

***ANÁLISE DA VIABILIDADE E A CURVA DE CRESCIMENTO DE UMA
LINHAGEM INDUSTRIAL DE SACCHAROMYCES CEREVISIAE
DE UMA DESTILARIA DE ETANOL DO PONTAL
DO TRIANGULO MINEIRO***

Analysis of viability and the growth curve of an industrial strain of Saccharomyces cerevisiae of an ethanol distillery in the Pontal do Triangulo Mineiro

Marisa Rodrigues Moraes, Leila Leal da Silva Bonetti, Eleusa Maria Ferreira Rocha

RESUMO

Os micro-organismos fermentadores como a levedura *Saccharomyces cerevisiae* e algumas bactérias são de grande interesse e de importância econômica, pois estes realizam processos biotecnológicos como a produção de vinhos, cervejas e de etanol. Neste trabalho foi realizada a análise da viabilidade e a curva de crescimento de uma linhagem industrial de *S. cerevisiae* de uma destilaria de etanol do Pontal do Triângulo Mineiro. A análise dos resultados revelou ótima viabilidade deste levedo industrial, tanto pela contagem por unidade formadora de colônias de 2.3×10^{11} UFC/mL, quanto pela contagem de células/leveduras viáveis microscópicas de 2.0×10^9 células/mL. O crescimento populacional desta linhagem industrial de *S. cerevisiae* apresentou as principais fases da curva: Lag, exponencial, estacionária e em declínio, confirmando que este fermento industrial foi de ótima qualidade. A análise da viabilidade do fermento industrial e a determinação da taxa de crescimento populacional da levedura mostraram resultados bastante significativos e dentro dos parâmetros esperados. Portanto, o monitoramento rápido e eficaz da viabilidade do fermento industrial pode garantir altos níveis de produção de etanol, sendo, assim de grande importância econômica.

Palavras-chave: Etanol. Levedura. *Saccharomyces cerevisiae*. Viabilidade Celular.

ABSTRACT

The fermenters microorganisms such as the yeast *Saccharomyces cerevisiae* and some bacteria are of great interest and economic importance since they perform biotechnological processes such as the production of wines, beers and ethanol. This work was carried out the analysis of viability and the growth curve of an industrial strain of *S. cerevisiae* of an ethanol distillery in the Pontal do Triangulo Mineiro. The analysis of the viability of industrial yeast showed great viability of both the forming parts counting colonies of 2.3×10^{11} UFC/mL as the cell count/ microscopic viable yeast 2.0×10^9 cells/mL. In addition, the data obtained on the growth curve were quite satisfactory, presented the main stages of the curve, as the lag phase, exponential, stationary and decline, and thus confirming that this industrial yeast was really great quality. Analysis of the viability of the industrial yeast and determining the growth rate of the yeast showed significant results and within expected parameters. Therefore, the rapid and effective monitoring of the viability of industrial yeast can ensure high levels of ethanol production, and thus of great importance economy.

Keywords: Ethanol. Yeast. *Saccharomyces cerevisiae*. Cell viability.

INTRODUÇÃO

A *Saccharomyces cerevisiae* é a espécie de levedura mais amplamente estudada em experimentos de genética molecular devido ao seu importante papel na indústria pelo processo bioquímico da fermentação alcoólica. É comumente utilizada na fabricação de etanol a partir da cana-de-açúcar e em diversos outros processos biotecnológicos (Silva Filho et al., 2005, Alencar et al., 2009).

De acordo com Batistote et al. (2010) o processo de produção do etanol, no Brasil, utiliza a sacarose proveniente da cana-de-açúcar, na forma de caldo de cana e melaço, como substrato para fermentação. Esta fermentação ocorre pela ação de células de *S. cerevisiae* que são reutilizadas ao longo de toda a safra. Atualmente o número de destilarias de álcool vem aumentando devido ao aumento da demanda deste combustível (BATISTOTE et al., 2010), que requer um grande desenvolvimento tecnológico para o setor agroindustrial da Cana e melhorias nos processos de fermentação pelas indústrias sucroalcooleiras (AMORIM et al., 2011).

O desempenho do processo fermentativo é enormemente afetado pelo tipo de levedura que o executa (LIMA et al., 2001), dependendo de várias circunstâncias, entre as quais o substrato ou matéria prima utilizada, o teor alcoólico desejado no produto final, a duração da fermentação, as propriedades do produto, e outros.

