AVALIAÇÃO DE FATORES QUE INFLUENCIAM O CRESCIMENTO DA *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* NA FERMENTAÇÃO DO MELAÇO

Aryandson da Silva[1]; Renata da Silva Bonfim[2]; Petrúcia Karine dos Santos de Brito Bezerra[3];

1 – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Norte – Campus Nova Cruz/Aryandson2011@gmail.com; 2 – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Norte – Campus Nova Cruz; 3 – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Norte – Campus Nova Cruz;

RESUMO

Há milhões de anos a humanidade vem utilizando processos fermentativos para a obtenção de alimentos e produtos de seu interesse, porém, cada processo fermentativo necessita de formas diferentes de condução. Nesse sentido, diversos estudos com diferentes formas de condução do processo fermentativo podem ser realizados, visando aumentar o rendimento da fermentação. O objetivo desse trabalho foi avaliar diferentes formas de condução do processo fermentativo a partir do melaço de cana, utilizando a *Saccharomyces cerevisiae*. Foram testadas duas condições: uma com controle de agitação a 150 RPM e temperatura ambiente e outra com controle de temperatura a 33° C e sem agitação. Avaliou-se, ao longo do tempo de processo, o consumo de substrato e o crescimento celular no meio fermentado. *Softwares* como o MS Excel e Origin foram utilizados como ferramentas para determinação de parâmetros cinéticos da fermentação. Na análise dos resultados foi possível observar que a fermentação conduzida com controle de agitação atingiu uma produtividade média de 0,67 g/L.h, obtendo uma velocidade máxima específica de crescimento igual a 0,43 h^{-1}, enquanto a fermentação conduzida por controle de temperatura obteve uma produtividade de 0,092 g/L.h, e uma velocidade máxima específica de crescimento de 0,22 h^{-1}. Ao aplicar o modelo de Monod aos dados experimentais, foi possível determinar sua constante (Ks), sendo novamente o meio conduzido por controle de agitação o que apresentou melhor resultado, com um Ks igual a 117,5 g/L, enquanto o meio com controle de temperatura obteve um Ks de 164,4 g/L. Dessa forma, é possível interpretar que existe uma maior afinidade do microrganismo com o meio conduzido por agitação à temperatura ambiente, uma vez que o valor de Ks para esse sistema foi menor. Conclui-se que, entre as duas formas de condução estudadas, a melhor delas foi por controle de agitação à temperatura ambiente, pois houve um maior consumo de substrato e um maior crescimento microbiano ao longo do processo fermentativo.

Palavras-chave: fermentação, agitação, *Saccharomyces cerevisiae*

ABSTRACT

For millions of years humanity has been using fermentative processes to obtain food and products of interest, but each fermentation process requires different ways of conduction. In this sense, several studies with different ways of conducting the fermentation process can be performed, aiming to increase the yield of the fermentation. The objective of this work was to

evaluate different ways of conduction of the fermentative process from cane molasses, using *Saccharomyces cerevisiae*. Two conditions were tested: one with agitation control at 150 RPM and room temperature and another with temperature control at 33 ° C and without agitation. Throughout the processing time, substrate consumption and cell growth in the fermented medium were evaluated. Softwares such as MS Excel and Origin were used as tools for the determination of fermentation kinetic parameters. In the analysis of the results it was possible to observe that the fermentation conducted with stirring control reached an average productivity of 0.67 g / Lh, obtaining a maximum specific growth rate equal to 0.43 h-1, while the fermentation conducted by control of temperature yielded a yield of 0.092 g / Lh, and a specific maximum growth rate of 0.22 h -1. When applying the Monod model to the experimental data, it was possible to determine its constant (Ks), again being the medium driven by agitation control which presented the best result, with a Ks equal to 117.5 g / L, while the medium with temperature control obtained a Ks of 164.4 g / L. Thus, it is possible to interpret that there is a greater affinity of the microorganism with the medium driven by stirring at room temperature, since the Ks value for that system was lower. It is concluded that, among the two forms of conduction studied, the best of them was by stirring control at room temperature, as there was a higher consumption of substrate and a greater microbial growth throughout the fermentation process.

Keywords: fermentaytion, agitation, *Saccharomyces cerevisiae.*

1. Introdução

A humanidade vivencia processos fermentativos há milhões de anos: em 5000 a.c., se produzia vinhos, queijos e cervejas; em 4000 a.c. na produção de pães, hoje em dia, estudos com processos fermentativos são realizados com o intuito de melhorar as condições de processos, como também se obter maiores rendimentos, além de entregar diversos produtos para diferentes indústrias, como o etanol, antibióticos, alimentos, entre outros produtos (MONGELO, 2012; NEVES, 2003). O etanol é um composto orgânico de fórmula química C_2H_5OH sendo utilizado no Brasil como combustível, obtido praticamente através da fermentação, vem ganhando espaço por serem biocombustíveis alternativos, que atendem a indústria de automóveis com menor impacto ao meio ambiente (SOUZA e MONTEIRO, 2010).

