



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO JOÃO DEL-REI
CAMPUS ALTO PARAÓPEBA
ENGENHARIA DE BIOPROCESSOS

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL FERMENTATIVO DE
LEVEDURA SELVAGEM E *Saccharomyces cerevisiae* EM CALDO
DE CANA DE AÇÚCAR**

Camila Henriques de Paula Fernandes

Orientadora: Mariana Dias Moreira

Ouro Branco

Dezembro, 2017

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL FERMENTATIVO DE
LEVEDURA SELVAGEM E *Saccharomyces cerevisiae* EM CALDO
DE CANA DE AÇÚCAR**

Camila Henriques de Paula Fernandes

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
em cumprimento às exigências do Curso de
Bacharelado em Engenharia de Bioprocessos
da Universidade Federal de São João del Rei.

Orientadora: Mariana Dias Moreira

Ouro Branco
Dezembro, 2017

*Dedico este trabalho primeiramente a Deus, por
me dar forças para trilhar esse longo caminho e
a todos que contribuíram direta ou
indiretamente em minha formação acadêmica,
em especial minha família e amigos, os quais
estiveram sempre presentes.*

RESUMO

A fermentação é um dos mecanismos que permitem a degradação parcial de moléculas orgânicas complexas em moléculas mais simples, liberando certa quantidade de energia. É um processo biológico no qual os açúcares como a glicose, frutose e sacarose são convertidos em energia celular com produção de etanol e dióxido de carbono como resíduos metabólicos. O presente trabalho teve como objetivo comparar o potencial fermentativo de uma levedura selvagem isolada de frutos de manga com a levedura *Saccharomyces cerevisiae* (controle). O isolamento das leveduras foi realizado através da raspagem dos frutos de manga com *swab* e inoculados em placa contendo meio Ágar Sabouraud e incubados a 30° por 7 dias. Após o isolamento das leveduras, uma colônia foi selecionada para fermentação do caldo de cana em reatores. Antes da inoculação no mosto de cana, as células foram crescidas em 600mL de meio Yeast extract – Peptone – Dextrose (YPD). A fermentação foi conduzida em 4 diferentes reatores (reator 1 com levedura selvagem, reator 2 com levedura selvagem, microbiota da cana e *Saccharomyces cerevisiae* (fermento biológico)), cada um com volume final de 3 litros. A cana-de-açúcar foi colhida na região rural do Marimbondo, em Ouro Branco, Minas Gerais. As fermentações nos quatro biorreatores tiveram duração de 13 dias, quando houve estabilização do teor alcoólico. O monitoramento do processo fermentativo foi realizado através da medição do pH, °Brix e teor alcoólico final. O pH foi medido utilizando o pHmetro de bancada fazendo as devidas calibrações a cada medição. O °Brix e o teor alcoólico (°GL) foram medidos utilizando um refratômetro ocular. Pode-se concluir que as leveduras isoladas dos frutos de manga presentes no Monumento Natural de Itatiaia apresentam potencial de fermentação semelhante ao da *Saccharomyces cerevisiae*.

Palavras-chave: fermentação alcoólica, levedura selvagem, Monumento natural de Itatiaia, *Saccharomyces cerevisiae*.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	7
2.	OBJETIVOS.....	8
2.1	OBJETIVO GERAL	8
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	8
3.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	9
3.1.	MONUMENTO NATURAL DE ITATIAIA	9
3.2.	FUNGOS	10
3.3.	FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA.....	11
3.4.	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	12
3.5.	METABOLISMO DA LEVEDURA <i>S. cerevisiae</i>	13
4.	METODOLOGIA	14
4.1	AMOSTRAGEM E ISOLAMENTO DAS LEVEDURAS	14
4.2	PREPARAÇÃO DOS INÓCULOS	15
4.3	FERMENTAÇÃO DO CALDO DE CANA EM BIORREATORES	15
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	16
6.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	21
7.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	21

1. INTRODUÇÃO

As leveduras são microrganismos de interesse em processos fermentativos, devido à capacidade de sobreviverem sob condições aeróbicas e anaeróbicas. A fermentação alcoólica, também conhecida como fermentação de etanol, é a via anaeróbia realizada por leveduras, em que os açúcares simples são convertidos em etanol e dióxido de carbono. (SANTOS, 2014)

A fermentação é um processo natural que ocorre em determinados compostos ou elementos a partir da ação de diferentes agentes e que pode ser simplificado como um processo de oxidação incompleto. A fermentação é o processo que acontece em alguns alimentos, tais como o pão, as bebidas alcoólicas, o iogurte, etc., e que tem como principal agente a levedura ou diferentes compostos químicos que complementam sua ação. (OLIVER, 2016)

O processo de fermentação alcoólica caracteriza-se como uma via catabólica, na qual há degradação de moléculas de açúcar (glicose ou frutose), no interior da célula de microrganismos até a formação de etanol e CO₂ havendo liberação de energia química e térmica (OLIVER, 2016).

Leveduras, particularmente do gênero *Saccharomyces*, são normalmente a primeira escolha para fermentação alcoólica, devido à sua boa capacidade fermentativa, alta tolerância ao etanol e outros inibidores (formados tanto durante o pré-tratamento de matérias-primas quanto durante a fermentação). (KNAUF e KRAUS, 2006).

No entanto, é importante salientar que outros micro-organismos têm sido considerados para serem empregados na produção de etanol, como, por exemplo, a levedura *Pichia pastoris*, as bactérias *Zymomonas mobilis* e *Escherichia coli*, que têm sido alvos de programas de engenharia genética com o objetivo de melhorar o desempenho em termos de fermentação alcoólica (JARBOE et al., 2007; ROGERS et al., 2007).

