

ESTUDO DA VIABILIDADE DA LEVEDURA *Saccharomyces cerevisiae* Y904 EMPREGANDO PROCESSO FERMENTATIVO EM BATELADA REPETIDA

M. L. CRUZ¹; F.T.M. SILVA¹; M. L. F. RAMINHO¹; A. L. M. CASTRO¹;
M. M. RESENDE¹ E. J. RIBEIRO¹

¹ Universidade Federal de Uberlândia, Faculdade de Engenharia Química.
E-mail para contato: mariana_lopes10@hotmail.com

RESUMO - Na produção do etanol empregando mostos formados de caldo de cana e melaço oriundo da fabricação de açúcar, após a etapa da fermentação, o fermento é separado do vinho fermentado e reciclado para ser novamente utilizado em novas fermentações. O aumento do teor alcoólico do vinho a valores acima de 10% (v/v) pode diminuir a viabilidade do fermento, chegando a inviabilizar o reciclo das leveduras. Neste trabalho avaliou-se o crescimento da levedura *Saccharomyces cerevisiae* Y904 a 20°C, sua viabilidade celular e sua reutilização em processos de fermentação em batelada repetida. Verificou-se que para fermentações em batelada repetida, conduzidas a 20°C, empregando uma concentração inicial de sacarose de 180 g/L, após a terceira fermentação, o teor alcoólico chegou a 12% (v/v), com um rendimento acima de 90%, com uma viabilidade celular de 92%, indicando ser possível o reciclo celular para fermentações com teor alcoólico mais elevado.

1. INTRODUÇÃO

Os biocombustíveis por serem oriundos de fontes renováveis, contribuem para redução da emissão de poluentes, já que grande parte dos gases resultantes da sua queima é reabsorvida nos ciclos de crescimento das plantas (NOGUEIRA e CAPAZ, 2013; DIAS et al., 2013). Dentre os vários combustíveis de fontes renováveis existentes, tem-se o etanol, que é considerado um combustível ecológico, uma vez que ele é obtido a partir de fontes renováveis cuja fonte principal, no Brasil, é a cana-de-açúcar. Também é ecológico porque contribui para a redução de CO₂ na atmosfera através da fotossíntese realizada pela fonte vegetal. Além de etanol e CO₂, vários subprodutos são produzidos durante a fermentação alcoólica. Um dos principais subprodutos é o glicerol. Ele é produzido a um nível de 1,0% (v/v) para a maioria dos processos de fermentação alcoólica. Outros subprodutos como ácidos orgânicos e alcoóis superiores são produzidos em níveis muito mais baixos (COSTA e SODRÉ, 2010).

Apesar de esforços visando à utilização de outros microrganismos para a obtenção de etanol em destilarias brasileiras, a utilização da *Saccharomyces cerevisiae* continua sendo a mais adequada, pois se trata de processos não estéreis necessitando de leveduras robustas. Além disso, ela se destaca pela alta eficiência fermentativa, um crescimento rápido, habilidade na produção de etanol e consumo de sacarose, tolerância a altas concentrações de etanol e a baixos níveis de

oxigênio, osmotolerância e tolerância a grandes variações de temperaturas (ANDRIETTA *et al.*, 2007).

No que diz respeito às células de leveduras, elas necessitam de condições nutricionais durante o processo de fermentação alcoólica, o que influencia diretamente na multiplicação celular e na eficiência da transformação do açúcar em etanol (RIBEIRO *et al.*, 1987). Temperaturas elevadas afetam o comportamento da levedura e diminuem o teor alcoólico do mosto, além de contribuir para a multiplicação bacteriana. Com o aumento da temperatura a toxidez do etanol sobre o fermento é intensificada, causando perda de viabilidade celular e causando baixo rendimento (AMORIM, BASSO e ALVES, 1996; SANTOS, 2008). A viabilidade é um fator importante para a fermentação alcoólica. Quanto maior for a viabilidade celular, melhor será o desempenho do processo. Na literatura foi observado que a viabilidade celular diminui continuamente em anaerobiose, mas permanece acima de 95% em aerobiose num sistema de fermentação a vácuo. O aumento da temperatura de fermentação produz uma forte diminuição da viabilidade celular, devido ao aumento das taxas de produção e acúmulo de etanol no meio e nas células (STECKELBERG, 2001). A temperatura adequada deve ser mantida na fermentação por meio de dispositivos para o resfriamento de dornas. À medida que a temperatura aumenta, a contaminação bacteriana é favorecida e a levedura fica mais sensível à toxidez do etanol. As linhagens industriais de *S. cerevisiae* são normalmente resistentes à alta temperatura, mas este fator interfere na viabilidade celular quando em sinergia com a presença de etanol ou meio com baixo pH (SILVA FILHO *et al.*, 2005). O rendimento alcoólico é maior em temperaturas mais baixas (15 a 20°C), porém apresentam uma demora para a obtenção da produção máxima. Quando a temperatura do biorreator é de 25°C a 31°C a taxa inicial de fermentação é maior, mas em temperaturas maiores que 35°C decresce a viabilidade celular (TORIJA *et al.*, 2003). O glicerol, juntamente com o ácido succínico, são os principais subprodutos da fermentação alcoólica e são responsáveis pela redução do rendimento em etanol, pois consomem 3-5% dos açúcares fermentáveis (GANCEDO e SERRANO, 1989).

