

# FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA COM SACCHAROMYCES CEREVISIAE EM MOSTO AERADO DE HIDROLISADOS DE AMIDO DE MANDIOCA

Luiz Henrique Urbano<sup>1</sup>

Paulo Henrique Mendonça Pinto<sup>2</sup>

Claudio Cabelo<sup>3</sup>

**Resumo:** O presente trabalho foi desenvolvido no Centro de Raízes e Amidos Tropicais – CERAT, Na UNESP em Botucatu, estado de São Paulo onde foram realizados ensaios de fermentação alcoólica com hidrolisado de amido de mandioca. A fécula de mandioca foi utilizada como fonte de carboidrato para obtenção dos açúcares redutores consumidos no processo. Em um reator agitado foi produzido 12Kg de hidrolisado a partir de suspensão de fécula a 30% (p/p) utilizando enzimas alfa amilase na primeira etapa, seguida de amiloglucosidase na etapa posterior. As dosagens em unidades enzimáticas foram 2KNU.g-1 de amido e 2AGU.g-1 de amido respectivamente. O planejamento experimental considerou a realização de três ensaios de hidrolisados e três ensaios de fermentação a partir do mosto produzido; a) mosto aerado; b) com microaeração; c) em meio anaeróbico. Os ensaios foram realizados em erlenmeyers com 2,5 Kg de hidrolisado, ajustado a concentração de glicose a 100g.L-1 sendo inoculada a levedura do gênero *Saccharomyces cerevisiae* à taxa de 1,5% (p/p). Todos os erlenmeyers foram colocados sob agitação orbital e temperatura controlada de 30°C sendo acompanhado o processo de fermentação através de coleta de amostras do mosto a cada hora. A aeração nos frascos erlenmeyers foi realizada através de mangueira coletora de válvula que regulava a vazão de ar. De acordo com os dados obtidos pode se concluir que o sistema anaeróbico em 32h foi o mais eficiente para a produção de etanol. Também foi possível observar que enquanto ocorre aeração no meio não se observa alteração significativa na concentração de etanol e quando cessa a aeração o meio torna se anaeróbico e tem início a produção de etanol. Quando aumenta a concentração de etanol no meio, o crescimento celular do sistema anaeróbico cai e etanol inibe a levedura, parando o crescimento celular.

**Palavras-chave:** etanol; aeração; *Saccharomyces cerevisiae*; mandioca.

<sup>1</sup> Aluno do curso de Mestrado Energia na Agricultura FCA/UNESP – BOTUCATU-SP  
luizhu@fca.unesp.br

<sup>2</sup> Professor da Fatec – Campus de Ourinhos phmp@uol.com.br

<sup>3</sup> ProfDr -Centro de Raízes e Amidos Tropicais – CERAT – BOTUCATU-SP dircerat@fca.unesp.br

**Abstrac:** *This work was developed at Centro de Raízes e Amidos Tropicais – CERAT, in Botucatu, São Paulo state where tests were performed with hydrolyzed fermentation of cassava starch. The cassava starch was used as carbohydrate source for obtaining the sugars consumed in the process. In an agitated reactor was 12Kg hydrolyzate produced from starch suspension of 30% (w/w) using enzymes alpha amylase in the first stage, followed by amyloglucosidase at a later stage. The dosage units were 2KNU.g-1 enzyme of starch and starch 2AGU.g-1 respectively. The experimental design considered the performance of three tests and three tests of hydrolysates from fermented wort produced, a) aerated wort, b) with microaeração c) in anaerobic conditions. The tests were performed in Erlenmeyer flasks with 2.5 kg of hydrolyzed, adjusted the glucose concentration at 100g.L-1 inoculated with the yeast of the genus *Saccharomyces cerevisiae* the rate of 1.5% (w/w). All flasks were placed under orbital agitation and controlled temperature of 30 °C during the fermentation process followed by collecting samples of beer every hour. Airing in Erlenmeyer flasks was performed by collecting hose valve which regulated the flow of air. According to the data obtained can be concluded that the anaerobic system in 32h was the most efficient for ethanol production. It was also noted that while aeration occurs in the middle is not observed significant change in ethanol concentration and aeration ceases when the means to become anaerobic and has commenced production of ethanol. When the concentration of ethanol in the medium, the cell growth of anaerobic system crashes and ethanol inhibits yeast, stopping cell growth.*

**Keywords:** *ethanol, aeration, *Saccharomyces cerevisiae*; cassava.*

## 1. Introdução

Nos últimos anos, a investigação sobre a melhoria da produção etanol obteve avanços nos aspectos econômicos e ambientais, principalmente na aplicação como fonte alternativa de combustível. O etanol pode ser produzido em duas maneiras: a rota petroquímica, através da hidratação do etileno e da biotecnologia, a partir da rota microbiana através da fermentação de biomassa agrícola.

Diversos fatores afetam o rendimento do processo de fermentação, utilizando altas concentrações de carboidratos e objetivando, consequentemente, economia de energia na operação de separação do etanol por destilação do vinho. Estudos recentes indicam que a aeração do mosto é uma forma de proporcionar a elevação da energia metabólica das leveduras para suportarem maiores concentrações de etanol no meio de fermentação, gerando a necessidade de parâmetros operacionais que conduzam um

processo com elevado rendimento.

O aumento do rendimento do processo de obtenção do etanol exige a quantificação do comportamento dinâmico da levedura em concentrações elevadas. Ao determinar o coeficiente extremo para o crescimento da produção de etanol, é necessário definir as melhores estratégias (Alfenore et al. 2004).

A fonte de carboidrato que pode ser utilizado como substrato para fermentação, proveniente da biomassa, pode ter várias matrizes como: arroz, milho e mandioca.