Saccharomyces cerevisiae é, sem dúvidas, o mais importante micro-organismo explorado pela humanidade. Nenhum outro organismo tem sido mais intimamente associado com o progresso e bem-estar da espécie humana do que este gênero e suas espécies mais proximamente relacionadas. Está diretamente ligado a produção de produtos biotecnológicos como bebidas, alimentos, dentre outros. (DE SMIDT, PREEZ e ALBERTYN, 2008).

Os microrganismos são as entidades bióticas mais numerosas e antigas, capazes de colonizar com sucesso cada nicho ecológico possível do planeta. Sua presença

e atividade são essenciais para o funcionamento e equilíbrio dos ecossistemas. Além disso, os microrganismos representam uma importante fonte de recursos genéticos para o avanço biotecnológico e para o desenvolvimento econômico sustentável. Estratégias tradicionais de isolamento e seleção de microrganismos têm garantido o desenvolvimento de novos fármacos e aplicações nas áreas de saúde, agricultura, indústria e meio ambiente (OLIVEIRA, SETTE E FANTINATTI-GARBOGGINI, 2006).

Uma das maneiras de se extrair valor econômico da biodiversidade é a bioprospecção, termo que academicamente pode ser entendido como a busca sistemática por organismos, genes, enzimas, compostos, processos e partes provenientes de seres vivos, que tenham potencial econômico e, eventualmente, levam ao desenvolvimento de um produto. Pode-se destacar algumas de suas vantagens que seriam: propiciar conhecimento da biodiversidade, fornecer substâncias importantes ao homem, favorecer o crescimento econômico, gerar empregos, fazer um fundo para a conservação da área e melhorar o nível científico e o nível de vida do país com a utilização correta dos recursos naturais. (SACCARO JÚNIOR, 2011). Desta maneira, é possível encontrar diferentes leveduras com potencial fermentativo semelhante ou até melhor ao da *S.cerevisiae*.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar do potencial fermentativo de levedura selvagem e *Saccharomyces cerevisiae* em caldo de cana-de-açúcar.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Isolar de leveduras de frutos de manga obtidas no Monumento Natural de Itatiaia.
2. Avaliar do potencial fermentativo, em caldo de cana-de-açúcar, de leveduras selvagens isoladas de frutos de manga em biorreator.
3. Comparar do potencial fermentativo, em caldo de cana-de-açúcar, entre as leveduras selvagens e *Saccharomyces cerevisiae* em biorreator.
4. Avaliar do efeito da esterilização do caldo de cana sob a

fermentação nos quatro biorreatores.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. MONUMENTO NATURAL DE ITATIAIA

O Monumento Natural de Itatiaia dispõe de uma área com vasta biodiversidade (Figura 1), criado pelo Decreto nº 45.179, de 21 de setembro de 2009. Ele possui 3.216 ha e está localizado nos municípios de Ouro Branco e Ouro Preto, Minas Gerais.

Segundo nota técnica emitida pelo Instituto Estadual de Florestas (IEF), que descreve a Serra de Itatiaia, a criação da Unidade de Conservação se justifica por várias razões, como por exemplo, estruturas geológica e geomorfológica vulneráveis, já que, quando o sistema é submetido a pressão inadequada de uso e ocupação, resulta em áreas potenciais para a formação de processos erosivos que podem assorear as planícies fluviais.

O Monumento possui grande potencial para a recarga hídrica dos mananciais e das drenagens que existem na serra. Além da captação de água para o consumo humano na cidade, são abastecidos dois grandes reservatórios: Lago Soledade e Represa dos Taboões. É uma área de diversidade biológica importante a qual abriga endemismos de flora rupestre nos afloramentos rochosos e alta relevância na cadeia do espinhaço, demonstrando ainda grande riqueza de fauna e de outros elementos da flora. Possui beleza cênica e paisagística, sítios de importância histórica e um acervo de artefatos do ciclo do ouro, vocação turística pela localização, paisagem e natureza. Estima-se que o local possua grande diversidade de fungos.

