



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA



**AVALIAÇÃO DA AÇÃO DE ANTIBIÓTICO NATURAL NA
FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA CONTAMINADA POR CULTURA
MISTA**

INÁCIO RAMOS LEITE

Uberlândia – MG

2011



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA



**AVALIAÇÃO DA AÇÃO DE ANTIBIÓTICO NATURAL NA
FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA CONTAMINADA POR CULTURA
MISTA**

Inácio Ramos Leite

Orientador(a): Prof^a. Dra. Vicelma Luiz Cardoso

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Uberlândia como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Engenharia Química

Uberlândia – MG

2011

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG - Brasil

L533a Leite, Inácio Ramos, 1985-
Avaliação da ação de antibiótico natural na fermentação alcoólica
contaminada por cultura mista / Inácio Ramos Leite. - 2011.
89 f. ; il.

Orientadora: Vicelma Luiz Cardoso.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Uberlândia. Pro-
grama de Pós-Graduação em Engenharia Química.
Inclui bibliografia.

1. Engenharia química - Teses. 2. Fermentação - Teses. 3. Álcool -
Teses. 4. Antibióticos - Teses. I. Cardoso, Vicelma Luiz. II. Universi-
dade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Engen-
haria Química. III. Título.

CDU: 66.0

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM ENGENHARIA QUÍMICA, EM 21 DE FEVEREIRO DE 2011.

BANCA EXAMINADORA



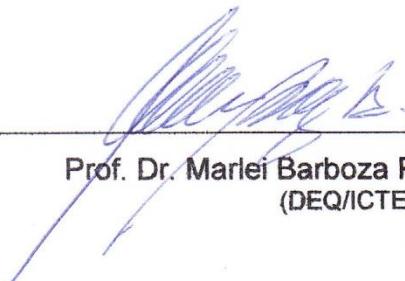
Profª. Dra. Vicelma Luiz Cardoso
Orientadora (PPGEQ/UFU)



Prof. Dr. Eloízio Júlio Ribeiro
Co-Orientador (PPGEQ/UFU)



Profª. Dra. Miriam Maria de Resende
(PPGEQ/UFU)



Prof. Dr. Marlei Barboza Pasotto
(DEQ/ICTE/ UFTM)

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela presença marcante em toda minha vida.

Aos meus pais, por me ensinarem o caminho da educação, da busca pelo conhecimento.

À Universidade Federal de Uberlândia pela disponibilização de seus laboratórios de pesquisa, estrutura acadêmica e corpo docente.

À professora doutora Vicelma Luiz Cardoso por todo o conhecimento transferido, disponibilidade irrestrita, empenho e dedicação.

Ao professor doutor Eloízio Júlio Ribeiro, co-orientador desta dissertação, por disponibilizar todo o seu conhecimento e experiência a fim de que este trabalho fosse concluído com êxito.

À CAPES pelo apoio financeiro enquanto bolsista do Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Engenharia Química da Universidade Federal de Uberlândia.

Aos alunos Jonas, Mariana, Manuela e Larissa, pela imensa contribuição na execução do planejamento experimental, sobretudo enquanto estive ausente.

Ao Açúcar Guarani S/A, por me apoiar neste trabalho e permitir que me ausentasse das minhas atribuições profissionais, sempre que necessário, a fim de atender ao Programa de Pós-Graduação na realização das atividades pertinentes a este projeto.

E também, meus sinceros agradecimentos a todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para que a conclusão deste trabalho fosse possível.

“O importante é não parar de questionar.

A curiosidade tem a sua própria justificativa racional para existir...

Não perca nunca essa sacrossanta curiosidade.”

(Albert Einstein)

SUMÁRIO

Lista de Figuras	i
Lista de Tabelas	iv
Resumo	vi
Abstract	vii
CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO	1
CAPÍTULO 2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1. Produção de etanol no Brasil	3
2.2. Fermentação Alcoólica	6
2.2.1. Leveduras	8
2.2.2. Bactérias	10
2.2.3. Contaminação bacteriana em fermentações alcoólicas	11
2.2.4. Principais bactérias contaminantes em uma fermentação alcoólica	13
2.2.5. Principais efeitos causados pelos produtos metabólicos das bactérias	14
2.3. Antibióticos	18
2.3.1. Mecanismo de ação dos antibióticos	20
2.3.2. Utilização de antibióticos nas indústrias de alimento e destilarias	22
2.4. Utilização de leveduras como fonte de proteínas	24
2.5. Rotas alternativas a utilização de antibióticos	27
2.5.1. Utilização de radiação	27
2.5.2. Utilização de compostos químicos com características bactericidas	30
2.6. Lúpulo (<i>Humulus lupulus</i> Linneus).....	34
CAPÍTULO 3 – MATERIAL E MÉTODOS	39
3.1. Aparato experimental	39
3.2. Métodos	39
3.2.1. Metodologia experimental	39

3.2.1.1. Testes preliminares	39
3.2.1.2. Planejamento experimental	40
3.2.1.3. Validação da condição ótima	42
3.2.1.4. Teste complementar	42
3.2.1.5. Meio de cultura	42
3.2.1.6. Inóculo	43
3.2.1.7. Contaminação	43
3.2.1.8. Dosagem de antibióticos	44
3.2.2. Acompanhamento analítico	44
3.2.2.1. Quantificação de sacarose	45
3.2.2.2. Quantificação de etanol	45
3.2.2.3. Quantificação de leveduras	46
3.2.2.4. Quantificação de bactérias	47
CAPÍTULO 4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
4.1. Testes preliminares	49
4.2. Planejamento experimental	52
4.2.1. Produtividade	53
4.2.2. Rendimento	58
4.2.3. Sacarose residual	62
4.2.4. Otimização	66
4.2.5. Quantidades de leveduras e bactérias finais	69
4.3. Teste complementar	70
4.3. Condição ótima	71
CAPÍTULO 5 – CONCLUSÕES	77
CAPÍTULO 6 – SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	79
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	80

APÊNDICE A – CURVAS DE CALIBRAÇÃO 87

LISTA DE FIGURAS

2.1. Produção brasileira de etanol	3
2.2. Cana-de-açúcar processada pelas usinas brasileiras	4
2.3. Exportações anuais de etanol pelo Brasil em volume exportado e arrecadações.....	4
2.4. Doze áreas selecionadas para produção de etanol	6
2.5. Rota metabólica da fermentação alcoólica na <i>S. cerevisiae</i>	7
2.6. Condições potenciais de estresse à <i>S. cerevisiae</i> durante a fermentação alcoólica	8
2.7. Viabilidade celular de leveduras utilizadas em processo contínuo realizado em um fermentador CSTR em função da presença de ácido láctico não dissociado	16
2.8. Glicose consumida (branco), glicose residual (preto) e concentração de etanol observados na saída de um fermentador CSTR com a adição de ácido láctico	16
2.9. Produtividade específica de etanol (círculos), consumo específico de glicose (quadrados) e produtividade específica de glicerol (triângulos) em função da concentração de ácido láctico não dissociado.....	17
2.10. Efeito dos antibióticos penicilina, aureomicina, cloromicetina, terramicina, streptomicina, bacitracina e tirotricina no início de fermentações com populações bacterianas	24
2.11. Efeito causado pelas doses de irradiação (kGy) na redução da contagem de bactérias do mosto do caldo de cana-de-açúcar contaminado com: (a) <i>L. plantarum</i> , (b) <i>L. fermentum</i> , (c) flora microbiológica natural do caldo de cana-de-açúcar	29

2.12. Efeito das doses de radiação (kGy) no rendimento de etanol (%) de fermentações de mostos de caldo de cana-de-açúcar contaminados	29
2.13. Concentração de ácido láctico produzido após 36 horas de fermentação pelo <i>L. paracasei</i> na presença ou ausência de UHP ou peróxido de hidrogênio	30
2.14. Espécies sobreviventes de <i>Lactobacillus</i> em relação ao tratamento com sulfito em função do tempo	31
2.15. Efeito do tratamento com sulfito sobre a viabilidade de bactérias em condições aeróbicas e anaeróbicas	31
2.16. Produção mundial de Lúpulo no ano de 2008	35
2.17. Estrutura química dos α-ácidos e β-ácidos presentes no lúpulo	36
4.1. Perfis de concentração de sacarose, de etanol e de células de leveduras vivas em função do tempo, para a fermentação sem contaminação	49
4.2. Perfis de concentração de sacarose, de etanol, da contagem de bactérias contaminantes e da quantidade de levedura em função do tempo, para a fermentação contaminada	50
4.3. Perfis de concentração de sacarose, de etanol, da contagem de bactérias contaminantes e da quantidade de levedura em função do tempo, para a fermentação contaminada, utilizando o antibiótico natural BETABIO 45 à 10 ppm	52
4.4. Distribuição dos resíduos relativos à produtividade	56
4.5. Valores preditos em função dos observados relativos à produtividade	56
4.6. Superfície de resposta e curva de contorno para resposta produtividade em função da concentração de leveduras (X_1) e dosagem de antibiótico (X_2)	57
4.7. Superfície de resposta e curva de contorno para resposta produtividade em função da concentração de leveduras (X_1) e contaminação bacteriana (X_3)	58

4.8. Superfície de resposta e curva de contorno para resposta produtividade em função da dosagem de antibiótico (X_2) e contaminação bacteriana (X_3)	58
4.9. Distribuição dos resíduos relativos ao rendimento	60
4.10. Valores preditos em função dos observados relativos ao rendimento	61
4.11. Superfície de resposta e curva de contorno para rendimento em função da concentração leveduras (X_1) e dosagem de antibiótico (X_2)	61
4.12. Superfície de resposta e curva de contorno para rendimento em função da concentração leveduras (X_1) e contaminação bacteriana (X_3)	62
4.13. Superfície de resposta e curva de contorno para rendimento em função da dosagem de antibiótico (X_2) e contaminação bacteriana (X_3)	62
4.14. Distribuição dos resíduos relativos à sacarose residual	64
4.15. Valores preditos em função dos observados relativos à sacarose residual	65
4.16. Superfície de resposta e curva de contorno para a resposta sacarose residual em função da concentração de leveduras (X_1) e dosagem de antibiótico (X_2)	65
4.17. Superfície de resposta e curva de contorno para a resposta sacarose residual em função da concentração de leveduras (X_1) e contaminação bacteriana (X_3)	66
4.18. Superfície de resposta e curva de contorno para a resposta sacarose residual em função da dosagem de antibiótico (X_2) e contaminação bacteriana (X_3)	66
4.19. Teste preliminar: perfis de concentração de sacarose, de etanol e de células de leveduras vivas em função do tempo, para a fermentação sem contaminação	71
4.20. Teste complementar: perfis de concentração de sacarose, de etanol e de células de leveduras vivas em função do tempo, para a fermentação sem contaminação com concentração inicial de 50 ppm de BETABIO 45.....	71
4.21. Cinética com BETABIO 45 na condição otimizada: 30 g de leveduras / L ($2,7 \times 10^8$ células/mL); 20 mg/L de antibiótico; 1,25 g/L de bactérias ($7,3 \times 10^4$ UFC/mL).....	72
4.22. Cinética com KAMORAN na condição otimizada: 30 g de leveduras / L ($3,2 \times 10^8$ células/mL); 20 mg/L de antibiótico; 1,25 g/L de bactérias ($8,7 \times 10^4$ UFC/mL).....	75

LISTA DE TABELAS

2.1. Principais exportações brasileiras de etanol por país de destino	5
2.2. Concentrações de nutrientes minerais no mosto para se obter uma boa fermentação alcoólica	12
2.3. Resumo dos mecanismos de ação para diferentes classes de antibióticos	18
2.4. Ano de surgimento de alguns antibióticos e os primeiros registros de resistência	19
2.5. Espectro de atuação de alguns antibióticos	21
2.6. Propriedades de alguns antibióticos utilizados na indústria de alimentos	22
2.7. Adequação de aminoácidos essenciais das células íntegras de levedura, autolisado total e extrato de levedura, tendo por base o padrão de referência da FAO/WHO	25
2.8. Aplicação de autolisados e hidrolisados de leveduras da indústria da cerveja como uma fonte de nutrientes em meios microbiológicos	26
2.9. Efeito do tratamento com sulfito no controle de contaminação bacteriana durante fermentação alcoólica com reciclo de células	32
2.10. Medida de acidez final e variação de acidez	33
2.11. Atividade antimicrobiana causada por alguns extratos de plantas	34
3.1. Planejamento experimental elaborado para a avaliação das variáveis: concentração de leveduras, concentração de antibiótico, concentração de bactérias.....	41
3.2. Concentração de nutrientes adotadas no preparo do meio de cultura para fermentação	43

3.3. Compostos químicos utilizados no preparo do meio de cultura para realização do plaqueamento	47
4.1. Resultados referentes à produtividade, rendimento, sacarose residual, leveduras e bactérias finais, em diferentes condições experimentais de acordo com o planejamento composto central	53
4.2. Resultado da regressão múltipla para Produtividade, com todas as variáveis e seus respectivos parâmetros e níveis de significância	54
4.3. Resultados da regressão múltipla para Produtividade, apresentando apenas as variáveis significativas com seus respectivos parâmetros e níveis de significância	54
4.4. Resultado da regressão múltipla para Rendimento, com todas as variáveis e seus respectivos parâmetros e níveis de significância	58
4.5. Resultados da regressão múltipla para Rendimento, apresentando apenas as variáveis significativas com seus respectivos parâmetros e níveis de significância	59
4.6. Resultado da regressão múltipla para Sacarose Residual, com todas as variáveis e seus respectivos parâmetros e níveis de significância	63
4.7. Resultados da regressão múltipla para Sacarose Residual, apresentando apenas as variáveis significativas com seus respectivos parâmetros e níveis de significância	63
4.8. Faixas de otimização para produtividade, rendimento e sacarose residual	69
4.9. Resultados referentes às bactérias iniciais, finais e redução percentual, em diferentes condições experimentais de acordo com o planejamento composto central	73
4.10. Paralelo entre os testes realizados nas condições ótimas com os antibióticos BETABIO 45 e o KAMORAN	76

RESUMO

O etanol brasileiro vem despertando a atenção do mundo por ser uma fonte de energia renovável e economicamente viável. O Brasil tem a seu favor alguns pontos fundamentais, como clima, área de cultivo e tecnologia, capazes de fazer com que este biocombustível se torne um dos pilares do mercado nacional e internacional de combustíveis renováveis. Por isso, diante de tamanho potencial, percebeu-se a importância da utilização de subprodutos como fonte de renda a fim de ampliar as fontes de receita do setor. Inúmeras pesquisas vêm sendo realizadas para que se possam avaliar as melhores condições de aplicação da *Saccharomyces cerevisiae* como fonte de nutrientes na dieta humana e dos mais variados rebanhos. No entanto, o controle de contaminação desses processos está, em grande parte, baseado na utilização de antibióticos químicos, e os resíduos deixados por esses produtos nas leveduras se tornaram um problema após a proibição, em vários países, da utilização destas leveduras na alimentação humana e de animais. Surge então a necessidade do desenvolvimento de outros mecanismos capazes de controlar os prejuízos causados pela contaminação bacteriana durante o processo de produção do etanol sem deixar resíduos nas leveduras. Diante desse quadro, o objetivo geral desta dissertação foi avaliar o desempenho do antibiótico natural Betabio 45 extraído do lúpulo na desinfecção de fermentações alcoólicas contaminadas com cultura mista. Para isto, procurou-se otimizar as concentrações iniciais de inóculo, bactérias contaminantes e antibiótico natural, empregando Planejamento Composto Central e a técnica da superfície de resposta. A partir da técnica mencionada anteriormente selecionou-se como melhor condição de aplicação do antibiótico natural estudado a dosagem de 20 mg/L em fermentações conduzidas sob concentração celular na ordem de 10^8 células/mL e contaminações de 10^4 UFC/mL. Além disso, comparou-se a ação do antibiótico natural à um dos antibióticos químicos mais difundidos nas destilarias, o Kamoran. O antibiótico natural Betabio 45 apresentou desempenho muito semelhante ao antibiótico Kamoran. No entanto, este foi mais eficaz no combate a bactérias contaminantes. Aplicados no início de fermentações contaminadas, a ação dos antibióticos testados não conseguiu impedir que os rendimentos fossem comprometidos, mas ambos apresentaram forte efeito bactericida sobre a cultura mista de bactérias contaminantes do meio fermentativo utilizado. O produto natural fez com que o percentual de redução de bactérias contaminantes estivesse sempre acima de 90% e, em algumas situações, atingisse reduções percentuais acima de 99% ao longo do processo fermentativo. O presente trabalho apresenta ainda, cinéticas de fermentações sem contaminação e contaminadas, com e sem a utilização do antibiótico natural extraído do lúpulo.

Palavras-chave: fermentação alcoólica, controle de contaminação bacteriana, antibiótico natural, etanol.

ABSTRACT

Brazilian ethanol is attracting the attention of the world as a renewable energy source and economically viable. Brazil has in its favor some fundamental issues such as climate, area and technology, able to make this biofuel becomes a pillar of the national and international markets for renewable fuels. So, faced with such potential, realized the importance of using byproducts as a source of income in order to increase sources of revenue in the sector. Numerous studies have been performed so they can assess the best conditions for the application of *Saccharomyces cerevisiae* as a source of nutrients in the human diet and of several herds. However, contamination control of these processes is largely based on the use of chemical antibiotics, and residues left by these products in yeast became a problem after being banned in several countries, the use of these strains in human food and animals. There is a need to develop other mechanisms to control the damage caused by bacterial contamination during the production of ethanol without residue in yeast. Given this situation, the objective of this thesis was to evaluate the performance of the natural antibiotic BETABIO 45 extracted from the hops in the disinfection of contaminated alcoholic fermentations with mixed cultures. For this, we tried to optimize the initial concentrations of inoculum, bacterial contaminants and natural antibiotic, employing central composite design and response surface technique. From the above mentioned technique was selected as the best condition for the application of natural antibiotic studied the dosage of 20 mg/L in fermentations conducted in cell concentration in the order of 10^8 cells/mL and contamination of 10^4 CFU/mL. In addition, we compared the action of natural antibiotic to one of the most widespread chemical antibiotics in distilleries, the KAMORAN. The natural antibiotic BETABIO 45 showed very similar performance to the antibiotic KAMORAN. However, this was more effective in fighting bacteria. Applied at the beginning of fermentations contaminated, the action of antibiotics could not prevent the income were affected, but both showed strong bactericidal effect on the mixed culture of bacteria in the fermentation media used. The natural product made with the percentage reduction of bacteria was always above 90% and in some cases, reductions reach percentages above 99% throughout the fermentation process. This paper presents further fermentation kinetics of uncontaminated and contaminated with and without the use of natural antibiotic extracted from hops.

Keywords: alcoholic fermentation, control of bacterial contamination, natural antibiotic, ethanol.

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

O etanol brasileiro vem despertando a atenção de todo o mundo por ser uma fonte de energia renovável e economicamente viável. O Brasil tem a seu favor alguns pontos fundamentais, como clima, área de cultivo e tecnologia, capazes de fazer com que este biocombustível se torne um dos pilares do mercado nacional e internacional de combustíveis renováveis (Cerqueira Leite *et al.*, 2009). Tamanho potencial colocou o país e esta promissora atividade em foco, atraindo constantes investimentos e, claro, elevando o grau de exigência por retorno sobre o capital investido. Neste contexto, a procura por novas tecnologias capazes de aumentar a rentabilidade e eficiência em todas as etapas inseridas nesse processo entrou em pauta no universo acadêmico e nos bastidores do setor sucroalcooleiro, ou sucroenergético, como preferem denominá-lo, atualmente, os profissionais envolvidos na área. Inevitavelmente, a fermentação alcoólica, ponto chave do processo de produção de etanol, não poderia deixar de receber a atenção que merece.

Fermentação alcoólica é um processo biológico conduzido normalmente pela levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Ela é um micro-organismo vivo, com múltiplas habilidades metabólicas, e que pode alterar a estequiometria da fermentação em resposta a alterações do meio, com grande impacto no rendimento do processo. A transformação da sacarose em etanol e CO₂ por essas leveduras envolvem 12 reações em seqüência ordenada, cada qual catalisada por uma enzima específica. Tal aparato enzimático se encontra confinado em seu citoplasma celular, sendo, portanto, nessa região da célula que a fermentação se processa.

Durante a fermentação, a levedura pode estar exposta a vários fatores estressantes. Dentre esses fatores, os mais freqüentemente mencionados são os altos teores alcoólicos, temperatura elevada, a acidez do meio (inclusive no tratamento ácido), a presença de sulfito, a contaminação bacteriana e, mais raramente documentada, a contaminação com leveduras não *Saccharomyces*.

O controle da contaminação bacteriana no processo de fermentação alcoólica é uma etapa fundamental para assegurar resultados positivos na produção de etanol. Para isto, é necessário adotar medidas adequadas que incluem desde a realização de boa assepsia do sistema até a escolha de bactericidas ou bacteriostáticos eficazes. Industrialmente, a aplicação de ácido sulfúrico, como antisséptico, no preparo do pé-de-cuba é a prática mais utilizada para descontaminação do inóculo. Porém, na maioria das vezes, esta medida é insuficiente, e a

recorrência aos antibióticos químicos para controle da contaminação se faz necessária (Lima *et al.*, 2001; Basso *et al.*, 2004; Amorim, 2005).

Os principais antibióticos utilizados são à base de penicilina G, estreptomicina, tetraciclina, virginiamicina, monoensina, ou a mistura destes compostos (Narendranath e Ingledew, 2000). Além de caros, estes antibióticos deixam resíduos químicos nas leveduras, os quais dão margem a questionamentos sobre a utilização destas leveduras para o consumo animal e humano. Países da Europa e os Estados Unidos estão proibidos de utilizarem leveduras com algum tipo de resíduo dos antibióticos (Anselmi, 2008).

Apesar da polêmica que envolve o assunto, existem empresas, como a ICC, empresa do ramo de nutrição animal, vem desenvolvendo aplicações para as leveduras oriundas da fermentação alcoólica de modo a agregar valor ao subproduto e garantir sua expansão e aproveitamento. Segundo o diretor da ICC, cada litro de etanol gera cerca de 60 gramas de levedura, sendo que cerca de 30 a 40 gramas são perdidos na vinhaça e algo em torno de 20 a 30 gramas podem ser recuperadas para a secagem (Taube, 2009). Por isso, visto o tamanho potencial para tal subproduto, torna-se fundamental que as empresas envolvidas com a secagem de levedura consigam soluções para questões como a presença indesejada de resíduos de antibióticos nestas leveduras.

Uma rota alternativa aos antibióticos vem sendo apresentada ao setor sucroenergético. Produtos naturais que prometem agir como antibióticos, mas sem deixar resíduos na levedura, estão entrando no mercado de insumos químicos para destilarias. Os antibióticos naturais, como são chamados, passaram a ser uma opção para aquelas usinas que têm interesse na comercialização de leveduras íntegras, autolisadas ou do extrato de levedura.

Diante desse quadro, o objetivo geral desta dissertação foi avaliar o desempenho de um antibiótico natural, o BETABIO 45, extraído do lúpulo, na desinfecção de fermentações alcoólicas. Para isto, procurou-se otimizar as concentrações iniciais de inóculo, bactérias contaminantes e antibiótico natural, empregando Planejamento Composto Central e a técnica da superfície de resposta. Além disso, comparou-se a ação do antibiótico natural à um dos antibióticos químicos mais difundidos nas destilarias, o Kamoran, em fermentações contaminadas com cultura mista de *Lactobacillus*. O presente trabalho apresenta ainda, cinéticas de fermentações sem contaminação e contaminadas, com e sem a utilização do antibiótico natural extraído do lúpulo.

CAPÍTULO 2

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Produção de etanol no Brasil

Nos últimos anos, devido aos altos preços alcançados pelo barril de petróleo e ao grande interesse por parte de muitos governantes e empresários por processos produtivos industriais sustentáveis, pesquisadores de todo o mundo voltaram suas atenções ao desenvolvimento de novos processos ou ao aprimoramento dos processos clássicos já existentes, visando sustentabilidade e viabilidade econômica (Corma *et al.*, 2008; Men *et al.*, 2007; Borges, 2008).

Diante desse contexto, o etanol brasileiro passa a se destacar no cenário mundial de biocombustíveis, pois apresenta impactos ambientais mínimos e já se encontra tecnologicamente desenvolvido a ponto de ser produzido em quantidades suficientes para fazer parte da solução deste grave problema (Cerqueira Leite *et al.*, 2009).

A produção brasileira de etanol vem crescendo desde a safra 2000/2001, saltando de aproximadamente dez milhões e quinhentos mil metros cúbicos para algo em torno de vinte e sete milhões e quinhentos mil metros cúbicos de etanol, contabilizando etanol hidratado e anidro (Figura 2.1). Essa produção corresponde a um salto de moagem que partiu de aproximadamente duzentos e cinqüenta e sete milhões de toneladas, na safra 2000/2001, para quinhentas e sessenta e nove milhões de toneladas de cana moída na safra 2008/2009 (Figura 2.2).

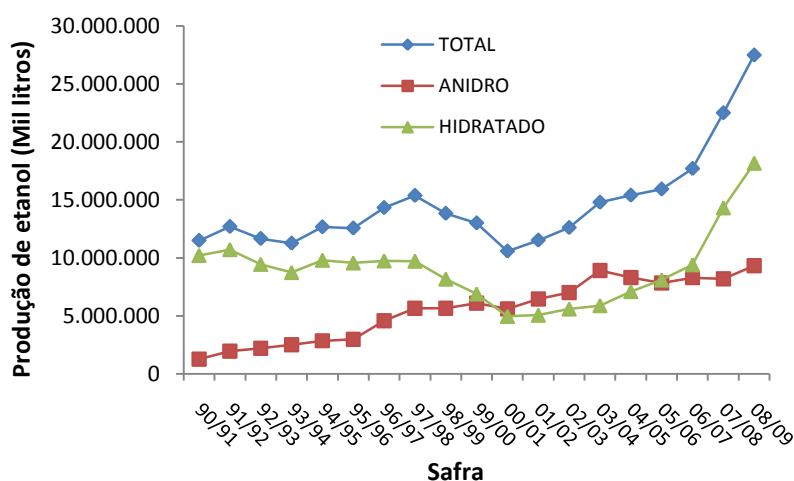


Figura 2.1. Produção brasileira de etanol (UNICA, 2010).

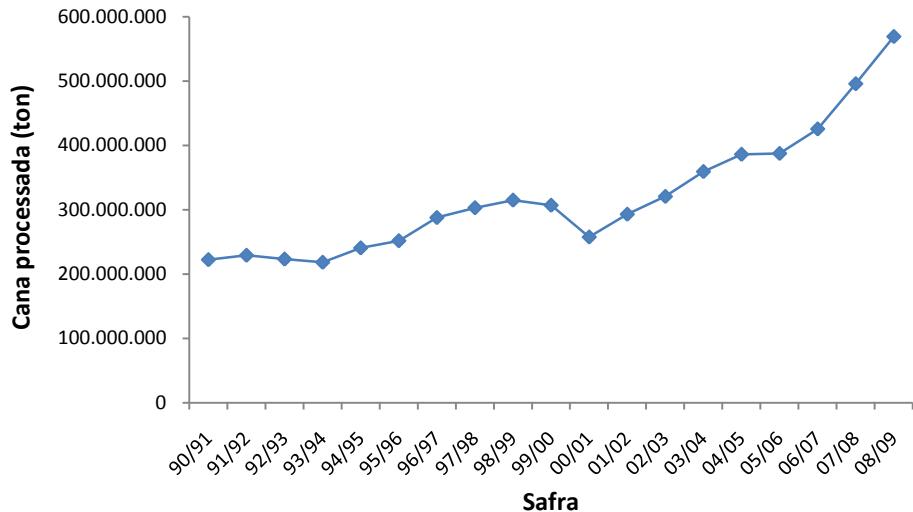


Figura 2.2. Cana-de-açúcar processada pelas usinas brasileiras (UNICA, 2010).

Ainda na safra 2008/2009, as exportações brasileiras de etanol ultrapassaram a barreira dos quatro milhões e quinhentos mil metros cúbicos, arrecadando algo em torno de dois bilhões e duzentos milhões de dólares (Figura 2.3). Em 2009, a produção brasileira de etanol correspondia a 33% da produção mundial (Cerqueira Leite *et al.*, 2009) e chegou a países de todos os continentes, tais como Estados Unidos, Jamaica, Índia, Japão, Reino Unido e Chile (Tabela 2.1).

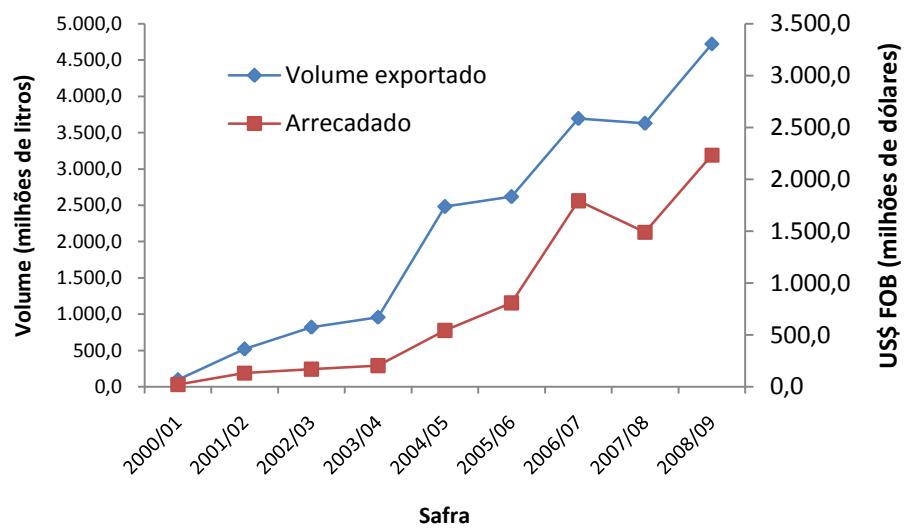


Figura 2.3. Exportações anuais de etanol pelo Brasil em volume exportado e arrecadações (UNICA, 2010).

Tabela 2.1. Principais exportações brasileiras de etanol por país de destino.

