



## **PRODUÇÃO DE ETANOL A PARTIR DE SEMENTES DE MILHO: Reflexos sobre a viabilidade celular de leveduras**

Gustavo Henrique Gravatim Costa<sup>1</sup>

Luis Gustavo Cardoso Moraes<sup>2</sup>

Giovanni Uema Alcantara<sup>3</sup>

### **Energias Renováveis e possibilidades de aplicação**

#### *Resumo*

O etanol é uma das principais fontes de bioenergia para substituição da gasolina em veículos automotores leves. Sua produção pode ser derivada de diversas matérias-primas, dentre elas, o milho, que possui amido em sua constituição. No Brasil, diversas usinas têm processado, além dos grãos da planta, sementes residuais de plantio, que contêm diferentes agroquímicos como fungicidas. Neste contexto, o objetivo do trabalho foi avaliar os reflexos do processamento de sementes de milho sobre a viabilidade celular da levedura em fermentação. O experimento foi conduzido na UEMG Frutal e o delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com dois tratamentos e 6 repetições. Os tratamentos foram constituídos por grãos e sementes obtidos do híbrido Campeaar 20A12. Os grãos foram triturados e submetidos a processos de cozimento, hidrólise do amido, preparo do mosto e fermentação. Utilizou-se a levedura *Saccharomyces cerevisiae* Thermo-Resistent na concentração de 30g.L<sup>-1</sup>. No início e final do processo fermentativo, avaliou-se a viabilidade celular, índice de brotamentos e viabilidade de brotos. Os dados foram submetidos à análise de variância pelo teste F e as médias foram comparadas de acordo com teste de Tukey (5%). Observou-se que há um decréscimo significativo da viabilidade celular da levedura entre o início e final da fermentação. Conclui-se que o processamento de sementes de milho afeta a levedura em fermentação.

**Palavras-chave:** *Zea mays*; bioenergia; fermentação; biocombustíveis.

---

<sup>1</sup>Prof. Dr. Universidade do Estado de Minas Gerais – Unidade Frutal – Departamento de Ciências Agrárias e Biológicas, gustavo.costa@uemg.br.

<sup>2</sup>Graduando em Engenharia Agrônoma. Universidade do Estado de Minas Gerais – Unidade Frutal – Departamento de Ciências Agrárias e Biológicas, luis.1093281@discente.uemg.br.

<sup>3</sup>Mestrando em Ciências Ambientais. Universidade do Estado de Minas Gerais – Unidade Frutal – Departamento de Ciências Agrárias e Biológicas, gigioalcantara@hotmail.com.

## INTRODUÇÃO

Nos últimos anos o mundo vêm buscando alternativas para a descarbonização das atividades antrópicas sobre o meio ambiente, objetivando a mitigação do aquecimento global sobre o planeta. Essa temática é discutida desde os anos 80, entretanto, somente em 2015 que houve o Acordo de Paris com significativo número de países signatários.

Neste contexto, os combustíveis utilizados para mobilidade vêm sendo discutidos a fim de se obter alternativas ao uso da gasolina e do óleo diesel em motores “ciclo-otto” em veículo automotores leves. Entre estes, cabe destacar o etanol, biocombustível amplamente produzido em países como Estados Unidos e Brasil, o qual pode ser diretamente misturado à gasolina ou ainda utilizado para queima direta (FIESP, 2022).

As principais matérias-primas utilizadas para a produção do etanol são a cana-de-açúcar e o milho, gramíneas que apresentam elevada taxa fotossintética e potencial de acúmulo de biomassa e de carboidratos. A cana-de-açúcar é uma cultura semi-perene com ciclo anual de 12 meses e os fotossintetizados são estocados na forma de sacarose (SEGATO et al., 2007); enquanto o milho é uma planta de cultivo anual, com ciclo variando de 90 à 150 dias após o plantio, armazenando açúcares em forma de amido (PAES et al., 2021). A primeira é amplamente cultivada no Brasil, enquanto a segunda é a principal cultura dos Estados Unidos para a produção de etanol.

