

# Estudo da Fermentação Alcoólica do Hidrolisado de Bagaço de Laranja por *Saccharomyces cerevisiae*

Homem, C. L. G.<sup>1\*</sup>; Costa, J. R. C.<sup>1</sup>; Pinheiro, I. R.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Discente de Engenharia Química, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, ES, Brasil.

<sup>2</sup> Docente do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, ES, Brasil.

\* e-mail: carollgh@hotmail.com

## Resumo

A realização deste trabalho teve como objetivo o estudo da cinética de crescimento microbiano de *Saccharomyces cerevisiae*, utilizando hidrolisado enzimático de bagaço de laranja (in natura) como substrato para a fermentação alcoólica. A polpa cítrica é uma biomassa de baixo custo e níveis elevados de carboidratos, o que viabiliza a sua utilização em processos biotecnológicos. Ao construir a curva de crescimento microbiano dos ensaios fermentativos, notou-se na fase exponencial (fase Log onde se tem o crescimento máximo de microrganismo), uma DO de 26,35 e velocidade específica máxima ( $\mu_{\text{máx}}$ ) de  $0,121 \text{ h}^{-1}$ . Os resultados demonstraram que as leveduras empregadas no trabalho conseguiram se adaptar de forma rápida ao substrato empregado. O teor alcoólico mensurado, ao final do ensaio, foi de 6,5% (v/v) e teor de sólido solúveis igual a 7,25 % Brix. Todo esse trabalho requer análise e entendimento das características do processo para aplicação de leveduras selecionadas na produção industrial.

## Abstract

This work had as objective the study of microbial growth kinetics for development a new biofuel. Using of a raw material and different alcoholic enzymatic hydrolyzate orange pulp fermentation for *Saccharomyces cerevisiae*. The orange bagass is a biomass of low cost and high levels of carbohydrates, what enables your use in biotechnological processes. From the formulation of microbial growth curve of fermentation trials, it was noted in the exponential phase (phase Log where has growth microorganism Maximum), a DO of 26,35 and speed Specific Maximum ( $\mu_{\text{máx}}$ ) of  $0.121 \text{ h}^{-1}$ . The results showed that Yeasts as their servants at work were able to adapt quickly by the substrate, the Alcohol measured, the end, to trial, was 6.5 % (v/v) and soluble solids content equal to 7.25 % Brix. All this work requires analysis and knowledge of process characteristics paragraph yeasts selected application in industrial production.

Keywords (Palavras chaves): fermentação, *Saccharomyces cerevisiae*, etanol.

## 1. Introdução

No sentido tecnológico, fermentação significa todo processo em que microrganismos atuam sobre substratos orgânicos, através de suas enzimas, produzindo determinadas substâncias ou substratos modificados, de utilidade para o homem [1].

A fermentação alcoólica dos açúcares obtida da hidrólise dos carboidratos é realizada principalmente pela levedura *Sacharomyces cerevisiae*, que é o microrganismo mais apropriado visto que seu emprego intensivo em fermentação industrial, já passou por um

processo de seleção natural, apresentando os melhores desempenhos em conversão de açúcares fermentescíveis a etanol, produtividade e tolerância alcoólica [2].

O metabolismo da levedura, bem como de qualquer ser vivo, pode ser dividido didaticamente em anabolismo e catabolismo. O processo anabólico diz respeito a reações de síntese de material celular, tais como proteínas, gorduras, polissacarídeos, etc., às custas de energia celular armazenada na molécula de trifosfato de adenosina (ATP). No catabolismo o processo se inverte, as moléculas são quebradas e oxidadas, sendo

que a energia química produzida nessas reações é acumulada nas moléculas de ATP [3].

A transformação do açúcar (glicose) em etanol e  $\text{CO}_2$  se processa na parede celular e no interior da célula, cada qual catalisada por uma enzima específica. Tal aparato enzimático está confinado no citoplasma celular sendo, portanto, nessa região da célula que a fermentação alcoólica se processa. Essas enzimas, referidas como “glicolíticas”, sofrem ações de diversos fatores (nutrientes, minerais, vitaminas, inibidores, substâncias do próprio metabolismo, pH, temperatura e outros), alguns que estimulam e outros que reprimem a ação enzimática, afetando o desempenho do processo fermentativo conduzido pelas leveduras [4].

Convém ressaltar que a levedura *S. cerevisiae* é um aeróbio facultativo, ou seja, tem a habilidade de se ajustar metabolicamente, tanto em condições de aerobiose como de anaerobiose (ausência de oxigênio molecular). Os produtos finais da metabolização do açúcar irão depender das condições ambientais em que a levedura se encontra. Assim, enquanto uma porção do açúcar é transformada em células,  $\text{CO}_2$  e  $\text{H}_2\text{O}$  em aerobiose, a maior parte é convertida em etanol e  $\text{CO}_2$  em anaerobiose, processo denominado fermentação alcoólica [4].