A fécula é a substância de reserva das raízes de mandioca, acumulada em teores médios de 20-30 %, variando entre os limites de 13% a 35%. Considerando-se que as raízes colhidas apresentam teores de umidade de 60 a 75%, o amido na matéria seca pode se concentrar até cerca de 90% (VILLELLA; FERREIRA, 1987).

De acordo com Leonel (1998) a fécula e amido são sinônimos do ponto de vista da composição química, entretanto, a legislação brasileira considera amido a substância amilácea encontrada nos órgãos aéreos vegetais e fécula a encontrada nas raízes e tubérculos.

O amido isolado dos vegetais é composto essencialmente por polímeros de  $\alpha$ -D-glucose, mas podem apresentar compostos menores provenientes de diversas fontes. Os polímeros formadores do grânulo de amido são: a amilose, polissacarídeo linear de (1-4)- $\alpha$ -D-glucose e a amilopectina, molécula ramificada, onde cadeias de (1-4)- $\alpha$ -Dglucana são conectadas por ligações  $\alpha$ (1-6). O amido deve muito de sua funcionalidade a estas duas macromoléculas, assim como a organização física das mesmas dentro da estrutura granular (BILIADERIS, 1991).

As características dos amidos dependem da planta onde foram produzidos e estocados e, para efeitos de sistematização de estudos, subdividiu-se em dois grupos; os originários de cereais e os outros de raízes. O armazenamento sob a forma de grânulos nas plantas e reaproveitamento da energia pela ação de enzimas é um mecanismo altamente favorável, pois à noite ocorre a utilização dos açúcares resultantes das hidrólises para a manutenção da planta (LEONEL, 1998).

Para a produção de etanol a partir de matérias-primas amiláceas faz-se necessária a hidrólise do amido, pois este não é fermentado pela levedura alcoólica. A hidrólise dos biopolímeros constituintes dos grânulos de amido e progressivamente a quebra das ligações glicosídicas, gerando cadeias mais curtas de dextrina, maltose e glicose. No processo de hidrólise, além de água, há necessidade de catalisadores químicos ou enzimáticos capazes de promover a quebra das ligações glicosídicas e da temperatura.

Para as etapas de hidrólise e sacarificação do material amiláceo, podem

ser utilizados três processos: o ácido, o ácido-enzimático e o enzimático. O processo mais simples de hidrólise do amido é o ácido, onde uma pasta preparada com amido e água, com concentração aproximada de 50%, recebe ácido clorídrico concentrado na proporção de 0,1 a 0,2%, calculado em função do peso seco de amido. Esta suspensão é submetida às condições de tempo e temperatura. Contudo, este processo não é indicado para a produção de aguardente devido à formação de muitos compostos secundários, o que interferem na qualidade da bebida (SUMERLY; ALVAREZ, 1997).

No processo enzima-enzima, utilizam-se duas enzimas, uma para a liquefação e outra para a sacarificação do amido. A liquefação é catalisada por uma enzima que hidrolisará o amido em dextrinas e polímeros menores. A segunda etapa, é utilizada uma enzima sacarificante que completará a hidrólise produzindo monômeros de glicose. A natureza, a dosagem, a temperatura, o pH e o tempo de ação desta enzima influenciam na composição final da solução após a sacarificação (MERCIER, 1985).

As enzimas amilolíticas pertencem à categoria das enzimas que catalisam as reações de hidrólises (hidrolases) e mais particularmente à categoria das enzimas que catalisam as reações de amido. (MERCIER, 1985).

Vários são os fatores que interferem na qualidade das bebidas alcoólicas destiladas, tais como a matéria-prima, fermentação, o método de condução do processo fermentativo, destilação, e envelhecimento. No entanto, as leveduras e as condições de fermentação têm sido relatadas como os fatores que mais influenciam o sabor das bebidas alcoólicas pois é durante a fermentação que a maioria dos compostos do sabor são formados (SUOMALAINEN; LEHTONEN, 1979; LEHTONEN; JOUNELA-ERIKSOSON, 1983).

No processo ácido-enzima, o amido é hidrolisado numa primeira etapa com ácido e a seguir sofre tratamento com enzima específica. Esta etapa é chamada de sacarificação que, dependendo do tipo de enzima utilizada, produz maior proporção de glicose, maltose ou dextrinas. Este processo de conversão ácido/enzima permite produzir vários tipos de hidrolisados, mas não é adequado para obter-se o hidrolisado com mais de 90% de glicose, devido a reações de retrogradação, que são catalisadas pelo ácido, formando ligações tipo beta-glicosídicas, que não são hidrolisadas por glucoamilases (MARC;ENGASSER, 1983).

Já no processo enzima-enzima, utiliza-se duas enzimas, uma para a liquefação e outra para a sacarificação do amido. A liquefação é catalisada por uma enzima que hidrolisará o amido em dextrinas e polímeros menores promovendo a liquefação do meio.

Na segunda etapa, é utilizada uma enzima sacarificante que completará a hidrólise produzindo glicose. A natureza, a dosagem, a temperatura, o pH e o tempo de ação desta enzima influenciam na composição final da solução após

a sacarificação (MERCIER, 1985), e podem ser compartilhadas pelo mecanismo de ação ou pela ação em si. (ROBYT, 1984; FORGARTY, 1983).

As enzimas que quebram indiferentemente as ligações glicosídicas no interior da molécula são chamadas de endoenzimas ( $\alpha$ -amilase, pululanase). Por outro lado, são chamadas de exoenzimas ( $\beta$ -amilase, amiloglicosidase, CGTase) aquelas que hidrolisam a molécula a partir de uma extremidade não redutora. Existem ainda as enzimas "desramificantes": R-enzima, amilo-1,6-glucosidase, pululanase, isoamilase e oligo-1,6-glucosidase. Estas enzimas são capazes de hidrolisar as ligações  $\alpha(1-6)$  do amido, e possuem características e especialidades diferentes. A ação sinérgica da  $\alpha$ -amilase e amiloglicosidase no processo de hidrólise vêm sendo estudada por diversos pesquisadores em amidos de diferentes origens. (GRAEL, 1989).

