

ESTUDO DE LINHAGENS DE LEVEDURAS *Saccharomyces cerevisiae* ORIUNDAS DA BIODIVERSIDADE AMBIENTAL NA FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA

STUDY OF YEAST STRAINS *Saccharomyces cerevisiae* FROM BIODIVERSITY ENVIRONMENTAL IN ALCOHOLIC FERMENTATION

Bruna Luiza Dacanal MOREIRA¹; Clóvis PARAZZI²; Larissa Ferreira PAPIN³; Jorge José Correa LOPES²

1. Aluna do curso de Engenharia Agrônoma, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de São Carlos - UFSCAR, São Carlos, SP, Brasil. brunadacanal@hotmail.com; 2. Professores, Doutores, Departamento de Tecnologia Agroindustrial e Sócio-economia Rural, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de São Carlos - UFSCAR, São Carlos, SP, Brasil; 3. Engenheira agrônoma, Usina Guarani S/A, Tanabi, SP, Brasil.

RESUMO: Linhagens de leveduras *Saccharomyces cerevisiae*, nativas e oriundas do processo industrial de produção de etanol foram isoladas e comparadas com a levedura padrão CAT-1, selecionada e amplamente utilizada na indústria de etanol, em sistema descontínuo de fermentação, com reciclo celular. As linhagens foram reativadas em meio sólido de manutenção em placas de Petri e em seguida foram colocadas em crescimento em meio de caldo de cana-de-açúcar clarificado e diluído à 4° Brix. Após a obtenção da massa celular, na concentração de $1,0 \times 10^8$ cél./mL, as linhagens foram inoculadas em meio de caldo de cana-de-açúcar a 20° Brix e assim procedeu-se por seis ciclos fermentativos consecutivos. Ao final de cada ciclo procedeu-se as determinações do teor de etanol, pH, produção de biomassa, viabilidade e concentração de células, açúcares redutores totais residuais no vinho e acidez. Com os resultados obtidos foram calculados a eficiência fermentativa, viabilidade celular e brotamento. Os dados foram analisados estatisticamente utilizando-se a análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Os resultados mostram que a linhagem utilizada em processo industrial, a CAT-1, se destacou diante das duas linhagens isoladas e selecionadas (18 e 19) em relação à eficiência fermentativa, mostrando um bom desempenho no processo de fermentação para a produção de etanol. Por outro lado observou-se que as linhagens 18 e 19 apresentaram desempenho fermentativo semelhante e, de modo geral, características adequadas à produção de etanol.

PALAVRAS-CHAVE: Leveduras nativas. Fermentação etanólica. Produção de etanol.

INTRODUÇÃO

Muitas são as adversidades encontradas no processo fermentativo de produção de etanol durante o período de safra e, como consequência, o fermento torna-se totalmente vulnerável à contaminação microbiana, principalmente por bactérias e leveduras nativas que acompanham a matéria-prima utilizada na produção de álcool. Segundo Oliveira e Pagnocca (1988), a levedura de processo sofre inúmeras reciclagens tornando-a susceptível à contaminação por outras leveduras, oriundas da biodiversidade ambiental. Essas leveduras selvagens, conforme suas características podem acarretar sérios prejuízos no rendimento final de produção de etanol.

Ceccato-Antonini e Parazzi (1996) isolaram uma linhagem de *Saccharomyces cerevisiae* do processo contínuo de fermentação alcoólica em uma destilaria Paulista, que foi responsável pela queda de 10% no rendimento de fermentação e de 18% na produção total de etanol.

Algumas vezes essas leveduras invasoras

passam despercebidas, sem prejudicar o processo normal de fermentação, mostrando ser uma linhagem compatível e mais resistente às condições adversas do meio. A partir destas constatações, vários estudos vêm sendo conduzidos visando aproveitar essas linhagens contaminantes para produzir etanol, em substituição às linhagens de leveduras atualmente utilizadas.

Ferrari et al. (1980), Parazzi e Oliveira (1996) e Andrietta et al. (2007) isolaram e avaliaram algumas dessas leveduras selvagens quanto ao seu potencial fermentativo na produção de etanol e constataram a hegemonia e rusticidade dessas linhagens aliados a um ótimo desempenho fermentativo.

Devido ao progresso da tecnologia de produção de álcool as linhagens de leveduras foram sendo selecionadas buscando-se características desejáveis ao processo e ao produto. Características como produtividade, eficiência da fermentação, tolerância ao etanol e à temperatura e resistência às altas concentrações de açúcares são alguns dos principais fatores que são considerados na escolha

de uma levedura (HAMMOND, 1995; GUTIERREZ; ANNICCHINO; LUCATTI, 1990).