PAÍS	VOLUME (milhões de litros)			
	2006	2007	2008	2009
Total	3.416,6	3.530,1	5.118,7	3.308,4
Países Baixos	344,5	800,9	1.331,4	674,7
Jamaica	133,0	312,1	436,1	441,9
Índia	9,9		66,4	371,2
Coréia do Sul	93,4	67,4	186,6	316,6
Japão	227,7	367,2	263,2	282,7
Estados Unidos	1.749,2	849,7	1.519,4	270,2
Reino Unido	26,7	47,1	69,6	159,4
Trinidad e Tobago	72,3	160,5	224,3	141,4
Nigéria	43,1	124,2	97,8	117,0
Costa Rica	92,2	172,2	109,4	101,2
México	50,7	50,2	30,4	74,4
El Salvador	182,7	226,8	355,9	71,9
Suíça	2,7		11,6	59,0
Filipinas		1,5	4,5	32,4
Finlândia		19,7	41,4	27,1
Emirados Árabes		38,7	5,2	23,5
Porto Rico	10,5	14,2	10,2	22,5
Cingapura		0,3	10,7	19,6
Gana	6,1	33,2	19,7	14,9
Virgens, Ilhas Am.		52,7	187,9	13,2
África do Sul	2,0	0,0	5,6	12,4
Coréia do Norte		4,8	1,8	11,3
Itália	0,0		0,0	10,1
Austrália			6,4	9,7
Angola	3,3	11,7	9,9	8,2
Bélgica		1,6	6,3	5,1

(Fonte: UNICA, 2010)

Segundo Cerqueira Leite *et al.* (2009), o Brasil possui ainda um enorme potencial de crescimento nesse setor. Para o autor, com um aumento de 21 milhões de hectares de terra para cultivo de cana-de-açúcar, a produção brasileira de etanol poderá alcançar o equivalente a 5% do consumo de gasolina projetado para o ano 2025, volume correspondente a 102 bilhões de litros. Estes 21 milhões de hectares correspondem a menos de 7% das terras agricultáveis do Brasil e quase se equivale à atual área utilizada no cultivo de soja. O Brasil possui 200 milhões de hectares de pastagens e 62 milhões de hectares de terras cultivadas. Destas, 22 milhões de hectares são usadas para produção de soja, 13 milhões para milho e 7 milhões para cana-de-açúcar. Cerqueira Leite *et al.* (2009) afirmam que se a cana-de-açúcar se expandisse apenas sobre as pastagens, o cultivo de mais 21 milhões de hectares de cana

poderia ser alcançado sem comprometer o cultivo das demais culturas e, tampouco, a preservação de reservas ambientais brasileiras, como a Floresta Amazônica, Floresta Atlântica e o Pantanal. Para isso, seria necessário um aumento da densidade demográfica dos rebanhos atuais de 1,0 cabeça/ha para 1,3-1,5 cabeças/ha, disponibilizando 50-70 milhões de hectares de terras cultiváveis. Cerqueira Leite *et al.* (2009) selecionaram 12 áreas potenciais capazes de fazer com que esta expansão da cultura da cana-de-açúcar seja possível (Figura 2.4). A maioria dessas áreas se localiza no cerrado brasileiro, entre os Estados de Mato Grosso do Sul e o sul do Maranhão.

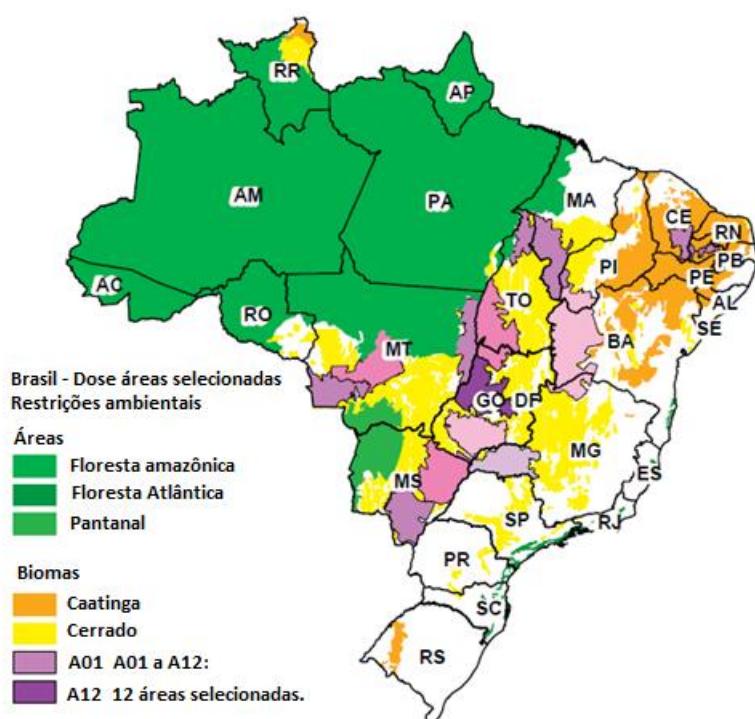


Figura 2.4. Doze áreas selecionadas para produção de etanol, A = área (CERQUEIRA LEITE *et al.*, 2009).

2.2. Fermentação alcoólica

A fermentação alcoólica é um processo biológico conduzido normalmente pela levedura *Saccharomyces cerevisiae*, cuja fisiologia e bioquímica tem sido negligenciada em favor de uma visão físico-química e mecânica do processo. Porém, trata-se de um organismo vivo, com múltiplas habilidades metabólicas, podendo alterar a estequiometria da fermentação em resposta a alterações no meio, com grande impacto no rendimento do processo (Lima *et al.*, 2001; Basso *et al.*, 2004; Amorim, 2005).

Tratando-se do processo envolvendo *Saccharomyces cerevisiae*, a principal rota metabólica envolvida no processo de produção de etanol é a glicólise, em que uma molécula de glicose é metabolizada produzindo duas moléculas de piruvato. Sob condições anaeróbicas, o piruvato é reduzido a etanol com liberação de CO₂ (Figura 2.5). Dois ATPs produzidos na glicólise são utilizados na síntese de novas células de fermento. Sem o consumo de ATP na reprodução celular, o metabolismo glicolítico seria interrompido por causa do acúmulo de ATPs que inibiria a enzima fosfofrutoquinase (phosphofructokinase – PFK), uma das enzimas mais importantes da glicólise.

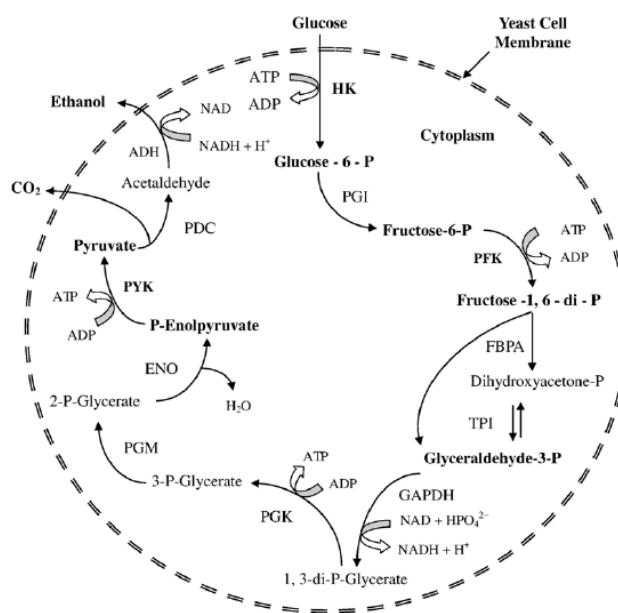


Figura 2.5. Rota metabólica da fermentação alcoólica na *Saccharomyces cerevisiae*. Abreviações: HK: hexoquinase, PGI: fosfoglucoisomerase, PFK: fosfofrutoquinase, FBPA: frutose bisfosfato aldolase, TPI: triose fosfato isomerase, GAPDH: gliceraldeido-3-fosfato desidrogenase, PGK: fosfoglicerato quinase, PGM: fosfogliceromutase, ENO: enolase, PYK: piruvato quinase, PDC: piruvato descarboxilase, ADH: álcool-desidrogenase (Bai *et al.*, 2008).

A levedura pode sofrer alguns estresses que comprometem seu desempenho durante um processo de produção de etanol. Deficiência de nutrientes, altas temperaturas, contaminações microbiológicas, pressão osmótica ocasionada pela concentração de sólidos dissolvidos no meio, altos teores de etanol, sulfito, íon sódio, ácidos láctico e acético provenientes de contaminações bacterianas, além de baixos pH são as principais condições

potenciais para um ambiente de estresse da levedura durante a fermentação alcoólica (Figura 2.6). Contornar essas adversidades é o maior desafio nesse tipo de processo.

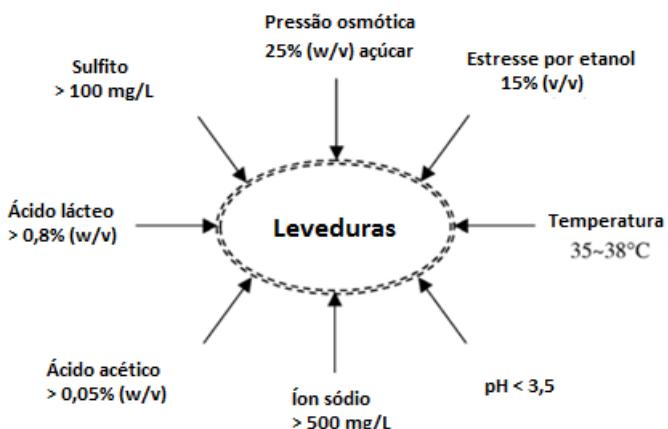


Figura 2.6. Condições potenciais de estresse na *Saccharomyces cerevisiae* durante a fermentação alcoólica (Bai *et al.*, 2008).

Entre todos os micro-organismos explorados para produção de etanol, a fermentação alcoólica conduzida por *Saccharomyces cerevisiae* é a mais difundida. Entretanto, a utilização de *Zymomonas mobilis* vem sendo estudada ao longo das últimas três décadas e defendida por alguns pesquisadores. Segundo eles, a baixa produção de biomassa no processo conduzido por essa bactéria pode elevar o rendimento da fermentação a níveis superiores a 97% do rendimento teórico de etanol, enquanto apenas 90-93% desse rendimento pode ser alcançado com a utilização de *Saccharomyces cerevisiae*. Apesar disso, esta espécie necessita de substratos muito específicos, que incluem D-glucose, D-frutose e sacarose, e os altos rendimentos obtidos com esse micro-organismo não estão relacionados à fermentação de sacarose, frutose e maltose, mas sim de glicose. Por isso, atualmente, a utilização da *Z. mobilis* não é interessante para a indústria do etanol, na qual não se é possível utilizar glicose pura em seu processo (Bai *et al.*, 2008).

2.2.1. Leveduras

As leveduras são micro-organismos eucarióticos pertencentes ao grupo dos fungos. Os fungos são organismos não-fotossintéticos que, com algumas raras exceções, possuem parede celular. Eles obtêm seu alimento por absorção e não possuem clorofila. O reino *Fungi* é dividido em três grupos: os fungos limosos, os inferiores flagelados e os fungos terrestres. Existem ainda, quatro grupos de fungos terrestres: os *Zigomicetos*, *Ascomicetos*,

Basidiomicetos e os *Deuteromicetos*. O grupo dos terrestres, onde estão classificadas as leveduras, são as espécies mais conhecidas entre os fungos.

As leveduras pertencem à classe dos *Ascomicetos*, denominados fungos superiores, por possuírem estrutura consideravelmente mais complexa do que os outros fungos. A *Saccharomyces cerevisiae* está entre as leveduras mais conhecidas em todo o mundo por serem utilizadas no processo de produção de bebidas alcoólicas, pães e na produção de etanol combustível (Pelczar Jr., 1997).

As principais micro-estruturas das *Saccharomyces cerevisiae* são a parede celular, a membrana citoplasmática, o núcleo, os vacúolos e as mitocôndrias. A parede celular é uma espécie de linha que circunda a célula. Apresenta-se bem fina nas células jovens e vai ficando cada vez mais espessa com a idade das células. Ela é constituída de polissacarídeos (cerca de 65%), proteínas (de 6% a 8%) e lipídeos (8,5% a 13,5%), dentre outros constituintes.

A membrana citoplasmática encontra-se diretamente abaixo da parede celular. É esta membrana que atua, de forma seletiva, no controle da entrada de nutrientes e também na regulagem da pressão osmótica da célula. É esta estrutura que impede a perda de compostos de baixo peso molecular por vazamento do citoplasma. A membrana citoplasmática é composta de uma complexa mistura de lipídeos neutros, esteróis livres e esterificados, esfingolipídeos complexos, glicerofosfatídeos, glicolipídeos e vários ácidos, com destaque para o ácido graxo.

O núcleo é formado por uma organela bem definida, circundada por uma membrana semi-permeável, com funções metabólicas e reprodutivas. Ele é composto pelo nucléolo, parte mais densa, e por outra parte, menos densa, que contém o material genético (DNA, que determina os caracteres hereditários, e o RNA, que comanda a síntese de proteínas, também estão presentes no núcleo).

Podem existir um ou mais vacúolos no interior das células da *Saccharomyces cerevisiae*. Possuem formato esférico, seu tamanho pode variar de 0,3 – 3,0 µm de diâmetro, e são mais transparentes a um feixe de luz do que o citoplasma. Os vacúolos estão envolvidos por uma membrana que se relaciona com o transporte de substâncias neles armazenados, tais como enzimas, aminoácidos livres e lipídeos.

As mitocôndrias organelas que, ao microscópio, possuem a aparência de filamentos pregueados, com diâmetros de 0,3 a 1 µm e comprimento de até 3 µm. Elas contêm enzimas respiratórias, cuja principal função é a de converter energia aerobicamente.

Todas as organelas descritas anteriormente encontram-se no citoplasma. Este contém grandes quantidades de ribossomo, polifosfato, enzimas, glicogênio, trealose, dentre outros compostos (Amorim, 2005).

As leveduras reproduzem-se assexuadamente por brotamento, processo em que o núcleo divide-se por constrição e uma porção dele entra no broto juntamente com outras organelas. A conexão citoplasmática é fechada e uma nova célula é gerada (Pelczar Jr., 1997). O brotamento, normalmente, pode ser detectado via microscópio.

2.2.2. Bactérias

As bactérias são micro-organismos unicelulares e procariontes, ou seja, que não possuem envoltório nuclear e nem organelas membranosas. Podem ser encontradas isoladas ou em colônias, viver na presença ou na ausência de ar, ou ainda serem anaeróbicas facultativas. Suas células possuem, normalmente, de 0,5 a 1 μm de tamanho e podem ser encontradas em diferentes formatos: coco (esférico), bacilo (em forma de bastonete) e espirilo (em forma de espiral, ondulada).

Por serem micro-organismos procariontes, as bactérias não apresentam envoltório nuclear e nem organelas membranosas. Sua estrutura celular se resume em ribossomos, citoplasma, parede e membrana celular e nucleóides. O citoplasma das bactérias é preenchido pelo hialoplasma, um líquido viscoso em que se localizam o RNA, nutrientes, algumas proteínas funcionais, dentre outras moléculas orgânicas. A membrana celular envolve o citoplasma e é constituído por uma dupla camada de fosfolipídeos. A parede celular recobre a membrana celular e apresenta uma estrutura mais rígida e complexa, composta por peptidoglicanos. O nucleóide consiste em uma molécula de DNA, sem delimitação por membrana.

As bactérias são usualmente classificadas como gram-positivas ou gram-negativas. Essa classificação teve origem com o pesquisador Christian Gram, que desenvolveu um método que permitia a separação desses dois grupos. Em seu método, as bactérias gram-positivas passam a apresentar coloração violeta, enquanto as gram-negativas, coloração vermelha. Estas colorações distintas verificadas com a realização do método de Gram são devido às diferenças de composição e estrutura dessas paredes celulares. A parede celular das bactérias é formada de uma estrutura rígida que mantém a forma característica de sua célula. Ela é formada de camadas constituídas de diferentes substâncias, que variam de acordo com o tipo de bactéria. Podem diferir por espessura e composição. A parede celular das bactérias

Gram-negativas são geralmente mais finas (10 – 15 nm), enquanto as Gram-positivas, são mais espessas (20 – 25 nm).

O peptídeoglicano é o componente que determina a forma da parede celular das bactérias. Ele é um polímero poroso, insolúvel e de grande resistência. É uma macromolécula, porém simples. A sua composição química pode diferir um pouco de uma espécie para outra, mas contém basicamente três unidades estruturais: N-acetilglicosamina (NAG), ácido- N-acetilmurâmico (NAM) e um tetrapeptídeo. A estrutura rígida da parede celular é resultado das ligações cruzadas dos tetrapeptídeos de uma cadeia de peptídeoglicana com os tetrapeptídeos de uma outra cadeia.

A parede celular é fundamental para a sobrevivência das bactérias. Além de servir como barreira para certas substâncias, pode prevenir a evasão de certas enzimas, assim como o influxo de certas substâncias químicas e enzimas que poderiam causar danos a célula. Corantes, alguns antibióticos, metais pesados e algumas enzimas degradativas são exemplos de substâncias que podem ficar retidas pela parede celular.

As bactérias Gram-positivas possuem, normalmente, uma quantidade maior de peptídeoglicanos em sua parede celular do que as Gram-negativas, o que torna sua parede mais espessa. A quantidade deste polímero na parede celular pode representar mais de 50% do peso seco da parede de algumas espécies Gram-positivas. Por outro lado, representam algo em torno de 5 a 10% da parede celular das Gram-negativas.

A parede celular das bactérias Gram-negativas são mais complexas do que as Gram-positivas. Elas possuem uma membrana externa cobrindo uma camada de peptídeoglicano que distingue as bactérias Gram-negativas. Da mesma forma que a parede espessa das bactérias Gram-positivas, a membrana externa das Gram-negativas trabalha como uma barreira seletiva que controla a passagem de algumas substâncias para dentro e para fora da célula. A estrutura básica da membrana externa das Gram-negativas é constituída de uma camada dupla de fosfolipídeos, que apresenta uma face apolar voltada para dentro, protegida por meio aquoso, e uma face polar voltada para fora. Ela está ancorada ao peptídeoglicano por uma lipoproteína. A membrana externa conta ainda com algumas proteínas e lipopolissacarídeos. Estes se localizam na parte externa da membrana, enquanto os fosfolipídeos estão, em sua grande maioria, na camada interna. Os lipopolissacarídeos são característicos apenas das bactérias Gram-negativas (Pelczar Jr., 1997).

2.2.3. Contaminação bacteriana em fermentações alcoólicas

A contaminação bacteriana é um problema bastante conhecido e estudado por pesquisadores de todo o mundo. Ela é uma das principais responsáveis pela diminuição da viabilidade celular e queda de rendimento em fermentações alcoólicas protagonizadas por *Saccharomyces cerevisiae* (Iemma, 2005; Narendranath *et al.*, 1997).

Apesar de alguns trabalhos não mostrarem tal relação de causa e consequência (Skinner e Leathers, 2004), é impossível negar que não existam perdas em um processo fermentativo com altos índices de contaminação, uma vez que cada molécula de glicose desviada para produção de ácido láctico, acético ou algum outro produto do metabolismo celular destas bactérias, corresponde a duas moléculas a menos de etanol que poderiam ter sido produzidas pela levedura.

Fermentações alcoólicas contaminadas propiciam uma competição, entre leveduras e bactérias, por nutrientes que estão presentes naquele meio. São vários os nutrientes demandados pelas leveduras para a manutenção de seu metabolismo celular e reprodução. Na Tabela 2.2 foram expostas as concentrações de minerais que se deve verificar em um mosto, para uma boa fermentação alcoólica, segundo Amorim, 2005. Além de nutrientes minerais, as leveduras precisam de uma fonte de carbono que forneça energia química e matéria para o esqueleto carbônico de suas estruturas celulares que, além de carbono, contém significativas quantidades de oxigênio e hidrogênio.

Segundo Bayrock e Ingledew (2004), a competição por estes nutrientes pode ser a principal causa da diminuição da viabilidade celular da *Saccharomyces cerevisiae* e consequente queda de rendimento de um processo de produção de etanol contaminado.

Tabela 2.2. Concentrações de nutrientes minerais no mosto para se obter uma boa fermentação alcoólica.

Mineral	Variação no Mosto (mg/L)	Recomendação (mg/L)
N-assimilável ($\text{NH}_4^+ \text{R} - \text{NH}_2$)	7 - 350	100 – 300
Fósforo (P)	20 - 200	50 – 250
Potássio (K)	300 - 1200	700 – 1300
Magnésio (Mg)	80 - 3900	100 – 200
Enxofre (S)	80 - 3900	↓
Cálcio (Ca)	150 - 2000	↓
Zinco (Zn)	0,45 - 9	1 – 5
Cobre (Cu)	0,20 - 8	1 – 5

Manganês (Mn)	2,0 - 8,0	1 – 5
Alumínio (Al)	5 - 240	<30 (mosto de caldo)

(Fonte: Amorim, 2005)

2.2.4. Principais bactérias contaminantes em uma fermentação alcoólica

O metabolismo das bactérias contaminantes dos processos de produção de etanol produz alguns compostos químicos que são liberados no meio fermentativo. Dentre estes compostos, destaca-se o ácido láctico, o qual evidencia a presença marcante de bactérias do gênero *Lactobacillus* nesses processos. Estudos mostram que as bactérias lácteas são as mais encontradas nos processos de fermentação alcoólica das indústrias de etanol combustível. O ácido acético, outro produto metabólico das bactérias, também está entre as principais substâncias consideradas tóxicas e inibidoras do desempenho da *Saccharomyces cerevisiae* (Skinner e Leathers, 2004; Bayrock e Ingledew, 2004).

A presença marcante de bactérias do gênero *Lactobacillus* se deve ao fato de estes micro-organismos apresentarem certas habilidades que favorecem seu desenvolvimento nesses processos. Resistência a altas temperaturas, tolerância a baixos valores de pH e capacidade de reprodução rápida são algumas dessas características. Além disso, limpeza e assepsia são exigências pouco rigorosas nessas indústrias. Por isso, focos de contaminação podem facilmente surgir ao longo de todo o circuito de tubulações e equipamentos envolvidos no processo (Narendranath *et al.*, 1997).

De acordo com Gallo (1990), a contaminação bacteriana que predomina em processos industriais de fermentação alcoólica mostra-se predominantemente Gram-positiva (98,5%), em forma de bastonetes (85,3%) e não esporulantes (73,9%). Ainda segundo este autor, os gêneros mais freqüentes também são os *Lactobacillus* (59,7%) e *Bacillus* (26,6%).

Skinner e Leathers (2004) realizaram alguns trabalhos enfocando a contaminação bacteriana na produção de etanol a partir de milho em unidades industriais que utilizavam moendas úmidas e trituradores secos. Nas moendas úmidas, o milho é inicialmente embebido em água e tratado com SO₂ a 52°C por 20-40 horas. Nos trituradores secos, por sua vez, o procedimento é mais simples, pois o milho triturado é encaminhado diretamente para o tratamento e fermentação. Estes autores isolaram e identificaram as principais bactérias contaminantes presentes nesses dois processos e em ambos constataram a prevalência do gênero *Lactobacillus*. Verificaram que o *Lactobacillus sp.* foi a espécie predominante na produção de etanol a partir do milho em ambos os processos.

Em processos envolvendo a cana-de-açúcar, também foi verificada a presença marcante de *Lactobacillus* sp. (Rosales, 1989). Outra espécie bastante comum nas fermentações de mostos preparados com caldo de cana é o *Lactobacillus fermentum* (Gallo, 1990; Oliva-Neto, 1990). Além de *Lactobacillus*, é muito comum se relacionar outros gêneros de bactérias em fermentações contaminadas. *Bacillus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus*, *Enterobacter*, *Cloristidium* e *Acetobacter* são bactérias comuns em fermentações alcoólicas mal sucedidas (Amorim e Oliveira, 1982; Serra *et al.*, 1979).

Alcarde *et al.* (2007) testaram a viabilidade de *Saccharomyces cerevisiae* cultivada em associação com bactérias contaminantes de fermentação alcoólica, tais como, *Bacillus subtilis*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus stearothermophilus*, *Lactobacillus fermentum* e *Lactobacillus plantarum*. Segundo o autor, apenas *Lactobacillus fermentum* e *Bacillus subtilis* conseguiram reduzir a viabilidade celular da *Saccharomyces cerevisiae* em cultivo misto. A levedura teve sua viabilidade reduzida em 59,2% quando em cultivo com *Bacillus subtilis*, enquanto o *Lactobacillus fermentum* provocou uma queda de 73,5% da viabilidade da *Saccharomyces cerevisiae*. Conclui-se que a acidez do meio juntamente com a presença das bactérias ativas foram os principais fatores relacionados à redução da viabilidade da levedura (Alcarde *et al.*, 2007).

2.2.5. Principais efeitos causados pelos produtos metabólicos das bactérias

Segundo Thomas *et al.* (2002), a presença significativa de ácido láctico e acético pode ser a causa da diminuição da viabilidade celular das leveduras e queda de rendimento na produção de etanol. Para o autor, a inibição do crescimento da *Saccharomyces cerevisiae* por estes ácidos orgânicos está em função do pH extracelular, da capacidade de proteção proporcionada pelo meio e do total destes ácidos presentes no mesmo.

Thomas *et al.* (2002) realizaram diferentes testes de cultivo com *Saccharomyces cerevisiae* variando a composição nutricional do meio, o pH e a concentração de ácido láctico e acético. Segundo o autor, trabalhando-se com o pH extracelular próximo ao pH intracelular da levedura, tem-se um menor desperdício de energia, a qual seria gasta para manter o pH interno em uma faixa ótima de trabalho para o crescimento celular.

Em uma fermentação alcoólica, o pH intracelular da *Saccharomyces cerevisiae* é normalmente mantido entre 5,5 e 5,75, quando o pH externo é 3,0, ou entre 5,9 e 6,75 quando o pH externo variar entre 6,0 a 10,0 (Imai e Ohno, 1995). Para manter o pH intracelular em uma faixa ótima de trabalho, as células bombeiam prótons para o meio externo, gastando

energia (ATP). Portanto, quanto mais próximos estiverem o pH do meio e o pH intracelular da levedura, menor será o esforço realizado por estes micro-organismos para manter o pH intracelular em uma condição ótima de trabalho (Thomas *et al.*, 2002). Conseqüentemente, as leveduras sofrerão um menor stress e consumirão menos energia em atividades que não despertam interesse em tal processo produtivo.

Outra constatação de Thomas *et al.* (2002) está relacionada com os efeitos opostos observados quando se varia o pH do meio. Tendo em vista que em baixos valores de pH mais baixos a concentração de ácidos orgânicos não dissociados é maior do que em pH mais elevados, estes ácidos não dissociados conseguem chegar ao citoplasma das leveduras em que podem encontrar um pH mais elevado, fazendo-os dissociarem e abaixarem o pH intracelular das leveduras. Esta, por sua vez, realizará um esforço indesejado para retirar prótons do interior de sua célula a fim retornar o pH a uma condição menos estressante para o micro-organismo. Esse consumo de energia metabólica é indesejado nos processos de produção de etanol, uma vez que esta energia poderia ser gasta para produzir o produto desejado. Para Thomas *et al.* (2002) a quantidade de ácidos não dissociados que difundem para dentro do citoplasma celular da levedura depende da concentração externa de ácidos orgânicos e do pH do meio. O equilíbrio entre concentrações externa e interna destes ácidos orgânicos não dissociados será restabelecido se os ácidos não dissociados se dissociarem dentro das células quando em contato com o alto pH intracelular. Caso esta dissociação intracelular seja contínua, mais ácidos não dissociados irão migrar para o interior da célula. O total de ácido não dissociado difundido estará em função da concentração externa do mesmo, que por sua vez, é função do pH extracelular e da concentração total de ácido.

Utilizando um fermentador CSTR em estado estacionário, Bayrock e Ingledew (2004) provocaram algumas perturbações no sistema introduzindo ácido láctico em quantidades pré-determinadas. Verificou-se nitidamente o efeito nocivo da presença do ácido não dissociado à viabilidade celular das leveduras (Figura 2.7), a qual atinge níveis baixíssimos em concentrações de ácido láctico acima de 4,5% w/v.

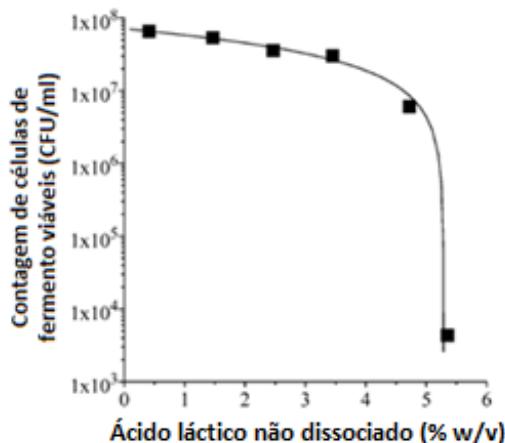


Figura 2.7. Viabilidade celular de leveduras utilizadas em processo contínuo realizado em um fermentador CSTR em função da presença de ácido láctico não dissociado (Bayrock e Ingledew, 2004).

Bayrock e Ingledew (2004) acompanharam ainda o efeito causado na produtividade e no consumo de açúcar em consequência da adição de ácido láctico no meio. Foi constatado que a concentração de glicose na saída do fermentador aumentou com o aumento da concentração de ácido láctico no meio. Verificou-se ainda que a concentração de etanol na saída do fermentador utilizado no processo diminuiu conforme se aumentava a concentração de ácido láctico no processo (Figura 2.8).

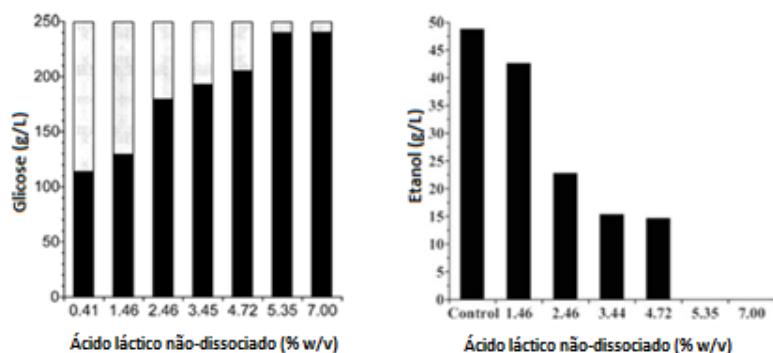


Figura 2.8. Glicose consumida (branco), glicose residual (preto) e concentração de etanol observados na saída de em fermentador CSTR com a adição de ácido láctico (Bayrock e Ingledew, 2004).

Apesar do notável efeito nocivo representado pela presença de altas concentrações de ácido láctico, Bayrock e Ingledew (2004) verificaram que o *stress* sofrido pelas leveduras sob estas condições estimulou a taxa de produção de etanol e o consumo de glicose

inesperadamente (Figura 2.9). Quando a concentração de ácido láctico na corrente de entrada do fermentador ultrapassou 3,5% w/v, as leveduras sobreviventes aumentaram acentuadamente a taxa de consumo de glicose (de 2×10^{-6} g CFU⁻¹ h⁻¹ para 2×10^{-3} g CFU⁻¹ h⁻¹). Segundo o autor, a alta concentração de ácido láctico não-dissociado, além de diminuir a viabilidade celular no sistema, força as células remanescentes a produzirem mais etanol.