Segundo Ribeiro et al. (1987), as células de leveduras apresentam necessidades nutricionais durante o processo fermentativo, as quais influenciam diretamente na multiplicação e no crescimento celular e também na eficiência da transformação de açúcar em álcool. As leveduras são capazes de assimilar mono, di e trissacarídeos e como são aeróbios facultativos, os produtos finais da metabolização dos açúcares irão depender das condições ambientais em que ela se encontra. Uma fração do açúcar é transformada em biomassa, CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O em aerobiose, a maior parte é convertida em etanol e CO<sub>2</sub> em anaerobiose (fermentação alcoólica). Juntamente com o etanol e CO<sub>2</sub>, o metabolismo anaeróbio permite formação de glicerol, ácidos orgânicos (succínico, acético, pirúvico e outros), álcoois superiores, acetaldeídos, acetoína, etc, e simultaneamente ocorre o crescimento das leveduras.

Na fermentação industrial, a levedura encontra-se continuamente exposta a situações estressantes, que de acordo com a intensidade, podem acarretar a exaustão de seu conteúdo de trealose, que leva a redução da viabilidade. Estas situações se constituem em fatores físicos, químicos e microbiológicos, que afetam o desempenho fermentativo (ALVES, 1996).

Após a fermentação, os meios açucarados passam a denominar-se vinhos, com uma constituição variável, mas encerrando sempre substâncias gasosas, sólidas e líquidas. As primeiras representam-se principalmente pelo dióxido de carbono, que se dissolve em pequena proporção. Os sólidos se fazem presentes pelas células das leveduras alcoólicas, de bactérias contaminantes, sais minerais, açúcares não fermentados e impurezas sólidas em suspensão. (LIMA et al, 2001).

Desse material impuro e heterogêneo, separa-se o etanol por processo unitário de destilação, em grau de pureza e concentração variáveis. Nessa operação, geram-se vapores de álcool e água, que depois de resfriados formam um líquido de concentração superior a do vinho e isento de substâncias

sólidas. (LIMA et al, 2001).

A fermentação alcoólica de açúcares fermentescíveis na presença de leveduras obedece à ordem sequencial de reações metabólicas da via de Embden - Meyerhof - Parnas (LIMA, 2001). O fenômeno como um todo pode ser representado pela equação de Gay - Lussac, que serve de base para cálculos de eficiência:



O balanço de massa teórico, indica que 1 mol de glicose é convertido a 2 moles de etanol e 2 moles de gás carbônico, que em valores mássicos corresponde a:

$$180g \rightarrow 92g + 88g$$

Estequiometricamente, o balanço anterior apresenta um rendimento teórico de 51,1% sobre a massa da glicose.

Durante a fermentação alcoólica, as leveduras produzem etanol, dióxido de carbono, e um grande número de componentes secundários como glicerol, ácido succínico e ácido láctico; sendo os mais abundantes os álcoois superiores; porém, muitos compostos presentes em menores quantidades também desempenham um papel importante no desenvolvimento do sabor das bebidas (LEHTONEM; et al, 1983).

São diversos os pesquisadores dedicam estudos buscando eficiência e melhoria do processo de fermentação, no qual pesquisas e testes com diversas linhagens de leveduras tornam os processos cada mais eficiente na conversão de substrato de produto da fermentação, conforma apresentado na Tabela 1.

Tabela 1 – Proporção dos diversos produtos da fermentação alcoólica, em g/100g de glicose metabolizada, de acordo com várias fontes e para diferentes eficiências fermentativas.

| Produto da fermentação | Pasteur<br>95% | Jackman,<br>1987<br>90 -95% | Basso et al.<br>1996<br>85-92% |
|------------------------|----------------|-----------------------------|--------------------------------|
|                        | -----%-----    |                             |                                |
| Etanol                 | 48,5           | 45,0-49,0                   | 43,0-47,0                      |
| Gás carbônico          | 46,4           | 43,0-47,0                   | 41,0-45,0                      |
| Glicerol               | 3,3            | 2,0-5,0                     | 3,0-6,0                        |
| Ácido succínico        | 0,6            | 0,5-1,5                     | 0,3-1,2                        |
| Ácido acético          | -              | 0,0-1,4                     | 0,1-0,7                        |
| Óleo fúsel             | -              | 0,2-0,6                     | -                              |
| Butileno glicol        | -              | 0,2-0,6                     | -                              |
| Biomassa (massa seca)  | 1,2            | 0,7-1,7                     | 1,0-2,0                        |

Fonte: (LIMA, 2001)

Atualmente, a produção de etanol carburante a partir de mandioca é comercialmente inviável, principalmente em comparação ao processo a partir da cana-de-açúcar e o eficiente uso do bagaço gerado. Todavia, a possibilidade de se produzir álcool etílico de qualidade a partir de resíduos da industrialização da mandioca tem se mostrado economicamente viável, pois estes apresentam maior valor de mercado que o etanol carburante, enquanto que a matéria-prima praticamente não apresenta custo. (LEONEL, 1998).

O álcool etílico hidratado, do ponto de vista químico, não apresenta diferença quanto às matérias-primas utilizadas como cana-de-açúcar, cereais, beterraba e mandioca. As diferenças estão restritas às impurezas que acompanham o álcool, que são características de cada matéria-prima e o grau de purificação pelo qual passou o produto (LOPES, 1986).

