

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

INFLUÊNCIA DO TRATAMENTO ÁCIDO NA PERFORMANCE DE DIFERENTES LEVEDURAS INDUSTRIAIS NA FERMENTAÇÃO ALCÓOLICA

João Pedro Marques Souza¹, Thais Suzane Milesi Esteves^{2,3}, André Aguiar¹,
Teresa Cristina Zangirolami^{2,3}.

¹Universidade Federal de Itajubá/Instituto de Recursos Naturais, Av. BPS, 1303 – Prédio I3
- 37500-903 – Itajubá-MG, Brasil, d2017013581@unifei.edu.br, aguiar@unifei.edu.br.

²Universidade Federal de São Carlos/Departamento de Engenharia Química, Rod. Washington Luiz,
km 235 - SP 310, s/n -13565-905 - São Carlos-SP, Brasil, thais.milesi@ufscar.br,
teresacz@ufscar.br

³Universidade Federal de São Carlos/Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Rod.
Washington Luiz, km 235 - SP 310, s/n -13565-905 - São Carlos-SP, Brasil, thais.milesi@ufscar.br,
teresacz@ufscar.br

Resumo

A utilização de cepas industriais selecionadas de *Saccharomyces cerevisiae* vem se tornando popular nas usinas sucroalcooleiras brasileiras, uma vez que esta abordagem aumenta o rendimento fermentativo e gera economia de insumos. Adicionalmente, o tratamento ácido durante a etapa de ativação das leveduras selecionadas fornecidas na forma liofilizada pode auxiliar na vitalidade das células no início da fermentação. Neste contexto, o presente trabalho avaliou a produção de etanol a partir de melaço utilizando duas cepas de leveduras selecionadas (Pedra-2 e Fermel®), assim como a influência da aplicação do tratamento ácido na etapa de ativação das leveduras. Para isso, realizou-se cultivos em mini-reatores à 32°C contendo 150 g/L de açúcares redutores totais (ART) e 20-25 g/L de células (concentração inicial), submetidas ou não a um tratamento ácido com H₂SO₄ na etapa de ativação. A levedura Fermel se mostrou mais adequada para a fermentação em melaço e o tratamento ácido aumentou a produtividade de ambas as cepas estudadas em até 39%.

Palavras-chave: Tratamento ácido, *S. cerevisiae*, fermentação alcoólica.

Área do Conhecimento: Engenharia – Engenharia Química.

Introdução

A indústria sucroalcooleira desempenha um papel crucial na economia, na geração de empregos, na produção de energia sustentável e no desenvolvimento de tecnologias, tornando-se um setor estratégico para o Brasil em diversos aspectos (IEA, 2021). O Brasil é um dos maiores produtores mundiais de etanol a partir da cana-de-açúcar, produzindo em torno de 30 a 35 bilhões de litros de etanol por ano (CONAB, 2019), a depender de fatores como condições climáticas, preços de mercado, políticas governamentais e demanda interna e externa.

Tradicionalmente, o processo de produção de etanol no Brasil é realizado a partir da fermentação de caldo de cana de açúcar ou do melaço proveniente da produção de açúcar, em um processo operado em bateladas repetidas onde realiza-se o reciclo das células durante toda safra (LOPES et al., 2016). Neste sentido, o microorganismo utilizado é de grande importância já que a eficiência do processo dependerá da robustez da levedura utilizada. *Saccharomyces cerevisiae* é a principal levedura utilizada da produção de etanol, pois é versátil, converte eficientemente açúcares em álcool e é resistente a elevadas concentrações de etanol (PEREIRA, 2021). Nas últimas décadas, a utilização de cepas de *S. cerevisiae* selecionadas vem se tornando popular nas usinas, uma vez que esta técnica aumenta o rendimento fermentativo, gera maior economia com antiespumantes e diminui a quantidade de açúcar residual (ao contrário das leveduras selvagens) (LOPES et al., 2016). Atualmente as cepas de leveduras selecionadas respondem pela produção de aproximadamente 70 a 75% de todo etanol produzido no país (LOPES et. al., 2016).