As fermentações conduzidas a temperaturas mais baixas podem levar a uma maior resistência da levedura no teor de etanol final e também um menor geração de subprodutos do metabolismo celular devido à menor tensão à qual as células são submetidas. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a viabilidade da levedura *Saccharomyces cerevisiae* empregando processo fermentativo em batelada repetida na temperatura de 20 °C.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Os ensaios experimentais foram realizados em batelada repetida, em um mini-fermentador, modelo New Brunswick Multigen equipado com controle de temperatura e de agitação. O volume do inóculo correspondeu a 30% do volume total do meio. O volume total de cada fermentação foi 1,5 L, sendo 0,45 L de inóculo. O inóculo consistiu-se da levedura após hidratação em água durante 2 horas, sob agitação. A levedura *Saccharomyces cerevisiae* utilizada neste trabalho foi a cepa industrial Y -904 produzida pela ABB Brasil . A composição

do meio de cultura para as leveduras consistia em sacarose (180 g/L), KH_2PO_4 (5 g/L), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (1 g/L), NH_4Cl (1,5 g/L), KCl (1g/L) e extrato de levedura (6 g/L). Os reagentes utilizados foram todos de grau analítico, exceto a sacarose, a qual foi substituída por açúcar cristal comercial. O pH inicial de todas as fermentações realizadas foi 4,5.

As concentrações de açúcares (sacarose, glicose e frutose), etanol e glicerol em todos os experimentos foram determinadas por cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC).

Para determinação da concentração celular no início e final das fermentações, utilizou-se uma câmara de Neubauer espelhada e um microscópio óptico (Olympus). Para a contagem das células, diluiu-se a amostra e promoveu-se a homogeneização com uma vigorosa agitação. Colocou-se esta solução, com o auxílio de uma pipeta Pasteur, entre a câmara de Neubauer e a lamínula, previamente limpas com álcool 70%. Realizou-se a contagem das células em microscópio óptico utilizando-se um aumento de 100 vezes. O cálculo da concentração de célula foi realizado de acordo com a Equação 1 (MADIGAN *et al.*, 2004).

$$\text{células (células/mL)} = \frac{\text{n}^\circ \text{ células totais} \times \frac{1}{\text{volume do retículo}} \times \text{diluição}}{\text{n}^\circ \text{ retículos}} \times 1000 \quad (1)$$

Para acompanhar o crescimento celular ao longo das fermentações, foi utilizado o método espectrofotométrico. Diluiu-se na proporção 1:100 o meio fermentativo e leu-se a absorbância em espectrofotômetro a 650 nm. Esse valor lido era comparado com uma curva padrão que relaciona absorbância com concentração celular em termos de massa seca em gramas por litro, previamente determinada.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura 1 mostra os perfis de concentração de sacarose, etanol e concentração celular na primeira fermentação conduzida a 20°C, em batelada com concentração inicial de 180 g /L de sacarose e inóculo de 30 % v/v, sem qualquer adaptação da levedura nesta temperatura.

Após 49 horas de fermentação, o teor alcoólico atingiu 9,70 °GL com um rendimento em etanol de 83,3%. A concentração celular que no início desta primeira fermentação era de 2,38 g/L subiu para 8,93 g/L no final da fermentação, onde obteve-se viabilidade de 91,89%.