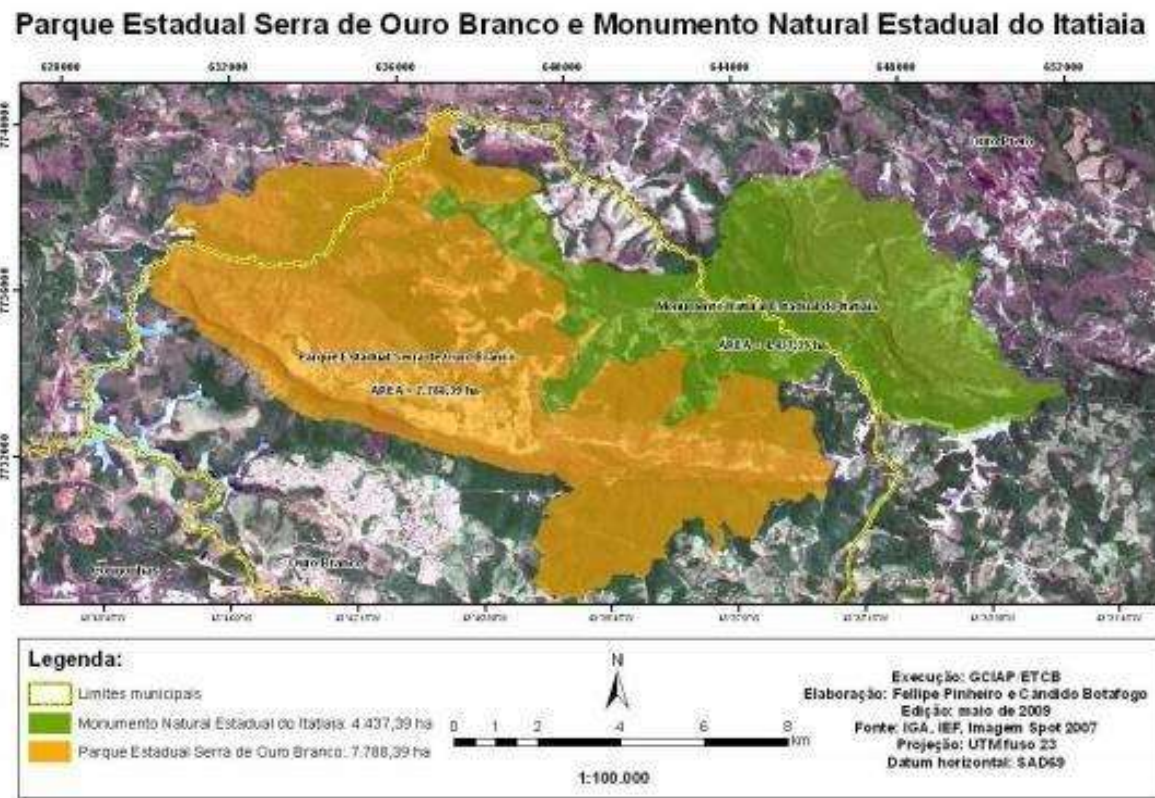


Figura 1: Mapa ilustrativo sinalizando a delimitação geográfica do Parque Estadual Serra do Ouro Branco (PESOB) e Monumento Natural Estadual de Itatiaia.

3.2. FUNGOS

Os fungos são organismos muito importantes, não somente devido ao seu papel vital no ecossistema, mas também por causa da sua influência sobre os humanos e em atividades relacionadas. São seres eucarióticos heterotróficos, altamente eficientes na degradação de uma ampla gama de substratos. Ocorrem em associação com outras espécies, por exemplo líquens ou micorrizas, como patógenos de animais e plantas ou como espécies de vida livre. Sua nutrição é feita por absorção, graças à presença de enzimas, as quais são produzidas por eles e utilizadas para a degradação dos nutrientes.

É difícil generalizar características dos fungos devido à diversidade ecológica, fisiológica e morfológica dentro do Reino Fungi, no qual são reconhecidos três grupos distintos: fungos filamentosos, leveduras e cogumelos, sendo os dois primeiros considerados fungos microscópicos e o último macroscópico.

Muitos dos fungos conhecidos tem um impacto negativo no bem estar humano como agentes que causam doenças em plantas, na biodeterioração e como patógenos de animais, tanto como produtores de micotoxinas quanto como causadores de micoses. Porém, entre as espécies microscópicas, os gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*

e *Saccharomyces* são os mais conhecidos por seu impacto positivo para os humanos (BENNETT, 1998). Entre os fungos filamentosos, algumas espécies são importantes industrialmente como *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Trichoderma reesei*, *Acremonium chrysogenum* e *Penicillium chrysogenum*. (RADZIO & KÜCK, 1997; IWASHITA, 2002).

Entre os fungos microscópicos, as leveduras são os micro-organismos mais intensamente utilizados em indústrias. Estas são cultivadas visando à obtenção das células propriamente ditas, seus componentes celulares e os produtos finais durante a fermentação alcoólica. As células de leveduras são também empregadas na produção de pães e como fontes de alimentos, vitaminas e outros fatores de crescimento. A fermentação em larga escala realizada por leveduras é responsável pela produção de álcool para uso industrial; porém, são mais conhecidas por seu papel na produção de bebidas alcoólicas (MADIGAN et al., 2004). Além disso, tem sido utilizadas desde o começo da década de 1980 para a produção heteróloga em larga escala de proteínas intra e extracelulares de humanos, animais e plantas (LIN CEREGHINO & CREGG, 1999). Devido à importância econômica dos processos biotecnológicos envolvendo a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, seja na panificação, na produção de cerveja, vinho e outras bebidas alcoólicas ou ainda na produção de um combustível alternativo e renovável (bioetanol), este micro-organismo pode ser considerado o eucarioto mais estudado e cujo metabolismo é o mais conhecido.

3.3. FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA

Em termos gerais, a fermentação implica na utilização de microrganismos na transformação da matéria orgânica catalisada por enzimas. Hoje em dia, diversos produtos utilizados nas indústrias químicas, farmacêuticas e de alimentos são obtidos por processos fermentativos. Estes produtos podem ser gerados pelo metabolismo primário (ex: Etanol) ou secundário (Ex: Antibióticos) do microrganismo cultivado e ao lado da produção de biomassa, enzimas e proteínas em geral, eles são os responsáveis pela evolução tecnológica e desenvolvimento das pesquisas na área (WARD, 1991).

As fermentações podem ser conduzidas por processos descontínuos, descontínuo-alimentados ou contínuos, bem como, por variações destes processos. (WARD, 1991; BORZANI, 2001). Independentemente do modo de operação utilizado, o desenvolvimento de processos fermentativos para a produção de enzimas por

microrganismos tornou viável a obtenção de novos sistemas enzimáticos (PARK, 1975).

Diversos são os estudos com a finalidade de aprimorar e otimizar os processos fermentativos, objetivando a produção de enzimas (PESSOA- JÚNIOR et al., 1996; ABRAHÃO-NETO et al., 1996). No entanto, a real aplicação industrial de qualquer enzima só é viável se as condições utilizadas no processo fermentativo forem favoráveis e se a enzima produzida em larga escala apresentar os mesmos níveis, de atividade e produtividade obtidas em escala de bancada.