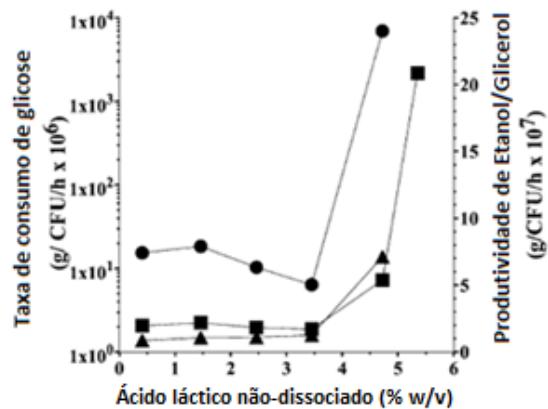


Figura 2.9. Produtividade específica de etanol (círculos), consumo específico de glicose (quadrados) e produtividade específica de glicerol (triângulos) em função da concentração de ácido láctico não dissociado (Bayrock e Ingledew, 2004).

Altos índices de contaminação também podem provocar a floculação das leveduras utilizadas no processo de fermentação. Dependendo da intensidade do problema, a floculação pode causar queda na velocidade da fermentação e, consequente diminuição na produtividade. Floculadas, estas leveduras também podem levar a entupimentos em tubulações e bicos de centrífugas separadoras de fermento, dificuldades no tratamento ácido do creme de levedura e diminuição da eficiência dos antibióticos empregados (Lima *et al.*, 2001; Amorim, 2005; Pacheco, 2010).

Outro composto químico marcante em fermentações alcoólicas é o glicerol. Depois do etanol, este é o composto químico mais produzido pela levedura em uma fermentação. Ele é formado pela necessidade da manutenção do balanço redox favorável pela conversão do excesso de NADH, que é gerado durante a formação da biomassa, a NAD⁺. Uma vez que a formação do glicerol requer a redução da dihidroxicetona-fosfato a glicerol-3-fosfato (G-3-P) pela dihidroxicetona-fosfato-redutase, ele converte uma molécula de NADH, gerada na oxidação do gliceraldeído-3-fosfato, a NAD⁺ (Berovic *et al.*, 2007).

Apesar de estar associado ao metabolismo natural da *Saccharomyces cerevisiae*, a formação de glicerol pode ser estimulada pelo estresse osmótico, químico ou microbiológico (Cherubin, 2003; Basso *et al.*, 2004). Por isso, o aumento da pressão osmótica, o excesso de sulfito no mosto e uma contaminação bacteriana acentuada podem fazer com que as leveduras aumentem a produção de glicerol, como um mecanismo de defesa a esses fatores estressantes.

2.3. Antibióticos

O termo antibiótico é usado normalmente para se referir a algum agente antimicrobiano sintético, semi-sintético ou natural, que seja efetivo em baixas concentrações. Para ser efetivo, um antibiótico precisa alcançar o seu alvo, matando o micro-organismo (microbiocida) ou impedindo seu crescimento e reprodução. (Singleton e Sainsbury, 2006).

Os antibióticos são produtos metabólicos secundários produzidos por micro-organismos, geralmente mofos e bactérias do gênero *Streptomyces*, *Bacillus* e *Paenibacillus spp.* Alguns antibióticos também podem ser produzidos usando manipulação química parcial ou completa, tais como a fosfomicina, entre outros.

Segundo Guilfoile (2007), desde a descoberta da penicilina, vários outros antibióticos foram desenvolvidos e introduzidos no mercado. Esses antibióticos tinham um objetivo em comum, matar bactérias. Para isso, utilizavam de diferentes rotas, ou seja, atacavam de diferentes maneiras. Os principais alvos dos antibióticos são parede celular, ribossomos, replicação do DNA, síntese de RNA e enzimas específicas (Tabela 2.3).

Tabela 2.3. Resumo dos mecanismos de ação para diferentes classes de antibióticos.

Classe de antibióticos (Exemplo)	Mecanismo de ação
Aminoglicosídeos (Streptomicina)	Inibe a síntese de proteínas
Cefalosporinas (Ceftazidima)	Inibe a síntese da parede celular
Cloronfenicol	Inibe a síntese de proteínas
Glicopeptídeos (Vancomicina)	Inibe a síntese da parede celular
Lincosamides (Clindamicina)	Inibe a síntese de proteínas
Macrolídeos (Eritromicina)	Inibe a síntese de proteínas
Penicilinas (Ampicilina)	Inibe a síntese da parede celular
Oxazolidinonas (Linezolide)	Inibe a síntese de proteínas
Quinolonas (Ciprofloxacina)	Inibe a síntese de DNA
Rifamicinas (Rifampicina)	Inibe a síntese de RNA

Streptograminas (Sinercida)	Inibe a síntese de proteínas
Sulfonamidas (Sulfametoxazol)	Inibe mecanismos bioquímicos (síntese de ácido fólico)
Tetraciclinas (Doxiciclina)	Inibe a síntese de proteínas

(Fonte: Guilfoile, 2007)

Entretanto, percebeu-se ao longo desses anos, que bactérias combatidas por esses antibióticos começaram a criar resistência à ação dos mesmos, tornando-os ineficazes (Tabela 2.4). Essa resistência fundamenta-se nas modificações genéticas sofridas intensamente por esses micro-organismos, gerando descendentes com características diferentes e muitas vezes favoráveis a resistência a ação daquele antibiótico. Uma vez que a reprodução celular desses micro-organismos acontece rapidamente, uma simples bactéria resistente surgida em meio a tantas outras susceptíveis a ação do antibiótico consegue gerar milhões de outras bactérias resistentes em poucas horas (Guilfoile, 2007).

Tabela 2.4. Ano de surgimento de alguns antibióticos e os primeiros registros de resistência.

	Introduzido	Resistência ocorrida
Sulfonamidas	1930's	1940's
Penicilina	1943	1946
Streptomicina	1943	1948
Bacitracina	1945	1953
Cloranfenicol	1947	1959
Cefalosporina	1960's	Final da década de 1960
Neomicina	1949	1950
Tetraciclina	1948	1953
Eritromicina	1952	1988
Vancomicina	1956	1988
Canamicina	1957	1966
Meticilina	1960	1961
Ampicilina	1961	1973
Gentamicina	1963	1969
Carbenicilina	1964	1974
Clindamicina	1969	1970
Amoxilina	1972	1975

Piperacilina	1980	1981
Augmentina	1984	1984
Aztreonam	1984	1985
Imipenem	1985	1985
Ciprofloxacina	1987	1987
Quinupristina dalfopristina	1999	2000
Linezolida	2000	2002

(Fonte: Guilfoile, 2007)

2.3.1. Mecanismo de ação dos antibióticos

Para entender o mecanismo de ação dos antibióticos, é necessário entender como as bactérias sintetizam sua parede celular. Inicialmente, elas produzem N-acetyl glucosamina e ácido N-acetyl muramico no citoplasma, compostos que funcionarão como uma espécie de “blocos de construção” para a parede celular. Esses compostos são transportados através da membrana celular por meio de uma molécula transportadora, as quais se juntam a uma longa cadeia de “blocos de construção”, por um processo chamado transglicosilação. Então elas são ligadas a outra longa cadeia de moléculas, por um processo chamado transpeptidação.

Entretanto bactérias produzem novas paredes celulares somente quando estão em crescimento. Portanto os antibióticos que perturbam esse processo são efetivos somente contra células em crescimento. Contudo, diferentes antibióticos podem apresentar mecanismos distintos de atuação. A penicilina, por exemplo, consegue inibir a transpeptidação. A bacitracina inibe a regeneração da molécula transportadora responsável por mover os “blocos de construção”, enquanto a vancomicina inibe os processos de transglicosilação e transpeptidação. Alguns antibióticos conseguem destruir a membrana celular das bactérias. A polimixina é um exemplo de antibiótico que consegue romper estas membranas.

Outro possível mecanismo de ação dos antibióticos fundamenta-se a atingir os ribossomos desses micro-organismos. Essas organelas são responsáveis pela síntese de novas proteínas necessárias àquele metabolismo e que são sintetizadas através de um processo chamado tradução. Para que esse processo seja concluído com sucesso, os ribossomos necessitam da atuação do RNA mensageiro, do RNA transferidor e dos aminoácidos. Durante a tradução, o ribossomo “lê” o RNA mensageiro a cada três nucleotídeos e os RNAs transportadores trazem o aminoácido apropriado para a construção da proteína desejada. Alguns antibióticos, como a estreptomicina, tem como alvo os ribossomos. Ela se liga as

proteínas dos ribossomos interferindo na movimentação do ribossomo ao longo do RNA mensageiro. Conseqüentemente, a síntese de proteínas se torna menos precisa. Assim como a estreptomicina, a eritromicina também atua sobre o ribossomo, mas age fazendo com que a síntese termine prematuramente.

Uma outra forma de atuação dos antibióticos está relacionada a síntese de DNA ou RNA. A síntese de DNA é um processo complexo, que envolve enzimas como a DNA girase e a topoisomerase, que ajudam a torcer e distorcer o DNA durante a replicação. Estas enzimas ainda cortam o DNA e, em seguida, “colam” as pontas cortadas juntas novamente. A ciprofloxina atua permitindo que a topoisomerase corte o DNA, mas não “cole” novamente, impedindo que a bactéria replique seu DNA.

Na síntese de RNA as bactérias utilizam a enzima RNA polimerase. Alguns antibióticos, como a rifampicina, ligam-se a RNA polimerase impedindo a síntese do RNA e, consequentemente, a síntese de novas proteínas, provocando a morte dessas bactérias.

Outra forma de atuar contra o desenvolvimento de bactérias é inibindo rotas metabólicas que acontecem nas células desses micro-organismos. O ácido fólico, por exemplo, participa de várias reações químicas presentes nesses metabolismos. Entretanto, as bactérias sintetizam seu próprio ácido fólico a partir de outros compostos. As sulfonamidas conseguem se passar por estes compostos durante a síntese do ácido fólico. No entanto, elas se ligam nas enzimas envolvidas no processo incapacitando-as. A Tabela 2.5 apresenta o espectro de atuação de alguns antibióticos (Guilfoile, 2007).

Tabela 2.5. Espectro de atuação de alguns antibióticos.

Antibióticos que atuam principalmente em bactérias gram-positivas:

Bacitracina	Penicilina
Clindamicina	Vancomicina
Meticilina	

Antibióticos que atuam principalmente em bactérias gram-negativas:

Gentamicina	Polimixina B
-------------	--------------

Antibióticos que atuam sobre bactérias gram-positivas e gram-

negativas:	
Ampicilina	Eritromicina
Carbenicilina	Estreptomicina
Cefalosporina	Sulfonamidas
Cloranfenicol	Tetraciclina
Ciprofloxacina	Trimetropim

(Fonte: Guilfoile, 2007)

2.3.2. Utilização de antibióticos nas indústrias de alimento e destilarias

Na indústria de alimentos, o uso de conservantes químicos não é um costume bem visto pelos consumidores. A aplicação de antibióticos, por sua vez, provoca uma rejeição ainda maior. Nos Estados Unidos, a visão que se tem a respeito dos antibióticos é a de que os benefícios trazidos pela utilização do mesmo não deve ser mais importante que os riscos a que os consumidores estarão sujeitos.

A maior parte dos antibióticos utilizados na indústria de alimentos é aplicada para tratar, controlar e prevenir doenças dos rebanhos, além de melhorar a eficiência de sua alimentação. A monensina, por exemplo, teve seu uso aprovado nos Estados Unidos como aditivo para a alimentação de gado, pois melhora a eficiência de alimentação de ruminantes. A natamicina, por sua vez, não é utilizada na alimentação de animais, mas apenas como agente clínico. Outros antibióticos, como as tetraciclinas, são utilizadas no tratamento de doenças de seres humanos, animais e, ainda, como suplemento na alimentação de alguns rebanhos nos Estados Unidos (Jay *et al.*, 2005).

Tabela 2.6. Propriedades de alguns antibióticos utilizados na indústria de alimentos.

Propriedade	Tetraciclinas	Subtilina	Tilosina	Nisina	Natamicina
Muito usado em alimentos	Não	Não	Não	Sim	Sim
Primeiro uso em alimentos	1950	1950	1961	1951	1956
Natureza química	Tetraciclinas	Polipeptídeos	Macrolídeos	Polipeptídeos	Polienos
Usado como adjuvante de calor	Não	Sim	Sim	Sim	Não
Estabilidade térmica	Sensível	Estável	Estável	Estável	Estável
Espectro microbiano	G+,G-	G+	G+	G+	Fungi
Usado como medicamento	Sim	Não	Sim (*)	Não	Sim (**)
Usado em alimentos	Sim	Não	Sim	Não	Não

(*) Em tratamento de doenças

de aves

(**) Limitado

(Fonte: Jay et al., 2005)

Na indústria do etanol, a prática da aplicação de um ou mais antibióticos no controle de contaminações bacterianas é bastante comum. Antibióticos como a penicilina, tetraciclina, clorotetraciclina, oxitetraciclina, virginiamicina e monensina são utilizados rotineiramente nas indústrias do setor (Bayrock *et al.*, 2003; Day *et al.*, 1954; Aquarone, 1959).

O desempenho de alguns deles, como a penicilina e a tetraciclina, é conhecido há vários anos. Em 1959, Aquarone já havia realizado alguns trabalhos com o intuito de avaliar o desempenho desses antibióticos em fermentações alcoólicas das indústrias canavieiras. Ele verificou um bom desempenho dos dois antibióticos testados. Segundo o autor, a penicilina é um bom agente de controle de contaminação em concentrações menores que 500 unidades/litro e não tem influência direta na atividade da levedura até a faixa de concentração testada. A tetraciclina, por sua vez, agiu como inibidor de contaminação quando presente em concentrações de 1 a 30 mg/litro e também não prejudicou o desempenho da levedura.

Day *et al.* (1954) avaliaram o desempenho de vários antibióticos em fermentações alcoólicas, dentre eles a penicilina, aureomicina, cloromicetina, terramicina e streptomicina (Figura 2.10). Todos os antibióticos testados tiveram algum efeito inibitório na contaminação. Segundo os autores, baseando-se na quantidade de antibiótico requerido para um desempenho satisfatório, a penicilina foi a mais efetiva. Aureomicina, cloromicetina, terramicina e bacitracina foram menos efetivas e os demais antibióticos testados não foram efetivos. Nos testes realizados, os antibióticos, particularmente a penicilina, evitaram o crescimento de bactérias.

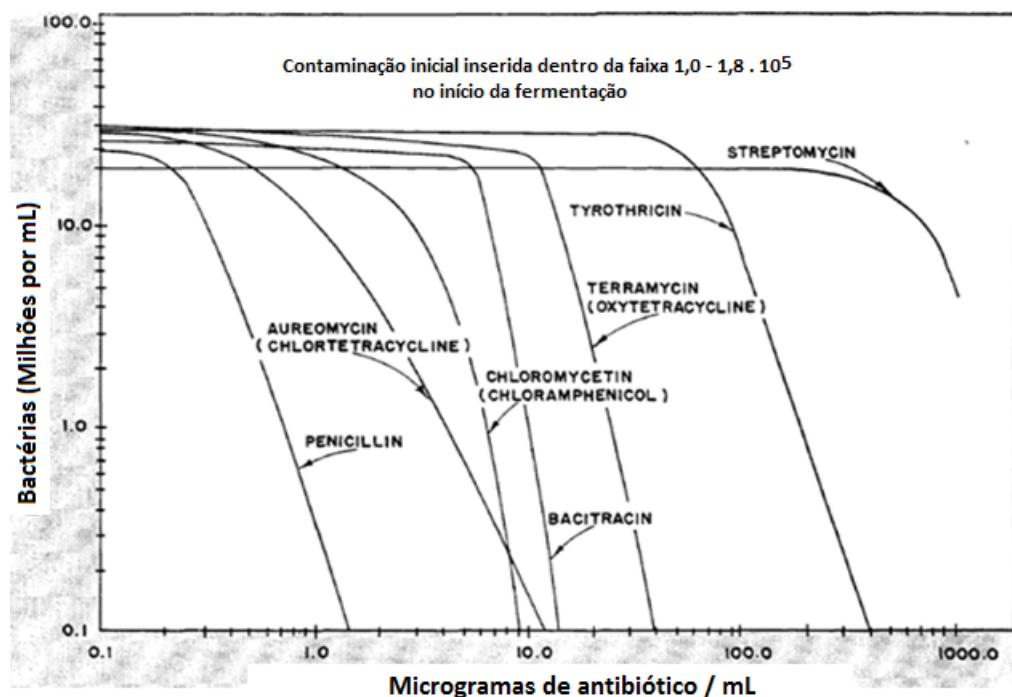


Figura 2.10. Efeito dos antibióticos penicilina, aureomicina, cloromicetina, terramicina, streptomicina, bacitracina e tirotricina no início de fermentações com populações bacterianas (Day *et al.*, 1954).

2.4. Utilização de leveduras como fonte de proteínas

A utilização de processos fermentativos na produção de alimentos é uma prática bastante antiga. Há mais de 4000 anos os egípcios produziam pães e bebidas alcoólicas a partir de cereais e frutas sem conhecerem os verdadeiros mecanismos que regiam aquele processo. Atualmente, ainda é ampla a utilização destes processos na indústria alimentícia de todo o mundo. Produtos como vinagre, iogurte, queijos, cervejas, vinhos, dentre outros, todos oriundos de vias fermentativas, estão inseridos nas dietas de pessoas de todo o mundo.

A *Saccharomyces cerevisiae* é um dos micro-organismos utilizados pela indústria de alimentos. Em sua forma ativa, atua em processos fermentativos para obtenção de algum produto de interesse. Quando inativa, é considerada uma fonte rica em proteínas e nutrientes que podem servir de complemento nutricional na alimentação de animais e seres humanos (Moraes *et al.*, 2009; Sgarbieri *et al.*, 2003).

As leveduras contém de 31 a 48% de proteínas, altos teores de vitaminas, como o complexo B (B1, B2, B6, niacina, ácido pantotênico, ácido fólico e biotina), vários minerais (Ca, P, Mg, K, Na, Al, Fe, Mn, Cu, B, Zn, Mo, Cd, Cr, Ni, Pb, Si e Se) e de 25 a 35% de carboidratos (Halasz & Lásztity, 1991).

Em seu trabalho visando a determinação do valor protéico de leveduras *Saccharomyces sp.*, Vilela *et al.* (2000) chegaram aos resultados expostos na Tabela 2.7, em que expõe a relação de aminoácidos essenciais e proteínas das células das leveduras utilizadas.

Tabela 2.7. Adequação de aminoácidos essenciais das células íntegras de levedura, autolisado total e extrato de levedura, tendo por base o padrão de referência da FAO/WHO.

Aminoácidos essenciais (mg / 100 mg de proteína)	Padrão FAO/WHO	Células íntegras	Autolisado Total	Extrato de levedura
Treonina	3,4	6,16	5,84	5,19
Metionina + cisteína	2,5	2,84	2,11 (*)	3,56
Valina	3,5	6,2	5,87	6,76
Leucina	6,6	8,84	7,8	8,07
Isoleucina	2,8	5,64	4,87	5,69
Fenilalanina + Tirosina	6,3	9,98	8,53	6,91
Lisina	5,8	7,13	9,54	8,58
Histidina	1,9	2,06	3,15	3,01
Triptofano	1,1	1,45	1,55	1,31

(*) Aminoácido limitante (84% do recomendado)

(Fonte: Vilela *et al.*, 2000)

Existem diferentes formas de se aplicar a levedura inativa como fonte de nutrientes. Ela pode ser utilizada em sua forma íntegra, autolisada ou como extrato de levedura. Autólise é a desintegração de células e tecidos vegetais ou animais. A partir das células autolisadas, separa-se a parede celular e obtém-se o extrato de levedura. A aplicação de cada um desses produtos ficará em função das necessidades nutritivas e capacidades digestivas de cada espécie que será nutrida. Para consumo humano, por exemplo, a parede celular espessa, rígida e resistente a ação das enzimas digestivas é um fator limitante (Snyder, 1970; Galvez *et al.*, 1990).

Além de serem ricas fontes de nutrientes, as leveduras estão disponíveis no mercado brasileiro de produção de etanol e nas cervejarias como um subproduto que, muitas vezes, é descartado como resíduo.

Ferreira *et al.* (2010) relata que as leveduras mais usadas na indústria da cerveja são as *Saccharomyces bayanus*, *Saccharomyces cariocanus*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces kudriavzevii*, *Saccharomyces mikatae* e a *Saccharomyces paradoxus*. Estas leveduras possuem características como crescimento rápido, habilidade para produzirem etanol e tolerância a diferentes ambientes estressantes, como altas concentrações de etanol no meio e baixos níveis de oxigênio. Na Tabela 2.8 estão expostas algumas das aplicações encontradas para as leveduras originárias da indústria da cerveja.

Outra grande fonte em potencial para a produção de leveduras disponível no Brasil são as destilarias das usinas sucroenergéticas, em que cada litro de etanol produzido nas destilarias brasileiras, cerca de 60 gramas de levedura são geradas, sendo que cerca de 30 a 40 gramas são perdidos na vinhaça e cerca de 20 a 30 gramas podem ser recuperadas para a secagem (Taube, 2009).

Por isso, diante de tamanho potencial, percebeu-se a importância da utilização deste subproduto como fonte de nutrientes. Inúmeras pesquisas vêm sendo realizadas para que se possa avaliar as melhores condições de aplicação da *Saccharomyces cerevisiae* na dieta de aves (Moraes *et al.*, 2009), bovinos (Santos *et al.*, 2006), cordeiros (Neumann *et al.*, 2008), suínos (Araújo *et al.*, 2006), coelhos (Scapinello *et al.*, 1997), dentre outros tipos de rebanho, de modo a verificar possíveis perdas e ganhos trazidos pelo micro-organismo.

Tabela 2.8. Aplicação de autolisados e hidrolisados de leveduras da indústria da cerveja como uma fonte de nutrientes em meios microbiológicos.

Leveduras das cervejarias	Micro-organismos	Efeitos	Aplicações
Extrato de levedura puro ou misturado com fermento de padaria	<i>Lactobacillus casei</i> EQ28 e EQ85, <i>Lactobacillus acidophilus</i> EQ57, <i>Pediococcus acidilactici</i> MA18/5-M	Somente para <i>L. acidophilus</i> EQ57 o crescimento foi melhor na presença de 100% de leveduras de cervejarias. <i>L. plantarum</i> A112 e <i>L. acidophilus</i>	Formulação de meio de crescimento microbiológico
Mistura de suco de beterraba e autolisados de leveduras de cervejarias	<i>Lactobacillus plantarum</i> A112, <i>L. acidophilus</i> BGSJ15-3 <i>L. acidophilus</i> NCDO1748	<i>BGSJ15-3</i> pode ser usado com sucesso para fermentações da mistura de suco de beterraba e autolisado de levedura de cervejaria.	Aditivo funcional em bebidas
Mistura de suco de beterraba, suco de cenoura e autolisado de leveduras de cervejarias.	<i>L. acidophilus</i> NCDO1748	Alto conteúdo mineral no suco de beterraba aumenta a produção de ácido láctico	Aditivo funcional em bebidas
Autolisado de levedura bruto suplementado com minerais e vitaminas.	Bactéria recombinante <i>Escherichia coli</i> KO11	Aumenta a formação de etanol.	Produção de etanol
Leveduras de cervejaria hidrolisadas ou autolisadas	<i>Actinobacillus succinogenes</i> NJ113	Hidrólise enzimática foi o método mais efetivo devido ao alto rendimento de ácido succínico e crescimento celular.	Produção de ácido succínico por preparação de polímeros biodegradáveis
Decomposição hidrotérmica de proteínas de leveduras de cervejarias	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	O crescimento de células de leveduras em um meio de cultura contendo 2 w/v% desse produto foi comparável ao do crescimento celular no meio contendo extrato de levedura comercial na mesma	Decomposição hidrotérmica de células de leveduras para a produção de proteínas e aminoácidos.

concentração.

(Fonte: Ferreira *et al.*, 2010)

As destilarias que realizam a secagem de leveduras para fins comerciais, principalmente aqueles voltados à alimentação humana ou de qualquer tipo de rebanho, estão atentas aos cuidados que devem ser tomados com as leveduras durante o processo de produção de etanol. Como o controle de contaminação desses processos está, em grande parte, baseado na utilização de antibióticos, os resíduos químicos deixados por esses produtos nas leveduras se tornou um problema. Segundo Henrique Amorim, presidente da Fermentec, em vários países está proibida a utilização de leveduras em processos voltados para o consumo humano e animal, com algum tipo de resíduo proveniente desses antibióticos. Segundo ele, uma alternativa para contornar esse problema seria não empregar antibióticos nas fermentações cinco dias antes da realização da sangria, que é a separação das leveduras em excesso formadas devido à reprodução desse micro-organismo durante o processo de fermentação (Anselmi, 2008). Outra alternativa é o desenvolvimento de outros mecanismos capazes de controlar os prejuízos causados pela contaminação bacteriana durante o processo de produção do etanol sem deixar resíduos.

2.5. Rotas alternativas a utilização de antibióticos

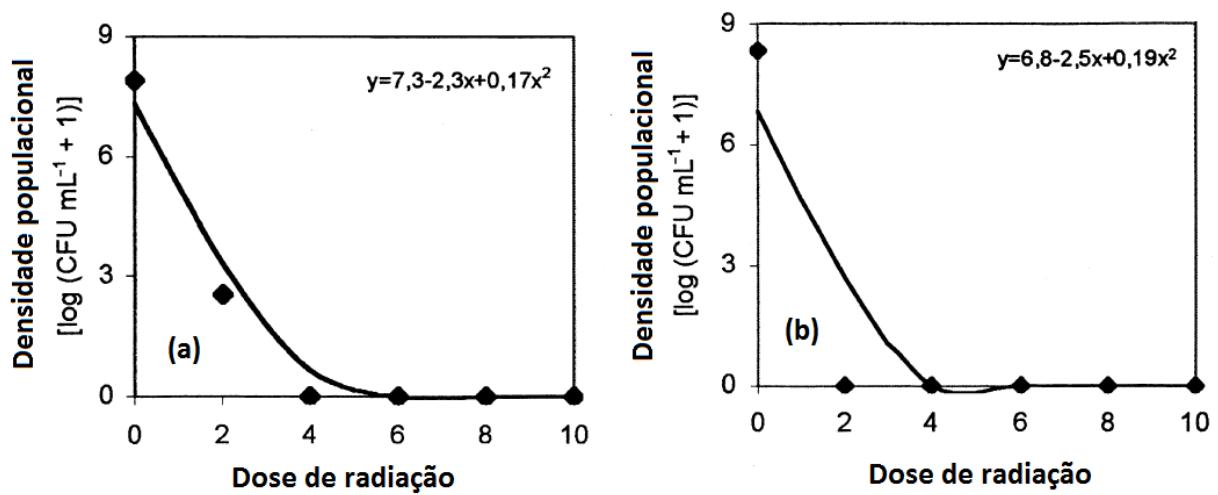
Existem diferentes correntes de pesquisa buscando alternativas capazes de eliminar ou, pelo menos, diminuir, a utilização de antibióticos no combate às contaminações bacterianas nos processos de fermentação alcoólica espalhados pelo mundo. Dentre elas estão a utilização de radiação γ (Alcarde *et al.*, 2002), radiação com ondas ultra-sônicas (Caliari *et al.*, 2004) e aplicação de compostos químicos diversos (Narendranath *et al.*, 2000; Chang *et al.*, 1997), tais como peróxido de hidrogênio, sulfito, e, até mesmo, produtos naturais com propriedades bactericidas, os chamados “antibióticos naturais” (Rodrigues *et al.*, 2009; Taube, 2009; Betabio, <http://www.betabio.com.br/>).

2.5.1. Utilização de radiação

Alcarde *et al.* (2002) realizaram alguns experimentos em que avaliaram a utilização de radiação γ contra a contaminação bacteriana em mostos de cana. Segundo eles, a radiação pode atuar modificando o DNA celular, o que afeta as funções normais das células e induz a

morte celular. Nesse trabalho, Alcarde *et al.* (2002) inocularam mosto com culturas de bactérias a 1% (v/v), o qual foi incubado a 32°C por 24 horas para o crescimento das bactérias. Então, irradiou o mosto com radiação γ em diferentes doses, para depois utilizá-lo em uma fermentação de 12 horas em um shaker a 32°C. A Figura 2.11 mostra o efeito causado pelas doses de irradiação (kGy) na redução da contagem de bactérias do mosto do caldo de cana-de-açúcar. Os níveis de contaminação das amostras testadas com diferentes micro-organismos foram reduzidos significativamente (Figura 2.11). Utilizando culturas de bactérias isoladas, seus testes foram capazes de zerar a contaminação em doses de radiação inseridas na faixa de 4 a 6 kGy. Em culturas mistas oriundas da flora natural do caldo de cana, a contaminação foi zerada apenas com radiações na casa dos 10 kGy. Na medida em que as doses de radiação foram aumentadas, foi constatado aumento no rendimento das fermentações (Figura 2.12).

O ganho médio de rendimento nas fermentações em que foi utilizada a radiação ficou em torno de 2%. A instalação completa de um irradiador para uma planta cuja produção anual de etanol seja, em média, 200 milhões de litros, gira em torno de US\$ 1,8 milhões de dólares e pode ser paga após dois anos de investimento com os lucros resultantes dos 2% acrescidos no rendimento da empresa (Alcarde *et al.*, 2002).



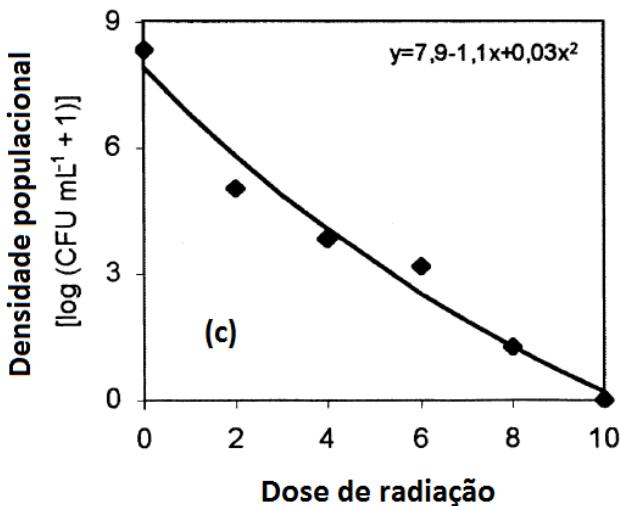


Figura 2.11. Efeito causado pelas doses de irradiação (kGy) na redução da contagem de bactérias do mosto do caldo de cana-de-açúcar contaminado com: (a) *L. plantarum*, (b) *L. fermentum*, (c) flora microbiológica natural do caldo de cana-de-açúcar. As equações representam as curvas de inativação obtidas por análises de regressão polinomial (Alcarde *et al.*, 2002).