A *Saccharomyces cerevisiae* é a espécie de levedura mais explorada comercialmente, sendo responsável por produzir diversos produtos, porém, em nosso país, se destaca principalmente na indústria de produção de etanol, obtida a partir da fermentação do caldo de cana e do melaço, principalmente pelo alto potencial de produção que o Brasil possui, sendo reconhecido mundialmente como o maior produtor de cana-de-açúcar (RODRIGUES, 2010), oferecendo assim, uma grande contribuição ao programa energético brasileiro.

Diversos autores mostram a importância tanto da agitação quanto do controle da temperatura para um processo fermentativo: o estudo de processos fermentativos com

agitação mostra melhores condições para o crescimento do microrganismo, principalmente pelo aumento da quantidade de oxigênio no meio, implicando no rendimento do processo (GUATÉRIO *et al*, 2015). Para a produção de etanol por *Saccharomyces cerevisiae*, SOUZA (2015) afirma que a aeração deve ser feita no início da fermentação para a multiplicação das células, deve ser evitada durante o processo fermentativo, com o objetivo de diminuir a formação de ácido acético e favorecer a transformação do produto desejável, o etanol.

Quanto a temperatura, diversos trabalhos vêm sendo feitos para encontrar faixas de temperaturas e limites apropriados para fermentações: LIMA *et al* (2014) mostra que existe uma faixa de temperatura ótima para se trabalhar, entre 26 e 35°C, mostrando que temperaturas abaixo dessa faixa são insuficientes para ativação das leveduras, e acima disso enfraquece as leveduras, criando condições para o aparecimento de outros microrganismos; TEXEIRA *et al* (2016) afirmam que a temperatura de 30°C foi a mais adequada para se trabalhar, enquanto SANTOS *et al* (2010) trabalhou com temperaturas adversas e obteve resultados satisfatórios a 38°C.

O objetivo do trabalho foi analisar qual é a melhor forma de conduzir um processo fermentativo, se é com agitação a temperatura ambiente ou com controle de temperatura sem agitação, analisando o crescimento microbiano e a redução da quantidade de substrato, estudo necessário para analisar qual a necessidade é mais importante para um processo fermentativo e qual rota metabólica o microrganismo irá tomar em cada forma de condução, ajudando a aumentar rendimentos de processos fermentativos.

2. Metodologia

Os ensaios experimentais necessários para o desenvolvimento deste trabalho foram realizados nos laboratórios de química orgânica e de biologia do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Norte, IFRN – Campus Nova Cruz.

2.1. Microrganismo e melaço

O microrganismo utilizado neste trabalho foi uma linhagem de levedura *Saccharomyces cerevisiae* PE-2 doada gentilmente pelo banco de culturas do Laboratório de Engenharia Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Norte e o melaço de cana utilizado foi doado gentilmente pela Usina Monte Alegre S/A.

2.2. Estoque, pré-inóculo e inóculo

Para a manutenção do microrganismo foi utilizado o meio sólido YEPD, cujos componentes estão apresentados na Tabela 1, após a transferência da levedura para a placa,

foram mantidas em estufa bacteriológica a 30°C por 72h para o crescimento das colônias. Após esse tempo de incubação, as placas foram mantidas a 4 ºC com o intuito de reduzir o metabolismo celular e conservá-las para as próximas etapas, ou seja, preparo do pré-inóculo e inóculo, realizando repiques a cada 20 dias para renovar a linhagem.

Tabela 1: Componentes do YEPD

Componentes	**Concentração (g/L)**
Glicose	20,00
Extrato de Levedura	10,00
Peptona	20,00
Agar-agar	18,00

Neste trabalho, realizaram-se os repiques utilizando o Método de Esgotamento de Inóculo por Estrias por Quadrante e em placas de Petri, onde, permite a transferência de microrganismos de um meio de cultura para outro, possibilitando o isolamento e a obtenção de culturas puras.

Para o preparo do pré-inóculo foi utilizado a composição apresentado na Tabelas 2 onde foi feita a inoculação e deixada em agitação por 24 horas a temperatura ambiente.

Tabela 2: Composição do meio de cultura para pré-inóculo e inóculo, utilizando fosfato de amônio.