Segundo TACIRO (1992), a ampliação de escala de um processo fermentativo, para que este se torne viável industrialmente, deverá manter as condições do processo uniformes para qualquer volume de operação.

No entanto, para tornar viável essa ampliação de escala é indispensável primeiro definir o microrganismo a ser empregado, o meio de cultivo e as condições de agitação e aeração mais adequadas ao processo.

3.4. *Saccharomyces cerevisiae*

Saccharomyces cerevisiae destaca-se como a espécie mais explorada comercialmente entre as leveduras e apresenta grande emprego em nosso país, notadamente, na indústria de produção de etanol.

As leveduras e, em particular, a *Saccharomyces cerevisiae*, são microrganismos aos quais nós temos algumas das mais antigas referências bibliográficas. Desde a Antiguidade, *Saccharomyces cerevisiae* vem sendo utilizada em processos fermentativos diversos, como na panificação, cervejaria e fabricação de vinho e, seu uso foi possível desde então, devido à sua capacidade de converter rapidamente açúcares em etanol, ácidos orgânicos e gás carbônico (WARD, 1991).

A produção de etanol pela fermentação do caldo de cana e melaço tem dado uma grande contribuição para o programa energético brasileiro. O uso de *Saccharomyces cerevisiae* como uma fonte na obtenção de enzimas mostra-se uma alternativa viável e bem prática devido à grande manipulação desta cepa em plantas industriais (SILVA et al., 2001).

Segundo ENTIAN (1997), a *Saccharomyces cerevisiae* tornou-se um microrganismo modelo em genética e biologia molecular, culminando com o seu completo sequenciamento. *Saccharomyces cerevisiae* é uma levedura ascomicética e anaeróbia facultativa. Uma levedura típica, consta de células pequenas, ovais e apresenta uma reprodução vegetativa por brotamento. O ciclo de vida de leveduras do tipo *Saccharomyces cerevisiae* inclui duas fases: haplóide e diplóide. Quando células

diplóides são colocadas em um meio de esporulação, o crescimento vegetativo se encerra e as células começam a formar esporos de forma que cada célula diplóide forme um asco, geralmente, com quatro esporos (BYERS,1981).

A levedura é uma fonte biológica para a obtenção de produtos de interesse na indústria farmacêutica e de alimentos, como as enzimas invertase, hexoquinase, glicose-6-fosfato desidrogenase, glicose-oxidase, proteases e outras, além da possível utilização de sua própria biomassa como fonte de proteínas na alimentação animal e humana (PESSOA -JÚNIOR et al., 1996; SILVA, 1998).

Vários são os fatores que influenciam o cultivo de *Saccharomyces cerevisiae*. O crescimento celular depende de fatores como temperatura, pH, componentes do meio de cultura e disponibilidade de oxigênio para a célula (SILVA et al., 2001).

3.5. METABOLISMO DA LEVEDURA *S. cerevisiae*

Segundo FLORES et al. (2000), açúcares são utilizados por quase todas as leveduras conhecidas e todas têm em comum no seu metabolismo a conversão da Glicose-6-Fosfato (ou Frutose-6-Fosfato) em Piruvato através de uma Via Glicolítica comum. O destino metabólico do Piruvato é que será diferenciado de acordo com a espécie de levedura e as condições de cultivo.

A Glicólise e o Ciclo dos Ácidos Tricarboxílicos são as principais vias metabólicas para a *Saccharomyces cerevisiae* e são responsáveis diretos pela produção de energia e redução dos equivalentes na forma de ATP, NADH e NADPH, além da geração de grande parte dos compostos precursores necessários à biossíntese de biomoléculas.

As membranas celulares não são livremente permeáveis a todos os componentes que possam estar presentes no meio. O primeiro passo no metabolismo das hexoses é o transporte de carboidratos, exceto nos casos onde um di ou trissacarídeo é hidrolisado fora da célula. Este transporte através da membrana é conduzido por transportadores específicos chamados permeases e para a *Saccharomyces cerevisiae* este transporte consiste de uma difusão facilitada no caso de meios contendo glicose, frutose ou manose.

O metabolismo de dissacarídeos é precedido pela hidrólise para outros monômeros e dependendo da espécie de levedura e da natureza do açúcar a ser metabolizado, esta hidrólise acontece fora da membrana celular, no espaço

periplasmático, ou dentro da célula através do transporte deste dissacarídeo. No caso de *Saccharomyces cerevisiae* esta hidrólise é feita em sua maior parte pela invertase extracelular repressível pela glicose.

A hexose intracelular entra na Via Glicolítica após uma etapa inicial de fosforilação, onde duas hexoquinases são responsáveis pela fosforilação da glicose, frutose e manose enquanto que uma glicoquinase é responsável pela fosforilação de glicose e manose, que são obtidos a partir da transcrição dos genes HXK1 e HXK2 (Hexoquinases) e GLK1 (Glucoquinase), cuja expressão é controlada pela concentração de glicose. As hexoquinases também são reprimidas pela presença de Trealose-6-Fosfato, o que a transforma em uma importante ferramenta de controle da glicólise em *Saccharomyces cerevisiae*. A Fosfofrutoquinase é considerada o “gargalo” da Via Glicolítica, pois, a superprodução de genes que codificam a fosfofrutoquinase não aumenta a fermentação em *Saccharomyces cerevisiae*.

Durante o crescimento em aerobiose, as enzimas NADH Desidrogenases mitocondriais participam da reoxidação em NAD⁺. A reoxidação do NADH pela via respiratória é a principal fonte de energia para as células com um metabolismo respiratório. Esta reoxidação está acoplada pela produção de ATP no processo conhecido como Fosforilação Oxidativa.

