

5.01.99 – Agronomia

**SUPLEMENTAÇÃO DO MOSTO COM MAGNÉSIO PARA O AUMENTO DA PRODUÇÃO DE ETANOL E TOLERÂNCIA DE LEVEDURAS AO PROCESSO FERMENTATIVO**Ana P. V. Silva<sup>1\*</sup>, Gildemberg A. L. Júnior<sup>2</sup>,

1. Estudante de Engenharia Química do Centro de Tecnologia da UFAL (CTEC/UFAL)

2. Professor do Centro de Ciências Agrárias da UFAL - Orientador (CECA- UFAL)

**Resumo**

Perdas no processo fermentativo com leveduras acontecem por desvios entre vias metabólicas, manejo do processo e fatores de estresse. A mitigação dos efeitos negativos dos fatores de estresse pode ser obtida pela suplementação do mosto afim de aumentar o rendimento. O objetivo do trabalho foi avaliar o efeito da suplementação do mosto de melaço com cloreto de magnésio na tolerância de leveduras industriais (Pe-2) a altas temperaturas e ao reuso. Os testes fermentativos foram realizados em 10 ciclos subsequentes. A 36°C e 32°C o resultado foi similar para o mosto com magnésio, a redução do Brix foi maior no mosto simples. Nos testes a 40°C e 32°C, o Brix médio foi 11,6% a 32°C o suplementado foi 12,8%, o brotamento foi 37% menor no tratamento com magnésio, e a 40°C foi 53% menor no mosto suplementado. A concentração celular foi menor no tratamento com magnésio. A 32°C o pH médio foi similar no mosto simples, e no mosto com magnésio, a 42°C o pH médio foi 4,8 no mosto simples e 4,4 no mosto suplementado. A redução do Brix a 42°C e 32°C foi maior no mosto simples, já a concentração celular foi 22% menor na parcela com magnésio. O suplemento adicionado mostrou-se ineficaz para o aumento da produção de etanol e tolerância de leveduras ao estresse fermentativo.

**Autorização legal:** não**Palavras-chave:** Fermentação industrial; Nutrientes; Termorresistência.**Apoio financeiro:** UFAL; FAPEAL.**Trabalho selecionado para a JNIC:** UFAL**Introdução**

Industrialmente, a produção de etanol é comprometida pelo desvio da via fermentativa para respiração, produção de glicerol e pela redução da viabilidade celular devido aos fatores de estresse do processo fermentativo. As condições são mais severas em processos fermentativos de alta performance, que trabalham com valores de açúcares redutores elevados, resultando em incremento da temperatura e da toxidade do etanol. A viabilidade celular é prejudicada pelo reuso do levedo que passa por tratamento ácido após ser centrifugado (processo de batelada alimentada).

Nos processos fermentativos, a suplementação do mosto é uma alternativa para melhorar o rendimento e mitigar os efeitos dos fatores de estresse. A suplementação do mosto com a adição de óleos vegetais (Saigal & Vishwanathan, 1983), leite desnatado (Patil et al., 1986), óleo de soja (Alterthum & Cruz, 1987), osmoprotetores (Chan-u-tit et al 2013), polietileno-glicol (Liu et al., 2014) e sais (Appiah-Nkansah et al 2018; Chan-u-tit et al 2013; Deesuth et al., 2012) tem propiciado o aumento da resistência das leveduras as condições estressantes do processo fermentativo. A suplementação com sais que são agentes menos complexos e de menor custo tem apresentado resultados positivos no aumento da tolerância das leveduras a temperatura (Appiah-Nkansah et al 2018; Chan-u-tit et al 2013; Deesuth et al., 2012).

A mitigação dos efeitos adversos das condições estressantes reduz as perdas no processo fermentativo, melhorando o rendimento do processo fermentativo. No entanto, os efeitos da suplementação do mosto foram avaliados em linhagens de leveduras laboratoriais sendo necessário confirmar os efeitos das suplementações do mosto com linhagem industrial.

**Metodologia**

Os testes foram realizados com levedura industrial (Pedra - 2) com 1% de massa de levedura no mosto a ser fermentado. As leveduras foram cultivadas e multiplicadas em meio YEPD (1% Extrato de levedura; 2% Dextrose; 1% Peptona bacteriológica) para manutenção da linhagem e produção de massa para inoculações nas fermentações. Os testes foram conduzidos em meio preparado com melaço de cana e ajustado para 17°Brix. O tratamento referência foi o meio sem adição de íons magnésio a ser comparado com o meio suplementado com íons magnésio (200 mM). Os fatores de estresse foram avaliados separadamente e em diferentes níveis. Os níveis foram avaliados aos pares tendo o menor nível como referência (ref.). A resistência a temperatura foi testada nos níveis de 32°C (ref.), 36°C, 40 e 42 °C. A fermentações foram conduzidas em tubos de 50 ml contendo 20 mL de mosto de melaço 17°Brix e pH 5,0. O delineamento do experimento foi ao acaso e com 3 repetições totalizando 12 parcelas por experimento. O efeito dos íons magnésio na manutenção da viabilidade dos ciclos foi avaliado em todos os experimentos. A cada fermentação o material foi centrifugado e a massa de células