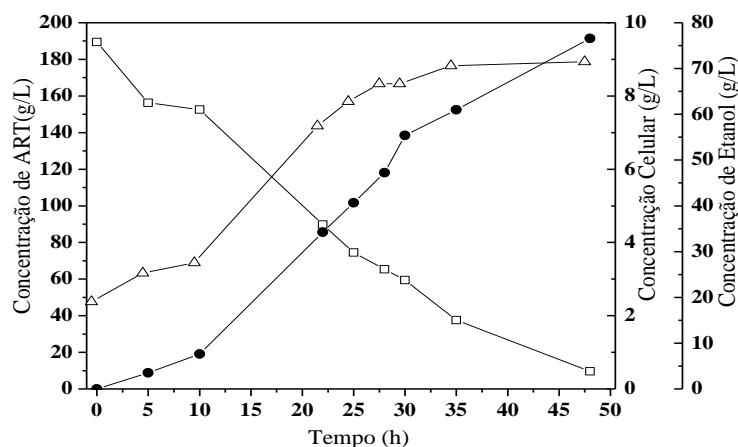


Figura 1 – Perfis de concentração de açúcar redutor total - ART (□), concentração de etanol (●) e concentração celular (Δ) em função do tempo, para a 1ª fermentação realizada a 20 °C.

Reutilizando a levedura da primeira fermentação, foi realizada uma segunda fermentação nas mesmas condições experimentais da primeira, cujos resultados são apresentados na Figura 2. Com 32 horas de fermentação a concentração de sacarose residual era de aproximadamente 4 g/L, o teor alcoólico de 10,9 °GL com um rendimento de 91,2%, obtendo-se uma melhoria em todos os parâmetros em relação à primeira fermentação. A concentração celular também aumentou de 7 para 13 g/L e a viabilidade celular foi de 91,94%, praticamente o mesmo valor daquele da primeira fermentação.

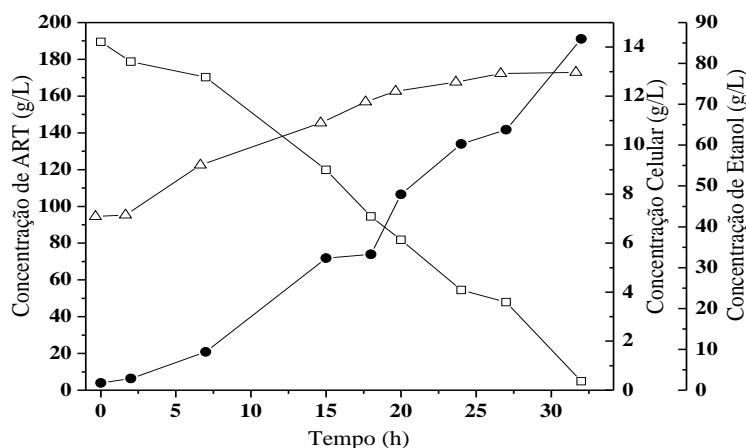


Figura 2 – Perfis de concentração de açúcar redutor total- ART (□), concentração de etanol (●) e concentração celular (Δ) em função do tempo, para a 2ª Fermentação realizada a 20 °C.

Realizou-se uma terceira fermentação a 20°C, recuperando e reutilizando a levedura centrifugada da segunda fermentação, cujos resultados estão apresentados na Figura 3. Com um tempo de fermentação de 26 horas, o teor alcoólico alcançou 11,94 °GL com um rendimento de 93,33% e consumo praticamente total do açúcar. A viabilidade celular ao final da fermentação foi de 92%.

Na sequência do trabalho, foram realizadas sucessivas fermentações nas mesmas condições experimentais das anteriores, recuperando e reutilizando o fermento centrifugado. Foi possível chegar ao teor alcoólico de aproximadamente 12%, indicando a possibilidade de se trabalhar com maior teor de etanol no mosto e reciclagem de leveduras, já que a viabilidade se manteve elevada e praticamente constante, em torno de 92%, mesmo depois de sucessivas repetições. Estes resultados foram bastante satisfatórios em relação ao teor alcoólico, rendimento em etanol e viabilidade celular mantidos após os sucessivos reaproveitamentos da levedura. O tempo de fermentação, a 20°C ainda é elevado se comparado com os atuais tempos de fermentação obtidos em batelada alimentada nas destilarias brasileiras. Um aspecto importante a ser destacado é a possibilidade de reciclar a levedura mesmo com teores alcoólicos acima de 10°GL.

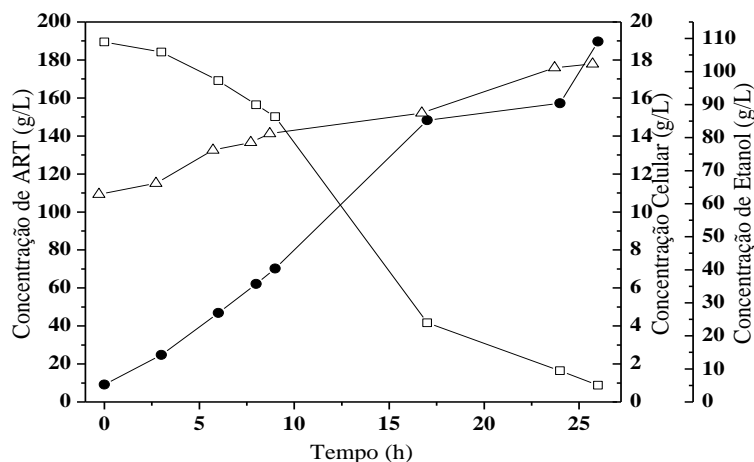


Figura 3 – Perfis de concentração de açúcar redutor total - ART (□), concentração de etanol (●) e concentração celular (Δ) em função do tempo, para a 3ª Fermentação realizada a 20 °C.