Segundo Galo e Canhos (1991), os avanços de técnicas moleculares de identificação de micro-organismos como: sequenciamento de rDNA 16S; fingerprinting genético (ARDRA - Amplified Ribossomal DNA - Restriction Analysis e RPDA - Random Amplified Polymorphic DNA) e Híbridação DNA-DNA, possibilitaram verificar que as leveduras "industriais verdadeiras" eram as contaminantes selecionadas pelo próprio processo e adequadas ao mesmo, apresentando altos rendimentos, baixas concentrações de glicerol e altas viabilidades celulares.

De acordo com Basso (2006), o estudo das características fermentativas das linhagens selvagens isoladas de processos industriais permite a seleção de cepas apropriadas à fermentação com reciclo, como a conduzida no país. Essa seleção visa obter linhagens com alto rendimento em etanol, baixa formação de glicerol, não floculante, não formadora de espuma, com alta viabilidade celular e com altos conteúdos celulares de trealose.

Algumas linhagens já foram selecionadas por essas características e são amplamente utilizadas nas indústrias, como a BG-1, CAT-1, PE-2 e SA-1. Essas leveduras vêm sendo empregadas nas destilarias e respondem por uma parte significativa do etanol produzido no país. Foram avaliadas em cerca de 40% das destilarias onde foram introduzidas e apresentaram uma grande capacidade de permanecerem no processo. Mesmo assim, essas cepas são substituídas por linhagens contaminantes, que na maioria das vezes apresentam características fermentativas indesejáveis como a formação de espuma, floculação, incapacidade de metabolizar todo açúcar do mosto ou ainda características muitas vezes superiores (PAPIN, 2009).

Embora a utilização de uma levedura qualquer selecionada seja uma alternativa viável para o início da safra, o uso de leveduras provenientes do próprio processo é a expectativa para o futuro das usinas brasileiras. A estabilidade microbiológica em relação às leveduras do processo de produção de álcool esta relacionada à utilização de inóculo de uma levedura isolada do próprio processo segundo Stroppa, Andrietta e Andrietta (2003).

Este trabalho teve como objetivo avaliar o desempenho de linhagens de leveduras nativas, isoladas como contaminantes de processos de fermentação de caldo de cana-de-açúcar na produção de etanol.

MATERIAL E MÉTODOS

As linhagens de leveduras foram obtidas através de isolamento e seleção em processos fermentativos industriais e avaliadas quanto à capacidade de produção de etanol, em condições de laboratório. Foram utilizadas três linhagens, sendo duas linhagens selvagens ou nativas (denominadas de 18 e 19) e uma linhagem padrão. As duas primeiras linhagens são *Saccharomyces cerevisiae* Meyen ex E.C. Hansen e têm características fermentativas comprovadas, conforme estudo preliminar realizado por Papin (2009). Para efeito de comparação utilizou-se a linhagem CAT-1, *Saccharomyces cerevisiae*, em uso no processo industrial de produção de etanol nas unidades do estado de São Paulo, normalmente utilizada para o início da fermentação nas destilarias de álcool e tem como característica a dominância e persistência na indústria, com 54 e 70% respectivamente, em uma safra, de acordo com Basso et al. (2002).

Os inóculos para as linhagens nativas e levedura padrão, foram preparados de forma semelhantes, a partir do tubo de cultura. Iniciou-se através da multiplicação em placas de Petri, em meio de crescimento GYMP (LODDER, 1970) e em seguida em erlenmeyer de 250 mL contendo 150 mL de meio de caldo de cana-de-açúcar clarificado, diluído à 4° Brix e previamente esterilizado à 120°C por 20 minutos. Após, as leveduras foram inoculadas e mantidas em agitação à temperatura de 30°C, por 24 horas. A massa celular obtida foi separada por centrifugação à rotação de 1500G durante 05 minutos em condições assépticas. As células assim obtidas foram novamente colocadas para a multiplicação sob as condições ambientais que prevaleceram anteriormente.

