em certos casos pode comprometer a obtenção de tétrades completas necessárias à análise genética, devida a inviabilidade de esporos ou taxas reduzidas de ascos completos, estes fatores tendem a dificultar a obtenção de híbridos em um programa de melhoramento.

Figura 4 – Micromanipulador de células acoplado à um microscópio óptico pertencente ao Laboratório de Genética de leveduras – ESALQ/USP

Como a esporulação em leveduras é um processo meiótico, dois eventos de grande importância ocorrem durante suas fases: a recombinação genética e a segregação cromossômica. Ambos participam na geração de novos genótipos durante a reprodução sexual e contribuem com a variabilidade genética. Assim, a esporulação e a hibridização podem ser consideradas como etapas valiosas do melhoramento (TAVARES, 1974; TAVARES; ECHEVERRIGARAY, 1987).

• **Hibridização**

Sob condições nutritivas desejáveis, os esporos podem se fundir aos pares formando zigotos (híbridos), nos quais, após a fusão nuclear, a condição diplóide é restaurada (FOWELL, 1969a; ROSE, 1975).

Fowell (1969a) apresenta três métodos principais de hibridização:

- a) Método de pareamento de esporos, que tem como vantagem distinguir, sob microscopia, os zigotos formados por fusão de esporos recém-germinados; e como desvantagem a baixa taxa de fusão entre os pares de esporos pareados.
- b) Método de pareamento de células haplóides, no qual, a formação dos zigotos, observada microscopicamente, tem como vantagem o fato de os clones de mesmo genótipo poderem ser usados em vários cruzamentos e como desvantagem o “enfraquecimento” da reação sexual, quando várias células estão pareadas juntas, e a inconstância da fusão de células haplóides para a formação de zigotos.
- c) Cruzamento massal, no qual um grande número de células de reações sexuais contrárias, são misturadas e os zigotos posteriormente avaliados quanto a esporulação.

O cruzamento massal é comumente recomendado para a hibridização de linhagens industriais e tem sido utilizado em diversos programas de melhoramento (TAVARES, 1974).

• **Análise de tétrades e recombinação meiótica**

Em *S. cerevisiae*, os quatro esporos pertencentes ao mesmo asco podem ser isolados e analisados. Os ascus formados são classificados como tétrades não ordenadas, pois a sequência de seus esporos não fornece informação alguma a respeito dos eventos meióticos (BURNETT, 1975; FINCHAM et al., 1979).

Análises de tétrades em *S. cerevisiae* têm sido exaustivamente realizadas, com importantes contribuições para o mapeamento genético, conforme demonstram os trabalhos de Mortimer e Hawthorne (1969 e 1975), Mortimer e Schild, (1981 e 1985) e Mortimer et al.,

(1989). Tais análises fornecem maiores informações genéticas do que uma simples análise de esporos ao acaso. Em particular, pode-se determinar a ligação entre genes e de genes com o centrômero e a interferência cromatídica e também se reconhecer a letalidade quando associada com aberrações cromossômicas e mutações, conversão gênica, etc. (MORTIMER; HAWTHORNE, 1975; MORTIMER; SCHILD, 1981).

2.14 Matérias-primas utilizadas na fermentação alcoólica

Qualquer produto que contenha açúcar ou outro carboidrato, constitui-se em matéria-prima para a obtenção do etanol. O carboidrato pode ser convertido a etanol por via direta (quando a matéria-prima pode ser metabolizada pelo microrganismo utilizado) ou por via indireta (quando há a necessidade de uma etapa de hidrólise do material que resulta na formação de açúcares que possam ser metabolizados pelos microrganismos). Entretanto, para que seja viável economicamente é preciso considerar-se seu volume de produção, o rendimento industrial e o custo de fabricação (LIMA et al., 2001).

As matérias-primas usadas para a produção de etanol podem ser classificadas em: *matérias açucaradas*, agrupando cana-de-açúcar, beterraba açucareira, sorgo sacarino, milho sacarino, melaços, mel de abelhas e frutas; em *matérias amiláceas e feculentas*, agrupando grãos amiláceos, raízes e tubérculos feculentos; e em *matérias celulósicas*, incluindo palhas, madeiras, resíduos agrícolas e resíduos sulfíticos de fábricas de papel (LIMA et al., 2001).

A sacarose é a representante mais importante dos componentes da cana-de-açúcar e dos melaços. O processo de alcoolização é fácil, não exige conhecimentos profundos e a matéria-prima que se usa nas indústrias nem sempre é pura (LIMA et al., 2001).

As matérias amiláceas e feculentas fermentam após uma hidrólise, que se denomina de sacarificação, pela qual o amido in fermentescível se transforma em açúcar fermentescível. Essa hidrólise pode ser ácida ou enzimática, utilizando enzimas obtidas do malte ou de fungos (MORI; INABA, 1990). Os álcoois de cereais produzem-se no Brasil em pequena escala, com maior importância para a indústria de bebidas.

A massa de matérias celulósicas disponível é vultosa, mas ainda não oferece, para o País, condições econômicas para a produção de etanol. O processo de hidrólise, necessário para sacarificar a celulose é complexo, geralmente feita pela ação de ácidos minerais (MACKIE et al.,

1982) e o teor de açúcares fermentescíveis obtenível é inferior ao encontrado nas matérias-primas sacarinas.

Embora tanto o amido quanto a celulose sejam polímeros de glicose, é muito mais difícil hidrolisar a celulose do que o amido. Isso porque sua estrutura é mais cristalina, protegendo as ligações internas da hidrólise. Além disso, a celulose em plantas é protegida pela lignina, um material polifenólico que forma uma camada protetora ao redor da molécula de celulose, prejudicando ainda mais o rendimento da hidrólise. Uma alternativa para a hidrólise ácida é a hidrólise enzimática. Embora as enzimas eliminem os problemas de corrosão e perda do rendimento devido à hidrólise ácida, os processos enzimáticos têm também suas desvantagens. A eficiência da hidrólise enzimática normalmente diminui conforme a glicose vai acumulando no meio, a menos que esta seja removida (HAYES, 1982; QURESHI; MANDERSON, 1995).

Em se tratando do Brasil as matérias-primas, de importância econômica imediata para a produção de etanol industrial, são os melaços e o caldo da cana-de-açúcar; para a preparação de bebidas destiladas, a cana-de-açúcar e as matérias amiláceas, com destaque para o milho. A mandioca é matéria feculenta potencial. A utilização de rejeitos da agroindústria é uma outra alternativa aparentemente promissora. Contudo, os custos envolvidos na remoção de água dos rejeitos ainda são muito elevados. O soro de queijo, um subproduto abundante na agroindústria, também parece ser uma matéria-prima potencial para a produção de etanol (GUIMARÃES et al., 1992; MAIORELLA; CASTILLO, 1984). Entretanto, embora haja diversas opções, a quase totalidade do álcool industrial produz-se à partir do caldo e do melaço da cana.

Cana-de-açúcar: o açúcar predominante da cana é a sacarose. Os açúcares redutores compõem-se primordialmente de glicose e frutose. Esses açúcares se encontram em proporções quase iguais nas canas imperfeitamente maduras. À medida que avança o amadurecimento, seus teores diminuem, podendo não ser detectados nas canas perfeitamente maduras. O teor de frutose diminui primeiro, até desaparecer. Por influência dos fatores que influem na composição da matéria-prima, a cana-de-açúcar pode conter: 74,5% de água, 14% de açúcares (12,5 de sacarose, 0,9 de glicose e 0,6 de frutose), 10% de fibras e o restante dividido entre matérias minerais, compostos nitrogenados, ceras, pectinas e ácidos. O caldo obtido pela moagem da cana-de-açúcar encerra entre 78 e 86% de água, 10 e 20% de sacarose, 0,1 e 2% de açúcares redutores, 0,3 e 0,5% de cinzas e entre 0,5 e 1,0 % de compostos nitrogenados. O pH do caldo varia entre 5,2 e 6,8. A eficiência de extração média do caldo da cana por moagem é de 95% e o resíduo sólido

restante é composto de fibras (bagaço) (LIMA et al., 2001). Esse bagaço é usado principalmente para produção da energia usada na moagem, aquecimento e concentração do caldo e na destilação do etanol. Resta ainda um excedente de aproximadamente 20% que pode ser usado na cogeração de eletricidade, à qual pode ser vendida à companhias elétricas durante o período de seca no Brasil, quando a demanda por eletricidade é alta devido à diminuição de capacidade das hidroelétricas. O bagaço parcialmente hidrolisado pode ser usado também como alimentação animal e nas indústrias de papel e de madeiras para construção (WHEELS et al., 1999).

A cana-de-açúcar é uma cultura tropical e subtropical, tolerante à seca, plurianual, com colheita anual. De maneira geral, ela é economicamente produtiva por três anos consecutivos. Dependendo da região e dos cuidados agrícolas, esse período pode ser estendido. Admite-se que a média do rendimento agrícola atinge entre 85 e 100 toneladas por hectare por ano, em grandes culturas e em condições normais. A tonelage da primeira colheita é a maior e decresce anualmente, até a reforma do canavial (LIMA et al., 2001).

A proporção de caldo produzido pela moagem varia de 50 a 100% do peso da cana, isto é, uma tonelada produz de 500 a 1.000 litros de caldo; comumente admite-se a média de 850 litros. A extração em caldo depende do preparo da cana para moagem, número de esmagamentos e porcentagem de embebição usada. Primordialmente depende do processamento, se para produzir açúcar ou álcool, e do custo do balanço térmico. A embebição extrai mais sacarose, mas dilui o caldo normal, aumenta o volume em operação e, em consequência, aumenta o gasto de vapor (LIMA et al., 2001).

Melaços: O melaço tem sido a fonte de açúcar mais utilizada na fabricação de etanol por muito tempo em vários países. Denominam-se melaços os resíduos da fabricação de açúcar que não são mais utilizados para a separação da sacarose. Eles se originam nas usinas de açúcar, pela centrifugação das massas cozidas para a separação dos cristais de açúcar (LIMA et al., 2001).

No Brasil, afora uma pequena percentagem oriunda da fabricação de açúcar demerara para exportação, os melaços provêm da fabricação de açúcar cristal branco, para consumo direto, após processo de industrialização, no qual clarifica-se o caldo de cana-de-açúcar com sulfitação seguida de calagem. Conforme o tipo de processamento do açúcar, pode-se ter melaço de primeira, mel pobre de primeira, melaço de segunda, mel rico de segunda e mel final, também chamado de mel residual ou esgotado (LIMA et al., 2001).

No Brasil, todos os méis que se enviam para a destilaria, qualquer que seja sua composição, denominam-se de mel final. Sua composição varia de acordo com o processo de produção do açúcar; entretanto, pode-se admitir que encerra, em números gerais, até 62% de açúcares, 20% de água, 8% de cinzas, 3% de matérias nitrogenadas e 7% de outros, como gomas e ácidos. Na fração açúcares distinguem-se 32% de sacarose, 14% de dextrose e 16% de levulose, além de ser uma fonte rica de minerais e vitaminas necessárias para o crescimento microbiano. De maneira geral, não se incorre em erro afirmar que o melaço encerra 50% de açúcares fermentescíveis. No processo industrial, o melaço é normalmente diluído, o microorganismo é inoculado e a fermentação é conduzida não assepticamente, a uma temperatura em torno de 34 °C, por cerca de 4 h (QURESHI; MANDERSON, 1995; CARIOCA; ARORA, 1984).

Quanto mais açúcar se obtiver das massas cozidas, menos sacarose se encontra no mel final. Este se obtém em proporções variáveis, segundo o processo de fabricação, excesso de cana-de-açúcar e outros fatores. Admite-se comumente a produção de 25 a 40 litros por tonelada de cana consumida na indústria, mas esta proporção pode atingir 50-60 litros, por efeito de fenômenos de estiagem, geadas e outros (CARIOCA; ARORA, 1984).

Milho: o milho limpo, ventilado, em condições de armazenamento, apresenta-se com 9 a 15% de água, 59 a 70% de extrativos-não-nitrogenados, 5 a 15% de material proteico, 1,5 a 8,5% de material celulósico e 1,3 a 4% de cinzas. A produção no Brasil é variável, de 1 a 3 toneladas de grãos por hectare, mas pelas campanhas de produtividade incentivadas, há registros de mais de 7 toneladas por hectare. Embora no Brasil o milho não seja destinado à produção de etanol, nos Estados Unidos, aproximadamente 10% do milho colhido é destinado para essa produção (SCHMITZ; POLOPOLOUS, 1999).

2.15 Agente de fermentação

As leveduras são os microrganismos mais importantes na obtenção do álcool por via fermentativa. Bactérias, entre as quais a *Zymomonas mobilis*, são tidas como capazes de produzir etanol (LYNESS; DOELLE, 1981; DOELLE; GREENFIELD, 1985a,b) mas, economicamente, as leveduras ainda são os agentes largamente usados. A levedura da fermentação alcoólica é a *Saccharomyces cerevisiae*, da qual foram selecionadas várias linhagens, tidas por muito tempo como espécies: *Saccharomyces ellipsoideus*, *S. carlsbergensis* e *S. uvarum*. Cada linhagem (isolada de meios diferentes) de vinho, de cerveja ou de mostos de destilarias tem suas carac-

terísticas próprias, afetadas pelas condições em que o processo fermentativo se desenvolve, sendo que o desempenho do processo fermentativo é enormemente afetado pelo tipo de levedura que o executa (LIMA et al., 2001).

2.16 Sistemas de fermentação alcoólica

Para a produção de etanol os processos podem ser descontínuos (ou batelada), contínuos ou semi-contínuos (LIMA et al., 2001).

Nos processos descontínuos distinguem-se quatro tipos de fermentação industrial (LIMA et al., 2001):

- *Sistema de cortes.* Depois que se faz a primeira fermentação, divide-se o volume de mosto fermentado por dois recipientes, completam-se os dois e deixa-se fermentar. Um envia-se para a destilaria e o outro serve para produzir o inóculo (ou "pé") para mais dois, e assim por diante.
- *Sistema de reaproveitamento do inóculo.* Após a fermentação deixam-se decantar as leveduras, retira-se o substrato fermentado para a destilação, trata-se o inóculo precipitado no fundo da dorna, e se realimenta com novo mosto.
- *Sistema de cultura pura.* Parte-se de um tubo de cultura pura para cada ciclo de fermentação, seguindo-se todas as fases de preparo do inóculo, nas etapas de laboratório e industrial, até às dornas de fermentação, nas quais se juntam o inóculo e o mosto. É uma técnica trabalhosa, que não se usa a não ser em trabalhos experimentais. Nesse sistema não ocorre o problema de substituição de linhagens.
- *Sistema de recuperação de leveduras* (com reciclagem ou de reciclo de leveduras). Nesse sistema, posto em prática nos meados da década de 1930 e amplamente usado no Brasil, após a fermentação passa-se todo o vinho por centrífugas, nas quais se separa o creme ou de leite de leveduras. Esse leite, que corresponde a 10 a 20% do volume da dorna, é enviado para purificação em um tanque onde é diluído e tratado com ácido sulfúrico até pH 2,2 a 3,2 sob agitação por 3 a 4 horas. Depois do tratamento envia-se esse leite tratado para outra dorna, na qual reinicia-se nova fermentação após realimentação com novo mosto.

