

# Avaliação da suplementação mineral em fermentação com cultura mista de leveduras *Saccharomyces cerevisiae*

## RESUMO

**Larissa Gabriele Silva Silveira**  
<http://orcid.org/0000-0003-2601-450X>  
[larissagabrieless@hotmail.com](mailto:larissagabrieless@hotmail.com)  
Universidade Federal de Goiás, Instituto de Química Goiânia, Goiás, Brasil

**Gabriel Luis Castiglioni**  
<http://orcid.org/0000-0001-6941-148X>  
[castigli@ufg.br](mailto:castigli@ufg.br)  
Universidade Federal de Goiás, Escola de Agronomia, Goiânia, Goiás

**Fernanda Ferreira Freitas**  
<http://orcid.org/0000-0002-1670-5094>  
Universidade Federal de Goiás, Instituto de Química Goiânia, Goiás, Brasil

O aumento na produção do etanol depende da redução das perdas por contaminação e da otimização da operação industrial. Assim, este estudo tem como objetivo analisar o impacto dos nutrientes minerais na redução da contaminação e na melhoria do rendimento de etanol. Para isso, uma levedura selvagem contaminante foi isolada de uma indústria de álcool brasileira e utilizada em cultura mista com quatro leveduras industriais cultivadas. Os experimentos foram realizados com 30% de levedura selvagem e 17,5% de cada levedura industrial. As fermentações ocorreram por 72 horas em 2,5 mL de mosto sintético suplementado de acordo com as especificações da literatura. Os testes demonstraram que cálcio, fósforo e ferro afetam negativamente o processo, e um projeto de mistura indicou o cálcio como o mineral mais desvantajoso entre os avaliados. Em contraste, a adição de nitrogênio, magnésio, enxofre e cobre melhora o processo, reduzindo a contaminação em 20% e aumentando a produção de etanol em 7%.

**PALAVRAS-CHAVE:** Levedura contaminante. Balanço de nutrientes minerais. Produção de etanol. Mosto sintético de cana-de-açúcar. Projeto de mistura.

## INTRODUÇÃO

Diante da preocupação global com o meio ambiente, o etanol ganhou destaque por seus grandes benefícios ambientais, como um combustível potencialmente alternativo, limpo e renovável (Baeyens et al., 2015).

Ocupando o segundo lugar global na geração do combustível e com o maior índice produtivo da história na safra 2019/20, a Política Nacional de Biocombustíveis, estima que a produção brasileira de etanol precisa crescer 82% até 2026 para atingir as metas de descarbonização do programa RenovaBio (CONAB, 2020).

Por mais que o processo de produção esteja consolidado, o aumento da produtividade, sem expansão das áreas de cultivo, depende da combinação de fatores que proporcionem maior síntese de etanol durante o processo fermentativo (Santos et.al, 2021b).

A fermentação acontece de maneira anaeróbica e consiste na conversão dos açúcares presentes no substrato fermentável pela ação das enzimas presentes em microrganismos (Lima, 2019). Historicamente, leveduras do gênero *Saccharomyces cerevisiae* são as mais utilizadas como microrganismos de fermentação devido a sua rápida capacidade de gerar etanol, bem como pela sua alta capacidade adaptativa (Andrietta et al., 2007).

No entanto, cepas *Saccharomyces*, não-*Saccharomyces* e outros microrganismos como bactérias ácido-láticas e acéticas e fungos, podem inocular naturalmente o mosto e interferir nas reações da via glicolítica (Schwan et al., 2001). Para coibir a presença destes microrganismos indesejados e potencializar o rendimento fermentativo, comumente utiliza-se diferentes cepas de leveduras em um sistema chamado de co-cultura (Bader et al., 2001). Casos em que os microrganismos indesejáveis não são eliminados e participam da reação são chamados de cultura mista (Bader et al., 2001).

Durante o processo, as leveduras necessitam de vários nutrientes para crescimento, multiplicação celular e conversão dos açúcares (Ferreira, 2015). Minerais como nitrogênio, fósforo, enxofre, potássio, magnésio, cálcio, cobre e ferro devem estar presentes em pequenas quantidades para auxiliar no rendimento do processo (Laskin, Bennett e Gadd, 2003; Lima et al., 2019).

Lima et al. (2019) aponta que fatores físicos, químicos e biológicos como temperatura, pressão osmótica, pH, nutrientes orgânicos e minerais, concentração da levedura, presença de inibidores e outras variáveis afetam o rendimento da fermentação e que a interação entre eles pode favorecer ou prejudicar a fermentação.

O papel dos nutrientes minerais ainda é negligenciado na avaliação do desempenho fermentativo bem como seu comportamento em sistemas de cultura mista. Diante das observações mencionadas, a avaliação dos efeitos da suplementação mineral na fermentação do mosto sintético de cana de açúcar com cultura mista de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* pode apresentar-se como uma alternativa para melhorar o rendimento do produto e inibir a ação de microrganismos contaminantes.

## METODOLOGIA

Para preparo do inóculo foram utilizadas as cepas de *Saccharomyces cerevisiae* BG-1, CAT-1, FT-858L e PE-2, disponibilizadas pelo Laboratório de Engenharia Bioquímica da Universidade Federal de Goiás, e uma cepa floculante isolada por Santos et.al. (2021a) do processo de produção de etanol de uma usina localizada no estado de Goiás.

Cada cepa foi mantida separadamente em meio GPY sólido (20 g.L<sup>-1</sup> de ágar-ágár, 20 g.L<sup>-1</sup> de glicose, 5 g.L<sup>-1</sup> de extrato de levedura e 5 g.L<sup>-1</sup> de peptona). Para o preparo do inóculo, as células de cada linhagem foram raspadas e transferidas para respectivos tubos de eppendorf com 1mL do meio GPY líquido (20 g.L<sup>-1</sup> de glicose, 5 g.L<sup>-1</sup> de extrato de levedura e 5 g.L<sup>-1</sup> de peptona).

