

OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA PARA PRODUÇÃO DE ETANOL HIDRATADO

G. BONASSA¹, L.T. SCHNEIDER¹, C.J. OLIVEIRA¹, J. T. TELEKEN², J. DIETER¹, P. A. CREMONEZ³, J.G. TELEKEN¹.

¹ Universidade Federal do Paraná, Setor Palotina

² Universidade Federal de Santa Catarina, Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos

³ Universidade Estadual do Oeste do Paraná
E-mail para contato: gabrielabonassa@gmail.com

RESUMO – A fermentação alcoólica consiste na transformação dos açúcares em álcool por meio de microrganismos, em anaerobiose. Fatores químicos, físicos e microbiológicos influenciam no rendimento da fermentação alcoólica e na eficiência dos microrganismos em consumirem os açúcares e excretarem etanol. Com base nisto o objetivo do presente trabalho foi avaliar a influência de diferentes variáveis que afetam o processo de fermentação alcoólica, visando a otimização do processo produtivo de etanol, buscando-se a máxima concentração de microrganismos ao final do processo, em menor tempo. Com a finalidade de otimizar o número de experimentos, analisaram-se três variáveis independentes: temperatura, pH e Brix e qual a influência destas sobre a fermentação alcoólica, nos diferentes experimentos realizados, avaliando o tempo de fermentação alcoólica e concentrações finais de microrganismos, substrato e produto. O processo conduzido em 32 °C, pH 3 e concentração de açúcares iniciais de 120 g.L⁻¹, foi o que apresentou maior concentração de microrganismos e em menor tempo, 4,07 g.L⁻¹ em 30,5 horas, e concentração final de etanol de 36,25 g.L⁻¹.

1. INTRODUÇÃO

A gradativa preocupação mundial com a escassez das reservas de petróleo e com o meio ambiente vem causando pressões sobre o uso dos combustíveis fósseis, responsáveis por emissão de gases poluentes na atmosfera. Por estes motivos, a busca por alternativas de substituição de fontes fósseis por renováveis, vem crescendo. O etanol é um combustível renovável, produzido a partir de matérias-primas açucaradas, como a cana-de-açúcar. No Brasil é a segunda maior fonte de energia renovável, correspondendo a 12,6% da participação na matriz energética (Santos; Santos, 2009).

A obtenção do etanol pode ser realizada por via degradativa, sintética e fermentativa. No Brasil a via de obtenção mais utilizada é a fermentativa por questões econômicas, domínio de tecnologia e disponibilidade de biomassa (Vieira *et al.*, 2009).

A fermentação alcoólica embasa-se na ação das leveduras sobre a biotransformação de açúcares em álcool e CO₂ (Lima, Marcondes, 2002). É necessária a compreensão de algumas condições durante a fermentação alcoólica, pois fatores físicos (temperatura, pressão osmótica), químicos (pH, oxigenação, nutrientes minerais e orgânicos, inibidores) e microbiológicos (espécie, linhagem e concentração da levedura, contaminação bacteriana) influenciam no rendimento da fermentação alcoólica e eficiência da conversão de açúcares em etanol (Lima *et al.*, 2001).

Com base em determinadas variáveis que afetam a fermentação alcoólica, o objetivo do presente trabalho foi à otimização da fermentação alcoólica, tomando como índices de desempenho o tempo necessário para o processo e a concentração final de substrato, microrganismos e etanol, empregando inicialmente diferentes condições de temperatura, pH e concentração de açúcares, buscando-se ao final dos processos, a máxima concentração de microrganismos em menor tempo.

2. METODOLOGIA

Os procedimentos executados até o início da fermentação alcoólica podem ser observados na Figura 1.



Figura 1 - Fluxograma do Processo Fermentativo.

Com o caldo de cana extraído, filtrado e clarificado, fizeram-se as correções de pH, temperatura e Brix, diferenciadas em cada ensaio, conforme o planejamento experimental presente na Tabela 1.

Tabela 1 - Condições experimentais dos diferentes ensaios fermentativos.

Experimento	Temperatura (°C)	pH	S (g.L ⁻¹)
1	28	5	120
2	36	5	120
3	32	3	120
4	32	7	120
5	32	5	80
6	32	5	160

2.1. Variáveis de entrada: Concentração de Sólidos Solúveis, pH e temperatura

Com auxílio de um refratômetro, mediu-se a quantidade inicial de sólidos solúveis e por meio de diluição com água destilada, foi adaptado o mosto para os valores da Tabela 1, através do cálculo de diluição (Equação 1):

$$C_1.V_1 = C_2.V_2 \quad (1)$$

Onde: C_1 : concentração inicial de sólidos solúveis; C_2 : concentração desejada; V_1 : volume inicial de caldo; V_2 : volume desejado.