Com o sistema de reaproveitamento de inóculo, por muito tempo usado nas destilarias de aguardente, e com o sistema de recuperação de células, reduz-se muito o tempo de fermentação, porque diminui-se substancialmente a fase inicial. Nesses sistemas coloca-se o substrato em

contato com uma elevada concentração de leveduras (3×10^9 cél/L, ou mais), o que permite que se entre rapidamente na fase tumultuosa do processo fermentativo, obtendo-se com isso vantagens econômicas (LIMA et al., 2001).

Os processos de fermentação contínuos são relativamente recentes, embora seu uso industrial tenha se iniciado na década de 1940. Embora tenha-se ensaiado usar esse processo de fermentação contínua anteriormente, o interesse pelo seu uso despertou após o estímulo à produção de etanol (PROÁLCOOL) decorrente da crise econômica causada pela alta dos preços do petróleo na década de 1970 (LIMA et al., 2001).

A fermentação contínua, faz-se, em sua forma mais simples, alimentando uma dorna com fluxo contínuo de meio em uma determinada concentração, retirando-se dela, de forma contínua, o vinho que se encaminha para a destilação ou para as dornas de espera, onde termina o processo e daí para a destilaria. Nesse tipo de processo a produtividade de etanol pode chegar a 10 g/L.h (MAIORELLA et al., 1984).

Os processos contínuos podem ser conduzidos em um único fermentador, em fermentadores ligados em série, com sedimentação de microorganismos no próprio fermentador (microorganismos floculantes), com reciclo de células, com células imobilizadas e/ou com separação de etanol durante a fermentação.

Na fermentação contínua em série é necessário ligações entre as dornas que trabalham de forma intermitente, por carga e descarga, de modo que o mosto em fermentação passa da primeira à última da série de recipientes. O mosto em fermentação sai pela base de uma dorna e entra lateralmente na seguinte, continuamente até a última, de onde segue para a destilaria. A alimentação de mosto faz-se na primeira ou nas duas primeiras dornas, e a circulação de uma para outra dorna faz-se por vasos comunicantes ou por meio de bombas. Em algumas instalações recolhe-se o mosto fermentado da última dorna, onde termina a fermentação dos açúcares e dali conduz-se para a destilaria. A recuperação das leveduras faz-se para a renovação do levedo e reinoculação nas primeiras dornas onde ocorre a entrada de mosto.

Os processos semi-contínuos, também chamados batelada alimentada, surgiram para se contornar o problema da baixa produtividade do processo em batelada. Nesse tipo de processo, a fermentação já ocorre durante a carga da dorna, e é feito o reaproveitamento de células, aumentando a produtividade, devido à diminuição do tempo de fermentação

No presente trabalho as fermentações foram feitas simulando-se o sistema de recuperação de leveduras de processos descontínuos (batelada) (fazendo-se o reciclo de leveduras).

Muitas pesquisas sobre alternativas econômicas para o processo de produção de etanol tem sido desenvolvidas. Há estudos que envolvem a pesquisa de diferentes sistemas para a fermentação alcoólica, como por exemplo imobilização de leveduras em géis (GHOSE; BANDYOPADHYAY, 1980; WILLIAMS; MUENNECKE, 1981), imobilização de leveduras dentro do fermentador através de reciclo de células, utilizando membranas de microfiltração (URIBELARREA et al., 1990), ou fermentação extrativa, onde etanol e outros inibidores são removidos por diferentes processos (KANG et al., 1990).

2.17 Aspectos econômicos

O açúcar é a maior “commodity” produzido e comercializado no mundo todo e o Brasil é o maior “player” no mercado mundial de açúcar apesar de pouco mais de metade da cana-de-açúcar produzida no Brasil ser destinada para a produção de etanol. Em contraste com o Brasil encontra-se os Estados Unidos onde o milho é a matéria-prima usada (ao invés da cana-de-açúcar ou da beterraba) para a produção de etanol. Também, nos EUA aproximadamente metade do mercado de adoçantes é representado pelos HFCS, derivados do milho. Estas diferenças podem ser explicadas pela diferença de preços das matérias-primas nos dois países: o milho e a cana-de-açúcar. Enquanto nos EUA o milho é produzido a preços baixos, no Brasil é a cana que é produzida a preços baixos. Políticas governamentais de ambos os países também influem nos preços da cana, do milho e de seus derivados (SCHMITZ et al., 2003).

Enquanto em 1999 o Brasil produziu 10.5×10^9 L de etanol hidratado e 6.5×10^9 L de etanol anidro à partir da cana, os EUA (2º maior produtor mundial) produziram 5.3×10^9 L de etanol anidro à partir do milho enquanto o Canadá produziu 0.24×10^9 L de etanol anidro (também derivado do milho) (WHEALS et al., 1999).

O xarope com alto teor de frutose (HFS), obtido do milho, começou a ser desenvolvido, principalmente nos EUA, na década de 60, através da simples mistura de partes iguais de glicose e frutose. Com o tempo, o edulcorante líquido provou ser um substituto adequado para a sacarose importada e, atualmente, o HFS é utilizado como edulcorante em bebidas carbonatadas não alcoólicas, alimentos (principalmente frutas) enlatados, processados, de panificação, geléias, gelatinas, derivados do leite e produtos dietéticos. Desde a década de 70 houve uma mudança

significativa no tipo de edulcorantes utilizados nos Estados Unidos. Em muitos alimentos e bebidas, a sacarose foi substituída por HFS, produzido do milho (HANOVER;WHITE, 1993).

O consumo de frutose tem sido crescente devido tanto ao crescimento do consumo per capita, quanto ao crescimento populacional. A produção de HFCS nos Estados Unidos em 1994/95, por exemplo, ficou em torno de 7,8 milhões de toneladas (base seca), 4,4% maior que o nível de 1993/94. Já em 1995/96 a produção alcançou 8,15 milhões de toneladas, ou seja, 4,3% maior que em 1994/95 (INTERNATIONAL SUGAR ORGANIZATION, 2000).

Os Estados Unidos são, de longe, os maiores produtores (71% da produção mundial) e consumidores mundiais de HFCS (Figura 5), sendo o Japão o segundo maior produtor mundial (SCHMITZ et al., 2003). Nos EUA, ao redor de 10% do milho colhido é destinado para a produção de HFCS enquanto aproximadamente a mesma porcentagem desse milho é destinada para a produção de etanol (SCHMITZ; POLOPOLOUS, 1999).

Figura 5 – Produção de HFCS por diferentes países em 2004

Fonte: LMC International

Mesmo em épocas de alta no preço do milho, não se tem observado um aumento no preço do HFCS-55 nos EUA. Um comportamento similar é relatado para os preços do xarope HFCS-42. Uma vez que o consumo de HFCS-55 é amplamente direcionado pela demanda do setor de bebidas não alcoólicas, que conta com aproximadamente 90% do consumo deste xarope, a expansão da indústria de bebidas não alcoólicas esperada para os próximos anos leva a crer no

aumento concomitante do consumo de HFCS. A utilização da grande parte do HFCS-42 está também no setor de bebidas, contando com pelo menos 40 a 45%. No entanto, o uso deste xarope em outras categorias de alimentos é responsável pela maior parte do seu consumo e vem se expandindo recentemente. O seu uso no setor de panificação e cereais matinais cresceu 14,5% de 1993 a 1995. Mesmo assim, a utilização de xarope HFCS-55 é responsável ainda por 60% do consumo de todo HFS nos Estados Unidos (ISO, 2000).

Outros mercados consumidores de HFCS reconhecidos pela Associação Internacional de Açúcar (ISO) são o Japão, México e Hungria. O consumo de HFCS no Japão é estável e situa-se em torno de 837.700 toneladas por ano. A previsão do comportamento do consumo e produção de HFCS no Japão é complicada, pois além do mercado sazonal, o país importa o milho dos Estados Unidos, ficando dependente dos preços de importação desta matéria-prima. Altas no preço do milho, levam a altos custos na produção de HFCS, tornando o seu preço pouco competitivo em relação ao preço do açúcar. Um importante desenvolvimento na indústria do HFCS é o aparecimento do México como um consumidor deste produto. O potencial desse país é grande devido ao tamanho e às perspectivas de aumento de produção do seu setor de refrigerantes (15,5 bilhões de litros foram produzidos em 1995). A utilização de HFCS pelo México ainda é pequena (cerca de 90.700 toneladas em 1995), e quase todo o xarope utilizado é importado dos Estados Unidos. No entanto, o México já tem capacidade para produção de HFCS, produzindo cerca de 45.450 toneladas em 1996. Outras fábricas foram construídas em 1996/1997, com capacidade anual em torno de 68.000 toneladas. O consumo de HFCS na Hungria tem expandido recentemente. Dados oficiais fornecidos pela ISO mostram que a produção em 1995 alcançou 142,2 mil toneladas. Atualmente existe uma planta na Hungria para produção de HFCS-42 para utilização em indústrias de panificação e de refrigerantes. De maneira geral, o HFCS não está estabelecido na Europa Oriental devido à falta de tecnologia adequada de processamento, limitações no manuseio e estoque do edulcorante líquido e baixo consumo per capita de refrigerantes. A produção de HFS pela América Latina é bem pequena e o Brasil não se inclui entre os produtores (VUILLEUMEIR, 1993; SCHMITZ et al., 2003; SECEX/NUCEX, 2000 apud DI LUCCIO, 2001).

2.18 Produção de etanol e frutose como alternativa para a indústria de etanol

Embora o Brasil possua um enorme potencial para a produção de etanol para fins combustíveis, a indústria do etanol é vulnerável à vários problemas econômicos que limitam a sua produção, onde destaca-se o preço de combustíveis fósseis e o mercado do açúcar, cuja matéria-prima é a mesma. Do ponto de vista tecnológico, muitas alternativas ao processo de produção do etanol já foram propostas e algumas implementadas; sem se alcançar soluções práticas que melhorassem a viabilidade econômica do processo.

Como pode se perceber, existe ainda um bom potencial para a produção de xaropes contendo mais que 55% de frutose no mercado mundial. No mercado brasileiro, particularmente, existe um grande potencial para a produção de HFS e de frutose cristalizada, devido às dimensões do país e disponibilidade de matéria prima, além do fato de grande parte do xarope de frutose e frutose cristalizada utilizadas serem importadas.

Dentro desse âmbito, alterações no processo fermentativo visando a produção de um composto com maior valor agregado como a frutose, simultaneamente ao etanol, pode levar a um aumento da rentabilidade do processo. Desta forma, a produção de frutose como um co-produto no processo fermentativo, pode representar uma alternativa capaz de melhorar economicamente a produção de etanol em algumas pequenas usinas que possuam melhores condições para direcionar sua produção, seja para exportação ou consumo interno. O objetivo desta tese é propor e estudar um processo para a produção de etanol e frutose baseado na fermentação seletiva de sacarose.

2.19 Material e métodos

2.19.1 Microrganismos

Duas linhagens parentais de *Saccharomyces cerevisiae* (obtidas da EUROSCARF (EUROPEAN *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* ARCHIVES FOR FUNCTIONAL ANALYSIS) foram utilizadas no presente trabalho:

- a) Orf: YFR053c; Acc n^o: Y05867; Genótipo: BY4741; MAT a; his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0; YFR053c::kanMX4.
- b) Orf: YGL253w; Acc n^o: Y14620; Genótipo: BY4742; MAT alpha; his3Δ1; leu2Δ0; lys2Δ0; ura3Δ0; YGL253w::kanMX4.

Obs: Enquanto a levedura a não contém o gene *HXX1* responsável pela produção da enzima hexokinase A ou P-I, a levedura b não possui o gene *HXX2*, responsável pela produção da enzima hexokinase B ou P-II. Essas duas linhagens foram cruzadas e os duplo mutantes obtidos (hexokinases-deficientes) foram utilizados nos ensaios de fermentação.

Como controle foi utilizada a linhagem selvagem Pedra (PE), obtida da coleção de leveduras do Laboratório de Bioquímica do Departamento de Ciências Biológicas da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiróz”- USP.

2.19.2 Meios de cultura usados

Para o armazenamento, o crescimento e o cruzamento das linhagens os meios foram preparados de acordo com protocolos padrões (SHERMAN, 1991).

Para os ensaios de fermentação foram utilizados os meios sintéticos: extrato de levedura, 10,0 g; peptona, 10,0 g; para 1,0 L de água deionizada, variando a fonte de carbono: para o meio de frutose foi usado 12,55% desse açúcar; para o de glicose, 13,91% e para o de sacarose, 18,03%.

Para ensaios de fermentação também foram utilizados meios de caldo de cana-de-açúcar puro (com 263 g.L⁻¹ de açúcares redutores totais [ART]) e diluído (com 164 g.L⁻¹ de ART) e de melaço de cana-de-açúcar (com 670, 526, 406 e 264 g.L⁻¹ de ART).

Para a recuperação da frutose foi utilizado caldo de cana puro, filtrado e esterilizado, extraído de cana-de-açúcar por moagem.

2.19.3 Métodos genéticos

Os cruzamentos, isolamento de diplóides e a esporulação foram feitos seguindo métodos propostos por Sherman e Hicks (1991).

As linhagens a serem cruzadas (a e b), portadoras de reações sexuais diferentes (a e α , respectivamente), foram estriadas em placas de Petri contendo o meio YEPS, e incubadas a 30°C por 24h. Após isso, uma pequena quantidade de células, de cada linhagem, foi misturada e espalhada sobre nova placa de Petri com o meio YEPS (cruzamento), de tal forma que se formasse uma película. A placa foi então incubada a 30°C por 4 h, durante esse período os zigotos foram formados, podendo ser observados ao microscópio.

Dessa placa foi retirado um número reduzido de células que, com o auxílio de um palito, foram estriadas sobre uma nova placa de Petri contendo meio YEPS. Esta placa foi colocada invertida sob um microscópio óptico (Olympus), ao qual encontrava-se adaptado um micromanipulador com agulha de vidro (Figura 5). Os zigotos puderam ser identificados pela sua morfologia peculiar e, através de micromanipulação foram isolados à distâncias regulares, na própria placa de Petri.

Esses zigotos (linhagem híbrida, 2n) formaram pequenas colônias que foram estriadas em outra placa de Petri contendo o meio YEPS, e incubadas a 30°C por 24h.

Após essa incubação essas linhagens foram repicadas para uma placa de Petri contendo meio de esporulação, e incubadas a 30°C por 4 a 5 dias. No final desse período essas linhagens formaram esporos que foram digeridos. Para tal, uma alçada de células da placa foi misturada com 300 μ L de uma solução para digestão de ascos (contendo a enzima Zimoliase) em um “ependorf” e incubada por 40 minutos em temperatura ambiente.

Após isso, estriou-se essa mistura em uma placa de Petri contendo o meio YEPS, de tal modo, que as células permanecessem isoladas. Esta placa foi invertida sob o microscópio com o micromanipulador adaptado (Figura 5) e os quatro esporos de ascos completos (tétrades) foram transferidos para posições isoladas e determinadas na placa. Esses esporos formaram colônias e foram analisados quanto à capacidade de crescer em frutose, glicose e sacarose.

2.19.4 Análise das linhagens (confirmação do duplo mutante)

Para isolar as linhagens hexokinases-negativas foram feitas análises de crescimento em meios de multiplicação apresentando como fonte de carbono glicose ou frutose ou sacarose. Após 48 horas de crescimento (30°C) foi feita a leitura de absorbância em um espectrofotômetro BECKMAN DU-600 (600nm). Nessa triagem, foram selecionadas 23 linhagens hexokinases-deficientes. Dessas, três (denominadas U1, I1 e J3) foram utilizadas em ensaios subseqüentes, pois apresentaram menores crescimentos em meio YEPF.

