



INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DE SACAROSE NA FERMENTAÇÃO ALCÓOLICA DE MOSTOS COM ALTOS TEORES DE AÇÚCAR UTILIZANDO LEVEDURAS FLOCULANTES

P. C. SILVA¹, A. C.T. BRANDÃO¹, G. B. MENDONÇA¹, M. M. RESENDE¹ e E. J. RIBEIRO¹

¹ Universidade Federal de Uberlândia, Faculdade de Engenharia Química
E-mail para contato: paulo.eq@outlook.com

RESUMO – A concentração de açúcar é um dos fatores importantes durante a fermentação alcoólica, já que elevadas concentrações de substrato resultam em maior pressão osmótica dentro da célula e, por conseguinte, resultando no aumento de morte celular. O presente trabalho avaliou a influência da concentração inicial de açúcar no processo da fermentação alcoólica, visando à máxima produção de etanol em menor tempo a baixas temperaturas. A concentração celular utilizada foi de 28% v/v. Foram realizados ensaios em batelada a temperatura 20°C sob agitação de 120 rpm, utilizando meio a base de sacarose e extrato de levedura, sendo que as concentrações iniciais de açúcar estudadas foram de 260 e de 290 g.L⁻¹. As concentrações de açúcares e etanol foram determinadas por cromatografia líquida (CLAE) e a contagem de células foi em da câmara de Neubauer. O processo conduzido com concentração inicial de 260 g.L⁻¹ produziu em 18 horas 125,23 g/L de etanol e consumo total do açúcar enquanto que para a concentração de 290 g.L⁻¹ de açúcar a concentração de etanol foi de 125,63 g/L e com 22,95 g/L de açúcar residual. Os rendimentos calculados em 18 horas foram de 94,26 e 87,45% e as produtividades foram de 7,68 e 6,98 g.L⁻¹h⁻¹, respectivamente. A concentração inicial de substrato mostrou-se influente no tempo de fermentação e na concentração de etanol produzida.

1. INTRODUÇÃO

O Brasil lançou pela primeira vez políticas para usar mais biocombustíveis em 1975, depois que o embargo de oferta da OPEP elevou os preços de petróleo. Os chamados carros flex, que funcionam com etanol puro ou uma mistura de gasolina e etanol, agora compõem 80% da frota de veículos leves do Brasil (GLOBO, 2019). A indústria de etanol no país processa cerca de 670 toneladas de cana de açúcar para produzir 38,1 milhões de toneladas de açúcar, 27,7 milhões em m³ de etanol e 36.400 GWh de energia elétrica anualmente (EPE, 2018) e emprega aproximadamente 4,5 milhões de pessoas (ZEIDAN et al., 2015). Com resultado, esta indústria continua a apresentar desafios em relação à crescente preocupação como os impactos ambientais, principalmente os efeitos das mudanças climáticas e a redução da dependência de recursos de combustíveis fósseis.



Segundo Amorim (2005), diversos fatores afetam o rendimento da fermentação e eficiência da conversão do açúcar em etanol tais como os fatores físicos (temperatura, pressão osmótica), químicos (pH, oxigenação, nutrientes, inibidores) e microbiológicos (espécie, linhagem e concentração da levedura contaminação bacteriana).

Na produção de álcool, a concentração inicial de açúcar é um parâmetro importante, pois tem efeito direto na taxa de fermentação e nas células microbianas. Assim, a concentração adequada é de suma importância, pois se presentes em quantidades insuficientes ou exageradas, podem refletir de forma negativa sobre o processo fermentativo. O aumento da concentração de açúcares, conseqüentemente eleva a velocidade de fermentação, resultando em perdas da atividade de transporte de açúcar, produzindo menos álcool. O estresse induzido pelo aumento da osmolaridade ocasionado devido às perturbações no gradiente osmótico através da membrana plasmática leva a redução do crescimento e perda de viabilidade das células das leveduras (CAMILI, 2006).

Com base nesse contexto, o presente trabalho teve como objetivo investigar a influência da concentração inicial de açúcar no processo fermentativo empregando leveduras flocculantes em condições de altos teores de açúcar (VHG).

2. METODOLOGIA

2.1. Microrganismos

Utilizou-se a cepa C2/00 da levedura *Saccharomyces cerevisiae* de características flocculantes, cedida pelo Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA).