Componentes	**Concentração (g/L)**
Glicose	30,00
Extrato de Levedura	5,00
Fosfato de Amônio ($(NH_4)_2HPO_4$)	10,00
Fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4)	4,50
Sulfato de magnésio heptahidratado ($MgSO_4.7H_2O$)	1,00
Sulfato de zinco heptahidratado ($ZnSO_4.7H_2O$)	1,16

Em seguida, 5% (v/v) deste inóculo foi suspenso em melaço de cana diluído em água destilada até atingir 19°Brix, sendo analisados dois procedimentos experimentais: um sob agitação a 150 rpm, em temperatura ambiente, aproximadamente 28°C, e o outro sem

agitação, foi realizado em banho maria, a temperatura de 33°C. Em ambos foram coletados pontos a cada 1,5 horas para o estudo cinético de crescimento microbiano e consumo de substrato. Todos os meios de cultivo para a S. cerevisiae foram esterilizados em autoclave, a 121°C por 15 minutos, e pH ajustado para 5,0.

2.3. Quantificação de substrato

Para quantificar o substrato foi utilizado um refratômetro digital (Novainstruments, DR 500), sendo os valores em °Brix convertidos em g/L de substrato, sabendo que, 1° Brix equivale a 1% de substrato em solução, ou seja, 10g/L.

2.4. Quantificação de biomassa

A biomassa foi quantificada por turbidimetria, em NTU (Nephelometric Turbidity Unity), e convertida em g/L de biomassa, utilizando uma curva de calibração construída a partir de diferentes diluições.

2.5. Cinética de fermentação

Para avaliar o desempenho do processo fermentativo, todos os cálculos foram feitos com auxílio de programas estatísticos, sendo utilizado o Origin e o MS Excel. As Equações 1-4 foram utilizadas para descrever o processo e avaliar qual a melhor condução do processo fermentativo

$$P_x = \frac{X_m - X_0}{t_f} \tag{1}$$

$$r_x = \frac{dX}{dt} \tag{2}$$

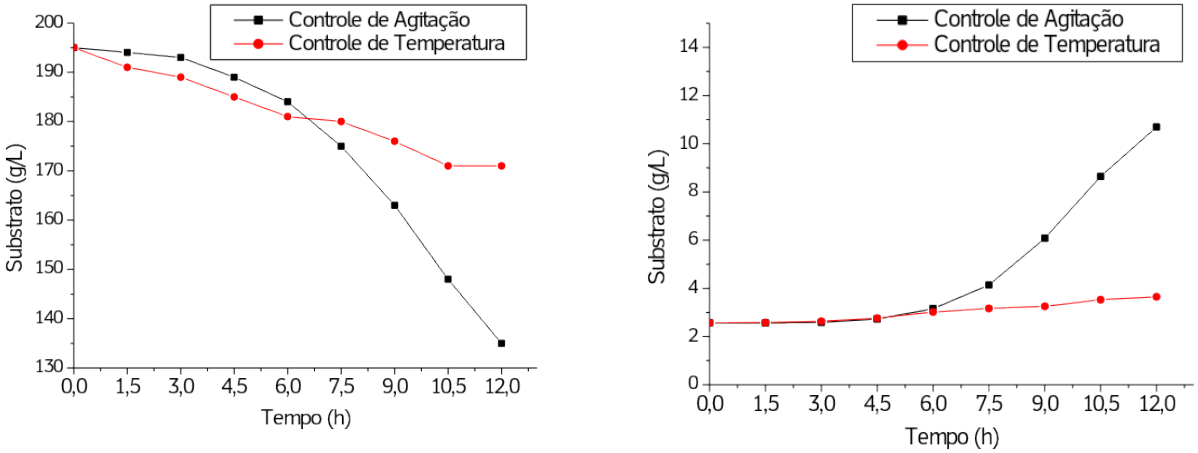
$$\mu_x = \frac{1}{X}\frac{dX}{dt} \tag{3}$$

$$\mu_x = \frac{\mu_m * S}{K_s + S} \tag{4}$$

3. Resultados e discussões

3.1. Analise da melhor forma de condução do processo fermentativo

A partir dos resultados obtidos na análise da turbidez e do °Brix foi possível observar um crescimento microbiano como também um consumo de substrato, sendo ambos influenciados pela forma como foi conduzida o processo, conforma apresentado na figura 1.



(a) (b)

Figura 1 – (a) Consumo de substrato no meio conduzido por controle de agitação à temperatura ambiente e no meio conduzido por controle de temperatura sem agitação; (b) Crescimento de biomassa no meio conduzido por controle de agitação a temperatura ambiente e no meio conduzido por controle de temperatura sem agitação.