Em *Saccharomyces cerevisiae* existem quatro genes que codificam isoenzimas de álcool-desidrogenases, sendo que o gene ADH1 codifica a isoenzima durante a fermentação e é induzida pela glicose enquanto que o gene ADH2 codifica a isoenzima que está ligada à utilização do etanol como fonte de carbono, sendo esta, repressível pela presença de glicose.

4. METODOLOGIA

4.1 AMOSTRAGEM E ISOLAMENTO DAS LEVEDURAS

As leveduras foram coletadas de frutos de manga do monumento natural de Itatiaia, em Itatiaia (Minas Gerais). A amostragem foi realizada através da raspagem de superfícies de quatro frutos de manga (*Mangifera indica*) com *swabs*. As amostras coletas foram semeadas em placas de Petri contendo meio sólido Ágar Sabouraud 2% (ágar bacteriológico: 17 g L⁻¹; glicose: 20 g L⁻¹; peptona: 10 g L⁻¹; pH = 5,6). As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 30°C por 7 dias.

Para evitar contaminações e comprometimento dos materiais coletados, os mesmos foram armazenados em geladeira a 4-7°C até a incubação em estufa no laboratório.

Após o crescimento, as colônias de leveduras foram isoladas e replicadas em placa contendo o mesmo meio e em seguida, foram incubadas em estufa bacteriológica sob as mesmas condições descritas acima. Em seguida, foram preparadas lâminas, para confirmação em microscopia, da presença de leveduras.

Dentre as diferentes colônias de leveduras crescidas em placa, apenas uma foi selecionada para a segunda parte do trabalho (fermentação em biorreatores).

Os experimentos foram realizados no laboratório de microbiologia, no Campus Alto Paraopeba da Universidade Federal de São João del Rei.

4.2 PREPARAÇÃO DOS INÓCULOS

Os inóculos da levedura selvagem foram preparados utilizando uma alçada padronizada da colônia e adicionados em 600ml de meio YPD, para um volume final de 3 litros em cada biorreator de 7 litros.

As células de *S. cerevisiae* (controle), 20g de fermento em pó, foram reativadas em 300 ml de água morna (30°C).

A fim de conhecer a cinética de crescimento da levedura selvagem, foi utilizado um segundo inóculo de 100ml para retirada das amostras para leitura de absorbância, com comprimento de onda de 600nm, e posterior construção da curva de crescimento. O frasco Erlenmeyer com o inóculo foi incubado em *Shaker* durante 25 horas com temperatura de 37°C e 180 RPM. As amostras foram retiradas de, aproximadamente, 3 em 3 horas.

4.3 FERMENTAÇÃO DO CALDO DE CANA EM BIORREACTORES

A cana-de-açúcar foi colhida na região rural do Marimbondo, em Ouro Branco, Minas Gerais. A mesma foi colhida inteira através do corte manual e lavada. A extração do caldo foi realizada através da moagem da cana. Parte do caldo de cana-de-açúcar obtido foi esterilizado em auto clave a 120°C por 20 minutos.

As fermentações foram conduzidas em batelada utilizando quatro biorreatores de bancada, contendo 600ml do inóculo e 2,4 litros de caldo de cana-de-

açúcar, totalizando 3 L de volume final. As células foram centrifugadas e lavadas duas vezes em água destilada estéril antes da inoculação no caldo de cana.

O reator 1 foi inoculado com a levedura selvagem e caldo da cana-de-açúcar estéril; o reator 2, com a levedura selvagem e caldo da cana-de-açúcar não estéril; o reator 3, contendo somente o caldo da cana-de-açúcar não estéril, sem inoculação; e o reator 4, com caldo da cana-de-açúcar estéril e *Saccharomyces cerevisiae*, obtida do fermento comercial *Fleischmann* (Figura 2).

As fermentações nos quatro biorreatores tiveram duração de 13 dias, em temperatura ambiente, quando houve estabilização do teor alcoólico. O monitoramento do processo fermentativo foi realizado através da medição do pH, °Brix e teor alcoólico final.

O pH foi medido utilizando o pHmetro de bancada fazendo as devidas calibrações a cada medição. O °Brix e o teor alcoólico (°GL) foram medidos utilizando um refratômetro ocular.



Figura 2: Reatores construídos: Reator 1: levedura selvagem com caldo da cana-de-açúcar estéril; reator 2: levedura selvagem com o caldo da cana-de-açúcar não estéril; reator 3: caldo da cana-de-açúcar não estéril, sem inoculação; reator 4: caldo da cana-de-açúcar estéril e *Saccharomyces cerevisiae*.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As amostras foram retiradas de frutos de mangas verdes em perfeito estado (Figura 3). Após a incubação, observou-se a presença de quatro colônias bem isoladas com aspecto cremoso (Figura 4). As leveduras morfologia esférica (Figura 5).



Figura 3: Frutos utilizados para a coleta da amostra.



Figura 4: Colônia de leveduras.

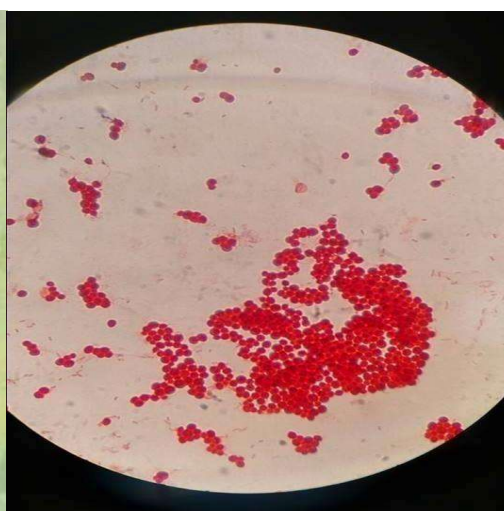


Figura 5: Leveduras observadas na microscopia.