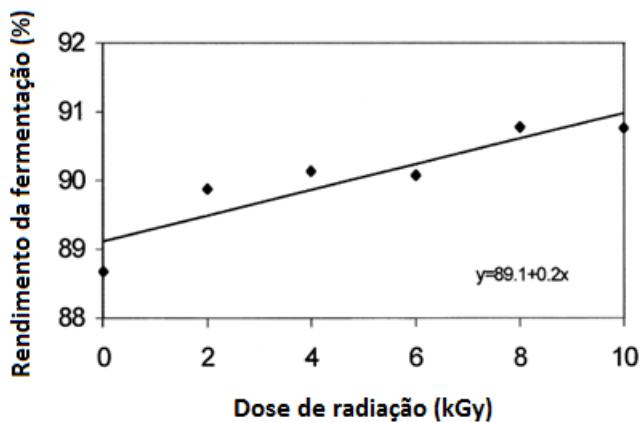


Figura 2.12. Efeito das doses de radiação (kGy) no rendimento de etanol (%) de fermentações de mostos de caldo de cana-de-açúcar contaminados (Alcarde *et al.*, 2002).

Caliari *et al.* (2004) avaliaram o controle da contaminação de caldo de cana com a bactéria *Leuconostoc mesenteroides* através da irradiação de ondas ultra-sônicas. A maior taxa de mortalidade obtida nas condições industriais foi de 8,06 %, aplicando-se as ondas ultra-sônicas com 250 W de potência, por 225 segundos em caldo de cana com 12º BRIX, pH de 5,5 e 45ºC. Para Caliari *et al.* (2004), ondas ultrasônicas podem ser utilizadas para reduzir a população de *Leuconostoc mesenteroides*.

2.5.2. Utilização de compostos químicos com características bactericidas

A utilização de UHP (uréia-peróxido-de-hidrogênio) como anti-bactericida em fermentações batelada com trigo pulverizado foi testada por Narendranath *et al.* (2000). Segundo eles, além de ter desempenhado um excelente papel em sua ação bactericida contra os *lactobacillus* utilizados, o UHP pode servir como uma fonte de nitrogênio (em forma de uréia), que é essencial para um bom crescimento celular e, também, para uma boa taxa de fermentação. Narendranath *et al.* (2000) relatam, ainda, que com a aplicação de UHP, não haverão resíduos químicos. A ação do UHP está fundamentada no efeito tóxico sofrido pelas bactérias devido aos produtos formados na decomposição do peróxido de hidrogênio. A Figura 2.13 mostra alguns resultados obtidos por Narendranath *et al.* (2000) relacionados a produtividade e nível de contaminação, representado pela concentração de ácido láctico.

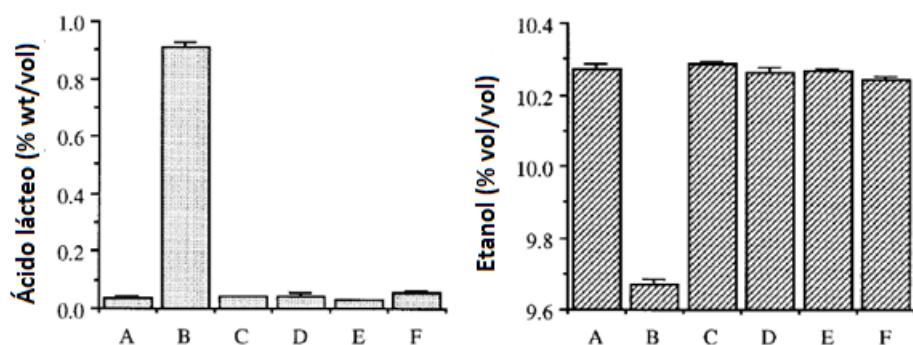


Figura 2.13. Concentração de ácido láctico produzido após 36 horas de fermentação pelo *L. paracasei* na presença ou ausência de UHP ou peróxido de hidrogênio. (A) controle (levedura, 30 mM uréia, sem bactéria. (B) levedura, *L. paracasei*, 30 mM de uréia; (C) levedura, 30 mM de UHP; (D) levedura, *L. paracasei* e 30 mM de UHP; (E) levedura, 30 mM de H₂O₂, 30 mM de ureia (adicionado separadamente); (F) levedura, *L. paracasei*, 30 mM de H₂O₂ e 30 mM de uréia (adicionado separadamente). Em todos os casos a levedura foi inoculada a 10⁶ CFU/mL. Onde adicionado, *L. paracasei* foi inoculado a 10⁷ CFU/mL (Narendranath *et al.*, 2000).

Nos gráficos apresentados na Figura 2.13, observa-se que a concentração de ácido láctico quando se utilizou UHP foi tão baixa quanto à do experimento em que bactérias não foram utilizadas. Nos experimentos em que não se utilizou UHP ou peróxido de hidrogênio, constatou-se uma redução de 5,84% no rendimento de etanol em comparação com o experimento tomado como controle.

Chang *et al.* (1997) avaliou a utilização de sulfito como um agente de controle de contaminação bacteriana em um processo de fermentação alcoólica contínua com recirculação

de células. O tratamento dessas células foi realizado com uma solução de sulfito preparada com meta-bissulfito de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$). Segundo o autor, a viabilidade das bactérias foi diminuída por uma concentração de sulfito entre 100 e 400 mg/litro, sem que houvesse alteração da viabilidade da *Saccharomyces cerevisiae* (Figura 2.14). Entretanto, o sulfito foi efetivo somente na presença de oxigênio (Figura 2.15).

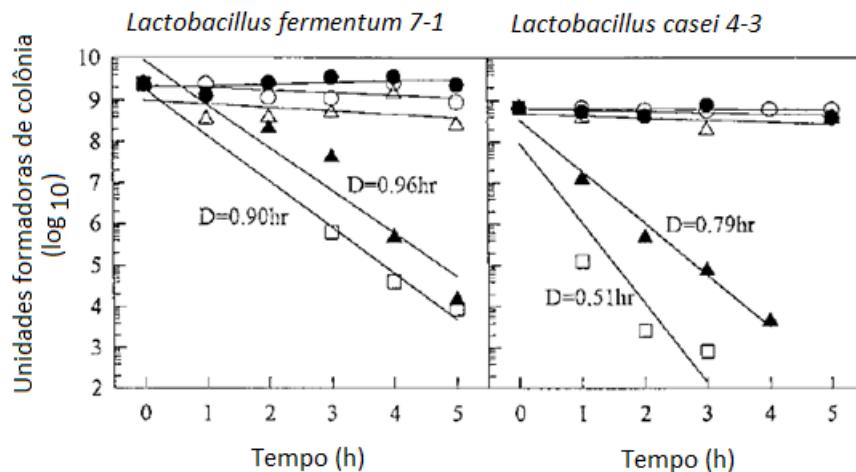


Figura 2.14. Espécies sobreviventes de *Lactobacillus* em relação ao tratamento com sulfito em função do tempo. Símbolos: círculos abertos, 0 ppm; círculos fechados, 32 ppm; triângulos abertos, 87 ppm; triângulos fechados, 134 ppm; quadrado aberto, 287 ppm (Chang *et al.*, 1997).

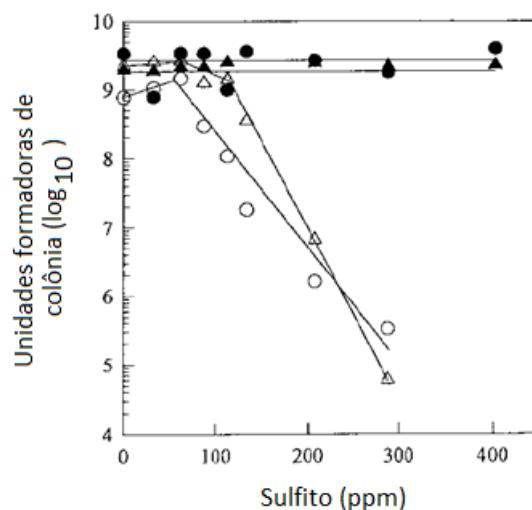


Figura 2.15. Efeito do tratamento com sulfito sobre a viabilidade de bactérias em condições aeróbicas (legendas abertas) e anaeróbicas (legendas fechadas). Símbolos: círculos, *L. Fermentum 7-1*; triângulos, *L. casei 4-3* (Chang *et al.*, 1997).

Segundo Chang *et al.* (1997), a utilização de sulfito pode ser mais econômica que a aplicação de ácido sulfúrico ou antibióticos, pois, ao contrário do ácido, que é utilizado em grandes quantidades na indústria do etanol, o sulfito deve ser aplicado em concentrações baixas. O autor afirma que, sob estas condições, o sulfito não afeta o metabolismo das leveduras.

Os parâmetros da fermentação alcoólica foram melhorados significativamente pelo tratamento com sulfito. Em alguns testes, a produtividade de etanol aumentou de 6,04 para 7,46 g/L.h tratando-se as células recirculadas à 400 ppm de sulfito. Outros resultados obtidos nesse trabalho estão expostos na Tabela 2.9.

Tabela 2.9. Efeito do tratamento com sulfito no controle de contaminação bacteriana durante fermentação alcoólica com reciclo de células.

Cultura	D	Etanol (g/L)	Glicose (g/L)	Produtividade de etanol (g/L/h)	Rendimento da produção de etanol (g/g)	Y p/s	Rendimento teórico de etanol (%)	Leveduras 10^7 CFU/mL	Bactérias 10^7 CFU/mL
Pura	0,1	90,0		9,0	0,5	0,5	97,8	25,0	
Contaminada									
<i>com L. fermentum 7- 1</i>	0,1	57,2	40,0	5,7	0,3	0,4	62,2	5,3	31,0
Tratamento									
<i>com sulfito de L. fermentum 7-1</i>	0,1	78,1	4,8	7,8	0,4	0,5	84,9	12,0	1,9
Caldo de fermentação industrial	0,1	60,4	35,9	6,0	0,3	0,4	65,7	3,0	5,3
como inóculo									
Tratamento									
<i>com sulfito em fermentação de caldo</i>	0,1	76,4	21,2	7,5	0,4	0,5	81,1	13,0	1,5

(Chang *et al.*, 1997)

A própolis é um produto coletado por abelhas dotadas de atividades biológicas versáteis que são usadas na medicina e em cosméticos. As propriedades antimicrobianas, antifúngicas, antiprotozoárias, antioxidantes e antivirais da própolis chamam a atenção para o produto. Rodrigues *et al.* (2009) avaliaram a sensibilidade das bactérias contaminantes da fermentação alcoólica frente a soluções hidroalcoolicas de própolis, pela variação da acidez do meio onde se desenvolveram os micro-organismos. A própolis demonstrou uma ação

microbiana eficiente com a aplicação da solução hidroalcoolica na concentração de 30%. Entretanto, se comparado o seu desempenho com os antibióticos convencionais testados, não está entre os melhores (Tabela 2.10). Apesar de tudo, o autor acredita que a própolis, além de economicamente viável, é diferenciado pelo fato de ser natural e livre de resíduos químicos.

Tabela 2.10. Medida de acidez final e variação de acidez.

Antibiótico	Vol. Gasto NaOH (ml)	Acidez final (ml H ₂ SO ₄)	Variação Acidez (ml H ₂ SO ₄)
Branco	9,5	2,32	0,93
5 % de própolis	8,2	2,00	0,71
10 % de própolis	8,1	1,98	0,71
20 % de própolis	8,5	2,08	0,81
25 % de própolis	8,2	2,00	0,71
30 % de própolis	8,1	1,98	0,61
Lactrol (Phibro)	6,9	1,69	0,4
Lactrol XP (Phibro)	6,8	1,66	0,34
Nalco 500261	7,4	1,81	0,57
Nalco 500257	6,9	1,69	0,45
Monicol PM (Quimatec)	7,4	1,81	0,44
Monicol MAX (Quimatec)	7,8	1,91	0,62
Biotran TE (Pratense)	7,0	1,71	0,42
Biotran PVK (Pratense)	7,5	1,83	0,51
PCA 1039 (Alltec)	7,2	1,76	0,49

(RODRIGUES *et al.*, 2009)

Nascimento *et al.* (2000) avaliaram a atividade antimicrobiana de extratos vegetais e fitofármacos diante de micro-organismos sensíveis e resistentes a antibióticos, assim como observou a possibilidade da existência de efeito sinérgico na associação entre antibióticos e extratos vegetais. Foram testadas plantas populares como o tomilho, o alecrim, o cravo-da-Índia, jambolão, erva cidreira, romã, goiaba, sálvia, manjericão e mil-folhas (Tabela 2.11). O mais alto efeito antimicrobiano verificado foi com o extrato de cravo e jambolão, que foram capazes de inibir, respectivamente, 64,2 e 57,1 % dos micro-organismos.

Estes resultados podem ser tomados como indícios para a descoberta de novos produtos naturais com características antimicrobiana ou bactericidas capazes de obter sucesso no mercado de insumos químicos das indústrias de alimentos e destilarias.

Tabela 2.11. Atividade antimicrobiana causada por alguns extratos de plantas. (+) susceptível (zona de inibição $\geq 7\text{mm}$). (-) Ausência de susceptibilidade. (1) *Staphylococcus aureus*, (2) *Salmonella choleraesuis*, (3) *Pseudomonas aeruginosa*, (4) *Bacillus subtilis*, (5) *Candida albicans*, (6) *Proteus spp*, (7) *Klebsiella pneumoniae*, (8) *K. pneumoniae*, (9) *Shigella spp*, (10) *Proteus spp*, (11) *P. aeruginosa*, (12) *Enterobacter aerogenes*, (13) *Escherichia coli*, (14) *S. aureus*.

Micro-org.	Tomilho	Alecrim	Cravo da Índia	Jambolão	Erva cidreira	Romã	Goiaba	Sálvia	Manjericão	Mil-folhas
1	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-
2	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-
3	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-
4	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-
5	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-
6	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-
7	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
8	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
9	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
10	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
11	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-
12	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-

(Fonte: Nascimento *et al.*, 2000)

2.6. Lúpulo (*Humulus lupulus Linneus*)

O lúpulo é uma planta bastante conhecida por todo o mundo por ser uma das principais matérias-primas da cerveja, juntamente com o malte, a cevada e o levedo. O cultivo de lúpulo teve início no século IX, entre os anos de 859 e 875, na Alemanha, de onde se estendeu para outras regiões da Europa e do mundo. No ano de 2008 (Figura 2.16), Alemanha, Estados Unidos e Etiópia foram os principais produtores de lúpulo do mundo,

responsáveis por aproximadamente 75% da produção mundial (Faostat, <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>).

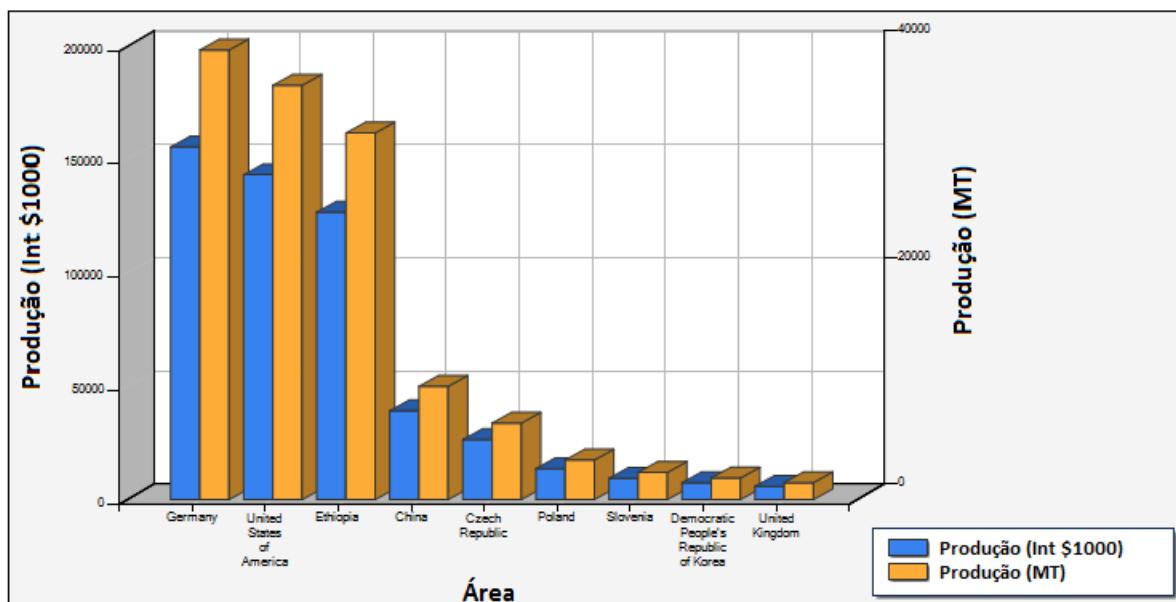


Figura 2.16. Produção mundial de Lúpulo no ano de 2008 (FAOSTAT, <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>).

Depois de ser colhido, o lúpulo é secado artificialmente para reduzir sua porcentagem mássica de água, de 65-80%, para 8-10%, a fim de que este seja armazenado. Graças a sua origem lipofílica, uma grande quantidade de solventes, tais como alcoóis, clorofórmio, acetona e hexano, tem sido aplicada na obtenção do extrato de lúpulo. Entretanto, a possibilidade de existência de resíduos químicos provenientes destes solventes fez com que outros métodos de extração, como a extração por dióxido de carbono líquido ou supercrítico, substituíssem esses solventes orgânicos (Zanolli *et al.*, 2008).

As principais classes de compostos identificadas no lúpulo incluem terpenos, chalconas, α -ácidos e β -ácidos. Terpenos é uma classe de hidrocarbonetos produzidos por algumas plantas, principalmente as coníferas, e também por alguns insetos, como os cupins. A chalcona é um aromático cetona que constitui o núcleo central de uma variedade de compostos biológicos importantes, conhecidos como chalconas. Eles apresentam propriedades antibacterianas, antifúngicas, antitumoral e antinflamatórias. Os principais α -ácidos são os humulonas (35-70% do total), cohumulonas (20-65% do total) e adhumulonas (10-15% do total). Dentre os β -ácidos, os principais são os lupulonas (30-55% do total), os colupulonas e adlupulona (Figura 2.17).

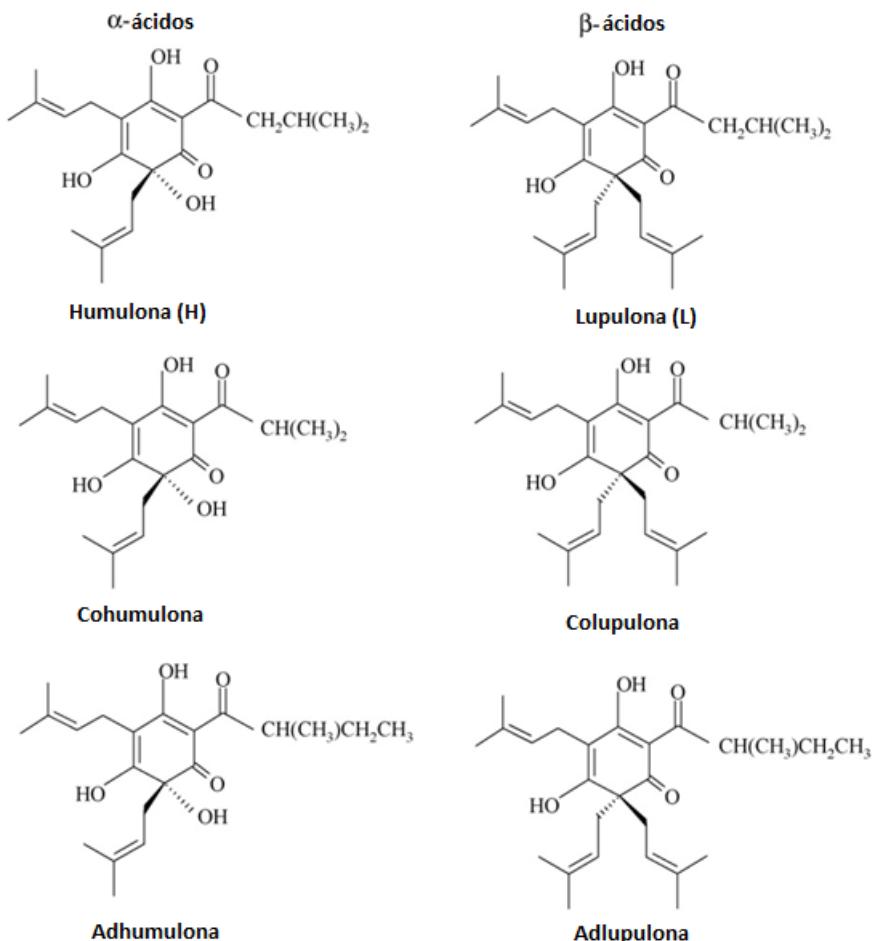


Figura 2.17. Estrutura química dos α -ácidos e β -ácidos presentes no lúpulo (ZANOLI *et al.*, 2008).

Conhecido cientificamente como *Humulus lupulus*, o lúpulo auxilia na preservação da cerveja, graças a sua ação bactericida, e fornece aroma característico a esta bebida. Em outro contexto, o lúpulo é utilizado com objetivos medicinais, como no tratamento de distúrbios do sono e problemas estomacais. Além disso, pode ser utilizado como sedativo e apresenta efeitos bactericidas e fungicidas (Zanolli, *et al.*, 2008).

Segundo Zanolli *et al.* (2008), a atividade antibacteriana do lúpulo vem sendo atribuída aos compostos humulona e lupulona, capazes de combater, principalmente, bactérias Gram-positivas. Espécies como *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Mycobacterium* e *Streptomyces* estão inseridas nesse grupo de bactérias. Acredita-se que esses compostos atuam sobre a membrana primária das bactérias, devido à interação das partes hidrofóbicas dessas moléculas com a parede celular destes micro-organismos. Os α -ácidos e os β -ácidos também apresentam

efeitos nocivos as espécies de fungos *Candida albicans*, *Trichophyton*, *Fusarium* e *Mucor* (Zanolli, et al., 2008). Nos trabalhos realizados por Langezaal et al. (1992), óleos essenciais obtidos do lúpulo pela extração por hidro-destilação e clorofórmio apresentaram efeitos nocivos as bactérias Gram-positivas, mas nenhuma influência foi detectada em bactérias Gram-negativas.

A Fermentec, empresa brasileira que presta assistência técnica e consultorias em fermentações alcoólicas, realizou alguns testes com o produto natural, BETABIO 45, fabricado pela empresa HOPSTEINER, originário do lúpulo, contendo aproximadamente 45% de β-ácidos (Colupulona, Lupulona, Adlupulona), no controle da contaminação bacteriana de fermentação alcoólica em escala industrial. Com uma dosagem de 10 ppm, a redução da população microbiana na primeira rodada foi significativa, pois reduziu a contaminação de níveis de 10^7 para 10^6 , o que representa uma redução acima de 90% (BETABIO, <http://www.betabio.com.br/>).

Segundo o fabricante do produto testado pela Fermentec, os β-ácidos (Colupulona, Lupulona, Adlupulona) são os principais compostos bactericidas encontrados no lúpulo. Menos de 2 ppm do produto pode inibir o crescimento da maioria das bactérias gram positivas em testes de laboratório. O mesmo produto também pode inibir o crescimento de certas algas se dosado em concentrações próximas a 20 ppm (HOPSTEINER, <http://www.hopsteiner.com/pdf/antibacterial-beta-bio45.pdf>).

Em outro estudo realizado pela Fermentec, com o intuito de avaliar o melhor pH do tratamento ácido para a aplicação deste produto, visando otimizar seu uso no controle de contaminação bacteriana em fermentações com reciclo a base de mosto de xarope, melaço e misto (50% xarope e 50% melaço), a empresa concluiu que houve atividade anti-bacteriana em todos os tratamentos nos quais o produto foi testado. O mesmo apresentou maior eficiência quando aplicado durante o tratamento ácido do fermento, na dose de 5 mg/L (5 ppm) em relação ao volume total de vinho. Outros parâmetros, como o rendimento fermentativo, formação de glicerol, produção de biomassa celular, viabilidade da levedura, conteúdo de trealose e velocidade de fermentação não foram afetados (BETABIO, <http://www.betabio.com.br/>).

Outros produtos naturais com características antimicrobianas vêm surgindo no mercado de insumos para destilarias. A Prozyn, empresa do ramo de biotecnologia, desenvolveu o Biozyn, um antimicrobiano natural a base de enzimas que, segundo o fabricante, pode substituir os antibióticos químicos e outros biocidas na fabricação de açúcar e

álcool, sem deixar resíduos de antibiótico no processo (PROZYN, www.prozyn.com.br). A *BetaTec Hop Products*, empresa especializada na aplicação de lúpulo e seus derivados, criou o IsoStab. Assim como o BETABIO 45, o IsoStab é produzido a partir do extrato de CO₂ de lúpulo em processo aquoso e, segundo a *BetaTec*, é capaz de controlar a contaminação bacteriana em fermentações alcoólicas. Os ácidos naturais presentes no extrato de lúpulo reduz o pH intracelular das bactérias contaminantes inibindo sua capacidade de transferir glicose através da parede celular, o que provoca a morte destes micro-organismos por insuficiência de nutrientes (BETATEC, www.betatechopproducts.com).

CAPÍTULO 3

MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Aparato experimental

As fermentações apresentadas neste trabalho foram realizadas em um fermentador *B. Braun Biotech International*, apto a conduzir os experimentos em condições próximas às utilizadas em processos industriais.

O fermentador era dotado de sistema de refrigeração por camisa, com monitoramento e controle de temperatura pela utilização de água a temperatura ambiente como fluido refrigerante. A temperatura adotada na fermentação foi de $32^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. O sistema de agitação possuía controle de rotação, a qual foi mantida em 350 rpm por uma hélice mecânica. O fermentador contava ainda com chicanas, que visavam uma melhor agitação do meio, e sistema de aferição contínua de pH. O volume total do fermentador era de 2 L e o volume de trabalho 1,7 L.

3.2. Métodos

3.2.1. Metodologia experimental

3.2.1.1. Testes preliminares

Como testes preliminares foram realizadas 3 fermentações em duplicata. A primeira fermentação foi sem contaminação, a segunda contaminada com bactérias advindas de uma contaminação natural de caldo de cana e a terceira contaminada e utilizando o antibiótico natural, BETABIO 45, na concentração inicial de 10 ppm.

As fermentações foram conduzidos em batelada num fermentador com volume total de 2 L e volume de trabalho de 1,7 L à temperatura ambiente de $32 \pm 1^{\circ}\text{C}$, pH inicial de 4,5, concentração de sacarose de 160 g/L e os demais nutrientes citados no item 3.2.1.5. O inóculo consistia de levedura após hidratação em água durante 2 horas. O volume correspondente ao inóculo foi de 30% do volume total, com uma concentração de 100 g/L, o que resultou em uma concentração de 30 g/L com relação ao volume de trabalho.

As fermentações foram acompanhadas ao longo do tempo pelas medidas de concentração de sacarose, etanol e quantificação de leveduras vivas. Amostras de 35 mL eram retiradas do fermentador em intervalos de uma hora. Retirava-se 2 mL para a determinação da

quantidade de bactérias e a concentração de células. O restante era centrifugado por 6 minutos a 12500 rpm, o que corresponde a uma força centrífuga de 18500 G. Do sobrenadante foram analisadas as concentrações de substrato e de etanol.

O tempo de fermentação foi determinado pelo consumo total da sacarose. Nas fermentações contaminadas foi determinada a quantidade de bactérias presentes por meio da contagem de bactérias viáveis em Unidades Formadoras de Colônia (UFC/mL).

Para contaminar a fermentação, 150 mL de meio contaminado foi centrifugado. As células centrifugadas foram colocadas no meio fermentado, as quais correspondiam a uma concentração de 1,25 g/L, de acordo com os testes de massa seca. A seguir (tempo zero) retirou-se uma pequena alíquota e fez-se a contagem do número de bactérias pela quantificação das Unidades Formadoras de Colônia (UFC/mL) utilizando a técnica da microgota e a quantidade de leveduras vivas em Câmara de Neubauer, conforme o item 3.2.2.4.

Os resultados preliminares foram utilizados para selecionar as faixas das variáveis a serem adotadas na próxima etapa desse estudo, que consistiu na avaliação conjunta das variáveis: quantidade inicial de levedura (tamanho do inóculo), concentração de antibiótico e de bactérias contaminantes.

3.2.1.2. Planejamento experimental

A avaliação conjunta das variáveis trabalhadas foi feita por um planejamento composto central (PCC) e as respostas (produtividade, rendimento, sacarose residual) foram analisadas utilizando a técnica de superfície de resposta. Devido à ampla faixa da quantidade de leveduras iniciais (10^3 a 10^8 células/mL) e bactérias iniciais (10^2 a 10^6 UFC/mL), além da grande variação dos resultados finais na quantidade de bactérias (zero a $8,7 \times 10^6$ UFC/mL) e de leveduras (10^2 a 10^7 células/mL), os resultados foram analisados observando os valores apresentados na Tabela 3.1 e as curvas apresentadas nos apêndices A.3 e A.4. Adotou-se esse procedimento porque a análise estatística no *software Statistic 7.0* para uma faixa muito ampla de resposta torna-se não satisfatória.

Os experimentos do PCC foram realizados com a concentração inicial de sacarose de 160 g/L, pH inicial de 4,5 e o tempo de fermentação selecionado foi de 8 horas, conforme resultados obtidos nos testes preliminares. O planejamento experimental adotado foi um 2^3 , com seis ensaios nas condições axiais e três repetições no ponto central para as variáveis X_1 (concentração de leveduras), X_2 (concentração de antibiótico) e X_3 (concentração de bactérias), resultando em 17 experimentos. As equações de codificação foram:

$$\frac{\frac{X - X_0}{X_{+1} - X_{-1}} - \frac{X_1 - 20}{10}}{2} \quad \text{Eq. 3.1}$$

$$\frac{\frac{X - X_0}{X_{+1} - X_{-1}} - \frac{X_2 - 28,75}{21,25}}{2} \quad \text{Eq. 3.2}$$

$$\frac{\frac{X - X_0}{X_{+1} - X_{-1}} - \frac{X_3 - 1,25}{0,75}}{2} \quad \text{Eq. 3.3}$$

Baseando-se nos testes preliminares, selecionou-se como ponto central a concentração de bactérias correspondente a 150 mL de meio contaminado centrifugado, o que correspondeu em massa seca a $1,25 \pm 0,2$ g/L de bactérias e a ordem de grandeza de 10^4 UFC/mL. Para a concentração de leveduras, selecionou-se como +1 a concentração de 30 g/L, o que correspondeu a uma quantidade de levedura inicial na ordem de 10^8 células /mL. Para a escolha da concentração de antibiótico natural procurou-se seguir a recomendação do fabricante (5 a 110 ppm). No entanto, adotou-se como +1 a concentração de 50 mg/L, ou 50 ppm, pois o produto apresentou-se ativo para as condições estudadas nos testes preliminares com apenas 10 ppm de dosagem. Como comparação para o valor de menos alfa, tomou-se a quantidade zero de antibiótico. Os demais pontos do planejamento experimental estão expostos na Tabela 3.1.

Tabela 3.1. Planejamento experimental elaborado para a avaliação das variáveis: concentração de leveduras, concentração de antibiótico, concentração de bactérias.

