

AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE FERMENTATIVA E DO CRESCIMENTO CELULAR DA LEVEDURA *Saccharomyces cerevisiae* CCT-3174

S. ORTIZ¹, E. L. SIMIONATTO² e A. A. C. BARROS³

¹ Universidade Federal de Santa Catarina, Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos

² Universidade Regional de Blumenau, Departamento de Química

³ Instituto Superior Politécnico de Tecnologias e Ciências, Departamento de Engenharias e Tecnologias, Luanda, Angola

E-mail para contato: samaraeq@gmail.com

RESUMO – Em relação ao bioetanol, pesquisa-se principalmente sua obtenção a partir de resíduos agroindustriais. Porém, a levedura utilizada na fermentação alcoólica também influencia na produtividade. Neste contexto, este trabalho visa estudar a capacidade fermentativa e o crescimento celular da levedura *Saccharomyces cerevisiae* CCT-3174. A fermentação alcoólica foi realizada em 300 ml de meio composto por D-glucose (10 g/l), peptona bacteriológica (5 g/l), extrato de levedura (3 g/l) e extrato de malte (3 g/l), dissolvidos em água destilada e esterilizados por 15 minutos a 121°C. Esta etapa do experimento foi conduzida por 30 horas em agitador orbital com agitação de 120 rpm e temperatura de 30°C. Coletaram-se amostras a cada duas horas para análise de dados cinéticos. O rendimento da reação foi superior a 90%, o que comprova sua potencialidade para fermentação alcoólica. Sendo assim, esta linhagem é propícia para estudos futuros de obtenção de bioetanol.

1. INTRODUÇÃO

Existem dois métodos de obtenção de etanol, por via sintética ou via fermentativa (Borzani *et al.*, 2001). A via de obtenção de etanol mais utilizada no Brasil é a fermentativa por questões econômicas, domínio de tecnologia e disponibilidade de biomassa (Vieira *et al.*, 2009).

De acordo com Borzani *et al.* (2001), todos os substratos açucarados são passíveis de fermentação, sendo estes açúcares convertidos em etanol e dióxido de carbono, por processo anaeróbio. Esta transformação envolve uma sequência de 12 reações catalisadas por enzimas. A fermentação alcoólica ocorre no citoplasma da célula, onde se localizam estas enzimas, denominadas de enzimas glicolíticas. A fermentação pode ser realizada a partir de açúcares, amido ou celulose. O desempenho do processo fermentativo depende diretamente das enzimas glicolíticas, pois estas podem ser estimuladas ou inibidas por diversos fatores, como por exemplo, pH, nutrientes, entre outros.

As leveduras são os microrganismos mais utilizados na fermentação alcoólica. A levedura atualmente utilizada em escala comercial é a *Saccharomyces cerevisiae*, que é um aeróbio facultativo. Porém, as bactérias também são capazes de produzir etanol, mas, por questões econômicas (rendimento em produto), não são utilizadas. Para a fermentação alcoólica é adicionada à mistura uma população de leveduras responsáveis por metabolizar os carboidratos, transformando estes em etanol e liberando dióxido de carbono. Esta etapa pode ocorrer em processo contínuo ou batelada (Hahn-Hagerdal, 2006).

Existem diversos fatores que afetam a fermentação alcoólica como um todo. Dentre eles pode-se citar a levedura utilizada. Leveduras de culturas puras fornecidas por instituições do ramo se comportam de forma diferente que a levedura comercial, utilizada para fabricação do pão (Borzani *et al.*, 2001).

