

CINÉTICA DO CRESCIMENTO DE LEVEDURAS EM MEIO SINTÉTICO, NA PRESENÇA DE INIBIDORES, USANDO DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE FERMENTO

J. H. S. OLIVEIRA¹, M. C. S. SILVA¹, L. M. O. SILVA¹, M. S. R. SANTOS² e R. M. R. G. ALMEIDA¹

¹ Universidade Federal de Alagoas, Centro de Tecnologia

² Universidade Federal de São Carlos, Departamento de Engenharia Química
E-mail para contato: jhenriquesoliveira@hotmail.com

RESUMO – O presente trabalho teve como objetivo estudar a influência da concentração de fermento, e dos principais contaminantes gerados no pré-tratamento de materiais lignocelulósicos sobre o perfil fermentativo e viabilidade celular da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, em meio sintético YPD, com e sem a adição dos contaminantes, ácido acético e furfural em diferentes concentrações. Os ensaios foram conduzidos em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL de meio, e agitação de 100 rpm, mantidos a temperatura de 30°C, num sistema em batelada. Como forma de acompanhar a cinética fermentativa coletou-se uma amostra do fermentado a cada 2 horas, aferindo-se o teor de sólidos solúveis, Brix, e a massa celular. Após fermentação, o caldo sobrenadante foi utilizado para verificação da viabilidade celular através de contagem em Câmara Neubauer. O teor de sólidos solúveis inicial dos meios estava em aproximadamente 6,0°Brix, e nos experimentos que ocorreram maior redução houve diminuição de 2,2°Brix, para a quantidade inicial de 0,2 g de fermento na ausência de contaminantes, já para os meios que continham os inibidores a maior variação no °Brix ocorreu em um ensaio com maior quantidade inicial de fermento, 1,0 g; e, a partir dos resultados de viabilidade celular observou-se que as leveduras mostram-se mais resistentes aos inibidores quando a concentração inicial de inóculo é maior.

1. INTRODUÇÃO

A fermentação é um processo pelo qual os microrganismos utilizam diversas moléculas orgânicas, como os açúcares, para produzir energia. No caso da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, a glicose é convertida em etanol com alta eficiência. Tais leveduras têm sido tradicionalmente utilizadas nas grandes indústrias produtoras de etanol, podendo ser leveduras de panificação, prensadas e secas ou leveduras selecionadas, com tolerância a altos teores de etanol e com boa velocidade de fermentação (BELLUCO, 2001).

O Brasil é pioneiro na produção de etanol e, no seu uso como combustível alternativo em larga escala, transformando-se em um dos maiores produtores, consumidores e exportadores de etanol do mundo, ocupando posição de liderança na tecnologia de sua produção (CHAVES; GOMES; PEREIRA, 2010) e, segundo dados da Renewable Fuels Association (2011), a produção de etanol

combustível está em torno de 75 bilhões de litros por ano, sendo a maior parte deste total, cerca de 95%, produzida pela fermentação de determinados açúcares pela levedura *Saccharomyces cerevisiae*, o que reforça a necessidade de estudos sobre a influência de parâmetros que podem interferir no processo fermentativo.

No entanto, o aumento da demanda de combustível e a crescente preocupação com o meio ambiente têm levado a busca por novas matérias-primas para a produção de etanol. Neste contexto, o bioetanol, ou etanol de segunda geração, proveniente de materiais lignocelulósicos como o bagaço e a palha da cana-de-açúcar, torna-se uma alternativa promissora. Entretanto, esta biomassa necessita de um pré-tratamento para a hidrólise da celulose e da hemicelulose em monômeros de açúcar, disponibilizando-os para a fermentação.

Segundo Santos (2014), durante o pré-tratamento do material lignocelulósico pode ocorrer liberação de substâncias que inibem o correto desenvolvimento da levedura, mesmo em condições ótimas de fermentação. Esses produtos de degradação são em geral: o furfural, formado a partir da degradação de pentoses; o HMF, formado como consequência da degradação de hexoses; e o ácido acético, formado devido a hidrólise da hemicelulose.