Durante o crescimento de *S. cerevisiae* pode-se descrever as fases: lag - com pouca ou nenhuma alteração no número de células, mas a atividade metabólica é intensa; log - as bactérias se multiplicam em alta velocidade, considerando as condições fornecidas pelo meio; estacionária - há um equilíbrio entre a divisão e a morte celular; declínio ou morte celular - o número de mortes excede o número de novas células formadas. Essas fases possibilitam analisar sua curva de crescimento e facilitam a compreensão da dinâmica das populações e o controle durante, por exemplo, a preservação ou a deterioração de alimentos; a microbiologia industrial, como a produção de etanol.

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 et al., 1990), para assegurar um bom rendimento industrial.

No presente trabalho teve-se como objetivo, a determinação da qualidade e viabilidade de uma linhagem industrial de *S. cerevisiae*, obtida de uma destilaria de etanol do Pontal do Triângulo Mineiro pela análise de sua curva de crescimento.

METODOLOGIA

Os experimentos de isolamento, cultivo e análises microscópicas para o fermento industrial analisado foram realizadas no laboratório de Microbiologia e Micologia da UEMG unidade de Ituiutaba-MG.

Preparação do Meio de Cultura para as Leveduras

O meio de cultura utilizado para o crescimento do fermento industrial foi o Ágar-Nutriente (peptona-0,8%, extrato de levedura-0,4%, glicose-2%, pH 5,5). Este meio foi autoclavado a 1 atm de pressão por durante 20 minutos. Amostras do fermento de levedo industrial foram homogeneizadas e em seguida filtradas em algodão para eliminar as impurezas.

Análise da Viabilidade e Contagem das Células Viáveis

Para o experimento da análise de viabilidade das células da levedura fermentadora foi realizada a técnica de coloração com azul de metileno (5%). O fermento de levedo industrial purificado foi diluído em tubos de ensaio com solução de salina esterilizada (0,8%). Após a diluição, transferiu-se 1 mL do levedo purificado para um tubo de ensaio de 5 mL e adicionou-se 1 mL da solução de azul de metileno. Após 5 minutos, transferiu-se 100 µL da amostra corada para uma Câmara de Neubauer e levou-se ao microscópio óptico, com objetiva de 40X para realização da contagem das células viáveis, isto é, não coradas pelo azul de metileno.

Diluição Seriada e Plaqueamento em Meios de Cultura (Ceccato-Antonini, 2010)

Primeiramente foram realizadas as diluições das amostras de levedo em série, de 10^{-2} a 10^{-11} , e uma alíquota de 0,1 mL de cada diluição foi inoculada com alça de Drigalsky em placa de Petri com meio de ágar nutriente sólido. Após, a inoculação das amostras, estas foram incubadas a 28°C, por 48 horas. Após este período, foi realizada a contagem das colônias crescidas nas placas de Petri. Estas colônias formadas foram genericamente denominadas de Unidades Formadoras de Colônias (UFC), ou Colony Forming Units (CFU). Este método de contagem de colônias em placas de Petri foi baseado no princípio de que cada colônia crescida foi considerada originária de uma única célula viável.

Curva de Crescimento

A colônia de *S. cerevisiae* foi inoculada em 10 mL do meio de cultura líquido, em ágar nutriente, contido em um tubo de ensaio esterilizado, e em seguida foi incubada em agitador (shaker) a 28°C por 24 horas. Após esse tempo, a cultura foi centrifugada por 10 minutos, a 2000 rpm, e ressuspendida em 10 mL de salina, e diluída a 1:10. Uma alíquota desta diluição foi então, novamente, inoculada, em meio ágar nutriente líquido, e várias amostras foram coletas nos intervalos de tempo, 0, 10, 20, 30, 40, 60, 90, 120, 150 minutos. Após este procedimento, foram então, realizadas as diluições de 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} de todas as amostras coletadas dos diferentes intervalos, acima mencionados. Em seguida, amostras de 0,1 mL destas diluições foram inoculadas em placa de Petri contendo meio de cultura sólido, e incubadas a 28° C por 48 horas. Após este período, as colônias resultantes foram contadas e então, determinou-se sua curva de crescimento.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na determinação da qualidade do levedo industrial analisado, o resultado mostrou o excelente desempenho desse micro-organismo, pela contagem por unidade formadora de colônias de 2.3×10^{11} UFC/mL (Figura 1), e pela contagem de células/leveduras viáveis microscópicas de 2.0×10^9 células/mL (Figura 2). Observou-

se, pela microscopia óptica, colônias não coradas pelo corante azul de metileno, que indicam boa viabilidade (Figura 2). Resultados semelhantes foram encontrados por Basso et al. (2008) para as linhagens de *S. cerevisiae* PE-2, CAT-1 e a BG-1 que apresentaram uma notável capacidade de competir com leveduras selvagens, sobrevivendo e dominando durante fermentações industriais.

