

# ESTUDO DE FATORES QUE INTERFEREM NA PRODUTIVIDADE DA FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA EM BATELADA ALIMENTADA

Mariana Lopes Cruz <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Faculdade de Talentos Humanos – FACTHUS, Uberaba (MG), Brasil

<sup>1</sup> Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia (MG), Brasil

mariana.cruz@facthus.edu.br

**RESUMO:** Neste trabalho estudou-se a produtividade de etanol no processo de fermentação alcoólica operando em reator batelada alimentada, analisando as influências da temperatura, da concentração celular do inóculo e da concentração do substrato, pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* Y904. Os ensaios foram realizados em reator de bancada utilizando meio sintético à base de sacarose e extrato de levedura. As concentrações de açúcares e etanol foram determinadas por cromatografia líquida (CLAE), e as concentrações de células foram determinadas pelo método espectrofotométrico. A análise estatística foi realizada no Software *Statistica 7.0* e determinaram-se as faixas que maximizaram as variáveis estudadas no planejamento composto central. A condição otimizada pelo PCC que maximizou a resposta produtividade, foi a de temperatura 26°C, concentração de ART (Açúcar Redutor Total) 240 g/L e concentração de inóculo 35 g/L. Nestas condições a produtividade alcançada foi de 6,0 g/L.h em 10 horas de fermentação.

**PALAVRAS CHAVE:** fermentação, produtividade, etanol, ART.

## STUDY OF FACTORS THAT AFFECTING PRODUCTIVITY ON ALCOHOLIC FERMENTATION IN FEED BATCH

**ABSTRACT:** In this work was studied the ethanol productivity in the fermentation process operating in reactor feed batch analyzing the influences of temperature, cellular concentration of the inoculum and the substrate concentration, the yeast *Saccharomyces cerevisiae* Y904. Assays were carried out in the reactor using synthetic medium with sucrose and yeast extract. The concentrations of sugars and ethanol were determined by liquid chromatography (HPLC), and cellular concentrations were determined by spectrophotometric method. Statistical analysis was performed using *Statistica 7.0* software and determined ranges that maximized the variables studied in the central composite design. The optimized conditions which maximized the CCD response yield were temperature, 26 ° C, concentration (RST - Reducing Sugar Total) 240 g/L and inoculum concentration 35 g/L. Under these conditions the yield achieved was 6.0 g /l.h in 10 hours fermentation.

**KEYWORDS:** fermentation, yield, ethanol, ART.

## INTRODUÇÃO

O consumo de energia no mundo baseia-se em dois tipos de fontes: os combustíveis fósseis e as energias renováveis. As principais fontes de energia utilizadas atualmente são o petróleo, o gás natural e o carvão. A crescente demanda de energia tem motivado os cientistas a desenvolver sistemas mais eficientes e tecnologias e buscar fontes diversificadas de abastecimento, para a energia limpa e renovável, em particular. O etanol tem um grande potencial para substituir os combustíveis fósseis, principalmente pelo fato de ser um bicomcombustível renovável, podendo melhorar a segurança energética e reduzir os déficits comerciais (HIRA e OLIVEIRA, 2009; ROLZ e LÉON, 2011).

As pesquisas na linha de processos de produção de etanol são variadas, e uma abordagem que tem despertado bastante interesse recentemente envolve estudos sobre a resistência da levedura ao teor final de etanol no vinho fermentado. Quanto maior for o teor alcoólico no vinho, menor será o volume de vinhaça gerado e menor o gasto na

destilação do vinho. A vinhaça gerada é da ordem de 12 L/L de etanol produzido para um vinho com 8% e de apenas 8 L/L para um vinho com 12% de álcool, sendo que o segundo maior custo envolvido na produção de etanol está ligado ao descarte da vinhaça (AMORIM et al., 2011). Diferentes temperaturas afetam de forma distinta a atividade metabólica e o crescimento da levedura. Isso pode ser atribuído, não somente à genética das diferentes cepas, mas também à composição do meio de crescimento e a outros parâmetros como pH, agentes químicos, desidratação osmótica, estado nutricional e fase de crescimento (MONACO, 2007).

A viabilidade celular é sem dúvida um aspecto importante no controle da fermentação alcoólica. Quanto maior esse número melhor será o desempenho do processo. Como o ambiente das dornas de fermentação não é propriamente ideal para manutenção da viabilidade celular, um controle minucioso deve ser feito pelas unidades produtoras de etanol. Assim, o objetivo geral deste trabalho foi estudar a influência dos fatores temperatura, concentração celular do inóculo e concentração de

substrato para a resposta produtividade, empregando o processo em batelada alimentada.

## MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados em um fermentador modelo *New Brunswick Multigen*, com controles de agitação e temperatura operados em batelada alimentada, com volume útil de 1,5 L, sendo este volume utilizado nas fermentações. O volume de inóculo representava em todas as fermentações 30% do volume útil e o meio de cultura 70%. Ao iniciar a alimentação do reator, foram acrescidos 1,05 L de meio de cultura com tempos de enchimento e concentração do substrato na alimentação conforme experimentos propostos. O meio de cultura empregado nas fermentações foi composto de sacarose (variável para cada experimento),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (5 g/L),  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (1 g/L),  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (1,67 g/L),  $\text{KCl}$  (1 g/L) e extrato de levedura (6 g/L). Os reagentes utilizados foram todos de grau analítico, exceto a sacarose, que foi açúcar cristal comercial. Utilizou-se uma cepa industrial Y-904 da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, na forma granulada, produzida pela AB Brasil. Na preparação do inóculo utilizou-se uma massa pré-determinada de levedura para cada experimento segundo o planejamento composto central. A hidratação das leveduras foi realizada por duas horas em água à temperatura ambiente e sob agitação em *shaker*.

Cálculo relacionado à fermentação: O cálculo da produtividade, em relação ao etanol produzido, é uma grandeza cinética que expressa a velocidade média de produção. A produtividade foi calculada pela Equação 1.

$$P_{\text{retanol}} = \frac{C_{\text{etanol}f}}{t} \quad (1)$$

Em que:

$P_{\text{retanol}}$  = produtividade do etanol (g/L.h);

$C_{\text{etanol}f}$  = concentração de etanol (g/L) ao final da fermentação;

$t$  = tempo final de fermentação (h).

Determinação das concentrações de açúcares e etanol: O etanol e os açúcares totais (glicose, frutose e sacarose) foram quantificados pelo método de cromatografia líquida de alta eficiência (CLEA). As amostras retiradas ao longo da fermentação eram diluídas, filtradas e injetadas no sistema cromatográfico de marca *Shimadzu* modelo *LC-20A Prominence*, coluna *SUPELCOGEL Ca*, na qual os açúcares e etanol foram detectados por índice de refração (RID). A solução de arraste utilizada foi uma solução aquosa de  $\text{H}_3\text{PO}_4$  (0,1%), com fluxo de bomba de 0,5 mL/min, temperatura do forno de 32°C e volume de injeção de 20 microlitros. Os valores obtidos nos cromatogramas foram calculados com o auxílio de curvas padrão.

Determinação da 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 1000 vezes. Para a contagem das células, utilizou-se a técnica de coloração de azul de metileno (JONES, 1981). Para acompanhar o crescimento celular, foi utilizado o método espectrofotométrico, através de uma curva de calibração relacionando massa seca com absorvância. Desta forma foi determinada a concentração celular em termos de massa seca por unidade de volume.

Adaptação da levedura: A levedura foi adaptada em *shaker*, com agitação de 120 rpm e temperatura de 4°C, por 10 vezes consecutivas (por períodos de 48 horas) em frascos *erlenmeyers* contendo 250 mL de meio de cultura (caldo de cana-de-açúcar) com concentração de sacarose de 100 g/L e 30% da levedura *Saccharomyces cerevisiae* Y904 em cada frasco. A levedura era recuperada por centrifugação. Inicialmente e após o tempo de incubação, foram analisadas as concentrações celulares obtidas por contagem em câmara de Neubauer e por massa seca.

Planejamento composto central: Através da análise dos resultados de experimentos preliminares realizados posteriormente ao Planejamento Composto Central (PCC), verificou-se as influências das variáveis: tempo de enchimento do reator operado em batelada alimentada, temperatura, concentração celular inicial e concentração inicial de açúcar redutor total. Concluiu-se que as variáveis que mais afetaram o processo de fermentação em batelada alimentada foram temperatura, concentração inicial de ART e concentração celular no inóculo, sendo estas variáveis selecionadas para realização de experimentos segundo um PCC, definido por: delineamento fatorial completo 2<sup>3</sup>, incluindo os 6 pontos axiais e 3 repetições no ponto central, totalizando 17 experimentos, utilizando-se o software *Statistica 7.0*. O alfa de rotabilidade utilizado neste planejamento experimental foi de 1,6818. O tempo de enchimento do reator batelada alimentada foi de 5 horas para todos os experimentos, que corresponde a um tempo amplamente usado nas indústrias de etanol no Brasil e o pH do meio foi ajustado em 4,5. As amostras foram retiradas em intervalos de tempo de 2 h. Após a realização do PCC foi realizada uma análise da região ótima de trabalho pelas superfícies de respostas e efetuou-se a validação do ponto escolhido nesta região.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