As leveduras necessitam de fonte de carbono que forneça energia, sendo esta fonte a glicose ou outro açúcar. O meio deve ser fonte de algumas vitaminas, nitrogênio, ferro, cobre, enxofre, fósforo, entre outros. A levedura *Saccharomyces cerevisiae* praticamente não é capaz de se beneficiar com as proteínas do meio e também não possui capacidade metabólica de aproveitar o nitrogênio em forma de nitrato, somente na forma amoniacal, amídica ou amínica. As leveduras são microrganismos mesófilos, sendo que a temperatura ótima está entre 26-35°C. O controle de temperatura é essencial, pois caso a temperatura aumente, a velocidade da fermentação consequentemente aumenta, elevando o risco de contaminação e tornando a levedura mais sensível à toxicidade do etanol gerado (Borzani *et al.*, 2001).

Dodic *et al.* (2009) estudaram a fermentação alcoólica utilizando polpa de beterraba diluída em água destilada como meio de cultivo, visando a obtenção de bioetanol. Após 72 horas de cultivo, o melhor rendimento obtido foi de 12%. Mohanty *et al.* (2009) também estudaram a fermentação alcoólica utilizando a levedura *Saccharomyces cerevisiae* comercial. O meio de cultivo utilizado pelos autores foi flores de *mahula*.

Vieira *et al.* (2009) obtiveram em seu estudo, bioetanol a partir do mesocarpo do babaçu, que é rico em amido na sua composição. Primeiramente, foi realizada a hidrólise enzimática do amido. Para a etapa da fermentação alcoólica, a levedura utilizada foi uma linhagem comercial da *Saccharomyces cerevisiae*. O rendimento obtido foi de 350 mL de etanol por quilograma de amido. Xiros *et al.* (2008) estudaram a fermentação de resíduos de cervejarias, sendo constituídos basicamente de cascas de cereais. A hidrólise aplicada aos resíduos foi a alcalina. O microrganismo utilizado na fermentação alcoólica foi o fungo *Neurospora crassa* DSM 1129. Os autores obtiveram neste experimento rendimento de 74 gramas de etanol por quilograma de resíduo seco.

Ortiz (2010) estudou a produção de bioetanol, a partir de bagaço de malte e bagaço de mandioca, utilizando a levedura *Saccharomyces cerevisiae* CCT-0294 e da linhagem comercial, para fins comparativos. A hidrólise enzimática dos resíduos foi conduzida através de fermentação em estado sólido pelo fungo *Rhizopus oryzae* ATCC 34612. Para as condições de estudo, a levedura da linhagem CCT-0294 mostrou-se mais viável na fermentação alcoólica, apresentado

rendimento de 46,58%, enquanto que o rendimento máximo obtido nas fermentações com a levedura comercial foi de 39,73%.

Percebe-se que pesquisas na área de bioetanol possibilitam novos estudos em diversos aspectos, como a utilização de resíduos de diferentes processos, assim como a utilização de diferentes espécies microbianas na fermentação alcoólica.

1.1. Objetivo

Este trabalho tem por objetivo estudar a capacidade fermentativa e o crescimento celular da levedura *Saccharomyces cerevisiae* CCT-3174, através da análise da concentração biomassa, do consumo do substrato (glicose) e da análise de parâmetros cinéticos.

2. METODOLOGIA

2.1. Fermentação Alcoólica

Para esta etapa, preparou-se 300 ml de meio, composto por 10g/l de D-glucose, 5g/l de peptona bacteriológica, 3g/l de extrato de levedura e 3g/l de extrato de malte. Os componentes foram dissolvidos em água destilada e o meio foi esterilizado em autoclave à temperatura de 121°C, por 15 minutos (Ortiz, 2010).

A inoculação foi realizada na câmara de fluxo laminar, a partir da cepa crescida em placa de Petri, que foi adicionada ao meio na quantidade de duas alçadas de célula. O cultivo foi realizado em incubadora de movimento orbital Tecnal modelo TE-420, a 30°C e com velocidade de agitação de 120 rpm. O cultivo foi acompanhado por 30 horas, com retirada de amostra a cada 2 horas, para aquisição de dados cinéticos. Todas as amostras foram analisadas no final do experimento. O produto da reação (etanol) foi quantificado apenas no final da fermentação alcoólica. O experimento foi realizado em duplicata.