O aumento de 2% do teor alcoólico observado da primeira para a terceira fermentação foi bastante significativo. Segundo dados publicados amplamente pela literatura, a cada 1% de aumento no teor alcoólico obtido no vinho fermentado, é obtida uma redução de 15 bilhões de litros de vinhaça por ano considerando todas as usinas do Brasil. O tempo de fermentação também é extremamente vantajoso comparado ao etanol de milho, já que na última dura 70 horas e no etanol de cana foram necessárias apenas 26 horas na temperatura de 20°C, que não é a considerada ótima para a levedura.

4. CONCLUSÃO

Com os resultados obtidos até agora com a cepa *Saccharomyces cerevisiae* Y904 é possível concluir que, nos processos de fermentação a temperaturas mais baixas, a resistência ao etanol é maior. Outro aspecto evidenciado é a viabilidade que se manteve praticamente constante ao longo das fermentações conduzidas a 20°C.

5. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Universidade Federal de Uberlândia e a Faculdade de Engenharia Química pela oportunidade em realizar este trabalho. Agradecem também ao apoio financeiro da CAPES, FAPEMIG e do CNPq.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMORIN, H.V., BASSO, L.C., ALVES, D.M.G. Processos de produção de álcool – Controle e monitoramento, Fementec/FEALQ/ESALQ- USP, Piracicaba, São Paulo, 103 p, 1996.
- ANDRIETTA, M.G.S, ANDRIETTA, S.R.; STECKELBERG, C.; STUPIELLO, E.N.A.. **Bioetanol – 30 years of Proálcool. International Sugar Journal**, Campinas, v.109, n. 1299, p. 195-200, 2007.
- COSTA, R.C.; SODRÉ, J.R.. Hydrous ethanol vs. gasoline-ethanol blend: Engine performance and emissions. **Fuel** v. 89, p. 287–293, 2010.
- DIAS, M. O.S.; JUNQUEIRAA, T.L.; CAVALETTA, O.; CUNHA, M. P.; JESUS, C.D.F.; MANTELATTOA, P. E.; ROSSELLA, C. E. V.; FILHO, R. M.; BONOMIA, A. Cogeneration in integrated first and second generation ethanol from sugarcane. **Chemical engineering research and design** v. 91, p. 1411-1417, 2013.
- GANCEDO, C.; SERRANO, R. **Energy – yielding metabolism. In: Rose A. H., Harrison J. S. (eds) The yeasts. Metabolism and Physiology of Yeast**, Academic, London, p. 205 – 259, 1989.
- MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; PARKER, J. Microbiologia de Brook, 10. ed. São Paulo, Brasil: Prentice Hall, 2004.

- RIBEIRO, F.J., LOPES, J.J.C., FERRARI, S.E.. Complementação de nitrogênio de forma contínua no processo de fermentação alcoólica, **Brasil Açucareira**, v.105, n.1, p. 26-30, 1987.
- SANTOS, A. M. **Fermentação alcoólica com levedura imobilizada em colmos de bambu e em fibra de coco**. 82 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Pós Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2008.
- SILVA-FILHO, E. A.; SANTOS, S. K. B.; RESENTE, A. M.; MORAIS, J. O. F.; MORAIS JR, M. A.; SIMÕES D. A.. Yeast population dynamics of industrial fuel-ethanol fermentation process assessed by PCR-fingerprinting. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 88, p. 13-23, 2005.
- STECKELBERG, C. *Caracterização de leveduras de processos de fermentação alcoólica utilizando atributos de composição celular e características cinéticas*. Tese (Doutorado em Engenharia Química). Faculdade de Engenharia de Química, Universidade Estadual de Campinas. 215p., 2001.
- TORIJA, M.J.; ROZÈS, N.; POBLET, M.; GUILLAMÓN, J.M. MAS, A. Effects of Fermentation Temperature on the Strain Population of *Saccharomyces cerevisiae*. *International Journal of Food Microbiology*, v.80, p.47,53, 2003.