No Brasil, o milho vêm sendo introduzido em usinas produtoras de etanol desde 2015, seja em indústrias dedicadas ao processamento desta matéria-prima, ou ainda em unidades que processam cana-de-açúcar e milho ao longo do ano – “Usinas Flex” (ALCANTARA et al., 2020). A adoção desta cultura pelo país, objetiva complementar a oferta deste biocombustível, que possui demanda crescente internamente em decorrência do aumento da frota de veículos leves equipados com motores “flex-fuel”, que saltou de 27,3 milhões em 2010 para 37,9 milhões em 2021 (OBSERVATORIO DA CANA, 2022).

O processo de produção do etanol de milho consiste na trituração dos grãos até

Realização



Apoio



granulometria inferior à 2mm, seguido de cozimento à 100°C, objetivando extrair o amido dos tecidos desta matéria-prima. A seguir, é adicionada enzima  $\alpha$ -amilase para quebrar as ligações  $\alpha$ -1,4 do amido em maltooligosacarídeos, os quais são solúveis em água, apresentam baixa viscosidade (possibilitando ações de bombas de transferência de fluidos) e são fermentescíveis pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* (BOTHAST; SCHLICHER, 2004). A etapa de hidrólise dura aproximadamente de 30 a 60 minutos e ocorre à temperatura de 90°C. A pasta é resfriada até temperatura de 30-35°C, ajustada o pH para 4,0-4,5 e o Brix para valores entre 16-22%, originando o mosto. Adiciona-se enzima glucosidase que quebra ligações  $\alpha$ -1,6 e disponibiliza pentoses para a levedura (ALCANTARA et al., 2020).

Após inoculação da levedura com o mosto, o processo fermentativo transcorre por 24-36h até que todos os açúcares sejam consumidos pelo micro-organismo e produzido o etanol (LOZANO et al., 2019). Essa molécula é recuperada por destilação, sendo eliminado como resíduo, nesta etapa, sólidos de milho que estavam em suspensão, biomassa de leveduras, água, e outros compostos produzidos na fase fermentativa (XXX). Esse resíduo é denominado DDG, que é amplamente comercializado com a finalidade de formulação de rações animais (GOES; SILVA; SOUZA, 2013).

No Brasil, grande parte das unidades industriais localizam-se no centro-oeste, região em que há expressiva oferta por milho. Além disso, a demanda pelo biocombustível é significativa e o custo logístico, neste caso, torna-se competitivo, uma vez que grande parte desse produto é adquirido da região sudeste do país (OBSERVATORIO DA CANA, 2022).

Entretanto, deve-se destacar que algumas usinas processam além de grãos de milho recém colhidos e/ou armazenados em silos, sementes que sobraram de processos de plantio. Essas possuem tratamento fungico, além de outros agroquímicos, que são utilizados para melhorar a sanidade da semente e induzir a brotação. Essas biomoléculas podem influenciar a levedura em fermentação, reduzindo a quantidade de células vivas.

Assim, o objetivo do trabalho foi avaliar a viabilidade celular de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* quando inoculadas em mosto preparado com sementes de

Realização

Apoio

milho.

## METODOLOGIA

O experimento foi desenvolvido no Laboratório de Pesquisas Ambientais da Universidade do Estado de Minas Gerais – Unidade Frutal. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com dois tratamentos e 6 repetições. Os tratamentos foram constituídos por grãos e sementes obtidos do híbrido Campear 20A12. Após a obtenção, os grãos e sementes foram dispostos em estufa para igualar a umidade em 15%.

A seguir, as amostras foram trituradas em triturador forrageiro, seguido de peneiramento até granulometria inferior a 1,00 mm. Os grãos triturados foram imersos em água acidulada (pH 5,5) na proporção de 250 g.L<sup>-1</sup>. O material foi aquecido a 100 °C por 1 hora, formando uma pasta (fase I). Na sequência, a pasta foi resfriada a 80-90 °C (fase II). Em ambas as fases, foi dosada a enzima  $\alpha$ -amilase (LpHera® Novozymes) na proporção de 300 KNU.g<sup>-1</sup> de amido, afim de hidrolisar esse composto em moléculas de glicose. Na fase I, será dosado ainda 0,05 mL da quantidade de enzima necessária para evitar “gelatinização” do amido, e 0,1mL adicionado durante a fase II (NOGUEIRA et al., 2017).

