

PRODUÇÃO DE ETANOL POR *Saccharomyces cerevisiae* EM BATELADA UTILIZANDO PROCESSO EXTRATIVO COM DIÓXIDO DE CARBONO

J. L. S. SONEGO¹, G. Y. RODRIGUEZ¹, A. J. G. CRUZ¹ e A. C. BADINO¹

¹Universidade Federal de São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química

E-mail para contato: silveirasonego@gmail.com

Resumo – No presente trabalho foi avaliada a produção de etanol por fermentação extrativa em batelada empregando CO₂ como gás de arraste. Na primeira etapa foram analisadas as influências da vazão específica de CO₂ e da temperatura no esgotamento do etanol, utilizando como critério de desempenho o fator de arraste (F_A), sendo que os resultados mostraram que a vazão específica do gás foi a variável que apresentou uma maior influência no arraste. Numa segunda etapa foi realizada uma fermentação convencional em batelada (sem arraste) em duplicata para a modelagem do processo e obtenção dos parâmetros cinéticos e, na sequência, foram realizadas simulações das fermentações extrativas iniciando a etapa de extração em 3 e 4 h de cultivo. O emprego da extração de etanol por arraste com CO₂ gerou aumentos de produtividade em etanol (em g/L-h) de 25% e 21,4%, respectivamente, para os arrastes com início em 3 e 4 h de processo, demonstrando a superioridade da fermentação extrativa com CO₂ em relação ao processo convencional.

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, o impacto ambiental associado ao excessivo uso de produtos derivados do petróleo, em especial os combustíveis, tem levado a uma busca crescente por bioenergia. Neste cenário, o etanol por ser renovável e ambientalmente correto, apresenta-se como uma das melhores alternativas como fonte de energia (BAI *et al.*, 2008).

A produção de etanol por via fermentativa é o processo mais utilizado e aplicado pela indústria. Consiste em uma série de reações químicas catalisadas por um microrganismo, sendo geralmente empregada a levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Este microrganismo é utilizado, principalmente, devido à sua maior produtividade, adaptação ao meio e robustez.

O etanol é um dos principais componentes tóxicos para a fermentação alcoólica, agindo como inibidor de sua própria biossíntese. Como resultado desse efeito, tem-se uma queda proporcional nas velocidades de crescimento celular e de produção de etanol, conforme a concentração desse inibidor aumenta no caldo de fermentação (MAIORELLA *et al.*, 1983).

Em decorrência do efeito inibidor, quando a concentração de etanol no caldo atinge valores da ordem de 10 a 12 % v/v, a produtividade do processo é fortemente afetada, resultando em fermentações longas e incompletas.

Uma alternativa para contornar o efeito da inibição causada pelo etanol e assim obter uma alta produtividade no processo fermentativo é a utilização de técnicas de extração do etanol do meio fermentativo à medida que ele é produzido (SCHÜGERL, 2000).

Para realizar a extração do etanol combinada com a fermentação pode ser aplicada a operação de esgotamento (*stripping*) empregando um gás de arraste. Essa técnica corresponde a um processo em que compostos voláteis presentes em uma solução são transferidos para uma fase gasosa, por meio do contato direto da solução com uma corrente gasosa insolúvel. A mesma se apresenta como uma ferramenta promissora para minimizar os efeitos da inibição causada pelo produto, possibilitando um aumento na produtividade do processo fermentativo empregando-se o mesmo volume de trabalho.

Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a produção de etanol de primeira geração (1G) por fermentação extrativa empregando CO₂ como gás de arraste.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Estudo do Arraste de Etanol – Influência da Vazão Específica de Alimentação de CO₂ e da Temperatura de Operação

Numa primeira etapa, com a finalidade de avaliar quais variáveis apresentam maior influência no processo de esgotamento com dióxido de carbono, foi realizado um estudo do arraste de etanol a partir de uma solução hidroalcoólica, variando a vazão específica de alimentação de CO₂ (ϕ) e a temperatura da solução (T).