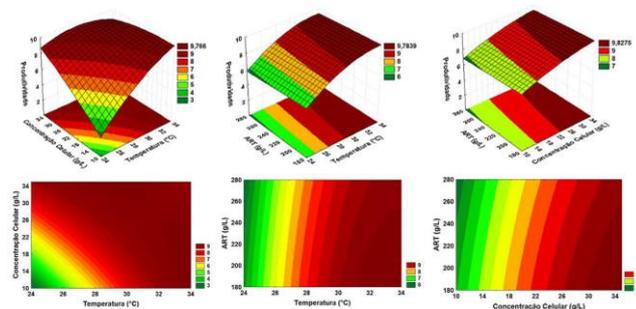
Os resultados do planejamento fatorial fracionado indicaram que as variáveis temperatura, concentração celular inicial e concentração de açúcar redutor inicial foram as que mais influenciaram no processo de fermentação em batelada alimentada. A resposta produtividade foi analisada considerando um tempo de fermentação de 10 horas. Os resultados experimentais do PCC levaram à Equação 2 relativa à produtividade de

etanol. Considerou-se um nível de significância de 90%, sendo que os parâmetros para os quais  $p < 0,1$  foram considerados significativos. O modelo em termos de variáveis significativas para a resposta produtividade de etanol ( $Y_{Prod}$ ), é mostrado na Equação 2. Somente os parâmetros significativos foram considerados no modelo. O coeficiente de determinação  $R^2$  obtido pelo ajuste do modelo aos dados experimentais foi de 0,94.

$$Y_{Prod}(g_{etanol}/L.h) = -105,81 + 4,24T - 0,056T^2 + 1,18X_0 - 0,005X_0^2 + 0,3S_0 - 6,44 \cdot 10^{-4}S_0^2 - 0,03X_0T \quad (2)$$

Como o modelo foi significativo, foi possível construir as superfícies de resposta e definir regiões de interesse. A Figura 1 representa as curvas de contorno e superfícies de resposta para a resposta produtividade.

Figura 1: Curvas de contorno e superfícies de resposta para a resposta produtividade.

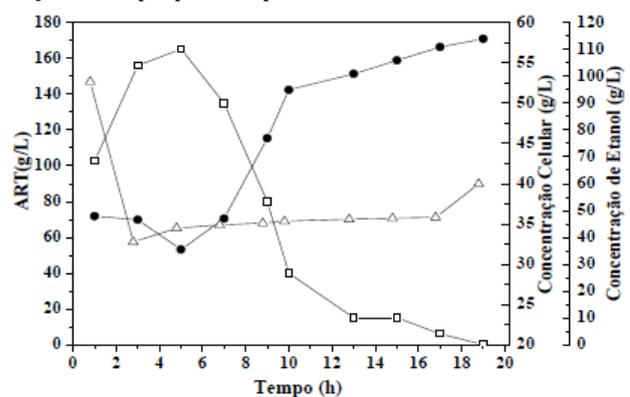


Pela análise das superfícies de resposta e curvas de contorno, concluiu-se que para se maximizar a resposta estudada produtividade, a concentração celular no inóculo deve ser alta, sendo assim maior que 30 g/L. Como a concentração celular não é um entrave econômico para uma fermentação alcoólica, optou-se por trabalhar com altos níveis celulares no inóculo na tentativa de otimizar a resposta. Altas densidades de células minimizam os efeitos do substrato e a inibição pelo produto, tornando possível realizar fermentações em curtos períodos de tempo (RIESENBERG e GUTHKE, 1999). A concentração de ART na alimentação que otimiza a resposta produtividade deve estar entre 180 e 240 g/L. A mesma análise foi feita para a temperatura e obteve-se uma faixa de 26 a 29°C. Aumentos da temperatura de fermentação produzem uma forte diminuição da viabilidade celular devido ao aumento das taxas de produção e acúmulo de etanol no meio e nas células (LALUCE, 1991).