2.2. Procedimentos Analíticos

Crescimento Celular: Inicialmente, foi graficada a reta de calibração da concentração celular versus a absorbância lida no espectrofotômetro. A partir desta reta, faz-se a leitura das amostras cuja concentração celular é desconhecida, e com a absorbância obtida, quantifica-se a concentração. Para a determinação dos pontos da reta de calibração, pesou-se 0,1 grama de célula coletada da placa de Petri com uso de alça de platina esterilizada em chama, e diluiu-se em 100 ml de água destilada, tendo assim, uma suspensão celular de concentração 1 g/l. A partir desta suspensão, foram feitas diluições, para se obter diferentes concentrações. As amostras foram lidas em espectrofotômetro Shimadzu UV-1650PC em 660 nm.

Concentração de Glicose: A análise da concentração de glicose foi realizada pelo método da glicose oxidase. A absorbância foi medida em espectrofotômetro Shimadzu UV-1650PC em 500 nm, e é diretamente proporcional à concentração de glicose na amostra, sendo o resultado

expresso em g/l.

Concentração de Etanol: Após a fermentação alcoólica, o meio foi centrifugado por 15 minutos com velocidade de agitação de 7500 rpm na centrífuga Hermle modelo Z300K. O etanol foi analisado em cromatógrafo gasoso Varian CP-3800 com detector de ionização em chama (CG-DIC) e com coluna capilar Chrompack de sílica fundida (CP-SIL PONA CB, 0,025 mm de diâmetro interno, 100 m de comprimento e 0,2 µm de filme).

Dados Cinéticos: A cinética da fermentação alcoólica foi analisada pelo fator de conversão do substrato em produto ($Y_{P/S}$) pelo rendimento (R). Estes foram calculados respectivamente de acordo com as Equações 1 e 2 (Borzani *et al.*, 1975).

$$Y_{P/S} = \frac{\Delta P}{\Delta S} = \frac{P_f - P_i}{S_i - S_f} \quad (1)$$

$$R = \frac{(Y_{P/S})_{\text{calculado}}}{(Y_{P/S})_{\text{teórico}}} \times 100 \quad (2)$$

O termo P_f é a concentração final do produto, neste caso, etanol. O termo P_i , correspondente à concentração inicial de produto (etanol), que foi considerada zero. Os termos S_i e S_f correspondem a concentração inicial e final do substrato, sendo neste caso a glicose.

A massa específica do etanol utilizada para os cálculos foi de 789,3 g/l (Najafpour e Lim, 2002). O fator de conversão máximo teórico foi utilizado como 0,51 grama de etanol por grama de glicose consumida, de acordo com a estequiometria da reação.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Análise do Crescimento Celular e do Consumo de Glicose

O gráfico do crescimento celular e do consumo do substrato durante o processo fermentativo de 30 horas está disposto na Figura 1.

Neste gráfico, pode-se perceber que o microrganismo possui atividade, obtendo-se concentração celular final de 7,37 g/l, e podendo-se considerar o consumo total do substrato (glicose). Observa-se ainda que no período entre 10 e 12 horas de fermentação, a concentração de glicose decai drasticamente, que é quando a levedura apresenta maior taxa de crescimento. Apesar da ausência de glicose, o microrganismo continua a crescer em função dos outros nutrientes.

Em termos de produtividade, percebe-se que o cultivo pode ser finalizado antes de 30 horas. Porém, como a análise das amostras só foi realizada no final do cultivo, permaneceu-se com o tempo de 30 horas previamente estipulado na metodologia.

