



## Estudo da Fermentação Alcoólica Descontínua de Mel Invertido

*Renam Luis Acorsi<sup>1</sup>; Flávio Faria de Moraes<sup>2</sup>; José Eduardo Olivo<sup>3</sup>*

**RESUMO:** Este trabalho introduz uma modificação no mosto utilizado no processo de fermentação alcoólica por leveduras e avalia a cinética da produção de etanol nessa nova condição. As fermentações foram conduzidas, em temperaturas controladas, utilizando um meio de cultivo à base de mel invertido de cana-de-açúcar de modo a se aproximar da realidade industrial. Para buscar eventuais efeitos inibitórios causados pelo uso deste meio de cultivo, as fermentações foram realizadas em diferentes concentrações iniciais de açúcares redutores totais (ART), tendo até o momento sido feita a varredura nos extremos inferiores de concentração, entre 30 e 75 g/L de concentração inicial de ART, onde os parâmetros cinéticos encontrados encontraram-se dentro da faixa considerada normal, exceto as velocidades específicas de crescimento celular, que foram baixas em todas as fermentações. Entretanto, a velocidade de consumo de substrato para esse meio de cultivo diferenciado foi alta, tendo esta aumentado com o aumento de concentração inicial de ART até atingir um máximo de 1,678 gs/h.gx.

**PALAVRAS-CHAVE:** Cinética Fermentativa; Mel Invertido; Fermentação Alcoólica Descontínua.

### 1 INTRODUÇÃO

A biomassa é uma importante fonte energética, correspondendo a cerca de 30% da energia consumida em países em desenvolvimento. O uso de energia renovável deve sempre ser estudado e modernizado de modo que se tenha um uso eficiente e sustentável (HALL et al., 2005).

O etanol, quando produzido a partir da cana de açúcar, apresenta um balanço energético mais favorável que outras matérias primas, sendo praticamente oito vezes mais rentável que o milho. Além disso, é um combustível renovável menos poluente que aqueles derivados do petróleo. Logo, avanços tecnológicos no processo de fabricação de etanol são bem-vindos para este setor industrial (EARLEY e MCKEOWN, 2005).

No Brasil, a maioria das usinas opera em sistema batelada alimentada, sendo apenas 30% destas operantes de forma contínua e a transição para este tipo de operação ainda é lenta (ANDRIETTA et al, 2006). O sistema descontínuo, apesar de ser mais seguro quanto à manutenção e condições de assepsia, apresentar boas condições de manutenção genética dos microrganismos e flexibilidade operacional, normalmente leva a baixos rendimentos e produtividades, devido à inibição causada pela súbita variação na concentração inicial de substrato (CARVALHO e SATO, 2001). Apesar de apresentar mais desvantagens do que vantagens em relação aos reatores contínuos, os biorreatores

<sup>1</sup> Mestrando do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Estadual de Maringá – UEM, Maringá – Paraná. Bolsista CAPES. [rnmacorsi@gmail.com](mailto:rnmacorsi@gmail.com)

<sup>2</sup> Orientador, Professor PhD do Departamento de Engenharia Química da Universidade Estadual de Maringá – UEM, Maringá – Paraná. [flavio@deq.uem.br](mailto:flavio@deq.uem.br)

<sup>3</sup> Coorientador, Professor Doutor do Departamento de Engenharia Química da Universidade Estadual de Maringá – UEM, Maringá – Paraná. [olivo@deq.uem.br](mailto:olivo@deq.uem.br)

descontínuos sempre serão utilizados como base de comparação para outros tipos de processo, além de serem essenciais para o desenvolvimento dos processos contínuos (GADEN, 1959).

Assim, este trabalho teve por objetivo estudar a fermentação alcoólica descontínua utilizando um meio de cultivo semelhante ao industrial, mas submetido a um processo de inversão da sacarose antes da inoculação.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

O microrganismo utilizado foi uma levedura isolada de uma amostra de creme de levedura doada por uma destilaria da região noroeste do Paraná. Para isolar da levedura utilizou-se um meio de cultura sólido (1% de extrato de levedura; 1% de peptona; 5% de ART oriundo da solução de mel invertido e 1,5% de água) (OLIVEIRA-FREGUGLIA et al., 1996).

Para o meio de cultivo das fermentações, utilizou-se mel final diluído e submetido à inversão dos açúcares como fonte de carbono. A solução de mel foi tamponada (tampão acetato de sódio) em pH 4,5 e a inversão foi realizada com a enzima invertase com agitação a 200 rpm em 50 °C até a concentração de açúcares redutores ser constante.