O ajuste de pH foi realizado após a diluição do caldo, com NaOH 0,1 mol.L⁻¹, para basidificação e com H₂SO₄ 0,1 mol.L⁻¹, para acidificação, adaptando este valor nos diferentes experimentos em pH 3; 5 e 7, conforme a Tabela 1.

O controle de temperatura foi realizado no banho-maria, local onde os experimentos foram conduzidos, sendo que fez-se a inspeção em 28; 32 e 36 °C (±1).

2.2. Condução do processo e análises

Com o mosto nas condições experimentais ajustadas, de acordo com as variáveis de cada ensaio, adicionaram-se em erlenmeyers 100 mL deste, encaminhando-os ao banho-maria. Ao mosto aquecido, adicionou-se 1 g.L⁻¹ de microrganismos (*Saccharomyces cerevisiae*) e então o processo fermentativo de oxidação dos açúcares iniciou.

Realizou-se o acompanhamento do consumo de açúcares, produção de etanol e concentração de microrganismos, durante as 6 primeiras horas de experimento em intervalos de 2 horas e posteriormente, em intervalos de 4 horas até que fosse observada a atenuação do processo fermentativo.

2.3. Determinação da concentração de microrganismos, substrato e produto (g.L⁻¹)

A fim de determinar a concentração de microrganismos, succionou-se 10 mL de caldo em membrana estéril (diâmetro de 47 mm e poros de 0,45 µm) acoplada em sistema de filtração a vácuo. Em seguida, a membrana foi levada para estufa elétrica a 105 °C, durante 24 horas, posteriormente a um dessecador de vidro, por mais 2 horas, após o decorrido tempo, pesou-se a membrana em balança analítica para quantificação da massa de microrganismos, conforme as Equações 2, 3, 4 e 5.

Determinação da massa de sólidos na amostra isenta de microrganismos (Equação 2):

$$m_{\text{sól. branco}} = m_{\text{branco}} - m_{\text{membrana}} \quad (2)$$

Determinação da massa de sólidos nas amostras com microrganismos e da massa de microrganismos na amostra (Equação 3 e 4):

$$m_{\text{sól. totais}} = m_{\text{pesada}} - m_{\text{membrana}} \quad (3)$$

$$m_x = m_{\text{sól. totais}} - m_{\text{sól. branco}} \quad (4)$$

Determinada a massa de microrganismos (m_x), realizou-se o cálculo através da Equação 5 para determinar a concentração em g.L^{-1} .

$$X (\text{g.L}^{-1}) = (m_x/V).100 \quad (5)$$

Onde: $V=10 \text{ mL}$.

Para determinar a concentração de substrato em g.L^{-1} , foram realizados os cálculos estequiométricos, uma vez a graduação Brix representa a porcentagem em massa de sólidos solúveis.

O teor de etanol em °GL foi calculado a partir da Equação 6, utilizando os valores obtidos na leitura do refratômetro (Carvalho *et al.*, 2008). Uma vez que a graduação Gay Lussac representa a porcentagem em volume de etanol presente em uma mistura álcool/água, realizou-se os cálculos estequiométricos necessários para transformar para g.L^{-1} .

$$E = [(B_i - B_f).4]/7,4 \quad (6)$$

Onde: E: graduação alcoólica em °GL; B_i : Brix Inicial; B_f : Brix Final.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Durante a cinética do processo, os microrganismos consomem glicose, frutose e sacarose. Mostos com elevadas concentrações de açúcares, acarretam em estresse osmótico, reduzindo o crescimento dos microrganismos, produzindo glicerol e levando a perda da viabilidade das células (Lima *et al.*, 2001). O experimento 6 foi conduzido com maior concentração de açúcares que os demais, e conforme observado na Tabela 2, possuiu alta concentração de substrato ao final do processo, porém demandou de um tempo maior e teve a quantidade de microrganismos reduzida significativamente quando comparado aos demais, concordando com Pataro *et al.* (2002), que em seu trabalho apresentou que fermentações com 16 °Brix ou mais, acarretam em fermentações mais lentas e incompletas.