Os efeitos negativos produzidos por esses compostos químicos vão desde a diminuição da taxa específica de crescimento e da produtividade de etanol, até a redução da síntese da biomassa. Os compostos aromáticos mostram-se como os mais tóxicos para os microrganismos, pois causam danos na membrana celular (ROSSELL, 2006; CHAVES, GOMES, PEREIRA, 2010). O efeito biológico de certos compostos pode ser intensificado na presença de outros compostos e, no caso da inibição microbiana, tal efeito pode ser aditivo ou simultâneo (KLINKE *et al.*, 2004). Por exemplo, o ácido acético quando adjunto ao furfural ocorre uma interação oposta no crescimento (PALMQVIST E HANH-HAGERDAL, 2000).

O estudo do processo fermentativo consiste em analisar a evolução dos valores de concentração de componentes do sistema de cultivo em função do tempo de fermentação. Estes componentes podem ser entendidos como o microrganismo, o produto do metabolismo e o substrato, e seus valores experimentais de concentração permitem que sejam traçadas curvas de ajuste que descrevam os mesmos (GRETSMANN, 2009). Em uma fermentação ocorrem muitas transformações, células crescem, reproduzem-se e morrem; substâncias diversas existentes no meio são consumidas pelos microrganismos e produtos de metabolismo são lançados no meio em que os microrganismos atuam (SANTOS, 2013).

Tendo em vista que a concentração do inóculo é um parâmetro fundamental para o rendimento do processo fermentativo, é de grande importância avaliar o efeito da concentração inicial da levedura a ser inoculada. Além disso, as condições ambientais do processo, como pH, temperatura, oxigênio e a composição do meio de cultura são fatores importantes, capazes de influenciar fortemente a produtividade de qualquer processo de bioconversão (CABRAL, 2005).

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Preparo do Inóculo

Para o preparo do inóculo nos ensaios de fermentação utilizou-se o meio de cultura YPD (Yeast Peptone Dextrose), com a seguinte composição: 10 g/L de extrato de levedura; 20 g/L de glicose; 20 g/L de peptona bacteriológica, tendo o pH ajustado para 5,0 com HCl 0,25 M. Como microrganismo utilizou-se a levedura *Saccharomyces cerevisiae* comercial, na forma de fermento seco.

2.2. Fermentação Etanólica

As fermentações foram conduzidas em frascos Erlenmeyers de 250 mL contendo 100 mL de meio, mantidos em shaker com agitação de 100 rpm e 30°C.

Diferentes ensaios fermentativos foram realizados, na presença e ausência de contaminantes, conforme descrito a seguir. Para os ensaios realizados na ausência de contaminantes, a variável estudada foi a concentração inicial de fermento utilizada, avaliando-se nesse caso a cinética de consumo de substrato e o aumento da massa celular. Para os demais ensaios, foram adicionados os principais contaminantes gerados no processo de pré-tratamento de materiais lignocelulósicos: furfural e ácido acético. Esses inibidores foram acrescidos ao meio de cultura em diferentes proporções buscando verificar a partir de qual concentração (de furfural e ácido acético) o rendimento fermentativo é afetado. A viabilidade celular também foi analisada após as 24 horas de fermentação.

2.3. Metodologia Analítica

A escala de Brix foi utilizada para determinar a concentração de açúcar no meio fermentativo, aplicando o método de refratometria, utilizando refratômetro portátil para a leitura, efetuando a devida correção de temperatura.

A concentração celular foi determinada através de método espectrofotométrico. As amostras foram diluídas na proporção 1:50 e fez-se as leituras de absorbância em espectrofotômetro com comprimento de onda de 600 nm. O valor de absorbância lido foi convertido em concentração, em g/L, utilizando a curva padrão que relaciona a absorbância com concentração celular em termos de massa seca em g/L.