recuperada foi tratada com ácido sulfúrico diluído (pH 2,5) por duas horas, sendo utilizada na próxima fermentação. O processo foi realizado 10 vezes em todos os tratamentos. O plaqueamento por superfície das células com meio WLN (5,0000% Glicose; 0,0550%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 0,0425% KCl; 0,0125%  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ; 0,0125%  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 0,0125%; 0,2500%  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ; 0,2500%  $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ; 0,5000% Peptona de caseína; 0,4000% Extrato de levedura; 2,0000% Ágar; 0,0022% Verde de bromocresol; pH 5,5) foi realizado para confirmar a contagem de células viáveis e verificar a morfologia das colônias formadas. A viabilidade celular, brotamento e população de células da levedura foram determinados pela coloração diferencial das células pela solução de eritrosina (OLIVEIRA et al.1996).

### Resultados e Discussão

No ensaio sob as temperaturas de 32 e 36°C, na condição ótima (32°C) verificou-se que o Brix residual médio do controle foi de 9,80% e o Brix residual médio do tratamento com suplementação de magnésio foi de 12,60%. O pH médio do controle foi de 4,80 e o pH médio do tratamento com suplementação de magnésio foi de 4,5. Ao final dos 10 ciclos, conduzidas a 32°C a média da concentração de células foi de  $2,6 \times 10^8$  células.  $\text{mL}^{-1}$  no mosto sem suplementação contra  $1,8 \times 10^8$  no mosto suplementado com magnésio. Verificou-se que a viabilidade das amostras no mosto controle foi de 81% e nas amostras suplementadas foi de 93%, sendo a taxa de brotamento no controle 15,90% e tratamento com suplementação de magnésio 13,3%.

Sob a temperatura de 36°C o teor de sólidos solúveis (açúcares residuais) foi maior nas amostras onde houve suplementação do magnésio. Na fermentação de 10 ciclos, a condição de 36°C verificou-se que o Brix residual médio do controle foi de 9,9% e o Brix residual médio do tratamento com suplementação de magnésio foi de 11,6%, o pH médio do mosto simples foi 4,80 e o pH médio do tratamento com suplementação de magnésio foi de 4,50. Na condição de 36°C a média da concentração de células foi de  $2,1 \times 10^8$  células.  $\text{mL}^{-1}$  no mosto sem suplementação contra  $1,5 \times 10^8$  no mosto suplementado com magnésio. A viabilidade celular média foi 88,5% no tratamento controle e 81,3% no tratamento com suplementação de magnésio, já a frequência de brotos foi de 13% no tratamento controle e 11% no tratamento com suplementação com magnésio.

No ensaio sob as temperaturas de 32 e 40°C, na condição ótima (32°C) as avaliações de Brix residual e pH verificou-se que o Brix residual médio do controle foi de 11,60% e o Brix residual médio do tratamento com suplementação de magnésio foi de 12,82%; e o pH médio do controle foi de 4,46 e o pH médio do tratamento com suplementação de magnésio foi de 4,18. Ao final dos 10 ciclos conduzidas a 32°C a média da concentração de células foi de  $3,5 \times 10^8$  no mosto suplementado com magnésio contra  $3 \times 10^8$  células.  $\text{mL}^{-1}$  no mosto sem suplementação. Verificou-se que a viabilidade das amostras no mosto controle foi de 91,34% e nas amostras suplementadas foi de 87,13%, sendo a taxa de brotamento no controle 11,93% e tratamento com suplementação de magnésio 7,53%.

Na condição de 40°C o teor de sólidos solúveis (açúcares) foi maior nas amostras onde houve suplementação do magnésio. Na fermentação de 10 ciclos, a 40°C o Brix residual médio do controle foi de 13,47% e o Brix residual médio do tratamento com suplementação de magnésio foi de 14,05%, o pH médio do tratamento controle foi de 4,60 e o pH médio do tratamento com suplementação de magnésio foi de 4,30. A 40°C a média da concentração de células foi de  $5,7 \times 10^7$  no mosto suplementado com magnésio contra  $6,9 \times 10^7$  células.  $\text{mL}^{-1}$  no mosto sem suplementação, a viabilidade celular média foi 84,15% no tratamento controle e 79,80% no tratamento com suplementação de magnésio e a frequência de brotos foi de 14% no tratamento controle e 6,56% no tratamento com suplementação de magnésio.