Após a segunda fase de crescimento repetiu-se a centrifugação e a massa celular foi ressuspensa à volumes idênticos ao da propagação, em meio de caldo de cana-de-açúcar clarificado e esterilizado na concentração de 20° Brix, passando então, a prevalecer às condições de fermentação. Nesta fase procedeu-se a padronização da concentração celular, iniciando-se o processo de fermentação com $1,0 \times 10^8$ cél/mL. Nesta etapa os experimentos foram conduzidos de maneira similar durante 96 horas, divididos em 06 ciclos de 16 horas cada de incubação, a temperatura de 32°C. Foram realizadas 03 repetições para cada linhagem. Utilizou-se para cada ciclo de fermentação caldo de cana-de-açúcar clarificado na concentração de 194,20 g/L de açúcares redutores totais (ART).

No final da segunda fase de multiplicação e

de cada ciclo retirou-se um volume equivalente à 5% de cada cultura para análise de biomassa. O vinho remanescente foi centrifugado e a biomassa proveniente dos frascos foi ressuspensa em novo meio, reiniciando o novo ciclo. Procedendo-se assim, sucessivamente, até o sexto ciclo. No material sobrenadante (vinho centrifugado) foram feitas as avaliações de Açúcares Redutores Totais residuais (ARTr), após inversão ácida pelo método do ácido 3,5 dinitrosalicílico (ADNS) (MILLER, 1959); a concentração de etanol foi determinada através do densímetro digital PAAR (DMA-45), após destilação das misturas hidroalcoólicas em microdestilador modificado (AMORIM; BASSO; ALVEZ, 1996); a viabilidade celular e a porcentagem de brotamento foram estimados por meio de contagem em câmara de Neubauer (LEE et al., 1981); a determinação da acidez sulfúrica do vinho foi feita de acordo com o método preconizado pela Copersucar (1995).

As eficiências dos processos fermentativos foram calculadas com base na estequiometria das fermentações, onde 01 grama de ART produz 0,64755 mL de álcool etílico a 20°C.

Os resultados obtidos nos ensaios de

fermentação foram submetidos à análise de variância (ANOVA) seguindo o delineamento em blocos casualizados, considerando cada ciclo como um bloco. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As linhagens apresentaram diferenças significativas na análise de variância a 1% de probabilidade ($p < 0,001$) para a concentração de etanol, açúcares redutores totais residuais, viabilidade celular e eficiência fermentativa. Os demais parâmetros analisados não diferiram estatisticamente entre si.

Os valores médios obtidos das concentrações de açúcares redutores totais residuais (ARTr), de etanol produzido (TA), de massa de células secas (MS), acidez no vinho, brotamento de células (BrC), viabilidade celular (VC) e eficiência fermentativa (EF) encontram-se na Tabela 1, seguidas das diferenças mínimas significativas obtidas pelo teste de comparações múltiplas (Tukey 5%).

Tabela 1. Médias dos valores de massa celular seca (MS), teor alcoólico no vinho (TA), acidez do vinho, açúcares redutores totais residuais (ARTr), brotamento de células (BrC), viabilidade celular (VC), e eficiência fermentativa (EF), das linhagens de leveduras 18, 19 e CAT-1.

Leveduras	MS g/L	TA v/v	Acidez g/L	ATRr g/L	BrC %	VC %	EF %
18	4,73 a	10,25 b	1,96 a	0,51 a	21,39 a	67,57 b	83,66 b
19	5,09 a	10,11 b	1,92 a	0,52 a	17,34 a	73,66 a	82,56 b
CAT-1	4,94 a	10,82 a	2,02 a	0,44 b	19,30 a	68,75 b	88,03 a
DMS	0,44	0,29	0,11	0,04	4,35	3,69	2,24

Obs: letras iguais mostram valores estatisticamente semelhantes; DMS - diferenças mínimas significativas, Tukey a 5% de probabilidade.

A comparação entre as linhagens em cada uma das determinações foram realizadas atribuindo-se o valor 100 (percentual) ao maior valor obtido, independentemente da linhagem de levedura e os resultados se encontram ilustrados na Figura 1.

As médias da massa celular seca obtida para as linhagens de leveduras variaram entre 4,73 a 5,09 g/L e a acidez entre 1,92 a 2,02 g/L. O brotamento, que caracteriza crescimento das leveduras durante o processo fermentativo, permaneceu em média entre 17 e 21%, valores esperados nas condições de desenvolvimento do experimento. Esses dados revelam que a fermentação foi conduzida em condições de concentração de massa e crescimento adequados,

sem alterações acentuadas na acidez do vinho, consequentemente, com contaminação bacteriana reduzida.