Equipamento: Os experimentos para estudo do arraste foram conduzidos em reator pneumático tipo coluna de bolhas encamisado com volume útil de 5 L (BADINO *et al.*, 2007). Foi utilizada uma solução hidroalcoólica com concentração de etanol de 10 °GL e o gás de arraste foi dióxido de carbono industrial armazenado em torpedo. Para controlar a vazão de gás foi empregado um fluxômetro de massa AALBORG, modelo GFC 37. A temperatura do reator foi mantida utilizando banho termostatizado. Durante a realização dos experimentos foi usado um termômetro digital marca Hanna Instruments, modelo HI 147-00 para monitorar a temperatura da solução. Foram retiradas amostras a cada 1 hora durante 6 horas de esgotamento.

Planejamento experimental: Para o estudo das variáveis mais importantes no processo de arraste (*stripping*) foi realizado um Delineamento Composto Central Rotacional com dois níveis, utilizando o software *Statistica 7.0*, tendo 2² pontos fatoriais 2 x 2 pontos axiais e 3 repetições no ponto central, totalizando 11 experimentos (RODRIGUES E IEMMA, 2009).

Na Tabela 1 são mostrados os valores utilizados no planejamento experimental para as duas variáveis independentes analisadas.

Como variável resposta foi calculado o Fator de Arraste (F_A), definido pela Equação 1.

$$F_A(\%) = \frac{C_{E0} \cdot V_0 - C_{EF} \cdot V_F}{C_{E0} \cdot V_0} \cdot 100 \quad (1)$$

onde C_{E0} é a concentração inicial de etanol (g.L^{-1}), C_{EF} é a concentração final de etanol (g.L^{-1}), V_0 é o volume inicial da solução (L) e V_F é o volume final da solução (L).

Tabela 1 - Valores reais e codificados das duas variáveis independentes

Variável	Código	Nível				
		- 1,41	- 1	0	+ 1	+ 1,41
ϕ (vvm)	X1	0,38	1,00	2,50	4,00	4,62
T ($^{\circ}\text{C}$)	X2	29,20	30,00	32,00	34,00	34,82

2.2. Avaliação das Fermentações Alcoólicas Convencional e Extrativa

Com o objetivo de realizar a modelagem cinética do processo de fermentação alcoólica para subsequente simulação da fermentação extrativa foi realizado inicialmente um ensaio fermentativo em duplicata.

Micro-organismo e Meio de cultura: *Saccharomyces cerevisiae* (marca Fleischmann) na forma liofilizada com concentração inicial de 15 g.L^{-1} foi utilizada neste estudo.

A composição do meio de cultura consistiu de (g.L^{-1}): sacarose (açúcar cristal) (180), KH_2PO_4 (5,6), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (1,4), extrato de levedura (6,8) e ureia (5,32). O pH inicial do caldo de fermentação foi ajustado para 4,6 com adição de ácido clorídrico (1 M).

Procedimento experimental: O reator empregado nas fermentações convencional e extrativa foi o mesmo empregado nos experimentos de arraste, porém esse reator foi adaptado com um sistema de agitação mecânica com o objetivo de garantir a agitação nas horas iniciais do processo, onde ainda não estava sendo alimentado o gás de arraste.

A levedura foi inoculada na forma seca, sendo nesse momento a agitação aumentada para 800 rpm a fim de facilitar a completa dissolução dos flocos de levedura e promover sua mistura no meio. Também, no momento inicial do cultivo foi feito o uso de antiespumante para impedir formação excessiva de espuma. Foi adotado um tempo de aclimação da levedura de 15 min, antes de ser retirada a primeira amostra. Após o início do processo fermentativo, a agitação foi mantida em 250 rpm até o final da batelada. A temperatura foi mantida em 34°C fazendo circular água proveniente de um banho termostatzado pela camisa do biorreator. O pH foi acompanhado durante o processo utilizando pH-metro da marca Qualxtro, modelo QX1500. Amostras de 30 mL foram retiradas a cada 1 h.