Planejamento experimental									
Codificado				Aplicado					
Experimento	Levedura	Antibiótico	Bactérias	Experimento	Levedura (g/L)	Antibiótico (mg/L)	Bactérias (g/L)	Bactérias UFC/mL	
1	-1	-1	-1	1	10	1,0E+04	7,5	0,5	1,0E+03
2	-1	-1	1	2	10	1,0E+04	7,5	2	1,0E+06
3	-1	1	-1	3	10	1,0E+04	50	0,5	1,0E+03
4	-1	1	1	4	10	1,0E+04	50	2	1,0E+06
5	1	-1	-1	5	30	1,0E+08	7,5	0,5	1,0E+03
6	1	-1	1	6	30	1,0E+08	7,5	2	1,0E+06
7	1	1	-1	7	30	1,0E+08	50	0,5	1,0E+03
8	1	1	1	8	30	1,0E+08	50	2	1,0E+06
9	- α	0	0	9	6,5	1,0E+03	28,75	1,25	1,0E+04
10	α	0	0	10	33,5	1,0E+08	28,75	1,25	1,0E+04

11	0	- α	0	11	20	1,0E+06	0	1,25	1,0E+04
12	0	α	0	12	20	1,0E+06	57,5	1,25	1,0E+04
13	0	0	- α	13	20	1,0E+06	28,75	0,24	1,0E+01
14	0	0	α	14	20	1,0E+06	28,75	2,26	1,0E+06
15	0	0	0	15	20	1,0E+06	28,75	1,25	1,0E+04
16	0	0	0	16	20	1,0E+06	28,75	1,25	1,0E+04
17	0	0	0	17	20	1,0E+06	28,75	1,25	1,0E+04

Com os resultados obtidos foi possível analisar estatisticamente a produtividade, o rendimento e a concentração de sacarose residual. Para isto, determinaram-se os coeficientes de regressão após a realização da regressão múltipla no programa *Statistic 7.0*.

3.2.1.3. Validação da condição ótima

Para avaliar o processo fermentativo nas condições estudadas e também verificar a reprodutibilidade dos resultados obtidos no planejamento composto central realizado, de acordo com as superfícies de respostas para cada uma das respostas, selecionou-se como condição ótima, os maiores valores observados nas superfícies de resposta para rendimento e produtividade, e os menores valores para sacarose residual. Nestas condições ótimas, realizou-se um experimento para verificar a reprodutibilidade dos resultados obtidos.

3.2.1.4. Teste complementar

Em função de alguns resultados obtidos ao longo da realização do planejamento experimental, constatou-se a necessidade de realizar mais alguns testes a título de esclarecimento.

Com o intuito de verificar uma possível influência do antibiótico natural BETABIO 45 na viabilidade celular das leveduras, foi realizada uma fermentação sem contaminação, porém, com uma dosagem de 50 ppm de antibiótico natural, equivalente ao extremo (+1) da faixa de trabalho adotada no planejamento.

Comparando-se estes resultados com os resultados do primeiro teste preliminar, em que não houve dosagem de antibióticos e nem contaminação forçada, pôde-se verificar se o antibiótico natural exerceu influência na viabilidade celular das leveduras.

3.2.1.5. Meio de cultura

O meio de cultura utilizado foi produzido artificialmente em laboratório. O mesmo continha sacarose, KH_2PO_4 , $(\text{NH}_4)\text{Cl}$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, KCl e extrato de levedura. Todos os

reagentes utilizados foram de grau analítico, com exceção da sacarose, que consistia de açúcar cristal comercial. As concentrações adotadas para todos esses nutrientes estão expostas na Tabela 3.1. Ao término do preparo do meio de cultura, era ajustado o pH do mesmo para 4,5. Não houve modificação no preparo do meio de cultura em nenhuma das fermentações realizadas em todo o trabalho.

Tabela 3.1. Concentração de nutrientes adotadas no preparo do meio de cultura para fermentação.

Nutrientes	Concentração (g / L)
Sacarose	160,0
KH ₂ PO ₄	5,0
(NH ₄)Cl	1,5
MgSO ₄ .7H ₂ O	1,0
KCl	1,0
Extrato de levedura	6,0

3.2.1.6. Inóculo

Para o preparo do inóculo, foi utilizada a cepa da levedura *Saccharomyces cerevisiae* Y904 na forma granulada, cedida pela MAURI (Mauri Brasil Ind. Com. Ltda). Após serem pesadas, hidratava-se as leveduras com volume de água necessário para que o inóculo atingisse o volume de 510 mL, correspondente a 30% do fermentador. A hidratação foi realizada em *shaker* por 2 horas. A concentração celular de leveduras contidas no inóculo variou de acordo com o planejamento.

3.2.1.7. Contaminação

O meio contaminado foi obtido por contaminação natural de caldo de cana. Este foi exposto ao ambiente por cerca de 7 dias para que tal contaminação acontecesse. Após ser contaminado, este meio foi mantido no refrigerador a 5°C. O seu cultivo foi realizado por meio de repiques que foram realizados antes de cada início de fermentação. No repique, 500 mL de meio eram separados e misturados com outros 500 mL de caldo de cana. Estas células foram mantidas expostas ao ambiente durante 24 horas, porém tampadas com um papel filme

que apresentava pequenas perfurações para saída de gases. Decorridas estas 24 horas, o meio era transferido para um refrigerador, a 5 °C, agora lacrado com papel filme sem perfurações.

Para contaminar as fermentações, uma quantidade pré-definida de meio contaminado foi centrifugado e as células centrifugadas foram inoculadas no meio logo no início da fermentação. A quantidade de meio contaminado a ser centrifugado para alcançar os níveis de contaminação desejados foi ajustada por meio de uma curva de calibração (Apêndice A.3).

3.2.1.8. Dosagem dos antibióticos

Os dois antibióticos utilizados neste trabalho foram dosados no início da fermentação. A concentração inicial de antibiótico natural, BETABIO 45, foi uma das variáveis analisadas no planejamento experimental. Portanto, a concentração inicial do mesmo variou de acordo com o experimento. O BETABIO 45 foi adicionado, logo após sua pesagem, ao meio fermentativo no início da fermentação.

O antibiótico KAMORAN foi utilizado nas condições do ponto ótimo obtido através da análise das superfícies de resposta criadas a partir dos resultados obtidos no planejamento experimental. O KAMORAN é um antibiótico fabricado e distribuído pela Química Real, capaz de controlar as principais bactérias Gram (+) contaminantes dos processos fermentativos. Segundo o fabricante, este antibiótico é eficaz contra *Lactobacillus*, *Bacillus* e *Streptococcus*, e sua dosagem mínima é de 3,0 ppm em relação ao volume total do sistema (QUÍMICA REAL, http://www.quimicareal.com.br/hp/paginanoticias2.php?area=Linha%20Industrial&cod_info=116&codigo=32&subarea=Elanco).

Na aplicação do KAMORAN, foram utilizados 0,2 g deste antibiótico. Diluiu-se o mesmo em 50 mL de etanol em um balão de 100 mL e completou-se com água. Transferiu-se para o meio fermentativo, o volume correspondente a quantidade de antibiótico sólido desejada.

3.2.2. Acompanhamento analítico

As fermentações foram acompanhadas ao longo do tempo por medidas de concentração de sacarose, etanol e quantificação de leveduras vivas. O tempo de fermentação foi determinado pelo consumo da sacarose presente no meio. Nas fermentações contaminadas,

foi determinada a concentração celular de bactérias presentes ao longo do processo pela técnica da microgota em Unidades Formadoras de Colônia (UFC / mL).

3.2.2.1. Quantificação de sacarose

A quantificação do açúcar foi feita por análise de glicose. Para isto, utilizou-se de um teste enzimático colorimétrico da *Laborlab*. Neste teste, oxida-se a glicose resultante da hidrólise da sacarose pela ação da glicose-oxidase, reação que também produz peróxido de hidrogênio. Este, na presença da peroxidase reage com a 4-aminoantipirina e fenol, gerando um cromógeno vermelho cereja. A intensidade deste composto é proporcional a concentração de glicose.

Durante as fermentações, amostras do meio fermentativo foram retiradas e centrifugadas. Separava-se 1 mL do sobrenadante para análise de glicose. Este volume era misturado com 1 mL de HCl 2N, a 67°C por 12 minutos. Então, a mistura era neutralizada com 3 mL de NaOH 1N. Separava-se 20 µL da amostra hidrolisada e devidamente diluída para que fosse misturada com 2 mL do reativo enzimático preparado de acordo com as especificações do fabricante. Colocava-se a mistura em banho-maria à 37°C por 10 minutos e efetuava-se a leitura de absorbância em espectrofotômetro a 505 nm. O reativo enzimático foi utilizado como branco e todas as análises foram feitas em duplicata. Os resultados de absorbância eram utilizados na curva de calibração (Apêndice A.1) que gerou os resultados em concentração de glicose.

3.2.2.2. Quantificação de etanol

Para que fosse determinada a concentração de etanol no vinho, utilizou-se do método espectrofotométrico do dicromato de potássio. Neste método ocorre oxidação da mistura hidroalcoólica a ácido acético pela reação do dicromato de potássio em meio ácido. A tonalidade obtida é a verde, proporcional a concentração de etanol na amostra (Steckelberg, 2001).

Após centrifugar as amostras colhidas ao longo do processo fermentativo, retirou-se 25 mL de sobrenadante em cada análise. A esse volume adicionava-se 50 mL de água destilada em um balão volumétrico. Destilou-se esta mistura até que fossem obtidos 50 mL de destilado. Diluiu-se este na proporção 1:25 e transferiu-se 5 mL para um tubo de ensaio. Adicionou-se 2 mL de água destilada e 2 mL do reagente de cor (dicromato). O tubo de

ensaio foi tampado e posto em banho-maria a 60ºC durante 30 minutos. Em seguida, resfriou-se a solução até que a mesma atingisse a temperatura ambiente. Então, leu-se a absorbância de três amostras em espectrofotômetro a 600 nm utilizando-se água destilada como o branco. Os resultados do espectrofotômetro foram redirecionados à curva de calibração (Apêndice A.2) preparada previamente, gerando os resultados em concentração alcoólica.

3.2.2.3. Quantificação de leveduras

No início de cada fermentação foram pesadas quantidades pré-definidas de leveduras de acordo com Planejamento Composto Central. No entanto, a concentração destas leveduras foi acompanhada ao longo de toda a fermentação para que fosse analisado o efeito que as diferentes condições de trabalho causavam sobre essas células.

O método utilizado para determinação da concentração celular das leveduras foi a contagem em câmara de Neubauer. Amostras foram coletadas do fermentado e realizada a diluição conveniente em tubo de ensaio. Após a diluição, 0,3 mL foram transferidos para o tubo de ensaio no qual se adicionou 0,3 mL de solução de azul de metileno-citrato de sódio. A mistura foi homogeneizada em agitador de tubos. Colocou-se a lamínula na Câmara de Neubauer e com auxílio da pipeta Pasteur, transferiu-se um pequeno volume da amostra preparada para a câmara. Levou-se ao microscópio óptico e com a objetiva de 40X, fez-se a contagem das células nos campos: 5 campos na segunda coluna e 5 campos na quarta coluna, ou os 4 retículos centrais em cada um dos 25 campos, contabilizando um total de 100 retículos. Contou-se aproximadamente 40 células por campo ou 3 células por retículo. No primeiro caso, escolheu-se 2 limites em cada quadrado nos quais seriam desprezadas as células que fossem encontradas em cima desses limites. Com o contador, marcava-se o número de células viáveis, ou seja, aquelas que não se coraram com o azul de metileno, e células inviáveis, que ficam coloridas de azul intenso. A concentração celular foi obtida pelo cálculo que segue:

$$\text{células_totais (cel / mm}^3\text{)} = \frac{n^{\circ}\text{ cél.totais} * \frac{1}{volume_do_retículo} * diluição}{n^{\circ}\text{ retículos}} \quad (3.1)$$

3.2.2.4. Quantificação de bactérias (Técnica da microgota)

Para determinar o nível de contaminação existente nas fermentações, foi aplicada a técnica da microgota (Romeiro, 2001). Neste procedimento, a amostra de meio fermentativo retirado ao longo da fermentação foi diluída de forma seriada em proporções de 1:10 em uma solução salina estéril preparada com 0,85% de NaCl. Nos tubos de ensaio foram colocados 9,0 mL de solução salina contendo 0,3 a 0,5% de Tween 80 e 1,0 mL da suspensão a ser diluída seqüencialmente até que se alcançasse diluição de $1,0 \times 10^{-10}$.

O meio de cultura utilizado para a análise de viabilidade celular de bactérias foi o proposto pela Fermentec para plaqueamento com bactérias lácticas totais. Para a formulação deste meio utilizou-se os seguintes compostos:

Tabela 3.3. Compostos químicos utilizados no preparo do meio de cultura para realização do plaqueamento.

Composto	Quantidade
Peptona	10,0 g
Extrato de carne	5,0 g
Extrato de levedura	5,0 g
Glicose	20,0 g
Tween	1,0 mL
Fosfato dibásico de potássio	2,0 g
Acetato de sódio	5,0 g
Citrato bibásico de amônio	2,0 g
Sulfato de magnésio	0,1 g
Sulfato de manganês	0,05 g
Agar	15,0 g
Água destilada	1000 mL

O meio foi colocado nas placas de Petri de forma que o fluido forme um pequeno filme sobre a superfície do vidro. Para que a superfície do filme secasse, as placas foram expostas sem tampa, à 37°C, por 12 horas sob luz UV. Ao término desse período, as placas estavam aptas a serem utilizadas nas análises. A superfície do meio permaneceu seca o suficiente para que uma microgota de 10 µL fosse absorvida rapidamente e não impedisse o crescimento das colônias. Antes mesmo de colocar o meio sobre as placas, estas foram marcadas com pincéis atômicos em sua parte inferior dividindo-as em quatro partes. Em cada uma destas partes foi depositada uma microgota referente à mesma diluição. Em cada uma

delas foram colocadas 4 microgotas, uma em cada parte da placa dividida pela marcação dos pincéis atômicos. À medida em que cada uma das microgotas foram sendo colocadas, foram realizados suaves movimento circulares com a placa de Petri sobre uma superfície plana e lisa, para que estas microgotas se espalhassem melhor sobre o meio. Todo o material utilizado foi esterilizado previamente em autoclave.

Após 7 dias de incubação, realizou-se a contagem propriamente do número de unidades formadoras de colônia. Como em uma única placa haviam 4 contagens diferentes para uma mesma diluição, contava-se as quatro partes e tirava-se a média aritmética para determinar o número de colônias que corresponderiam aquela diluição. Aquela placa cuja contagem estivesse em uma faixa de 5 a 100 colônias por microgota seria considerada nos cálculos. De acordo com o número médio de colônias formadas e sua diluição, foi possível determinar o nível de contaminação presente naquela amostra (Romeiro, 2009).

CAPÍTULO 4

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Testes preliminares

A Figura 4.1 mostra os perfis de consumo de sacarose e de produção de etanol em função do tempo, bem como a contagem das leveduras vivas em função do tempo, nas condições mencionadas no item 3.2.1.1. Verificou-se que o tempo de fermentação foi de 8 horas e que a concentração de álcool obtida foi de 73,2 g/L. Nota-se que houve um pequeno crescimento celular, porém isso era esperado porque a concentração inicial de leveduras também era elevada ($1,7 \cdot 10^8$ células/mL). A concentração final de leveduras vivas foi de $1,3 \cdot 10^9$ células/mL. A produtividade foi de 9,15 g_{etanol}/L.h, o rendimento foi de 85,2% e a concentração residual de sacarose de 0,3 g/L.

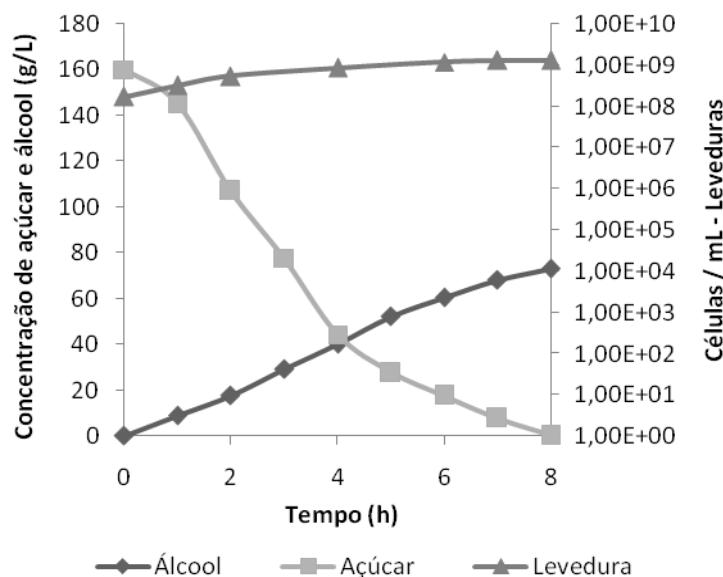


Figura 4.1. - Perfis de concentração de sacarose, de etanol e de células de leveduras vivas em função do tempo, para a fermentação sem contaminação.

Segundo Viegas (2003), uma unidade de fermentação contínua convencional, geralmente é operada com rendimento de 87% e produtividade de 7,9 g_{etanol}/L.h., quando melaço é usado como matéria-prima. No entanto, o rendimento médio obtido nas destilarias que utilizam o caldo de cana como matéria-prima gira em torno de 92% (Amorim *et al.*, 1999). Assim, em relação aos resultados obtidos, verificou-se que a produtividade foi maior

do que aquelas obtidas em fermentações à base de melaço, mas o rendimento do produto em relação ao substrato, tanto para fermentações com melaço como em fermentações com caldo de cana tratado, foi menor ($Y_{P/S} = 0,435$ ou 85,2%) tomando-se por base o rendimento teórico 0,511 g etanol/g ART (Andrieta *et al.*, 2006; Andrieta *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 1995).

A Figura 4.2 mostra os perfis de consumo de sacarose e de produção de etanol em função do tempo, bem como o crescimento das bactérias contaminantes em função do tempo, nas condições mencionadas no item 3.2 de materiais e métodos, para a fermentação contaminada e sem adição de antibiótico.

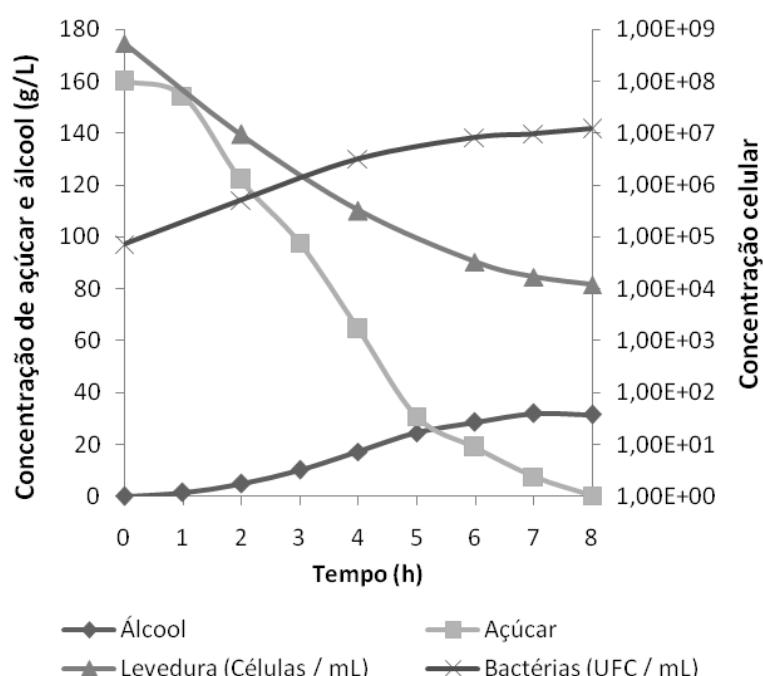


Figura 4.2. Perfis de concentração de sacarose, de etanol, da contagem de bactérias contaminantes e da quantidade de levedura em função do tempo, para a fermentação contaminada.

Na fermentação contaminada o tempo de processo foi de 8 horas e a concentração final de álcool foi de 31,5 g/L. A produtividade foi de 4,5 g_{etanol}/L.h, o rendimento foi de 36,7 % e a concentração residual de sacarose de 0,4 g/L.

A quantidade inicial de bactérias contaminantes foi de $7,2 \cdot 10^4$ UFC/mL e a quantidade de leveduras vivas iniciais foi de $5,4 \cdot 10^8$ células/mL. No entanto, a concentração final das bactérias foi de $9,8 \cdot 10^6$ UFC/mL, enquanto que a quantidade final de levedura foi de $1,7 \cdot 10^4$ células/mL. A morte das leveduras provavelmente foi devido à competição com as bactérias pelo substrato, o que comprometeu também o seu metabolismo, já que a produção de etanol

foi baixa. Além disso, os produtos do metabolismo das bactérias podem ter comprometido a sobrevivência das leveduras. O crescimento das bactérias mostra que o meio tornou-se propício para as mesmas. Estes fatores também contribuíram para a baixa produtividade e rendimento do processo fermentativo (Thomas *et al.*, 2002; Bayrock e Ingledew, 2004). Em seus estudos sobre fermentação alcoólica com utilização de trigo como substrato, Narendranath (2000) verificou que contaminações em níveis de 10^5 UFC/mL com bactérias do gênero *L. paracasei* é suficiente para causar quedas de rendimento superior a 2%. Alterthum *et al.* (1984) constataram que contaminações bacterianas por volta de 10^8 a 10^9 células/mL podem causar queda de 14 a 90% no rendimento alcoólico da fermentação.

Comparando as Figuras 4.1 e 4.2, nota-se que na primeira hora de processo o consumo de substrato e a produção de etanol foram pequenos. Este comportamento é semelhante a uma fase lag do sistema, como se fosse necessária uma adaptação dos micro-organismos para iniciar o processo fermentativo. Este fato corrobora com a hipótese de ter ocorrido competição entre as cepas presentes. Além disso, devido à maior facilidade de adaptação das bactérias, já que o número de variedades das mesmas era maior (cultura mista), seu crescimento ocorreu em detrimento ao das leveduras.

A Figura 4.3 mostra os perfis de consumo de sacarose e de produção de etanol em função do tempo, bem como a redução na quantidade de bactérias contaminantes e de leveduras vivas em função do tempo, nas condições mencionadas anteriormente para a fermentação contaminada e com a adição de antibiótico natural, BETABIO 45.

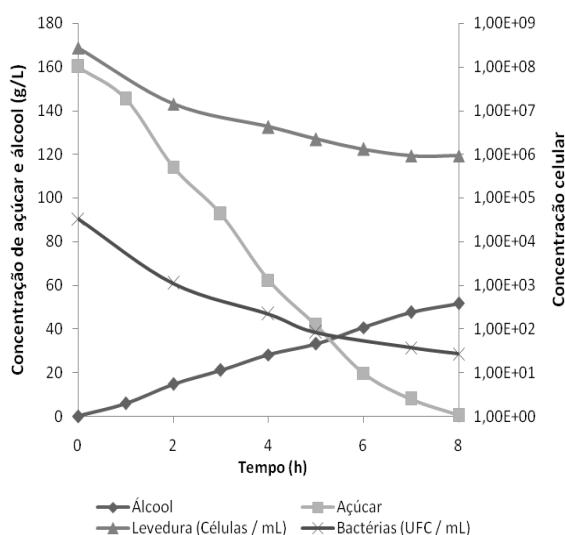


Figura 4.3. Perfis de concentração de sacarose, de etanol, da contagem de bactérias contaminantes e da quantidade de levedura em função do tempo, para a fermentação contaminada, utilizando o antibiótico natural BETABIO 45 à 10 ppm.

Na fermentação contaminada na qual foi adicionada o antibiótico, o tempo de processo foi de 8 horas, a concentração final de álcool foi de 49,8 g/L. A produtividade foi de 6,22 g_{etanol}/L.h, o rendimento foi de 58,2 %, com a concentração residual de sacarose de 1,0 g/L.

A concentração inicial de bactérias era de $3,3 \cdot 10^4$ UFC/mL e a concentração final foi de $2,7 \cdot 10^1$ UFC/mL. A contagem das leveduras vivas iniciais foi de $2,7 \cdot 10^8$ células/mL e a final foi de $1,1 \cdot 10^6$ células/mL. Nota-se que houve uma redução significativa no número de bactérias e uma diminuição na quantidade de leveduras vivas. Os resultados mostraram que a redução no número de leveduras vivas ocorreu nas 4 primeiras horas de fermentação quando a quantidade das mesmas atingiu o valor da ordem de 10^6 células/mL e se manteve nesta ordem de grandeza até o final da fermentação. Pode-se observar também que nas primeiras 4 horas de fermentação também houve uma redução significativa de bactérias. Porém, ao término da fermentação não ocorreu total eliminação das mesmas. Por outro lado, o tempo de fermentação foi o mesmo do processo sem contaminação. O rendimento e a produtividade foram menores do que o processo sem a adição de bactérias. Isto mostra que o antibiótico natural não foi capaz de manter o metabolismo das leveduras para a produção de etanol nas condições trabalhadas, mas a redução nos valores do rendimento e da produtividade não foi tão significativa como ocorreu na fermentação contaminada sem a adição de antibiótico. Este fato mostra que a ação do antibiótico foi importante para que os valores de rendimento, produtividade e de quantidade de leveduras vivas finais não fossem tão baixo como ocorreu na fermentação contaminada sem a adição de antibiótico.

Os resultados preliminares foram importantes para a seleção das faixas das variáveis a serem adotadas no planejamento experimental

4.2. Planejamento experimental

Os resultados médios de produtividade, rendimento, sacarose residual, concentração de leveduras e bactérias finais, em função das variáveis normalizadas estudadas (X_1 : concentração inicial de levedura, X_2 : dosagem de antibiótico, X_3 : concentração inicial de

bactérias) encontram-se na Tabela 4.1. A partir destes resultados foram geradas as superfícies de resposta para produtividade, rendimento e sacarose residual. Estes dados também serviram de base para a análise das respostas leveduras e bactérias finais, as quais não puderam ser analisadas estatisticamente, conforme item 3.2.1.2.

Tabela 4.1. Resultados referentes à produtividade, rendimento, sacarose residual, leveduras e bactérias finais, em diferentes condições experimentais de acordo com o planejamento composto central.

Exp.	Levedura	Antibiótico	Bactérias	Produtividade	Rendimento	Sacarose residual	Leveduras finais	Bactérias finais
	(g/L)	(mg/L)	(g/L)	(g/Lh)	(g etOH/g ART)x100	(g/L)	(cél/mL)	(UFC/mL)
1	10,0	7,5	0,5	2,66	24,7	1,5	3,0E+02	7,7E+01
2	10,0	7,5	2	2,01	18,7	1,4	1,2E+02	2,0E+02
3	10,0	50	0,5	3,01	27,97	1,6	1,3E+03	2,3E+01
4	10,0	50	2	2,17	20,16	1,4	9,7E+02	6,6E+01
5	30,0	7,5	0,5	6,65	61,79	0,1	6,0E+06	4,2E+01
6	30,0	7,5	2	5,67	52,69	0,5	1,2E+06	1,3E+02
7	30,0	50	0,5	6,87	52,69	0,8	3,7E+07	0,0E+00
8	30,0	50	2	6,35	59,01	0,5	1,8E+07	2,7E+01
9	6,5	28,75	1,25	2,75	20,91	1,2	7,5E+02	1,0E+02
10	33,5	28,75	1,25	7,24	67,28	0,2	4,0E+07	5,0E+00
11	20	0	1,25	3,93	36,58	0,3	9,8E+03	8,7E+06
12	20	57,5	1,25	4,50	42,13	1,2	7,8E+04	9,6E+01
13	20	28,75	0,24	4,25	39,49	0,3	7,0E+05	0,0E+00
14	20	28,75	2,26	3,74	30,12	0,7	3,2E+04	2,6E+02
15	20	28,75	1,25	6,17	57,33	0,1	3,3E+05	4,2E+01
16	20	28,75	1,25	6,18	57,43	0,1	3,7E+05	5,8E+01
17	20	28,75	1,25	6,2	57,61	0,1	1,2E+05	5,2E+01

A seguir, serão analisadas cada uma das respostas.

4.2.1. Produtividade

Foram determinados os coeficientes de regressão com a realização de uma regressão múltipla utilizando o *software Statistic 7.0*. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 4.2 e na Equação 4.1, nos quais são mostrados os parâmetros significativos e não significativos, bem como os valores dos níveis de significância relacionados aos mesmos.

Após a eliminação dos parâmetros não significativos com $p > 0,10$, foram obtidas as relações apresentadas na Tabela 4.3. A equação resultante deste ajuste está representada pela Equação 4.2.

Os parâmetros não significativos desprezados foram relacionados aos termos das interações: concentração inicial de levedura/concentração inicial de levedura (X_1^2); concentração de antibiótico (X_2); concentração inicial de levedura/concentração de antibiótico (X_1X_2); concentração inicial de levedura/concentração inicial de bactéria (X_1X_3); concentração de antibiótico/concentração de bactéria (X_2X_3), respectivamente.

O coeficiente de determinação (R^2) obtido após o ajuste foi de 0,94 indicando que os resultados foram explicados pela equação empírica proposta com 94% da variabilidade dos dados (Equação 4.2).

Tabela 4.2. Resultado da regressão múltipla para Produtividade, com todas as variáveis e seus respectivos parâmetros e níveis de significância (Coeficiente de determinação: $R^2 = 0,95$).

Fatores	Parâmetros	Nível de significância (p)
Constante (β_0)	5,835	0,000
X_1 (L)	1,866	0,000
X_1^2 (L ²)	-0,215	0,362
X_2 (A)	0,187	0,299
X_2^2 (A ²)	-0,641	0,023
X_3 (B)	-0,316	0,110
X_3^2 (B ²)	-0,761	0,0150
$X_1 X_2$ (L A)	0,05	0,817
$X_1 X_3$ (L B)	-0,001	0,995
$X_2 X_3$ (A B)	0,034	0,872

$$\text{Produtividade} = 5,835 + 1,870 X_1 - 0,215 X_1^2 + 0,187 X_2 - 0,641 X_2^2 - 0,316 X_3 - 0,761 X_3^2 + 0,050 X_1 X_2 - 0,001 X_1 X_3 + 0,034 X_2 X_3 \quad (4.1)$$

Tabela 4.3. Resultados da regressão múltipla para produtividade, apresentando apenas as variáveis significativas com seus respectivos parâmetros e níveis de significância (Coeficiente de determinação: $R^2 = 0,94$).