Os tubos foram agitados, incubados por 24h a temperatura de 30°C, e finalizada a incubação, centrifugados a 8000 rpm por 2 minutos. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em 1mL de água estéril para serem adicionadas à fermentação

Avaliando as condições do processo, a definição da suplementação mineral foi realizada a partir da caracterização do mosto sintético usado nas fermentações. A quantificação dos teores minerais foi realizada por meio da espectrometria de absorção atômica, com base no tratamento empregado em Silva (2009). A partir das concentrações encontradas, estabeleceu-se concentrações mínimas e máximas a serem suplementadas para cada mineral conforme disposto na Tabela 1.

Tabela 1 - Composição do meio fermentativo com as respectivas concentrações minerais em g.L<sup>-1</sup>.

Mineral	Meios de Fermentação (g.L <sup>-1</sup> )																
	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9	E10	E11	E12	E13	E14	E15	E16	E17
N	0,776	<b>2,000</b>	<b>5,000</b>	0,776	0,776	0,776	0,776	0,776	0,776	0,776	0,776	0,776	0,776	0,776	0,776	0,776	0,776
P	0,170	0,170	0,170	<b>0,200</b>	<b>0,400</b>	0,170	0,170	0,170	0,170	0,170	0,170	0,170	0,170	0,170	0,170	0,170	0,170
K	0,329	0,329	0,329	0,329	0,329	<b>1,000</b>	<b>2,000</b>	0,329	0,329	0,329	0,329	0,329	0,329	0,329	0,329	0,329	0,329
Ca	0,195	0,195	0,195	0,195	0,195	0,195	0,195	<b>0,200</b>	<b>0,300</b>	0,195	0,195	0,195	0,195	0,195	0,195	0,195	0,195
Mg	0,050	0,050	0,050	0,050	0,050	0,050	0,050	0,050	0,050	<b>0,500</b>	<b>1,000</b>	0,050	0,050	0,050	0,050	0,050	0,050
S	0,209	0,209	0,209	0,209	0,209	0,209	0,209	0,209	0,209	0,209	0,209	<b>0,300</b>	<b>0,400</b>	0,209	0,209	0,209	0,209
Cu	0,007	0,007	0,007	0,007	0,007	0,007	0,007	0,007	0,007	0,007	0,007	0,007	0,010	<b>0,015</b>	0,007	0,007	0,007
Fe	0,060	0,060	0,060	0,060	0,060	0,060	0,060	0,060	0,060	0,060	0,060	0,060	0,060	<b>0,080</b>	<b>0,100</b>		

\*E1: ensaio denominado controle por conter as concentrações dos minerais presentes no mosto e quantificados na análise; E2 e E3: enriquecido com NH<sub>4</sub>Cl; E4 e E5: enriquecido com KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> como fonte de fósforo; E6 e E7: enriquecido com KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> como fonte de potássio; E8 e E9: enriquecido com CaO; E10 e E11: enriquecido com MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O como fonte de magnésio; E12 e E13: enriquecido com MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O como fonte de enxofre; E14 e E15: enriquecido com CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O; E16 e E17: enriquecido com FeSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O.

Para cada mineral fez-se uma solução correspondente que foi adicionada aos respectivos ensaios, de modo que o volume correspondesse à concentração destacada na Tabela 1.

Os ensaios foram realizados com mosto sintético de cana de açúcar elaborado com as seguintes especificações: 10 g.L<sup>-1</sup> de glicose, 10 g.L<sup>-1</sup> de frutose, 129,24 g.L<sup>-1</sup> de sacarose, 1,8 g.L<sup>-1</sup> de ácido málico, 8,0 g.L<sup>-1</sup> de ácido cítrico, 0,75 g.L<sup>-1</sup> de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,5 g.L<sup>-1</sup> de K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,25 g.L<sup>-1</sup> de MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0,155 g.L<sup>-1</sup> de CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O e 0,2 g.L<sup>-1</sup> de NaCl. Também acrescentou-se 36,8 mL da solução de aminoácidos (0,03

g.L<sup>-1</sup> de Tirosina; 0,067 g.L<sup>-1</sup> de Isoleucina; 0,16 g.L<sup>-1</sup> de Ácido Aspártico; 0,17 g.L<sup>-1</sup> de Ácido Glutâmico; 0,07 g.L<sup>-1</sup> de Arginina; 0,13 g.L<sup>-1</sup> de Leucina; 0,006 g.L<sup>-1</sup> de Treonina; 0,123 g.L<sup>-1</sup> de Glicina; 0,006 g.L<sup>-1</sup> de Treonina), 10 mL dos elementos traços (0,015 g.L<sup>-1</sup> de EDTA Sal Dissódico; 0,0045 g.L<sup>-1</sup> de Sulfato de Zinco Heptahidratado; 0,001 g.L<sup>-1</sup> de Cloreto de Manganês II; 0,0003 g.L<sup>-1</sup> de Cloreto de Cobalto Hexahidratado; 0,0003 g.L<sup>-1</sup> de Sulfato de Cobre II; 0,0004 g.L<sup>-1</sup> de Molibdato de Sodio Dihidratado; 0,0045 g.L<sup>-1</sup> de Cloreto de Cálcio Dihidratado; 0,003 g.L<sup>-1</sup> de Sulfato de Ferro; 0,001 g.L<sup>-1</sup> de Ácido Bórico; 0,0001 g.L<sup>-1</sup> de Iodeto de Potássio; 0,113 g.L<sup>-1</sup> de Alanina; 0,110 g.L<sup>-1</sup> de Valina; 0,014 g.L<sup>-1</sup> de Metionina; 0,067 g.L<sup>-1</sup> de Fenilalanina; 0,085 g.L<sup>-1</sup> de Serina; 0,025 g.L<sup>-1</sup> de Histidina; 0,046 g.L<sup>-1</sup> de Lisina) e 1 mL de vitaminas (0,002 g.L<sup>-1</sup> de D-biotina; 0,04 g.L<sup>-1</sup> de Cálcio d-Pantotenato; 0,04 g.L<sup>-1</sup> de Ácido Nicotínico; 0,965 g.L<sup>-1</sup> de Myo-Inositol; 0,04 g.L<sup>-1</sup> de Cloridrato de Tiamina; 0,04 g.L<sup>-1</sup> de Cloridrato de Piridoxal; 0,008 g.L<sup>-1</sup> de Ácido p-Aminobenzoico).

