



## X Congresso Brasileiro de Engenharia Química Iniciação Científica

*“Influência da pesquisa em Engenharia Química no desenvolvimento tecnológico e industrial brasileiro”*

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro  
Universidade Severino Sombra  
Vassouras – RJ – Brasil

### ESTUDO DA CONTAMINAÇÃO EM FERMENTAÇÃO ALCÓOLICA COM LEVEDURAS FLOCULANTES

**SOUSA\*<sup>1</sup>, M.D.B.; CECÍLIO\*<sup>1</sup>, M.S.A.; GUIDINI<sup>2</sup>, C.Z.; MARQUEZ<sup>3</sup>, L.D.S.; RIBEIRO<sup>3</sup>, E.J.**

<sup>1</sup>Aluna da FEQ/UFU    <sup>2</sup>Doutoranda do FEQ/UFU    <sup>3</sup>Professor (a) da FEQ/UFU  
Faculdade de Engenharia Química - Universidade Federal de Uberlândia

*Endereço – UFU, Av. João Naves de Ávila, 2121, Campus Santa Mônica – Bloco 1K, CEP. 38400-902, MG,*

email: libia@feq.ufu.br

**RESUMO** – A volatilidade dos preços dos combustíveis a base de petróleo no mundo e a segurança do clima brasileiro impulsionam a pesquisa por fontes de energia alternativas e o desenvolvimento de pesquisas em biocombustível para substituição do petróleo desde 1970. O estudo da fermentação alcoólica utilizando leveduras floculantes aparece como uma alternativa à diminuição dos custos desta produção pela facilidade de separação das leveduras do meio fermentado por um processo de decantação. Uma das preocupações é o tratamento das contaminações durante a fermentação, este trabalho estuda o efeito de antibiótico natural em comparação ao antibiótico comercial Kamoran que em alguns casos tem seu uso limitado por restrições à saúde ou a resistências de cepas. Foram realizadas fermentações em bateladas com concentração de 160 g/L de sacarose, à temperatura controlada em 32°C sem contaminação; com contaminação e sem antibiótico; contaminada e tratada com 3 ppm de Kamoran; e contaminada e tratada com 35 ppm de beta bio, condições dos antibióticos recomendadas pelos fabricantes. Concentrações como: 1ppm de Kamoran e beta bio nas concentrações de 20 e 45ppm também foram analisados. As fermentações ocorreram em 10 horas, obtendo-se 92% de rendimento da fermentação sem contaminação, valor este reduzido a 50% quando contaminada; 83% quando tratada com Kamoran (3ppm) e 86,6% com a utilização do beta bio (35ppm).

**Palavras chave:** antibiótico, Kamoran, beta bio.

### INTRODUÇÃO

O petróleo sempre teve grande destaque no setor energético nacional e mundial. Entretanto, visando diminuir os problemas ambientais e devido às perspectivas de esgotamento das fontes não renováveis de

combustíveis fósseis, o biocombustível surgiu como uma opção mais viável para assegurar um futuro sustentável.

Por volta de 1970, com a crise do petróleo, instaurou-se no Brasil o programa Pró- Álcool, no qual consistia no incentivo à substituição do petróleo pelo etanol. Foi então, que o álcool

\*Bolsista CNPQ.

começou a surgir como uma nova alternativa de biocombustível, uma vez que se comparado aos combustíveis fósseis, o etanol apresenta as vantagens de ser uma fonte renovável de energia, que contribui com a redução das emissões de poluentes.

Nesse contexto, o desafio passou a ser a identificação dos gargalos que limitam os processos de fermentação industriais e o desenvolvimento de processos que forneçam alta produção de etanol (Alfenore *et al.*, 2004).

Atualmente, a utilização de leveduras suspensas no meio fermentativo em plantas industriais de produção de etanol é muito ampla. Porém, devido à dificuldade de se operar com altas densidades de leveduras a produção de etanol acaba inevitavelmente sendo mais baixa. Um recurso para o aumento dessa produtividade seria a separação das células por centrifugação e reciclo das mesmas ao reator. Entretanto, os altos investimentos de capital e elevado custo energético de operação das centrífugas estão associados ao custo de tratamento e bombeamento da corrente de reciclo que elevam o custo do produto final e entravam sua aplicação em plantas químicas produtoras de etanol, especialmente em países em desenvolvimento, onde o custo energético é relativamente alto (Xu *et al.*, 2005, Filho, 2007).

A aplicação de cepas floculantes, como por exemplo, a espécie *Saccharomyces cerevisiae*, no processo de fermentação alcoólica vem sendo analisada, uma vez que essas cepas possuem a capacidade de se agregarem espontaneamente e formarem flocos, resultantes da ligação das proteínas com os receptores da superfície celular e da movimentação das células, que se concentram no fundo do reator após a transformação dos açúcares presentes no caldo de cana em álcool.