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

Para preservar as leveduras e outros microorganismos de forma estável e prolongada, uma das técnicas mais comumente utilizada é a liofilização, a qual consiste em retirar água de um material por meio da sublimação (SANTOS, 2013). A remoção da água evita o crescimento bacteriano ou fúngico indesejado, tornando-se uma opção segura e eficiente para o armazenamento de culturas microbianas. Essa técnica também garante a viabilidade, estrutura e atividade biológica desses microorganismos por longos períodos de tempo (SANTOS, 2013; SILVA, 1992).

As leveduras selecionadas geralmente são fornecidas na forma liofilizada para as usinas, de forma que quando chegam ao destino, pode ser necessário um processo de ativação para restaurar a vitalidade das células, tornando-as novamente funcionais (Ramos et al., 2022). Por outro lado, o tratamento ácido é amplamente realizado no leite de levedura durante os ciclos de células nas usinas, a fim de promover a eliminação das células que ficaram com algum tipo de deficiência na parede celular e tornar assim, a população mais enriquecida em células viáveis e com maior qualidade (RODRIGUES, 2009). Os ácidos têm a capacidade de desestabilizar a estrutura das membranas celulares e alterar o pH do meio intracelular, o que pode levar à desnaturação de proteínas da membrana e à ruptura da estrutura lipídica, comprometendo a integridade da membrana, levando à lise celular e, consequentemente, à morte da célula (RODRIGUES, 2009). Este tratamento também auxilia no controle microbiológico do processo, reduzindo assim a concentração de contaminantes (FREIRIA, 2023).

Neste contexto, considerando a importância da cepa utilizada na produção de etanol e a contribuição do tratamento ácido na revitalização das células de *S. cerevisiae*, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a produção de etanol a partir de melaço utilizando duas cepas de leveduras selecionadas (Pedra-2 e Fermel®) e avaliar a influência da implementação do tratamento ácido das leveduras liofilizadas na etapa de ativação prévia à fermentação.

Metodologia

Hidratação e ativação das leveduras

Nos ensaios foram utilizadas as leveduras *S. cerevisiae* Pedra-2 (PE-2) e Fermel®, gentilmente cedidas em sua forma liofilizada pela empresa Fermentec Tecnologias em Açúcar e Alcool Ltda (Piracicaba, Brasil). A levedura PE-2 é uma das mais utilizadas nas destilarias do Brasil, a qual foi originalmente selecionada na Usina da Pedra. Essa cepa possui alta plasticidade genômica, facilitando a adaptação a diferentes processos de fermentação (LOPES et al., 2016). Já a Fermel® é uma levedura especialmente selecionada pela empresa Fermentec, indicada para fermentações de mostos a base de melaço e água ou melaço e caldo, com elevada tolerância a um alto teor alcoólico no meio (TOGNETE, 2017).

Todo o procedimento de hidratação e ativação foi adaptado de Mesquita (2021) e realizado igualmente para as duas cepas. Primeiramente, 40 g/L de células foram hidratadas em 125 mL de água pura em Erlenmeyer de 1 L, sob incubação a 150 rpm, 32°C por 30 min. Em seguida, realizou-se a ativação das leveduras pela adição ao Erlenmeyer de mais 125 mL de meio baseado em melaço de cana diluído contendo 60 g/L de ART, e manteve-se *overnight* a 150 rpm e 32°C. Após a ativação, as células foram recuperadas por centrifugação (10.000 rpm 5 min 4 °C) e utilizadas diretamente na fermentação ou submetidas ao tratamento ácido.

Tratamento ácido das leveduras

O tratamento ácido das leveduras centrifugadas foi realizado pela adição de solução ácida à suspensão de células para abaixar o pH a 2,0. A suspensão foi mantida nestas condições por 2 h a 160 rpm e 30°C (BASSI, 2016). Em seguida, as células foram centrifugadas (10.000 rpm, 5 min, 4 °C) e lavadas 3 vezes com água destilada, de modo a se garantir a remoção total do ácido utilizado. A solução ácida foi preparada adicionando-se ácido sulfúrico em água destilada até obtenção de pH 2,0, monitorando-se os valores de pH em pH-metro digital.