Fatores	Parâmetros	Nível de significância
Constante (β_0)	5,688	0,000000
X_1 (L)	1,8668	0,000000

X_2^2 (A^2)	-0,6405	0,0062
X_3 (B)	-0,3156	0,0526
X_3^2 (B^2)	-0,7607	0,002
Produtividade = $5,688 + 1,867 X_1 - 0,641 X_2^2 - 0,316 X_3 - 0,761 X_3^2$		(4.2)

Observa-se pela Equação 4.2, que a produtividade foi influenciada pelas variáveis isoladas X_1 (concentração inicial de levedura) e X_3 (concentração inicial de bactérias). A mesma equação discrimina o forte efeito causado pela concentração de levedura inicial sobre a produtividade da fermentação. Comparando os resultados dos experimentos 1 e 5, 2 e 6, 3 e 7, 4 e 8, e 9 e 10, observa-se que a produtividade aumenta com o aumento da concentração inicial de levedura, isto é, as leveduras têm poder de competição com as bactérias quando ocorre a contaminação do processo fermentativo, contrapondo-se aos danos causados pela contaminação. Tal fato é confirmado pelo sinal positivo dessa variável na Equação 4.2. O efeito da concentração inicial de bactéria também é apresentado no modelo. O sinal negativo do coeficiente da variável X_3 (concentração inicial de bactérias) indica que quanto maior a concentração inicial de bactéria menor a produtividade, o que pode ser confirmado comparando os resultados dos experimentos 1 e 2, 3 e 4, 5 e 6, 7 e 8, e 13 e 14. O modelo também mostra que o efeito da concentração inicial de levedura sobre a produtividade é maior do que o da contaminação do processo fermentativo pelas bactérias, confirmando a hipótese levantada anteriormente sobre a competição entre as leveduras e as bactérias contaminantes. Comparando os experimentos 1 e 3, 2 e 4, 5 e 7 ,6 e 8, e 11 e 12, observa-se que o aumento na concentração de antibiótico promoveu pequeno aumento na produtividade. Entretanto, a comparação entre os experimentos 12 e 15 não mostrou o mesmo efeito. Este fato mostra que aumentar indiscriminadamente a concentração de antibiótico não significa resultados positivos no combate a contaminação do meio fermentativo.

Com os resultados obtidos foi possível verificar os comportamentos de resíduos e dos valores preditos em função dos observados graficamente, de acordo com as Figuras 4.4 e 4.5.

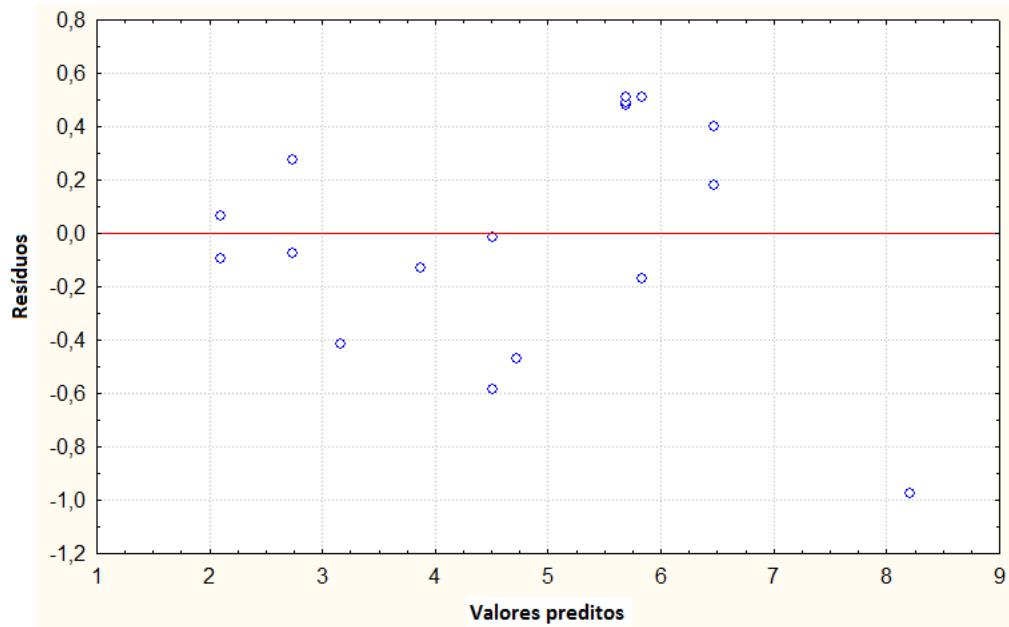


Figura 4.4. Distribuição dos resíduos relativos à produtividade.

Observando-se a Figura 4.4, verifica-se que a distribuição dos resíduos comportou-se aleatoriamente em torno do zero, não apresentando nenhuma tendência.

Pela Figura 4.5, foi verificada uma boa proximidade entre os resultados experimentais e os valores fornecidos pela equação empírica.

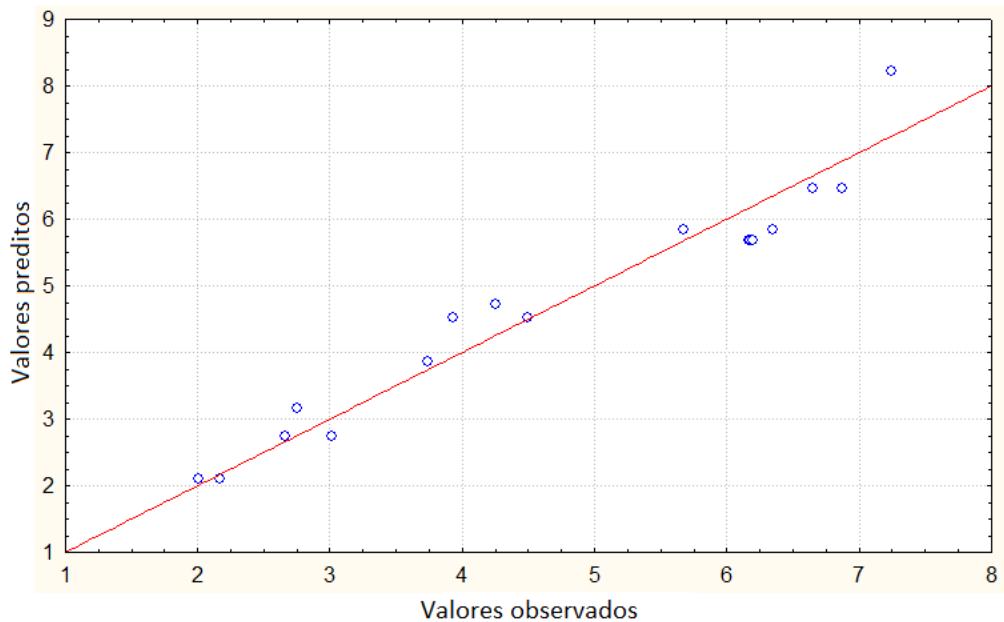


Figura 4.5. Valores preditos em função dos observados relativos à produtividade.

Com o objetivo de ilustrar os efeitos das variáveis na produtividade da fermentação, são apresentadas nas Figuras 4.6, 4.7 e 4.8 as superfícies de resposta e as curvas de contorno. Estas figuras mostram a região de otimização das variáveis em suas formas reais, duas a duas, em relação à resposta produtividade.

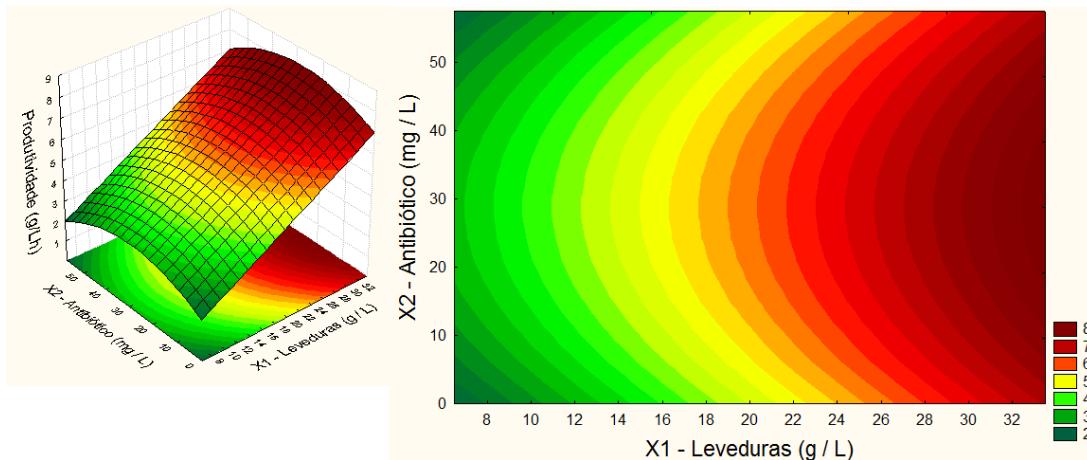


Figura 4.6. Superfície de resposta e curva de contorno para resposta produtividade em função da concentração de leveduras (X_1) e dosagem de antibiótico (X_2)

Nota-se, tendo por base as figuras 4.6, 4.7 e 4.8, que a região de otimização para a dosagem de antibiótico encontra-se centralizada na faixa de trabalho pré-estabelecida no planejamento. Os maiores valores de produtividade alcançados correspondem a uma dosagem de 20 – 40 mg/L. Com relação às bactérias, observa-se que os melhores resultados de produtividade alcançados estão relacionados às contaminações entre 0,8 – 1,4 g/L, que implica em uma contaminação da ordem de 10^3 - 10^4 UFC/mL. Foi constatado ainda, que os melhores resultados foram obtidos quando utilizada a concentração de levedura inicial superior a 28 g/L, o que corresponde a uma quantidade de células na ordem de 10^8 célula/mL.

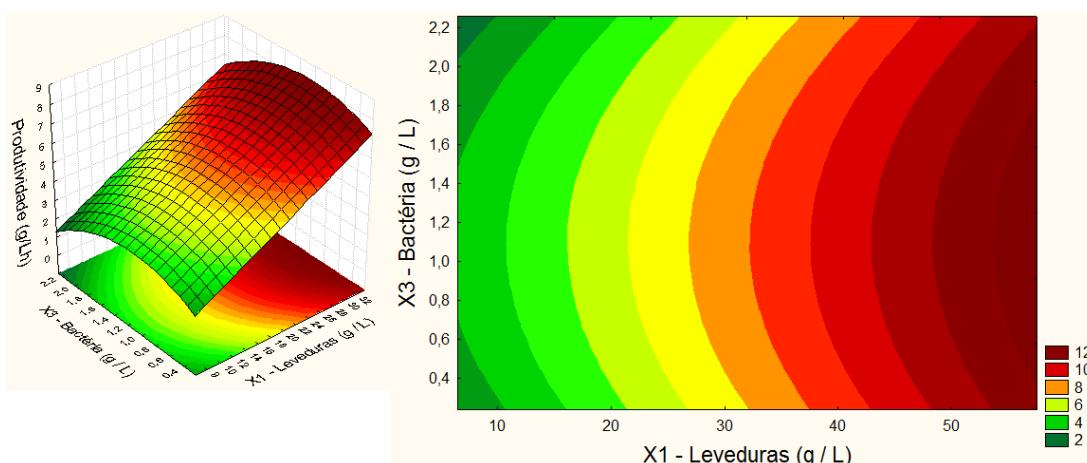


Figura 4.7. Superfície de resposta e curva de contorno para resposta produtividade em função da concentração de leveduras (X_1) e contaminação bacteriana (X_3).

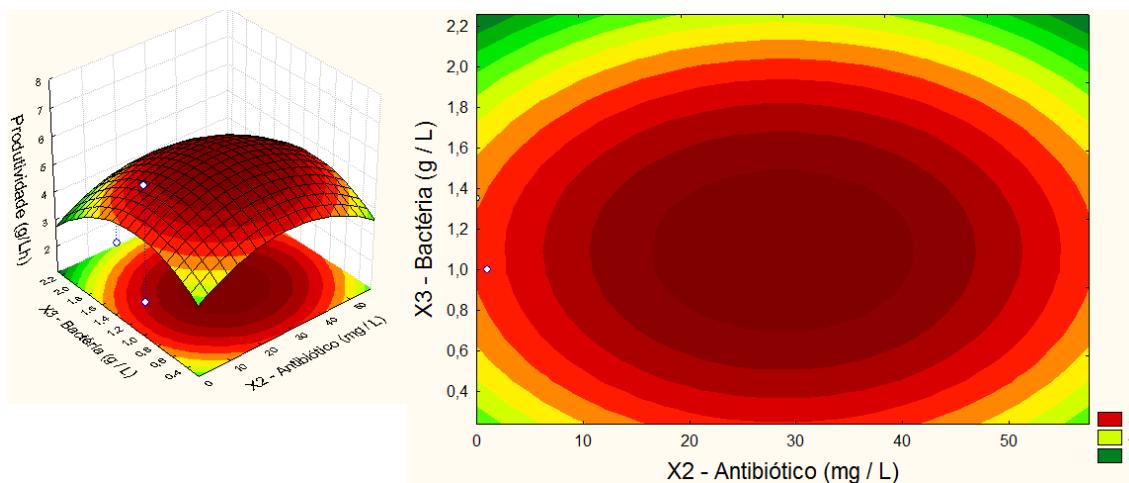


Figura 4.8. Superfície de resposta e curva de contorno para resposta produtividade em função da dosagem de antibiótico (X_2) e contaminação bacteriana (X_3).

4.2.2. Rendimento

O mesmo tratamento de dados foi realizado para analisar o comportamento do rendimento em função das variáveis trabalhadas. Os coeficientes obtidos com a regressão múltipla estão expostos na Tabela 4.4 e na equação 4.3. Eliminando-se os efeitos não significativos, tem-se a Tabela 4.5 e a Equação 4.4, que descrevem os resultados empíricos. Verificou-se que o modelo obtido a partir de todas as variáveis analisadas apresentou 94% de variabilidade dos dados (Equação 4.3), enquanto o modelo que utilizou apenas variáveis significativas representou os dados com 90% de variabilidade (Equação 4.4).

Tabela 4.4. Resultado da regressão múltipla para Rendimento, com todas as variáveis e seus respectivos parâmetros e níveis de significância (Coeficiente de determinação: $R^2 = 0,94$).

Fatores	Parâmetros	Nível de significância
Constante (β_0)	53,907	0,000
X_1 (L)	16,926	0,000
X_1^2 (L^2)	-2,872	0,251
X_2 (A)	0,811	0,655
X_2^2 (A^2)	-5,461	0,049

X_3 (B)	-2,510	0,192
X_3^2 (B ²)	-7,946	0,105
$X_1 X_2$ (L A)	-0,939	0,688
$X_1 X_3$ (L B)	1,379	0,533
$X_2 X_3$ (A B)	1,701	0,445

$$\begin{aligned} \text{Rendimento} = & 53,91 + 16,93 X_1 - 2,87 X_1^2 + 0,81 X_2 - 5,46 X_2^2 - 2,51 X_3 - 7,94 X_3^2 - 0,94 \\ & X_1 X_2 + 1,38 X_1 X_3 + 1,7 X_2 X_3 \end{aligned} \quad (4.3)$$

Tabela 4.5. Resultados da regressão múltipla para Rendimento, apresentando apenas as variáveis significativas com seus respectivos parâmetros e níveis de significância (Coeficiente de determinação: $R^2 = 0,90$).

Fatores	Parâmetros	Nível de significância
Constante (β_0)	51,937	0,0000
X_1 (L)	16,926	0,0000
X_2^2 (A ²)	-5,461	0,0268
X_3^2 (B ²)	-7,945	0,0033

$$\text{Rendimento} = 51,94 + 16,93 X_1 - 5,46 X_2^2 - 7,95 X_3^2 \quad (4.4)$$

Vale ressaltar que para a resposta rendimento a única variável isolada significativa (Equação 4.4), foi a concentração inicial de levedura, confirmando o forte efeito desta sobre esta resposta.

Assim como na produtividade, a concentração inicial de leveduras apresentou forte efeito a favor do rendimento da fermentação (Equação 4.4). Analisando os resultados expostos na Tabela 4.1, ao se comparar os experimentos 1 e 5, 2 e 6, 3 e 7, 4 e 8, 9 e 10, 10 e 15, e 9 e 15 verifica-se que o rendimento aumenta em função do aumento da concentração inicial de leveduras, comportamento análogo ao observado para a produtividade. Com isso, reforça-se a idéia de que em fermentações contaminadas, na presença de antibiótico, as leveduras conseguem estabelecer uma competição com as bactérias, mesmo diante das intempéries causadas pela contaminação. As bactérias, por sua vez, promovem um efeito negativo no rendimento da fermentação, quando comparados os experimentos 1 e 2, 3 e 4, 5 e 6, 13 e 14, e 14 e 15. O efeito da concentração inicial de leveduras sobre o rendimento da fermentação também se apresentou mais forte do que o causado pela concentração inicial de bactérias. A dosagem de antibiótico também apresentou efeito positivo no rendimento,

quando comparados os experimentos 1 e 3, 2 e 4, 6 e 8, 11 e 12, 11 e 15. No entanto, alguns testes demonstraram que altas dosagens do antibiótico natural podem prejudicar o rendimento da fermentação, como foi constatado comparando-se os experimentos 5 e 7 e 12 e 15, nos quais as concentrações de antibióticos utilizadas foram de 50 e 57,5 mg/L, contra 7,5 e 28,75 mg/L, respectivamente. Estes resultados reforçam a idéia de que a utilização indiscriminada de antibiótico não significam bons resultados nos processos fermentativos.

Foram analisados os comportamentos dos resíduos e dos valores preditos em função dos observados graficamente (Figura 4.9 e 4.10). Nota-se que a distribuição dos resíduos foi aleatória em torno do zero, sem tendências. Os resultados experimentais para rendimento também se apresentaram próximos aos valores fornecidos pela Equação 4.4.

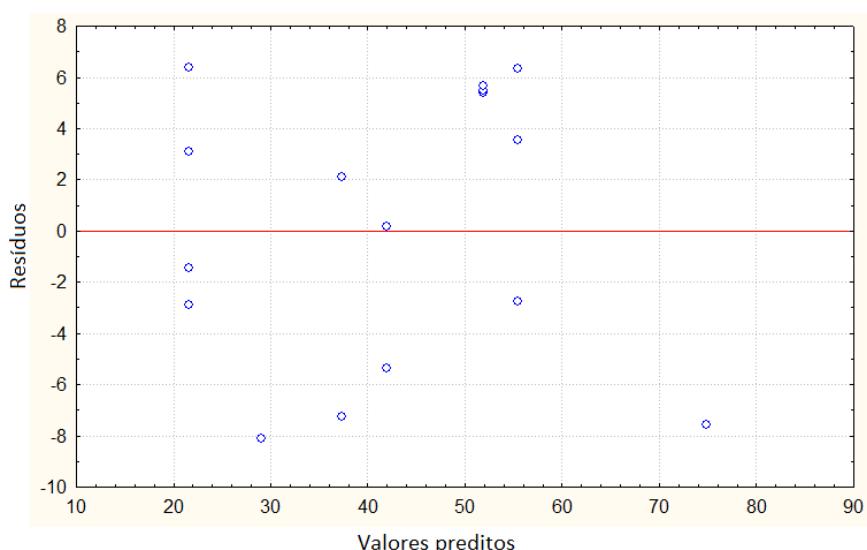


Figura 4.9. Distribuição dos resíduos relativos ao rendimento.

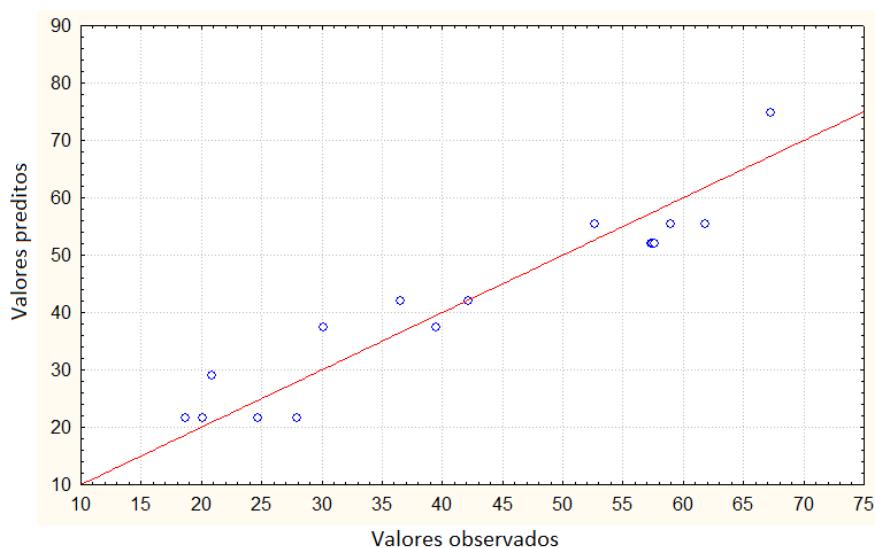


Figura 4.10. Valores preditos em função dos observados relativos ao rendimento.

As superfícies de resposta e as curvas de contorno foram apresentadas nas Figuras 4.11, 4.12 e 4.13, nas quais estão expostas as regiões de otimização das variáveis em suas formas reais, duas a duas, para rendimento. Como era esperada, a resposta para rendimento em função das variáveis trabalhadas se deu de maneira muito semelhante àquela constatada para produtividade. Os melhores valores de rendimento obtidos correspondem a uma dosagem de 15 – 40 mg/L, na região do ponto central. Para bactérias, os melhores rendimentos alcançados estão relacionados às contaminações em torno de $X_3 = 0$ que, de acordo com a equação de codificação, corresponde a 0,8 – 1,6 g/L de meio centrifugado, ou a uma contaminação da ordem de 10^4 UFC/mL. E assim como na produtividade, o melhor resultado para rendimento foi obtido quando se utilizou concentrações iniciais de leveduras acima de 28 g/L, correspondente a quantidade de células na ordem de 10^8 células/mL.

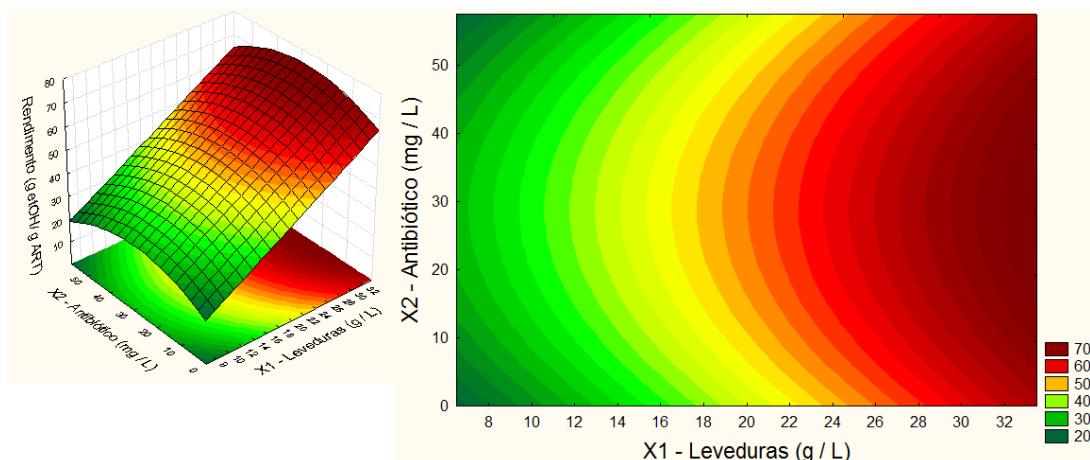


Figura 4.11. Superfície de resposta e curva de contorno para rendimento em função da concentração leveduras (X_1) e dosagem de antibiótico (X_2).

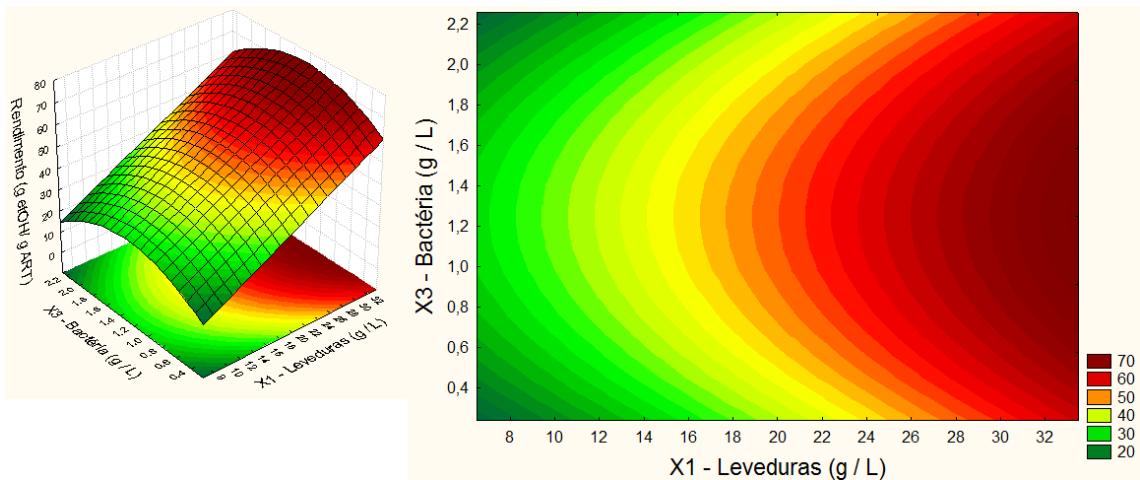


Figura 4.12. Superfície de resposta e curva de contorno para rendimento em função da concentração leveduras (X_1) e contaminação bacteriana (X_3).

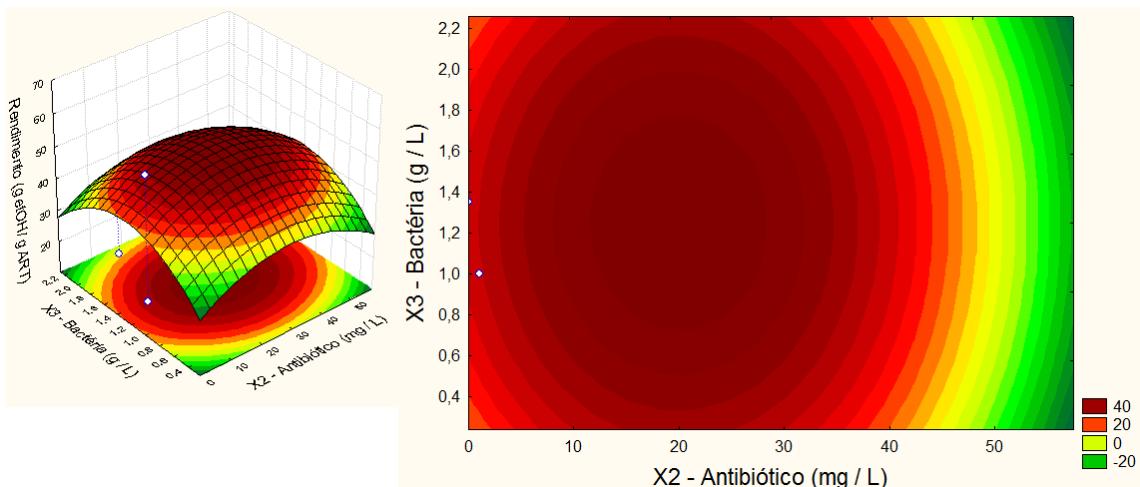


Figura 4.13. Superfície de resposta e curva de contorno para rendimento em função da dosagem de antibiótico (X_2) e contaminação bacteriana (X_3).

4.2.3. Sacarose residual

Os resultados obtidos com a regressão múltipla com os dados relativos a sacarose residual foram apresentados na Tabela 4.6 e na Equação 4.5, nos quais são mostrados os parâmetros significativos e não significativos, bem como os valores dos níveis de significância relacionados aos mesmos.

Eliminando-se os parâmetros não significativos, foi obtido um coeficiente de correlação de 0,91, indicando que os resultados foram bem representados pela Equação 4.6 (Tabela 4.7).

De acordo com a Equação 4.6, os resíduos de sacarose se tornam menores em função do aumento da concentração inicial de levedura. Este fato pode também ser observado nas comparações dos resultados dos experimentos 1 e 5, 2 e 6, 3 e 7, 4 e 8, 9 e 10, e 9 e 15 do planejamento. Estes resultados já eram esperados, uma vez que a análise da resposta produtividade também apresentou tal comportamento.

Ainda pela Equação 4.6, observa-se que o aumento da dosagem de antibiótico aumenta a sacarose residual, pois se observa a presença do coeficiente positivo contribuindo para tal efeito. Este resultado pode ser notado comparando-se os experimentos 1 e 3, 5 e 7, 11 e 12, 12 e 15 do planejamento.

Tabela 4.6. Resultado da regressão múltipla para Sacarose Residual, com todas as variáveis e seus respectivos parâmetros e níveis de significância (Coeficiente de determinação: $R^2 = 0,94$).

Fatores	Parâmetros	Nível de significância
Constante (β_0)	0,107863	0,348587
X_1 (L)	-0,459027	0,000129
X_1^2 (L^2)	0,317893	0,005333
X_2 (A)	0,173026	0,024477
X_2^2 (A^2)	0,345201	0,003478
X_3 (B)	0,029262	0,643830
X_3^2 (B^2)	0,208660	0,034835
$X_1 X_2$ (L A)	0,075000	0,339320
$X_1 X_3$ (L B)	0,050000	0,516231
$X_2 X_3$ (A B)	-0,100000	0,213865

$$\text{Sacarose Residual} = 0,108 - 0,459 X_1 + 0,318 X_1^2 + 0,173 X_2 + 0,345 X_2^2 + 0,029 X_3 + 0,209 X_3^2 + 0,075 X_1 X_2 + 0,05 X_1 X_3 - 0,1 X_2 X_3 \quad (4.5)$$

Tabela 4.7. Resultados da regressão múltipla para Sacarose Residual, apresentando apenas as variáveis significativas com seus respectivos parâmetros e níveis de significância (Coeficiente de determinação: $R^2 = 0,91$).

Fatores	Parâmetros	Nível de significância
Constante (β_0)	0,107863	0,328608
X_1 (L)	-0,459027	0,000009
X_1^2 (L^2)	0,317893	0,001919
X_2 (A)	0,173026	0,014277
X_2^2 (A^2)	0,345201	0,001069
X_3^2 (B^2)	0,208660	0,022277

$$\text{Sacarose Residual} = 0,108 - 0,459 X_1 + 0,318 X_1^2 + 0,173 X_2 + 0,345 X_2^2 + 0,209 X_3^2 \quad (4.6)$$

O comportamento dos resíduos e dos valores preditos em função dos observados graficamente foi exposto nas Figuras 4.14 e 4.15. A distribuição dos resíduos comportou-se aleatoriamente em torno do zero, não apresentando tendências. Os resultados experimentais foram bem representados pela equação empírica, uma vez que estão bem próximos aos valores fornecidos por esta equação.