2.19.5 Crescimento das linhagens

Neste experimento, as três linhagens selecionadas foram novamente testadas quanto à sua incapacidade de crescer em meio com frutose como fonte de carbono. Elas foram comparadas com a linhagem controle Pedra (PE) quanto ao crescimento em meios de multiplicação YEPD, YEPF e YEPS à 30°C sob agitação, sendo feita coletas e leituras de absorbância a cada 2 horas, até o tempo 12 horas, em um espectrofotômetro BECKMAN DU-600 (600nm).

2.19.6 Ensaios de fermentação

- **Multiplicação das leveduras:** foram realizadas em meio YEPD (1% de extrato de levedura, 1% de peptona e 2% de glicose diluídos em água destilada) a partir de culturas puras (armazenadas em tubos inclinados) e conservadas com óleo mineral. A primeira inoculação foi feita em tubos de ensaio contendo 10 mL do meio (35°C/24 horas). Estes tubos foram vertidos completamente em frascos Erlenmeyer com o meio e incubados, sob agitação (35°C/62 horas). Após a obtenção da levedura necessária para o ensaio, a mesma foi separada mediante centrifugação (4000 x G por 5 minutos) e transferida para os frascos de fermentação.
- **Ensaios fermentativos:** foram realizados em tubos de centrífugas com capacidade para 150 mL, contendo 4,5 gramas de biomassa centrifugada de leveduras e 45 mL do meio de fermentação. Esses tubos foram incubados a 33°C $\pm$ 1°C.

- **Primeiro ensaio:** foram utilizadas quatro linhagens: três mutantes obtidas (U1, I1 e J3) e a controle Pedra (PE). Como substratos foram preparados dois meios. O primeiro com: 1% de extrato de levedura, 1% de peptona e 12,55% de glicose e o segundo com: 1% de extrato de levedura, 1% de peptona e 13,91% de frutose, ambos diluídos em água destilada e esterilizados a 120°C, 0,5 atm, por 30 minutos.

Esse experimento durou 16 horas, sendo que, a cada 4 horas foi retirada uma amostra para determinação do teor de etanol e de açúcares. Foram feitos oito tratamentos (utilizando-se as quatro leveduras em dois substratos). Para cada levedura em diferente substrato foram feitas duas repetições perfazendo um total de 16 parcelas.

- **Segundo ensaio:** foram utilizadas as linhagens parentais: Acc nº Y05867 e Acc nº Y14620, que serão denominadas Y0 e Y1, respectivamente; as mutantes obtidas: I1 e J3; e a linhagem controle Pedra (PE). Como substrato foi utilizada sacarose, sendo o meio preparado com: 1% de extrato de levedura, 1% de peptona e 18,07% de sacarose diluídos em água destilada e esterilizado a 120°C, 0,5 atm, por 30 minutos.

Cada ciclo fermentativo durou 12 horas, após isso foi retirada uma amostra (0,1 mL) para verificar a viabilidade celular e o vinho bruto foi então centrifugado. As células obtidas (precipitado) foram usadas no ciclo subsequente após serem pesadas e suspensas com um bastão enquanto o sobrenadante foi utilizado para determinação da concentração de etanol e de açúcares residuais.

Esse experimento constou de 9 ciclos fermentativos, sendo feitos cinco tratamentos (utilizando-se cinco diferentes leveduras). Para cada levedura foram feitas duas repetições perfazendo um total de 12 parcelas.

- **Terceiro ensaio:** nesse ensaio foi utilizada a linhagem mutante I1. Como substrato foi usado caldo de cana puro (com 263 g.L⁻¹ de ART) e diluído (com 164,6 g.L⁻¹ de ART) esterilizados. Esse experimento durou 27 horas, sendo que, a cada 2 horas foi retirada uma amostra para análise (até completar 10 horas) e também nos tempos 13 e 27 horas.
- **Quarto ensaio:** nesse ensaio foi utilizada a linhagem mutante I1 e a linhagem controle Pedra (PE). Como substrato foi usado melaço de cana esterilizado (com 670, 526, 406 e 264 g.L⁻¹ de ART). Esse experimento durou 52 horas, sendo retiradas amostras para análise nos tempos: 0, 6, 11, 20, 26 e 52 horas.

2.19.7 Métodos analíticos

- **Dosagem dos açúcares:** para a determinação colorimétrica de açúcares redutores utilizou-se o método proposto por Somogyi e Nelson (BACILA, 1960; NELSON, 1944). Após adequada diluição, ao vinho centrifugado era acrescentado 1 mL do reativo de Somogyi em um tubo de ensaio. Esse tubo era, então, fervido em banho-maria por 10 minutos e resfriado. Era então adicionado 1 mL do reativo de Néelson e 7 mL de água destilada. Após agitação era feita a leitura em um espectrofotômetro Beckman a 520 nm. Embora a metodologia proposta por Somogyi e Néelson seja eficiente para a quantificação de açúcares redutores (% de ART) ela não é capaz de distinguir o tipo de açúcar redutor presente na amostra (nesse caso frutose ou glicose), sendo então necessário uma metodologia complementar. Para tal, foi utilizada cromatografia de papel feita em papel Whatmann nº 1 (CARRER et al., 2002) utilizando-se como solvente n-propanol : acetato de etila : água (7 : 1 : 2) e como corante a seguinte solução: 1 mL de anilina + 1 g de difenilamina + 100 mL de acetona + 10 mL de H_2PO_4 a 85%.
- **Dosagem do teor alcoólico:** foi realizada no vinho centrifugado após prévia diluição (1:100) utilizando-se um cromatógrafo gasoso (CG) modelo 37-D, com sistema de ionização de chama e coluna PAC-2694. O cálculo do teor alcoólico foi realizado em um integrador CG-100, programado com padrão 10% de etanol (vol/vol).
- **Viabilidade celular:** no primeiro, terceiro, sexto e nono ciclo do segundo ensaio foram realizadas análises microbiológicas (AMORIM et al., 1989), visando monitorar a capacidade de sobrevivência das leveduras mutantes aos estresses dos ciclos fermentativos.
- **Eficiência fermentativa:** foi calculada considerando-se que 100 g de ART pode produzir 51,11 g de etanol (para eficiência de 100%) e levou-se em conta o etanol proveniente da fermentação anterior (AQUARONE; ZACANARO JÚNIOR, 1983).

2.19.8 Análise estatística

Para análise estatística utilizada no segundo ensaio, foi utilizado o Sistema de Análise Estatística (SANEST), sendo o delineamento experimental inteiramente casualizado com parcelas subdivididas, considerando as leveduras como tratamento principal e os ciclos fermentativos

como parcelas. Para a análise da variância com testes para os níveis de fatores foi escolhido o Teste de Tukey.

2.19.9 Recuperação da frutose

Para produção de frutose foi utilizada a linhagem *Saccharomyces cerevisiae* mutante II e como substrato foi utilizado caldo de cana puro, contendo aproximadamente 25% de ART, previamente filtrado e esterilizado a 120°C, 0,5 atm, por 30 minutos. A fermentação foi realizada em erlenmeyer com capacidade para três litros contendo um litro de caldo de cana e aproximadamente 100 gramas da levedura (massa úmida) em uma estufa B.O.D. a 33°C ± 1°C.

Após o término da fermentação o vinho foi recuperado por centrifugação (4000G) e as células foram reutilizadas em fermentações subseqüentes. Para eliminar completamente as leveduras ainda presentes, esse vinho foi filtrado em uma coluna composta por algodão hidrófilo. Para clarear o vinho e reter aromas indesejáveis foi utilizada uma coluna composta por carvão ativado. Após esses tratamentos o etanol e a frutose puderam ser recuperados em um rotaevaporador com o auxílio de vácuo.

2.19.10 Avaliação econômica preliminar

Foi elaborada baseada em cotações de preços de produtos no Brasil e exterior e em bibliografias relativas ao assunto.

2.20 Resultados

2.20.1 Análise das linhagens

Após o crescimento em três meios (YEP) apresentando como fonte de carbono glicose, frutose ou sacarose, foram isoladas 23 linhagens de interesse, ou seja, leveduras que não possuíam o gene *HXX1* e o gene *HXX2*, e portanto eram incapazes de crescer em frutose como fonte de carbono. Dessas, três foram selecionadas (U1, I1 e J3) por apresentarem menor crescimento em meio YEPF.

2.20.2 Crescimento das linhagens

Neste experimento, as três linhagens previamente selecionadas foram novamente testadas quanto à sua incapacidade de crescer em meio com frutose como fonte de carbono.

Nota-se, observando as Figuras 6 e 7, que as linhagens obtidas apresentaram um crescimento inferior, em meio com frutose, em relação à linhagem controle (PE). Resultados semelhantes foram encontrados por com Maitra (1975) e Gancedo et al. (1977) que observaram que linhagens hexokinases-deficientes não crescem em meio com frutose como única fonte de carbono, mas crescem em glicose e sacarose.

Figura 6 - Crescimento (Absorção à 600 nm) da linhagem controle PE (A) e da linhagem mutante II (B) em meios YEP tendo como fonte de carbono 2% de açúcar: glicose (Gli); frutose (Fru) ou sacarose (Sac).

Figura 7 - Crescimento (Absorção à 600 nm) das linhagens mutantes J3 (A) e U1 (B) em meios YEP tendo como fonte de carbono 2% de açúcar: glicose (Gli); frutose (Fru) ou sacarose (Sac).

2.20.3 Ensaio de fermentação

- **Primeiro ensaio de fermentação**

Usando-se meios fermentativos apresentando como fontes de carbono glicose ou frutose, as leveduras PE (controle), U1, I1 e J3 foram submetidas a fermentações, buscando-se avaliar o comportamento dessas linhagens em condições de fermentação. Na Figura 8 são apresentados os valores de açúcares redutores totais (ARTs) e os teores de etanol no transcorrer de 16 horas de fermentação.

Esses resultados mostram, claramente, que as linhagens mutantes não são capazes de fermentar frutose e fermentam a glicose, um pouco mais lentamente que a levedura controle PE, mas com equivalente produção de etanol. Eles estão de acordo com Koren e Duvnjak (1989; 1992; 1993) que obtiveram frutose e etanol à partir de misturas de glicose/frutose usando uma linhagem de *S. cerevisiae* hexokinase-deficiente.

Figura 8 – Teores de ART (g.L^{-1}) consumidos e de etanol (g.L^{-1}) produzidos pelas linhagens PE, U1, J3 e I1 em 16 horas de fermentação em meio YEP tendo como fonte de carbono $125,5 \text{ g.L}^{-1}$ de frutose (A) e $139,1 \text{ g.L}^{-1}$ de glicose (B).

Com o objetivo de confirmar esses resultados, as amostras do sobrenadante colhidas após centrifugação foram submetidas à cromatografia de papel.

Nas Figuras 9 e 10 são apresentados os valores de açúcares presentes ao longo da fermentação. Foram coletadas amostras a cada quatro horas.

Esses resultados mostram que as linhagens mutantes obtidas, como a U1 (Figura 9) não são capazes de fermentar frutose e fermentam a glicose, enquanto a levedura controle PE (Figura 10), fermenta a frutose (F) e a glicose (G).

Figura 9 - Açúcares presentes no vinho após fermentação com a levedura U1. G (15%) = padrão preparado contendo 15% de glicose e F (15%) = padrão com 15% de frutose. Os números correspondem aos tempos (em horas), por exemplo G0 = meio com glicose no tempo zero e F0 = meio com frutose no tempo zero.

Figura 10 - Açúcares presentes no vinho após fermentação com a levedura PE. G (15%) = padrão preparado contendo 15% de glicose e F (15%) = padrão preparado contendo 15% de frutose. Os números correspondem aos tempos (em horas), por exemplo G0 = meio com glicose no tempo zero.

• Segundo ensaio de fermentação

Com o objetivo de avaliar o comportamento das leveduras mutantes obtidas perante ciclos fermentativos, foi realizado esse experimento, constando de nove ciclos fermentativos.

Ficou bem caracterizado nesse experimento a capacidade das leveduras mutantes fermentarem somente a glicose em meio de sacarose (Figuras 11 e 14). Além disso, também pode-se constatar a boa tolerância delas aos estresses dos ciclos fermentativos (Figura 12): as linhagens mutantes cresceram tanto quanto a levedura controle (PE), porém as parentais (Y0 e Y1) apresentaram um crescimento inferior em relação a levedura controle ($P < 0,05$) ao longo dos ciclos.

Quanto à viabilidade, nota-se na Figura 12 que as mutantes e as parentais apresentaram, ao longo dos ciclos, viabilidade semelhante à da levedura PE, o que caracteriza as mutantes como boas fermentadoras.

A produção total de etanol foi semelhante entre a controle PE e as parentais Y0 e Y1 e maior ($P < 0,05$) em relação as mutantes I1 e J3 (iguais entre si); o que já era esperado, afinal as mutantes fermentaram somente a glicose (Figura 11).

O teor de frutose remanescente foi semelhante entre as duas mutantes J3 e I1 e maior ($P < 0,05$) em relação à controle (PE) e às parentais (Y0 e Y1) (Figura 11).

Figura 11 – Valores de etanol (A) e frutose (B) após fermentação em meio de sacarose ao longo de 9 ciclos fermentativos.

Figura 12 – Biomassa produzida (A) e viabilidade das leveduras (B) após fermentação em meio de sacarose ao longo de 9 ciclos fermentativos.

Levando-se em consideração que as leveduras mutantes J3 e I1 fermentaram apenas 50% dos carboidratos disponíveis, ou seja, a glicose, pôde-se calcular a eficiência fermentativa dessas leveduras, isto é, o teor de álcool produzido à partir do teor de açúcar disponível. Assim nota-se na Figura 13 que tanto as mutantes (J3 e I1) quanto as parentais Y0 e Y1 são tão boas fermentadoras quanto a levedura controle PE.

Figura 13 – Eficiência da fermentação, levando-se em conta os carboidratos disponíveis em meio de sacarose ao longo de 9 ciclos fermentativos.

Para confirmar os resultados, após cada ciclo fermentativo, os vinhos centrifugados foram analisados quanto a presença de açúcar através de cromatografias de papel (Figura 14). Embora na Figura 14 esteja representado apenas um ciclo, os 9 ciclos apresentaram resultados semelhantes. Ao analisar essa figura nota-se claramente que enquanto a linhagem controle (PE) e as parentais Y0 e Y1 fermentaram todos os açúcares, as linhagens mutantes não fermentaram a frutose. Esses resultados são semelhantes aos obtidos por Atiyeh e Duvnjak (2001a,b) que também trabalharam com meio sintético de sacarose, porém, fizeram um único ciclo fermentativo.

S F G M PE Y0 Y1 I1 J3 J3
 (15%) (15%) (15%)

Figura 14 - Cromatografia dos vinhos após um ciclo fermentativo de mosto (M) de sacarose.

Nota-se a cor verde correspondente a sacarose (S), a amarela correspondente a frutose (F) e a azul correspondente a glicose (G). Enquanto as linhagens PE, Y0 e Y1 consumiram todo o açúcar do mosto, as linhagens I1 e J3 não metabolizaram a frutose.