Determinações analíticas: A concentração celular foi determinada por análise termogravimétrica da biomassa seca após centrifugação da amostra a 10.000 rpm por 10 min a 4°C e lavagem do precipitado 2 vezes com água destilada. A secagem do precipitado foi feita em estufa à 80°C por 24 h. Após este período, realizou-se a pesagem do sedimento seco.

As concentrações de sacarose, glicose e frutose e etanol foram determinadas empregando HPLC (Waters), equipado com detector de índice de refração. Foi utilizada coluna Sugar-Pak I (300 x 6,5 mm, 10 μm , Waters) operada a 80°C . Água ultrapura foi usada

como eluente a uma vazão de $0,5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$. Os padrões foram soluções de sacarose, glicose, frutose e etanol com concentrações de $0,1$ a $8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$.

Modelagem matemática do processo: Para um processo fermentativo operando em batelada e admitindo que a geração do produto seja associada ao crescimento celular, as equações de balanço de massa para células (C_x), substrato (C_s) e produto (C_p) resultam em um sistema de equações diferenciais ordinárias conforme mostrado nas Equações de 2 a 4:

$$\frac{dC_x}{dt} = \mu \cdot C_x \quad (2)$$

$$\frac{dC_s}{dt} = -\frac{1}{Y_{X/S}} \cdot \mu \cdot C_x \quad (3)$$

$$\frac{dC_p}{dt} = \frac{Y_{P/S}}{Y_{X/S}} \cdot \mu \cdot C_x \quad (4)$$

onde C_x é a concentração celular ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$), μ é a velocidade específica de crescimento celular (h^{-1}), C_s é a concentração de substrato limitante ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$), no caso a soma das concentrações de glicose e frutose, C_p é a concentração de etanol ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$), $Y_{X/S}$ é o coeficiente de rendimento de substrato a células ($\text{g}_X \cdot \text{g}_S^{-1}$) e $Y_{P/S}$ é o coeficiente de rendimento de substrato a etanol ($\text{g}_P \cdot \text{g}_S^{-1}$).

Como modelo de crescimento foi utilizado o modelo cinético de Andrews-Levenspiel, considerando as inibições de substrato e produto dado pela Equação 5.

$$\mu = \mu_{\max} \cdot \frac{C_s}{\left(K_S + C_s + \frac{C_s^2}{K_{IS}}\right)} \cdot \left(1 - \frac{C_p}{C_{P_{\max}}}\right)^n \quad (5)$$

onde μ_{\max} é a velocidade específica máxima de crescimento celular (h^{-1}), K_S é a constante de saturação ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$), K_{IS} é a constante de inibição pelo substrato ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$), $C_{P_{\max}}$ é a concentração máxima de etanol a partir da qual cessa o crescimento celular e n é uma constante adimensional.

Os coeficientes de rendimento de substrato a células e a produto (etanol), $Y_{X/S}$ e $Y_{P/S}$, são obtidos pelas Equações 6 e 7.

$$Y_{X/S} = \frac{C_x - C_{x_0}}{C_{s_0} - C_s} \quad (6)$$

$$Y_{P/S} = \frac{C_p - C_{p_0}}{C_{s_0} - C_s} \quad (7)$$

Ajuste do modelo cinético: Para ajuste do modelo aos dados experimentais e estimativa dos parâmetros cinéticos utilizou-se um rotina implementada no software Scilab versão 5.4.1, baseando-se no algoritmo Nelder & Mead de otimização que fornece um valor mínimo para o resíduo, neste caso definido pela função objetivo apresentada pela Equação (8) (BONOMI e SCHMIDELL, 2001).

$$R = \sum (y_{\text{exp}} - y_{\text{calc}})^2 \quad (8)$$

Modelagem da Fermentação Alcoólica com Arraste de Etanol por CO₂ (Stripping): Com base nos balanços de massa para a fermentação extrativa, considerando uma vazão de arraste de etanol no biorreator (\dot{m}_p), obtém-se o modelo matemático da fermentação extrativa em batelada, representado pelas Equações 9 a 11.

