

ESTUDO DO CONTROLE DA CONTAMINAÇÃO NA FERMENTAÇÃO ALCÓOLICA COM *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* FLOCULANTES UTILIZANDO ANTIBIÓTICOS NATURAIS E COMERCIAIS

L.D. SANTOS¹, C.Z. GUIDINI¹, M.D.B.SOUSA¹, V.L. CARDOSO¹, E.J. RIBEIRO¹

¹ Universidade Federal de Uberlândia, Faculdade de Engenharia Química
E-mail para contato: libia@feq.ufu.br

RESUMO – A produção de bioetanol é uma alternativa interessante para a substituição dos combustíveis à base de petróleo. Com intuito de diminuir os custos desta produção, estudos são impulsionados na direção de encontrar leveduras e processos alternativos que alcancem altos rendimentos e produtividades para a fermentação alcoólica. O uso de leveduras floculantes se mostra interessante por facilitar a separação e, conseqüentemente, a reutilização de células pelo processo de decantação. Uma das preocupações na fermentação alcoólica é o tratamento das contaminações, assim o presente trabalho estuda o efeito de antibióticos natural em comparação ao antibiótico comercial Kamoran em fermentações com leveduras floculantes. Foram realizadas fermentações em bateladas com concentração de 160 g/L de sacarose a temperatura controlada em 32°C sem contaminação e controlando as contaminações com 1, 3 e 6 ppm de Kamoran e 5, 20, 35 e 45 ppm de Beta Bio. O rendimento das fermentações contaminadas com bactérias diminuiu de 92% para 60%. 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%.

1. INTRODUÇÃO

Os combustíveis derivados de petróleo representam em torno de 46% do consumo mundial de energia, enquanto no Brasil este percentual cai para 37,6%, porém como combustíveis fósseis, suas reservas são finitas e seu uso é uma fonte importante de emissão de gases de efeito estufa. Encontrar substitutos para estes combustíveis a partir de matérias orgânicas renováveis tem sido um grande objetivo da comunidade científica mundial. Uma das opções é o etanol, um excelente substituto para a gasolina, o principal combustível usado em automóveis no mundo (Lautenschlager, 2013).

No Brasil, o etanol produzido a partir da cana de açúcar substitui, atualmente, cerca de 50% da gasolina que seria consumida, e seu custo é competitivo sem os subsídios que viabilizaram a criação do Proálcool em meados da década de 1970. Segundo dados da Secretaria de Energia do Estado de São Paulo, em 2010, a participação de energias renováveis na matriz energética mundial era de apenas 12,5%, enquanto que na brasileira era de 45,5%. No Estado de São Paulo este percentual sobe para

55,5%, sendo que a energia dos derivados da cana de açúcar, etanol e bagaço, representa 35,5% do total, contra 17,8% para o restante do País. Estas participações da cana de açúcar na matriz energética brasileira provem de uma área cultivada da ordem de 4,2 milhões de hectares, o que representa em torno de 0,5% da área agricultável do País (Lautenschlager, 2013).

A produção brasileira de bioetanol tem crescido substancialmente, numa taxa de crescimento muito acima da expansão da área agrícola empregada para a cultura da cana. Este fato se deve aos avanços tecnológicos alcançados, tanto na área agrícola, como na área industrial. Nesta, os processos de fermentação alcoólica evoluíram a partir dos sistemas em batelada com separação de fermento do vinho dos anos 1930, aos processos batelada alimentada e contínuos empregando centrífugas eficientes, com recirculação e tratamento de fermento. Este fato foi um grande avanço no setor, que aliado à seleção de leveduras de alta capacidade fermentativa, melhorias constantes nos processos produtivos, aumento da eficiência energética do setor, avanços nos processos de destilação, autonomia nacional na produção de equipamentos e insumos, fez com que a indústria brasileira do etanol de primeira geração, utilizando cana de açúcar como matéria prima, seja uma das mais competitivas e mais modernas do mundo (Lautenschlager, 2013).