A colônia de levedura selvagem selecionada foi adicionada ao meio líquido e foi obtida a curva (Figura 6), com os valores de absorbância em função do tempo, com o objetivo de conhecer a cinética de crescimento.

É possível observar no gráfico o comportamento do crescimento microbiano, com a ocorrência das fases: lag, log, estacionária e declínio. A fase lag teve duração de 6 horas, o crescimento da população foi observado após 6 horas de cultivo e durou 17 horas, a fase estacionária durou 2 horas, ocorrendo assim, posteriormente, a fase de morte celular.

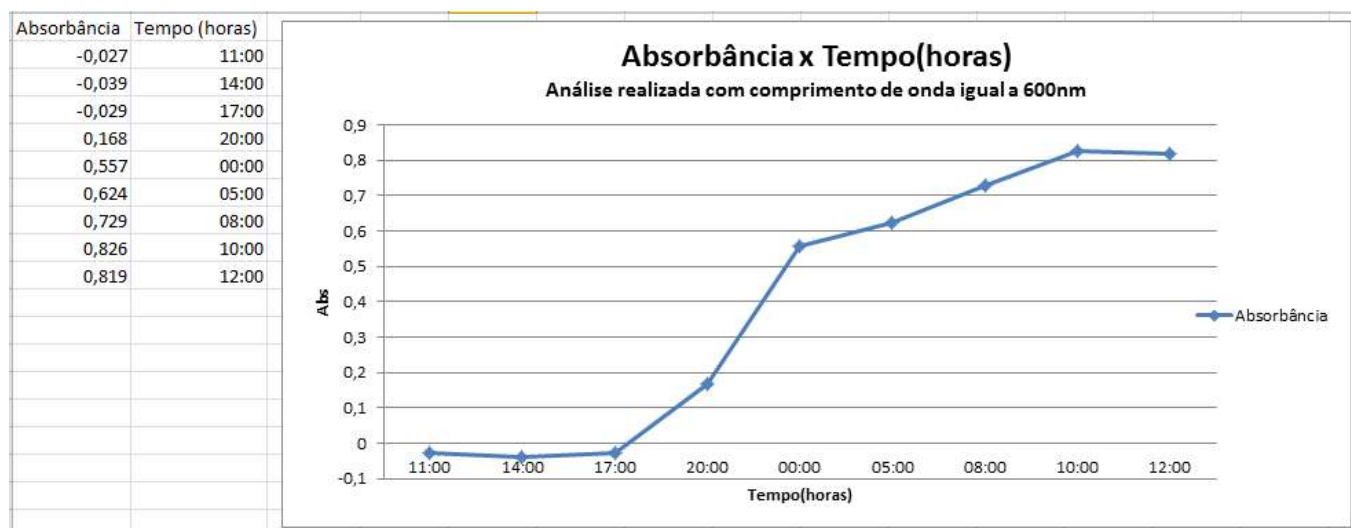


Figura 6: Curva com valores da absorbância em função do tempo a fim de observar o comportamento do crescimento microbiano.

Após inocular as leveduras no caldo de cana-de-açúcar, foram obtidos parâmetros que mostram o acompanhamento do perfil fermentativo: pH, grau Brix e teor alcoólico, como pode ser observado na figura 7. O controle corresponde ao caldo de cana-de-açúcar com o fermento biológico (*S. cerevisiae*); o biorreator 1 se trata do caldo contendo levedura selvagem com o caldo de cana estéril; o biorreator 2 se trata do caldo de cana não estéril contendo levedura selvagem; e, por fim, a microbiota se trata do caldo de cana contendo somente a levedura proveniente da microbiota da própria cana.