• Terceiro ensaio de fermentação

São descritos aqui, testes fermentativos utilizando como substrato caldo de cana-de-açúcar. Esse ensaio foi realizado com o objetivo de avaliar o comportamento da levedura mutante I1 nesse meio. Nota-se na Figura 15 que ela foi hábil em fermentar aproximadamente 50% dos açúcares presentes (somente a glicose) nos caldos de cana puro e diluído.

Após a fermentação o vinho foi analisado e constatou-se um rendimento de 98,63% de frutose no caldo puro e 97,81% de frutose no caldo diluído (Figura 15).

Como 50% do ART total (a glicose) foi transformado em etanol, pode-se calcular a eficiência fermentativa. Com o caldo puro essa eficiência foi de 98,63% enquanto com o caldo diluído foi de 97,81%.

Figura 15 – Teores de ART (g.L^{-1}) consumidos (A) e de etanol (g.L^{-1}) produzidos (B) pela linhagem II em 27 horas de fermentação em meio de caldo de cana puro (com 263 g.L^{-1} de ART) e diluído (com 164 g.L^{-1} de ART).

Com o objetivo de confirmar esses resultados os vinhos obtidos foram submetidos à cromatografia de papel (Figura 16).

Esses resultados mostram que a linhagem mutante obtida I1 (Figura 16) não é capaz de fermentar frutose e fermenta a glicose.

Figura 16 - Açúcares presentes no caldo de cana puro e diluído e nos respectivos vinhos após fermentação com a levedura I1. S=sacarose, G=glicose, F=frutose. S (15%) é um padrão preparado contendo 15% de sacarose; F (15%) contendo 15% de frutose e G (15%) contendo 15% de glicose.

• Quarto ensaio de fermentação

Esse ensaio foi realizado com o objetivo de avaliar o comportamento da levedura mutante em meio de melaço de cana-de-açúcar. Nota-se (Figura 17) que as leveduras foram hábeis em fermentar aproximadamente 50% dos açúcares presentes (somente a glicose) no melaço de cana diluído (com 406 e 264 g.L⁻¹ de ART), porém não conseguiram fermentar meios com concentrações maiores de açúcar (com 670 e 526 g.L⁻¹ de ART), devido ao efeito inibitório causado pelo aumento da concentração de açúcar no meio.

Figura 17 -- Teores de ART (g.L^{-1}) consumidos (A) e de etanol (g.L^{-1}) produzidos (B) pelas linhagens I1 e PE em 52 horas de fermentação em meio de melaço de cana (PE = linhagem Pedra; I1 = linhagem I1; m1 = melaço com 406 g.L^{-1} de ART; m2 = melaço com 264 g.L^{-1} de ART).

Com a levedura PE obteve-se uma eficiência fermentativa (etanol) de 94,76% à partir do meio mais concentrado (406 g.L⁻¹ de ART) e uma eficiência de 99,77% à partir do meio com 264 g.L⁻¹ de ART. Já a levedura mutante produziu 98,22% de frutose e 97,77% de etanol à partir do melaço mais concentrado (406 g.L⁻¹ ART) e 98,56% de frutose e 97,59% de etanol à partir do melaço menos concentrado (264 g.L⁻¹ de ART), levando-se em consideração que ele fermentou apenas a glicose.

Na produção de etanol, é interessante usar, no processo fermentativo, meios com concentrações altas de substrato pois isso reduz custos na etapa de destilação além de evitar o crescimento de microrganismos contaminantes osmo-sensíveis (JONES et al., 1981). Entretanto, a capacidade fermentativa de muitos microrganismos, em tais condições, é drasticamente reduzida devido ao efeito inibitório causado pelas altas concentrações de substrato que causam a plasmólise na célula. A levedura mutante usada nesse trabalho fermentou concentrações com até 406 g.L⁻¹ de açúcar, podendo ser considerada tolerante ao efeito inibitório causado pelo açúcar, uma vez que, em leveduras, a plasmólise já começa a ocorrer em concentrações acima de 150 g.L⁻¹ de açúcar no meio (GRAY, 1945). Atiyeh e Duvnjak (2002), trabalhando com melaço de beterraba, verificaram a produção de frutose e etanol nesse tipo de substrato em meio contendo até, no máximo, 312,4 g.L⁻¹ de ART.

Com o objetivo de confirmar esses resultados os vinhos obtidos foram submetidos à cromatografia de papel (Figura 18).

Esses resultados mostram que a linhagem mutante II não é capaz de fermentar frutose e fermenta a glicose, enquanto a levedura controle PE, fermenta a frutose (F) e a glicose (G) presente no melaço de cana.

Figura 18 - Açúcares presentes no melaço de cana (M1 = melaço com 406 g.L^{-1} de ART; M2 = melaço com 246 g.L^{-1} de ART) e nos respectivos vinhos após fermentação com as leveduras PE e I1. S=sacarose, G=glicose, F=frutose. S (15%) é um padrão preparado contendo 15% de sacarose; F (15%) contendo 15% de frutose e G (15%) contendo 15% de glicose.

2.20.4 Recuperação da frutose

Com o objetivo de recuperar a frutose após a fermentação de caldo de cana puro, diversos experimentos baseados em destilação/evaporação foram realizados.

Após fermentação de caldo de cana esterilizado ($0,5 \text{ ATM}/30$ minutos) com a levedura hexokinase-deficiente I1 o vinho bruto foi centrifugado (4000G) sendo as células (precipitado) reutilizadas em fermentações subseqüentes e o sobrenadante usado para recuperar a frutose. Para eliminar completamente as leveduras ainda presentes, esse vinho foi filtrado em uma coluna composta por algodão hidrófilo. Para clarear o vinho e reter aromas indesejáveis foi utilizada uma coluna composta por carvão ativado. Após esses tratamentos o etanol e a frutose puderam ser recuperados em um rotaevaporador com o auxílio de vácuo. Como a recuperação direta da frutose à partir do vinho resultava em um xarope com sabor amargo e coloração escura, provavelmente devido à presença de leveduras ainda presentes, foi necessária a realização de etapas adicionais antes da recuperação da frutose por evaporação. Essas consistiram na filtração do vinho com

algodão hidrófilo com o objetivo de reter leveduras e restos de leveduras não separadas pela centrifugação e no uso de carvão ativo cujo objetivo foi remover aromas e coloração indesejáveis. A Figura 19 mostra o esquema proposto para a produção de frutose e etanol à partir da sacarose proveniente da cana-de-açúcar.

Figura 19 – Esquema proposto para a produção de frutose e etanol à partir de leveduras hexocinases-deficientes.

O uso de resinas de troca iônica também poderia ser adicionado ao processo com o objetivo de purificar e estabilizar (deionizar) ainda mais o produto, tornando-o mais comercial, conforme sugerido por Koren e Duvnjak (1989).

Atiyeh e Duvnjak (2004) purificaram xaropes de frutose provenientes de fermentação seletiva de sacarose utilizando membranas de ultrafiltração, carvão ativado e resinas de troca iônica, conseguindo uma eficiência de remoção de cor maior que 98% e uma desmineralização quase total, porém esse processo de purificação foi reconhecido como sendo economicamente inviável.

Di Luccio et al. (2002) também trabalhando com produção de etanol e frutose via fermentação seletiva, utilizaram processos de separação com membranas acopladas ao biorreator para remover mais eficientemente o etanol e concluíram que o custo da membrana a ser instalada é uma das variáveis que mais influencia a viabilidade econômica do processo.

2.20.5 Caracterização físico-química da frutose

O xarope de frutose obtido (Figura 20) do caldo de cana apresentou sabor doce (semelhante ao mel), 20% de umidade e 3,35% (v/p) de acidez em solução normal. Após desidratação ele foi submetido à análises químicas fornecendo os resultados mostrados na Tabela 4.

Figura 20 – Foto da frutose obtida.

Tabela 4. Componentes do xarope de frutose (em 100 g de matéria seca):

Componente	Teor
Extrato etéreo (gordura)	0,16%
Proteínas	0,33%
Cinzas	2,73%
Carboidratos	96,76%
Cálcio (Ca)	2,41 g.Kg ⁻¹
Fósforo (P)	1,47 g.Kg ⁻¹
Potássio (K)	12,85 g.Kg ⁻¹
Magnésio (Mg)	3,57 g.Kg ⁻¹
Enxofre (S)	3,52 g.Kg ⁻¹
Sódio (Na)	8,82 g.Kg ⁻¹
Cobre (Cu)	5,25 mg.Kg ⁻¹
Ferro (Fe)	381,9 mg.Kg ⁻¹
Zinco (Zn)	37,39 mg.Kg ⁻¹
Manganês (Mn)	52,94 mg.Kg ⁻¹

Embora não haja na legislação brasileira nenhuma referência quanto às características físico-químicas do xarope de frutose, para o melado (líquido xaroposo obtido pela evaporação do caldo de cana) têm-se como umidade máxima permitida: 25% p/p; acidez em solução normal (máximo): 10% v/p; glicídios totais (mínimo): 50% p/p; resíduo mineral fixo (cinzas) (máximo): 6% p/p (Brasil, 1978). Tendo-se como base o melado pode-se concluir que o xarope de frutose está dentro dos parâmetros exigidos pela legislação em vigor (Quadro 1).

Característica	Frutose obtida	Melado (legislação)
Umidade máxima permitida	20% p/p	25% p/p
Acidez em solução normal (máximo)	3,35% v/p	10% v/p
Glicídios totais (mínimo)	77,40% p/p	50% p/p
Resíduo mineral fixo (cinzas) (máximo)	2,18% p/p	6% p/p

Quadro 1 - Características físico-químicas da frutose obtida e dos parâmetros exigidos pela legislação em vigor para o melado de cana.

Avaliação econômica preliminar

A primeira parte dessa avaliação consistiu em uma cotação de preços (Quadro 2).

PRODUTO	PREÇO EM R\$ (AGOSTO - 2005)	FONTE	WEBSITE
AÇÚCAR CRISTAL	0,605 o Kilo (30,25 por sc 50 Kg)	CEPEA/Esalq	www.cepea.esalq.usp.br
ÁLCOOL ANIDRO	0,773 o Litro	CEPEA/Esalq	www.cepea.esalq.usp.br
AÇÚCAR INVERTIDO (75° Brix)	0,575 o Kilo (575 a Tonelada)	(Usina da Barra/ Usina Nova América/Dulcini)	(Consulta pessoal)
MELAÇO	0,330 o Kilo (330 a Tonelada)	(Usina Cosan)	(Consulta pessoal)
AÇÚCAR CRISTAL	0,80 o Kilo	Supermercado (varejo)	(Consulta pessoal)
FRUTOSE CRISTALIZADA	27,00 o Kilo	Supermercado (varejo)	(Consulta pessoal)
FRUTOSE CRISTALIZADA (EUA)	4,71 o Kilo	Internet	http://shopping.yahoo.com
HFCS 42 (EUA) (xarope com 42% de frutose) (71°Brix)	0,695 o Kilo (695 a Tonelada)	Internet	www.beverage-digest.com/cgi-bin/hfcs.cgi
HFCS 55 (EUA) (xarope com 55% de frutose) (75°Brix)	0,748 o Kilo (748 a Tonelada)	Internet	

Quadro 2 - Preços do álcool e de açúcares em agosto/2005.

Através da observação dos custos (Tabela 6), pode-se achar, “a priori”, que o processo de fermentação seletiva seria mais rentável que o processo tradicional de fabricação de etanol, sem considerar as perdas, as etapas intermediárias de processamento do produto e os investimentos necessários para a implementação do processo. Na tabela 6 nota-se que o preço da frutose cristalizada em supermercados brasileiros é cerca de 30 vezes superior ao da sacarose cristalizada. Como ambos açúcares podem ser produzidos à partir do mesmo substrato (cana-de-açúcar) pode-se inferir que a frutose possui um mercado em potencial a ser explorado. Desta forma, a proposta de produção da frutose paralela ao etanol poderia ser economicamente rentável. Esta proposta pode ser útil para algumas usinas que estejam próximas de grandes mercados potenciais de frutose ou direcionem seu produto à exportação.

Como o processo de fermentação seletiva é viável tecnicamente, diante da cotação simplificada apresentada acima, pode-se observar que a alternativa proposta pode ser bastante promissora também no aspecto econômico, considerando-se que o mercado potencial de frutose no Brasil é muito pouco explorado. Uma avaliação econômica mais detalhada, embora ainda em caráter preliminar, foi realizada por Di Luccio (2001) e Di Luccio et al (2002).

Esses autores (DI LUCCIO, 2001; DI LUCCIO et al; 2002) elaboraram uma avaliação econômica capaz de proporcionar uma estimativa da viabilidade do processo de fermentação seletiva da sacarose. Eles trabalharam com biorreator integrado a processos de separação com membrana. Nesse caso a membrana é um auxiliar do processo, cujo objetivo é remover o etanol do meio, diminuindo a inibição causada pelo mesmo.

Para a análise da viabilidade do processo os autores consideraram duas propostas. Na primeira consideraram que não havia infraestrutura pré-existente. Nesse caso sendo necessário investimento em todos os equipamentos necessários ao processo. Na segunda proposta consideraram a adaptação de uma planta pré-existente com um conseqüente investimento menor em equipamentos (neste caso, o investimento em fermentadores, tanques de mistura, tanques de pré-inóculo, tanques de alimentação entre outros itens, não é necessário). Entretanto, os autores ressaltam que a metodologia de análise empregada possui um grau de incerteza associada.

Os autores usaram uma metodologia de avaliação econômica baseada na taxa interna de retorno (TIR), a qual é considerada adequada para uma estimativa inicial da viabilidade

econômica de processos industriais (GROOT et al., 1993; CASTILHO et al., 2000). Este método consiste em calcular a taxa de desconto para a qual o valor presente do fluxo de caixa projetado para a vida útil do empreendimento se iguala ao montante investido.

A idéia básica do cálculo da TIR é que se procura calcular um único número que sintetize os méritos de um projeto ao longo de sua vida útil. Esse número não depende da taxa de juros do mercado, sendo por isso chamado de taxa interna de retorno. O número calculado é intrínseco ao projeto e não depende de qualquer outra coisa além do fluxo de caixa deste (PETERS; TIMMERHAUS, 1991). Os autores assumiram ainda que o lucro anual seria constante durante a vida útil da planta.

A viabilidade do projeto depende ainda da taxa mínima de atratividade esperada pelos investidores/acionistas do projeto. Usualmente para projetos da indústria química esta taxa encontra-se entre 8 a 18% (RUDD; WATSON, 1968), sendo que a atratividade depende do risco percebido do país e do mercado e das taxas de juros do mercado financeiro local. Se a TIR estiver acima da taxa mínima de atratividade esperada, considera-se que o projeto é economicamente viável. Caso contrário, o projeto não deve ser considerado um investimento atrativo. Nesta análise os autores consideraram que a taxa mínima de retorno esperada para o projeto seja de 17%.

Após uma análise completa do processo os autores concluíram que para os dois projetos (um consistindo na instalação completa de uma nova planta baseada no processo proposto e outro baseado em adaptação de uma planta de produção de etanol pré-existente) “a fermentação seletiva representa uma alternativa extremamente promissora para aumentar a rentabilidade do processo de produção de etanol” (DI LUCCIO, 2001). Eles observaram que os custos que envolvem a área de membrana instalada são os que mais afetam a viabilidade do processo. Para ambos os projetos, o processo proposto é economicamente viável considerando-se uma taxa mínima de atratividade do investimento de 17%, porém com a otimização das condições de operação pode-se ainda esperar que a atratividade desta alternativa para a produção de etanol aumente. A opção por substratos mais baratos (caldo e/ou melaço de cana) proposta no presente trabalho, ao invés da mistura de glicose/frutose proposta pelos autores é um item relevante que deve favorecer a rentabilidade do processo.