Nas Figuras 2, 3 e 4, observa-se a cinética da fermentação alcoólica das variáveis controladas nos diferentes experimentos.

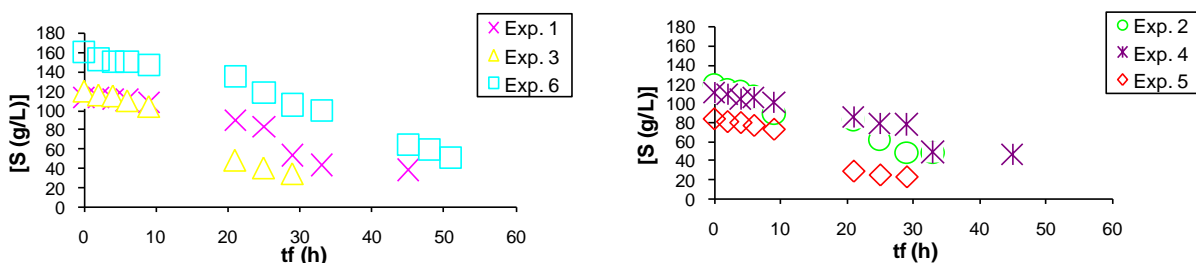


Figura 2 – Comportamento da concentração de substrato (g.L^{-1}) em função do t_f (h).

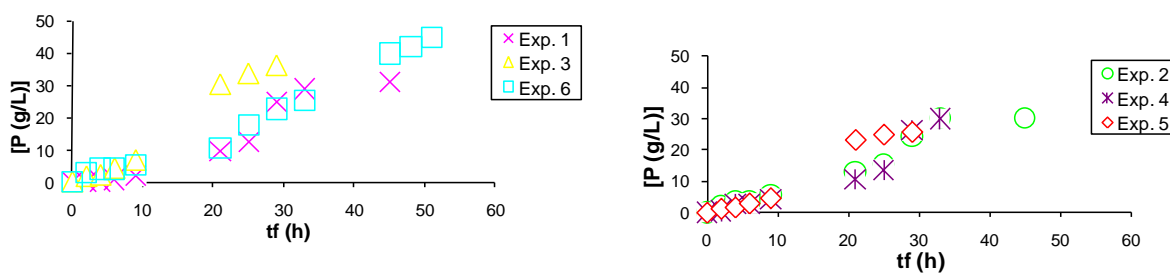


Figura 3 – Comportamento da concentração de produto (g.L^{-1}) em função do t_f (h).

Após a adaptação dos microrganismos com o meio, há o início do consumo de açúcares do mosto, onde por anaerobiose há a oxidação da glicose, para transformação em etanol e CO_2 , sendo que os produtos finais da metabolização dos açúcares dependem das condições ambientais em que as leveduras se encontram (Lima *et al.*, 2001). Conforme observa-se na Figura 2 e 3, com o declínio da concentração de açúcares ao longo do tempo de fermentação, houve o aumento da produção de etanol. Os experimentos 1, 3 e 5 tiveram máxima conversão de substrato em etanol e CO_2 , e a máxima produção de etanol deu-se nos experimentos 1, 3 e 6, os quais possuíam concentrações de substrato mais elevadas inicialmente. O experimento 5 esteve entre os experimentos de máximo consumo de açúcares, porém, não entre as produções de etanol mais elevadas, devido ao fato de que a quantidade inicial de substrato era inferior a todos os demais experimentos (80 g.L^{-1}).

Na figura 4, observa-se cinética da concentração de microrganismos ao longo da fermentação alcoólica.

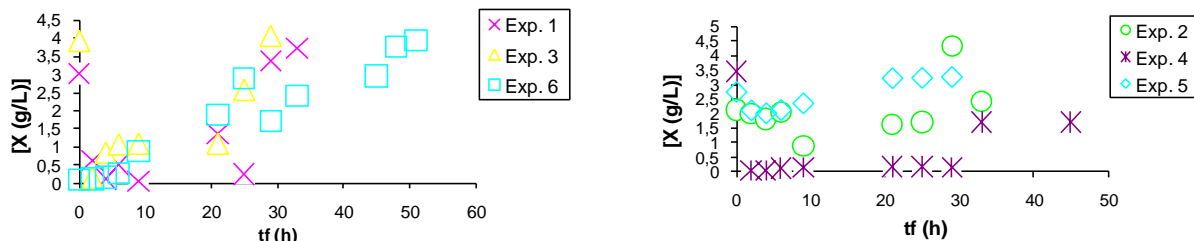


Figura 4 – Comportamento da concentração de microrganismos (g.L^{-1}) em função do t_f (h).