Diferenças significativas para concentração de etanol, açúcares redutores totais residuais e eficiência fermentativa foram observadas entre a CAT-1 e as linhagens 18 e 19 (Tabela 1 e Figura 1). Esses resultados confirmam a superioridade da levedura CAT-1 em relação à concentração de etanol nos testes realizados.

O teor dos açúcares redutores totais residuais obtidos pela levedura CAT-1 foi menor que o das outras duas linhagens. Houve também diferença estatística significativa em relação à eficiência fermentativa entre a CAT-1 (88,03%) e as linhagens 18 (83,66%) e 19 (82,56%), que não

diferiram entre si.

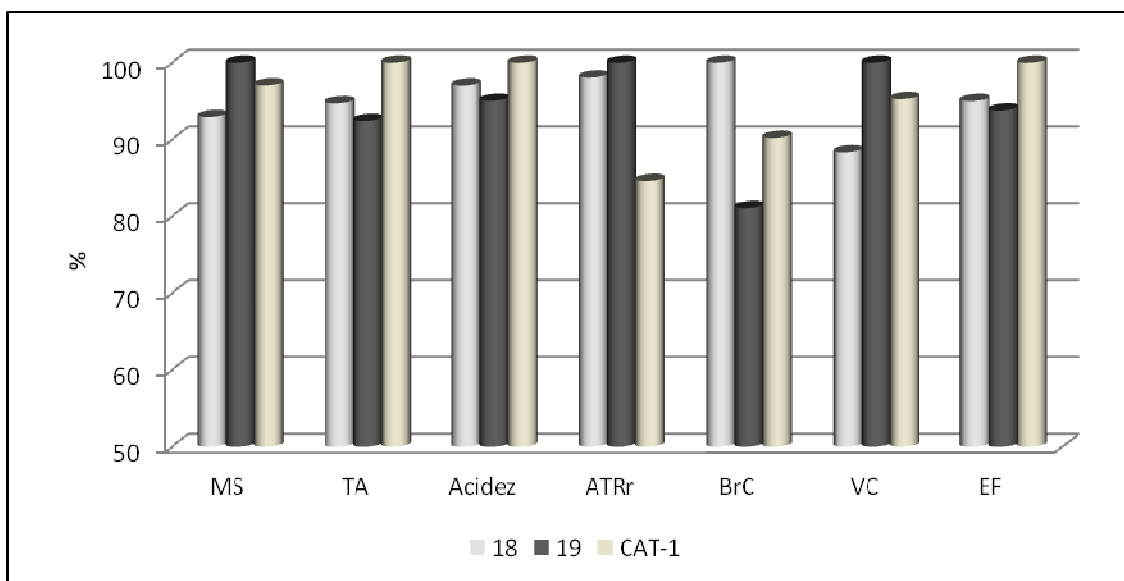


Figura 1. Comparação percentual entre as linhagens de leveduras 18, 19 e CAT-1, em relação a biomassa seca, o teor alcoólico, a acidez do vinho, açúcares redutores totais residuais, brotamento de células, viabilidade celular e eficiência fermentativa, na fermentação etanólica do caldo de cana conduzidos em seis ciclos.

Em relação à viabilidade celular as análises estatísticas mostraram diferenças significativas entre as linhagens, entre os ciclos fermentativos e também para a interação ciclos e linhagens. Através do teste de comparações múltiplas pode-se observar que as leveduras 18 e CAT-1 não apresentaram

diferença significativa entre si, já a levedura 19 diferiu significativamente das demais (Tabela 1).

Os resultados médios de viabilidade celular (%) para cada ciclo para as três linhagens de leveduras são mostrados na Figura 2.