O emprego do etanol como combustível veicular no Brasil tem sido cíclico, com as primeiras citações do seu uso na década de 1920, e em mistura com a gasolina em 1931, sempre associado a grandes aumentos nos preços mundiais do petróleo. Na década de 1970 surgiu um marco interessante, que foi a criação do Programa Nacional do Álcool (Proálcool). A partir do Proálcool houve grande aumento na produção brasileira de etanol, destinado à frota de automóveis movidos com álcool hidratado, porém em 1986 começou uma fase de desaceleração do programa e uma vertiginosa diminuição da produção de veículos movidos a álcool. Iniciou-se então uma fase de aumento crescente da produção do combustível na forma anidra, para uso em mistura à gasolina. Na safra 2000/2001, a produção do etanol anidro já superava a do hidratado, safra na qual a produção de etanol total foi bastante reduzida em relação aos anos anteriores. Em 2003 surgem os veículos *flex-fuel* no Brasil e inicia nova fase na história do bioetanol brasileiro, atingindo nos dias de hoje mais de 90% da produção brasileira de veículos leves com ciclo Otto, que podem utilizar gasolina ou etanol hidratado (Rosa, 2005; Xu et al., 2005).

Hoje tem-se no Brasil uma frota expressiva de automóveis *flex-fuel* que tem impulsionado a produção de etanol para combustível veicular, porém os preços de venda da gasolina no País são mais favoráveis aos consumidores e os elevados preços do açúcar a nível internacional tem diminuído o interesse dos empresários nacionais em produzir o referido biocombustível. Assim, melhorias de processos produtivos do etanol de primeira geração, com possíveis reflexos em diminuição de seu custo tem sido alvo de muitas pesquisas, tanto no campo, como na indústria. Além disso, as pesquisas em produção de etanol de segunda geração, a partir de matérias primas lignocelulósicas, tais como bagaço de cana tem despertado grande interesse por parte de pesquisadores (Costa e Sodré, 2011).

Os processos de fermentação alcoólica têm sido conduzidos pelo uso de diferentes cepas selecionadas da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, na sua grande maioria, empregando células dispersas no meio de fermentação. Uma linha de pesquisa seguida por diferentes pesquisadores tem sido o emprego de processos com alta densidade celular, via imobilização ou floculação (auto

imobilização), no qual se consegue uma alta população celular por unidade de volume do reator. A tecnologia de floculação espontânea de células aumenta a concentração celular pela retenção dos flocos no interior do reator sem o uso de um suporte inerte, se mostra economicamente competitiva e representa um novo conceito de imobilização (Ge et al., 2006). A habilidade de flocular de cepas de *Saccharomyces cerevisiae* tem sido considerada na produção de etanol um sistema auto-imobilizado (Andrietta et al., 2008).

A floculação indesejada é aquela encontrada em fermentações industriais utilizando leveduras livres e contaminadas com bactérias e também com leveduras selvagens, fato este de grande repercussão negativa no desempenho das centrífugas separadoras de fermento e no rendimento do processo. Já o emprego de leveduras floculantes se iniciaram no Brasil a partir de 1980, com o principal objetivo de substituir as centrífugas por decantadores, operações mais baratas e de manutenção mais simples.

Estes fatos contribuíram para que ocorresse a instalação de um pequeno número de unidades industriais empregando tal tecnologia, atualmente três em funcionamento no Brasil, todas empregando reatores de mistura em processo contínuo, com decantadores e cubas de tratamento ácido. Ao final dos anos 1990, este interesse é retomado por pesquisadores da área de fermentação alcoólica industrial do Brasil. A seleção de diferentes cepas de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* tem sido realizada por diferentes pesquisadores e o emprego de reatores tipo tubulares de escoamento contínuo, denominados reatores torre, têm sido muito estudados a nível de experimentos de bancada e piloto. O título da seção é um cabeçalho de primeira ordem, deverá ser numerado com algarismos arábicos, alinhados junto à margem esquerda, com letras maiúsculas e em negrito. Deverá ser separado por um espaço duplo antes e depois do texto.

Diante deste contexto este trabalho apresentou como objetivo estudar a utilização de antibiótico natural e comercial, com o intuito de controlar a contaminação da fermentação alcoólica com leveduras floculantes.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O micro-organismo utilizado foi a levedura *Saccharomyces cerevisiae* de características floculantes C2/00 doada pelo Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA). A composição do meio de cultura para as leveduras consistiu-se de sacarose em concentrações variadas, KH_2PO_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). Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico, com exceção do açúcar, o qual foi substituído pelo açúcar cristal comercial.

Os agentes antibacterianos utilizados nos processos fermentativos foram um antibiótico natural Beta Bio (Hopsteiner Trading (Zhuhai) Co.,Ltda.), um extrato de lúpulo, predominantemente com β -ácidos $45 \pm 15\%$ dissolvido em propileno glicol de grau alimentício $35 \pm 5\%$, o antibiótico comercial Kamoran (Química Real Brasil), ampicilina e ácido nalidixílico.