O crescimento relativo, em termos de massa celular, foi calculado a partir da razão entre a variação da massa celular ao longo do tempo, pela massa celular inicial.

A viabilidade celular da levedura *Saccharomyces cerevisiae* foi feita a partir da contagem dos microrganismos realizada em Câmara de Neubauer espelhada, adotando a técnica preconizada por Antonini (2004), considerando as células coradas de azul como mortas, e as transparentes como ainda vivas.

2.4. Planejamento Experimental

Com o objetivo de avaliar quais fatores influenciam a viabilidade celular da levedura, um planejamento experimental 2^3 completo foi realizado verificando dentre as variáveis e níveis estudados os parâmetros relevantes. As análises de °Brix e massa celular foram realizadas em triplicata, e as variáveis estudadas apresentando seus respectivos máximos e mínimos, conforme a Tabela 1.

Tabela 1 – Condições experimentais

Ensaio sem contaminantes	Planejamento experimental 2^3		
Fermento (g)	Fatores	(-)	(+)
0,2	Fermento (g)	0,2	1,0
0,5	Ácido acético (mL)	0,5	2,5
1,0	Furfural (mL)	0,1	0,5

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Para os ensaios fermentativos realizados na ausência de contaminantes, analisou-se o comportamento da levedura variando apenas a quantidade inicial de fermento adicionada ao meio. O maior consumo de açúcares ocorreu no experimento com menor quantidade inicial de fermento, obtendo redução de 2,2° Brix. Porém o ensaio que apresentou maior ganho relativo de massa celular, cerca de 44,2%; foi o de massa inicial 0,5 g. Os resultados obtidos experimentalmente estão contidos na Tabela 2.

Tabela 2 – Comportamento fermentativo na ausência de contaminantes

Tempo (h)	Massa celular (g/L)		
	Massa inicial de fermento (g)		
	0,2	0,5	1,0
0	2,00	5,00	10,00
2	2,57	6,24	11,59
4	3,31	7,18	13,09
6	4,24	7,91	13,32
8	4,74	8,45	13,39

A Figura 1 apresenta o gráfico da cinética de crescimento da levedura para as diferentes quantidades iniciais de fermento, nela é possível observar que nas primeiras duas horas de fermentação o maior aumento ocorreu no experimento com maior concentração inicial de fermento, porém, a partir de quatro horas o crescimento da levedura foi mais intensificado nos demais ensaios, enquanto no ensaio com maior concentração inicial o comportamento da levedura assemelha-se a fase estacionária.

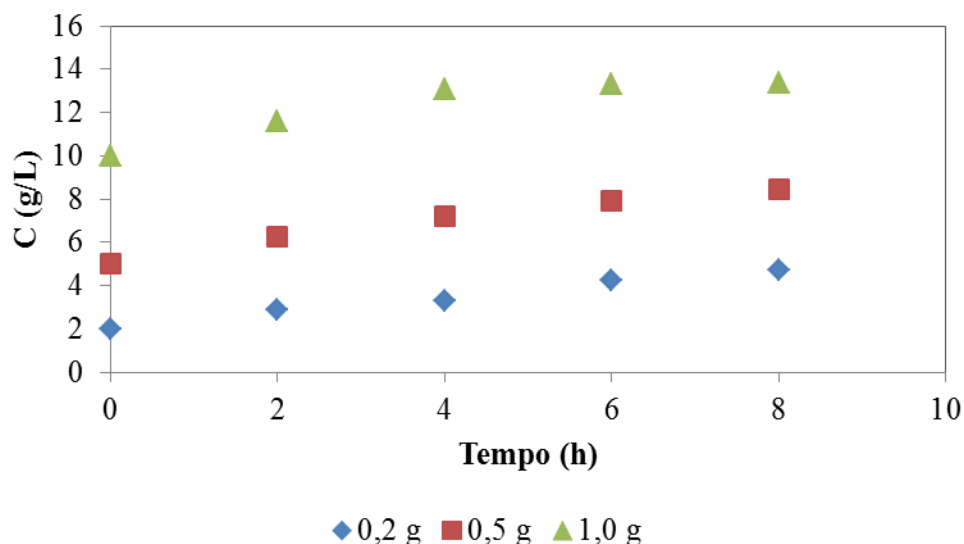


Figura 1 – Cinética de crescimento na ausência de contaminantes.