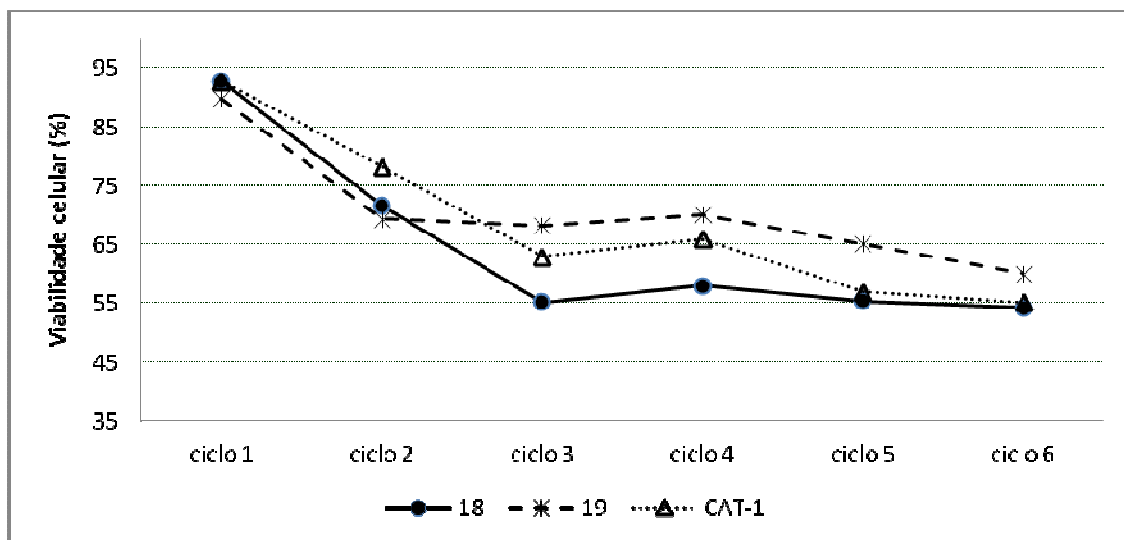


Figura 2. Valores percentuais médios em cada ciclo de fermentação para viabilidade celular das linhagens de leveduras 18, 19 e CAT-1.

Houve uma redução acentuada na viabilidade celular para as linhagens nos três primeiros ciclos fermentativos. A menor redução da viabilidade celular foi da linhagem 19 (21,5%), seguida das linhagens 18 e CAT-1 e iguais a 37,6%

e 29,8%, respectivamente. Considerando as médias dos ciclos subsequentes houve tendência da estabilização desse parâmetro, em valores acima de 55% de células viáveis. A viabilidade da linhagem 19 foi sempre superior a 60% em todos os ciclos

fermentativos.

As porcentagens de viabilidade celular nos ciclos foram inferiores às normalmente encontradas nos processos fermentativos industriais. Este fato pode estar relacionado à concentração inicial de açúcar utilizada, 200g/L, à toxidez provocada pela concentração final de etanol, aliada à permanência das células por um longo período (16 horas) de fermentação. Esses são os principais fatores que causam instabilidade no processo fermentativo.

As linhagens 18 e 19 (Tabela 1) diferiram estatisticamente entre si, somente para viabilidade celular, o que demonstra a rusticidade e desempenho semelhante aos das leveduras etanólicas utilizadas em sistema descontínuo de fermentação (feed-batch) com ciclos celulares.

CONCLUSÕES

A linhagem CAT-1 apresentou valores de eficiência fermentativa em média 4,5% superiores às demais linhagens nos ensaios comparativos em sistema descontínuo de fermentação com ciclo celular.

Já a linhagem 19 obteve o maior valor médio para viabilidade celular, superando em 4,9% a CAT-1. Este resultado pode caracterizar a adaptação e a rusticidade dessa linhagem às condições do meio utilizado.

Devido ao desempenho satisfatório apresentado pelas linhagens nativas 18 e 19, sugerem-se novos estudos, em maior escala, tendo em vista o seu aproveitamento na indústria de etanol.

ABSTRACT: Native strains of *Saccharomyces cerevisiae* from the industrial ethanol process were isolated and have been tested with standard CAT-1 strain, which was selected, and widely used in ethanol production in southeast of Brazil in batch fermentation system with cells recycles (Melle-Boinot). The strains were reactivated in synthetic culture media and then inoculated into clarified sugar cane juice at 4° Brix for growth until it reaches a cell concentration 1.0×10^8 /mL. After this, the cells were inoculated in a sugar cane juice at concentration 20°Brix by six fermentative cycles. After each cycle were carried out the following analyses: ethanol concentration, pH, biomass, viability and budding cells. The data were analyzed statistically using variance analyses (ANOVA) and averages compared by Tukey test at 5% probability. The results show the best performance for that CAT-1 in fermentative efficiency than strains 18 and 19, mainly by the ethanol concentration. The 18 and 19 strains showed similar results of performance with characteristics for the ethanol production.

KEYWORDS: Wild yeasts. Alcoholic fermentations. Ethanol production.

