DETERMINAÇÃO DA VIABILIDADE DE CÉLULAS DE LEVEDURA APÓS O TRATAMENTO COM ÁCIDO SULFÚRICO

SANTOS, Estefânia Caroline Oliveira[1]
FRANCISCO, Bruno Henrique[2]

RESUMO:

A levedura do tipo *Saccharomyces cerevisiae* são microrganismos utilizados na fermentação alcoólica em nível industrial devido ao seu alto rendimento. O substrato utilizado na fermentação é a sacarose, glicose e frutose presentes no caldo da cana de açúcar. Para que o processo fermentativo se torne rentável, é necessário realizar o reciclo do fermento para que o mesmo seja reutilizado no processo novamente. O reciclo do fermento exige um tratamento específico utilizando alguns produtos, sendo um deles o ácido sulfúrico que irá atuar diminuindo a quantidade de bactérias presentes no meio. O tratamento ácido quando realizado com valores de pH baixos, pode ocasionar a morte das células de leveduras diminuindo assim a viabilidade do fermento. Podemos concluir que tratamentos com ácido sulfúrico realizados com valores de pH abaixo de 2,6 por um tempo de duas horas causam quedas mais acentuadas na viabilidade do que com valores de pH mais altos para o mesmo período de tratamento.

PALAVRAS-CHAVE:

Ácido Sulfúrico; Viabilidade; *Saccharomyces cerevisiae*;

[1]SANTOS, Estefânia Caroline Oliveira. Estudante de Licenciatura de Ciências Biológicas no FIRA (Faculdades Integradas Regionais de Avaré) Avaré-SP, 2018, e-mail: fany10@outlook.com
[2]FRANCISCO, Bruno Henrique – Professor Especialista do departamento de Ciências Biológicas no FIRA(Faculdades Integradas Regionais de Avaré). 18700 – 902. Avaré – São Paulo.

1. INTRODUÇÃO

O Brasil possui grande destaque mundial em relação à produção de etanol, sendo um dos países que mais produz este biocombustível no mundo, desta forma, este produto é de grande importância para a economia tendo grande comercio de exportação e consumo próprio (KOHLHEPPl.,2010).

Em 1975 o programa Pró-Álcool intensificou a produção de etanol no Brasil, desta forma, o número de unidades produtoras aumentou com o objetivo de atender a demanda de etanol nacional (KOHLHEPPl.,2010).

Dentro do processo de produção de etanol, a fermentação é a etapa que possui a menor eficiência, podendo variar entre 85% até 92%. Existem vários fatores que afetam diretamente a eficiência da fermentação como pH do meio fermentativo, pH do tratamento do fermento, concentração de substrato, tipo de levedura, presença de bactérias, temperatura do meio e outros (REIS, 2016).

A fermentação alcoólica é um processo biológico no qual o dissacarídeo, como a sacarose, ou os monossacarídeos, como a glicose e frutose, são convertidos em etanol, dióxido de carbono e energia celular. Podemos afirmar que o objetivo principal deste processo é produzir energia para a célula e o dióxido de carbono (CO2) e o etanol podem ser considerados como resíduos metabólicos (SANTIN, 1996).

A fermentação alcoólica de nível industrial utiliza a levedura *Saccharomyces cerevisiae* no processo de conversão dos açúcares em etanol. O processo de fermentação ocorre através de reciclo de levedura, em outras palavras, após a levedura (fermento) fermentar o substrato disponível no meio, a mesma é separada e reutilizada no processo novamente (SANTIN, 1996).

O mosto utilizado na fermentação em nível industrial é composto por caldo ou melaço derivados do caldo da cana de açúcar. O mosto deve ser tratado de maneira a eliminar os microrganismos contaminantes do meio, pois os mesmos causam baixo rendimento fermentativo (REIS, 2016).

As leveduras utilizadas no processo fermentativo são do tipo selecionado, ou seja, são leveduras que apresentaram ótimos rendimentos e foram separadas através de análise de cariotipagem. Além das leveduras selecionadas que são as mais indicadas, existem as leveduras nativas que chegam até o meio fermentativo através do caldo da cana, porém apresentam rendimentos satisfatórios e por fim, existem as leveduras selvagens que chegam no meio fermentativo e apresentam rendimentos insatisfatórios (SANTIN, 1996).

A fermentação alcoólica com reciclo de fermento contém vários processos de tratamento que ajudam a manter o meio livre de bactérias além de manter a viabilidade do fermento, em outras palavras, o tratamento garante que no meio contenha uma quantidade de células vivas suficientes para manter o rendimento fermentativo adequado (NOBRE, 2005)

Entre os tratamentos que são realizados no fermento, a aplicação de ácido sulfúrico é um método utilizado em todas as unidades produtoras de etanol. A adição de ácido sulfúrico no fermento até atingir valores de pH entre 2,4 e 3,0 durante o tratamento ajuda a reduzir a contaminação bacteriana além de outros benefícios. É importante ressaltar que a queda do pH durante o tratamento com ácido sulfúrico afeta diretamente a viabilidade celular, diante disto, quanto menor o pH do meio, maior será a quantidade de células mortas após o tratamento (MELO, 2006).