A característica do etanol proveniente de raízes de mandioca é do tipo C3 onde o isótopo tem característica diferente da cana de açúcar que tem o isótopo é do tipo C4, isto pode diferenciar no etanol quando utilizado como aditivo em bebidas ou para utilizar com álcool de cereais.

O processo de fotossíntese consiste em três fases; a primeira é fotoquímica onde ocorre a absorção de energia luminosa, a segunda quando há transferência de elétrons, produção de NADPH<sub>2</sub> e ATP, e a terceira fase, a bioquímica onde ocorre a síntese de carboidratos. Nestas rotas bioquímicas, o primeiro composto orgânico sintetizado pode conter três ou quatro átomos de carbono. As plantas que possuem ciclo bioquímico onde o primeiro composto orgânico sintetizado possui três átomos de carbono são denominadas de plantas do ciclo C3. Por outro lado, as plantas em que o primeiro composto orgânico formado possui quatro átomos de carbono são denominadas de plantas do ciclo C4. (DUCATTI, 2004)

Uma unidade industrial para produção de etanol representa um significativo investimento que pode ser melhor explorado se a produtividade em etanol for aumentada dos recorrentes 7% em volume no vinho para valores acima de 10%. A tecnologia para obtenção destes níveis de produção ainda não está disseminada devido a gargalos tecnológicos que demandam mais conhecimento para a sua superação.

Hidrolisados enzimáticos de matérias primas vegetais amiláceas permitem ajustes em concentrações de açúcares no mosto tornando-se assim possível a condução da fermentação visando o aumento na produtividade independente do porte do sistema.

O objetivo do presente trabalho foi verificar a influência da aeração no processo de fermentação alcoólica em mosto com alta concentração de hidrolisados enzimáticos de amido de mandioca utilizando como catalisador biológico a levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

## 2. Materiais e métodos

O trabalho foi realizado no Laboratório de Análises e Processamento do Centro de Raízes e Amidos Tropicais, CERAT da Universidade Estadual Paulista, UNESP- Campus de Botucatu - São Paulo.

### 2.1 Metodologia

#### 2.1.1 Hidrólise enzimática substrato

Um volume de 12 kg de suspensão a 30% (p/p) de fécula de mandioca comercial foi preparado em reator com agitação e aquecimento.

Foi adicionado 30mL de enzima alfa amilase Termamyl 240 que proporcionou uma dosagem de 2KNU/g de amido e o pH foi ajustado para 6,0. O KNU é a unidade enzimática do fabricante Termamyl.

A suspensão foi submetida à agitação e elevação de temperatura até 95°C permanecendo nesta temperatura por duas horas, posteriormente iniciado o resfriamento até 60°C.

Em seguida o pH foi ajustado para 4,5 e inoculado com 24mL de enzima amiloglucosidase AMG 300AGU que proporcionou uma dosagem de 2AGU.g<sup>-1</sup> de amido, e permanecendo sob agitação branda por um período de 6 horas. Após este tempo o hidrolisado foi transportado para recipiente plástico e estocado sob refrigeração a 5°C em câmara fria para posterior utilização.

#### 2.1.2 Processo de fermentação

O planejamento experimental proposto para os ensaios especificou como variáveis independentes:

Volume do mosto 2,5kg.

Concentração da glicose 100g L<sup>-1</sup>.

Inóculo da levedura 2% (p/p).

Temperatura 30°C.

Condicionamento em 3 formas: aerado, microaerado e anaeróbio.

Tempo de fermentação 32 horas.

E variações dependentes:

Concentração de etanol, metanol e glicerol.

Concentração de massa celular.

O hidrolisado de mandioca foi diluído, ajustado o pH e transferido para frascos Erlenmeyers com capacidade de 5 litros. Após inoculação da levedura foram instalados num agitador orbital com temperatura regulada em 30°C. Dois frascos com condicionamento para processo com aeração e

microaeração foram abastecidos através de mangueira dotada de válvula para regulação de vazão de ar.

### **2.1.3 Análises de acompanhamento**

O hidrolisado e fermentado foram avaliados com as seguintes análises:

Para as análises de açúcar e Brix e determinação de pH, a amostra foi centrifugada a 12000 rpm durante 8 minutos, em seguida filtrada em membrana hidrofílica de PVDF 0,22µm, com 13mm de diâmetro.

Para a determinação das concentrações de açúcares redutores (maltose, frutose, glicose), glicerol e etanol, em amostras de mosto e vinho, foram realizadas análises em cromatografia líquida de alta resolução, utilizando equipamento Varian, modelo Pró-Star 410, com detector de índice de refração, coluna da Bio Rad modelos: i) HPX-87H na determinação de álcoois, com temperatura de 50°C, fase móvel ácido sulfúrico 0,01M e vazão de 0,7 mL.min<sup>-1</sup>; ii) HPX-42A para determinação de glicose, maltose, maltotriose, e outros oligossacarídeos, utilizando temperatura de 85°C, fase móvel água deionizada, vazão de 0,6mL.min<sup>-1</sup>.

A identificação e quantificação de outras substâncias foram realizadas através de comparação com cromatogramas de amostras padrões, injetadas nas mesmas condições.

### **2.1.4 Análises de acompanhamento**

Para análise estatística dos dados foi utilizado o programa estatístico Assistat. Todos os dados originais foram submetidos à análise de variância a 5 e 1% de probabilidade pelo teste F, sendo as médias dos tratamentos comparadas pelo teste de Tukey.

Os dados referentes aos tempos foram submetidos à análise de regressão calculada para equações lineares e quadráticas e foram aceitas as equações significativas até 5% de probabilidade pelo teste F, com o maior coeficiente de determinação.