O contaminante foi obtido através da exposição do caldo de cana ao ambiente durante sete dias,

fazendo com que o caldo fosse contaminado naturalmente. Este caldo contaminado foi centrifugado, decantado e a fase decantada (cultura mista) foi armazenada a 5°C e depois adicionada ao decantado celular de *Saccharomyces cerevisiae* floculante. O decantado celular utilizado foi de 150 g o qual corresponde a 10% (v/v) do reator. Esse decantado celular tem uma contaminação de 1010 UFC/mL e concentração de leveduras de 108 células/mL.

A contaminação nas fermentações foi estudada em batelada, com concentração inicial de sacarose 160 g/L, em um fermentador Bioflo 110, de volume útil igual a 1,5 L, controlando a temperatura em $32 \pm 0,5^\circ\text{C}$ e uma agitação de 50 rpm. Foram realizadas fermentações com contaminação induzida para a verificação da eficiência dos antibióticos, assim, foram realizadas fermentações com a levedura floculante sem e com a presença de contaminação induzida. Na tentativa de controlar a contaminação foram testadas as concentrações 1, 3 e 6 ppm de Kamoran; 5, 20, 35 e 45 ppm de Beta Bio e 50 ppm de ampicilina e ácido nalidixico. As concentrações dos antibióticos correspondiam ao recomendado pelo fabricante e após os resultados alguns valores próximos foram testados.

Durante o processo fermentativo de dez horas foram analisados o rendimento, a produtividade da fermentação alcoólica e a contagem de células contaminadas por meio de plaqueamento pela técnica da microgota. As concentrações de açúcares (glicose, frutose e sacarose), etanol e glicerol foram analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência em todos os experimentos.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As fermentações realizadas com a levedura *Saccharomyces cerevisiae* C2/00 em processo batelada a $32 \pm 0,5^\circ\text{C}$ em reator de mistura, com 10% (v/v) de decantado celular como inóculo, sem contaminação induzida, alcançou rendimentos altos de 92%. A concentração inicial de sacarose foi de 160 g/L e foi totalmente consumida em 10 horas de fermentação, com produtividade de 7,84 g/L.h. As concentrações de etanol, ART e células de bactérias e leveduras estão apresentadas na Figura 1.

A fermentação com o inóculo de levedura contaminada com caldo de cana numa concentração de 10^{10} células/mL, ocorreu conforme a Figura 2. Pode observar que a concentração de etanol obtida foi bem menor que quando não foi acrescentada a contaminação e a maior concentração obtida 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. O uso desse antibiótico, muito comum nas fermentações industriais com células livres, mostrou ser eficiente também no controle da contaminação utilizando leveduras floculantes, obtendo um rendimento de 83%.

Foram testadas também as concentrações de 1 e 6 ppm de Kamoran. Com a concentração de 1 ppm o rendimento obtido foi muito baixo ficando em 67,42% e na concentração de 6 ppm (Figura 3)

o rendimento aumentou para 89,5% em 10 horas de fermentação e o açúcar residual de 1,45 g/L (ART) foi menor do que obtido na fermentação de 3 ppm de 21,31 g/L de ART. O rendimento da fermentação alcoólica empregando uma cepa de *Saccharomyces cerevisiae* não floculante obtido por Leite et al., (2012) foi de 83,1%, iniciando a fermentação com uma concentração inicial de bactérias igual a $8,7 \cdot 10^8$ células/mL e com 6 ppm de Kamoran, durante 9 horas de fermentação. Nas concentrações de 3 ppm e 6 ppm o número de bactérias foram reduzidos a ordem de 10^5 células/mL e as leveduras finalizaram as fermentações com 10^8 células/mL.

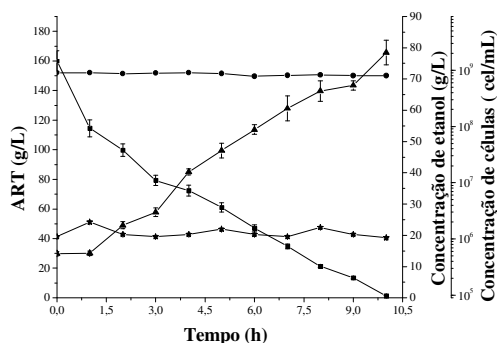


Figura 1 - Fermentação com 160 g/L de sacarose sem contaminação induzida. Com concentração de ART (■), concentração leveduras (●), concentração de bactérias (x) e produção de etanol (▲).