As pastas foram resfriadas a temperatura ambiente, filtradas em peneira de 20 meshes e ajustadas a pH para 4,5 (ácido sulfúrico 10N) e temperatura na 30°C, originando o mosto.

Os mostos foram inoculados com a levedura industrial Thermo-Resistente (LNF) na concentração de 10% do volume a ser fermentado (400mL de mosto para 40g de levedura) com a adição de 0,2 mL da enzima glucoamilase (AML 300L Novozymes). As fermentações foram mantidas em B.O.D. (Biochemical oxygen demand) a 33°C.

Ao longo do processo fermentativo foi avaliado o desenvolvimento fisiológico da levedura, através de análises microscópicas propostas por CTC et al. (2005), sendo estas: viabilidade celular, brotamento e viabilidade de brotos.

Os resultados obtidos foram submetidos a análise de variância pelo teste F, e as

Realização

Apoio

médias comparadas segundo teste de Tukey (5%), utilizando-se o programa AGROESTAT® (BARBOSA; MALDONADO, 2015).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após caracterização das pastas e mostos, o próximo passo foi realizar o processo fermentativo dessas matérias-primas com a levedura ThermoResistente. Os resultados de viabilidade celular, índice de brotamentos e viabilidade de brotos, no início e final do processo fermentativo, estão disponibilizados nas tabelas 1 e 2, respectivamente.

**Tabela 1.** Valores médios obtidos para viabilidade celular, índice de brotamento e viabilidade de brotos no início do processo fermentativo de mostos com os tratamentos de grãos e sementes de milho hidrolisado

Tratamentos	Viabilidade celular (%)	Brotamento (%)	Viabilidade de broto (%)
Grãos	86,19 B	10,95 A	90,81 A
Sementes	90,34 A	9,49 A	87,61 A
Teste F	5,65*	0,38 <sup>ns</sup>	0,18 <sup>ns</sup>
DMS (5%)	30076	19,81	105620
CV	10,16	30,75	33,45

Letras diferentes diferem entre si segundo teste de Tukey (5%). \*significativo ao nível de 1% de probabilidade. ns – não significativo. DMS – Desvio Mínimo Significativo. CV – Coeficiente de Variação.

Observou-se que, para a viabilidade celular, a fermentação de sementes de milho promove, inicialmente, um ambiente favorável à manutenção da levedura. Entretanto, com o passar do tempo, a viabilidade decresce até níveis de 74%, enquanto o processamento de grãos, os valores tendem a se manter constantes durante todo o processo. Provavelmente, a presença de fungicida nas sementes, resulta um ambiente estressivo para o micro-organismo, fazendo com que o mesmo consuma açúcares para manter-se vivo como, por exemplo, para a multiplicação celular, evidenciado pelo índice de brotamentos. Neste contexto, deve-se destacar que a levedura pode iniciar um processo

Realização

Apoio

de produção de biomassa ao invés do produto de interesse principal – etanol. Outro fator que pode ter potencializado a interferência na viabilidade das leveduras são inibidores como aldeídos furfural e 5-hidroxi-metil-furfural (HMF) que podem ter se formado durante o processo de hidrólise, resultante da metabolização de ligações entre açúcares monoméricos e cadeias poliméricas (ECKERTA et al., 2017). Entretanto, estudos futuros podem validar essa afirmação. Não foram verificadas diferenças significativas para a viabilidade de brotos no início e final da fermentação.

**Tabela 2.** Valores médios obtidos para viabilidade celular, índice de brotamento e viabilidade de brotos no final do processo fermentativo de mostos com os tratamentos de grãos e sementes de milho hidrolisado

Tratamentos	Viabilidade	Brotamento (%)	Viabilidade de
	celular (%)		broto (%)
Grãos	83,28 A	7,11 B	76,02 A
Sementes	74,91 B	15,17 A	71,95 A
Teste F	18,90**	22,16**	0,71 <sup>ns</sup>
DMS (5%)	26611	0,0061	457,38
CV	12,38	0,64	19,74

Letras diferentes diferem entre si segundo teste de Tukey (5%). \*significativo ao nível de 1% de probabilidade. ns – não significativo. DMS – Desvio Mínimo Significativo. CV – Coeficiente de Variação.