## **2.2 Materiais**

Cromatógrafo Líquido de Alta Resolução marca Varian modelo Pró Star  
Fermentador Shaker da marca Superohm  
Erlenmeyer graduado de 6000mL  
Centrífuga Fanen modelo Baby  
Centrífuga Fanen modelo 213 para micro-tubos  
Estufa com circulação de ar forçado marca Marconi

Reator Marca Ranazzi de 18L  
 Cromatógrafo gasoso Marca Varian modelo 3380 com detector tipo FID.  
 Balança analítica marca Mettler  
 Espectrofotômetro marca Micronal modelo B442  
 Balança semi-analítica Marca Marconi  
 Pipeta volumétrica de 20ml  
 Balão volumétrico de 10, 100ml  
 Tubos de ensaio de 5ml  
 Becker graduado de 50, 250 e 5000ml  
 Bastão de vidro  
 Proveta graduada de 250ml  
 Kit de análise de glicose enzimático  
 Compressor de ar de 120 lbs. Com filtros microbiológicos estéril.  
 Saccharomyces cerevisiae CAT-01.

### 3. Resultados e discussões

De acordo com a Figura 1, houve um aumento na concentração de etanol em função do tempo, apresentando um comportamento quadrático em função do tempo de fermentação.

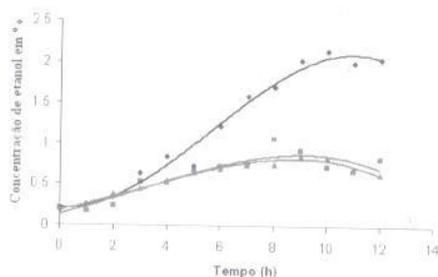
As funções estatísticas ajustadas mostraram um comportamento no índice de correlação maior que 0,85 para o sistema microaerado maior que 0,97 para o aerado e anaeróbio. Isto demonstra que ocorreu adaptabilidade do catalisador com o substrato e indica que não ocorreu limitações para nenhum dos sistemas.

Tabela 2 - Concentrações de glicerol, metanol e etanol em vinho fermentado de mandioca submetido sistemas de fermentação anaeróbia, microaerada e aeróbio.

| Tratamento  | Glicerol    | Metanol    | Etanol   |
|-------------|-------------|------------|----------|
|             | -----%----- |            |          |
| Anaeróbio   | 0,3534 a    | > 0,041394 | 1,2063 a |
| Microaerado | 0,2711 b    | > 0,009698 | 0,6106 b |
| Aeróbio     | 0,2677 b    | > 0,057275 | 0,5922 b |
| CV%         | 32,65       |            | 38,99    |

Médias seguidas de letras iguais na coluna não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste Tukey.

O DMS (diferença mínima significativa) foi de 0,3613, as médias de tratamento em função do tempo para etanol foram significativas após cinco horas de ensaio, quando a levedura começou a produzir CO<sub>2</sub> e, não tinha mais oxigênio no meio.

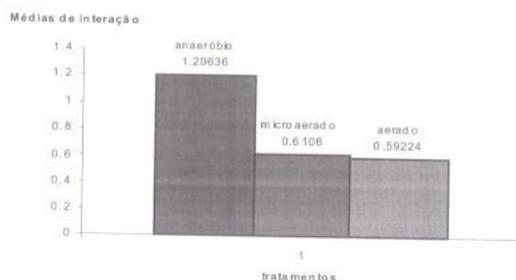


- ◆ Anaeróbico  $y = -0.0031x^3 + 0.0524x^2 - 0.0303x + 0.2211$   $R^2 = 0,9808$
- Microaerado  $y = -0.001x^3 + 0.0086x^2 + 0.0818x + 0.1393$   $R^2 = 0,8561$
- ▲ Aerado  $y = -0.001x^3 + 0.0087x^2 + 0.0697x + 0.1846$   $R^2 = 0,9750$

**Figura 1-** Gráfico da média de interação tratamento em função do tempo, de concentração de etanol.

Analisando os dados da Tabela 2, os resultados indicam que houve diferença entre os tratamentos com o decorrer do tempo e o anaeróbico mostrou-se mais eficiente, ao produzir maior quantidade de etanol após 12 horas de fermentação. O processo de fermentação em meio anaeróbico estimula a produção de etanol devido a mudanças nas rotas metabólicas da levedura que busca energia para multiplicar-se e então realiza a fermentação.

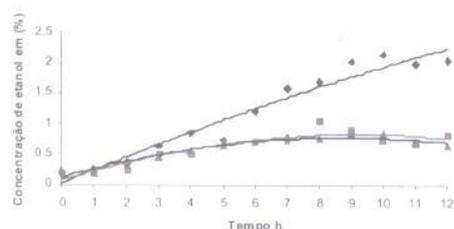
Segundo Marques (1991), a temperatura é outro fator que influencia a produção de etanol. Em experimentos com fermentação alcoólica do tipo batelada, verificou-se que a temperatura do meio deve ficar entre 26 e 32°C e, que entre 32 e 38°C são encontrados microorganismos concorrentes e prejudiciais.



**Figura 2 -** Histograma da análise qualitativa independente do tempo.

A Figura 2, mostra ao  $DMS-b = 1,0022$ , indicando que não é significativo para os processos microaerado e aerado, mostrando que o tratamento anaeróbio é superior na produção de etanol.

No gráfico da Figura 3, pode-se observar que os valores de produção de etanol para os três ensaios realizados com indicações semelhantes aos resultados obtidos em pré-testes.