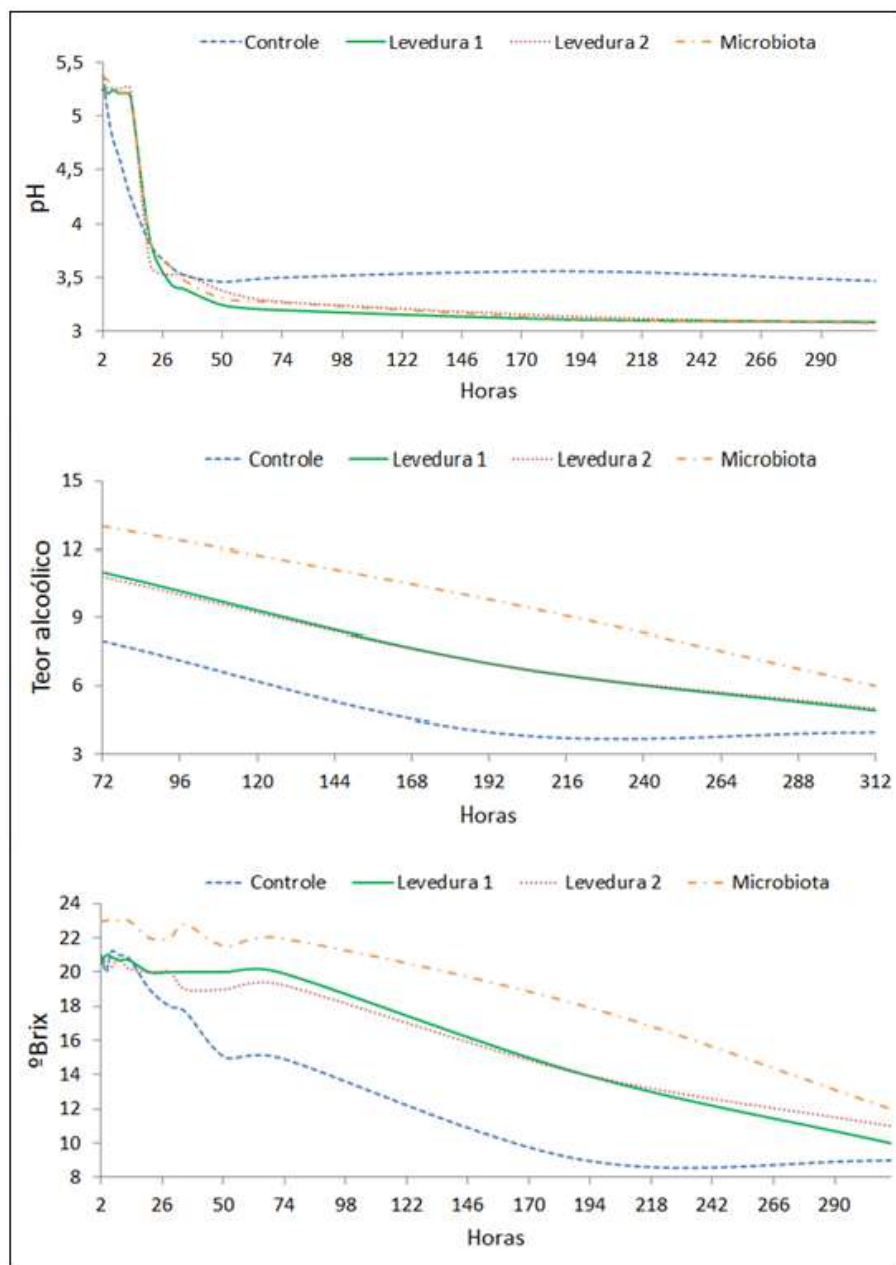


Figura 7: Gráficos dos resultados obtidos de pH, teor alcoólico e °Brix em função do tempo para acompanhamento do perfil fermentativo. A levedura 1 se trata do caldo contendo levedura selvagem com o caldo de cana esteril; a levedura 2 se trata do caldo de cana não esteril contendo levedura selvagem; e, por fim, a microbiota se trata do caldo de cana contendo somente a levedura proveniente da microbiota da própria cana.

Observou-se que os valores de pH sofreram uma redução geral, de 5,3 para 3,2, aproximadamente, até se manter constante. O decréscimo do pH e consequentemente, o aumento da acidez do meio de fermentação podem estar associados à formação de ácidos orgânicos, principalmente os ácidos acético, láctico, succínico (DUARTE ET AL., 2010).

O pH do caldo de cana em estágio adequado de maturação é da ordem de

5,0-5,5. Como as leveduras são microrganismos acidófilos, o pH ótimo para a fermentação é da ordem de 4,5, enquanto para a multiplicação das células, entre 5,0 e 6,0. Valores inferiores favorecem o estabelecimento das contaminações, enquanto valores muito elevados promovem a debilidade e morte do fermento (BECKER, 2009). Sendo assim, a redução do pH indicou uma possível contaminação bacteriana nos biorreatores.

Alguns fatores podem afetar o rendimento da fermentação, ou seja, ineficiência na conversão do açúcar em álcool. Dentre esses fatores pode-se destacar fatores físicos, como temperatura e pressão osmótica; fatores químicos, como pH, oxigenação, nutrientes minerais e orgânicos e inibidores; e fatores microbiológicos, como espécie, linhagem e concentração da levedura. Outro fator que pode afetar a fermentação é a presença de microrganismos contaminantes (SOARES, 2014).

Geralmente as quedas na eficiência fermentativa decorrem de uma alteração na estequiometria do processo, levando à maior formação de produtos secundários (especialmente glicerol e ácidos orgânicos) e biomassa (SOARES, 2014).

Após 72 horas de fermentação, os valores de teor alcoólico nos 4 biorreatores variaram de 8 a 13 °GL, no Controle e Microbiota, respectivamente. Com o passar dos dias, conforme observado na Figura 7, os valores sofreram uma redução. Sendo que o biorreator contendo a Microbiota foi o que apresentou maior redução (53,84 %) do teor alcoólico no final de 13 dias. Essa redução do teor alcoólico pode ter ocorrido devido a presença de contaminantes no meio, que produzem fermentações indesejáveis, das quais resultam substâncias estranhas à fermentação alcoólica. Estas fermentações levam à diminuição do rendimento da produção de álcool, além de produzirem substâncias indesejáveis. (ALCARDE, 2015). Duarte et al. (2010) relataram que concentrações elevadas de ácido acético estão associada com a presença de leveduras não *Saccharomyces cerevisiae* em fermentações espontâneas que normalmente produzem grandes quantidades de ácido acético, sugerindo assim, uma possível contaminação do caldo de fermentação no decorrer do processo. Ainda de acordo com esses autores, o ácido acético em concentrações acima de 0.7 g.L⁻¹ confere sabor e odor de vinagre a bebida, além de reduzir o rendimento de etanol. Outro possível composto presente nas fermentações é o ácido lático, principal produto do metabolismo de bactérias do ácido lático (BAL), cuja presença em processos de fermentação alcoólica é indesejada, pois está associada também a menores rendimentos de etanol.

Observando os resultados do °Brix em relação ao tempo, o que sofreu

redução mais rapidamente foi da levedura controle (*Saccharomyces cerevisiae*), cujo o consumo de açúcar representou 57,14 % ao final de 13 dias. Já os biorreatores 2 e o com a microbiota da própria cana, o consumo de açúcar foi mais lento, 47,11% e 47,82 %, respectivamente.

Observa-se a redução do °Brix com o passar do tempo, revelando o consumo dos açúcares pelos microrganismos, e possivelmente a produção de álcool.