3 CONCLUSÕES

Leveduras hexokinases deficientes *hxx1 hxx2* podem ser obtidas após o cruzamento de parentais com bloqueio nas atividades de hexokinase 1 e hexokinase 2, essa metodologia tornou possível a produção de diversas linhagens, o que permitiu selecionar os melhores duplo mutantes. Embora essas leveduras sejam geneticamente modificadas elas não são transgênicas (pois os seus próprios genes é que foram alterados, no caso, silenciados). Essas linhagens invertem a sacarose e fermentam a glicose mas não são capazes de fermentar a frutose. Elas crescem e mantêm-se vivas durante nove ciclos fermentativos consecutivos em meio sintético de sacarose, mostrando-se, portanto, adequadas para fermentações com ciclos fermentativos, sendo tolerantes aos estresses promovidos por estes.

Utilizando-se como substrato caldo puro (com 263 g.L⁻¹ de ART) e diluído e, melaço de cana-de-açúcar (com até 406 g.L⁻¹ de ART), frutose e etanol puderam ser produzidos com alta eficiência. A frutose produzida foi analisada. Ela pôde ser recuperada após filtração e tratamento do vinho de fermentação com carvão ativado, representando assim um produto que poderia competir com a importação de frutose pelo Brasil, resultando em economia de divisas para o país.

Como, em escalas maiores, é de se esperar que contaminações com leveduras selvagens ocorram, o cruzamento dessas linhagens com uma *S. cerevisiae* nistatina-resistente resultando linhagens hexokinase-deficiente e nistatina-resistente poderia ser uma forma de controlar as selvagens (que poderiam consumir a frutose).

Estudos visando purificar e estabilizar ainda mais o produto (frutose), tornando-o mais comercial, porém sem esquecer aspectos de custos, seriam interessantes, assim como, estudos sobre a cristalização da frutose obtida por fermentação seletiva, uma vez que esse tipo de frutose possui um mercado em expansão, sendo mais adequado quando o objetivo é exportar.

Uma análise econômica mais detalhada do processo, inclusive visando o mercado internacional (exportação) também seria desejável.

REFERÊNCIAS

- AMORIM, H.V.; OLIVEIRA, A.J.; ZAGO, E.A.; BASSO, L.C.; GALLO, C.R. **Processos de fermentação alcoólica, seu controle e monitoramento**. Piracicaba: Fermentec, 1989. 145p.
- ANDERSON, C.M.; McDONALD, R.C.; STEITZ, T.A. Sequencing a protein by x-ray crystallography. I. Interpretation of yeast hexokinase B at 2.5 Å resolution by model building. **Journal of Molecular Biology**, London, v.123, p.1-13, 1978a.
- ANDERSON, C.M.; STEMKAMP, R.E.; McDONALD, R.C.; STEITZ, T.A. A refined model of the sugar binding site of yeast hexokinase B. **Journal of Molecular Biology**, London, v.123, p.207-219, 1978b.
- ANDERSON, R.L.; WOOD, W.A. Carbohydrate metabolism in microorganisms. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v.23, p.539-578, 1969.
- AQUARONE, E.; ZACANARO JÚNIOR, O. Vinagres. In: AQUARONE, E.; LIMA, U.A.; BORZANI, W. (Coords.) **Alimentos e bebidas produzidos por fermentação**. São Paulo: E. Blücher, 1983. p. 104-122 (Biotecnologia, 5).
- ASSOCIAÇÃO NACIONAL DE FABRICANTES DE VEÍCULOS AUTOMOTIVOS – ANFAVEA. Disponível em: <http://www.anfavea.com.br>. Acesso em: 03 dez. 2005.
- ASSOCIAÇÃO DE PRODUTORES DA INDÚSTRIA DO ÁLCOOL – ALCO. Disponível em: <http://www.alco.com.br>. Acesso em: 07 nov. 1997.
- ATIYEH, H.; DUVNJAK, Z. Study of the production of fructose and ethanol from sucrose media by *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, n.57, p.407-411, 2001a.
- ATIYEH, H.; DUVNJAK, Z. Production of fructose and ethanol from media with high sucrose concentrations by a mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, Oxford, n.76, p.1017-1022, 2001b.
- ATIYEH, H.; DUVNJAK, Z. Production of fructose and ethanol from sugar beet molasses using *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 36858. **Biotechnology Progress**, New York, n.18, p.234-239, 2002.
- ATIYEH, H.; DUVNJAK, Z. Utilization of raffinose and melibiose by a mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, Oxford, n.78, p.1068-1074, 2003.
- ATIYEH, H.; DUVNJAK, Z. Purification of fructose syrups produced from cane molasses media using ultrafiltration membranes and activated carbon. **Separation Science and Technology**, New York, v.39, n.2, p.341-362, 2004.
- BACCHI, M.R.P. A variabilidade dos preços do açúcar e do álcool em São Paulo. **Visão Agrícola**, Piracicaba, n.1, p.100-105, jan./jun. 2004.
- BACILA, M. **Curso de fisiologia de microrganismo**. Curitiba: UFPR, Instituto de Química, 1960. 209p.

BAJPAL, P.K.; BAJPAL, P. Cultivation and utilization of jerusalem artichoke for ethanol, single cell protein and high fructose syrup production. **Enzyme and Microbial Technology**, Surrey, v.13, p.359-362, 1991.

BARKER, S.A.; SUMERS, P.J.; HATT, B.W. **Process for the preparation of fructose**. US 3875140. 1975.

BATEMAN, J.R.; COODACRE, B.C.; SMITHSON, A. European Patent Application 0116389. 1984.

BAUDIN, A.; OZIER-KALOGEROPOULOS, O.; DENOUEL, A.; LACROUTE, F.; CULLIN, C. A simple and efficient method for direct gene deletion in *Saccharomyces cerevisiae*. **Nucleic Acids Research**, London, v.21, n.14, p.3329-3330, 1993.

BENNETT, W.S.; STEITZ, T.A. Glucose-induced conformational change in yeast hexokinase. **Proceedings of National Academy of Science of the United States of America**, Washington, v.75, p.4848-4852, 1978.

BHATT, S. Separation of fructose from carbohydrate mixtures. Part I. Non-chromatographic methods. **Indian Sugar**, Calcutta, v.43, n.7, p.463-468, 1993a.

BHATT, S. Separation of fructose from carbohydrate mixtures. Part II. Chromatographic methods. **Indian Sugar**, Calcutta, v.43, n.8, p.615-620, 1993b.

BISSON, L.F.; FRAENKEL, D.G. Involvement of kinases in glucose and fructose uptake by *Saccharomyces cerevisiae*. **Proceedings of National Academy of Science of the United States of America**, Washington, v.80, p.1730-1734, 1983.

BLANCHARD, .P.H.; GEIGER, E.O. Production of high fructose corn syrup in the USA. **Sugar Technology Reviews**, Amsterdam, n.11, p.1-94, 1984.

BOHANNON, N.V.; KARAM, J.H.; FORSHAM, P.H. Endocrine responses to sugar ingestion in man. **Journal of the American Dietetic Association**, New York, n.76, p.555-567, 1980.

BOLES, E.; HOLLENBERG, C.P. The molecular genetics of hexose transport in yeasts. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v.21, p.85-111, 1997.

BRACHMANN, C.B.; DAVIES, A.; COST, G.J.; CAPUTO, E.; LI, J.; HIETER, P.; BOEKE, J.D. Designer deletion strains derived from *Saccharomyces cerevisiae* S288C: a useful set of strains and plasmids for PCR-mediated gene disruption and other applications. **Yeast**, Chichester, n.14, p.115-132, 1998.

BRASIL. Ministério da Saúde. CONSOLIDAÇÃO DAS NORMAS E PADRÕES DE ALIMENTOS. Resolução 12/35. In: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DE ALIMENTAÇÃO. **Compêndio da legislação de alimentos**. São Paulo: ABIA, 1978. v.1/B.

BREVENOVA, E.E.; KOZLOV, D.G.; EFREMOV, B.D.; BENEVOLENSKY, S.V. Inulase-secreting strain of *Saccharomyces cerevisiae* produces fructose. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v.60, n.4, p.492-497, Nov. 1998.

BRINGER, S.; SAHM, H. **Fermentation process for the production of fructose from aqueous mixtures of fructose and glucose and *Zymomonas mobilis* mutants which can be used for such fermentation.** U.S. 4742006. 1988.

BURNETT, J.H. **Mycogenetics na introduction to the general genetics of fungi.** London: John Wiley & Sons, 1975. 375p.

CARASIK, W.; CARROL, J.O. Development of immobilized enzymes for the production of high-fructose corn syrup. **Food Technology**, Champaign, v.37, p.85-91, Oct. 1983.

CARIOCA, J.O.B.; ARORA, H.L. **Biomassa: fundamentos e aplicações tecnológicas.** Fortaleza: UFC, 1984. 644 p.

CARLSON, M. Regulation of glucose utilization in yeast. **Current Opinion in Genetics & Development**, Philadelphia, v.8, p.560-564, 1998.

CARLSON, M. Glucose repression in yeast. **Current Opinion in Microbiology**, Oxford, v.2, p.202-207, 1999.

CARRER, H.; GALLO, L.A.; BASSO, L.C.; MELO, M. **Roteiro de aulas práticas de bioquímica.** Piracicaba: USP, ESALQ, Departamento de Ciências Biológicas, 2002. 3 lp.

CASTILHO, L.R.; POLATO, C.M.S.; BARUQUE, E.A.; SANT'ANNA Jr., G.L.; FREIRE, D.M.G. Economic analysis of lipase production by *Penicillium restrictum* in solid-state and submerged fermentations. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, v.4, p.239-247, 2000.

CIRILO, V.P. Relationship between sugar structure and competition for the sugar transport system in baker's yeast. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v.95, p.603-611, 1968.

COKER, L.E.; VENKATASUBRAMANIAN, K. Corn sweeteners. In: KNORR, D. (Ed.) **Food biotechnology.** New York: Marcel Dekker, 1987. p. 443-460.

COLOWICK, S.P. The hexokinases. In: BOYER, P.D. (Ed.) **The enzymes.** 3rd ed. New York: Academic Press, 1973. v.9, p. 1-48.

CRAPO, P.A.; SCARLETT, J.A.; KOLTERMAN, O.G.; SANDERS, L.R.; HOFELDT, F.D.; OLEFSKY, J.M. The effects of oral fructose, sucrose and glucose in subjects with reactive hypoglycemia. **Diabetes Care**, New York, v.5, n.5, p.512-517, 1982.

DELAFUENTE, G.; LAGUNAS, R.; SOLS, A. Induced fit in yeast hexokinase. **European Journal of Biochemistry**, Oxford, v.16, p.226-233, 1970.

DERECHIN, M.; RUSTUM, Y.M.; BARNARD, E.A. Dissociation of yeast hexokinase under the influence of substrates. **Biochemistry**, Washington, v.11, n.10, p.1793-1797, 1972.

DI LUCCIO, M. **Produção de etanol e frutose em biorreator integrado a processos com membrana.** 2001. 259p. Tese (Doutorado em Engenharia) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2001.

DI LUCCIO, M.; BORGES, C.P.; ALVES, T.L.M. Economic analysis of ethanol and fructose production by selective fermentation coupled to pervaporation: effect of membrane costs on process economics. **Desalination**, Ámsterdam, v.147, p.161-166, 2002.

DIDERICH, J.A.; SCHEPPER, M.; VAN HOEK, P.; LUTTIK, M.A.H.; VAN DIJKEN, J.P.; PRONK, J.T.; KLAASSEN, P.; BOELEN, H.F.M.; TEIXEIRA DE MATTOS, M.J.; VAN DAM, K.; KRUCKEBERG, A.L. Glucose uptake kinetics and transcription of *HXT* genes in chemostat cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v.274, p.15350-15359, 1999.

DOELLE, H.W.; GREENFIELD, P.F. The production of ethanol from sucrose using *Zymomonas mobilis*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v.22, p.405-410, 1985a.

DOELLE, H.W.; GREENFIELD, P.F. Fermentation pattern of *Zymomonas mobilis* at high sucrose concentrations. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v.22, p.411-415, 1985b.

DOELLE, M.B.; DOELLE, H.W. High fructose formation from sugar cane syrup and molasses using *Zymomonas mobilis* mutants. **Biotechnology Letters**, Kew, n.13, p.875-878, 1991.

DUVNJAK, Z.; KOREN, D.W. Production of fructose syrup by selective removal of glucose from hydrolyzed *Jerusalem artichoke* juice. **Biotechnology Letters**, Kew, v.9, n.11, p.783-788, 1987.

DWIVEDI, B.K.; RANIWALA, S.K. **Process of preparing crystalline fructose from high fructose corn syrup**. US 4199374. 1980.

EASTERBY, J.S.; ROSEMEYER, M.A. Purification and subunit interactions of yeast hexokinase. **European Journal of Biochemistry**, Oxford, v.28, p.241-252, 1972.

EDYE, L.A.; JOHNS, M.R.; EWINGS, K.N. fructose production by *Zymomonas mobilis* in fed-batch culture with minimal sorbitol formation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, n.31, p.129-133, 1989.

ENTIAN, K.D. Genetic and biochemical evidence for hexokinase PII as a key enzyme involved in carbon catabolite repression in yeast. **Molecular & General Genetics**, Berlin, v.178, p.633-637, 1980.

ENTIAN, K.D.; ZIMMERMANN, F.K.; SCHEEL, I. A partial defect in carbon catabolite repression in mutants of *Saccharomyces cerevisiae* with reduced hexose phosphorylation. **Molecular & General Genetics**, Berlin, v.156, p.99-105, 1977.

ESPOSITO, R.E.; KLAPHOLZ, S. Meiosis and ascospore development. In: STRATHERN, J.N.; JONES, E.W.; BROACH, J.R. (Eds.) **The molecular biology of the yeast *Saccharomyces cerevisiae***. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1981. p. 211-287.

FAN, L. **Process for producing fructose**. U.S. 4774183. 1988.

FINCHAM, J.; DAY, P.R.; RADFORD, A. **Fungal genetics**. Oxford: Blackwell, 1979. 636p.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION CENTER FOR FOOD SAFETY AND APPLIED NUTRITION. **Health Information**. 1997. Disponível em: <http://ifinfo.health.org/insight/fructose.htm>. Acesso em: 05 dez 2003.

FORSBERG, K.H.L.; HAMALAINEN, A.J.M.; VIRTANEN, J.J. **pH adjustment in fructose crystallization for increased yield.** U.S. 3883365. 1975.

FOWELL, R.R. Sporulation and hybridization of yeasts. In: ROSE, A.H.; HARRISON, J.S. (Eds.) **The yeasts.** New York: Academic Press, 1969a. v.1, p. 303-384.

FOWELL, R.R. Life cycles in yeasts. In: ROSE, A.H.; HARRISON, J.S. (Eds.) **The yeasts.** New York: Academic Press, 1969b. v.1, p. 461-472.