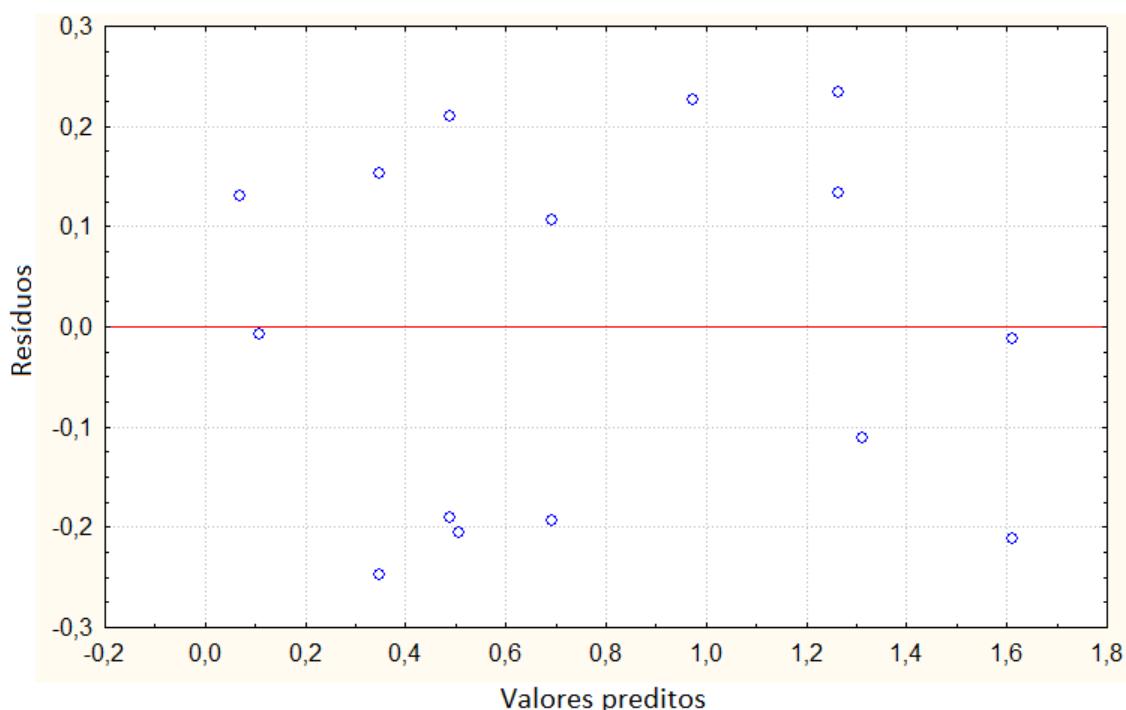


Figura 4.14. Distribuição dos resíduos relativos à sacarose residual.

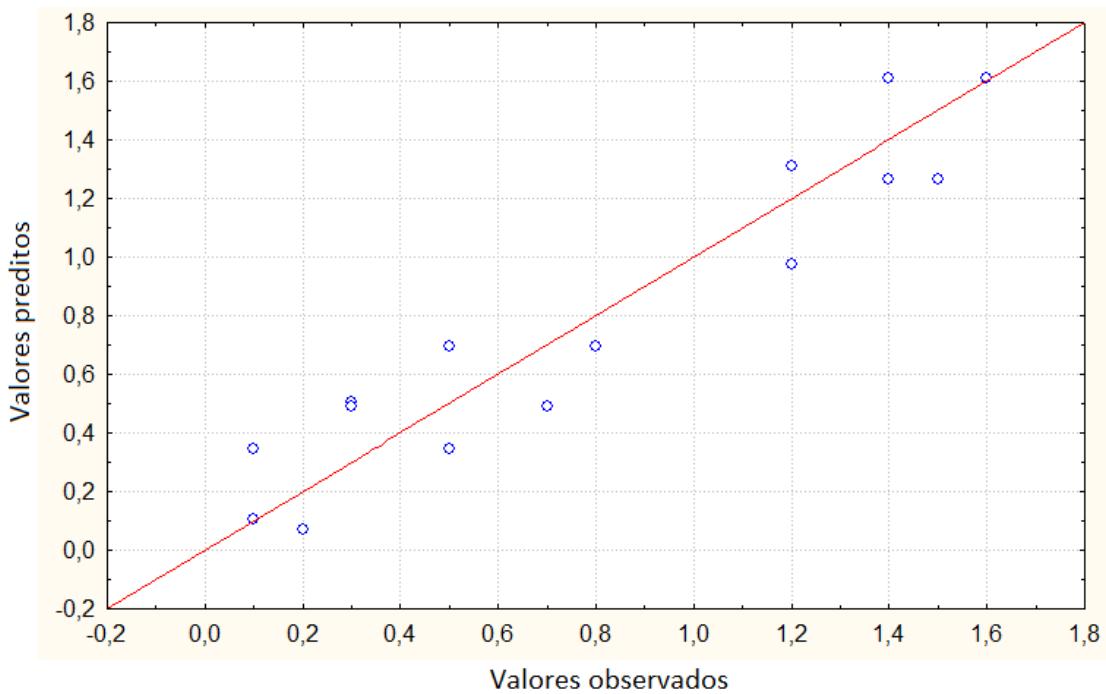


Figura 4.15. Valores preditos em função dos observados relativos à sacarose residual.

As superfícies de resposta e curvas de contorno apresentadas nas Figuras 4.16, 4.17 e 4.18, mostram as regiões de otimização visando à minimização da concentração de sacarose residual. Estes resultados correspondem às faixas de 25 – 33,5 g/L de leveduras (10^8 UFC/mL), 18,12 – 28,75 mg/L de antibiótico e uma contaminação que corresponde à ordem de 10^4 UFC/mL.

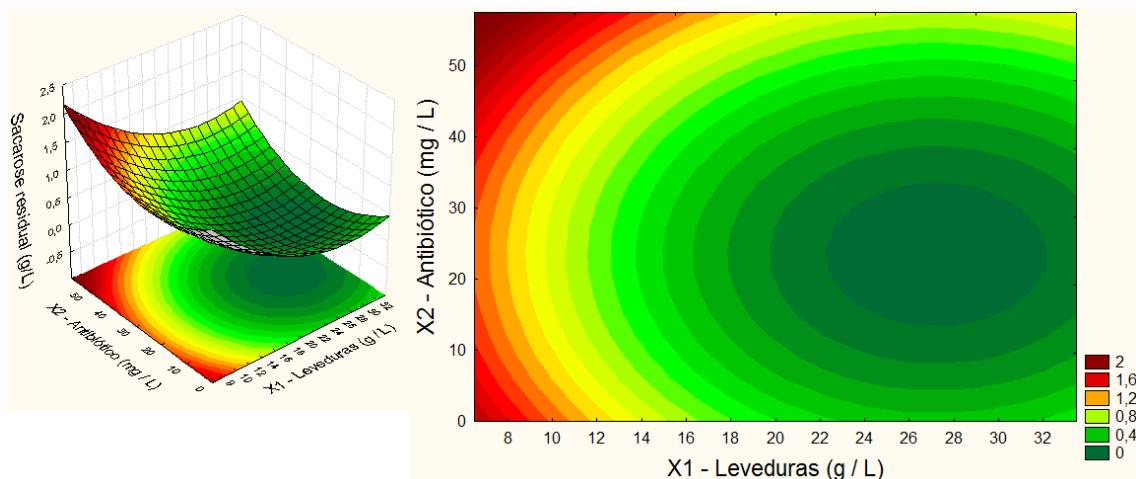


Figura 4.16. Superfície de resposta e curva de contorno para a resposta sacarose residual em função da concentração de leveduras (X_1) e dosagem de antibiótico (X_2).

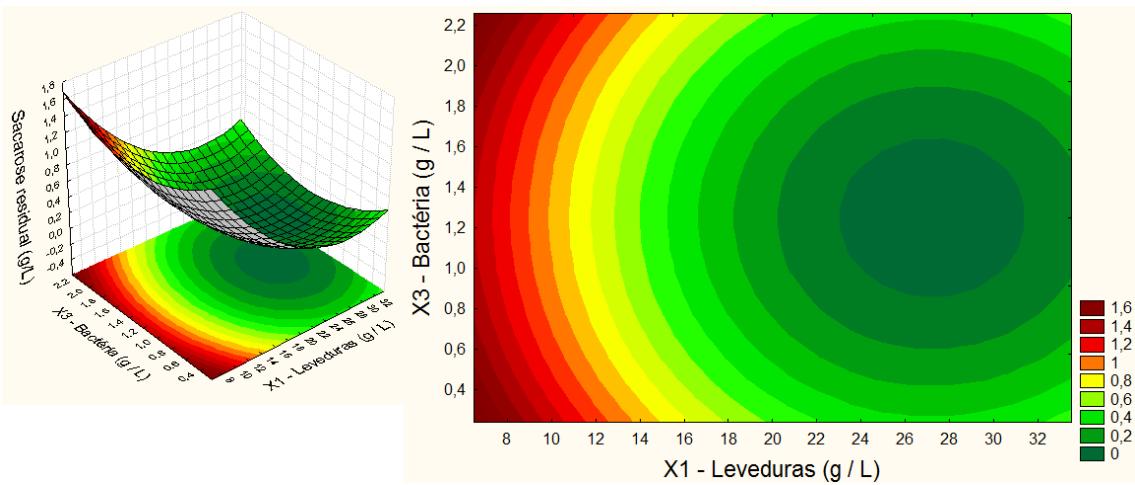


Figura 4.17. Superfície de resposta e curva de contorno para a resposta sacarose residual em função da concentração de leveduras (X_1) e contaminação bacteriana (X_3).

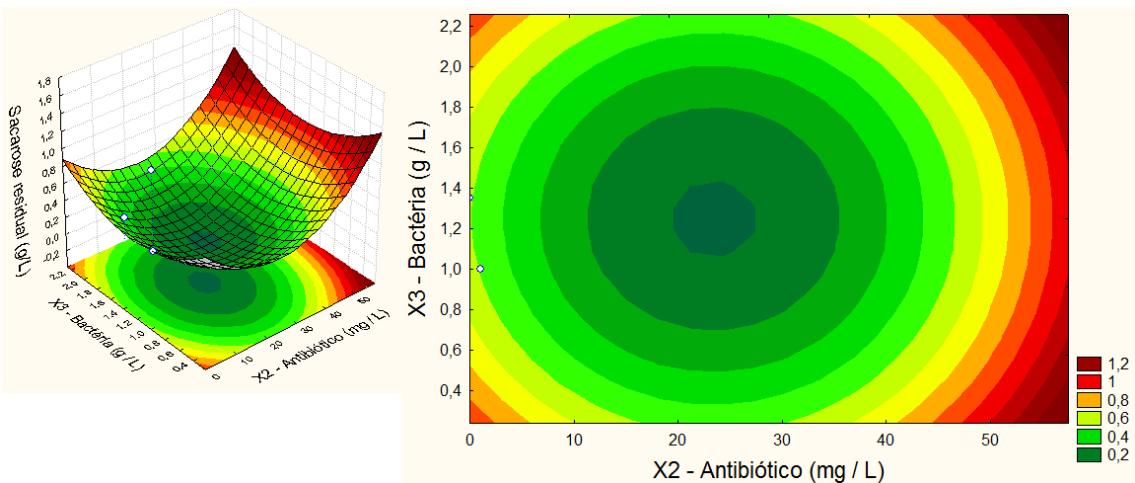


Figura 4.18. Superfície de resposta e curva de contorno para a resposta sacarose residual em função da dosagem de antibiótico (X_2) e contaminação bacteriana (X_3).

4.2.4. Otimização

Com o objetivo de encontrar o ponto estacionário para estas respostas, ou seja, o ponto correspondente de otimização, foi realizada a implementação de um algoritmo no programa *Maple V*.

A otimização para a resposta produtividade gerou os seguintes valores codificados: $X_1 = 4,38$; $X_2 = 0,31$ e $X_3 = -0,20$. Utilizando as equações de codificação, foi possível calcular os valores das variáveis em sua forma real, o que resultou em:

$$X_1 = 63,8 \text{ g/L de leveduras}$$

$$X_2 = 35,3 \text{ mg/L}$$

$$X_3 = 1,1 \text{ g/L (corresponde a } 10^4 \text{ UFC/mL)}$$

O forte efeito da concentração inicial de levedura sobre a resposta produtividade, fez com que o ponto de maximização obtido para essa variável, quando utilizou-se a rotina de otimização, encontrasse fora da região estudada.

Logo, tendo em vista a produtividade do processo, verificou-se que a dosagem ideal de antibiótico, de acordo com a otimização, encontra-se inserida na faixa de trabalho tida como normal pelo fabricante, que é de 5 – 110 ppm. A dosagem de 35,3 mg /L seria a dosagem a ser aplicada em processos com contaminações da ordem de 10^4 UFC/mL. A concentração inicial de levedura apresentou valores acima da faixa estudada e, ainda, bem acima da concentração aplicada nas fermentações a base de caldo de cana. Porém trabalhar com concentrações tão altas de inóculo inicial não é recomendado, pois pode haver o crescimento excessivo do fermento, acarretando em uma maior formação de glicerol e na necessidade de maiores gastos com insumos (ácido sulfúrico) no tratamento do fermento (Amorim, 2005).

Utilizando um procedimento análogo ao realizado na análise da resposta produtividade, foi obtido o ponto estacionário para rendimento a fim de definir a condição operacional dentro da região de otimização. Os valores codificados destes pontos foram os seguintes: $X_1 = 3,0$; $X_2 = -0,17$ e $X_3 = 0,08$. Em sua forma real, obtivemos:

$$X_1 = 50,0 \text{ g/L de leveduras}$$

$$X_2 = 25,1 \text{ mg/L}$$

$$X_3 = 1,31 \text{ g/L (corresponde a } 10^4 \text{ UFC/mL)}$$

De acordo com a otimização acima, os melhores resultados possíveis para o rendimento da fermentação foram alcançados quando a fermentação foi conduzida em níveis

de contaminação da ordem de 10^4 UFC/mL, concentração de 50,0 g/L de leveduras e dosagem de antibiótico de 25,1 mg/L, dosagem que está dentro da faixa recomendada pelo fabricante.

Novamente verificou-se que a otimização para a resposta rendimento em relação à quantidade de levedura ficou acima da faixa estudada. Porém, como mencionado anteriormente, esta quantidade de inóculo é muito alta e, normalmente, não é utilizada industrialmente. Assim, analisando-se a superfície de resposta dentro da faixa estudada, nota-se que para as concentrações de levedura contidas no intervalo de 28 a 33,5 g/L, a resposta rendimento apresentou seus valores máximos. A maximização do rendimento para a concentração de antibiótico variou de 15 a 40 mg/L e de 0,8 a 1,6 g/L para a quantidade de bactérias (10^3 – 10^5 UFC/mL).

O ponto estacionário para sacarose residual, em sua forma codificada, foram os seguintes: $X_1 = 0,79$; $X_2 = -0,37$ e $X_3 = -0,25$. Em sua forma real, obtivemos:

$$X_1 = 27,9 \text{ g/L de leveduras}$$

$$X_2 = 20,9 \text{ mg/L}$$

$$X_3 = 1,06 \text{ g/L (corresponde a } 10^3 \text{ UFC/mL)}$$

Nota-se que o ponto ótimo que minimizou a resposta sacarose residual apresentou menor concentração inicial de leveduras em relação às respostas rendimento e produtividade. No entanto, as demais variáveis apresentaram valores muito próximos aos obtidos nas análises do rendimento e da produtividade. Verificou-se que a competição por nutrientes em uma fermentação cuja concentração de inóculo ou levedura trabalhe em níveis altos nem sempre significará melhor esgotamento do mosto. Acredita-se que o estresse causado por esta competição tenha inibido o desempenho das células com relação ao consumo do açúcar presente no meio.

Os pontos de otimização obtidos pelo algoritmo implementado no programa *Maple V* e as faixas ótimas observadas nas superfícies de resposta foram expostas na Tabela 4.8.

Tabela 4.8. Faixas de otimização para produtividade, rendimento e sacarose residual.

Ponto central	Leveduras (g/L)	Antibiótico (mg/L)	Bactérias (g/L ou UFC/mL)	10^4 (UFC/mL)
Faixa ótima para produtividade	> 28	20 - 40	0,8 - 1,4	10^3 - 10^4
Ponto ótimo para produtividade (Maple)	63,8	35,3	1,1	10^4
Faixa ótima para rendimento	> 28	15 - 40	0,8 - 1,6	10^3 - 10^5
Ponto ótimo para rendimento (Maple)	50	25,1	1,31	10^4
Faixa ótima para sacarose residual	23 - 32	15 - 33	0,9 - 1,6	10^3 - 10^5
Ponto ótimo para sacarose residual (Maple)	27,9	20,9	1,06	10^3

4.2.5. Quantidades de leveduras e bactérias finais

Conforme descrito do item 3.2.1.2, a quantidade de leveduras e bactérias finais foram analisadas observando-se os resultados expostos na Tabela 4.1. Nas concentrações de 6,5, 10, 20, 30 e 33,5 g/L as quantidades iniciais de levedura foram na ordem de 10^3 , 10^4 , 10^6 , 10^8 e 10^8 células por mL, respectivamente. Assim pode-se observar que em todos os experimentos houve redução na concentração final de levedura vivas, confirmando os resultados obtidos nos testes preliminares. Nos trabalhos realizados por Alves (1994), também foi constatado que a eficiência fermentativa podia ser restabelecida com a aplicação dos antimicrobianos virginiamicina a 10 mg/L, penicilina a 10 mg/L e cloranfenicol a 100 mg/L, mas ocorreram quedas de viabilidade das leveduras.

Nas concentrações iniciais de bactérias de 0,24, 0,5, 1,25, 2,0 e 2,26 g/L, as quantidades de bactérias iniciais foram da ordem de 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^6 e 10^6 UFC/mL, respectivamente. Os resultados da Tabela 4.1 e os dados da Tabela 3.1, mostram que não houve redução na quantidade final de bactérias apenas no experimento 11, em que não foi utilizado antibiótico. Nota-se também que a quantidade final de bactéria foi zero nos experimentos 7 e 13. No ensaio 7 a concentração de levedura (30% v/v) e de antibiótico (50 mg/L) eram altas e a concentração de bactéria era baixa (0,5 g/L - da ordem de 10^3 UFC/mL) e no ensaio 13 a quantidade de bactérias contaminantes era muito baixa (0,24 g/L – da ordem de 10^2 UFC/mL). Nos demais experimentos, que utilizou o antibiótico, a concentração final de bactéria diminuiu, mas não atingiu o valor zero. Este fato estimula a pensar em duas hipóteses, a primeira é de que o antibiótico natural pode ser utilizado como agente preventivo na fermentação alcoólica, pois mesmo que a fermentação venha a sofrer contaminação quando

em baixa concentração inicial de bactérias o antibiótico natural utilizado foi capaz de impedir a proliferação e a ação das mesmas.

O planejamento experimental abrange as mais variadas condições sob as quais um processo fermentativo pode ser submetido. Foram testadas condições em que a quantidade de bactérias esteve na mesma ordem de concentração das leveduras (bactérias: 10^6 UFC/mL; leveduras: 10^6 cél/mL; experimento 14 – Tabela 4.1) e até mesmo em ordens superiores (bactérias: 10^6 UFC/mL; leveduras: 10^4 cél/mL; experimento 2 – Tabela 4.1). Sob condições tão adversas, como era esperado, as leveduras apresentaram péssimo desempenho em termos de rendimento e produtividade. No entanto, em ambos os testes citados anteriormente, o produto natural apresentou forte efeito bactericida, eliminando mais de 99,9% das bactérias presentes (Tabela 4.9), restabelecendo boas condições de assepsia ao meio fermentativo.

4.3. Teste complementar

Observando os resultados obtidos ao longo do planejamento experimental, foi possível notar a redução na viabilidade celular das leveduras em todos os experimentos. Com o intuito de avaliar uma possível influência negativa causada pelo BETABIO 45 sobre este parâmetro do processo fermentativo, realizou-se uma fermentação idêntica ao primeiro teste preliminar (item 3.2.1.1), porém, com uma dosagem de 50 ppm de antibiótico natural BETABIO 45. Confrontando os resultados obtidos neste teste com os resultados obtidos no primeiro teste preliminar, foi possível avaliar melhor esta questão.

No primeiro teste preliminar (tem 3.2.1.1), foi obtido um rendimento de 85,2% e uma produtividade de 9,15 g_{etanol}/L.h. A concentração final de etanol foi de 73,2 g/L e a sacarose residual, 0,3 g/L (Figura 4.1). O teste complementar, por sua vez, alcançou 85,3% de rendimento, produtividade de 10,4 g_{etanol}/L.h e sacarose residual de 1,43 g/L, em uma fermentação com 7 horas de duração. No teste preliminar (Figura 4.19), houve um crescimento celular de 10^8 para 10^9 cél/mL, enquanto que, no complementar (Figura 4.20), apesar de não ter sido forçada a contaminação e, mesmo assim, ter sido aplicado o BETABIO 45, também foi verificado crescimento celular, de $1,9 \times 10^8$ para $2,4 \times 10^8$ cél/mL. Portanto, acredita-se que o antibiótico natural BETABIO 45 não prejudica a saúde das células envolvidas no processo fermentativo. Assim, os baixos rendimentos e produtividades observados ao longo de todo o planejamento experimental não devem ser atribuído ao BETABIO 45.

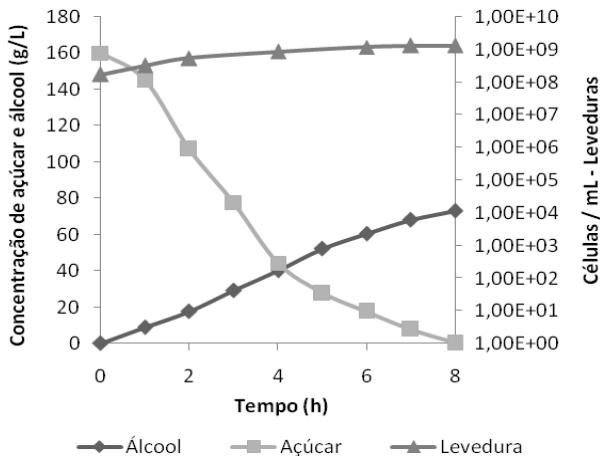


Figura 4.19. Teste preliminar: perfis de concentração de sacarose, de etanol e de células de leveduras vivas em função do tempo, para a fermentação sem contaminação.

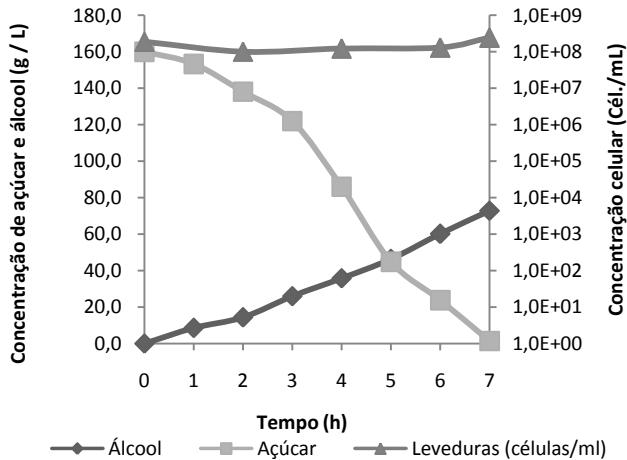


Figura 4.20. Teste complementar: perfis de concentração de sacarose, de etanol e de células de leveduras vivas em função do tempo, para a fermentação sem contaminação com concentração inicial de 50 ppm de BETABIO 45.

4.4. Condição ótima

De acordo com as regiões com maiores valores de rendimento e produtividade e menores valores de concentração de sacarose residual, adotou-se como melhor condição 30 g/L de levedura inicial (correspondendo a $2,7 \times 10^8$ células /mL), concentração de bactéria de 1,25 g/L, o que correspondeu a uma concentração de bactérias de $7,3 \times 10^4$ UFC/mL, e a concentração de antibiótico de 20 mg/L. Como esta variável apresenta um alto custo para o

processo, selecionou o menor valor obtido para ela na região de otimização mostrada pelas superfícies de resposta.

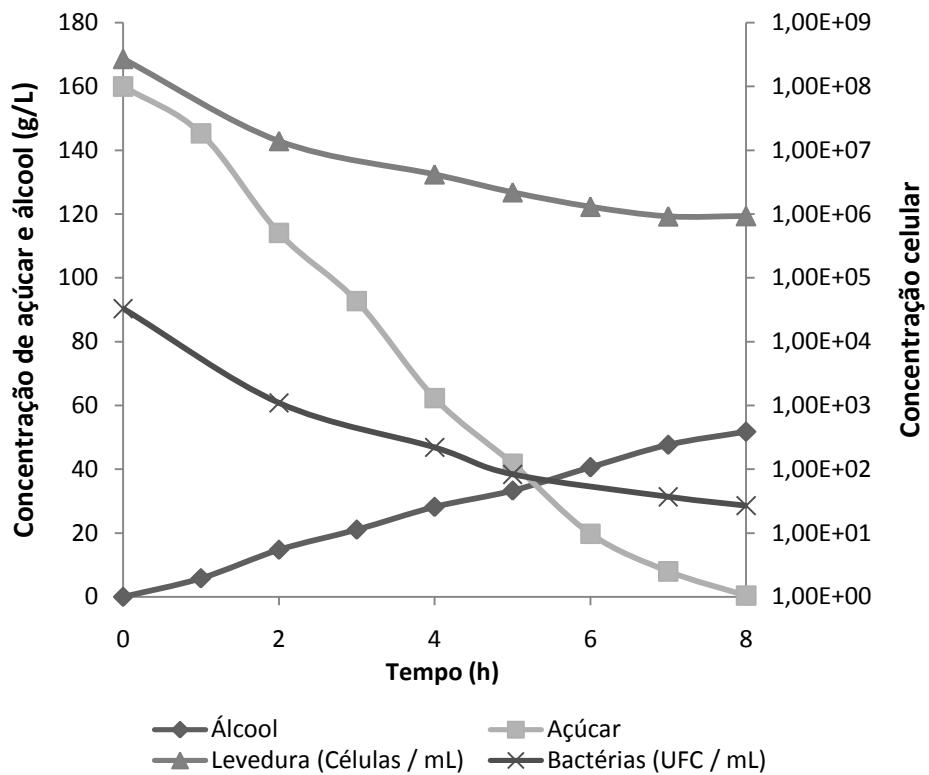


Figura 4.21. Cinética com BETABIO 45 na condição otimizada: 30 g de leveduras/L ($2,7 \times 10^8$ células/mL); 20 mg/L de antibiótico; 1,25 g/L de bactérias ($7,3 \times 10^4$ UFC/mL).

A Figura 4.21 mostra os perfis de consumo de sacarose e de produção de etanol em função do tempo, bem como a contagem de leveduras e bactérias vivas, nas condições ótimas, ou seja, partindo de alta concentração inicial celular de leveduras ($2,7 \times 10^8$ cél/mL), contaminação da ordem de $7,7 \times 10^4$ UFC/mL e com uma dosagem de antibiótico de 20 ppm. Verifica-se que o tempo de fermentação foi de 8 horas e que a concentração de álcool obtida foi de 57,5 g/L. Nota-se que houve redução na viabilidade celular das leveduras, fazendo sua concentração final chegar a $4,0 \times 10^6$ células/mL. A produtividade foi de 7,2 g_{etanol}/L.h, o rendimento foi de 66,8% e a concentração residual de sacarose de 0,3 g/L. A fermentação teve início com uma contaminação de $7,3 \times 10^4$ UFC/mL e chegou a $1,2 \times 10^1$ UFC/mL ao final do experimento. Este resultado representa uma redução percentual de 99,98% na quantidade de bactérias contaminantes.

A Fermentec, empresa de consultoria especializada em fermentação alcoólica, em pesquisa realizada em escala industrial e publicada no site www.betabio.com.br, aplicou uma dosagem de 10 ppm de antibiótico BETABIO 45 e alcançou uma redução percentual de

bactérias contaminantes acima de 90%, reduzindo a contaminação de níveis de 10^7 para níveis de 10^6 ($3,7 \times 10^7$ para $1,4 \times 10^6$). De acordo com os resultados obtidos nos testes realizados em nosso planejamento experimental, este percentual de redução de bactérias contaminantes foi alcançado em todos os experimentos em que se utilizou o antibiótico BETABIO 45 (Tabela 4.9).

Tabela 4.9. Resultados referentes às bactérias iniciais, finais e redução percentual, em diferentes condições experimentais de acordo com o planejamento composto central.

Exp.	Levedura (g/L)	Antibiótico (mg/L)	Bactérias iniciais (g/L)	Bactérias iniciais (UFC/mL)	Bactérias finais (UFC/mL)	Redução percentual (%)
1	10	7,5	0,5	1,0E+03	7,7E+01	92,300%
2	10	7,5	2	1,0E+06	2,0E+02	99,980%
3	10	50	0,5	1,0E+03	2,3E+01	97,700%
4	10	50	2	1,0E+06	6,6E+01	99,993%
5	30	7,5	0,5	1,0E+03	4,2E+01	95,800%
6	30	7,5	2	1,0E+06	1,3E+02	99,987%
7	30	50	0,5	1,0E+03	0,0E+00	100,000%
8	30	50	2	1,0E+06	2,7E+01	99,997%
9	6,5	28,75	1,25	1,0E+04	1,0E+02	99,000%
10	33,5	28,75	1,25	1,0E+04	5,0E+00	99,950%
11	20	0	1,25	1,0E+04	8,7E+06	Sem antibiótico
12	20	57,5	1,25	1,0E+04	9,6E+01	99,040%
13	20	28,75	0,24	1,0E+02	0,0E+00	100,000%
14	20	28,75	2,26	1,0E+06	2,6E+02	99,974%
15	20	28,75	1,25	1,0E+04	4,2E+01	99,580%
16	20	28,75	1,25	1,0E+04	5,8E+01	99,420%
17	20	28,75	1,25	1,0E+04	5,2E+01	99,480%

Os resultados também mostraram que houve reprodutibilidade dos resultados obtidos no planejamento composto central, empregando uma condição mais econômica dentro da região

Nas mesmas condições dos testes realizados na condição ótima para o BETABIO 45, conduziu-se uma fermentação utilizando o antibiótico KAMORAN. Este experimento teve como finalidade comparar a atuação dos dois antibióticos nas mesmas condições de fermentação e dosagem.

Os perfis de consumo de sacarose e de produção de etanol em função do tempo, bem como a contagem de leveduras e bactérias vivas em função do tempo obtidos nos testes com o KAMORAN estão expostos na Figura 4.22. A fermentação foi concluída em 9 horas. Obteve-se a concentração de álcool de 59,9 g/L. Assim como no ensaio com o antibiótico natural, foi

observada uma pequena redução na viabilidade celular das leveduras com o antibiótico químico. A fermentação com antibiótico químico iniciou com de $3,2 \times 10^8$ células /mL e chegou a $1,4 \times 10^7$ células/mL, ao final da fermentação. A produtividade foi de 6,7 g_{etanol}/L.h, o rendimento foi de 69,6% e a concentração residual de sacarose de 0,4 g/L. Por outro lado a concentração de bactérias iniciou em $8,7 \times 10^4$ UFC/mL e ao final de 8 horas de fermentação a concentração era de zero UFC/mL. Oliveira *et al.* (1996) chegaram em reduções percentuais muito semelhantes aos testes realizados neste trabalho. Obtiveram percentuais de redução populacional de bactérias do gênero *Lactobacillus fermentum* de 99,99%, 99,70% para *Lactobacillus plantarum*, 82,30% para *Bacillus subtilis*, 99,99% para *Bacillus brevis* e 99,30% para *Leuconostoc mesenteroides*, dentre outros micro-organismos testados, com uma dosagem de 3,0 ppm de antibiótico e um tempo de contato que durou 6 horas. Iemma (2005) verificou que a viabilidade celular da *Saccharomyces cerevisiae* Y-904 teve sua redução atenuada pelos tratamentos com KAMORAN, uma vez que reduziu efetivamente a população bacteriana, propiciando condições favoráveis ao crescimento da levedura.