Dessa maneira, a retenção das células floculantes no reator possibilita sua reutilização, dispensando assim a centrifugação do vinho fermentado e garantindo uma economia em termos de aquisição e manutenção de centrífugas.

Entretanto, dentre os diversos fatores físicos, químicos e microbiológicos que podem afetar a floculação de leveduras, o rendimento da fermentação e a eficiência da conversão de açúcar em etanol (ZHAO *et al.*, 2009, LIMA

*et al.*, 2001), uma das preocupações é o tratamento das contaminações durante a fermentação alcoólica.

Com isso, o estudo do efeito de antibióticos naturais bem como os comerciais, se torna um fator importante a ser analisado de modo a contribuir e auxiliar no aumento da produtividade e na redução do custo do processo, promovendo assim a aplicação de cepas floculantes na produção de etanol a nível comercial.

## MATERIAIS E MÉTODOS

Utilizou-se como micro-organismo *Saccharomyces cerevisiae* com características floculantes, denominada C2/00, doada pelo Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA). Os reagentes utilizados foram todos de grau analítico, com exceção do açúcar, que foi sacarose comercial. A composição do meio para cultivo das leveduras consistiu-se de sacarose comercial (160 g/L),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (5 g/L),  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (1 g/L),  $[\text{NH}_4]_2\text{SO}_4$  (2 g/L) e extrato de levedura (6 g/L) (Pacheco, 2010).

Os experimentos foram realizados no em um fermentador Biostat M ( B. Braun Co., Alemanha) operado em batelada e com volume de 2L e operado com 1,5L de meio. Este reator é dotado de camisa para recirculação de água proveniente de um banho termostaticado, no qual se manteve a temperatura constante em  $32^\circ\text{C} \pm 0,2$  em todos os ensaios. O pH foi ajustado apenas no início da fermentação em 4,5.

O contaminante foi obtido através da exposição do caldo de cana ao ambiente durante 7 dias, fazendo com que o caldo fosse contaminado naturalmente. Este contaminado foi centrifugado, decantado e a fase (cultura mista) foi armazenada a  $5^\circ\text{C}$  e depois adicionada ao decantado celular de *Saccharomyces cerevisiae* floculante. O decantado celular utilizado foi de 150 g o que corresponde a 10% (v/v) do reator, esse decantado celular tem uma contaminação de  $10^{10}$  UFC/mL e concentração de leveduras de  $10^8$  células/mL.

Os agentes antibacterianos utilizados nos processos fermentativos foram um antibiótico natural Beta Bio (Hopsteiner Trading (Zhuhai)

Co., Ltd.), um extrato de lúpulo, predominantemente com  $\beta$ -ácidos  $45 \pm 15\%$  dissolvido em propileno glicol de grau alimentício  $35 \pm 5\%$  e o antibiótico comercial Kamoran (Química Real Brasil), monoenzima.

Para a verificação da eficiência dos antibióticos foram realizadas fermentações com a levedura floculante sem a presença de bactérias e com a presença de contaminantes. Na tentativa de controlar a contaminação foram testadas as concentrações 1, 3 e 6 ppm de Kamoran e para o beta bio utilizou as seguintes concentrações: 20, 35 e 45 ppm.

Os processos fermentativos foram acompanhados por análise de açúcares, de etanol e as contagens de células viáveis de bactérias e leveduras. Foram retiradas amostras de 20 mL, nos quais 2 mL foi utilizado para determinar as contagens de células e o restante centrifugado a 5000 rpm durante 15 min, a sacarose e o etanol do sobrenadante foram realizadas por análise no HPLC (HPLC modelo LC – 20ª destaque, Shimadzu, Japão).

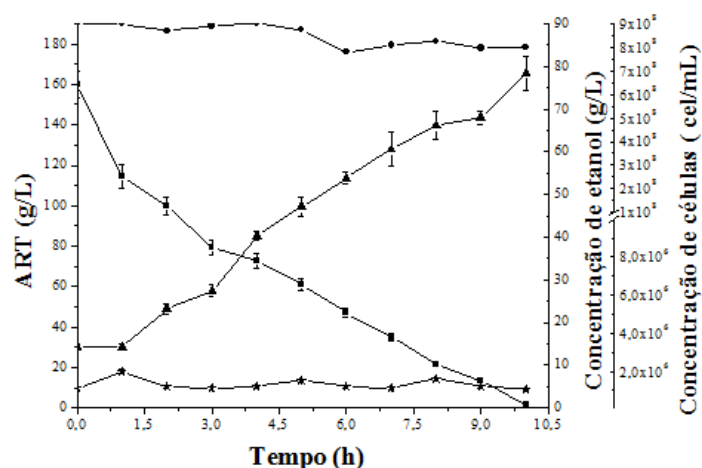
## RESULTADOS E DISCUSSÕES

As fermentações realizadas com a *Saccharomyces cerevisiae* com características floculantes em processo batelada a 32°C com 10% (v/v) de decantado celular alcançou rendimentos altos de 92%, o açúcar de concentração inicial de 160 g/L foi totalmente consumido em 10 horas de fermentação com produtividade de 7,84 g/L.h. As concentrações de etanol, sacarose e células de bactérias estão na Figura 1.