$$\frac{dCx}{dt} = \mu \cdot Cx - Cx \cdot \frac{1}{V} \cdot \frac{dV}{dt} \quad (9)$$

$$\frac{dCs}{dt} = -\frac{1}{Y_{X/S}} \cdot \mu \cdot Cx - Cs \cdot \frac{1}{V} \cdot \frac{dV}{dt} \quad (10)$$

$$\frac{dCp}{dt} = \frac{Y_{P/S}}{Y_{X/S}} \cdot \mu \cdot Cx - Cp \cdot \frac{1}{V} \cdot \frac{dV}{dt} - \frac{\dot{m}_p}{V} \quad (11)$$

$$\frac{dV}{dt} = \frac{\dot{m}_p + \dot{m}_A}{\rho_A} \quad (12)$$

onde V é o volume líquido de caldo (L), \dot{m}_p é a vazão mássica de etanol arrastado pela corrente de CO₂ (g.h⁻¹), \dot{m}_A é a vazão mássica de água arrastado pela corrente de CO₂ (g.h⁻¹) e ρ_A é a massa específica da água (g.L⁻¹).

A variação no volume do reator durante a fermentação está representada pela Equação 12, considerando a massa específica da solução como sendo igual à da água.

Durante o processo fermentativo ocorre formação de CO₂, logo deve-se considerar esta parcela de gás na modelagem. Com base na estequiometria da fermentação alcoólica e fazendo a conversão para unidades de vazão volumétrica, obtém-se a vazão de CO₂ gerado naturalmente no processo (ϕ_{CO_2} em L.min⁻¹), dada pela Equação 13.

$$\phi_{CO_2} = \frac{24,86}{46 \cdot 60} \cdot \frac{Y_{P/S}}{Y_{X/S}} \cdot \mu \cdot Cx \cdot V \quad (13)$$

A integração do sistema de equações diferenciais formado pelas Equações 9, 10, 11 e 12 foi com o algoritmo de Runge-Kutta implementado no software Scilab versão 5.4.1.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Estudo do arraste de etanol – Influência da vazão e da temperatura de operação

Com os resultados obtidos foi possível verificar as influências da vazão do gás e da temperatura no arraste de etanol (*stripping*). As contribuições dessas variáveis foram analisadas em função do fator de arraste (F_A), conforme mostrado na Tabela 2.

Com base nos resultados obtidos de fator de arraste (F_A), pode-se observar que a vazão de gás (ϕ) apresenta uma maior influência no arraste na faixa experimental avaliada (ϕ e T).

A partir dessas informações foram definidos valores de vazão (ϕ) e temperatura (T) a serem empregados nas simulações da fermentação extrativa com arraste de etanol por CO₂,

como 4,0 vvm e 34 °C, respectivamente. Foi adotada a vazão de 4,00 vvm em razão de problemas de instabilidade do fluxômetro de massa na maior vazão, devido provavelmente ao congelamento de CO₂ na válvula de expansão.

Tabela 2 - Matriz do planejamento experimental com os valores de Fator de Arraste (FA)

Ensaio	X ₁	X ₂	φ (vvm)	T (°C)	FA (%)
1	-1,00	-1,00	1,00	30,00	12,5
2	-1,00	1,00	1,00	34,00	8,8
3	1,00	-1,00	4,00	30,00	25,7
4	1,00	1,00	4,00	34,00	21,3
5	-1,41	0,00	0,38	32,00	5,9
6	1,41	0,00	4,62	32,00	30,5
7	0,00	-1,41	2,50	29,20	15,3
8	0,00	1,41	2,50	34,82	20,3
9	0,00	0,00	2,50	32,00	21,1
10	0,00	0,00	2,50	32,00	20,1
11	0,00	0,00	2,50	32,00	17,9