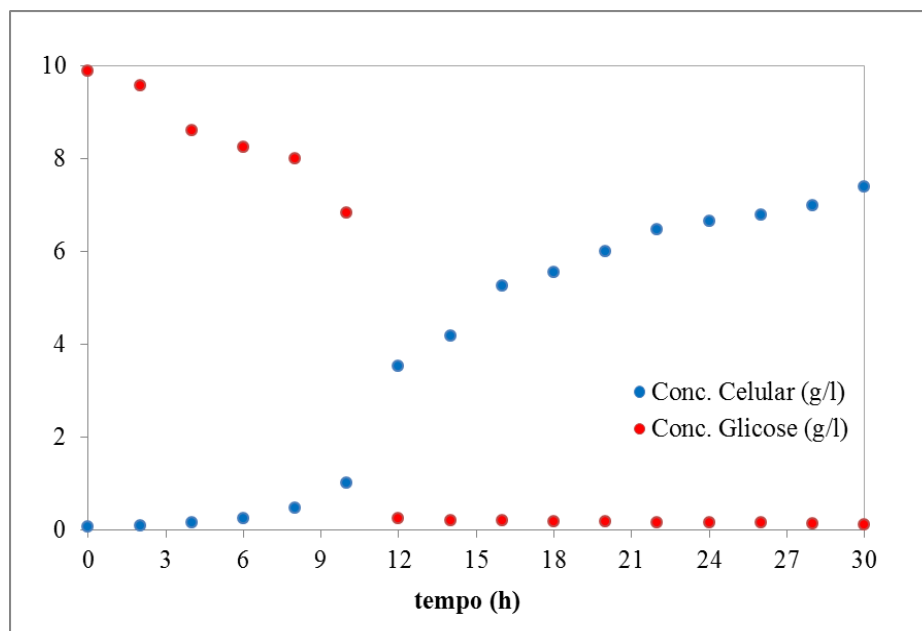


Figura 1 - Curva de crescimento da levedura CCT-3174 e do consumo da glicose.

3.2. Análise Cinética

A análise da cinética foi realizada considerando o fator de conversão de substrato em produto ($Y_{P/S}$) e o rendimento (R). Para o substrato, considerou-se apenas a glicose. A concentração de etanol no final da fermentação alcoólica resultou em 4,846 g/l. As concentrações inicial e final de glicose resultaram em 9,88 g/l e 0,114 g/l respectivamente. Aplicando estes valores na Equação 1 obtém-se o valor de $Y_{P/S}$, sendo este 0,496. E substituindo este $Y_{P/S}$ calculado na Equação 2, obtém-se o rendimento, que resultou em 97,3%.

No trabalho apresentado na literatura por Najafpour *et al.* (2004), a concentração inicial de glicose era de 50 g/l, e a fermentação alcoólica foi conduzida durante 27 horas com o microrganismo *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 24860. O fator de conversão de substrato em produto obtido foi de 0,32 $g_{etanol}/g_{glicose}$.

De acordo com o trabalho desenvolvido por Mariam *et al.* (2009) o rendimento obtido na fermentação alcoólica foi de 0,75%. Os autores avaliaram o processo conduzido pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* GC-IIB3, sendo utilizado como meio o melaço da cana de açúcar com 15% de açúcares. Rodrigues *et al.* (2010) realizaram a fermentação alcoólica em suco de caju, com concentração de glicose em torno de 24 g/l, com a levedura comercial e em condições de operação de fermentação semelhantes às deste estudo. O maior fator de conversão obtido foi de 0,4 grama de etanol por grama de glicose consumida.

A discussão dos resultados obtidos neste estudo foi realizada com base em trabalhos publicados na literatura, porém, não foram encontrados trabalhos utilizando o mesmo meio de

cultivo, nem fermentações alcoólicas utilizando a levedura *Saccharomyces cerevisiae* CCT-3174. A avaliação da capacidade fermentativa da levedura selecionada para este estudo foi realizada a partir de estudos que relatavam experimentos com outros meios e outros microrganismos.