FROHLICH, K.U.; ENTIAN, K.D.; MECKE, D. The primary structure of the yeast hexokinase PII gene (*HXX2*) which is responsible for glucose repression. **Gene**, Amsterdam, v.36, p.105-111, 1985.

FUKAGAWA, N.K.; VEIRS, H.; LANGELOH, G. Acute effects of fructose and glucose ingestion with and without caffeine in young and old humans. **Metabolism**, Philadelphia, v.44, n.5, p.630-638, 1995.

GAGNÉ, I.; MATSUURA, T.; DUVNJAK, Z. Enhanced high fructose syrup production by a hybrid fermentation/pervaporation system using a silicone rubber hollow fiber membrane module. **Separation Science and Technology**, New York, v.37, n.9, p.2055-2075, 2002.

GANCEDO, C.; SERRANO, R. Energy yielding metabolism. In: ROSE, A.H.; HARRISSON, J.S. (Eds.) **The yeasts.** 2nd. ed. Oxford: Academic Press, 1989. v.3.

GANCEDO, J.M. Yeast carbon catabolite repression. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v.62, p.334-361, 1998.

GANCEDO, J.M.; CLIFTON, D.; FRAENKEL, D.G. Yeast hexokinase mutants. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, n.252, p.4443-4444, 1977.

GEITEL, B.; RYL, W.; FIEDLER, B. Microbial hydrolysis of inulin-containing juice from *Jerusalem artichoke* to fructose syrup. **Zentralblatt Mikrobiologie**, Jena, v.148, p.205-211, 1993.

GHOSE, T.K.; BANDYOPADHYAY, K.K. Rapid ethanol fermentation in immobilized yeast cell reactor. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v.22, p.1489-1496, 1980.

GODSHALL, M.A. Future directions for the sugar industry. **International Sugar Journal**, London, v.103, n.1233, p.378-384, 2001.

GRAY, W.D. The sugar tolerance of four strains of distiller's yeast. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v.49 (A), p.445-452, 1945.

GROOT, W.J.; KRAAYENBRINK, M.R.; van der LANS, R.G.J.M.; LUYBEN, K.C.A.M. Ethanol production in an integrated fermentation/membrane system. Process simulations and economics. **Bioprocess Engineering**, Berlin, v.8, p.189-201, 1993.

GUÉNETTE, M.; DUVNJAK, Z. Effect of oleic acid on the production of ethanol and fructose from glucose/fructose mixtures in an immobilized cell reactor. **Acta Biotechnologica**, Berlin, v. 15, n.4, p.381-386, 1995.

GUÉNETTE, M.; DUVNJAK, Z. Wood blocks as a carrier for *Saccharomyces cerevisiae* used in the production of ethanol e fructose. **The Chemical Engineering Journal**, Lausanne, v. 61, p.233-240, 1996.

GUIMARÃES, W.V.; DUDEY, G.L.; INGRAM, L.O. Fermentation of sweet whey by ethanologenic *Escherichia coli*. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v.33, p.906-911, 1992.

GUIRAUD, J.P.; GALZY, P. Inulinases and inulin utilization by yeasts. In: VERACHTERT, H.; DE MOT, R. (Eds.) **Yeast: biotechnology, biocatalysis**. New York: Marcel Dekker, 1989. p. 255-296.

GUSTIN, M.C.; MARTINAC, B.; SAIMI, Y.; CULBERSTON, M.R.; KUNG, C. **Science**, Washington, v.233, p.195, 1986.

GUTIERREZ, L.E. **Carboidratos**. Piracicaba: ESALQ, Departamento de Química, 1991. 43p.

HABER, J.E.; HALVORSON, H.O. Methods in sporulation and germination of yeasts. In: PRESCOTT, D.M. (Ed.) **Methods in cell biology**. New York: Academic Press, 1975, p. 46-67.

HADFIELD, C.; JORDAN, B.E.; MOUNT, R.C.; PRETORIUS, G.H.J.; BURAK, E. G418-resistance as a dominant marker and reporter for gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. **Current Genetics**, Berlin, v.18, p.303-313, 1990.

HANOVER, L.M.; WHITE, J.S. Manufacturing, composition and applications of fructose. **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v.58 (suppl.), p.724-732, 1993.

HASHIMOTO, K.; ADACHI, S.; NOUJIMA, H.; UEDA, Y. A new process combining adsorption and enzyme reaction for producing higher-fructose syrup. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v.25, p.2371-2393, 1983.

HATCHER, H.J.; GALLIAN, J.J.; LEEPER S.A. **Production of substantially pure fructose**. US 4927757. 1988.

HAYES, F.W. U.S. 4326036. 1982.

HEADY, R.E. **Preparation of high fructose syrups from sucrose**. US 4276379. 1981.

HEADY, R.E. **Process for production of high fructose syrups and ethanol**. US 4335207. 1982a.

HEADY, R.E. **Process for the production of high fructose syrups and ethanol**. US 4356262. 1982b.

HEADY, R.E. **Preparation of high fructose syrups from sucrose**. US 4423150. 1983.

HEIKKILA, H.; KURULA, V. **Method for the crystallization of fructose**. US 4938804. 1990.

HEREDIA, C.F.; SOLS, A.; Metabolic studies with 2-deoxyhexoses. II. Resistance to 2-deoxyglucose in a yeast mutant. **Biochemical and Biophysical Acta**, Amsterdam, v.86, p.224-228, 1964.

HEREDIA, C.F.; SOLS, A.; DELAFUENTE, C. Specificity of the constitutive hexose transport in yeast. **European Journal of Biochemistry**, Oxford, v.5, p.321-329, 1968.

HERSKOWITZ, I.; OSHIMA, Y. Control of cell type in *Saccharomyces cerevisiae*: mating type and mating-type interconversion. In: STRATHERN, J.N.; JONES, E.W.; BROACH, J.R. (Eds.) **The molecular biology of the yeast *Saccharomyces***. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1981, p. 181-209.

HODGKIN, J. High fructose: a growing world role? **Sugar Y Azucar**, New York, v.82, p.15-23, 1987.

HOGGETT, J.G.; KELLETT, G.L. Yeast hexokinase – a fluorescence temperature – jump study of the kinetics of the binding of glucose to the monomer forms of hexokinases P-I e P-II. **European Journal of Biochemistry**, Oxford, v.68, p.347-353, 1976a.

HOGGETT, J.G.; KELLETT, G.L. Yeast hexokinase: substrate-induced association-dissociation reactions in the binding of glucose to hexokinase P-II. **European Journal of Biochemistry**, Oxford, v.66, p.65-67, 1976b.

HORII, J. A cana-de-açúcar como matéria-prima. **Visão Agrícola**, Piracicaba, n.1, p.88-90, jan./jun. 2004.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. Disponível em <http://www.ibge.gov.br>. Acesso em: 17 nov. 2004.

INTERNATIONAL SUGAR ORGANIZATION – ISO. Alternative Sweeteners, HFCS, 2000. Disponível em: <http://www.iso.com>. Acesso em: 13 out. 2003.

ITO, H.; FUKUDA, Y.; MURATA, K.; KIMURA, A. Transformation of intact cells treated with alkali cations. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v.153, n.1, p.163-168, jan. 1983.

JENKINS, D.J.A.; WOLEVER, T.M.S.; TAYLOR, R.H.; BARKER, H.; FIELDEN, H.; BALDWIN, J.M.; BOWLING, A.C.; NEWMAN, H.C.; JENKINS, A.L.; GOFF, D.V. Glycemic index of foods: a physiological basis for carbohydrate exchange. **The American Journal of Clinical Nutrition**, Bathesda, v.34, p.362-366, mar., 1981.

JIMENEZ, A.; DAVIES, J. Expression of a transposable antibiotic resistane element in *Saccharomyces*. **Nature**, London, v.287, p.869-871, 1980.

JONES, R.P.; PAMMENT, N.; GREENFIELD, P.F. Alcohol fermentation by yeasts – the effect of environmental and other variables. **Process Biochemistry**, London, v.16, p.42-49, 1981.

KAJI, A.; COLOWICK, S.P. Adenosine triphosphatase activity of yeast hexokinase and it's relation to the mechanism of the hexokinase reaction. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v.240, p.4454-4462, 1965.

KANG, W.; SHUKLA, R.; SIRKAR, K.K. Ethanol production in a microporous hollow-fiber based extractive fermentor with immobilized yeast. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v.36, p.826-833, 1990.

KERKHOFFS, P.L.; STAMICARBON, B.V. **Preparation of fructose**. US 4277563. 1979.

KIDO, E.A. **Análises de tétrades e biométrica combinadas para o estudo da produção de etanol em *Saccharomyces cerevisiae***. 1990. 160p. Dissertação (Mestrado em genética) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1990.

KIERSTAN, M.P.J. Production of fructose syrup from inulin. **Process Biochemistry**, London, n.5, p.2-4, 1980.

KIM, C.H.; RHEE, S.K. Fructose production from *Jerusalem artichoke* by inulinase immobilized in chitin. **Biotechnology Letters**, Kew, v.11, n.3, p.201-206, 1989.

- KIRK, L.A.; DOELLE, H.W. Simultaneous fructose and ethanol production from sucrose using *Zymomonas mobilis* 2864 co-immobilized with invertase. **Biotechnology Letters**, Kew, n.16, p.533-538, 1994.
- KO, C.H.; LIANG, H.; GABER, R.F. Roles of multiple glucose transporters in *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular and Cellular Biology**, Washington, p.638-648, jan., 1993.
- KOPETZKI, E.; ENTIAN, K.D.; MECKE, D. Complete nucleotide sequence of the hexokinase P1 gene (*HXK1*) of *Saccharomyces cerevisiae*. **Gene**, Amsterdam, v.39, p.95-102, 1985.
- KOPPERSCHLÄGER, G.; HOFMANN, E. Über multiple formen der hexokinase in hefe. **European Journal of Biochemistry**, Oxford, v.9, p.419-428, 1969.
- KOREN, D.W.; DUVNJAK, Z. Continuous production of very enriched fructose syrup by the conversion of glucose to ethanol from glucose-fructose mixtures in an immobilized cell reactor. **International Journal of Food Science & Technology**, Oxford, n.24, p.429-437, 1989.
- KOREN, D.W.; DUVNJAK, Z. Pure fructose syrup and ethanol production from high fructose corn syrup supplemented with Jerusalem Artichoke Juice. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, Oxford, n.47, p.117-125, 1990.
- KOREN, D.W.; DUVNJAK, Z. Fed-batch production of concentrated fructose syrup and ethanol using *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 36859. **Acta Biotechnologica**, Berlin, v.12, n.6, p.489-496, 1992.
- KOREN, D.W.; DUVNJAK, Z. Kinetics of the selective fermentation of glucose from glucose/fructose mixtures using *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 36859. **Acta Biotechnologica**, Berlin, v.35, n.4, p.311-322, 1993.
- KRUCKEBERG, A.L. The hexose transporter family of *Saccharomyces cerevisiae*. **Archives of Microbiology**, Heidelberg, v.166, p.283-292, 1996.
- KUSCH, T.; GOSEWINKEL, W.; STOECK, G. **Process for the production of crystalline fructose**. US 3513023. 1970.
- LAGUNAS, R. Sugar transport in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v.104, p.229-242, 1993.
- LILLARD, D.W.; SCHANEFELT, R.V.; DAY, G.; SCHWAB, L.R. MALLEE, F.M. **Processo integrado para produção de frutose cristalina**. BR PI9301098-2. 1994.
- LIMA, U. de A.; BASSO, L.C.; AMORIM, H.V. Produção de etanol. In: LIMA, U. de A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. (Eds.) **Biotecnologia industrial: processos fermentativos e enzimáticos**. São Paulo: Edgard Blücher, 2001. p. 1-43.
- LMC (LMC international LTD) Disponível em: [http:// www.lmc.co.uk](http://www.lmc.co.uk). Acesso em 13 out. 2005.
- LOBO, Z.; MAITRA, P.K. Genetics of yeast hexokinase. **Genetics**, Bethesda, n.86, p.727-744, 1977a.
- LOBO, Z.; MAITRA, P.K. Physiological role of glucose-phosphorylating enzymes in *Saccharomyces cerevisiae*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, n.182, p.639-645, 1977b.

LOBO, Z.; MAITRA, P.K. Resistance to 2-deoxyglucose in yeast: A direct selection of mutants lacking glucose phosphorylating enzymes. **Molecular & General Genetics**, Berlin, n.157, p.297-300, 1977c.

LONG, J.E. High fructose corn syrups. In: Nabors, L.O.; Gelardi, R.C. (Eds.) **Alternative sweeteners**. 2nd. ed. New York: Marcel Dekker, 1991. p.247-258.

LONGTINE, M.S.; MCKENZIE, A.; DEMARINI, D.J.; SHAH, N.G.; WACH, A.; BRACHAT, A.; PHILIPPSSEN, P.; PRINGLE, J.R. Additional modules for versatile and economical PCR-based gene deletion and modification in *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, Chichester, n.14, p.953-961, 1998.

LORENZ, M.C.; MUIR, R.S.; LIM, E.; MCELVER, J.; WEBER, S.C.; HEITMAN, J. Gene disruption with PCR products in *Saccharomyces cerevisiae*. **Gene**, Amsterdam, n.158, p.113-117, 1995.

LUTSTORF, U.; MEGNET, R. Multiple forms of alcohol dehydrogenase in *Saccharomyces cerevisiae*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, n.126, p.933-947, 1968.

LYNESS, E.; DOELLE, H.W. Fermentation pattern of sucrose to ethanol conversion by *Zymomonas mobilis*. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v.26, p.475-486, 1981.

MACKIE, K.L.; DEVERELL, K.; CALLENDER, I.J. Aspects of wood hydrolysis via the dilute sulfuric acid process. In: CANADIAN INTERNATIONAL SYMPOSIUM OF ETHANOL FROM BIOMASS, Ottawa: 1982. **Proceedings**. Ottawa: Royal Society of Canada, 1982. p.271-308.

MAIORELLA, B.L.; CASTILLO, F.J. Ethanol, biomass and enzyme production for whey waste abatement. **Process Biochemistry**, London, v.19, p.157-161, 1984.

MAIORELLA, B.L.; BLANCH, H.W.; WILKE, C.R. Economic evaluation of alternative ethanol fermentation processes. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v.26, p.1003-1025, 1984.

MAITRA, P.K. A glucokinase from *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, n.245, p.2423-2431, 1970.

MAITRA, P.K. Glucose and fructose metabolism in a phosphoglucose-isomeraseless mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, n.107, p.759-763, 1971.

MAITRA, P.K. Glucokinase from yeast. **Methods in Enzymology**, New York, v.42, p.25-30, 1975.

MAYES, E.L.; HOGGETT, J.G.; KELLETT, G.L. The binding of glucose to native and proteolytically modified yeast hexokinase PI. **European Journal of Biochemistry**, Oxford, v.133, p.127-134, 1983.

MCELVER, J.; WEBER, S. FlagTM N-terminal epitope overexpression of bacterial alkaline phosphatase and FlagTM C-terminal epitope tagging by PCR one-step targeted integration. **Yeast**, Chichester, n.8, suppl.627, 1992.

MODERNIZADA, canicultura é líder de produção. **Visão Agrícola**, Piracicaba, n.1, p.60-62, jan./jun. 2004.