2.2. Meio Fermentativo

A composição do meio de fermentação consistiu-se de sacarose em concentrações de 260 e 290 g.L⁻¹, KH₂PO₄ (5g.L⁻¹), MgSO₄·7H₂O (1g.L⁻¹), (NH₄)₂SO₄ (2 g.L⁻¹) e extrato de levedura (6 g.L⁻¹), com pH inicial ajustado em 4,5. Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico, com exceção do açúcar, que foi substituído pelo açúcar cristal comercial.

2.3. Fermentação Alcoólica

Os experimentos foram realizados em erlenmeyers de 250 mL, contendo 100 mL do meio de cultivo estéril e concentração inicial de células de 28% v/v, o que correspondia a 10⁸ células/mL. As fermentações foram conduzidas em shaker sob agitação de 120 rpm e temperatura a 20°C, durante um período de 18 horas. As amostras foram retiradas em intervalos de tempo pré-definidos para serem analisados o teor de sacarose residual e etanol por cromatografia líquida e a concentração celular (início e fim da fermentação) obtida por contagem em câmara de Neubauer.

2.4. Métodos Analíticos



Concentração celular

A viabilidade celular foi acompanhada pela determinação de células vivas e totais por contagens em câmara de Neubauer espelhada e um microscópio óptico (Olympus) com aumento de 40X. Para a contagem das células, utilizou-se a técnica de coloração de azul de metileno (JONES, 1981).

Concentração de Açúcares e Álcool

As análises de açúcares (sacarose, glicose, frutose) e etanol dos experimentos foram feitas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). As amostras foram diluídas, filtradas e injetadas no sistema cromatográfico de marca Shimadzu, modelo LC-20A Prominence, coluna SUPELCOGEL Ca, na qual os componentes foram separados e detectados por refração (RID). A solução de arraste foi uma solução aquosa de H_3PO_4 (0,1%), o fluxo da bomba 0,5 mL/min, temperatura do forno 32°C e volume de injeção de 20 microlitros. Os valores obtidos nos cromatogramas foram calculados com o auxílio de curvas padrão.

2.5. Cálculo do parâmetro cinético

Rendimento

O rendimento em grama de etanol por grama de açúcar redutor total inicial (ARTi), foi determinado pela Equação 1:

$$Y_{ps} = \frac{C_{etanol}}{0,511 * C_{ARTi}} * 100\% \quad (1)$$

Em que: Y_{ps} = rendimento de etanol formado em relação aos açúcares totais consumidos (%); C_{etanol} = Concentração de etanol ao final da fermentação (g.L⁻¹); C_{ARTi} = concentração de açúcar redutor total inicial (g.L⁻¹).

Produtividade

O cálculo da produtividade em relação ao etanol produzido, foi calculada pela equação 2.

$$Pr = \frac{C_{etanol}}{t} \quad (2)$$

Sendo: Pr = produtividade de etanol (g/L); C_{etanol} = concentração de etanol (g/L) ao final da fermentação; t = tempo de fermentação (h).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para avaliar a influência da concentração do açúcar no processo fermentativo, avaliou-se a viabilidade celular, a produção de etanol, a produtividade e o rendimento para as concentrações iniciais de açúcar de 260 e 290 g/L sendo mostrado a seguir.

Na tabela 1, têm-se os resultados de Concentração de etanol, Rendimento, Produtividade e açúcar residual para os dois experimentos em 18 horas e 24 horas para o experimento com concentração inicial de açúcar de 290 g/L.

Tabela 1: Dados experimentais obtidos para as concentrações iniciais de substrato.

Ensaio	Temp. (°C)	ART (g/L)	Etanol (g/L)	Rendimento (%)	Açúcar Residual	Produtividade (g/Lh)
1	20	260	125,23	94,26	0	7,68
2	20	290	125,63	87,45	22,95	6,98
2*	20	290	135,21	91,95	0	5,63

* Resultados para 24 horas de fermentação.

De acordo a tabela 1, ao utilizar o meio com 260 g/L de substrato inicial, verifica-se que após as 18 horas de fermentação todo o açúcar foi consumido e obteve-se uma produção de etanol praticamente igual ao meio com 290 g/L de açúcar. O rendimento foi superior ao rendimento do meio com maior concentração de açúcar. No entanto, o experimento com concentração inicial de 290 g/L por apresentar uma concentração de substrato inicial superior, necessitou-se de um maior tempo de fermentação, para terminar o consumo do açúcar residual.