Com os valores das massas de etanol e água arrastados nos experimentos do planejamento, foi possível obter equações de previsão das vazões de arraste de etanol (\dot{m}_p) e água (\dot{m}_A) do sistema, por meio do ajuste de funções aos dados experimentais, utilizando o software LAB Fit. Essas equações escritas em função da temperatura do sistema (T), da concentração de etanol (C_{Et}) e da vazão específica de CO₂ (φ) são apresentadas na sequência:

$$\dot{m}_p = 0,049 \cdot \phi^{0,741} \cdot T^{1,191} \cdot C_{Et}^{0,15} \quad (14)$$

$$\dot{m}_A = 0,513 \cdot \phi^{0,595} \cdot T^{0,824} \quad (15)$$

3.2. Fermentação alcoólica – Modelagem matemática e estimativa de parâmetros

Os parâmetros Y_{X/S} e Y_{P/S} foram calculados a partir das equações (6) e (7) e os demais foram determinados por ajuste do modelo aos pontos experimentais. Os valores obtidos para os parâmetros foram: Y_{X/S}=0,046 g_x/g_s, Y_{P/S}=0,46 g_p/g_s, μ_{max}=0,50 h⁻¹, K_S= 24,6 g.L⁻¹, K_{iS}=30,4 g.L⁻¹ Cp_{max}=85,0 g.L⁻¹ e n=0,89. A Figura 1 ilustra o excelente ajuste do modelo aos valores experimentais de concentrações de substrato, células e etanol.

Com modelo de inibição mista proposto (Andrews–Levenspiel) foi possível estimar os parâmetros cinéticos da fermentação alcoólica pela levedura e observar que o modelo, descreveu adequadamente o comportamento dinâmico do processo fermentativo convencional.

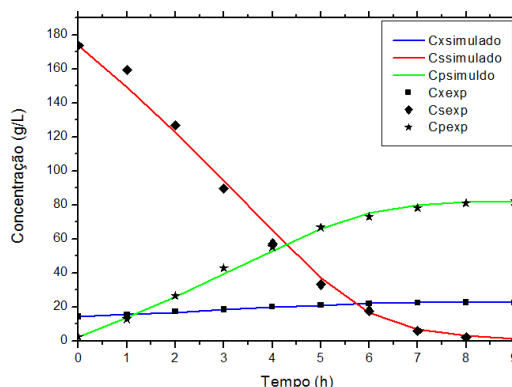


Figura 1 - Variação das concentrações de biomassa, substrato e etanol ao longo da fermentação convencional em batelada.

3.2. Simulação da fermentação extrativa com arraste de etanol por CO_2

Com as equações do modelo da fermentação com arraste e fazendo uso das equações de previsão das vazões de arraste de etanol e água (Equações 14 e 15) mais os parâmetros cinéticos estimados foram realizadas simulações para avaliar o efeito da extração na dinâmica do bioprocessamento com arraste de etanol por CO_2 . No caso da fermentação extrativa, considerou-se o início do arraste na 3ª e 4ª horas do processo. A Figuras 2 ilustra a simulação do processo fermentativo com arraste (simulado) e sem arraste (experimental).