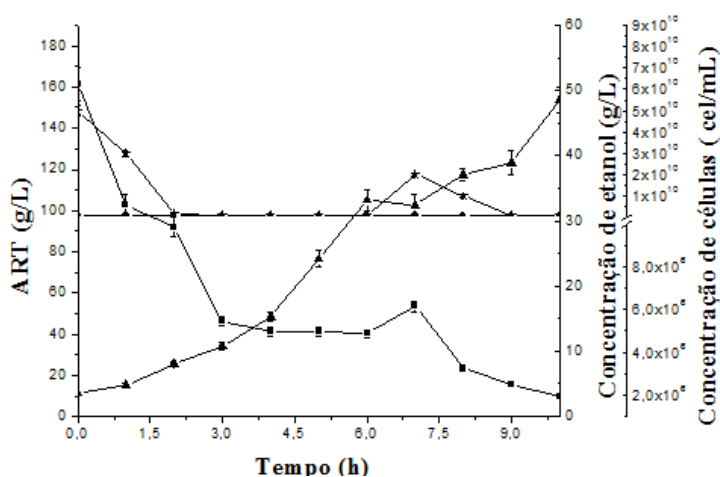
Ao contaminar as leveduras com as bactérias do caldo de cana a fermentação ocorreu conforme a Figura 2. Pode observar que a concentração de etanol obtida foi bem menor que quando não tinha contaminação a maior concentração foi de 48,56 g/L de etanol enquanto sem contaminação chegou a 78,44 g/L de etanol. Assim houve a necessidade de controlar essa contaminação para melhorar o rendimento e produtividade da fermentação alcoólica.

Inicialmente foram realizados testes utilizando o antibiótico comercial Kamoran na concentração indicada pelo fabricante 3 ppm,

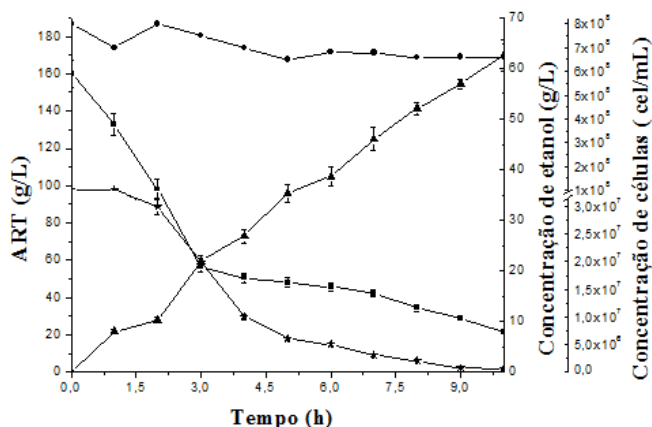
mostrado na Figura 3, o uso do antibiótico mostrou ser eficiente também no controle da contaminação utilizando leveduras floculantes, obtendo um rendimento de 83%. Foram testados as concentrações de 1 e 6 ppm de Kamoran, na concentração de 1 ppm o rendimento obtido foi muito baixo ficando em 67,42 % e na concentração de 6 ppm o rendimento aumentou para 89,5 % em 10 horas de fermentação e o açúcar residual de 1,45 g/L foi menor do que obtido na fermentação de 3 ppm de 21,31 g/L.



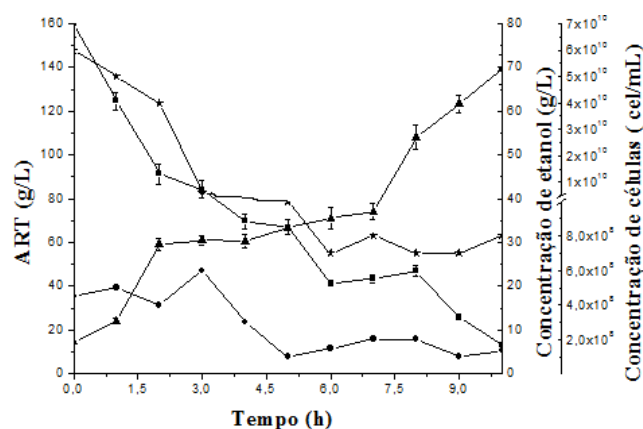
**Figura 1 - Fermentação com 160 g/L de sacarose sem contaminação (■ sacarose, ▲ etanol, ● células e bactérias x).**