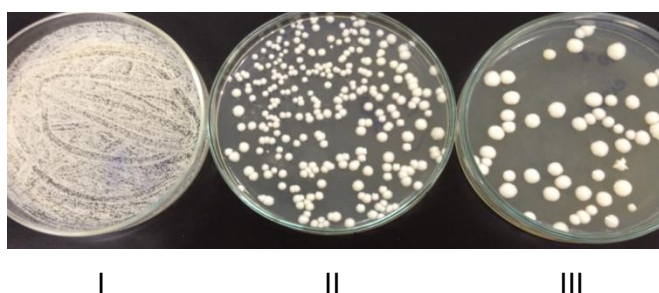


Figura 1- Cultura de fermento de levedo industrial cultivada em meio de cultura sólido, agar nutreinte. I-Concentrado, II-diluição 10^{-6} e III- diluição 10^{-9} .

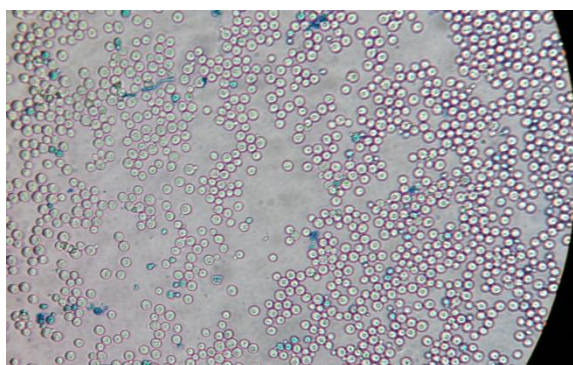


Figura 2- Células viáveis de *S. cerevisiae* visualizadas ao microscópio óptico, não coradas pelo azul de metileno.

Após a avaliação das células pelo indicador de viabilidade, o azul de metileno, fez-se a contagem das leveduras usando a câmara de Neubauer, pelo microscópio óptico, estimadas em torno de $2,0 \times 10^9$ células/mL, quantidade que conferem ao fermento industrial analisado um grau significativo de viabilidade celular. Martins et al. (2013) relataram que a avaliação da viabilidade celular dos fermentos industriais e a concentração de células vivas são fatores decisivos na eficiência da fermentação industrial.

Outro monitoramento bastante importante e necessário para evitar perdas significativas no processo fermentativo do etanol, e garantir um fermento saudável, é o diagnóstico rápido da presença de micro-organismos invasores durante o processo fermentativo (CECCATO-ANTONINI, 2010). Estes contaminantes, como por exemplo, as bactérias invasoras, competem pelo mesmo substrato, a glicose, e duplicam-se mais rápido que a levedura. Tais bactérias podem provocar um enorme prejuízo na fermentação alcoólica, inibindo o crescimento de leveduras pela produção de ácido láctico, um fenômeno chamado de floculação, que causa uma queda significativa na produção de etanol e também na viabilidade da levedura (NARENDRANATH; POWER, 2004; VENTURA, 2007; ANDRADE; ROCHA, 2013).

De acordo com os relatos de Kelsall e Lyons (2003) e de Barbosa (2012), as perdas equivalentes em etanol, como por exemplo, pelas bactérias contaminantes viáveis (UFC/mL), foi na ordem de 10^7 com perda de 2.120.000 L de etanol, e em bactérias contaminantes viáveis (UFC/mL), 10^8 com perda de 2.544.000 L de etanol, indicando que é bastante sério e grave o prejuízo econômico que os micro-organismos invasores podem causar em um processo fermentativo do etanol.

Portanto, o controle e o monitoramento do processo fermentativo são de extrema relevância (KELSALL; LYONS, 2003; BARBOSA; 2012; ANDRADE; ROCHA, 2013).

O resultado da curva de crescimento (taxa de crescimento), contagem viável em Logaritmo (Log), está representado pelo gráfico abaixo (Figura 3). Nesta figura, observa-se as principais fases de crescimento em um tempo de geração: Lag (fase inicial, tempo zero); Exponencial (fase de crescimento da população), demonstrada entre o tempo zero e aos trinta minutos; Estacionária, observada após 30-60 minutos, Declínio da levedura, assim confirmando que este fermento industrial foi realmente de ótima qualidade.



Figura 3. Taxa de crescimento celular do fermento industrial de *S. cerevisiae*.