Para as fermentações na presença dos contaminantes foi realizado um planejamento experimental com objetivo de analisar, de forma mais rápida, quais os fatores influenciam a viabilidade celular da levedura. A matriz do planejamento foi montada conforme a Tabela 3, as variáveis estudadas foram a quantidade de fermento, a de ácido acético e a de furfural, os resultados analisados foram: o aumento da massa celular entre 2 e 8 h de fermentação, a variação do °Brix e a viabilidade celular após 24 h de fermentação.

Tabela 3 – Matriz do planejamento experimental 2^3

Ensaio	Fermento (g)	Ácido acético (mL)	Furfural (mL)	Massa Celular (g/L)		$\Delta^\circ\text{Brix}$
				2 h	8 h	
1	0,2	0,5	0,1	2,14	2,90	0,1
2	1,0	0,5	0,1	12,07	13,27	0,0
3	0,2	2,5	0,1	2,35	2,44	0,7
4	1,0	2,5	0,1	10,29	11,28	0,8
5	0,2	0,5	0,5	2,11	2,78	0,4
6	1,0	0,5	0,5	11,07	12,43	0,9
7	0,2	2,5	0,5	2,20	2,47	0,7
8	1,0	2,5	0,5	8,48	11,13	0,2

A partir dos dados obtidos é possível observar a influência dos contaminantes no processo, a variação de °Brix diminui significativamente em relação ao resultado obtido na fermentação sem contaminantes. Sendo a maior redução, de 0,9°Brix, obtida no ensaio 6 nas seguintes condições: 1,0 g de fermento; 0,5 mL de ácido acético; 0,5 mL de furfural; e a menor no ensaio 2 nas condições: 1,0 g

de fermento; 0,5 mL de ácido acético; e 0,1 mL de furfural. A Figura 2 ilustra a cinética de crescimento nas diferentes condições experimentais.

De maneira distinta ao processo sem contaminantes, o maior ganho relativo de massa celular ocorreu no ensaio 1, com 37,7 % de ganho, e o menor no ensaio 6, com apenas 10% onde ocorreram reduções de 0,1 e 0,9°Brix, respectivamente.

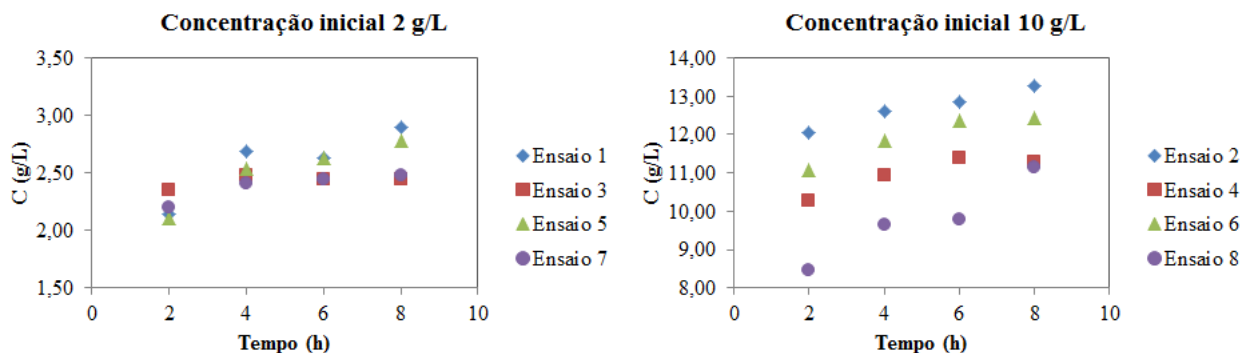


Figura 2 – Cinética de crescimento fermentativo

Na Figura 3 estão apresentados os resultados de viabilidade celular após 24 h de fermentação.