As especificações para as fermentações foram determinadas a partir da análise do período de incubação realizado por Santos et.al. (2021a) e da observação da prejudicialidade da cepa floculante quando presente a uma taxa igual ou superior à 30%.

Os ensaios foram conduzidos em placas de fermentação, com a adição de 2,5 mL do mosto sintético, 0,09 g.L<sup>-1</sup> da levedura contaminante, 0,00525 g.L<sup>-1</sup> de cada levedura industrial e as respectivas suplementações minerais destacadas na Tabela 1. A fermentação ocorreu a uma temperatura de 30°C, sob agitação de 150 rpm e por 72 horas.

Para cada ensaio fez-se o ajuste da concentração inicial para 0,2 g.L<sup>-1</sup> com o intuito de plaquear e identificar as leveduras a partir das suas características macromorfológicas de crescimento. Desse modo, fez-se diluições seriadas até 10<sup>-3</sup> em tubos de eppendorfs com água estéril e transferiu-se uma alíquota de 100µL para uma placa de manutenção com meio GPY sólido. As placas foram incubadas a 30°C por 48 horas, e as colônias foram contabilizadas para determinação da taxa de contaminação.

A quantidade de açúcares e a presença de outros metabólitos foram analisados por cromatografia líquida de alta performance (HPLC - *High Performance Liquid Chromatography*), retirando 1mL das amostras fermentadas para centrifugação por 2 minutos a 8000 rpm. O sobrenadante foi separado das células e diluído na proporção de 1:5. Após, parte do sobrenadante foi filtrado em filtros Merck Millex-GP Filter de porosidade 0,22 µm, colocados em vials e injetado no cromatógrafo da marca @Shimadzu, modelo Prominance, com detectores de índice de refração (RID-20 A) e UV-VIS (SPD-20A).

Seguindo as definições de Santos et.al (2021a), as concentrações de biomassa celular foram estimadas pela curva de calibração expressa por X = 0,535.ABS, sendo ABS a absorbância.

A eficiência fermentativa ( $\eta$ ), produtividade ( $\emptyset$ ) e fator de conversão de substrato em produto ( $Y_P/S$ ) foram calculados por meio dos valores de residual de açúcares e concentração de etanol conforme disposto nas respectivas equações 1, 2 e 3.

$$\eta = \frac{Pf/(S0 - Sf)}{0,535} \times 100 \quad (1)$$

$$\emptyset = \frac{Pf - P0}{tf} \quad (2)$$

$$Y_P/S = \frac{Pf - P0}{S0 - Sf} \quad (3)$$

Sendo:  $\eta$  = Eficiência fermentativas (%);  $P_f$  = Concentração final de etanol ( $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ );  $P_0$  = Concentração inicial de etanol ( $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ );  $S_f$  = Concentração final de substrato ( $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ );  $S_0$  = Concentração inicial de substrato ( $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ );  $\emptyset$  = Produtividade ( $\text{g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ );  $t_f$  = Tempo total de fermentação (h);  $Y_{P/S}$  = Fator conversão do substrato a produto ( $\text{g}_{\text{etanol}} \cdot \text{g}^{-1}$ ).

Os delineamentos foram do tipo simplex, com o número de minerais identificados respectivamente como prejudiciais e benéficos, com nível superior e inferior conforme a suplementação adicionada, e acrescido do ponto central.

Primeiramente fez-se um planejamento para misturas com os minerais prejudiciais ao processo fermentativo para caracterizar o cenário desfavorável. A partir deste resultado, um delineamento de misturas com os minerais identificados como benéficos foi realizado no meio.