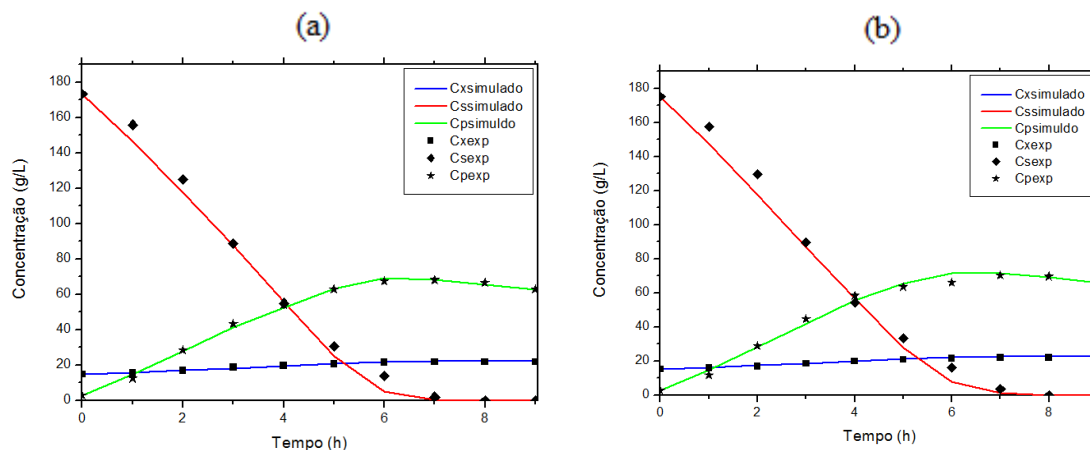


Figura 2 - Valores experimentais e simulados para (Cx), (Cs) e (Cp) com arraste iniciando na 3ª h (a) e 4ª h (b) de cultivo.

Analisando as Figuras 2 e 3, pode-se observar que o modelo proposto para descrever a fermentação extrativa mostrou-se adequado prevendo o comportamento do processo ao longo do tempo. Pode-se verificar o efeito positivo da remoção do etanol ao longo da fermentação por meio do aumento da velocidade de consumo do substrato, o qual chega a concentrações próximas a zero em torno de sete h de fermentação, quando o arraste foi iniciado a partir da 3ª h de cultivo. Para o arraste com início a partir da 4ª h, o substrato terminou em torno de 7,5 h

de cultivo. O uso da fermentação extrativa possibilitou ganhos em produtividade de 25% (3^a h) e 21,4% (4^a h) para a fermentação extrativa em batelada em relação à convencional sem extração, pois foi possível o consumo de todo substrato em menores intervalos de tempo em comparação com a fermentação convencional (Figura - 1), a qual terminou com 9 h de cultivo.

4. CONCLUSÃO

A vazão de gás apresentou uma forte influência no arraste de etanol durante a operação de *stripping* nas faixas de temperatura e vazão avaliadas. O modelo híbrido de inibição por substrato e produto (Andrews-Levenspiel) apresentou um bom ajuste aos dados experimentais, podendo ser adotado para simulação das variáveis de interesse em outras condições de cultivo. O modelo proposto para fermentação extrativa mostrou-se eficaz para previsão do comportamento do processo ao longo do tempo. A fermentação extrativa com CO₂ apresentou-se como uma boa alternativa para diminuir o efeito inibidor do etanol sobre a levedura, tornando o processo mais produtivo.

5. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a CAPES e à FAPESP (PITE Proc. 2012/50046-4) pelo auxílio financeiro.

6. REFERÊNCIAS

- BADINO, A.C.; CERRI, M.O.; HOKKA, C.O. *Sistema reacional pneumático e uso do mesmo*. Patente licenciada (PI0701608-5), 2007.
- BAI, F. W.; ANDERSON, W. A.; MOO-YOUNG, M. Ethanol fermentation Technologies from sugar and starch feedstocks. *Biotechnology Advances* v. 26, p. 89-105, 2008.
- BONOMI, A. e SCHMIDELL, W. Modelagem matemática e simulação de processos fermentativos. In. BORZANI, W. *Biotecnologia Industrial*. Vol. 2. Editora Edgard Blucher. São Paulo, 2001. p.123-178.
- CHRISTEN, P.; MINER, M.; RENON, H. Ethanol extraction by supported liquid membrane during fermentation. *Biotechnology and bioengineering*, v. 36, p. 116-123, 1990.
- MAIORELLA, B.; BLANCH, H. W.; WILKE, C. R. By-product inhibition effects on ethanolic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 25, n. 1, p. 103-121, 1983.
- RODRIGUES, M.I., IEMMA, A.F. (2005) *Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos: Uma estratégia Sequencial de planejamentos*. Casa do Pão Editora, 2005.
- SCHÜGERL, K. Integrated processing of biotechnology products. *Biotechnology Advances*, 18, 581-599, 2000.