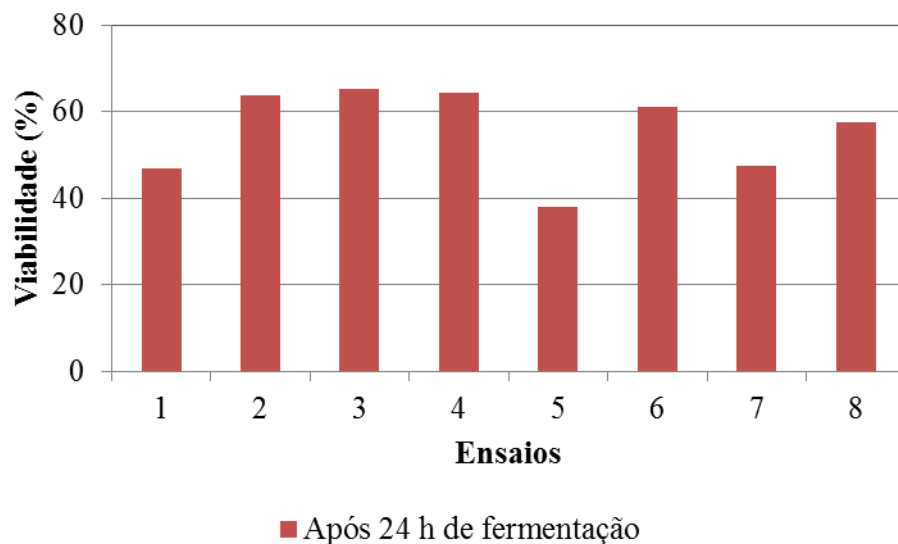


Figura 3 – Viabilidade celular após 24 h de fermentação.

Para avaliar de maneira mais rápida qual entre as variáveis estudadas afeta a viabilidade da levedura, gerou-se no programa STATISTICA 7 uma superfície de resposta, tendo como variáveis as quantidades, em mL, de ácido acético e furfural, mantendo como fixa a quantidade inicial de fermento, obtendo como resposta a influência desses fatores sob a viabilidade celular.

Analisando-se a Figura 4 nota-se que a máxima viabilidade é obtida na condição em que a concentração de ácido acético é maior e a de furfural é menor, enquanto que o mínimo é obtido a medida que a concentração de furfural aumenta. Sendo assim, a concentração de furfural mostra-se a variável de maior influência no desenvolvimento da levedura. Entretanto nas concentrações estudadas o ácido acético não demonstrou ser significativo no desenvolvimento do microrganismo, apresentando baixo efeito na inibição da levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

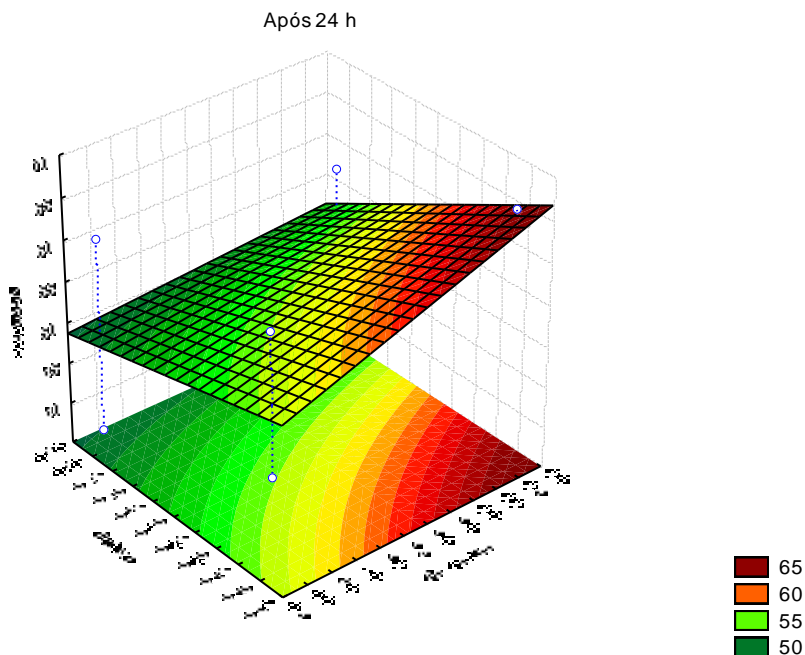


Figura 4 Influência das variáveis em planejamento 2^3 .