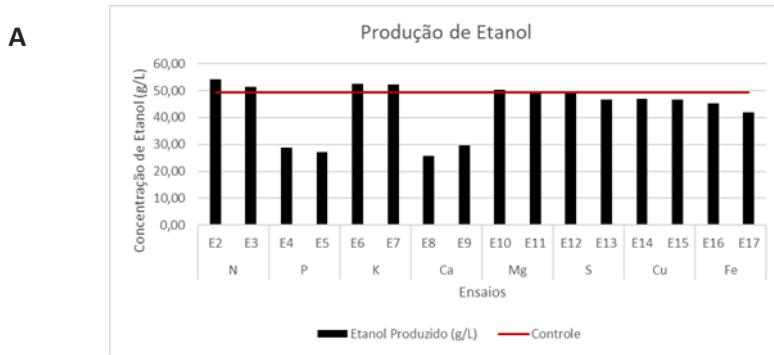
## RESULTADOS E DISCUSSÕES

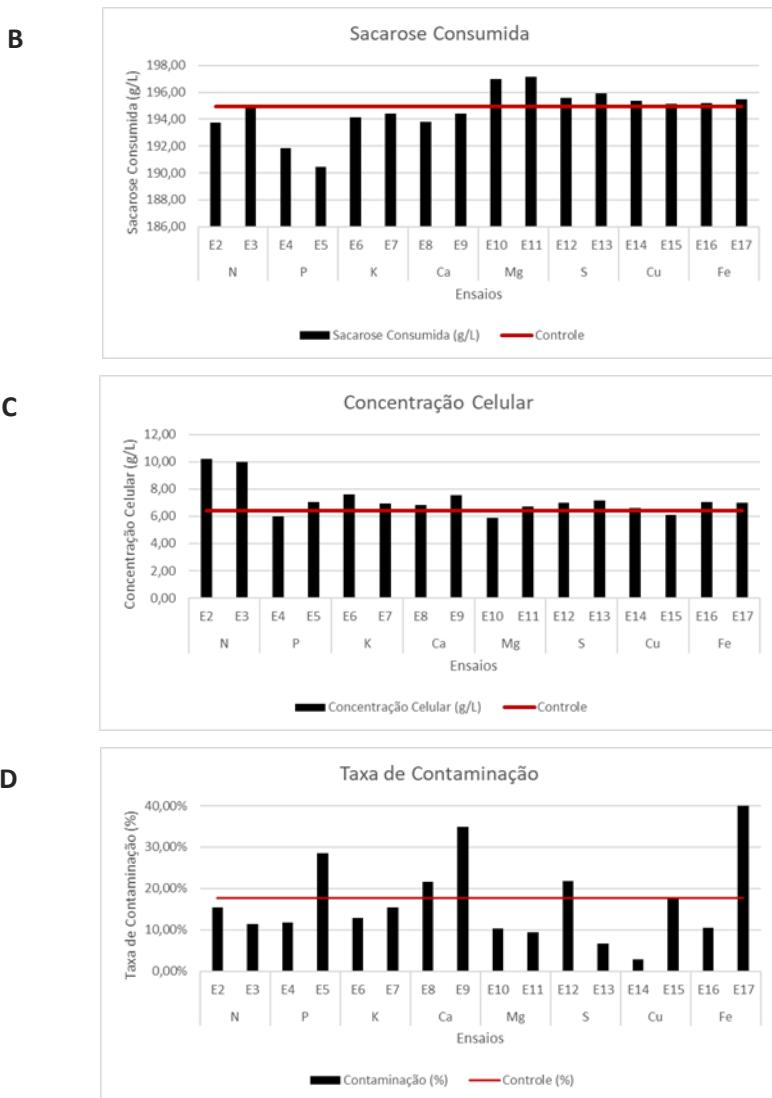
Como fósforo e potássio foram suplementados com a mesma fonte de enriquecimento ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), pode haver interferência nos reais valores suplementados para cada mineral, assim como magnésio e enxofre que também usam a mesma fonte de enriquecimento ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ). Além disso, cobre e ferro são suplementados com soluções que possuem o íon  $\text{S}^{++}$ , o que também pode alterar a concentração avaliada do elemento.

Com uma posterior avaliação da mistura e análises separadas para cada meio, as concentrações estabelecidas para suplementação foram mantidas visto que o objetivo é identificar as condições fermentativas de cada ensaio e as variações são irrigúrias.

As fermentações suplementadas foram comparadas ao controle (E1), observando a produção de etanol, sacarose residual, concentração celular e a taxa de contaminação como parâmetros principais expressos na Figura 1.

Figura 1 - Resultados de produção de etanol (A), consumo de sacarose (B), concentração celular (C) e taxa de contaminação (D) dos ensaios suplementados.





Os ensaios com nitrogênio aumentam a eficiência fermentativa respectivamente em 5% e 3%, observada pela produção de etanol superior e consumo de açúcares inferior ao controle. O mineral mostra-se como fator limitante para a multiplicação dos microrganismos, aumentando significantemente a concentração celular conforme observado na Figura 1C (Vairo et al., 1975 apud Lopes, 1989). Além disso, proporciona melhores condições para o desenvolvimento das leveduras, inibindo a ação de contaminantes (Bishop, 1971).

Oliveira e Souza (1970) apud Lopes (1989) apontam que a presença do fósforo atua na célula da levedura, influindo no sistema ADP-ATP e, consequentemente, no metabolismo nitrogenado. Ao suplementar fósforo, a eficiência fermentativa e a produtividade reduzem 40% em comparação com o controle e correspondem a cerca de 50% do encontrado para o nitrogênio. Para a concentração de 0,400 g.L<sup>-1</sup> (E6), a contaminação de leveduras selvagens em 28,6% indica estabilidade para a

taxa inicial de 30%, sugerindo que a presença do elemento afeta sobretudo as leveduras industriais inoculadas no sistema.

A adição de potássio induz a produção de etanol, a concentração celular e o menor consumo de sacarose, com eficiência fermentativa, produtividade, conversão de substrato em produtos e em células aumentando em 7%. O potássio auxilia na absorção do íon fosfato pela levedura, indicando que a suplementação aumenta a concentração do elemento e, consequentemente, a atividade do íon  $\text{PO}_4^{3-}$  (Lopes, 1989). Assim, os resultados obtidos para os ensaios suplementados com fósforo podem indicar escassez de potássio para o beneficiamento do processo, enquanto nos ensaios suplementados com potássio, as concentrações sugeridas mostram-se adequadas.

Em ambos os ensaios suplementados com cálcio, a taxa de contaminação é superior aos 30% iniciais, indicando que o mineral beneficia leveduras selvagens e provavelmente coloca-a como dominante no processo de fermentação (Teixeira et al., 1995). A linhagem LFS tende a reduzir os valores da concentração final de etanol, produtividade e eficiência fermentativa comparando-a com linhagens industriais (Santos et.al, 2021a). Desse modo, o favorecimento do cálcio à ação desta levedura corresponde aos ensaios mais insatisfatórios, com eficiência fermentativa de 24,9% e 28,4%, e produtividade de  $0,36 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$  e  $0,41 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$  para as suplementações E8 e E9.

A biodisponibilidade de magnésio atua na multiplicação celular e na proteção aos estresses gerados pela presença de metabólitos no decorrer do processo (Walker e Maynard, 1996). Mesmo com produção de etanol a níveis do controle, houve maior consumo de sacarose, e uma pequena redução na eficiência fermentativa (1,1%). Entretanto, para as concentrações avaliadas, as respectivas taxas de contaminação em 10,3% e 9,3% sugerem uma atuação eficaz do mineral frente a atividade das leveduras selvagens, viabilizando as reações da via glicolítica.