MORAES, M.A.F.D. de A cadeia produtiva da cana em mercado desregulamentado. **Visão Agrícola**, Piracicaba, n.1, p.94-99, jan./jun. 2004.

MOREIRA, J.R.; GOLDEMBERG, J. The alcohol program. **Energy Policy**, Guildford, v.27, p.229-245, 1999.

MORI, Y.; INABA, T. Ethanol production from starch in a pervaporation membrane bioreactor using *Clostridium thermohydrosulfuricum*. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v.36, p.849-853, 1990.

MORTIMER, R.K.; HAWTHORNE, D.C. Yeast genetics. In: ROSE, A.H.; HARRISON, J.S. (Eds.) **The yeasts**. New York: Academic Press, 1969. v.1, p.386-460.

MORTIMER, R.K.; HAWTHORNE, D.C. Genetic mapping in yeast. In: PRESCOTT, D.M. (Ed.) **Methods in cell biology**. New York: Academic Press, 1975. cap.12, p. 221-232.

MORTIMER, R.K.; SCHILD, D. Genetic mapping in *Saccharomyces cerevisiae*. In: STRATHERN, J.N.; JONES, E.W.; BROACH, J.R. (Eds.) **The molecular biology of the yeast *Saccharomyces***. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1981. p.11-26.

MORTIMER, R.K.; SCHILD, D. Genetic map of *Saccharomyces cerevisiae*, edition 9. **Microbiological Reviews**, Amsterdam, v.49, p.181-212, 1985.

MORTIMER, R.K.; SCHILD, D.; CONTOPOULOU, C.R.; KANS, J.A. Genetic map of *Saccharomyces cerevisiae*, **Yeast**, Chichester, n.5, p.321-403, 1989.

MUNZ, P. Dissecting yeast asci without a micromanipulator. In: PRESCOTT, D.M. (Ed.) **Methods in cell biology**. New York: Academic Press, 1975. Chap. 9, p. 185-188.

MURATSUBAKI, H.; KATSUME, T. Distribution of hexokinase isoenzymes depending on a carbon source in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, n.86, p.1030-1039, 1979.

NABORS, L.O.B.; GELARDI, R.C. (Ed.) **Alternative sweeteners**. 2nd ed. New York: Marcel Dekker, 1991. 461p.

NELSON H. A photometric adaptation of the Somogyi Method. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v.153, p.375-380, 1944.

NILSSON, K.G.I.; MOSBACH, K.; SAKAGUCHI, K. Increased yield of fructose from glucose employing thermophilic xylose isomerase in water-ethanol mixtures. **Biotechnology Letters**, Kew, v.13, n.11, p.787-792, 1991.

O AÇÚCAR brasileiro nas mesas do mundo. **Visão Agrícola**, Piracicaba, n.1, p.63-64, jan./jun. 2004.

OLIVER, S.G.; VAN DER AART, Q.J.M.; AGOSTONI-CARBONE, M.L.; AIGLE, M.; ALBERGHINA, L.; ALEXANDRAKI, D.; ANTOINE, G.; ANWAR, R.; BALLESTA, J.P.G.; BENIT, P.; *et al.* The complete DNA sequence of yeast chromosome III. **Nature**, London, n.357, p.38-46, 1992.

PASCHALIDIS, S. Le fructose. **Bios**, Paris, n.21, p.38-40, 1990.

PETERS, M.S.; TIMMERHAUS, K.D. **Plant design and economics for chemical engineers**. New York: McGraw-Hill, 1991.

PETIT, T.; DIDERICH, J.A.; KRUCKEBERG, A.L.; GANCEDO, C.; DAM, K.V. Hexokinase regulates kinetics of glucose transport and expression of genes encoding hexose transporters in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v.182, n.23, p.6815-6818, 2000.

PILNIK, W. Food additives. **Gordian**, Hamburg, n.73, p.39-40, 1973.

PRINGLE, J.R.; HARTWELL, L.H. The *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle. In: STRATHERN, J.N.; JONES, E.W.; BROACH, J.R. (Eds.) **The molecular biology of the yeast *Saccharomyces cerevisiae***. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1981. p. 97-142.

QURESHI, N.; MANDERSON, G.J. Bioconversion of renewable resources into ethanol: an economic evaluation of selected hydrolysis, fermentation and membrane technologies. **Energy Sources**, New York, v.17, p.241-265, 1995.

RAAMSDONK, L.M.; DIDERICH, J.A.; KUIPER, A.; GAALEN, M.V.; KRUCKEBERG, A.L.; BERDEN, J.A.; DAM, K.V. Co-consumption of sugars or ethanol and glucose in a *Saccharomyces cerevisiae* strain deleted in the *HXK2* gene. **Yeast**, Chichester, v.18, p.1023-1033, 2001.

REIFENBERGER, E.; FREIDEL, K.; CIRIACY, M. Identification of novel *HXT* genes in *Saccharomyces cerevisiae* reveals the impact of individual hexose transporters on glycolytic flux. **Molecular Microbiology**, Oxford, v.16, p.157-167, 1995.

REMIZE, F.; SCHORR-GALINDO, S.; GIRAUD, J.P.; DEQUIN, S.; BLONDIN, B. Construction of a flocculating yeast for fructose production from inulin. **Biotechnology Letters**, Kew, v.20, n.3, p. 313-318, 1998.

REUSSER, F.; GORIN, P.A.J.; SPENSER, J.F.T. The production of fructose as a residue of sucrose fermentation by *Tricholoma nudum*. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.6, p. 17-20, 1960.

RÍPOLI, M.L.C.; RÍPOLI, T.C.C.; GAMERO, C.A. Palhiço de cana, fonte de energia renovável. **Visão Agrícola**, Piracicaba, n.1, p.68-71, jan./jun. 2004.

ROCH-NORLUND, A.; HUTMAN, E.; SON NILSON, L.H. Metabolism of fructose in diabetes. **Acta Medica Scandinavica**, Stockholm, (suppl.), p.542-548, 1972.

RODRIGUES, R. O novo tempo da agroenergia renovável. **Visão Agrícola**, Piracicaba, n.1, p.4-7, jan./jun. 2004.

ROMAN, H. Development of yeast as na experimental organisms. In: STRATHERN, J.N.; JONES, E.W.; BROACH, J.R. (Eds.) **The molecular biology of the yeast *Saccharomyces***. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1981. p. 1-9.

ROSE, A.H. Growth and handling of yeasts. In: PRESCOTT, D.M. (Ed.) **Methods in cell biology**. New York: Academic Press, 1975. cap.1, p. 1-15.

ROSILLO-CALLE, F.; CORTEZ, L.A.B. Towards Proalchool II – A review of Brazilian bioethanol programme. **Biomass and Bioenergy**, Pergamon, v.14, n.2, p.115-124, 1998.

ROTHSTEIN, R.J. One-step gene disruption in yeast. **Methods in Enzymology**, New York, v.101, p.202-211, 1983.

RUDD, D.F.; WATSON, C.C. **Strategy of process engineering**. New York: John Wiley and Sons, 1968.

SCHEININ, A.; MAKINEN, K.K.; YLITALO, K. Turku sugar studies V. Final report of the effect of sucrose, fructose and xylitol diets on the caries incidence in man. **Acta Odontologica Scandinavica**, Stockholm, v.34, p.179-216, 1976.

SCHENCK, F.W. High fructose syrups – a review. **International Sugar Journal**, London, v.102, n.1218, p.285-288, 2000.

SCHMIDT, J.J.; COLOWICK, S.P. Chemistry and subunit structure of yeast hexokinase isoenzymes. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v.158, p.458-470, 1973.

SCHMITZ, A.; POLOPOLOUS, L. Alcohol fuel tax policy: sugar, corn and the environment. In: CASEY, F.; SCHMITZ, A.; SWINTON, S.; ZILBERMAN, D. (Eds.) **Flexible incentives for the adoption of environment environmental technologies in agriculture**. Norwell, MA:Kluwer Academic Publishers, 1999. p. 157-178.

SCHMITZ, A.; SEALE, J.L.; SCHMITZ, T.G. Sweetener-ethanol complex in Brasil, the United States and Mexico: Do prices matter? **International Sugar Journal**, London, v.105, n.1259, p.505-513, 2003.

SCHORR-GALINDO, S.; FONTANA, A.; GUIRAUD, J.P. Fructose syrups and ethanol production by selective fermentation of inulin **Current Microbiology**, New York, v.30, p.325-330, 1995a.

SCHORR-GALINDO, S.; GHOMMIDH, C.; GUIRAUD, J.P. Simultaneous production of sugars and ethanol from inulin rich-extracts in a chemostat. **Biotechnology Letters**, Kew, v.17, n.6, p.655-658, 1995b.

SHALLENBERGER, R.S. Hydrogen bonding and the varying sweetness of the sugars. **Journal of Food Science**, Chicago, v.28, p.584-589, 1963.

SHERMAN, F. Getting started with yeast. **Methods in Enzymology**, New York, v.194, p.3-21, 1991.

SHERMAN, F. Use of micromanipulators in yeast studies. In: PRESCOTT, D.M. (Ed.) **Methods in cell biology**. New York: Academic Press, 1975. cap.10, p. 189-199.

SHERMAN, F.; HICKS, J. Micromanipulation and Dissection of Asci. **Methods in Enzymology**, New York, v.194, p.21-37, 1991.

SHILL, J.P.; PETERS, B.A.; NEET, K.E. Monomer-dimer equilibriums of yeast hexokinase during reacting enzyme sedimentation. **Biochemistry**, Washington, v.13, p.3864-3871, 1974.

SMITH, T.F.; WATERMAN, M.S. Identification of common molecular subsequences. **Journal of Molecular Biology**, London, v.147, p.195-197, 1981.

SPROULL, R.D.; LIM, H.C.; SCHNEIDER, D.R. A model for enzymatic isomerization of D-glucose to D-fructose in a batch reactor. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v.18, p.633-648, 1976.

STALEY, M.F.G. Crystalline fructose: a breakthrough in corn sweetener process technology. **Food Technology**, Champaign, v.72, p.66-67, Jan., 1987.

SUNTINANALERT, P.; PEMBERTON, J.P.; DOELLE, H.W. The production of ethanol plus fructose sweetener using fructose utilization negative mutant of *Zymomonas mobilis*. **Biotechnology Letters**, Kew, v.8, p.351-356, 1986.

TALBOT, J.; FISHER, K. The need for special foods and sugar substitutes by individuals with diabetes mellitus. **Diabetes Care**, New York, v.1, p.231-244, 1978.

TAVARES, F.C.A. **Princípios do melhoramento em função de parâmetros biométricos aplicados a *Saccharomyces uvarum* Beijerinck**. 1974. 100p. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1974.

TAVARES, F.C.A.; ECHEVERRIGARAY, S. Yeast breeding for fuel production. In: STEWART, G.G.; RUSSELL, I.; KLEIN, R.D.; HIEBSCH, R.R. (Eds.) **Biological research on industrial yeasts**. Boca Raton: CRC Press, 1987. v.1, p. 59-79.

UENG, P.P.; MCCracken, L.D.; GONG, C.S.; TSAO, G.T. Fructose production from sucrose and high fructose syrup: a mycelial fungal system. **Biotechnology Letters**, Kew, v.4, p.353-358, 1982.

URIBELARREA, J.L.; WINTER, J.; GOMA, G.; PAREILLEUX, A. Determination of maintenance coefficients of *Saccharomyces cerevisiae* cultures with cell recycle by cross-flow membrane filtration. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v.35, p.201-206, 1990.

VAN STEVENINCK, J.; ROTHSTEIN, A. Sugar transport and metal binding in yeast. **The Journal of General Physiology**, Baltimore, v.49, p.235-246, 1965.

VISURI, K.; KLIBANOV, A.M. Enzymatic production of high fructose corn syrup (HFCS) containing 55% fructose in aqueous ethanol. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v.30, p.917-920, 1986.

VOJTEK, A.B.; FRAENKEL, D.G. Phosphorylation of yeast hexokinases. **European Journal of Biochemistry**, Oxford, v.190, p.371-375, 1990.

VUILLEUMEIR, S. Worldwide production of high fructose syrup and crystalline fructose. **The American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v.58, suppl.5, p.733-736, 1993.

WACH, A.; BRACHAT, A.; PÖHLMANN, R.; PHILIPPSEN, P. New heterologous modules for classical or PCR-based gene disruptions in *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, Chichester, v.10, p.1793-1808, 1994.

WACH, A.; BRACHAT, A.; ALBERTI-SEGUI, C.; REBISCHUNG, C.; PHILIPPSEN, P. Heterologous *HIS3* marker and GFP reporter modules for PCR-targeting in *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, Chichester, v.13, p.1065-1075, 1997.

WALSH, M.C.; SMITS, H.P.; SCHOLTE, M.; VAN DAM, K. Affinity of glucose transport in *Saccharomyces cerevisiae* is modulated during growth on glucose. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v.176, p.953-958, 1994.

WHEALS, A.E.; BASSO, L.C.; ALVES, D.M.G.; AMORIM, H.V. Fuel ethanol after 25 years. **Trends in Biotechnology**, London, v.17, p.482-487, Dec., 1999.

WILLAMAN, J.J. Levulose syrup. **Science**, Washington, v.52, p.351-352, 1920.

WILLIAMS, D.; MUENNECKE, D.M. The production of ethanol by immobilized yeast cells. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v.23, p.1813-1825, 1981.

WOMACK, F.C.; COLOWICK, S.P. Catalytic activity with associated and dissociated forms of the yeast hexokinases. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v.191, p.742-747, 1978.

WOMACK, F.C.; COLOWICK, S.P. Proton-dependent inhibition of yeast and brain hexokinases by aluminum in ATP preparations. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, Washington, v.76, n.10, p.5080-5089, 1979.

WORKMAN, W.E.; DAY, D.F. Enzymatic hydrolysis of inulin to fructose by glutaraldehyde fixed yeast cells. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v.26, p.905-910, 1984.

ZANIN, G.M.; SANTANA, C.C.; BON, E.P.S.; GIORDANO, R.C.L.; MORAES, F.F.; ANDRIETTA, S.R.; CARVALHO NETO, C.C.; MACEDO, I.C.; LAHR, D.; RAMOS, L.P. Brazilian bioethanol program. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v.84, p.1147-1161, 2000.

APÊNDICES

	Fonte de carbono		
Horas	Gli	Fru	Sac
0	0,0515	0,021	0,0478
2	0,1019	0,0795	0,0752
4	0,3135	0,3204	0,3262
6	0,7409	0,7728	0,7500
8	1,2191	1,1265	1,1942
10	1,4136	1,3023	1,4313
12	1,4223	1,3034	1,4295

Quadro 1 – Dados da curva de crescimento (Figura 6 – página 68) da linhagem controle PE em meios YEP (1% de extrato de levedura e 1% de peptona) tendo como fonte de carbono 2% de açúcar: glicose (Gli); frutose (Fru) ou sacarose (Sac). Valores de absorbância à 600 nm.

	Fonte de carbono		
Horas	Gli	Fru	Sac
0	0,0757	0,0801	0,1011
2	0,1285	0,1207	0,1271
4	0,2659	0,1695	0,2582
6	0,4654	0,2506	0,4559
8	0,7272	0,3515	0,6888
10	1,0582	0,5220	1,0386
12	1,2343	0,6150	1,2234

Quadro 2 – Dados da curva de crescimento (Figura 6 – página 68) da linhagem mutante I1 em meios YEP (1% de extrato de levedura e 1% de peptona) tendo como fonte de carbono 2% de açúcar: glicose (Gli); frutose (Fru) ou sacarose (Sac). Valores de absorbância à 600 nm.