As fermentações foram realizadas em biorreatores tipo Kitassato com capacidade de 1 litro, adicionando-se ureia e triplofosfato de sódio (0,40 g/L e 1,00 g/L respectivamente) como nutrientes adicionais. Os inóculos consistiam de 50 g/L (base úmida) de levedura diluídos em 100 mL de água destilada. A temperatura foi mantida constante por meio de um banho termostatizado, sendo as temperaturas trabalhadas 32, 34 e 37 °C.

A amostragem foi feita com auxílio de pipetas de vidro esterilizadas, sendo tomado 20 mL de meio fermentado por amostra. O tempo de amostragem variou conforme a concentração inicial de substrato. As amostras foram resfriadas a 0 °C e centrifugadas a 3000 rpm durante 8 min para a determinação das concentrações de ART, biomassa e etanol.

A determinação da biomassa foi realizada por espectrofotometria (OLIVO, 1985), tendo o corpo de fundo da centrifugação sido lavado com água destilada e em seguida ressuspenso em água destilada. A absorbância foi lida a 610 nm.

A concentração de ART foi determinada pelo método DNS, modificado para um diferente comprimento de onda e diluição da amostra com água (ZANIN e MORAES, 1987).

O etanol foi quantificado por destilação em um micro destilador TECNAL TE-012 seguida de cromatografia gasosa utilizando um cromatógrafo VARIAN 3300, com uma coluna Porapak Q. Tanto o injetor quanto o detector foram mantidos a 120 °C e a coluna foi mantida em 100 °C. O gás de arraste utilizado foi o hélio, na vazão de 18,75 mL/min.

Com os dados obtidos de concentração de biomassa (X), concentração de ART (S) e concentração de etanol (P), calcularam-se os seguintes parâmetros cinéticos: fatores de conversão de substrato em biomassa ( $Y_{X/S}$  = g de biomassa seca produzida/g de substrato consumido) e de substrato em produto ( $Y_{P/S}$  = g de etanol produzido/g de substrato consumido); velocidade específica máxima de crescimento celular ( $\mu_{max}$ ); nível de conversão de substrato (NCO = % de ART convertido); velocidade de consumo de substrato (VCS = g de substrato consumido/hora x g de biomassa seca) e rendimento ( $\eta_p$ ). A velocidade específica máxima de crescimento celular  $\mu_{max}$  foi obtida pela ajuste linear de  $\ln(X/X_0)$  em função do tempo, sendo o coeficiente angular desta correlação o valor de  $\mu_{max}$ .

O rendimento da fermentação  $\eta_p$  foi calculado pela razão entre o etanol produzido e o máximo teórico de produção segundo o balanço estequiométrico apresentado em 1815 por Gay-Lussac, onde 1 g de ART formaria 0,511 g de etanol.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 1 mostra os parâmetros cinéticos obtidos experimentalmente em função da temperatura e da concentração inicial de ART.

**Tabela 1.** Parâmetros cinéticos obtidos da fermentação descontínua de meio a base de mel final invertido.  $Y_{X/S} = g_X/g_S$ ; NCO = %; VCS =  $g_S/h \cdot g_X$ ;  $\mu_{max} = h^{-1}$ ;  $Y_{P/S} = g_P/g_S$ ;  $\eta_p = \%$ .

T (°C)	S <sub>0</sub> (g/L)	Y <sub>X/S</sub>	Parâmetros Cinéticos				
			NCO	VCS	$\mu_{max}$	Y <sub>P/S</sub>	$\eta_p$
32	30	0,2575	94,14	0,731	0,2054	0,4394	85,98
	50	0,0603	97,13	1,485	0,1019	0,4264	83,45
	75	0,0622	90,11	1,442	0,1069	0,4473	87,54
34	30	0,2164	94,97	0,934	0,2245	0,4571	89,45
	50	0,0798	97,23	1,132	0,1033	0,4687	91,71
	75	0,0418	97,81	1,542	0,0727	0,4545	88,95
37	30	0,1459	94,49	1,013	0,1771	0,4390	85,92
	50	0,0654	89,99	1,112	0,0781	0,4112	80,47
	75	0,0356	97,75	1,678	0,0646	0,4511	88,27

Os resultados obtidos foram comparados com o proposto por ANDRIETTA et al. (1999) e STECKELBERG et al. (2006).

A velocidade específica máxima de crescimento,  $\mu_{max}$ , apresentou valores baixos em todas as fermentações. Uma baixa velocidade de crescimento pode ser bem vista numa fermentação alcoólica, pois indica que menos açúcar está sendo desviado para a reprodução das células. O maior valor de  $\mu_{max}$  obtido foi de 0,2245 h<sup>-1</sup>, enquanto na maioria dos valores encontrados na literatura situam-se acima de 0,3500 h<sup>-1</sup>, tendo os maiores valores sido obtidos nas fermentações cuja concentração inicial de ART foi de 30 g/L, conforme esperado, pois a baixa concentração de ART favorece mais a reprodução celular.