◆ Anaeróbio =  $-0,0035x^2 + 0,2274x + 0,0161$   $R^2 = 0,9508$

■ Micro aerado =  $-0,0085x^2 + 0,1491x + 0,1214$   $R^2 = 0,9429$

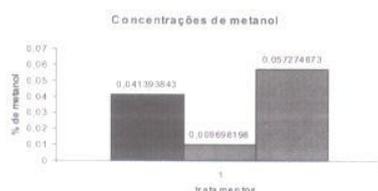
▲ Aerado =  $-0,0087x^2 + 0,1618x + 0,0756$   $R^2 = 0,8347$

**Figura 3** - Gráfico da produção de etanol com coletas de 0h a 12h, para aeróbio, microaerado e aerado.

A fermentação é uma transformação bioquímica provocada num substrato por fermento vivo ou por princípio ativo extraído deste fermento. O setor alcooleiro no Brasil utiliza-se de leveduras do gênero *Saccharomyces*, predominantemente a espécie *Saccharomyces cerevisiae* e suas diversas linhagens. Nas grandes indústrias produtoras de etanol são usadas leveduras de panificação prensadas e secas, ou leveduras selecionadas, com tolerância a altos teores de etanol e com boa velocidade de fermentação (BELLUCO, 2001).

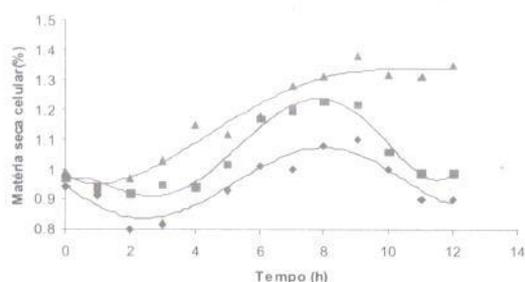
Analisando a Figura 4, a produção de metanol, os valores foram muito baixos e não teve uma uniformidade com as repetições, por se tratar de traços nos resultados.

Para o teste F não houve diferença significativa, e não houve interação entre os fatores testados. Não houve diferença mínima significativa para os tratamentos.



**Figura 4** – Gráfico das concentrações de metanol, no independente do tempo de fermentação.

Na fermentação de hidrolisado de mandioca encontra-se apenas traços de metanol, em concentração tão baixa que fica quase impossível sua detecção são denominados traços do composto, isto confere o álcool de mandioca uma qualidade para uso como álcool fino aplicado em cosméticos e farmacologia. A Figura 5, a mostra que no sistema microaerado e aeróbio a levedura realizou a via da respiração que, produz mais energia, as reações de oxirredução consistem na transferência de H<sup>+</sup> de um composto orgânico para outro, com liberação de energia. A fonte de energia mais utilizada é a glicose, os aminoácidos e os ácidos graxos fornecem mais energia, mas são menos utilizados.

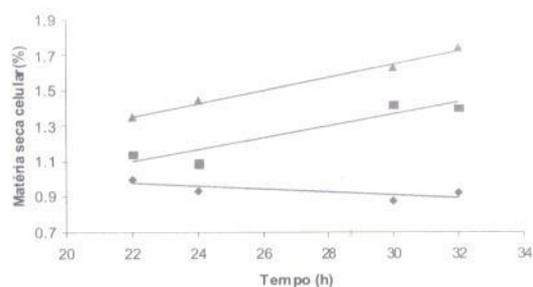


- ▲ Aerado:  $y = 0,5394 + 0,0371x$   $R^2 = 0,9914$
- Microaerado:  $y = 35,68 - 3,9433x + 0,1478x^2 - 0,0018x^3$   $R^2 = 1$
- ◆ Anaeróbio:  $y = 1,44 + 0,0597x - 0,0064x^2 + 0,0001x^3$   $R^2 = 1$

**Figura 5** - Gráfico da concentração de matéria seca celular de 0h a 12h, nos sistemas aeróbio, microaerado e aerado.

Analisando a Figura 5, observa-se que no sistema aerado a biomassa se mostrou mais estável e crescente que nos tratamentos microaerado e anaeróbio. Com os tempos de 22h a 32 h a biomassa celular manteve estabilidade ainda maior, mostrando eficiência no consumo de ar no meio.

No processo microaerado, houve uma função quadrática positiva para o crescimento, no aeróbio houve um crescimento linear, sendo este positivo, e para o anaeróbio houve uma função quadrática negativa, com o aumento do tempo houve redução de matéria seca celular, conforme apresentado na Figura 6.



▲ Aerado:  $y = 0.0371x + 0.5394 R^2 = 0.9914$

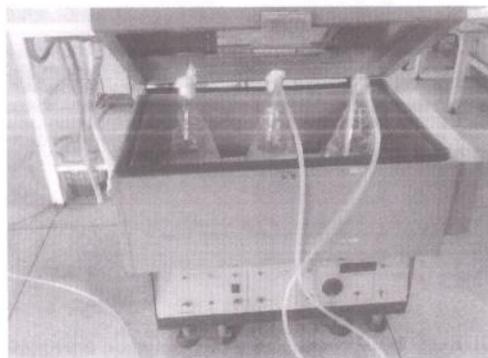
■ Microaerado:  $y = 0.0337x + 0.3532 R^2 = 0.8716$

◆ Anaeróbio:  $y = -0.0085x + 1.1603 R^2 = 0.5752$

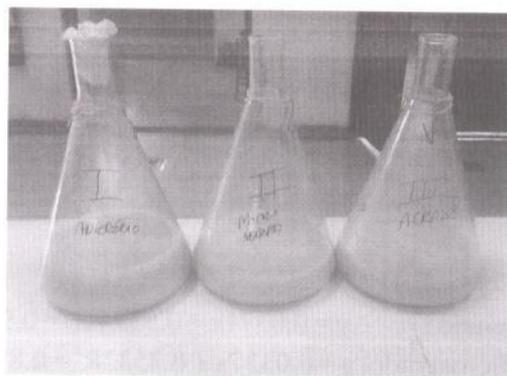
**Figura 6** – Gráfico de matéria seca celular de 22h a 32h.