Ao analisar a figura 1, pode ser observado que o meio conduzido por controle de agitação à temperatura ambiente obteve uma maior redução de substrato no meio comparado ao meio conduzido por controle de temperatura (Figura 1(a)), como também, o meio conduzido por controle de agitação obteve melhores resultados na produção da biomassa, obtendo um aumento de biomassa muito maior que o meio conduzido por controle de temperatura (Figura 1(b)). Isso mostra uma maior facilidade de reprodução da célula em um meio mais aerado, como é o caso do meio conduzido por controle de agitação.

3.2. Cinética de fermentação

Avaliando a cinética de fermentação, é possível comparar as velocidades obtidas em cada processo fermentativo juntamente com a produtividade média de biomassa e a constante de Monod.

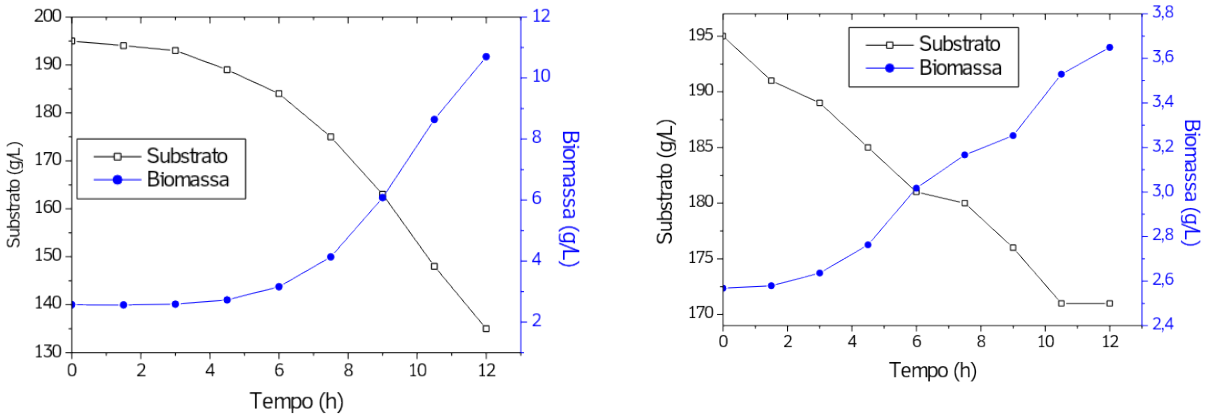


Figura 2 – Estudo cinético do crescimento de biomassa e consumo de substrato, para o meio conduzido por controle de agitação à temperatura ambiente (a) e para o meio conduzido por controle de temperatura sem agitação (b).

Na figura 2, é possível analisar que o processo fermentativo conduzido por controle de agitação foi mais estável (Figura 2(a)), podendo observar claramente a fase de adaptação (lag) até 4 horas e a fase exponencial (log) após as 4 horas, sem ser possível observar a fase estacionaria e a morte celular, enquanto que no processo conduzido por controle de temperatura obteve uma menor estabilidade em seu processo fermentativo.

Na avaliação cinética do processo fermentativo, a fermentação conduzida por controle de agitação obteve uma produtividade média de 0,67 g/L.h, obtendo uma velocidade máxima específica de crescimento igual a 0,43 h^{-1}, enquanto a fermentação conduzida por controle de temperatura obteve uma produtividade de 0,092 g/L.h, e uma velocidade máxima específica de crescimento de 0,22 h^{-1}, vendo assim, novamente, uma maior produtividade e velocidade máxima do meio conduzido por agitação.

Na figura 3 é possível analisar as velocidades instantâneas da fermentação ao longo do período fermentativo, observando a superioridade do meio conduzido por controle de agitação em relação do meio conduzido por controle de temperatura.

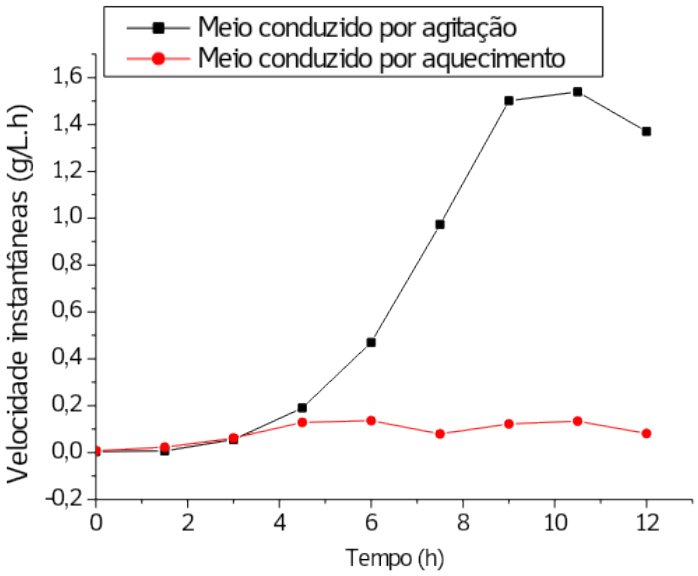


Figura 2 – Velocidade instantânea de crescimento da biomassa em relação ao tempo para o meio conduzido por controle de agitação à temperatura ambiente e para o meio conduzido por controle de temperatura sem agitação.