CONCLUSÃO

A determinação da qualidade e viabilidade e a análise da curva de crescimento da levedura *S. cerevisiae*, por meio de técnicas laboratoriais adequadas e monitoramento eficaz, podem contribuir para um diagnóstico rápido e eficiente da qualidade do fermento, evitando perdas e garantindo um rendimento lucrativo, traduzido, em milhões de litros, durante o processo industrial do etanol.

REFERÊNCIAS

- ALENCAR, E.M.B; Souza-Motta, C.M.; Walter, B.S.; Santos, R.M.P.; Marques, O.M.; Queiroz, L.A. Fermentation capacity of *Saccharomyces cerevisiae* cultures. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.52, n.4, p.819-824, 2009.
- AMORIM, H., LOPES, M., DE CASTRO OLIVEIRA, J., BUCKERIDGE, M. e GOLDMAN, G. Scientific challenges of bioethanol production in Brazil. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.91, n.5, p.1267-1275. 2011.
- ANDRADE, J. V., ROCHA, E. M. F. Identificação de contaminantes bacterianos em uma destilaria de etanol do pontal do triângulo mineiro. **Intercursos Revista Científica**, v.12, p.46-58, 2013.
- BARBOSA, N. F. **Aspectos teóricos e práticos do processo de fermentação alcoólica**. Trabalho de Graduação. Centro Estadual de Educação Tecnológica Paula Souza, Faculdade de Tecnologia de Araçatuba, 2012.
- BASSO, L. C., AMORIM, H. V., OLIVEIRA, A. J. , LOPES, L. M. Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil. **FEMS Yeast Research**, v.8, p.1155-1163, 2008.

BATISTOTE, M.; CARDOSO, C. A. L.; RAMOS, D. D.; ERNANDES, J. R. Desempenho de leveduras obtidas em indústrias de Mato Grosso do Sul na produção de etanol em mosto a base de cana de açúcar. **Ciência e Natura**, UFSM, 32(2): 83 - 95, 2010.

CECCATO-ANTONINI, S. R. **Monitoramento microbiológico em destilarias: uma necessidade**. STAB, Piracicaba, v. 16, n.5, p. 18-19, 1998.

CECCATO-ANTONINI, S. R. **Microbiologia da fermentação alcoólica**. EdUFSCAR, 103 p, 2010.

KELSALL, D. R. ; LYONS, T. P. **Grain dry milling and cooking procedures**. In: JACQUES, K. A.; LYONS, T. P.; KELSALL, D. R. (Ed.). The alcohol textbook. 4th ed. Norfolk: N. University Press, Chapter 2, p. 21, 2003.

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.

LIMA, U. A., BASSO, L. C., AMORIM, H. V. **Produção de Etanol**. In: SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. (Coord.). Biotecnologia Industrial: Processos Fermentativos e Enzimáticos, v.3, capítulo 1, São Paulo, SP, Editora Edgard Blucher, 2001.

MARTINS, S. C. S.; FIÚZA, L. M. C. G.; MARTINS, C. M. Comparação de diferentes meios de cultivo para a avaliação da viabilidade celular de fermentos biológicos. **Enciclopédia Biosfera**, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.9, n.16; p. 2478-2486, 2013.

NARENDRANATH, N. V.; POWER, R. Effect of yeast inoculation rate on the metabolism of contaminating lactocilli during fermentation of corn mash. **Journal of Industrial Microbiology and Biothechnology**, v.31, p. 581-584, 2004.

SILVA FILHO, E. A. S.; MELO, H.F.; ANTUNES, D.F; SANTOS, S.K.B.; RESENDE, A.M.; SIMÕES, D.A; MORAIS Jr, M.A. Isolation by genetic and physiological characteristics of a fuel-ethanol fermentative *Saccharomyces cerevisiae* strain with potential for genetic manipulation. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v.32, n.10, p.481-486, 2005.

VENTURA, R. **Quantificação do ácido láctico na fermentação etanólica como parâmetro de monitoramento do processo**. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) Instituto de Biociências de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2007.

AUTORAS:

Marisa Rodrigues Moraes ⁽¹⁾ - Estudante de graduação do curso de Engenharia Agrônoma da Universidade do Estado de Minas Gerais - UEMG.
marisamorais22@hotmail.com

LEILA LEAL DA SILVA BONETTI ⁽²⁾ - Mestre e professora do curso de Licenciatura em Ciências Biológicas da Universidade do Estado de Minas Gerais – UEMG. Ituiutaba, MG.
Email: lealbonetti@gmail.com

ELEUSA MARIA FERREIRA ROCHA ⁽²⁾ - Doutora em Genética de Microrganismos pela Universidade de São Paulo (USP). Professora de Microbiologia da Universidade do Estado de Minas Gerais - UEMG.
eleusarocha@hotmail.com