Os reatores 1 e 2 revelaram um comportamento da fermentação semelhante ao controle, ou seja, foram capazes de reduzir o °Brix do caldo fermentado e produzir etanol. No entanto apresentaram menor rendimento com relação a *Saccharomyces cerevisiae*.

À medida que ocorre a fermentação, o ° Brix vai reduzindo, sendo que, em um determinado momento, as bolhas de gás carbônico deixam de ser liberadas, indicando que o °Brix se tornou igual a zero, isto é, a fermentação foi concluída. Em condições normais, a fermentação será completada em um período de 24 a 36 horas. As fermentações conduzidas neste trabalho tiveram duração de 13 dias, o que pode ter contribuído para possíveis contaminações nos mostos e consequentemente aos baixos teores alcoólicos observados.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados de pH apresentaram uma grande redução, indicando uma possível contaminação bacteriana nos biorreatores, o que justifica também a redução do teor alcoólico.

As leveduras se adaptaram bem no mosto de cana, foram capazes de consumir açúcar e detectar a presença de etanol. Essas evidências indicam que as mesmas possuem potencial para fermentação.

No entanto, estudos mais criteriosos poderiam identificar o gênero que pertencem para saber se são mais ou menos eficientes que a *Saccharomyces cerevisiae*.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

DUARTE, W. F.; DIAS, D. R.; OLIVEIRA, J. M.; TEIXEIRA, J. A.;
ALMEIDA E SILVA, J. B.; SCHWAN, R. F. Characterization of different fruit wines

made from cacao, cupuassu, gabirola, jaboticaba and umbu. LWT - Food Sci. and Technol., v. 43, p. 1564-1572, 2010.

JUNQUEIRA, L.C. CARNEIRO, José. *Biologia Celular e Molecular*. São Paulo: Guanabara KOOGAN, 2004. 350p.

LIMA, U. de A. *Tecnologia das fermentações*. São Paulo: Editora Edgard Blücher, 1975. v. 1

PASCHOAL, G.R. Alimentos produzidos por fermentação. In: *Fermentações industriais & transformações microbianas no solo*. São Paulo: Sociedade Brasileira de Microbiologia, 1980.

OLIVEIRA, M. C. R. Avaliação do processo de fermentação alcoólica de suco de maçã obtido por liquefação enzimática. 2006. 92 p. Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2006.

LIMA, U. A. *Aguardente: fabricação em pequenas destilarias*. 1ª ed. Piracicaba: Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz, 1999. 187 p.

TEIXEIRA, CIRO G. AND SALATI, ANESÍADES. Fermentação da cana de açúcar: Influência da estirpe de fermento sobre o rendimento alcoólico. *Bragantia*, Mar 1952, vol.12, no.1-3, p.95-96. ISSN 0006-8705

TOLEDO, ODETTE ZARDETTO DE AND TEIXEIRA, CYRO G. O emprego de leveduras selecionadas na fermentação do vinho.

AZEVEDO, C.M.A.; VIANNA, L.P.; BRITO, M.C.W. Bioprospecção: Mecanismos para Proteção e Acesso à Biodiversidade. *PHORMA Cosmetologia* - n.16 - set.out.1998.

KNAUF, M.; KRAUS, K. (2006). Specific yeasts developed for modern ethanol production. *Sugar Industry*, v. 131, p. 753-758.

OLIVEIRA, V.M.; SETTE, L.D; FANTINATTI-GARBOGGINI, F.F. Preservação e prospecção de recursos microbianos. Revista Interdisciplinar dos Centros e Núcleos da Unicamp, v.7, p. 1-19,2006.

SACCARO JUNIOR, N. L. Desafios da bioprospecção no Brasil. Brasília: Ipea, 2011a. (Texto para Discussão, n. 1.569).

EDWARD C. STEWART AND MILTON J. BENNETT, American Cultural Patterns: A Cross-Cultural Perspective, rev. ed. (Yarmouth, ME: Intercultural Press, 1991)

MANDIGAN, M. T.; MARTINKO, J.M; PARKER, J. Evolução e sistemática microbianas. In: MADIGAN, M, T; MARTINKO, J. M; PARKER, J. (Ed.) Microbiologia de Brock. São Paulo: Pretice Hall, 2004. P . 302-330

SERRANO, A, GP LIN CEREGHINO, P FERRER, JM CREGG, AND F VALERO. 2001. Overexpression of a *Rhizopus oryzae* lipase in *Pichia pastoris* strains containing multiple copies of the target gene. In Recombinant Protein Production with Prokaryotic and Eukaryotic Cells-a Comparative View on Host Physiology, O-W. Merten et al. (Ed.)

PRÄVE, P, FAUST, U, SITTIG, W, & SUKATSCH, DA, *Fundamentals of Biotechnology*, VCH, Germany, 1987.

WARD, OP, *Biotecnologia de la Fermentacion*, Acríbia, Espanha, 1989.

SILVA, D.P.; PESSOA Jr., A.; ROBERTO, I.C.; VITOLO, M. Effect of agitation and aeration on the production of hexokinase by *Saccharomyces cerevisiae*. Appl. Biochem. Biotechnol. Vol 91/93, p. 605-613, 2001.

SILVA I. R., BITTENCOURT A.C.S.P., DOMINGUEZ J.M.L, MARTIN L. 2001.

RANDEZ-GIL, F., N. BOJUNGA, M. PROFT, AND K. D. ENTIAN. 1997. Glucose derepression of gluconeogenic enzymes in *Saccharomyces cerevisiae* correlates with phosphorylation of the gene activator Cat8p. Mol. Cell. Biol.

FLORES, G.V., DUAN, H., YAN, H., NAGARAJ, R., FU, W., ZOU, Y., NOLL,