No trabalho de Guidini (2013) utilizando alimentação de 170 g/L de sacarose no processo batelada alimentada a 32°C, obteve-se uma produtividade de 6,01 g/L.h, um rendimento de 92,20% e 42,84 g/L de açúcar residual. Enquanto Santos (2014) utilizando a mesma cepa em processo contínuo e alimentação de 225 g/L de sacarose alcançou rendimento de 92,4%, produtividade de 17,37 g/L e 16,03 g/L de açúcar residual.

Na Tabela 2, é possível observar que os dois ensaios no início da fermentação apresentaram uma viabilidade satisfatória, ou seja, superior a 90%. Segundo Cruz (2016), quanto maior esse número melhor será o desempenho do processo, já que terá células suficientes para que a fermentação ocorra. Além disso, percebe-se que o meio com 290 g/L apresentou uma maior queda da viabilidade. Isso é devido ao fato de que fermentação em processo batelada com alto teor de açúcar inicial ocasiona alta pressão osmótica e forte inibição por etanol durante a fase de produção o que podem causar a redução da viabilidade celular da levedura, aumentando o tempo de fermentação (Souza, 2009).

Tabela 2 – Viabilidade celular dos experimentos 1 e 2.

Ensaio	Viabilidade inicial (%)	Viabilidade final (%)
1	92,09	95,94
2	94,14	93,5



4. CONCLUSÃO

A concentração inicial de substrato mostrou-se influente no tempo do processo de fermentação e consequentemente na produtividade. A concentração de etanol foi maior para o processo com maior concentração inicial de açúcar. O rendimento final após o consumo total de açúcar apresentou pouca variação com relação às duas concentrações iniciais de açúcar estudado. A viabilidade celular também foi influenciada pela concentração de açúcar inicial, já que o meio 290 g/L apresentou menor viabilidade no fim da fermentação.

5. AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Uberlândia e à Faculdade de Engenharia Química pela oportunidade em realizar este trabalho, à FAPEMIG, CAPES e CNPq pelo apoio financeiro.

6. REFERÊNCIAS

- AMORIM, H. V. de (Org.), LEÃO, R. M. (Org.). *Fermentação Alcoólica: Ciência e Tecnologia*. Piracicaba: Fermentec Publicações Editora e Comércio de Livros LTDA., 1ª ed. 2005. v. 3000. 448p.
- CAMILI, E. A; CABELLO, C.; CARDOSO, M. G. *Produção de etanol de tratada com processo de flotação*. 2.ed. Lavras: UFLA, 2006.
- CRUZ, M. L. *Jornal de Engenharia, Tecnologia e Meio Ambiente*. Uberaba: Facthus, 2016.1 v.
- EPE. *Balanco Energético Nacional 2018: Ano base 2017 / Empresa de Pesquisa Energética*. – Rio de Janeiro: EPE, 2018.
- GUIDINI, C. Z. *Fermentação alcoólica em batelada alimentada empregando Saccharomyces cerevisiae de características floculantes*. 2013. 127 f. Tese (Doutorado) - Curso de Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2013.
- GLOBO. *Com apostas em etanol, usinas do Brasil ampliam investimentos em produção*. Economia. Disponível em <https://g1.globo.com/economia/agronegocios> Acesso: Abr. 2019.
- LI, F.; ZHAO, X. Q.; GE, X. M.; BAI, F. W. *Na innovative consecutive batch fermentation process for very-high-gravity ethanol fermentation with self-flocculating yeast*. Applied Microbiology and Biotechnology, v. 84, p. 1079-1086, 2009.
- SANTOS, L D. *Fermentação alcoólica empregando leveduras floculantes em sistema de reatores torre*. 2014. 148 f. Tese (Doutorado) - Curso de Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2014.



SOUZA, C. S. *Avaliação da produção de etanol em temperaturas elevadas por uma linhagem de S. Cerevisiae*. 48 p. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia (USP), Instituto Butantan (IPT), São Paulo, SP. Brasil, 2009.

ZEIDAN, R.; BOECHAT, C.; FLEURY, A. *Developing a sustainability credit score system*. J. Bus. Ethics. 2015, p.283-296.