REFERÊNCIAS

- AMORIM, V. H.; ZAGO E. A.; SILVA, L. F. L.; BERNARDINO, C. D.; **Métodos Analíticos para o controle da produção de álcool e açúcar**. 2ª.ed. Piracicaba: Fermentec/Fealq/Esalq-USP, 1996. 195p.
- ANDRIETTA, M. G. S.; ANDRIETTA, S. R.; STECKELBERG, C.; STUPIELLO, E. N. A. Brazil, 30 years of Proálcool. **International Sugar Journal**, Campinas, v. 109, n. 1299, p. 195-200, 2007.
- BASSO, L. C.; AMORIM, H. V.; ALVES, D. M. G.; CHERUBIN, A. R. Antagonism between *Saccharomyces* and *Lactobacillus* in fuel ethanol fermentation. In: INTERNATIONAL SPECIALISED SYMPOSIUM ON YEAST, 22, 2002, Pilanesberg. **Proceedings...** Pilanesberg: Yeast Fermentations and Other Yeast Bioprocess, 2002. v. 1. p. 109-09.
- BASSO, L. C. Fisiologia e ecologia microbiana. In: I WORKSHOP TECNOLÓGICO SOBRE OBTENÇÃO DE ETANOL, 2006, Lorena. **Anais...** Lorena: EEL/USP, 2006. Disponível em: <http://www.apta.sp.gov.br/cana/anexos/Paper_sessao_2_Basso.pdf>. Acesso em: 16 de maio 2012.
- CECCATO-ANTONINI, S. R.; PARAZZI, C. Isolamento de levedura selvagem floculante e efeitos da contaminação em processo de fermentação etanólica contínua. In: CONGRESSO NACIONAL DA STAB, 6., 1996, Maceió. **Anais...** Maceió: STAB, 1996. p. 23-29.
- COPERSUCAR. **Manual de métodos analíticos e controle químico da fermentação**. Piracicaba: Centro de Tecnologia Copersucar, 1995. 83p.

FERRARI, S. E; LOPES, J. J. C; LEME, J. R. A; OLIVEIRA, E. R. Industrial efficiency of alcohol fermentation: a comparative study. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM OF THE ALCOHOL FUELS TECHNOLOGY, 4., 1980, Guarujá. **Proceedings...** São Paulo: IPT, 1980. v. 1, p. 1139-141.

GALLO, C. R.; CANHOS, V. P. Contaminantes bacterianos na fermentação Alcoólica. **STAB - Açúcar, Álcool e Subprodutos**, v. 9, n. 1, p. 35-40, 1991.

GUTIERREZ, L. E.; ANNICCHINO, A. V. K. O.; LUCATTI, L. Capacidade fermentativa de *Saccharomyces cerevisiae* enriquecida com ácidos graxos. In: ANAIS DA ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA "LUIZ DE QUEIROZ", 2., 1990, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 1990. v. 47, p. 575-95.

HAMMOND, J. R. Genetically-modified brewing yeasts for the 21st century. Progress to date. **Yeast**, Chichester, England, v. 11, n. 16, p. 1613-27, 1995.

LEE, S. S.; ROBISON, F. F; WANG, H. Y. Rapid determination of yeast viability. **Biotecnology and Bioengineering**, New York, v. 11, p. 641-49, 1981.

LODDER, J. **The Yeasts: a taxonomic study**. 2.ed. Amsterdam, 1970. 1385p.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic Acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, 1959.

OLIVEIRA, M. C. F. L.; PAGNOCA, F. C. Aplicabilidade de meios seletivos empregados na indústria cervejeira para detecção de leveduras selvagens em unidades sucroalcooleiras. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE FERMENTAÇÃO, 8., 1988, São Lourenço. **Anais...** São Lourenço: SINAFERM, 1988. p. 78-81.

PAPIN, L. F. Seleção e avaliação de linhagens de leveduras para produção de etanol e aguardente. 2009. 90 p. Monografia (Trabalho de Conclusão do Curso de Engenharia Agrônômica) - Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de São Carlos, Araras, 2009.

PARAZZI, C; OLIVEIRA, M. C. F. L. Comparação de linhagens de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* floculantes em processo descontínuo de produção de álcool e aguardente. In: CONGRESSO NACIONAL DA STAB, 6., 1996, Maceió. **Anais...** Maceió: STAB, 1996. p. 121-29.

STROPPIA, C. T; ANDRIETTA, S. R; ANDRIETTA, M. G. S. Caracterização das Leveduras Floculantes Seleccionadas em Reator Tipo Torre em uma Unidade de Fermentação Alcoólica. In: SIMPOSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS, 14., 2003. Florianópolis. **Anais...** Florianópolis: SINAFERM, 2003, p. 107-12.