No ensaio sob as temperaturas de 32 e 42°C, na condição ótima (32°C) verificou-se que o Brix residual médio do controle foi de 10,28% e o Brix residual médio do tratamento com suplementação de magnésio foi de 13,60%. O pH médio do controle foi de 4,50 e o pH médio do tratamento com suplementação de magnésio foi de 4,22. Ao final dos 10 ciclos conduzidas a 32°C a média da concentração de células foi de  $2,22 \times 10^8$  no mosto suplementado com magnésio contra  $3 \times 10^8$  células.  $\text{mL}^{-1}$  no mosto sem suplementação. Verificou-se que a viabilidade das amostras no mosto controle foi de 91,62% e nas amostras suplementadas foi de 71,95%, sendo a taxa de brotamento no controle 8,6% e tratamento com suplementação de magnésio 8,5%. A 42°C o teor de sólidos solúveis (açúcares) foi maior nas amostras onde houve suplementação do magnésio. Na fermentação de 10 ciclos, a condição de 42°C as avaliações de Brix residual e pH verificou-se que o Brix residual médio do controle foi de 14,65% e o Brix residual médio do tratamento com suplementação de magnésio foi de 16,37%, o pH médio do tratamento controle foi de 4,82 e o pH médio do tratamento com suplementação de magnésio foi de 4,43. A 42°C a média da concentração de células foi de  $4,5 \times 10^7$  no mosto suplementado com magnésio contra  $5,8 \times 10^7$  células.  $\text{mL}^{-1}$  no mosto sem suplementação, a viabilidade celular média foi 49,6% no tratamento controle e 58,7% no tratamento com suplementação de magnésio e a frequência de brotos foi de 5,2% no tratamento controle e 5% no tratamento com suplementação de magnésio.

Nas condições avaliadas, a suplementação com cloreto de magnésio foi ineficaz para atenuar os efeitos negativos da temperatura na produção de etanol, e na manutenção da viabilidade celular em uma linhagem industrial. O magnésio tem influência positiva no metabolismo da levedura, porém, é menor comparativamente com manganês e zinco (Deesuth et al., 2012). O efeito observado em linhagens laboratoriais pode ser repetido em linhagens comerciais, abrindo a possibilidade para testes com zinco, que apresenta melhor efeito na tolerância a altas temperaturas.

### Conclusões

A suplementação com ions de magnésio mostrou-se ineficaz para o aumento do rendimento da produção de etanol e tolerância em condições de alta temperatura.

## Referências bibliográficas

- Alterthum, F.; Cruz, M.R.M. Aumento do rendimento da fermentação alcoólica pela adição de óleo de soja. *Revista de Microbiologia*, 18 (1): 52-7, 1987.
- Appiah-Nkansah, NB; Zhang, K; Rooney, W; Wang, DH. Ethanol production from mixtures of sweet sorghum juice and sorghum starch using very high gravity fermentation with urea supplementation. ***Industrial Crops and Products***, 111: 247-253, 2018.
- Chan-u-tit, P; Laopaiboon, L; Jaisil, P; Laopaiboon, P. High Level Ethanol Production by Nitrogen and Osmoprotectant Supplementation under Very High Gravity Fermentation Conditions. ***Energies***, 6(2): 884-899, 2013.
- Deesuth, O; Laopaiboon, P; Jaisil, P ; Laopaiboon, L. Optimization of Nitrogen and Metal Ions Supplementation for Very High Gravity Bioethanol Fermentation from Sweet Sorghum Juice Using an Orthogonal Array Design . ***Energies***, 5(9): 3178-3197, 2012.
- Liu, XM; Xu, WJ; Zhang, C ; Yan, PF; Jia, SY; Xu, ZW; Zhang, ZC. Vitalized yeast with high ethanol productivity RSC *Advances*, 4 (94): 52299-52306, 2014.
- Oliveira, A. J. et al. Métodos para o controle microbiológico na produção de álcool e açúcar. Piracicaba: FERMENTEC; FEALQ; ESALQ-USP, 1996.
- Patil, S.G.; Gokhale, D.V.; Patil, B.G. Enhancement in ethanol production from cane molaasses by skim milk supplementation. *Enzyme and Microbial Technology*, 8: 481-4, 1986.
- Saigal, D.; Viswanathan, L. Effect of oils and fatty acids on the tolerance of distiller's yeast to alcohol and temperature. *International Sugar Journal*, 85 (1017): 266-9, 1983.