O ensaio com  $0,400 \text{ g.L}^{-1}$  de enxofre (E13) reduz a taxa de contaminação para 6,7% e mostra-se mais ideal que o ensaio E12, com  $0,300 \text{ g.L}^{-1}$  de enxofre, e contaminação superior ao controle (21,8%). O enxofre atua como cofator para várias enzimas, assim como o cobre; uma possível competição entre estes minerais pode afetar a toxicidade do meio, prejudicando a atuação das leveduras (Lima, 2019). Desse modo, a menor concentração de enxofre não atinge níveis suficientes para a sua ação, deixando-o em excesso no meio. Por outro lado, os parâmetros fermentativos possuem valores próximos ao controle, com redução em cerca de 5%.

Naiki e Yamagata (1976) observaram que a tolerância ao cobre depende das espécies de leveduras usadas, podendo inibir ou favorecer o meio. Em paralelo, os ensaios suplementados com cobre evidenciam este fato e a possível competição com o enxofre, com taxa de contaminação de 2,9% (E14) na concentração de  $0,010 \text{ g.L}^{-1}$ , e de 17,6% (E15) na concentração de  $0,015 \text{ g.L}^{-1}$ . Os parâmetros fermentativos também sofrem uma redução de 5% comparado ao controle, evidenciando um comportamento semelhante nas suplementações com cobre e enxofre.

A eficiência fermentativa nos ensaios suplementados com ferro apresenta respectivas reduções de 9% e 15%. Na concentração de  $0,100 \text{ g.L}^{-1}$ , observa-se a maior contaminação dentre os ensaios realizados. O ferro em excesso induz a absorção do íon nos vacúolos das leveduras *Saccharomyces cerevisiae* para

posterior utilização; em falta os microrganismos consomem fontes não fermentáveis de carbono para se desenvolverem sem prejuízos (Philpott e Protchenko, 2008). Indicando um possível excesso na suplementação, a redução da atividade fermentativa das leveduras industriais propicia o desenvolvimento da levedura selvagem, e maior contaminação do meio.

Os resultados inferem que fósforo, cálcio e ferro são os minerais mais prejudiciais à fermentação, afetando significativamente os parâmetros fermentativos, e atuando no favorecimento das leveduras selvagens. Assim, nos planejamentos experimentais, avaliou-se a taxa de contaminação e a produção de etanol como variáveis principais, visto que seus valores interferem diretamente na condição do meio.

Desse modo, fez-se um delineamento de mistura do tipo simplex-lattice com 10 ensaios, acrescido do ponto central, nas mesmas condições fermentativas e adicionando as respectivas concentrações minerais previstas pelo planejamento (Neto et.al., 2010).

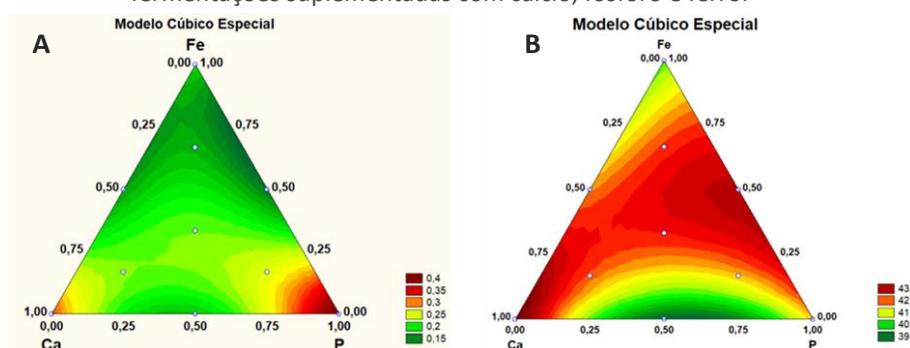
A análise de variância ao nível de 5% de significância indicou que modelos cúbicos avaliam com maior precisão os efeitos da interação ternária entre os minerais. Os coeficientes não significativos foram removidos e o comportamento da taxa de contaminação e do etanol gerado apontam ausência de interação sinérgica ou antagônica entre fósforo, cálcio e ferro, de modo que cada mineral exerce um efeito individual nas variáveis respostas, conforme expresso na Tabela 2.

Tabela 2 – Modelo matemático para os parâmetros fermentativos avaliados em função da concentração do cálcio ( $x_1$ ), fósforo ( $x_2$ ) e ferro ( $x_3$ ).

Variável resposta	Modelo matemático	R <sup>2</sup>
Taxa de Contaminação	$y = 0,312451x_1 + 0,423073x_2$	0,6898
Etanol Gerado	$y = 43,9989x_1 + 41,4526x_2 + 40,3059x_3$	0,7646

Para compreender o comportamento do sistema de mistura em todo o espaço experimental, usou-se a metodologia de superfície de resposta disposta na Figura 2 para avaliar a correlação entre os minerais (Reis e Andrade, 1996). O etanol gerado, de fato, é afetado pela presença do cálcio e do fósforo, quando suplementados individualmente, sem perturbações consideráveis na mistura. No entanto, a contaminação sofre maior interferência destes minerais, mantendo a taxa superior ao controle nos ensaios em que estão presentes em maiores quantidades, conforme previsto pelo delineamento.

Figura 2 – Curvas de nível para a (2A) contaminação e a (2B) produção de etanol das fermentações suplementadas com cálcio, fósforo e ferro.



Corroborando com os estudos de Santos et.al (2021a), os ensaios com cálcio suplementado em maior proporção favorecem as leveduras selvagens, aumentando a taxa de contaminação para misturas binárias com ferro, e interferindo na avaliação ternária. Na Figura 2A, a região mais esverdeada entre Ca e P aponta que a interação não favoreceu a contaminação, diferentemente do eixo entre Ca e Fe, cuja região avermelhada indica maior presença dos microrganismos contaminantes na mistura entre estes minerais.

Lopes (1989), ao realizar o balanço de minerais em uma safra de cana de açúcar, concluiu que o ferro possui importância secundária no meio fermentativo quando comparado ao nitrogênio, fósforo e magnésio, por exemplo.