Ferreira (2005) obteve a maior produtividade, 9,6 g<sub>etanol</sub>/L.h, utilizando em uma de suas fermentações temperatura de 34 °C, com 180 g/L de sacarose, 30% concentração celular e 3 horas de enchimento do reator. Pacheco (2010) obteve produtividade de 13,3 g<sub>etanol</sub>/L.h operando em um reator tipo torre a 32 °C com concentração celular no inóculo de 40% e concentração inicial de sacarose de 204 g/L.

Experimento de validação: definiram-se as condições para realização do experimento de validação baseando-se nas faixas de interesse para a resposta avaliada na literatura, e considerando-se os critérios técnicos e econômicos. Pela análise das superfícies de resposta e das curvas de contorno, definiu-se como condição a ser reproduzida experimentalmente: concentração celular no inóculo de 35 g/L, concentração inicial de ART de 240 g/L e temperatura de 26 °C. Na Figura 2 observam-se os perfis de consumo de sacarose e da produção de etanol em função do tempo, bem como o crescimento celular em função do tempo para a condição definida no PCC.

Figura 2: Perfis de concentração de açúcar redutor total - ART (□), concentração de etanol (●) e concentração celular (Δ) em função do tempo, para o experimento realizado a 26 °C.



Obeve-se no tempo final de fermentação de 19 horas, que todo substrato foi consumido, com produtividade de 6,0 g<sub>etanol</sub>/L.h, rendimento de 93,0% e teor alcoólico de 14,4 °GL. De acordo com os resultados apresentados no experimento de validação em 10 horas de fermentação, obteve-se produtividade de 9,50 g<sub>etanol</sub>/L.h. Através das equações em termos das variáveis não codificadas obteve-se produtividade de 9,35 g<sub>etanol</sub>/L.h.

## CONCLUSÃO

A análise dos resultados do planejamento fatorial fracionado indicou que das variáveis estudadas tempo de enchimento do reator, temperatura, concentração celular no inóculo e concentração de ART, o tempo de enchimento foi a variável que teve menor influência no processo. Os resultados do planejamento composto central indicaram que as faixas de concentração de ART de 180 a 240 g/L, concentração celular no inoculo de 30 a 35 g/L e temperatura de 26 a 29°C maximizaram a resposta produtividade.

## REFERÊNCIAS

AMORIM, H.V.; LORENZI, M.S.; BOSCARIOL, F.C.; FERREIRA, G.M. Alto teor alcoólico e concentração de vinhaça: Processos se complementam. News – Tecnologia Industrial. p. 26-32, 2011.

FERREIRA, E. Contribuição para o estudo da otimização da fermentação alcoólica operando em batelada alimentada. Tese (Mestrado), Universidade Federal de Campinas, 2005.

HIRA, A.; OLIVEIRA, L. G. No substitute for oil? How Brazil developed its ethanol industry. *Energy Policy*, v. 37, p. 2450–2456, 2009.

JONES, R.P.; PAMMENT, N.; GREENFIELD, P.F. Alcohol fermentation by yeasts: The effect of environmental and other variables. *Proc. Biochemistry*. v.16, p. 42-49, 1981.

LALUCE, C.; PALMIERI, M. C.; CRUZ, R. C. L. Growth and fermentation characteristics of new selected strains of *Saccharomyces* at high temperatures and high cell densities. *Biotechnol. Bioenh.*, v.37, p. 528-536, 1991.

MONACO, M. A. S. L. Efeito protetor do magnésio no choque térmico e estresse pelo etanol em leveduras *Saccharomyces cerevisiae*. Piracicaba, Universidade de São Paulo, Escola superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, p. 64, 2007.

PACHECO, T. F. Fermentação alcoólica com leveduras de características floculantes em reator tipo torre com escoamento ascendente. 94f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia, 2010.

RIESENBERG, D.; GUTHKE, R. High- cell-density cultivation of microorganisms. *Appl. Microbial. Biotechnol.*, v. 51, n 4, p. 422-430, 1999.

ROLZ, C.; LEÓN, R. Ethanol fermentation from sugarcane at different maturities. *Industrial Crops and Products*, v. 33, p. 333–337, 2011.

#### 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, à FACHTUS pela oportunidade de intercâmbio constante do conhecimento, cultura e prática da ciência.