O conhecimento da cinética de um processo ou cinética de crescimento microbiano é importante industrialmente, pois permite a análise dos pontos críticos do processo, previsão de eventos fora do processo, determinação de vida de prateleira e análise de risco [5].

Cada uma das fases de desenvolvimento apresenta características peculiares em função da relação entre os organismos presentes e o substrato disponível. A fase Lag é observada após a adição de um inóculo ao meio de cultura e representa o tempo requerido para os microrganismos se aclimatarem ao novo ambiente e iniciar a divisão celular. Na fase Log, de crescimento, as células se dividem a uma taxa determinada pela sua geração e sua habilidade em processar o substrato. Nesta fase, a taxa percentual de crescimento se apresenta constante. A fase que precede a fase exponencial é a fase estacionária, onde a quantidade de células no meio permanece estacionária e há duas razões possíveis para este fenômeno: (i) que as células tenham exaurido o substrato ou os nutrientes necessários ao crescimento e (ii) que o crescimento de novas células seja compensado pela morte de células velhas. A última fase, a de decaimento, é onde as células morrem a uma taxa que excede à produção das novas células [6].

O crescimento microbiano, no caso das leveduras, pode ser acompanhado, em tempo real, através da Densidade Ótica (DO), um método já estabelecido e chamado de turbidimetria [7]. A turbidimetria se tornou um método atrativo, devido ao advento de sistemas turbidimétricos automatizados [7 e 8].

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Materiais

O hidrolisado enzimático de bagaço de laranja utilizado na fermentação foi obtido junto ao laboratório de engenharia química da Universidade Federal do Espírito Santo, estudos vêm sendo realizados nesta instituição a fim de se avaliar a utilização dessa biomassa como fonte alternativa para produção de etanol de segunda geração, o hidrolisado utilizado neste trabalho apresentava inicialmente, 24,11 g/L de glicose [9].

### 2.2. Ensaio de Fermentação alcoólica

Com intuito de realizar um estudo sobre a cinética do crescimento da levedura, foi utilizado o mosto contendo hidrolisado e licor proveniente do resíduo obtido após a prensagem [9]. Empregou-se como inóculo, a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, para isso utilizou o fermento biológico seco da marca Fleischmann®.

A fermentação foi conduzida em condições anaeróbias em batelada em um biorreator encamisado de 500 mL (Figura 1), mantendo a temperatura em 35 °C com auxílio de um banho termostático, durante 24 h sob agitação constante (nível 2), sendo que, todo processo foi feito em batelada. O meio reacional totalizou 300 mL sendo 90 % deste constituído pelo mosto e 10 % de inóculo (suspensão 10 g/L). Amostras foram coletadas nos seguintes tempos: 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 15, 18, 21 e 24 h. Nas alíquotas coletadas analisou-se a cinética de crescimento celular, utilizando o espectrofotômetro a fim de se avaliar a DO da cultura. Posteriormente, as mesmas foram centrifugadas para análise de AR pelo método DNS, determinação do pH inicial e final, e do teor alcoólico ao final do cultivo. Vale ressaltar que, todo o processo foi realizado em condições de assepsia.

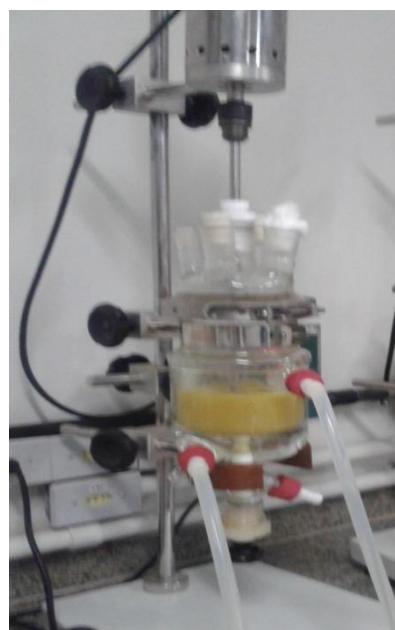


Figura 1 - Biorreator utilizado na fermentação alcoólica.

### 2.3. Cinética de crescimento celular

O procedimento para avaliar a DO das culturas de *S. cerevisiae*, por meio da turbidez da amostra, foi realizado em um espectrofotômetro (Kasuki IL-227) a 600 nm. Antes de fazer a leitura das amostras as mesmas foram homogeneizadas.

### 2.4. Graduação alcoólica do vinho

A densidade dos fermentados foi determinada ao final do cultivo e a partir do valor obtido foi determinada a graduação alcoólica, em % (v/v), por meio de uma tabela alcoométrica [12].