Assim, pressupõe-se para a taxa de contaminação, que nas interações entre Ca e Fe há uma sobreposição do cálcio e maior atuação no meio fermentativo, assim como entre P e Fe, com fósforo exercendo influência sobre o meio. Na interação entre Ca e P, não há favorecimento da levedura contaminante, podendo haver uma competição entre estes minerais e consequente redução de seus efeitos.

Em contrapartida, este cenário não se repete para a produção de etanol, sugerindo que a presença de cálcio, fósforo e ferro, em mistura, atinge majoritariamente os microrganismos contaminantes, e pouco influenciam na rota de formação do composto pelas leveduras industriais.

O delineamento sugere que o ferro possui efeito inferior aos demais nos ensaios de mistura e, o fósforo demonstra possível estabilidade ao manter os níveis de contaminação conforme o adicionado inicialmente.

Dante do encontrado pelo delineamento de misturas e pelos experimentos suplementados, o cálcio é o mineral mais prejudicial ao cenário fermentativo avaliado, por afetar o rendimento e produtividade do etanol favorecendo a ação da levedura selvagem e elevando sua contaminação no meio.

Para analisar a interação dos demais minerais no meio fermentativo menos favorável, fez-se um delineamento de misturas do tipo simplex-centroide com o número de experimentos igual a  $2^{n-1}$ , na qual n é o número de minerais identificados como mais favoráveis ao processo, acrescido do ponto central (Neto et al, 2010).

A partir dos resultados dos ensaios suplementados, nitrogênio, magnésio, enxofre e cobre mostraram-se benéficos ao processo, por reduzir a contaminação e produzir etanol em quantidades iguais ou superiores ao controle. O potássio, apesar do aumento na eficiência fermentativa e na produtividade, utiliza da mesma fonte de enriquecimento que o fósforo; diante das concentrações estabelecidas pelo delineamento, optou-se por não utilizar este mineral, para evitar interferências na análise e uma possível atuação/suplementação do fósforo no meio.

Os 15 ensaios foram realizados no cenário mais desfavorável a fermentação, suplementando cálcio a 0,300 g.L<sup>-1</sup> em todos os ensaios, e as respectivas concentrações minerais propostas pelo delineamento.

Ao nível de 5% de significância, a taxa de contaminação expressa pelo modelo cúbico destaca a atuação individual do magnésio, enxofre e cobre, e a interação sinérgica entre N, Mg e Cu no meio. Para o etanol gerado, o modelo cúbico não

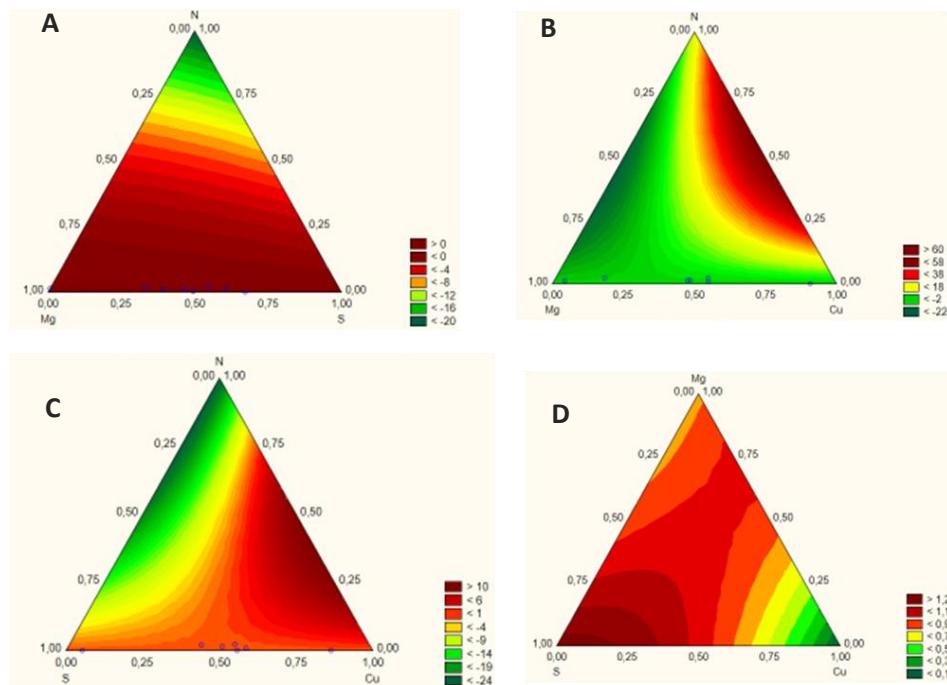
apresenta variáveis significativas e o modelo linear descrito na Tabela 3 aponta que apenas o nitrogênio atua de maneira benéfica na fermentação.

Tabela 3 – Modelos matemáticos para os parâmetros fermentativos avaliados em função da concentração do nitrogênio ( $x_1$ ), magnésio ( $x_2$ ), enxofre ( $x_3$ ) e cobre ( $x_4$ ).

Variável resposta	Modelo matemático	$R^2$
Taxa de Contaminação	$y = 0,2145x_2 + 0,2874x_3 + 0,2187x_4 - 25,1074x_1x_2x_4$	0,9989
Etanol Gerado	$y = 153,079x_1$	0,6218

Em complemento, as Figuras 3 e 4 apresentam as curvas de nível resposta, resultantes dos modelos, em função das diferentes concentrações de nitrogênio, magnésio, enxofre e cobre.

Figura 3 – Curvas de nível para a taxa de contaminação em função da combinação quaternária realizada no delineamento de mistura simplex-centroide.