Os resultados obtidos vão de encontro às afirmações de Freitas (2011) e Taherzadh (2007), que relatam a inibição do crescimento da levedura e redução do valor da taxa específica de crescimento à medida que as concentrações de ambos inibidores, ácido acético e furfural, aumentam. Isso pode ter ocorrido devido a possíveis erros analíticos e, além disso, a concentração de contaminantes adicionadas ao meio pode não apresentar significativa toxicidade na faixa estudada, e não causar perturbação no metabolismo microbiano.

4. CONCLUSÃO

Os resultados obtido experimentalmente apontam a necessidade de maiores estudos em relação a levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Entretanto, concluiu-se que a concentração de fermento influencia a viabilidade celular e, independente da concentração dos contaminantes no meio, quanto maior a quantidade inicial de fermento, maior é a resistência aos inibidores e, consequentemente,

maior a viabilidade celular. Sendo assim, o foco de futuros estudos deve ser a concentração dos principais compostos químicos gerados no pré-tratamento de materiais lignocelulósicos: ácido acético, furfural e HMF. Avaliando o quanto os mesmos afetam a levedura.

5. REFERÊNCIAS

- BELLUCO, A. E. S. Alterações fisiológicas e de composição em *Saccharomyces cerevisie* sob condições não proliferantes. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – USP, 2001.
- CABRAL, J.C.A.; SILVA, J.P.A.; ROBERTO, I.C. Influência do pH na produção de etanol por *Pichia stipiti*. *Encontro Latino Am. de Pós-Grad.*, SP, 2005.
- CHAVES, M. C. C; GOMES, C. F. S; PEREIRA, E. R. Avaliação de biocombustíveis utilizando o apoio multicritério à decisão. Simp. Bras. P. Op. Bento Gonçalves, RS, 2010.
- FREITAS, C. S. S. Utilização da citometria de fluxo multiparamétrica na monitorização da resposta fisiológica da levedura *Saccharomyces carlsbergensis* em presença de ácido acético na produção de bioetanol. 76p. Dissertação de mestrado – *Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa*, 2011.
- GRETSCHMANN, A. S. Ajuste de curvas na produção de etanol num processo em batelada. X EGEM. RS, 2009
- KLINKE, H.B., THOMSEN, A.B., AHRING, B.K. Inhibition of ethanol-producing yeast and bacteria by degradation products produced during pre-treatment of biomass. *Applied Microbiology and Biotechnology*, Vol. 66, 10-26, 2004.
- PALMQVIST, E., HANH-HAGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition. *Bioresource Technology*, Vol. 74, 25-33, 2000
- Renewable Fuels Association, Ethanol industry statistics 2010. Disponível em: <<http://www.ethanolrfa.org/pages/statistics>>
- ROSSELL, C.E.V. Fermentação do hidrolisado. *III Workshop Tecn. sobre Hidrólise para Prod. de Etanol*, 2006.
- SANTOS, R.A. Estudo cinético do processo de fermentação etanólica do hidrolisado de farinha de mandioca utilizando complementação nutricional do mosto. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – UFAL, 2013
- SANTOS, M. S. R. Estudo de pré-tratamentos de palha e sabugo de milho visando a produção de etanol 2G. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – UFAL, 2013.
- TAHERZADEH, M. J.; KARIMI, K. Acid-based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials: a review. *BioResources*, Vol 2, 472-499, 2007.