A utilização do ácido durante o tratamento das células de levedura é praticamente imprescindível, pois é uma maneira eficiente de combater a contaminação. No entanto, algumas células morrem durante este processo devido ao estresse provocado pelo pH reduzido (MELO, 2006). O tratamento com ácido sulfúrico atua como um fator de seleção da população de levedura, pois apenas as células que melhor se desenvolvem em meios com pH baixos irão sobreviver dentro do processo (CORAÇA, 2012)

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho é avaliar a viabilidade celular após o tratamento do fermento com ácido sulfúrico em diferentes faixas de pH com tempo de tratamento estabelecido em duas horas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no laboratório de uma usina produtora de etanol situada no município de Cerqueira César, SP.

A levedura utilizada foi a *Saccharomyces cerevisiae* do tipo selecionada, comercializada como PE-02, uma das mais utilizadas hoje no Brasil entre as usinas produtoras de etanol. É importante ressaltar que não foi realizado análise de cariotipagem para ter a certeza de que no meio não existe a presença de levedura nativa ou selvagem.

O creme de levedura utilizado no ensaio foi retirado do processo fermentativo, ou seja, as células já estavam sendo utilizadas em processo de fermentação batelada, Foi necessário realizar a centrifugação para separar o vinho do creme de levedura. A

centrifugação foi realizada em centrífugas de fermento da marca MAUSA, utilizada em plantas produtoras de etanol.

Figura 1- Centrífuga de fermento da marca Mausa

Após a batelada de fermentação, o vinho levedurado foi centrifugado e o creme de levedura foi separado com uma concentração de 63%. Esta etapa de centrifugação tem o objetivo de separar o vinho que será destinado para a destilação do creme de levedura que são as células que serão recicladas e reutilizadas novamente em outra batelada de fermentação após o tratamento. É importante ressaltar que a etapa de centrifugação também ajuda a diminuir a contaminação do meio, pois como as bactérias são menores e mais leves que as células de levedura, esses microrganismos contaminantes acabam saindo junto com o vinho durante a centrifugação e não retornam novamente para o processo fermentativo.

A determinação da concentração do creme de levedura na saída da centrífuga foi realizada através de uma centrífuga de bancada. Adicionou-se 10 ml de creme de levedura em uma cubeta de 10 ml, o menisco da cubeta foi aferido, em seguida, adicionou-se a cubeta contendo a amostra na centrífuga juntamente com outra cubeta contendo água para balancear o equipamento, a centrifugação ocorreu no tempo de 5 min com 3200 RPM de rotação, após o procedimento Foi verificado a concentração do fermento.

Após a determinação da concentração do creme de levedura, foram coletadas quatro amostras de 100 mL do creme de levedura com concentração de 63% e em seguida foram diluídas para 30% através da adição de água tratada. A diluição foi feita adicionando 110 mL de água em cada amostra, obtendo assim, quatro amostras de 210 mL cada com 30% de fermento.

Tabela 1. Concentração de fermento em cada amostra.

Amostra	Volume (mL)	Concentração (%)
A	210	30%
B	210	30%
C	210	30%
D	210	30%

É importante ressaltar que as amostras foram diluídas para 30% para que durante a adição de ácido sulfúrico no creme de levedura, o contato entre a parede celular e o ácido não seja tão intenso.

Para estas amostras, não foram analisados o teor alcoólico e nem o grau de infecção do meio, porém, foram analisadas as viabilidades das quatro amostras de fermento diluído antes da adição do ácido sulfúrico. A análise de viabilidade foi realizada antes do tratamento em ácido sulfúrico e depois do tratamento em ácido sulfúrico com o objetivo e avaliar se houve mortes das células de leveduras devido ao baixo pH do meio.

Para a determinação da viabilidade celular das leveduras foi utilizada a técnica de coloração com eritrosina, este método é o mais utilizado nos laboratórios das unidades produtoras de etanol.

Primeiramente foi pesado 0,1g de eritrosina e posteriormente foi diluída em 10ml de água destilada. A solução foi armazenada em frasco âmbar sem o contato da luz.

Em seguida, a solução tampão foi preparada pesando 17,90g de Na_2HPO_4 (ácido sulfúrico) e dissolvido em 250mL de água destilada (solução A) e armazenado. Após o preparo da solução A, foi pesado 6,89g de NaH_2PO_4 e dissolvido em 250ml de água destilada (solução B). Em seguida misturou-se a solução A e a solução B.