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O teor de umidade inicial da polpa cítrica na indústria é de aproximadamente 82 % [13]. A análise efetuada na biomassa empregada no trabalho mostrou que a mesma possuía teor de umidade igual a 76,04 % valor razoável ao se comparar com a literatura. Para obtenção do mosto utilizado na fermentação, primeiramente, extraiu-se através do processo de prensagem um licor com 8,5 °Brix. Uma fração desse licor foi adicionada ao hidrolisado com aproximadamente 4,22 g/L AR na proporção de 2:1, propiciando uma leve concentração do hidrolisado, obtendo assim um teor final de 6,25 °Brix.

O acompanhamento da cinética de crescimento de *S. cerevisiae* e de consumo de AR contendo, inicialmente, 24,11 g/L de glicose é apresentado na Figuras 2 e 3.

Observando-se a curva de crescimento, Figura 2, é possível perceber que as leveduras empregadas no trabalho, apesar de não serem indicadas para o processo, conseguiram se adaptarem de forma rápida ao substrato empregado. No intervalo de 2 a 24 horas, percebe-se a presença da fase exponencial (fase Log), a fase onde se tem o crescimento máximo de microrganismo, onde foi possível observar (Figura 3) uma velocidade específica máxima ( $\mu_{\max}$ ) de  $0,121\text{h}^{-1}$ .

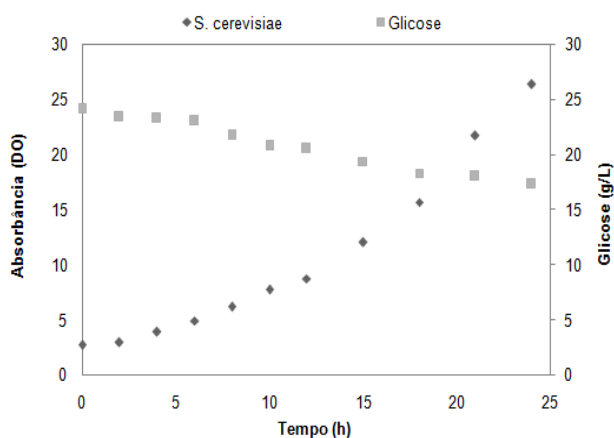


Figura 2: Curva de crescimento de *S. cerevisiae* e consumo de glicose durante fermentação.

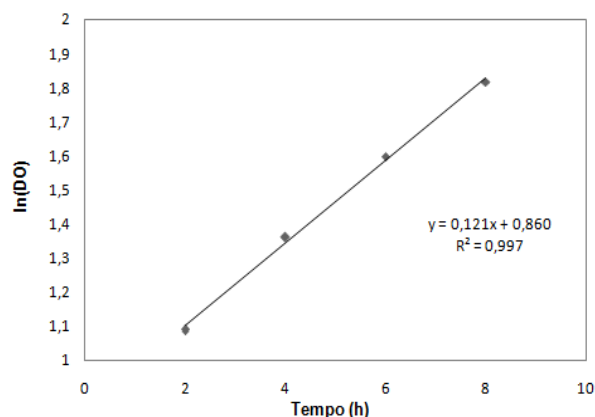


Figura 3: Velocidade específica máxima de crescimento de *S. cerevisiae* em meio de glicose com concentração inicial igual a 24,11 g/L.

A presença de agitação promoveu o contato homogêneo do inóculo com o meio e contribuiu para o crescimento da levedura. O cultivo não atingiu a fase estacionária, uma vez que ainda havia açúcares presentes no meio até o final desse experimento.

O perfil de crescimento da levedura apresentou um suave retardamento inicial no alcance da fase exponencial. Isso se deve a maior concentração de açúcar inicial no meio, que pode ter promovido uma inibição de crescimento na fase de adaptação da levedura.

Durante os ensaios foi observado a queda de pH do meio fermentativo, sendo este, inicialmente, 4,38, alcançando o pH de 3,46, ao final do ensaio. Este fenômeno é decorrente da formação de ácidos orgânicos (succínico, acético, entre outros), que são subprodutos do metabolismo celular da levedura [12]. O teor alcoólico mensurado, ao final do ensaio, foi de 6,5 % (v/v) para o meio. Ao final dos ensaios o meio fermentado apresentou o teor de SS: 7,25 °Brix. Ao final dos ensaios fermentativos observou-se que não houve total consumo de açúcares do meio, o que pode ser comprovado pelo teor de SS dos ensaios (7,25 °Brix). Não foi possível evidenciar, na análise gráfica, a presença da fase estacionária e região de declínio celular. A velocidade específica máxima de crescimento de *S. cerevisiae*, foi obtida por regressão linear (método de mínimos quadrados) dos dados de  $\ln(DO)$  da fase exponencial de crescimento (Figura 2). Nesta região tem-se a velocidade específica máxima ( $\mu_{\max}$ ) possuindo valores de  $\mu_{\max}=0,121\text{h}^{-1}$ . Estudos envolvendo a parâmetros fisiológicos de *S. cerevisiae* (linhagem 248 UNSW 703100), demonstraram que experimentos em batelada em meio de cultivo contendo glicose (5 g/L) + frutose (5 g/L) apresentaram velocidade específica máxima de  $0,45\text{h}^{-1}$ , evidenciando que cepas de leveduras previamente adaptadas trazem o crescimento microbiano mais eficiente e, conseqüentemente, produções mais elevadas de etanol [13].