Para o fator de conversão de substrato em etanol ( $Y_{X/P}$ ), que esteve na faixa de 0,4112 a 0,4687 g<sub>P</sub>/g<sub>S</sub>, notou-se que a temperatura de 34 °C foi a mais adequada, apresentando os melhores valores de  $Y_{P/S}$ . Valores de  $Y_{P/S}$  maiores que 0,45 são considerados altos.

O nível de consumo de substrato (NCO) esteve entre 89,99 e 97,81%, ou seja, todos valores médios. As temperaturas utilizadas neste experimento não aparentam ter influencia neste parâmetro.

As velocidades de consumo de substrato (VCS) foram relativamente altas se comparados aos valores da literatura, variando de 0,731 a 1,678 g<sub>S</sub>/h·g<sub>X</sub>. Notou-se um aumento deste com relação ao aumento da temperatura e da concentração inicial de substrato.

Os rendimentos  $\eta_p$  variaram de 80,47 a 91,71%. Os maiores valores deste parâmetro também foram obtidos nas fermentações conduzidas a 34 °C. Espera-se, para um processo fermentativo industrial, que o rendimento esteja entre 90 e 92%. Entretanto, essa diferença pode ser explicada pelo fato do processo industrial ser conduzido de modo descontínuo alimentado.

## 4 CONCLUSÃO

O uso de um meio de cultura previamente invertido na fermentação alcoólica resultou em valores cinéticos medianos no geral, tendo apenas se destacado a alta velocidade de consumo de substrato. Esta característica aliada à baixa velocidade específica de máxima de crescimento mostrou que o uso de um meio de cultivo contendo açúcares invertidos é promissor para o desenvolvimento de processos contínuos, inclusive pelo fato de tal processo não precisar de altas concentrações de substrato.

Fermentações com concentração de ART entre 100 e 250 g/L ainda devem ser desenvolvidas de modo a se estudar o outro extremo de concentrações, sendo então possível determinar a concentração ideal para o desenvolvimento de uma fermentação contínua.

## REFERÊNCIAS

ANDRIETTA, M.G.S.; ANDRIETTA, S.R.; STECKELBERG, C. Bioetanol – Brasil, 30 anos na vanguarda. **Revista Multiciência**, Campinas, n.7, 16 p. 2006.

ANDRIETTA, S.R.; MIGLIARI, P.C.; ANDRIETTA, M.G.S. Classificação das cepas de levedura de processos industriais de fermentação alcoólica utilizando capacidade fermentativa. **STAB – Açúcar e Alcool e Subprodutos**, v.17, n.5, p.54-59, 1999.

CARVALHO, J.C.M.; SATO, S. Fermentação descontínua. In: Schmidell, Willibaldo et al. (Coord.) *Biotechnologia Industrial: Engenharia Bioquímica*. São Paulo: Editora Edgar Blücher, 2001. p. 193-222 (Biotechnologia industrial; v.2).

EARLEY, J.; MCKEOWN, A. **Smart choices for biofuels**. Washington: Sierra Club and the Worldwatch Institute, 2009, 15 p.

GADEN Jr, E.L. Fermentation process kinetics. **Journal of Biochemical and Microbiological Technology and Engineering**, v.1, n.4, p.423-429, 1959.

HALL, D.O.; HOUSE, J.I.; SCRASE, I. **Uso da biomassa para produção de energia na indústria brasileira**. Campinas, São Paulo: Ed. UNICAMP, 2005, 28 p.

OLIVEIRA-FREGUGLIA, R.M.; GONÇALVES, R.H.; OGATA, A.Y.; HORII, J. Análise microbiológica de *Saccharomyces cerevisiae* e *Lactobacillus fermentum* através da técnica de microplacas. IN: **Simpósio de Iniciação Científica da Universidade de São Paulo**, 4., Piracicaba, 1996. Anais. v.1.

OLIVO, J. E., **Efeito da concentração inicial de microrganismos (*S. cerevisiae*) e da recirculação de células em parâmetros cinéticos de processos simultâneos de sacarificação e fermentação de meios preparados a partir de farinha de rapa de mandioca**. Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil, 1985.

STECKELBERG, C.; ANDRIETTA, M.G.S.; ANDRIETTA, S.R. Caracterização da biomassa isolada de processos fermentativos de produção de etanol para uso como biocombustíveis. **Encontro de Energia no Meio Rural**, Campinas, 2006

ZANIN, G. M.; MORAES, F. F. **Tecnologia de Imobilização de Células e Enzimas Aplicada à Produção de Álcool de Biomassas**. Relatório nº 2, junho/87, p. 315-321, 1987.

**Anais Eletrônico**

*VIII EPCC – Encontro Internacional de Produção Científica Cesumar*  
UNICESUMAR – Centro Universitário Cesumar  
Editora CESUMAR  
Maringá – Paraná – Brasil