Estes comportamentos são os mesmos apresentados por Alcantara et al. (2020), os quais verificaram índices iniciais satisfatórios para o desenvolvimento da levedura em mosto de milho, porém houve redução significativa da viabilidade celular ao final do processo, quando utilizou-se a levedura CAT-1.

## CONCLUSÕES

A utilização de sementes de milho tratadas com fungicida apresenta influência negativa sobre a levedura em fermentação.

Realização

Realização

Apoio

Apoio

## A GRADECIMENTOS

Gustavo Henrique Gravatim Costa agradece à UEMG pela Bolsa Produtividade (Chamada PQ/UEMG 01/2021). Luiz Gustavo Cardoso Moraes agradece ao PAPq/UEMG. Giovanni Uema Alcântara agradece à CAPES pela bolsa concedida.

## R REFERÊNCIAS

ALCANTARA, G. U.; NOGUEIRA, L. C.; STRINGACI, L. A.; MOYA, S. M.; COSTA, G. H. G. Brazilian “flex mills”: ethanol from sugarcane molasses and corn mash, **BioEnergy Research**, v.13, p. 229-236, 2020. <https://doi.org/10.1007/s12155-019-10052-3>

BARBOSA, J. C.; MALDONADO JUNIOR, W. **Experimentação Agronômica & AgroEstat: Sistema para Análises Estatísticas de Ensaios Agronômicos**. FUNEP: Jaboticabal, 2015.

BOTHAST, R. J.; SCHLICHER, M. A. Biotechnological processes for conversion of corn into ethanol. **Applied microbiology and biotechnology**. v.67, n.1, 2004.

CTC - Centro de Tecnologia Canavieira. **Manual de métodos de análises para açúcar**. Piracicaba, Centro de Tecnologia Canavieira, Laboratório de análises, 2005. Disponível em CD ROM.

ECKERTA, C.T.; FRIGOB, E.P.; ALBRECHTC, L.P.; ALBRECHTC, A.J.P.; CHRISTA, D.; SANTOS, W.G.; BERKEMBROCKC, E.; EGEWARTH, V.A. Maize ethanol production in Brazil: Characteristics and perspectives. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 82, p. 3907-3912, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2017.10.082>

FIESP. **Safra Mundial de Milho Safra 2022/2023**. 3º Levantamento USDA. Disponível em: <<https://www.fiesp.com.br/indices-pesquisas-e-publicacoes/safra-mundial-de-milho-2/>>. Acesso em: 01/07/2022.

GOES, R.H.T.B.; SILVA, L.H.X.; SOUZA, K.A. **Alimentos e Alimentação Animal**. 1ª ed. Dourados: UFGD, 2013.

LOZANO, E. V.; NOGUEIRA, L. C.; ALCANTARA, G. U.; COSTA, G. H. G. Híbridos de Milho afetam a quantidade de etanol produzida no Cerrado do Centro-Oeste paulista. **Fronteiras: Journal of Social, Technological and Environmental Science**, v. 9, n. 1, 2020.

NOGUEIRA, L. C.; ALCANTARA, G. U.; MOYA, S. M.; COSTA, G. H. G. "Extração dos açúcares do grão de milho de 1,18mm em diferentes tempos de cozimento", p. 1162-

Realização

Apoio



1166. In: **Anais do XII Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica** Blucher Chemical Engineering Proceedings, v. 1, n.4. São Paulo: Blucher, 2017.

OBSERVATORIO DA CANA. **Frota Brasileira de Automóveis e veículos comerciais Leves (Ciclo Otto)**. Disponível em: <<https://observatoriodacana.com.br/listagem.php?idMn=147>>. Acesso em: 01/07/2022.

PAES; M.C.D.; GUIMARÃES, P.E.O.; CARVALHO, C.W.P.; OLIVEIRA, A.C. **Perfil viscoamilográfico de amidos isolados de híbridos de milho**. 1ª ed. Sete Lagoas: Embrapa, 2021.

Realização



Apoio