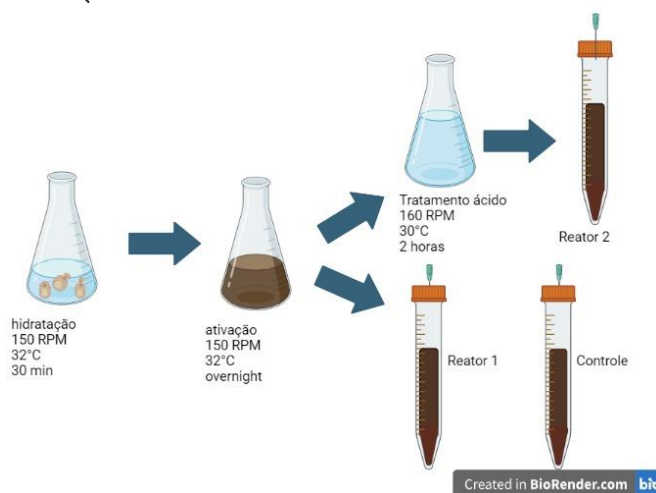
Ensaio fermentativo

Os cultivos foram realizados em mini-reatores de 15 mL dotados de saída de CO₂, conforme descritos por Mesquita (2021) e monitorados por meio da medida da liberação de massa de CO₂ na fermentação alcoólica, fazendo a pesagem dos mini-reatores periodicamente. Os experimentos foram

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

interrompidos quando ocorreu estabilização da massa dos mini-reatores, o que indicaria o fim da fermentação. Os cultivos foram realizados em meio composto por melaço diluído em água de forma a se obter aproximadamente 150 g/L de açúcares redutores totais (ART), com densidade óptica (DO₆₀₀) inicial de 40-50 (20 a 25 g/L de células) e mantido estaticamente à 32°C. Ao final dos cultivos, o meio foi centrifugado (3500 rpm x 10 min) e o sobrenadante utilizado para quantificar substratos e produtos por HPLC. A Figura 1 ilustra procedimento experimental empregados para os dois processos estudados.

Figura 1 – Processo de ativação e tratamento ácido com H₂SO₄ das leveduras liofilizadas estudadas.



Fonte: Autor (2023).

Métodos analíticos

A viabilidade celular foi medida de acordo com método colorimétrico de azul de metileno e contagem em câmara de Neubauer, conforme descrito por Mesquita (2021). A viabilidade celular foi obtida pela razão células vivas/células totais.

Para a quantificação de açúcares e produtos, as amostras foram tratadas para remoção dos sólidos insolúveis, sendo congeladas por pelo menos 24 h, descongeladas e centrifugadas duas vezes (2500 rpm, 4 °C por 5 min) conforme Demeke et al. (2013). Em seguida, as amostras foram filtradas em filtro 0,22 µm e analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em um cromatógrafo Waters e2695 dotado de detectores de índice de refração e UV-VIS (λ= 210 nm). Para quantificar etanol, glicerol, glicose, frutose e sacarose foi utilizada a coluna de exclusão iônica Rezex™ ROA-Organic acid H+, com H₂SO₄ 5 mmol/L como fase móvel com fluxo de 0,6 mL/min e temperatura de operação 65 °C (BATISTA et al., 2019).

Cálculos

Os parâmetros fermentativos dos ensaios realizados foram calculados de acordo com Shuler (2002), conforme as equações 1-3, onde $Y_{P/S}$ é o fator de rendimento de substrato em produto (g/g); P e S são as concentrações finais de produto e substrato (g/L), respectivamente; S_0 é a concentração inicial de substrato; P_0 é a concentração inicial de produto; η é a eficiência da fermentação (%); $Y_{P/S(\text{teórico})}$ é o máximo rendimento teórico em etanol obtido pela estequiometria (0,51 g/g); Q_p é a produtividade volumétrica (g/L/h) e t é o tempo de processo (h).