	Fonte de carbono		
Horas	Gli	Fru	Sac
0	0,0858	0,0858	0,0788
2	0,1656	0,1418	0,1557
4	0,2961	0,1800	0,2825
6	0,5161	0,2440	0,4864
8	0,7959	0,3568	0,7549
10	1,1320	0,5444	1,0918
12	1,3142	0,6379	1,2985

Quadro 3 – Dados da curva de crescimento (Figura 7 – página 69) da linhagem mutante J3 em meios YEP (1% de extrato de levedura e 1% de peptona) tendo como fonte de carbono 2% de açúcar: glicose (Gli); frutose (Fru) ou sacarose (Sac). Valores de absorbância à 600 nm.

	Fonte de carbono		
Horas	Gli	Fru	Sac
0	0,0745	0,0813	0,0742
2	0,1459	0,1272	0,1387
4	0,2596	0,1620	0,2461
6	0,4706	0,2472	0,4480
8	0,6684	0,3218	0,6966
10	1,0612	0,5107	1,0165
12	1,3098	0,6065	1,2767

Quadro 4 – Dados da curva de crescimento (Figura 7 – página 69) da linhagem mutante U1 em meios YEP (1% de extrato de levedura e 1% de peptona) tendo como fonte de carbono 2% de açúcar: glicose (Gli); frutose (Fru) ou sacarose (Sac). Valores de absorbância à 600 nm.

	Levedura (linhagem)			
Horas	PE	U1	J3	I1
0	125,5	125,5	125,5	125,5
4	64,5	117,2	116,4	112,6
8	0	122,4	118,5	126
12	0	131	115,2	131,2
16	0	110,2	133,3	131,6

Quadro 5 – Dados do primeiro ensaio de fermentação (Figura 8 – página 71) - consumo de ART (g.L^{-1}) pelas linhagens PE, U1, J3 e I1 em 16 horas de fermentação em meio YEP (1% de extrato de levedura e 1% de peptona) tendo como fonte de carbono 125,5 g.L^{-1} de frutose (média de duas amostras).

	Levedura (linhagem)			
Horas	PE	U1	J3	I1
0	0	0	0	0
4	38	0	0	0
8	61,8	0	0	0
12	64,1	0	0	0
16	64,1	0	0	0

Quadro 6 – Dados do primeiro ensaio de fermentação (Figura 8 – página 71) - produção de etanol (g/L) pelas linhagens PE, U1, J3 e I1 em 16 horas de fermentação em meio YEP (1% de extrato de levedura e 1% de peptona) tendo como fonte de carbono 125,5 g.L^{-1} de frutose (média de duas amostras).

	Levedura (linhagem)			
Horas	PE	U1	J3	I1
0	139,1	139,1	139,1	139,1
4	62,0	92,8	91,9	89,4
8	0	28,2	53,2	47,4
12	0	0	0	0
16	0	0	0	0

Quadro 7 – Dados do primeiro ensaio de fermentação (Figura 8 – página 71) - consumo de ART (g/L) pelas linhagens PE, U1, J3 e I1 em 16 horas de fermentação em meio YEP (1% de extrato de levedura e 1% de peptona) tendo como fonte de carbono 139,1 g.L⁻¹ de glicose (média de duas amostras).

	Levedura (linhagem)			
Horas	PE	U1	J3	I1
0	0	0	0	0
4	37,1	22,4	19,9	20,7
8	61,4	46,0	39,5	47,3
12	59,4	66,8	62,8	68,5
16	71,0	71,0	62,2	69,0

Quadro 8 – Dados do primeiro ensaio de fermentação (Figura 8 – página 71) - produção de etanol (g/L) pelas linhagens PE, U1, J3 e I1 em 16 horas de fermentação em meio YEP (1% de extrato de levedura e 1% de peptona) tendo como fonte de carbono 139,1 g.L⁻¹ de glicose (média de duas amostras).

	Levedura				
ciclo	PE	J3	I1	Y0	Y1
1	6,64	3,34	2,94	6,60	5,73
2	7,38	3,49	3,33	7,42	8,29
3	8,02	3,50	3,88	8,59	7,68
4	7,89	4,00	4,05	7,28	8,32
5	8,46	3,18	3,46	8,00	7,61
6	7,83	3,48	3,71	8,14	8,48
7	7,77	3,18	3,46	8,40	7,54
8	7,75	3,27	3,72	8,01	8,46
9	7,23	4,01	4,23	7,55	8,11

Quadro 9 – Dados do segundo ensaio de fermentação (Figura 11 – página 74) - valores de etanol produzido (%) após fermentação em meio de sacarose ao longo de 9 ciclos fermentativos.

	Levedura				
ciclo	PE	J3	I1	Y0	Y1
1	0	8,58	8,59	0	0
2	0	8,59	8,61	0	0
3	0	8,55	8,56	0	0
4	0	8,6	8,9	0	0
5	0	9,13	9,25	0	0
6	0	9,25	9,24	0	0
7	0	8,94	8,65	0	0
8	0	9,07	9,01	0	0
9	0	9,14	9,03	0	0

Quadro 10 – Dados do segundo ensaio de fermentação (Figura 11 – página 74) - valores de ART (frutose) não-consumido (%) após fermentação em meio de sacarose ao longo de 9 ciclos fermentativos.

	Levedura				
ciclo	PE	J3	I1	Y0	Y1
1	5	5	5	5	5
2	5,58	5,79	5,51	5,6	5,47
3	6,16	6,13	5,85	5,85	5,7
4	6,58	6,27	5,91	6,09	5,88
5	6,71	6,5	6,21	6,23	5,98
6	7,02	6,74	6,36	6,32	5,96
7	7,24	7,12	6,59	6,51	6,1
8	7,41	7,41	6,86	6,58	6,19
9	7,47	7,56	7,06	6,64	6,25

Quadro 11 – Dados do segundo ensaio de fermentação (Figura 12 – página 75) - valores de biomassa produzida (g/tubo) após fermentação em meio de sacarose ao longo de 9 ciclos fermentativos.

	Levedura				
ciclo	PE	J3	I1	Y0	Y1
1	96,4	92,8	94,5	93	95,1
3	86,8	90,4	92	93,3	91,4
6	76,4	85,4	79,1	86,2	86,1
9	70,6	77,4	68,5	75,1	73,1

Quadro 12 – Dados do segundo ensaio de fermentação (Figura 12 – página 75) - valores da viabilidade das leveduras (%) após fermentação em meio de sacarose ao longo de 9 ciclos fermentativos.

	Levedura				
ciclo	PE	J3	I1	Y0	Y1
1	71,93	72,45	63,77	71,5	62,08
2	79,95	75,7	72,23	80,39	89,81
3	86,89	75,92	84,16	93,06	83,2
4	85,48	86,76	87,85	78,87	90,14
5	91,65	68,98	75,05	86,67	82,44
6	84,83	75,48	80,47	88,19	91,87
7	84,18	68,98	75,05	91	81,69
8	83,96	70,93	80,69	86,78	91,65
9	78,33	86,98	91,75	81,79	87,86

Quadro 13 – Dados do segundo ensaio de fermentação (Figura 13 – página 76) - valores da eficiência fermentativa (%) após fermentação em meio de sacarose ao longo de 9 ciclos fermentativos.

Figura 1 – Efeito de diferentes leveduras ao longo de 9 ciclos fermentativos sobre o parâmetro teor de etanol (segundo ensaio de fermentação - Figura 11 – página 74)

Teste de Tukey para médias de tratamento e ciclo.

Tratamento	Média	5%	1%
PE	7,871	a	A
J3	3,495	b	B
I1	3,837	b	B
Y0	7,777	a	A
Y1	7,871	a	A

Médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de significância indicado.

C.V. = 3,636%

D.M.S. 5% = 1,48697

D.M.S. 1% = 2,35456

Ciclo	Média	5%	1%
3	6,335	a	A
6	6,331	a	A
4	6,310	a	A
8	6,245	a	A
9	6,227	a	A
5	6,143	a	A
7	6,071	a	A
2	5,984	a	A
1	5,519	a	A

Médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de significância indicado.

C.V. = 9,484%

D.M.S. 5% = 0,85295

D.M.S. 1% = 1,01104

Figura 2 – Efeito de diferentes leveduras ao longo de 9 ciclos fermentativos sobre o parâmetro teor de frutose (segundo ensaio de fermentação - Figura 11 – página 74)

Teste de Tukey para médias de tratamento e ciclo.

Tratamento	Média	5%	1%
PE	0	b	B
J3	8,877	a	A
I1	8,875	a	A
Y0	0	b	B
Y1	0	b	B

Médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de significância indicado.

C.V. = 2,430%

D.M.S. 5% = 0,57565

D.M.S. 1% = 0,91152

Ciclo	Média	5%	1%
6	3,698	a	A
5	3,676	ab	A
9	3,634	abc	AB
8	3,616	abcd	AB
7	3,518	abcd	AB
4	3,500	bcd	AB
2	3,440	cd	B
3	3,438	cd	B
1	3,436	d	B

Médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de significância indicado.

C.V. = 3,774%

D.M.S. 5% = 0,19662

D.M.S. 1% = 0,23306

Figura 3 – Efeito de diferentes leveduras ao longo de 9 ciclos fermentativos sobre o parâmetro biomassa produzida (segundo ensaio de fermentação - Figura 12 – página 75)

Teste de Tukey para médias de tratamento e ciclo.

Tratamento	Média	5%	1%
PE	6,574	a	A
J3	6,488	ab	A
I1	6,150	bc	AB
Y0	6,086	c	AB
Y1	5,836	c	B

Médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de significância indicado.

C.V. = 0,937%

D.M.S. 5% = 0,38908

D.M.S. 1% = 0,61609

Ciclo	Média	5%	1%
9	6,996	a	A
8	6,890	a	A
7	6,688	ab	AB
6	6,480	bc	BC
5	6,326	c	BC
4	6,146	cd	CD
3	5,919	de	DE
2	5,590	e	E
1	5,010	f	F

Médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de significância indicado.

C.V. = 3,714%

D.M.S. 5% = 0,33933

D.M.S. 1% = 0,40222

Figura 4 – Efeito de diferentes leveduras ao longo de 9 ciclos fermentativos sobre o parâmetro viabilidade das leveduras (segundo ensaio de fermentação - Figura 12 – página 75)

Teste de Tukey para médias de tratamento e ciclo.

Tratamento	Média	5%	1%
PE	82,55	c	B
J3	86,51	a	A
I1	83,52	b	B
Y0	86,71	a	A
Y1	86,42	a	A

Médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de significância indicado.

C.V. = 0,200%

D.M.S. 5% = 0,75608

D.M.S. 1% = 1,19722

Ciclo	Média	5%	1%
1	94,36	a	A
3	90,62	b	B
6	82,64	c	C
9	72,94	d	D

Médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de significância indicado.

C.V. = 0,822%

D.M.S. 5% = 0,90306

D.M.S. 1% = 1,16202

Figura 5 – Efeito de diferentes leveduras ao longo de 9 ciclos fermentativos sobre o parâmetro eficiência da fermentação levando-se em conta os carboidratos disponíveis (segundo ensaio de fermentação - Figura 13 – página 76)

Teste de Tukey para médias de tratamento e ciclo.

Tratamento	Média	5%	1%
PE	83,04	a	A
J3	75,80	a	A
I1	79,08	a	A
Y0	84,25	a	A
Y1	84,52	a	A

Médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de significância indicado.

C.V. = 2,343%

D.M.S. 5% = 12,7145

D.M.S. 1% = 20,1331

Ciclo	Média	5%	1%
4	85,85	a	A
9	85,35	a	A
3	84,64	a	A
6	84,22	a	A
8	82,84	a	A
5	80,98	a	AB
7	80,19	a	AB
2	79,64	a	AB
1	68,35	b	B

Médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de significância indicado.

C.V. = 9,319%

D.M.S. 5% = 11,1231

D.M.S. 1% = 13,1847

	Tempo (em horas)							
Caldo de cana	0	2	4	6	8	10	13	27
Caldo puro	263,0	262,4	260,9	241,1	234,1	211,3	201,5	129,7
Caldo diluído	164,6	159,9	158,4	146,1	138,0	123,7	113,8	80,5

Quadro 14 – Dados do terceiro ensaio de fermentação (Figura 15 – página 78) - valores de ART (g.L^{-1}) consumidos pela linhagem hexokinase-deficiente I1 em 27 horas de fermentação em meio de caldo de cana puro (com 263 g.L^{-1} de ART) e diluído (com 164 g.L^{-1} de ART).

	Tempo (em horas)							
Caldo de cana	0	2	4	6	8	10	13	27
Caldo puro	0	0	0	10,4	13,5	24,5	29,5	54,5
Caldo diluído	0	0	2,2	6,5	12,9	19,7	23,8	37,7

Quadro 15 – Dados do terceiro ensaio de fermentação (Figura 15 – página 78) - valores de etanol (g.L^{-1}) produzidos pela linhagem hexokinase-deficiente I1 em 27 horas de fermentação em meio de caldo de cana puro (com 263 g.L^{-1} de ART) e diluído (com 164 g.L^{-1} de ART).

	Tempo (em horas)					
Melaço de cana	0	6	11	20	26	52
M1	406	386	355,5	274,3	219	2,6
M2	264	233,6	137,6	4,4	4,2	3,2

Quadro 16 – Dados do quarto ensaio de fermentação (Figura 17 – página 80) - valores de ART (g.L^{-1}) consumidos pela linhagem controle (PE) em 52 horas de fermentação em meio de melaço de cana com 406 g.L^{-1} de ART (m1) e com 264 g.L^{-1} de ART (m2).

	Tempo (em horas)					
Melaço de cana	0	6	11	20	26	52
M1	406	363,3	343	309,9	283,6	199,4
M2	264	235,1	205,1	169,3	138,4	130,1

Quadro 17 – Dados do quarto ensaio de fermentação (Figura 17 – página 80) - valores de ART (g.L^{-1}) consumidos pela linhagem hexokinase-deficiente I1 em 52 horas de fermentação em meio de melaço de cana com 406 g.L^{-1} de ART (m1) e com 264 g.L^{-1} de ART (m2).

	Tempo (em horas)					
Melaço de cana	0	6	11	20	26	52
M1	0	5,1	14,6	60,7	85,8	191,7
M2	0	18,7	66	130,8	127,4	132,9

Quadro 18 – Dados do quarto ensaio de fermentação (Figura 17 – página 80) - valores de etanol (g.L^{-1}) produzidos pela linhagem controle PE em 52 horas de fermentação em meio de melaço de cana com 406 g.L^{-1} de ART (m1) e com 264 g.L^{-1} de ART (m2).

	Tempo (em horas)					
Melaço de cana	0	6	11	20	26	52
m1	0	6	18,8	35,3	52,9	98,4
m2	0	15,5	32,2	65,7	63,1	63,4

Quadro 19 – Dados do quarto ensaio de fermentação (Figura 17 – página 80) - valores de etanol (g.L^{-1}) produzidos pela linhagem hexokinase-deficiente I1 em 52 horas de fermentação em meio de melaço de cana com 406 g.L^{-1} de ART (m1) e com 264 g.L^{-1} de ART (m2).