Conforme se observa na Figura 4, a máxima concentração de microrganismos foi nos experimentos 1, 3 e 6, os quais também tiveram a máxima produção de etanol. Sendo que o ensaio 3 apresentou máxima concentração de microrganismos em menor tempo de processo fermentativo.

A análise das diferentes variáveis objetivou identificar as melhores condições para o processo fermentativo, através da variação de pH, temperatura e concentração de sólidos solúveis. Na Tabela 2, encontram-se as variáveis respostas de cada um dos testes realizados.

Tabela 2 - Resultados obtidos nas cinéticas: tempo de fermentação (t_f (h)), concentração de microrganismos (X (g.L^{-1})), concentração de substrato (S (g.L^{-1})), concentração de produto (P (g.L^{-1})).

Experimento	t_f (h)	X (g.L^{-1})	S (g.L^{-1})	P (g.L^{-1})
1	43	3,70	39	31,20
2	37	2,43	48	30,35
3	30,5	4,07	34	36,25
4	43	1,72	47	29,98
5	30,5	3,27	23	25,72
6	51	3,95	51	45,96

Quanto maior a concentração de microrganismos no meio fermentativo, o consumo de açúcares será maior e logo a produção de etanol também, até certos intervalos, pois concentrações muito elevadas podem levar a competição por alimento, nutrientes, minerais e vitaminas (Lima *et al.*, 2001).

No experimento de número 3, a concentração de microrganismos ao final do processo foi maior e o tempo de fermentação alcoólica menor, quando comparado aos demais, possuindo concentração de etanol inferior que somente o experimento 6. Porém como se observa na Tabela 1, a concentração de açúcares iniciais entre estes era diferenciada. O experimento 6, apesar da maior concentração final de etanol, demandou de um tempo maior, consumindo menos açúcares do meio e demandando de maiores gastos energéticos.

De acordo com Lima *et al.* (2001), quanto ao tempo de fermentação, espera-se que a fermentação alcoólica esteja estagnada entre 24 a 36 horas de processo, concordando com o tempo da literatura, os experimentos 3 e 5. Nos demais experimentos, pode ter ocorrido a formação de compostos inibidores por linhagens selvagens de bactérias, sendo que geralmente as quedas na eficiência fermentativa decorrem de alterações estequiométricas, levando a formação de produtos secundários (glicerol e ácidos orgânicos), biomassa e aumento do tempo de fermentação.

O pH influencia na atividade dos microrganismos e logo, na fermentação, sendo este importante para o controle de contaminação bacteriana, crescimento da levedura, taxa de fermentação e formação de subprodutos (Souza, 2009). O experimento 3, que foi o que melhor respondeu o objetivo do trabalho, possuía pH inicial 3. As fermentações se desenvolvem em uma ampla faixa de pH, sendo que fermentações conduzidas em meios mais ácidos resultam em maiores rendimentos alcoólicos, pela capacidade de restringir o crescimento do fermento, redução da produção de glicerol e de contaminação bacteriana (Lima *et al.*, 2001).

O pH do meio em que as células se encontram também influencia no desenvolvimento do fenômeno de floculação, onde ocorre um agrupamento de células formando conglomerados de peso superior ao da célula individualizada, tendendo à sedimentação ou flotação, reduzindo a superfície de contato entre as células e o meio (Mutton & Souza, 2004). Segundo Ludwig *et al.* (2001) quanto maior o pH, maior a taxa de floculação, o que compromete o desenvolvimento dos microrganismos e a conversão de açúcares em etanol e CO₂. A floculação pode ter ocorrido no processo de pH mais alto (Experimento 4), ao qual o processo se alongou para estabilizar, quando comparado ao experimento 3, variando pouco a concentração de açúcares nas últimas horas e convertendo menos substrato em produto, possuindo também a menor concentração de microrganismos. Sendo que células floculadas e ao fundo ou flotadas, não possuem atividades.

Outra variável de influência é a temperatura, as leveduras são mesófilas e as temperaturas ótimas para produção de etanol estão entre 26 e 35 °C (Lima *et al.*, 2001). A temperatura está entre as condições que mais afetam a atividade dos microrganismos, influenciando no crescimento, capacidade fermentativa, metabolismo e viabilidade celular (Naves *et al.*, 2010). Todos os experimentos foram conduzidos próximos a esta faixa.