4. CONCLUSÕES

Com os resultados obtidos neste estudo, é possível concluir que a levedura *Saccharomyces cerevisiae* CCT-3174 possui capacidade fermentativa. Com isto, esta levedura é passível de estudos futuro na obtenção de bioetanol, apresentando-se como possível alternativa à levedura comercialmente utilizada. Para estudos futuros, sugere-se o acompanhamento da concentração de etanol durante a fermentação alcoólica, para determinação do tempo necessário de fermentação com o intuito de se obter a máxima produtividade do processo.

5. REFERÊNCIAS

- BORZANI, W.; LIMA, U. de A.; AQUARONE, E. *Engenharia Bioquímica*. São Paulo: Edgard Blücher, 300p, il. Biotecnologia, v. 3, 1975.
- BORZANI, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; SCHMIDELL, W. *Biotecnologia Industrial*. São Paulo: E. Blücher, v. 3, 2001.
- DODIC, S.; POPOV, S.; DODIC, J.; RANKOVIC, J.; ZAVARGO, Z.; JEVTIC, M. Bioethanol production from thick juice as intermediate of sugar beet processing. *Biomass Bioenergy*, v. 33, p. 822-827, 2009.
- HAHN-HAGERDAL, B. Bio-ethanol – the fuel of tomorrow from the residues of today. *Trends in Biotechnol*, v. 24, n. 12, 2006.
- MARIAM, I.; MANZOOR, K.; ALI, S.; HAQ, I. U. Enhanced production of ethanol from free and immobilized *Saccharomyces cerevisiae* under stationary culture. *Pak J Bot*, v. 41(2), p. 821-833, 2009.
- MOHANTY, S. K.; BEHERA, S.; SWAIN, M. R.; RAY, R.C. Bioethanol production from mahula (*Madhuca latifolia* L.) flowers by solid-state fermentation. *Appl Energy*, v. 86, p. 640-644, 2009.
- NAJAFPOUR, G. D.; LIM, J. K. Evaluation and Isolation of Ethanol Producer Strain SMP-6. *Reg Symp Chem Eng*, Malásia, p. 229-236, 2002.
- NAJAFPOUR, G.; YOUNESI H.; ISMAIL K. S. K. Ethanol fermentation in an immobilized cell reactor using *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioresour Technol*, v. 92, p. 251-260, 2004.
- ORTIZ, S. Produção de Bioetanol a partir de Resíduos Agroindustriais. *Dissertação de Mestrado*, Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, Universidade Regional de Blumenau - FURB, Blumenau – SC, 2010.
- RODRIGUES, T. H. S.; PINHEIRO, A. D. T.; REGO, D. R. B.; ROCHA, M. V. P.; MACEDO, G. R. de; GONÇALVES, L. B. Avaliação do potencial do pedúnculo de cajú (*Anacardium*

occidentale L.) para a produção de bioetanol por *Saccharomyces cerevisiae*. XVIII Congresso Brasileiro de Engenharia Química, Foz do Iguaçu - PR, Brasil, 2010.

VIEIRA, G. E. G.; PICKLER, A.; CASTRO, J. G. D.; CARDOSO, A. S.; FIGUEIREDO, R. L.; SILVEIRA, A. S.; MILHOMEM, C. C.; LEAL, E. R. M.; PEDROZA, M. M.; MAFRA, W. A.; SILVA, F. C.; LIMA, M. M.; CARVALHO, M. B.; BOAS, V. F. V. Obtenção de etanol a partir do mesocarpo de babaçu (*Orbignya sp.*). 2º Simpósio Nacional de Biocombustíveis, 2009. Disponível em: <http://www.abq.org.br/biocom/2009/trabalhos/-11-5572.htm>. Último acesso em: 23/03/2014.

XIROS, C.; TOPAKAS, E.; KATAPODIS, P. CHRISTAKOPOULOS, P. Hydrolysis and fermentation of brewer's spent grain by *Neurospora crassa*. *Bioresour Technol*, v. 99, p. 5427-5435, 2008.