**Figura 2 – Fermentação com 160 g/L de sacarose com contaminação (■ sacarose, ▲ etanol, ● células e bactérias x).**



**Figura 3 – Fermentação com 160 g/L de sacarose com contaminação e 3 ppm de Kamoran (■ sacarose, ▲ etanol, ● células e bactérias x).**



**Figura 4 – Fermentação com 160 g/L de sacarose com contaminação e 35 ppm de Beta-Bio (■ sacarose, ▲ etanol, ● células e bactérias x).**

No intuito de testar a eficiência de um antibiótico natural nas fermentações com leveduras flocculantes, foi utilizado o Beta Bio na concentração de 20 ppm, a recomendada pelo fabricante, em 10,5 h de fermentação ainda restava 8,56 g/L de sacarose e obteve apenas 56,27 g/L de etanol, resultando em um rendimento de 68,9%. Por isso aumentou-se a concentração para 35 ppm e o rendimento subiu para 88% e o comportamento da fermentação esta na Figura 4. Na tentativa de aumentar esse rendimento aumentou-se a concentração de Beta Bio para 45 ppm, mas não houve um aumento significativo de rendimento permanecendo na ordem de 88% e a diminuição da concentração de células de bactérias reduziu em 10 vezes.

O rendimento obtido por esse trabalho foi promissor e se comparado com o trabalho de Leite et al., 2012 que estudou a influência destes dois antibióticos no controle da contaminação da fermentação com *Saccharomyces cerevisiae* livre pode constatar que o rendimento alcançado com leveduras flocculantes foi maior do que com leveduras livres, mas a diminuição da concentração de bactérias e leveduras no trabalho de Leite et al., 2012 foi bem maior chegando a concentrações da ordem de  $10^5$  células /mL, enquanto no nosso trabalho tanto as concentrações de leveduras e bactérias não reduziram mais que  $10^7$  células/mL Isto indica ser a *Saccharomyces cerevisiae* flocculante um pouco mais resistentes aos efeitos dos antibióticos.

## CONCLUSÃO

Pode observar que a concentração celular de leveduras não se alterou durante os processos fermentativos. O rendimento da fermentação contaminada com bactérias diminuiu de 92% para 50%.

Os processos utilizando Kamoran obtiveram resultados satisfatórios, sendo que nas concentrações de 3 e 6 ppm foi obtido rendimentos de 83 e 89,5%, respectivamente. Nas fermentações utilizando o antibiótico natural beta-bio a melhor resposta foi na concentração de 35 ppm, atingindo um rendimento de 86,6%. Observa-se que o antibiótico natural teve uma grande atuação no controle da contaminação utilizando leveduras flocculantes.

## REFERÊNCIAS

- ALFENORE, S., CAMELEYRE, X., BENBADIS, L., BIDEAUX, C., URIBELARREA, J.L., GOMA, G., MOLINA-JOUE, C., GUILLOUET, S.E. (2004), Aeration strategy: A need for very high ethanol performance in *Saccharomyces cerevisiae* fed-batch process. *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 63, 537-542.
- FILHO, U. C. (2007) Engenharia Bioquímica. Uberlândia: Universidade Federal de Uberlândia (apostila).

- LEITE, I.R., FARIA, J.R., MARQUEZ, L.D.S., REIS, M.H.M., RESENDE, M.M., RIBEIRO, E.J., CARDOSO, V.L. (2012), Evaluation of hop extract as a natural antibacterial agent in contaminated fuel ethanol fermentations. *Fuel Processing Technology*, v.106, 611-618.
- LIMA, U. A., BASSOL, L. C., AMORIM, H.V. (2001), *Biotecnologia Industrial: Processos Fermentativos e Enzimáticos*. São Paulo: Edgard Blücher, v.3, 1-43.
- PACHECO, T. F. (2010), *Fermentação alcoólica com leveduras de características floculantes em reator tipo torre com escoamento ascendente*. 94 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia.
- XU, T. J., ZHAO, X. Q., BAI, F. W. (2005), Continuous ethanol production using self-flocculating yeast in a cascade of fermentors. *Enzyme and Microbial Technology*, v.37, 634 – 640.
- ZHAO, X. Q., BAI, F. W. (2009), Yeast flocculation: New story in fuel ethanol production. *Biotech. Adv.*, v.27, 849-856.

## **AGRADECIMENTOS**

Os autores agradecem a FAPEMIG, CNPq e CAPES pelo apoio financeiro. Ao CPQBA pela doação das cepas de levedura.