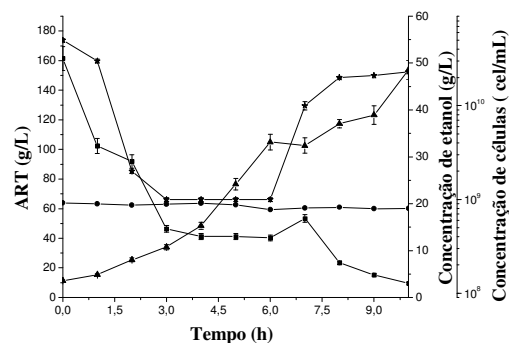


Figura 2 – Fermentação com 160 g/L de sacarose com contaminação induzida. Com concentração de ART (■), concentração leveduras (●), concentração de bactérias (x) e produção de etanol (▲).

No intuito de testar a eficiência de um antibiótico natural nas fermentações com leveduras floculantes, foi utilizado o Beta Bio na concentração de 20 ppm, concentração esta, recomendada pelo fabricante. Os experimentos foram realizados nas mesmas condições do estudo com Kamoram, com a mesma contaminação. Nestas condições, em 10,5 h de fermentação ainda restava 8,56 g/L de ART e obteve apenas 56,27 g/L de etanol, resultando em um rendimento de 68,9%. Assim, realizou-se um teste com concentração de 35 ppm e o rendimento subiu para 88%. As concentrações em função do tempo para esta fermentação são apresentados na Figura 4. Na tentativa de aumentar esse rendimento testou-se a concentração de Beta Bio de 45 ppm, mas não houve um aumento significativo de rendimento permanecendo na ordem de 88%. A redução do número de bactérias utilizando o antibiótico natural foi menor se comparada à utilização do Kamoran, sendo que, com Beta Bio no final da fermentação ainda restava uma contaminação da ordem de 10^8 células/mL de bactérias e os rendimentos obtidos utilizando os dois antibióticos foram muito próximos. O melhor resultado obtido no trabalho de Leite et al. (2012), que avaliou a produção de etanol com leveduras livres, foi utilizando Beta Bio na concentração de 46 ppm,

que alcançou um rendimento de 81,4% e uma redução do número de bactérias para mesma ordem de grandeza daquela alcançada no presente trabalho com leveduras flocculantes

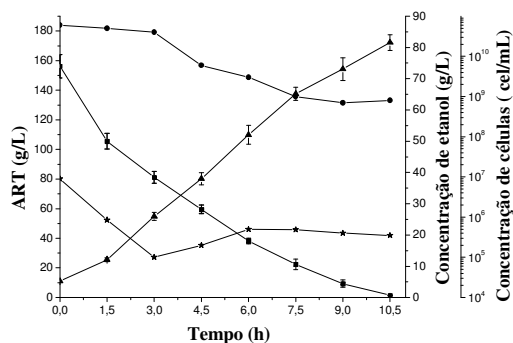


Figura 3 – Fermentação com 160 g/L de sacarose com contaminação e 6 ppm de Kamoran. Com concentração de ART (■), concentração leveduras (●), concentração de bactérias (x) e produção de etanol (▲)

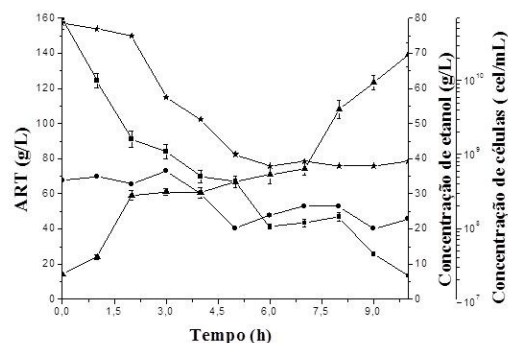


Figura 4 – Fermentação com 160 g/L de sacarose com contaminação e 35 ppm de Beta-Bio. Com concentração de ART (■), concentração leveduras (●), concentração de bactérias (x) e produção de etanol (▲).

Foram testados, também, dois antibióticos comerciais muito utilizados para controlar contaminação de bactérias em fermentações alcoólicas, ampicilina e ácido nalidíxico, na concentração de 50 ppm, recomendada pelos fabricantes. Os resultados obtidos utilizando esses dois antibióticos foram muito próximos um do outro. Com os dois antibióticos os rendimentos obtidos foram de 91% e a redução das bactérias foi na ordem de 10^7 células/mL.

Na Tabela 1 estão os resultados da influencia do uso de antibióticos na concentração de etanol, no rendimento e na redução do número de bactérias em cada processo fermentativo estudado.