O maior tempo de fermentação proporcionado pelo antibiótico químico pode estar relacionado à menor concentração de bactérias contaminantes finais. Como o antibiótico KAMORAN conseguiu reduzir o número de bactérias em maior percentual e a uma taxa mais elevada do que o antibiótico natural, o consumo de substrato pelas bactérias foi menor, fazendo com que a fermentação se estendesse a 9 horas de processo. Vale ressaltar que com o antibiótico químico a quantidade de bactérias finais foi igual a zero.

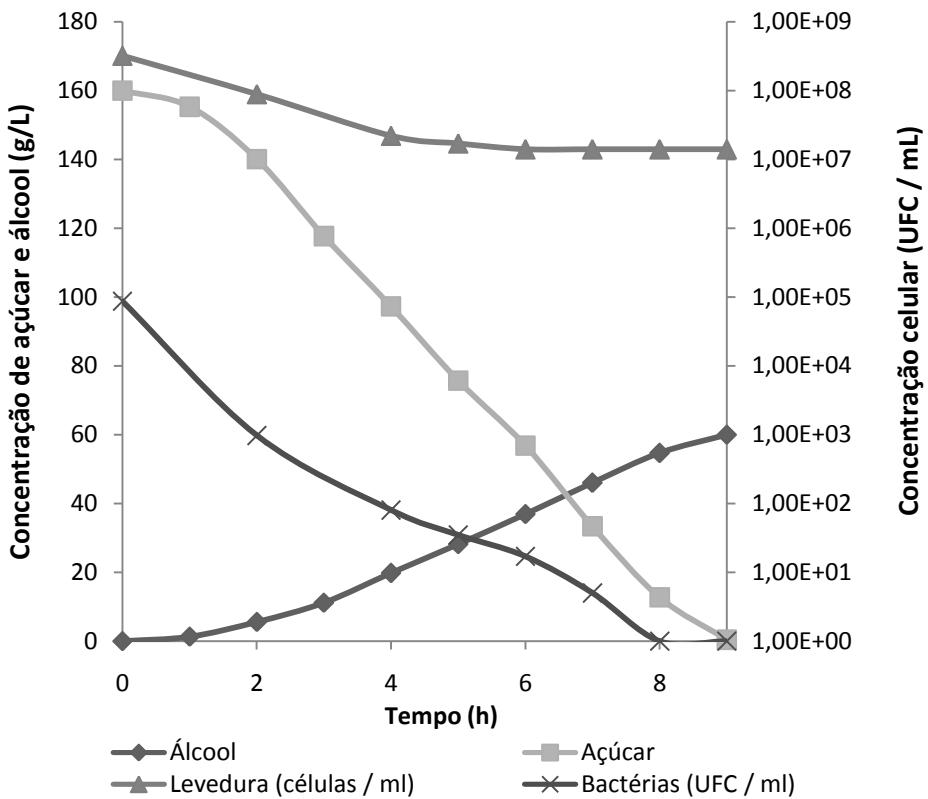


Figura 4.22. Cinética com KAMORAN na condição otimizada: 30 g de leveduras / L ($3,2 \times 10^8$ células/mL); 20 mg/L de antibiótico; 1,25 g/L de bactérias ($8,7 \times 10^4$ UFC/mL).

Tomando por base os resultados da Figura 4.22 e os dados da Tabela 4.10, pode-se dizer que os dois antibióticos tiveram desempenho semelhante. No entanto, o KAMORAN gerou resultados um pouco mais eficientes com relação ao combate a contaminação bacteriana, eliminando estes micro-organismos. Por outro lado, o BETABIO 45 proporcionou uma produtividade mais elevada e um rendimento um pouco menor. Observa-se ainda, que em ambos os experimentos foi verificado queda na viabilidade celular das leveduras, sendo que para o antibiótico natural essa redução foi um pouco maior do que para o antibiótico químico. Os resultados obtidos confirmam a hipótese de que o antibiótico natural pode ser utilizado como um agente de prevenção a contaminação do processo fermentativo.

Tabela 4.10 – Paralelo entre os testes realizados nas condições ótimas com os antibióticos BETABIO 45 e o KAMORAN.

	BETABIO 45	KAMORAN
Produtividade (g/L h)	7,2	6,7
Rendimento ((g etOH / g ART)x100)	66,8	69,6
Sacarose residual (g/L)	0,3	0,4
Contaminação inicial (UFC/mL)	7,7E+04	8,7E+04
Contaminação final (UFC/mL)	1,2E+01	0,0E+00
Leveduras iniciais (células/mL)	2,7E+08	3,2E+08
Leveduras finais (células/mL)	4,0E+06	1,4E+07
Tempo de fermentação (h)	8	9

Em todos os experimentos realizados no planejamento composto central e também nas condições ótimas, foram alcançados baixos índices de rendimento (< 68%) e produtividade (< 7,3 g/L.h). Nos processos fermentativos em vigor atualmente no mercado do etanol brasileiro, são alcançados rendimentos em torno de 92% (Amorim *et al.*, 1999). Acredita-se que esta discrepância de resultados possa ser atribuída as condições de aplicação dos antibióticos. Nos processos industriais, estes são normalmente dosados nos pré-fermentadores ou cubas de tratamento, onde após receberem tratamento ácido (H_2SO_4), recebem certa dosagem de antibiótico quando necessário. Dessa forma, o fermento parte para um novo ciclo com um nível de contaminação aceitável para os padrões industriais. No entanto, neste trabalho, conforme item 3.2.1.7, contaminou-se o meio no início da fermentação e, neste instante, foram dosados os antibióticos. Portanto, todas as fermentações foram iniciadas em condições pouco propícias a obtenção de altos rendimentos. Esta metodologia também é capaz de justificar a queda de viabilidade celular das leveduras em todos os experimentos em que se utilizou antibiótico, pois estas leveduras estiveram expostas aos produtos metabólicos das bactérias e submetidas a uma competição com as mesmas por nutrientes enquanto a contaminação não foi contornada pela ação dos antibióticos. Acredita-se, ainda, que outro possível agravante na obtenção de baixos rendimentos possa ser atribuído a uma possível presença de micro-organismos incomuns nesses processos. No entanto, seria necessária a realização de outros testes capazes de confirmar esta hipótese.

CAPÍTULO 5

CONCLUSÕES

- O antibiótico natural BETABIO 45 apresentou forte efeito bactericida sobre a cultura mista de bactérias contaminantes do meio fermentativo utilizado em todo o planejamento experimental. O produto fez com que o percentual de redução de bactérias contaminantes estivesse sempre acima de 90% e, em algumas situações, atingisse reduções percentuais acima de 99% ao longo do processo fermentativo.
- Em fermentações em que a quantidade de bactérias esteve na mesma ordem de concentração das leveduras (bactérias: 10^6 UFC/mL; leveduras: 10^6 cél/mL) e até mesmo em ordens superiores (bactérias: 10^6 UFC/mL; leveduras: 10^4 cél/mL), os testes com o produto natural apresentou forte efeito bactericida, eliminando mais de 99,9% das bactérias presentes, restabelecendo boas condições de assepsia ao meio fermentativo.
- Altas quantidades de antibiótico BETABIO 45 não significaram resultados melhores. Constatou-se, que o aumento na dosagem de antibiótico natural contribuiu para o aumento de sacarose residual.
- Nas condições trabalhadas no planejamento experimental proposto, os melhores resultados obtidos com o BETABIO 45 estiveram relacionados a baixas contaminações (10^4 UFC/mL), sugerindo que o mesmo possa ser utilizado como um agente preventivo de contaminações.
- Acredita-se que a redução da viabilidade celular das leveduras, as baixas produtividades e os baixos rendimentos detectados em todos os experimentos realizados ao longo do planejamento experimental não possam ser atribuídos ao uso de antibiótico.

- Apesar dos pontos de otimização encontrados nas condições experimentais conduzidas neste trabalho, acredita-se que a aplicação eficiente do mesmo sob outras condições requer análises e testes em planta.
- O antibiótico natural BETABIO 45 apresentou desempenho muito semelhante ao antibiótico KAMORAN. No entanto, este último foi mais eficaz no combate às bactérias contaminantes.

CAPÍTULO 6

SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Testar o produto sob contaminações superiores a 10^6 UFC/mL.
- Realizar os mesmos experimentos dosando o antibiótico BETABIO 45 ao inóculo contaminado após tratamento ácido com a aplicação de H₂SO₄, para só então, dar início a fermentação com o inóculo tratado.
- Realizar os mesmos experimentos com o antibiótico KAMORAN e analisar a viabilidade econômica da utilização do BETABIO 45 mesmo quando não exista o interesse na comercialização de leveduras desidratadas.
- Obter o modelo cinético referente à aplicação do BETABIO 45.
- Avaliar o desempenho do antibiótico natural BETABIO 45 em fermentações submetidas a reciclo de células a fim de avaliar o possível desenvolvimento de resistência pelas bactérias contaminantes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALCARDE, A. R.; WALDER, J. M. M.; HORII, J. Effect of γ radiation on physiological parameters of the ethanolic fermentation. **World journal of Microbiology & Biotechnology**. vol. 18, p. 41 – 47, 2002.
- ALCARDE, A. R.; HORII, J.; NOBRE, T. P. Viabilidade celular de *Saccharomyces cerevisiae* cultivada em associação com bactérias contaminantes da fermentação alcoólica. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, vol. 27, n.1, p. 20-25, 2007.
- ALTERTHUM, F.; CRUZ, M.R.M.; VAIRO, M.L.R.; GAMBASSI, D.M. Efeito dos microrganismos contaminantes da fermentação alcoólica nas microdestilarias. **STAB. Açúcar, Álcool e Subprodutos**, vol.3, n.1, p.42-49, 1984.
- ALVES, D.M.G. Fatores que afetam a formação de ácidos orgânicos bem como outros parâmetros da fermentação alcoólica. Piracicaba. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, 251p. 1994.
- AMORIM, H. V. Fermentação Alcoólica: Ciência e Tecnologia. Piracicaba. São Paulo, Fermentec, 448p. 2005.
- AMORIM, H. V.; OLIVEIRA, A. J. Infecção na fermentação: como evitá-la. **Açúcar e Álcool**, vol.5, p.12-18, 1982.
- AMORIM, H. V.; WHEALS, A. E.; BASSO, L. C.; ALVES, D. M. G. Fuel ethanol after 25 years, Focus, December 1999, vol 17.
- ANDRIETTA, S. R.; STECKELBERG, C.; ANDRIETTA, M. G. S. Bioetanol – Brasil, 30 anos na vanguarda. MultiCiêncie, Universidade de Campinas, 2006.
- 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.
- ANSELMI, Renato. Jornal Cana, Campinas; Maio de 2008, p. 51.
- AQUARONE, E. Penicillin and Tetracycline as Contamination Control Agents in Alcoholic Fermentation for Sugar Cane Molasses. Resumo de uma tese apresentada pelo autor para a Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil, 1959.

ARAÚJO, L. F.; JUNQUEIRA, O. M.; LOPES, E. L.; ARAÚJO, C. S. da S.; ORTOLAN, J. H.; LAURENTIZ, A. C. de. Utilização da levedura desidratada (*Saccharomyces cerevisiae*) para leitões na fase inicial. **Ciência Rural**, Santa Maria; v. 36, n.5, p. 1576-1581, Set.-Out., 2006.

BAI, F. W.; ANDERSON, W. A.; MOO-YOUNG, M. Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks. **Biotechnology Advances**, vol. 26, p. 89-105, 2008.

BASSO, L. C., BARRE, P.; BLONDIN, B.; DEQUIN, S.; FEUILLAT, M.; SABLAYROLLES, J. M.; **Fisiologia e ecologia microbiana**, I Workshop Tecnológico sobre Produção de Etanol, Projeto Programa de Pesquisa em Políticas Públicas, ESALQ/USP, 2004.

BAYROCK, D. P.; THOMAS, K. C.; INGLEDEW, W. M. Control of *Lactobacillus* contaminants in continuous fuel ethanol fermentation by constant or pulsed addition of penicillin G. **Appl Microbiol Biotechnol**. vol. 62, p. 498-502, 2003.

BAYROCK, DENNIS P.; INGLEDEW, W. MICHAEL. Inhibition of yeast by lactic acid bacteria in continuous culture: nutrient depletion and/or acid toxicity? **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.** vol. 31: 362-368, 2004.

BEROVIC, M.; PIVEC, A.; KOSMERL, T.; WONDRA, M.; CELAN, S. Influence of heat shock on glycerol production in alcohol fermentation. **Journal of Biosciene and Bioengineering**; vol. 103, no. 2, p.135-139, 2007.

BETABIO, disponível em <http://www.betabio.com.br>. Acessado em 13/11/2010.

BETATEC, disponível em www.betatechopproducts.com. Acessado em 06/02/2011.

BORGES, P. C. S. **Otimização dinâmica da fermentação alcoólica no processo em batelada alimentada.** (Dissertação de mestrado), Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2008.

CALIARI, M.; JÚNIOR, M. S. S.; GOMES, R. J. C. Efeito de ondas ultra-sônicas sobre a população de *Leuconostoc mesenteroides* em caldo de cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, vol. 34 (3), p. 139 – 146, 2004.

CERQUEIRA LEITE, R. C.; LEAL, M. R. L. V.; CORTEZ, L. A. B.; GRIFFIN, W. M.; SCANDIFFIO, M. I. G. Can Brazil replace 5% of the 2025 gasoline world demand with ethanol? **Energy**, vol. 34, p.655-661, 2009.

CHANG, I. S.; KIM, B. H.; SHIN, P. K. Use of sulfite and hydrogen peroxide to control bacterial contamination in ethanol fermentation. **Applied and Environmental Microbiology**, vol. 63, p. 1 – 6, Jan. 1997.

CHERUBIN, R. A. Efeitos da viabilidade da levedura e da contaminação bacteriana na fermentação alcoólica. Tese (Doutorado). Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 137p., 2003.

CORMA, A.; HUBER, G. W.; SAUVANAUD, L.; O’CONNOR, PAUL. Biomass to chemicals: Catalytic conversion of glycerol/water mixtures into acrolein, reaction network. **Journal of Catalysis**, vol. 257, p. 163-171, 2008.

DAY, W. H.; SERJAK, W. C.; STRATTON, J. R.; STONE, L. Antibiotics as Contamination-Control Agents in Grain Alcohol Fermentations. **Agricultural and Food Chemistry**, v. 2, n. 5, p. 252-258, March, 1954.

FAOSTAT, Food and agriculture organization of the United Nations, disponível em <<http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>>, Acesso em: 13/novembro/2010.

FERREIRA, I. M. P. L. V. O.; PINHO, O.; VIEIRA, E.; TAVARELA, J. G. Brewer’s *Saccharomyces* yeast biomass: characteristics and potential applications. **Trends in Food Science & Technology**, vol. 21, p. 77 – 84, 2010.

GALLO, C. R. Determinação da microbiota bacteriana de mosto e de dornas de fermentação alcoólica. Tese (Doutorado) Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 388p, 1990.

GALVEZ, A., RAMÍREZ, M.J., GARCIA-GARIBAY, M. Chemical composition of a mixture of single cell protein obtained from *Kluyveromyces fragilis* and whey proteins. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, Guatemala, v.40, n.2, p.252-262, 1990.

GUILFOILE, P. G. Antibiotic-Resistant Bacteria. 1^a Ed. Chelsea House Publishers. p.10-37, 2007.

HALASZ A., LÁSZTITY R. Use of yeast biomass in food production. Boca Raton: CRC Press; 312p. 1991.

HOPSTEINER, disponível em <<http://www.hopsteiner.com/pdf/antibacterial-beta-bio45.pdf>>, acessado em 13/novembro/2010.

IEMMA, J. Viabilidade celular de *Saccharomyces cerevisiae* cultivada em associação com bactérias contaminantes da fermentação alcoólica. (Tese Doutorado) Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.

IMAI, T., and T. OHNO. Measurement of yeast intracellular pH by image processing and the change it undergoes during growth phase. **J. Biotechnol.** vol. 38, p. 165–172, 1995.

JAY, J. M.; LOESSNER, M. J.; GOLDEN, D. A. Modern Food Microbiology. 7^a Ed., Springer. p. 327-330, 2005.

LANGEZAAL, C.R., CHANDRA, A., SHEFFER, J.J.C. Antimicrobial screening of essential oils and extracts of some *Humulus lupulus* L. cultivars. **Pharmaceutisch Weekblad. Scientific Edition.** vol. 14, 353–356, 1992.

LEE, Y. S.; LEE, W. G.; CHANG, Y. K. e CHANG, H. N. Modelling of Ethanol Production by *Saccharomyces cerevisiae* from a Glucose and Maltose Mixture. **Biotechnology Letters**, p. 791-796.1995.

LIMA, U. A.; BASSO, L. C.; AMORIM, H. V. In: LIMA, U. A. (Coord.). **Biotecnologia Industrial: Processos Fermentativos e Enzimáticos**. São Paulo: Edgard Blücher,.vol. 3, p.1 – 43, 2001.

MEN, Y.; KOLB, G.; ZAPF, R.; HESSEL, V.; LOWE, H. Ethanol steam reforming in a microchannel reactor. **IChemE**, vol. 85 (B5), p.413-418, 2007.

MORAES, V. M. B.; SILVA, V. K.; SILVA, J. D. T.; GRAVENA, R. A.; MARQUES, R. H.; HADA, F. H.; Desempenho de frangos de corte de 1 a 21 dias de idade alimentados com rações contendo extrato de leveduras e prebiótico e criados em diferentes temperaturas. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.38, n.4, p. 690-696, 2009.

NASCIMENTO, G. G. F.; LOCATELLI, J.; FREITAS, P. C.; SILVA, G. L. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**. vol. 31, p. 247-256, November 14, 2000.

NARENDRANATH, N. V.; Effects and management of lactobacilli in yeast-catalyzed ethanol fermentations; Thesis submitted to the College of Graduate Studies and Research in Partial FtWhent oaf the Requirements for the Degree of Doctor of Philosophy in the Department of Applied Microbiology and Food Science, University of Sashchewan Saskatoon, 2000.

NARENDRANATH, K. C. THOMAS, and INGLEDEW, W. M. Effects of *Lactobacilli* on Yeast-Catalyzed Ethanol Fermentations. **Applied and Environmental Microbiology**. vol. 63, No. 11, p. 4158 – 4163, Nov. 1997.

NARENDRANATH, N. V.; THOMAS K. C.; INGLEDEW, W. M. Urea Hydrogen Peroxide Reduces the Numbers of *Lactobacilli*, Nourishes Yeast, and Leaves No Residues in the Ethanol Fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*. vol. 66, p. 4187-4192, Oct. 2000.

NEUMANN, M.; OST, P. R.; PELLEGRINI, L. G.; MELLO, S. E. G.; SILVA, M. A. A.; NÖRNBERG, J. L.; Utilização de leveduras vivas (*Saccharomyces cerevisiae*) visando a produção de cordeiros Ile de France superprecoce em sistemas de creep-feeding. *Cienc. Rural*, vol. 38, no. 8, Santa Maria, Nov. 2008.

OLIVA-NETO, P. Influência da contaminação por bactérias láticas na fermentação alcoólica pelo processo de batelada alimentada. Dissertação (Mestrado) Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 207p., 1990.

OLIVEIRA, A.J.; GALLO, C.R.; ALCARDE, V.E.; GODOY, A.; AMORIM, H.V. **Métodos para o controle microbiológico na produção de álcool e açúcar.** Piracicaba: FERMENTEC; FEALQ; ESALQ-USP, 89p. 1996.

PACHECO, T. F.; Fermentação Alcoólica com leveduras de características floculantes em reator tipo torre com escoamento ascendente. Uberlândia: Faculdade de Engenharia Química, UFU, Dissertação (Mestrado), p., 2010.

PELCZAR JR., M. J.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R. *Microbiologia: Conceitos e aplicações*. v. 1, 2^a Ed. São Paulo: Pearson Makron Books, 1997.

PROZYN, disponível em www.prozyn.com.br. Acessado em 06/02/2011.

QUÍMICA REAL;
http://www.quimicareal.com.br/hp/paginanoticias2.php?area=Linha%20Industrial&cod_info=116&codigo=32&subarea=Elanco; acessado em 13/12/2010, às 20:50.

RODRIGUES, L. M.; DANTAS, R.; FINZER, J. R. D. Utilização de produto natural durante a fermentação alcoólica visando uma produção que se enquadre nos parâmetros de atividade sustentável. **Fazu em Revista, Uberaba.** n. 6, p. 53 – 82, 2009.

ROMEIRO, R. S. **Métodos em bacteriologia de plantas.** Viçosa: UFV, 2001. 279 p.

ROSALES, S. Y. R. Contaminantes bacterianos da fermentação etanólica: isolamento em meios diferenciais, identificação e avaliação de desinfectantes. Tese (Doutorado) Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Rio Claro, 200p., 1989.

SANTOS, F. A. P.; CARMO, C. A.; MARTINEZ, J. C.; PIRES, A. V.; BITTAR, C. M. M.; Desempenho de vacas em lactação recebendo dietas com diferentes teores de

amido total, acrescidas ou não de levedura (*Saccharomyces cerevisiae*). Revista Brasileira de Zootecnia, v. 35, n. 4, p. 1568-1575, 2006.

SCAPINELLO, C.; FURLAN, A. C.; OLIVEIRA, P. B. de; FARIA, H. G. de; PEDRO, M. R. S.; MACHADO, R. M.; Desempenho de coelhos em crescimento alimentados com levedura de recuperação (*Saccharomyces ssp*)seca pelo método spray-dry. Revista UNIMAR. p. 913 – 921, 1997.

SERRA, G. E.; CEREDA, M. P.; FERES, R. J. F.; BERTOZO, M. T.; VICENTE, A. L. Contaminação da fermentação alcoólica “flocação do fermento”. Brasil Açucareiro, vol. 93, p.26-31, 1979.

SGARBieri, V. C.; SANTUCCI, M. C. C.; ALVIM, I. D.; FARIA, E. V.; Efeito do enriquecimento de biscoitos do tipo água e sal, com extrato de levedura (*Saccharomyces sp.*). Ciência Tecnologia de Alimentos. p. 441 – 446, Set.-Dez., 2003.

SINGLETON, P.; SAINSBURY, D. Dictionary of Microbiology and Molecular Biology. 3^a Ed., p. 39, John Wiley & Sons Ltd., 2006.

SNYDER, H.E. Microbial sources of protein. **Advances in Food Research**, New York, v.18, p.85-91, 1970.

SKINNER, K. A.; LEATHERS, T. D. Bacterial contaminants of fuel ethanol production. **J Ind Microbiol Biotechnol**. vol. 31, p. 401 – 408, 2004.

STECKELBERG, C. Caracterização de leveduras de processos de fermentação alcoólica utilizando atributos de composição celular e características cinéticas. 2001. 215p. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas – SP.

TAUBE, J. S. Revista Canamix, Abril de 2009, p. 52.

THOMAS, K. C.; HYNES, S. H.; INGLEDEW, W. M.; Influence of Medium Buffering Capacity on Inhibition of *Saccharomyces cerevisiae* Growth by Acetic and Lactic Acids. **Applied and Environmental Microbiology**. vol. 68, no. 4, p. 1616 – 1623, 2002.

UNICA – União da Indústria de Cana-de-Açúcar. **Estatísticas**. Disponível em <<http://www.unica.com.br/dadosCotacao/estatistica/>>. Acesso em 01/novembro/2010.

VIEGAS, M. C. Otimização de Sistema de Fermentação Alcoólica Contínua Utilizando Reatores Tipo Torre e Leveduras com Características Floculantes. Tese

(Doutorado em Engenharia Química) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP. 135p. 2003.

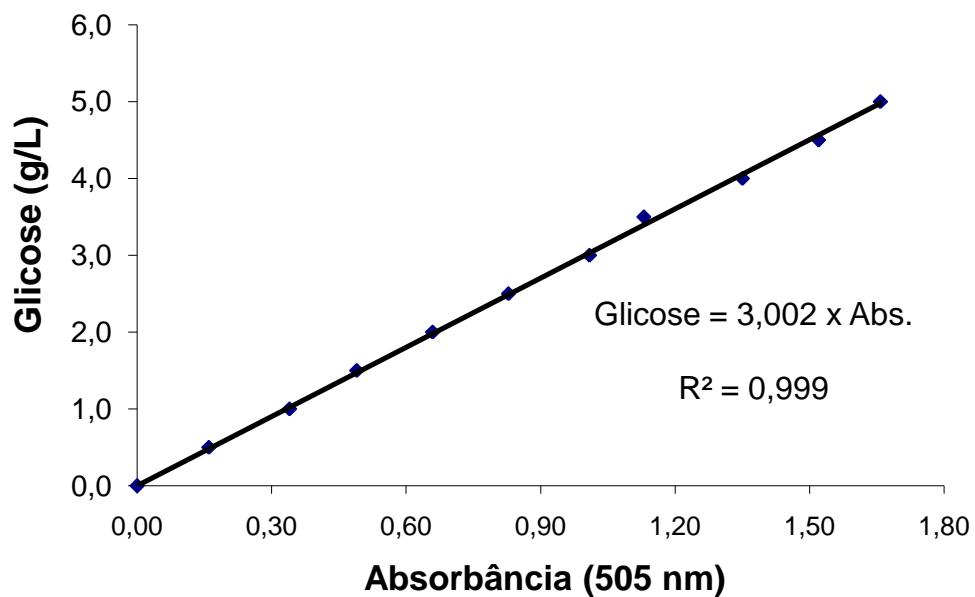
VILELA, E. S. D.; SGARBIERI, V. C.; ALVIM, I. D.; Determinação do valor protéico de células íntegras, autolisado total e extrato de levedura (*Saccharomyces sp.*). **Rev. Nutr., Campinas**. p. 185-192, Set.-Dez., 2000.

ZANOLI, P.; ZAVATTI, M. Pharmacognostic and pharmacological profile of *Humulus lupulus L.* **Journal of Ethnopharmacology**. vol. 116, p. 383 – 396, 2008.

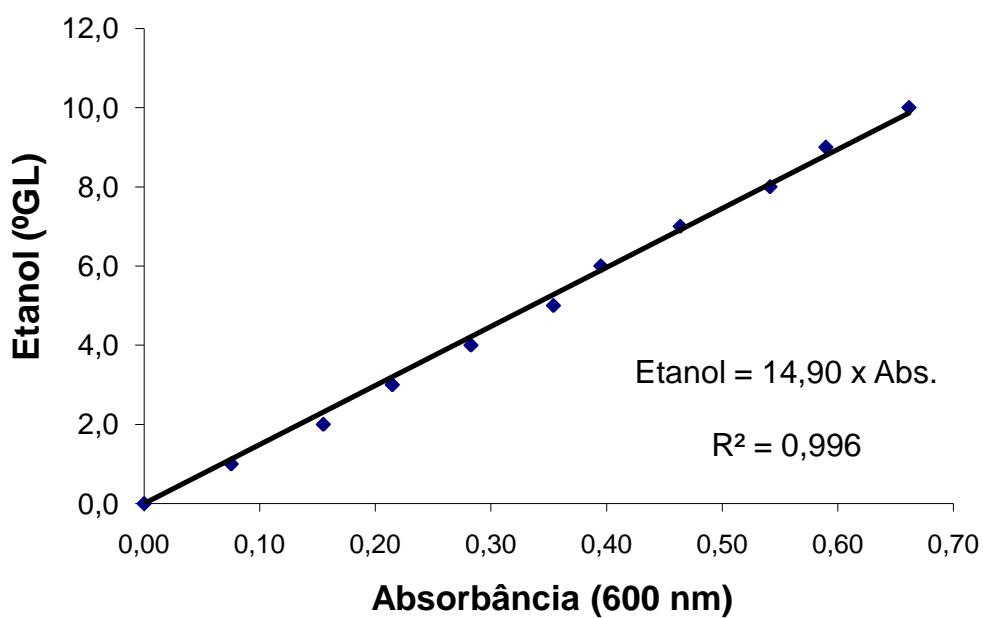
APÊNDICE A

CURVAS DE CALIBRAÇÃO

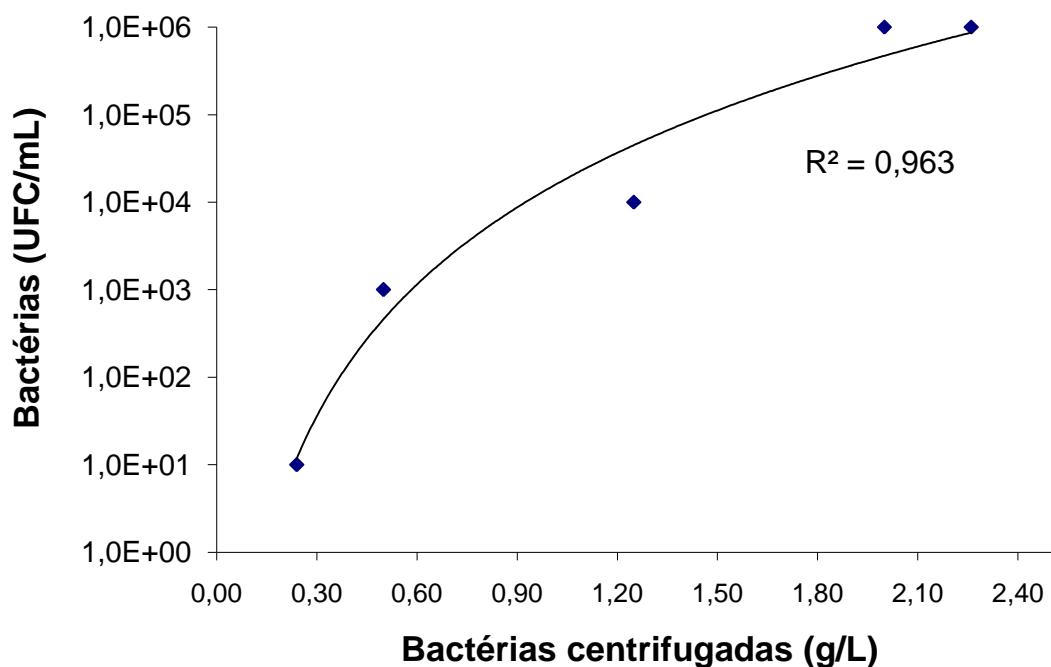
A.1 – Curva de calibração para concentração de glicose



A.2 – Curva de calibração para concentração de etanol



A.3 – Curva de calibração para contaminação



A.4 – Curva de calibração para células