A solução final de trabalho foi preparada misturando 0,1ml de solução de eritrosina com 5,0 ml de solução tampão (solução A + B). A solução eritrosina resultante foi armazenada para utilizar na análise da viabilidade.

O procedimento analítico foi realizado da seguinte forma:

Foi transferido uma alíquota de amostra de creme de levedura de 5mL para um tubo de ensaio, em seguida adicionou-se solução de papaína e a amostra descansou por 5 min com o objetivo de desflocular as células de leveduras para facilitar a contagem. Após a

ação da papaína, transferiu-se1mL da amostra para um tubo de ensaio e foi adicioando neste mesmo tubo 1 mL da solução de trabalho eritrosina.

O preparo da câmera de Neubauer foi realizado com uma lamínula de 24 x 24 mm e foi então transferido a solução (amostra + corante) suficiente para cobrir a área da câmera. As células foram contadas utilizando a objetiva de imersão (100x). Primeiramente foram contadas as células que continham a coloração vermelha, indicando que as mesmas não eram viáveis para o processo fermentativo.

O cálculo da viabilidade foi realizado utilizando a seguinte fórmula:

$$\% \text{ de células viáveis} = \frac{\text{Total de células viáveis}}{\text{Total de cel. Viáveis + não viáveis}}$$

Após a determinação da viabilidade, iniciou-se o tratamento com ácido sulfúrico nas quatro amostras de creme de levedura. Através de uma pipeta, adicionou-se ácido sulfúrico P.A nas amostras sobre agitação até atingir o pH estipulado para cada amostra.

Tabela 2. Potencial hidrogeniônico das amostras de fermento.

Amostra	pH
A	2,41
B	2,60
C	2,82
D	3,01

Após a correção do pH, as amostras ficaram sobre agitação por duas horas, sendo esse o tempo ideal para o tratamento do fermento.

Após o tratamento ácido, foi realizado novamente a análise de viabilidade conforme procedimento já demonstrado acima para verificar se houve diferença na quantidade de células vivas após a adição do ácido sulfúrico.

Como a temperatura do meio influencia na viabilidade do fermento, durante o tempo de tratamento foi monitorado a temperatura de cada amostra. A levedura sendo um microrganismo mesofilo, o mesmo mantém sua vitalidade em temperaturas que podem variar entre 30° e 34°.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Durante o experimento, não houve desvio de temperaturas durante o tratamento. Foram registrados fotos do microscópio, nas imagens abaixo, podemos verificar as células de leveduras na câmera de Neaubauer:

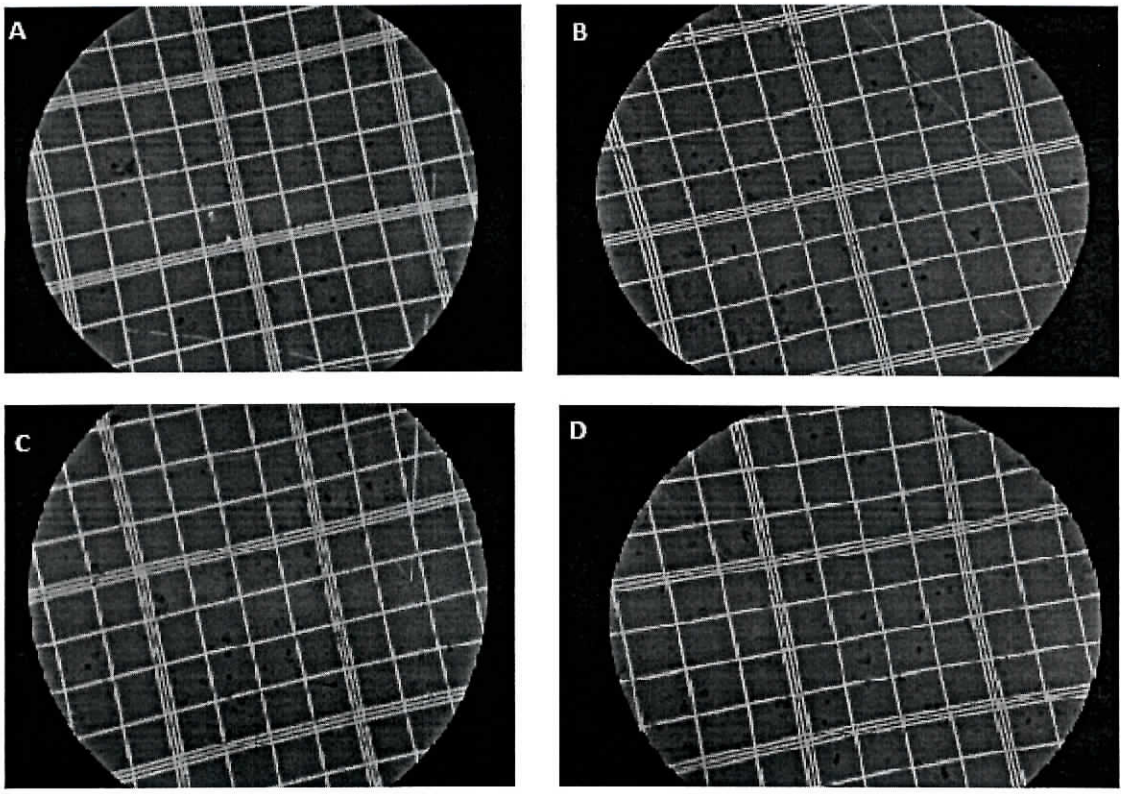

Figura 2- Células de Leveduras na Câmera de Neaubauer.

A figura 2 contém imagem da câmera de Neubauer das quatro amostras após o tratamento ácido onde é possível observar as células com a coloração vermelha indicando que não são viáveis e as células sem coloração indicando que são viáveis para o processo fermentativo.

É importante ressaltar que mesmo após o tratamento ácido e adição de papaína, as quatro amostras continham células aglomeradas indicando um grau de floculação. De acordo com a figura 2, a amostra D que foi tratada com o maior valor de pH possui o menor grau de floculação. Podemos citar também o grau de brotamento, a amostra D possui a maior quantidade de células brotos, esta característica pode estar atrelada ao valor de pH que foi o maior dentre as quatro amostras.

A tabela abaixo contém os valores de viabilidade para cada amostra realizado antes do tratamento com ácido sulfúrico.

Tabela 3. Valores de viabilidade antes do tratamento ácido

Amostra	Viabilidade (%)
A	82
B	81
C	82
D	82

A tabela 3 mostra que a viabilidade do fermento antes do tratamento é de 82%, este valor é altamente satisfatório dentro do processo fermentativo a nível industrial. É importante lembrar que a viabilidade depende de vários fatores como pH, temperatura, concentração de açúcar, contaminação e outros.

Os valores de viabilidade das amostras após o tratamento ácido estão expostos na tabela 4.

Tabela 4. Valores de viabilidade após o tratamento ácido.

Amostra	pH	Viabilidade (%)
A	2,41	76
B	2,60	76
C	2,82	79
D	3,01	81

A tabela acima demonstra de forma clara que a viabilidade das leveduras é prejudicada pelo tratamento ácido. A amostra A teve a maior queda de viabilidade e a amostra D praticamente não alterou mostrando que quanto maior a concentração de íons H+ no meio de tratamento, maior será a queda de viabilidade do fermento.

É importante esclarecer que a avaliação da eficiência fermentativa depende de outros fatores e um deles é o grau de contaminação. A queda de viabilidadena amostra A devido ao baixo valor de pH pode não ser totalmente desvantajoso, isso devido à assepsia que o ácido sulfúrico causa no meio, visto que a presença de bactérias, além de causar queda da viabilidade, também significam perdas de processo já que esses microrganismos indesejáveis também irão metabolizar os substratos presentes no meio.

4. CONCLUSÃO

De acordo com os parâmetros analisados acima, fica evidenciado que quanto menor for o pH do meio de tratamento, mais acentuada será a queda da viabilidade do fermento, portanto, pode-se realizar tratamentos com pH mais altos variando entre 2,8 e 3,0 e com isso, a assepsia pode ser compensada através de outros produtos como antibióticos ou produtos oxidantes como o dióxido de cloro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

CORAÇA, Alessandra Cristina Maciel. **Utilização do ácido sulfúricono tratamento das leveduras na fermentação etanólica**. 2012. 45.Universidade de São Carlos, São Carlos, 2012.

KOHLHEPP, Gerd. **Análise da situação da produção de etanol e biodísel no Brasil**. Etudos Avançados. 2010. Pg 24 – 68.

MELO,Hélio Fernandes. **Resposta ao estresse ácido em leveduras da fermentação alcoólica industrial**. 2006. 218.Universidade Ferderal de Pernambuco, Pernambuco. 2006.

NOBRE, Thais de Paula.**Viabilidade Celular de Saccharomycescerevisiae cultivada em associação com bactérias contaminantes da fermentação alcoólica**. 2005. 111. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2005.

OLIVA-NETO, P. et. Al. **Quantificação da floculação de leveduras por bactérias contaminantes da fermentação alcoólica**. 1ª edição. Campinas – SP. Ciencia e Tecnologia alimenticia. 2001. Pg 63-68.

REIS, Vanda Renata**Efeito do substrato e das condições de tratamento do fermento sobre a fermentação etanólica contaminada com leveduras SaccharomycesCerevisae Selvagens e Lactobacillusfermentum**. 2016. 142. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2016.

SANTIN, Ana Paula. **Estudo da secagem e da inativação da levedura**. 1996. 151. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 1996.