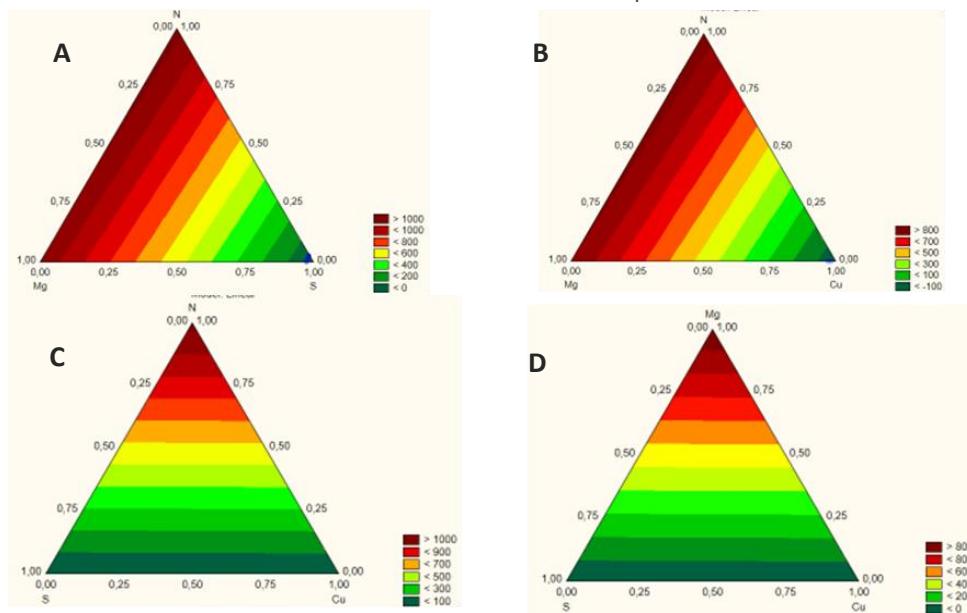
A faixa entre magnésio e enxofre (Figura 3A) demonstra maior uniformidade, provavelmente pela mesma fonte de enriquecimento usada, indicando que a combinação não favoreceu o meio.

A presença do nitrogênio auxilia no desenvolvimento das leveduras e aumenta o desempenho fermentativo quando suplementado no meio (Alves e Del Bianco, 1971; Santos, 2008). Os vértices esverdeados (Figuras 3A, 3B e 3C) fundamentam a ação individual do mineral, bem como a ampla faixa entre N e Mg (Figura 3B), e N e S (Figura 3C). A relação entre nitrogênio e cobre mostra-se prejudicial pela faixa mais avermelhada nas Figuras 3B e 3C, indicando que na relação binária, a presença do cobre pode gerar toxicidade ao meio.

As fermentações requerem uma quantidade diminuta de enxofre e cobre por compartilharem a mesma função e atuarem como cofatores para várias enzimas (Lima, 2019). A provável competição conduz um mineral à função, e dispõe o outro como excesso que eleva a toxicidade para as leveduras. Assim, na faixa entre

enxofre e cobre (Figura 3C e 3D), enquanto um reduz a ação dos microrganismos contaminantes, o outro favorece.

Figura 4 – Curvas de nível para o etanol gerado em função da combinação quaternária realizada no delineamento de mistura simplex-centroide.



A semelhança entre as Figuras 4A e 4B, e 4C e 4D evidenciam um comportamento semelhante do processo fermentativo na geração de etanol.

A adição de fontes de nitrogênio tende a aumentar o rendimento fermentativo (Russel, 2003). Ainda que o modelo esteja em função deste mineral, a região de contorno da resposta evidencia que enxofre e cobre concentram as regiões mais favoráveis; na análise estatística, as variáveis são significativas a 8% e 6% de significância, indicando que neste caso, um aumento no nível de análise embasa e justifica modelo, como disposto na equação 4.

$$y = 153,079x_1 + 18,104x_3 + 90,945x_4 \quad (4)$$

As regiões mais esverdeadas para enxofre e cobre destacam sua importante atuação na mistura, indicando que apesar da competição pelas leveduras e aumento da contaminação, os minerais mantêm a produção de etanol em valores satisfatórios.

Na presença de meios suplementados com cálcio, manganês e cobre, o magnésio atua no direcionamento metabólico de *Saccharomyces cerevisiae* (Ferreira, 2015). A adição de Ca e a presença de microrganismos contaminantes pode inibir esta ação, afetando o desempenho do mineral no meio, impedindo sua correta atuação, e demonstrando prejudicialidade aos ensaios.

De modo semelhante, os vértices do nitrogênio e a faixa avermelhada entre N e Mg indicam não favorecimento ao processo. Apesar de reduzir a contaminação, o mineral não impulsiona o desempenho fermentativo, sugerindo que o cálcio prejudica a fermentação, independente das leveduras selvagens.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diante dos minerais avaliados, magnésio, cobre, enxofre, nitrogênio e potássio favorecem o processo, sendo os dois últimos com resultados mais expressivos, aumentando a eficiência fermentativa, respectivamente, em 4,5% e 7%, e reduzindo a contaminação em 24% e 20%. Cálcio, fósforo e ferro apresentam reduções nos parâmetros fermentativos avaliados, indicando que a suplementação com estes minerais afeta desfavoravelmente o meio. Os experimentos de mistura com estes minerais evidenciaram o efeito individual de cada um deles, apontando que a interação não afeta o processo de maneira significativa e que a suplementação com cálcio é a que mais prejudica o meio. Na avaliação dos minerais identificados como favoráveis, adicionados no cenário mais prejudicial, observou-se que a redução da contaminação não acompanha a produção de etanol, indicando uma complexa correlação entre as variáveis analisadas e as proporções minerais usadas. Entretanto, a interação quaternária, retrai a contaminação em 83% e reduz a geração de etanol em 7%, valores significativos e usuais diante do encontrado no cenário desfavorável. Dessa maneira, o presente estudo evidencia a necessidade da avaliação mineral dos meios fermentativos, de modo a identificar excessos prejudiciais ao processo, e atuar na promoção do desempenho e da produtividade com uma medida simples e barata como a suplementação a níveis adequados dos componentes essenciais.