A diferença obtida na velocidade de crescimento microbiano pode ser explicada pela afinidade do microrganismo com o meio, sendo avaliada pela constante de Monod, onde, para saber a afinidade do microrganismo, encontra-se a constante de Monod (Ks), e quanto menor for o valor da constante, mais afinidade com o meio fermentativo o microrganismo possui, por se tratar de um mesmo meio fermentativo, alterando somente o processo, a constante de Monod obtida ira se referir a afinidade do microrganismo com a forma como a fermentação foi conduzida.

A partir dos cálculos realizados, foi possível obter uma constante de 117,5 g/L para o meio conduzido por controle de agitação à temperatura ambiente e 164,4 g/L para o meio conduzido por controle de temperatura sem agitação, mostrando assim, uma maior afinidade do microrganismo com o meio conduzido por agitação à temperatura ambiente.

4. Considerações Finais

A partir dos experimentos realizados com diferentes formas de condução dos processos fermentativos, foi possível afirmar que a melhor forma de conduzir o processo é com um controle de agitação à temperatura constante, pois obteve uma maior reprodução celular em menor tempo, como também, um maior consumo de substrato.

A eficiência dessa forma de condução pode ser vista também na análise cinética, em que a fermentação conduzida por controle de agitação apresentou uma superioridade em relação a fermentação conduzida com controle de temperatura, uma diferença bastante significativa, principalmente se tratando do crescimento microbiano.

Analisando a constante de Monod, foi possível explicar a diferença nos resultados, pois o Ks menor indica que o microrganismo possui maior afinidade com o meio e, portanto, a condução do processo por controle de agitação e temperatura constante promove uma melhor utilização do substrato pelas células microbianas.

Contudo, novos estudos deverão ser realizados para a observação de outras formas de condução de processos fermentativos, como também, a possibilidade de combinar as duas condições, com a finalidade de aumentar ainda mais a eficiência do processo.

5. Referências bibliográficas

SANTOS, J.R.A.; GUSMA, N.B.; GOUVEIA, E.R. **Seleção de linhagem industrial de S. cerevisiae para a produção de etanol em condições adversas de temperatura e de agitação.** Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais, Campina Grade, v.12, n.1, p.75-80, 2010.

SOUZA, J. L. U.; MONTEIRO, R. A. B. **Fatores interferentes na fermentação alcoólica para a produção de Etanol.** FAZU em Revista, Uberaba, n.8. p. 100-107. 2011.

GUATÉRIO, F. G. A.; MOREIRA, A. S.; VENDRUSCOLO, C. T. **Investigação por planejamento experimental da influência da agitação e aeração no processo produtivo de xantana por Xanthomonas arboricola pv pruni**. Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial. UTFPR – Ponta Grossa. Paraná. v.9. n. 2. p. 1821-1835. 2015.

NEVES, L. C. M. **Obtenção da enzima glicose 6-fosfato desidrogenase utilizando '*Saccharomyces cerevisiae*' W303-181**. Dissertação de Mestrado. São Paulo. 2003.

RODRIGO, L. C. **A cana-de-açúcar como matéria-prima para a produção de biocombustíveis: Impactos ambientais e o zoneamento agroecológico como ferramenta para mitigação**. UFJF. Juiz de Fora. 2010.

LIMA, U. A.; AQUORONE, E; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; **Biotecnologia Industrial**, Blucher, São Paulo, v.3. ed. 1. p. 17. 2001.

TEXEIRA, V.; SILVA, A. F.; FERNANDES, G. C.; NASCIMENTO, F.; ROVIERO, J. P.; MUTTON, M. J. R. **Efeito da temperatura na microbiota da fermentação alcoólica.** Ciência e Tecnologia. FATEC. São Paulo. v.8. 2016.

MONGELO,A.I. **Validação de Método Baseado em Visão computacional para Automação da Contagem de Viabilidade de Leveduras em Indústrias Alcooleiras.** Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Univesidade Católica Dom Bosco, Campo Grande, MG., 2012.