$$Y_{P/S} = \frac{P - P_0}{S_0 - S} \quad (1)$$

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

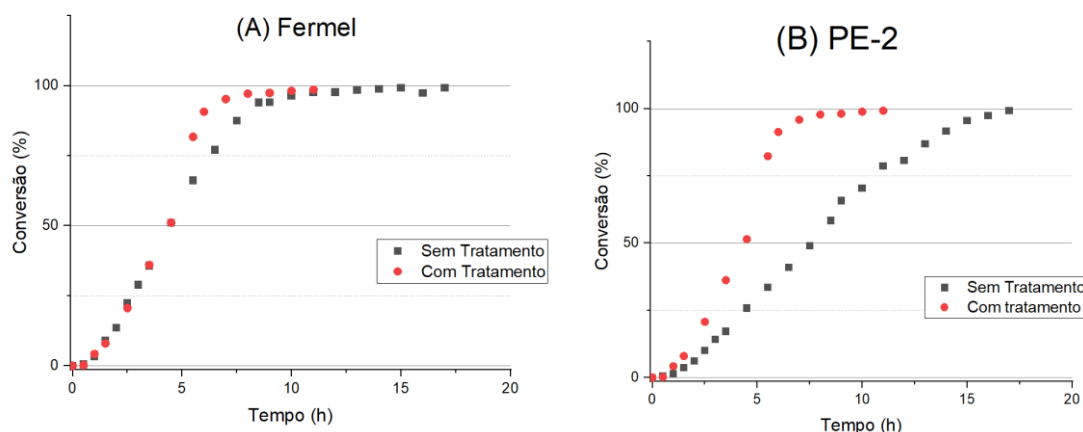
$$\eta = \frac{Y_{P/S}}{Y_{P/S}(\text{teórico})} 100 \quad (2)$$

$$Q_P = \frac{P - P_0}{t} \quad (3)$$

Resultados

Os ensaios fermentativos foram acompanhados por aproximadamente 17 horas e a conversão de ART pelo tempo é apresentada na Figura 2. Os parâmetros fermentativos observados em cada condição estudada são apresentados na Tabela 1.

Figura 2 – Conversão de ART ao longo do tempo de processo de fermentação alcoólica de melaço pelas leveduras Fermel (A) e PE-2 (B) com (reator 2) e sem (reator 1) realização de tratamento ácido na ativação. Condições: 35°C, 60 g/L de células e 150 g/L ART iniciais.



Fonte: Autor (2023).

Tabela 1- Comparação dos processos com e sem tratamento ácido, para as leveduras Fermel® e PE-2.

Parâmetro	Fermel®		PE-2	
Tratamento ácido	Não	Sim	Não	Sim
$Y_{P/S}$ (g/g)	0,47	0,42	0,47	0,45
η (%)	92,9	83,1	92	88
Q_P (g/L/h)	7,6	10,6	3,7	4,4
Tempo de processo (h)	8	6	17	6

Fonte: Autor (2023).

Discussão

A levedura Fermel® foi superior à PE-2 em ambas as condições estudadas, com uma produtividade em etanol duas vezes superior (Tabela 1). Tal comportamento evidencia a importância da utilização de

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

cepas selecionadas em processos industriais. O desempenho superior da Fermel® pode ser atribuído ao fato desta levedura ter sido especialmente desenvolvida para a fermentação de melaço, conforme relatado anteriormente (TOGNETE, 2017). Também é importante ressaltar que os resultados obtidos foram superiores aos observados por Mesquita (2021) com a levedura Fermel em meio mínimo, evidenciando a especificidade desta levedura para o melaço.

A realização do tratamento ácido da levedura na etapa de ativação foi benéfica para ambas as cepas estudadas, reduzindo significativamente o tempo de processo (Figura 1) e aumentando a produtividade da Fermel em 39% e da PE-2 em 19%. O tratamento provavelmente eliminou as células debilitadas, deixando apenas as células mais produtivas, de maneira a acentuar o consumo de açúcares por essa população, conforme também relatado por Rodrigues (2009). É importante salientar que em todos os ensaios os ART foram totalmente consumidos e não houve produção significativa de subprodutos como glicerol (dados não mostrados). Porém, apesar da melhora significativa, é válido ressaltar que o ácido sulfúrico utilizado possui elevado impacto ambiental, de forma que estudos futuros visando métodos e compostos alternativos para realizar o tratamento das leveduras se torna de grande relevância para o setor.