# Evaluation of mineral supplementation in alcoholic fermentation with mixed culture of *Saccharomyces cerevisiae* yeasts

## ABSTRACT

This study aims to analyze the impact of mineral nutrients on reducing contamination and improving ethanol yield. For this, a contaminating wild yeast was isolated from a Brazilian alcohol industry and used in mixed culture with four cultivated industrial yeasts. The experiments were carried out with 30% of wild yeast and 17.5% of each industrial yeast. Fermentations occur for 72 hours and in 2.5 mL of synthetic must supplemented according by literature specifications. The tests demonstrated that calcium, phosphorus and iron affect the process negatively and a mixture design indicated calcium as the most disadvantageous between the minerals evaluated. In contrast, the addition of nitrogen, magnesium, sulfur and copper enhance the process, reducing contamination by 20% and increasing ethanol production by 7%.

**KEYWORDS:** Contaminating yeast. Mineral nutrient balance. Ethanol production. Synthetic sugar cane must. Mixture design.

## REFERÊNCIAS

- ALVES, T. C. F.; BIANCO, V. del. “**Tecnologia dos processos bioquímicos**”, 1971.
- ANDRIETTA, M. G. S. et al. “**Bioethanol-Brazil, 30 years of Proálcool**”, International Sugar Journal, Vol. 109, No 1299, pp 195-200, 2007.
- BADER, J. et al. “**Relevance of microbial co culture fermentations in biotechnology**”, Journal of applied microbiology, Vol. 109, No 2, pp 371-387, 2010.
- BAEYENS, J. et al. “**Challenges and opportunities in improving the production of bio-ethanol**”, Progress in Energy and Combustion Science, Vol. 47, pp 60-88, 2015.
- BISHOP, L. R. “**Horace Brown Memorial Lecture a conspectus of brewing progress**”, Journal of the Institute of Brewing, Vol. 77, No 1, pp 12-24, 1971.
- CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. “**Brasil alcança a maior produção de etanol da história**”, Material Digital, 2020.
- FERREIRA, D. S. “**Efeito da suplementação mineral com magnésio e cobre no comportamento fisiológico de *Saccharomyces cerevisiae***”, Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas), Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, 2015.
- LASKIN, A. I.; BENNETT, J. W.; GADD, G. M. “**Advances in applied microbiology**”, Academic Press, 2003.
- LIMA, U. de A. “**Biotecnologia Industrial - Vol. 3: Processos fermentados e enzimáticos**”, Editora Blucher, 2019.
- LOPES, J. J. C. “**Balanço de nutrientes minerais no processo Melle-Boinot de fermentação alcoólica**”, Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, 1989.
- NAIKI, N.; YAMAGATA, S. “**Isolation and some properties of copper-binding proteins found in a copper-resistant strain of yeast**”, Plant and Cell Physiology, Vol. 17, No 6, pp 1281-1295, 1976.
- NETO, B. B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. “**Como Fazer Experimentos: Pesquisa e Desenvolvimento na Ciência e na Indústria**”, Bookman Editora, 2010.

PHILPOTT, C. C.; PROTCHENKO, O. “**Response to iron deprivation in *Saccharomyces cerevisiae***”, Eukaryotic cell, Vol. 7, No 1, pp 20-27, 2008.

REIS, C.; ANDRADE, J. C. “**Planejamento experimental para misturas usando cromatografia em papel**”, Química Nova, Vol. 19, No 3, pp 313-319, 1996.

Revista Nova Cana. “**Produção de Etanol precisa crescer 82% até 2026**”, Material Digital, 2021.

RUSSELL, I.; “**Understanding yeast fundamentals**”, The alcohol textbook, Vol. 4, pp 531-537, 2003.

SANTOS, A. M. dos. “**Estudo da influência da complementação de nutrientes no mosto sobre o processo de fermentação alcoólica em batelada**”, Dissertação (Mestrado em Engenharia Química), Universidade Federal de Alagoas, 2008.

SANTOS, C. O. dos. et al. “**Industrial yeast strains competence in mixed culture with wild flocculent yeast**”, Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, Vol. 36, pp 102-144, 2021a.

SANTOS, M. V. et al. “**Interaction between *S. cerevisiae* MONA, PE-2, CAT-1 and ATCC in fermentation sugar cane broth**”, Research, Society and Development, Vol. 10, No 2, pp e54710212791 - e54710212791, 2021b.

SCHWAN, R.F. et al. “**Microbiology and physiology of cachaça (aguardente) fermentations**”, Antonie van Leeuwenhoek, Vol. 79, No 1, pp 89-96, 2001.

SILVA, F. C. “**Manual de Análise Química de Solos, Plantas e Fertilizantes**”, 2<sup>a</sup> Edição, EMBRAPA, Informações Tecnológicas, Brasília, 2009.

TEIXEIRA, J. A. et al. “**Cell wall surface properties and flocculence of a *Kluyveromyces marxianus* strain**”, Colloids and surfaces B: Biointerfaces, Vol. 5, No 3-4, pp 197-203, 1995.

WALKER, G. M.; MAYNARD, A. I. “**Magnesium-limited growth of *Saccharomyces cerevisiae***”, Enzyme and microbial technology, Vol. 18, No 6, pp 455-459, 1996.

**Recebido:** 2025-06\_26**Aprovado:** 2025\_09\_25.**DOI:** 103895/recit. V16n41.20456**Como citar:** SILVEIRA, L.G.S.; CASTIGLIONI, G. L.; FREITAS, E.E.; T. Avaliação da suplementação mineral em fermentação com cultura mista de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* R. Eletr. Cient. Inov. Tecnol. Medianeira, v. 16. n. 41, p. 57-73, set/dez, 2025 Disponível em: <<https://periodicos.utfpr.edu.br/recit>>. Acesso em: XXX.**Correspondência:**J Larissa Gabriele Silva Silveira <http://orcid.org/0000-0003-2601-450X>

Universidade Federal de Goiás, Instituto de Química Goiânia, Goiás, Brasil

**Direito autoral:** Este artigo está licenciado sob os termos da Licença creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0 Internacional.