Os rendimentos obtidos pelas fermentações alcoólicas com contaminação induzida utilizando células flocculantes foram promissores se comparado com o trabalho de Leite et al., (2012) que estudou a influência dos dois antibióticos estudados (Kamoran e Beta Bio) 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), alcançou, com os dois antibióticos estudados nos dois trabalhos, a concentrações da ordem de 10^5 células/mL. Acredita-se que no presente trabalho, com leveduras flocculantes, os antibióticos apresentaram ações bacteriostáticas ao invés de bactericidas, como esperado, apenas inibiu as bactérias durante o processo fermentativo. O controle da contaminação bacteriana empregando leveduras sem características flocculantes é mais fácil, uma vez que os flocos formados pelas leveduras flocculantes retêm as bactérias no seu interior, dificultando a ação do antibiótico. Este efeito é semelhante ao verificado industrialmente em fermentações alcoólicas com leveduras não flocculantes, que devido à

contaminação bacteriana, ocorre floculação, dificultando a operação de centrifugação do vinho fermentado. Um dos possíveis processos a serem utilizados para diminuir a contaminação seria o tratamento com ácidos que ao diminuir o pH ocorre a desfloculação da célula e o contato do antibiótico com as bactérias seria mais eficiente.

Tabela 1 – Resultados da influencia do uso de antibióticos na fermentação alcoólica com células floculantes em reação batelada.

Antibióticos	Concentração (ppm)	Etanol (g/L)	Rendimento %	Redução bacteriana (UFC/mL)
Sem indução	0	78,44	92%	0,00E+00
Contaminada	0	48,55	60%	0,00E-00
Kamoran	1 ppm	56,26	67,42%	0,00E+00
Kamoran	3 ppm	62,58	83%	1,00E+02
Kamoran	6 ppm	81,57	89,50%	1,00E+01
Beta Bio	20 ppm	56,26	68,9%	1,00E+02
Beta Bio	35 ppm	69,54	88%	1,00E+02
Beta Bio	45 ppm	72,38	86%	1,00E+02
Ampicilina	50 ppm	75,65	91%	1,00E+02
Ácido Nalidixico	50 ppm	77	91%	1,00E+02

4. CONCLUSÕES

O uso de antibióticos naturais e comerciais testados no trabalho levaram a resultados satisfatórios, sendo que para o uso de Kamoran e Beta Bio os melhores resultados foram em concentrações um pouco acima do recomendado pelos fabricantes, sendo 6 ppm e 35 ppm, respectivamente. Já com os antibióticos ampicilina e ácido nalidixico foram eficientes nas concentrações recomendadas pelo fabricante de 50 ppm.

5. AGRADECIMENTOS

Agradecemos a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelos recursos concedidos no Projeto de Participação Coletiva em Eventos Técnicos-Científicos (PCE-00082-14). E ao CNPq e Capes pelo apoio à pesquisa científica.

6. REFERÊNCIAS

- ANDRIETTA, S. R.; STECKELBERG, C.; ANDRIETTA, M. G. S. Study of flocculent yeast performance in tower reactors for bioethanol production in a continuous fermentation process with no cell recycling. *Bioresource Technology*, v. 99, p. 3002-3008, 2008.
- COSTA, R. C., SODRÉ, J. R. Compression ratio effects on an ethanol/gasoline fuelled engine performance. *Applied Thermal Engineering* v.31, p. 278 e 283, 2011.
- GE, X.M., ZANGH L., BAI F.W.. Impacts of yeast floc size distributions on their observed rates for substrate uptake and product formation. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 39, p. 289-295, 2006.
- LAUTENSCHLAGER, M.F.M. Potencial e perspectivas da energia solar no estado de São Paulo. Secretária de energia de São Paulo., 2013
- LEITE, I.R.; FARIA, J.R.; MARQUEZ, L.D.S.; REIS, M.H.M; RESENDE, M.M.; RIBEIRO, E.J.; CARDOSO, V.L.. Evaluation of hop extract as a natural antibacterial agent in contaminated fuel ethanol fermentations. *Fuel Processing Technology*. v. 106, p. 611-618, 2012.
- PACHECO, T. F. 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, 2010.
- ROSA, G.R.. O sucesso do flex-fuel. Anuário Brasileiro da Cana de Açúcar . p. 39-40, 2005.
- XU, T. J.; ZHAO, X. Q.; BAI, F. W. , Continuous ethanol production using self-flocculating yeast in a cascade of fermentors. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 37, p. 634 –640, 2005.