Conclusão

A levedura Fermel se destaca como uma levedura industrial selecionada com elevada especificidade e eficiência em meios baseados em melaço de cana. O tratamento ácido das leveduras liofilizadas foi eficiente em selecionar melhores células para o processo, aumentando significativamente a produtividade em etanol. Porém a realização do tratamento com compostos alternativos no futuro pode auxiliar na redução do impacto ambiental da produção de etanol a partir de melaço de cana.

Referências

BASSI, A.P.G. **Avaliação da contaminação conjunta de *Dekkera bruxellensis* e *Lactobacillus fermentum* sobre a fermentação alcoólica: efeito do substrato e formas de controle**. 2016. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

BATISTA, G. et al. Effect of severity factor on the hydrothermal pretreatment of sugarcane straw. **Bioresource Technology**, v. 275, p. 321–327, mar. 2019.

CONAB (Companhia Nacional do Abastecimento), **Produção total de etanol fica em milhões de litros – Ano 2019**. Nota disponível em <https://www.conab.gov.br/ultimas-noticias/3017-producao-total-de-etanol-deve-ficar-em-31-6-bilhoes-de-litros>.

DEMEKE, M. M. et al. Development of a D-xylose fermenting and inhibitor tolerant industrial *Saccharomyces cerevisiae* strain with high performance in lignocellulose hydrolysates using metabolic and evolutionary engineering. **Biotechnology for Biofuels**, v. 6, n. 1, p. 89, dez. 2013.

IEA (Instituto de Economia e Agrícola), **Alta na Produção e nas Exportações de Açúcar Marca a Safra 2020/21 de Cana - Ano 2021**. Nota disponível em <http://www.iea.sp.gov.br/out/TerTexto.php?codTexto=15925>.

FREIRIA, Beatriz Helena. **Levedura Selvagem: Comparação e análise de contaminação do processo fermentativo para obtenção de etanol de cana-de-açúcar**. 2023. 62 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia Química) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2023.

LOPES, M. L. et al. Ethanol production in Brazil: a bridge between science and industry. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, p. 64–76, dez. 2016.

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

MESQUITA, T. J. B. **Estruturas de controle de biorreator baseadas em fluxos metabólicos para fermentações micro-aeradas**. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2021.

PEREIRA, L. P. R. C. **Produção integrada de etanol 1G/2G utilizando meios industriais e leveduras recombinantes**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2021.

RAMOS, M. D. N. et al. **DEVELOPMENT OF A PROTOCOL FOR COMMERCIAL BAKER YEAST PROPAGATION AIMING ITS APPLICATION IN BIOPROCESSES**. In: International Conference Advances in renewable and clean energy Technologies, 2022, Online. International Conference Advances in renewable and clean energy Technologies, 2022.

RODRIGUES, R. S. **Produção de enzimas e avaliação do pré-tratamento ácido de biomassas para produção de bioetanol**. Dissertação (Mestrado em Bioquímica agrícola) - Programa de pós-graduação em Bioquímica agrícola, Universidade Federal de Viçosa, 2009.

SANTOS, D. M. **Viabilidade de leveduras durante o processo de liofilização utilizando diferentes crioprotetores**. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. 2013

SHULER, M. L., KARGI F., **Bioprocess engineering: basic concepts**. p. 276-277 2002.

SILVA, L. et al. **Liofilização de leveduras de interesse industrial: influência das condições de cultivo, velocidade de congelamento e meio protetor, na viabilidade celular após a liofilização**. Rev. microbiol, p. 117-22, 1992.

TOGNETE, M.H.P.B. **A influência da matéria-prima e diferentes cepas de levedura no rendimento fermentativo de um processo de obtenção de etanol**. 2017. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho".

Agradecimentos

Os autores agradecem à Fermentec Tecnologias em Açúcar e Alcool LTDA, Ipiranga Agroindustrial (Descalvado, SP), a FINEP (Financiadora de Estudos e Projetos) e ao Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovação e Comunicações- MCTIC, com recursos do FNDCT, pelo apoio financeiro (UNIFEI PROEX nº 23088.017409/2022-61 e UFSCar 14.708 – ProEx nº 012827/2022-18). Este estudo foi parcialmente financiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) – código 001 e pela FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) Processo 2016/10.636-8.