4. CONCLUSÃO

A viabilidade celular do processo fermentativo, é influenciada pelo pH, temperatura e concentração de açúcares iniciais. Apesar de em ambos os experimentos testados houve o consumo de açúcares e produção de etanol, o tempo de fermentação nestes, a concentração de microrganismos, consumo de substrato e quantidade de produto foi diferenciada. A máxima concentração de microrganismos em menor tempo de processo foi otimizada no experimento de temperatura inicial de 32 °C, pH 3 e 12 °Brix.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CARVALHO, W.; CANILHA, L.; ALMEIDA E SILVA, J. B. de. Cinética da fermentação e balanço

de massa da produção de cachaça artesanal. *Brazilian Journal of Food Technology*, VII BMCFB, 2008.

LIMA, L. R.; MARCONDES, A. A. *Álcool carburante: uma estratégia brasileira*. Curitiba: Editora UFPR, 248p., 2002.

LIMA, U. A., BASSO, L. C., AMORIM, H. V. Produção de Etanol. In: SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. (Coord.). *Biotecnologia Industrial: Processos Fermentativos e Enzimáticos*, v.3, capítulo 1, São Paulo, SP, Editora Edgard Blucher, 2001.

LUDWIG, K.M.; OLIVA-NETO, P.; ANGELIS, D.F. de. Quantificação da Flocculação de *Saccharomyces cerevisiae* por bactérias contaminantes da fermentação alcoólica. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v. 21, n. 1, p. 63-68, 2001.

MUTTON, M. J. R.; SOUZA, M. A. C. Flocculação de leveduras por *Lactobacillus fermentum* em processos industriais de fermentação alcoólica avaliada através de técnica fotométrica. *Ciência e Agrotecnologia*, v. 28, n. 4, p. 893-898, 2004.

NAVES, R. F.; FERNANDES, F. de S.; PINTO, O. G., NAVES, P. L. F. Contaminação microbiana nas etapas de processamento e sua influência no rendimento fermentativo em usina alcooleira. *Enciclopédia Biosfera: Centro Científico Conhecer*, Goiânia, v. 6, n. 11, p.1-16, out. 2010.

PASCHOALINI, G.; ALCARDE, V. E. Estudo do Processo Fermentativo de Usina Sucroalcooleira e Proposta para sua Otimização. *Revista de Ciência & Tecnologia*, Piracicaba, v. 16, n. 32, p.59-68, jul. 2009.

PATARO, C.; GOMES, F.C.O.; ARAÚJO, R.A.C.; ROSA, C.A.; SCHWAN, R.F.; CAMPOS, C.R.; CLARET, A.S.; CASTRO, H.A. Utilização de leveduras selecionadas na fabricação da cachaça de alambique. Informe Agropecuário, EPAMIG, Belo Horizonte, v. 23, n 217, p. 37-43, 2002.

SANTOS, R. E. R. dos; SANTOS, I. A. dos. Análise da viabilidade energética da produção de etanol em microdestilarias. *Congresso Nacional de Bioenergia*, São Paulo, 2009. Disponível em: <<http://www.porthuseventos.com.br/site/eventos/2009/eventobioenergia.com.br/congresso/br/tecnica/RodolfoSantos.pdf>>. Acesso em: 27 mar. 2014.

RODRIGUES, M. I., IEMMA, F. A., Noções sobre experimentos fatoriais; Comparação do uso das metodologias; Estratégia experimental para fatoriais fracionados e delineamento composto central rotacional (DCCR). In: *Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos*, v. 1, capítulo 3, 4, 5, Campinas, SP, 2 ed., Editora Cárita, 2009.

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

VIEIRA, G. E. G.; PICKLER, A.; CASTRO, J. G. D; CARDOSO, A. S.; FIGUEIREDO, R. L.; SILVEIRA, A. S.; MILHOMEM, C. C.; LEAL, E. R. M.; PEDROZA, M. M.; MAFRA, W. A.; SILVA, F. C.; LIMA, M. M.; CARVALHO, M. B.; BOAS, V. F. V. Obtenção de etanol a partir do mesocarpo de babaçu (*Orbignya sp.*), 2009. Disponível em: <http://www.abq.org.br/biocom/2009/trabalhos/-11-5572.htm>. Acesso: 25/02/2014.