Para o sistema aerado, a matéria seca celular apresentou um comportamento linear positivo, a produção de etanol foi baixa e não afetou a levedura. No sistema microaerado o comportamento da levedura foi semelhante ao aeróbio mostrando que não é necessário o excesso de ar, no sistema anaeróbio houve um comportamento linear negativo com o tempo mostrando que a concentração crescente de etanol inibiu o crescimento celular no final da curva. Segundo Lima (2001), a reprodução ocorre por gemação, esporulação ou fissão, sendo mais comum à gemação ou brotamento.

No processo de fermentação foi utilizado um fermentador com temperatura de 30°C e agitação constante de 120 rpm.



**Figura 7** – Fermentador SUPEROHRM, com os erlenmeyers utilizados no processo de fermentação.

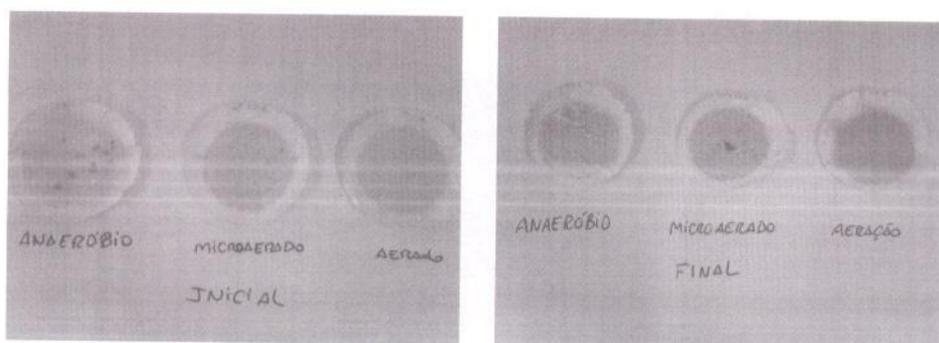


**Figura 8** - Erlenmeyers com o vinho, no final da fermentação.

Foi possível comprovar que no sistema microaerado e aerado, o volume se reduziu consideravelmente, mostrando que houve perda de material para o ambiente. Durante o desenvolvimento do experimento ocorreu produção de espuma formada pela biomassa celular, que pode ser corrigido aplicando anti-espumantes.

A biomassa celular é um indicativo para se determinar a elevação ou diminuição de leveduras no processo fermentativo.

A Figura 8 apresenta o papel de filtro contendo biomassa de 20mL de vinho nos processos iniciais e finais para cada experimento.

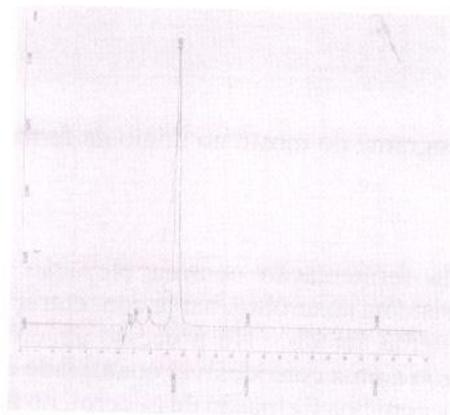


**Figura 9** - Papel de filtro contendo bolo filtrante de amostra de 20mL de vinho no início e final de fermentação.

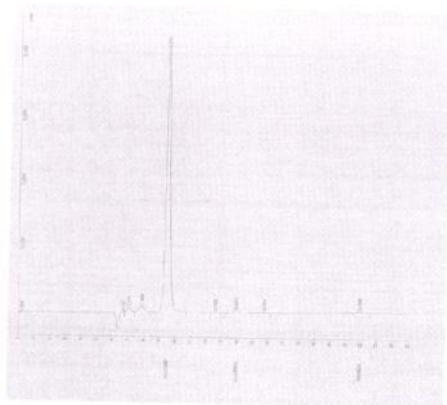
Observando a Figura 8, verifica-se aumento da biomassa celular no sistema aerado em relação aos outros.

No início da fermentação temos uma concentração de carboidrato (glicose) igual para os três sistemas, com traços de glicerol e etanol, estes cromatogramas foram gerados por cromatografia líquida de alta eficiência, com uma coluna de fase fixa do Chumbo, fluxo de  $0,6 \text{ mL min}^{-1}$  e temperatura de  $80^\circ\text{C}$ .

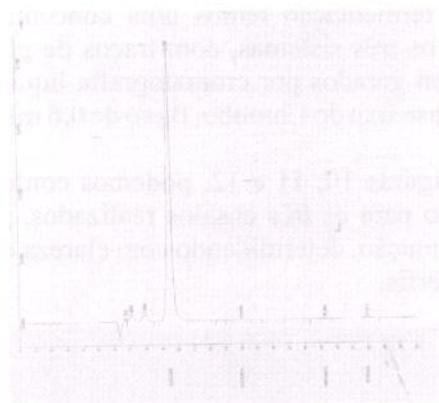
Através das Figuras 10; 11 e 12, podemos conferir as concentrações exatas de carboidrato para os três ensaios realizados, para correlacioná-los com o final da fermentação, determinando com clareza e de forma qualitativa e quantitativa estes perfis.