#### 4. Conclusão

De acordo com os resultados obtidos nos ensaios fermentativos a leveduras apresentaram bom crescimento alcançando uma DO de 26,35, apesar das leveduras empregadas no trabalho não serem indicadas para o processo as mesmas conseguiram se adaptar de forma rápida ao substrato empregado atingindo uma velocidade específica máxima ( $\mu_{\max}$ ) de  $0,121 \text{ h}^{-1}$ , tendo uma boa produção de etanol, o vinho apresentou teor alcoólico de 6,5 % (v/v). O estudo da cinética de crescimento microbiano no desenvolvimento de um novo biocombustível com uma matéria-prima diferenciada, como proposta neste trabalho, requer todo esse trabalho de análise e entendimento das características do processo, a fim de constatar a viabilidade do processo em escala laboratorial, sendo necessária uma avaliação das condições em uma produção industrial com leveduras selecionadas. Como sugestão para trabalhos futuros recomenda-se o uso de leveduras adaptadas ao mosto, para assim avaliar de forma mais conclusiva a potencialidade do uso deste hidrolisado alternativo para produção de etanol.

#### 5. Referências

- [1] REGULY, J. C. Biotecnologia dos processos fermentativos - Fundamentos, matérias-primas agrícolas, processos e produtos. v. 1. Ed. Universitária – UFPEL, Pelotas – RS. 1996.
- [2] ZHU, S.; WU, Y.; YU, Z.; ZHANG, X.; WANG, C.; YU, F.; JIN, S.; ZHAO, Y.; TU, S.; XUE, Y. Simultaneous saccharification and fermentation of microwave/alkali pretreated rice straw to ethanol. *Biosystems Engineering*. v. 92. n. 2. p. 229-235. 2005.
- [3] VENTURINI FILHO, W. G. e CEREDA, M. P. Cerveja. In: ALMEIDA LIMA, U., AQUARONE, E., BORZANI, W., SCHIMIDELL, W. Biotecnologia Industrial: Biotecnologia na produção de alimentos. Brasil: Edgar Blücher. v.4. p. 91-144. 2001.
- [4] LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHIMIDELL, W. Biotecnologia industrial - Processos fermentativos e enzimáticos. v. 3. Ed. Edgard Blücher. São Paulo. 2001.
- [5] RODRIGUES, D. C. G. A.; SANTOS, T. T. dos. Manual de práticas de processos bioquímicos. Processos Bioquímicos - UERJ, Rio de Janeiro. 2011.
- [6] PELCZAR, M. J.; REID, R.; CHAN, E. C. S. Microbiologia. v.1. 1 ed. São Paulo: McGrall-Hill Co, 566p, 1980.
- [7] BEGOT, C.; DESNIER, I.; DAUDIN, J. D.; LABADIE, J. C e LEBERT, A. Recommendations for calculating growth parameters by optical density measurements. *Journal of Microbiological Methods*. v. 25. p. 225-232. 1996.
- [8] AUGUSTIN, J. C; ROSSO, L. e CARLIER, V. Estimation of temperature dependent growth rate and lag time of *Listeria monocytogenes* by optical density measurements. *Journal of Microbiological Methods*. v.38. p.137-146. 1999.
- [9] HOMEM, C. L. G; COSTA, J. R. Estudo Cinético Da Hidrólise Enzimática E Fermentação Alcoólica Da Biomassa Residual Da Indústria Cítrica. 66p. Trabalho de conclusão de curso (Engenharia Química), Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, ES, 2014.
- [10] FARMACOPÉIA BRASILEIRA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 5ª ed. 546p. Brasília. 2010. Piracicaba: FERMENTEC/FEALQ/ESALQ-USP. 1996.
- [11] YAMANAKA, H. T. Cítricos. Série P + L. Guia Técnico Ambiental. São Paulo: CETESB. 45p. 2005. Disponível em: <http://www.cetesb.sp.gov.br>. Acesso em: 20 outubro, 2014.
- [12] AMORIM, H. V.; BASSO, L. C. e ALVES, D. M. G. Processo de produção de álcool- controle e monitoramento.
- [13] ORLOWSKI, J. H; BARFORD, J. P. Direct uptake of sucrose by *Saccharomyces cerevisiae* in batch and continuous culture. *J Gen Appl Microbiol*. v.37. p.215-8. 1991.