**Figura 10** – Cromatograma do mosto no início da fermentação, no processo anaeróbio



**Figura 11** – Cromatograma do mosto no início da fermentação, no processo micro aerado.

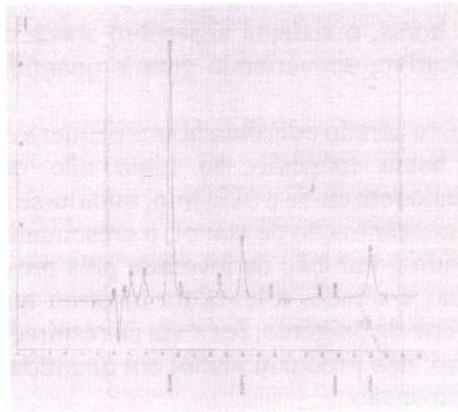


**Figura 12** – Cromatograma do mosto no início da fermentação, no processo aerado.

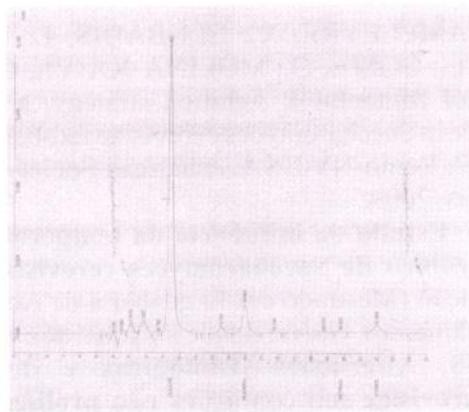
No término da fermentação ocorreu elevação da concentração de glicerol e etanol no sistema anaeróbio, baixa concentração no microaerado e, apenas traços no sistema aerado. No processo anaeróbio a quantidade de etanol formada chegou a uma considerável quantidade de substrato (glicose) que havia no sistema, com boa formação de glicerol, no processo microaerado as concentrações de etanol e glicerol ficaram praticamente iguais e, consumiram muito pouco substrato, no sistema aerado houve apenas traços de etanol e metanol mostrando que não houve conversão de substrato no produto final desejado, conforme apresentado nas Figuras 13; 14 e 15.



**Figura 13** – Cromatograma do vinho no final da fermentação, no processo aerado.



**Figura 14** – Cromatograma do vinho no final da fermentação, no processo micro aerado.



**Figura 15** – Cromatograma do vinho no final da fermentação, no processo aerado.

#### 4. Considerações Finais

De acordo com os dados apresentados pode se concluir que o sistema anaeróbio em 32 horas foi o mais eficiente para a produção de etanol.

Para os testes realizados com as condições apresentadas, foi possível comprovar que na cinética da fermentação com tempo de 5 horas, não ocorreram alterações significativas nos três sistemas.

A partir de 6 horas, o sistema anaeróbio apresentou um processo de fermentação significativo, convertendo grande quantidade de substrato em etanol.

No sistema micro aerado e aeróbio houve pequena conversão, observou-se que enquanto havia oxigênio no meio não ocorreram alterações significativas, e quando retirou-se o oxigênio, iniciou-se a produção de etanol. Com a elevação da concentração de etanol, o crescimento celular do sistema anaeróbio caiu, devido a inibição da levedura pela presença do etanol. Nos sistemas microaerado e aerado, a levedura mostrou que não utilizou a via glicolítica, com a oferta de oxigênio, fez a via da respiração celular que é mais energética e com isso, não produziu etanol em quantidade expressiva, o que levou a uma baixa conversão.

## 5. Referências

- ALFENOR, S.; CAMELEYRE, X.; BENBADIS, L.; BIDEAUX, C.; J. URIBELARREA, L.; GOMA, G.; MOLINA-JOUVE, C.; GUILLOUET, S. E.; **Appl Microbiol Biotechnol**; Aeration strategy: a need for very high ethanol performance in *Saccharomyces cerevisiae* fed-batch process, 2004. *AGRICULTURE*, 7, Remo-NV-USA: American Society of Agricultural and Biological Engineers, 2009
- ALVES, J. G. L. F. **Estudo da influência da temperatura na cinética de crescimento anaeróbico de *Saccharomyces cerevisiae***. Campinas - SP., 1996. 69p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
- BELLUCO, A.E.S, **Alterações fisiológicas e de composição em *Saccharomyces cerevisiae* sob condições não proliferantes**. 2001. 100p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz/USP. Piracicaba, 2001
- CEREDA, M.P. Caracterização dos subprodutos da industrialização da mandioca. In: CEREDA, MP. **Manejo, uso tratamentos de subprodutos da industrialização da mandioca**. São Paulo: Fundação Cargill, 2001, p. 13-37.
- LEHTONEM, M.; JOURNELA-ERIKSSON, P. Volatile and non-volatile compounds in the flavour of alcoholic beverages. In: PIGGOTT, J. R. **Flavour of distilled beverages: Origin and Development** Flórida: Verlag Chemie International Inc., 1983.p.64-78.
- LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZONI, W. ; SCHIMIDELL, W. Porcessos Fermentativos In : **Biotecnologia Industrial Processos fermentativos e enzimáticos**. São Paulo: E. Blucher, 2001, v. 3, p. 90-122.

---

MARC, A., ENGASSER, J.M., MOLL, M., FLAYEUX, R. A kinetics model of Starch hydrolysis by alfa and beta amylase during mashing. **Biotechnology Bioeng.**, v.25, p. 481-496, 1983.

MERCIER, C. Les enzymes amylolytiques - Dans hydrolases et dépolymérasés. **Enzymes d'intérêt industriel**, A Mouranche et C Costes Ed., Paris, France, Gauthier-Villars Bordas, 109-142, 1985.

SILVA, F. de A. S. e & Azevedo, C.A.V. de. **Principal components Analysis in the Software Assistat-Statistical Attendance**. In WORLD CONGRESS ON COMPUTERS IN AGRICULTURE, 7, Remo-NV-USA: American Society of Agricultural and Biological Engineers, 2009.

SUOMALAINEN, H; LEHTONEM, M. The production of aroma compounds by yeast. **Journal of the Institute of Brewing**, London, v. 85, p.149 - 156, 1979.