



AVANÇOS TECNOLÓGICOS NO PROCESSO INDUSTRIAL DE ETANOL A PARTIR DA CANA DE AÇÚCAR UTILIZANDO ENERGIA DE ULTRASSOM.

Glauciane R.S. **Doutor da Silva**¹; Michele N. **Berteli**³; Daniel I.P. **Atala**³; Antonio **Marsaioli, Jr.**³; Maria Isabel **Berto**²

Nº 12223

RESUMO

Com o objetivo de reduzir a dependência dos combustíveis fósseis, muitos países têm incentivado e financiado programas de pesquisas em novas tecnologias ao longo da cadeia produtiva do etanol visando, com sua implementação, criar uma expansão da produção desse biocombustível. Além disso, diversos outros fatores convergem para o favorecimento da ampliação do uso do etanol, sendo eles: reconhecimento mundial das consequências ambientais devidas ao aquecimento global decorrente do uso de combustíveis fósseis, o custo de produção ser competitivo com a gasolina além do etanol a partir da cana de açúcar ter a maior produtividade por unidade de área e o melhor balanço energético, entre outros. O Brasil ocupa uma posição de prestígio no cenário mundial, sendo o maior exportador de etanol e principal produtor de açúcar, fator que têm incitado estudos e pesquisas por todo o país que visem contribuir para a melhoria do desempenho do processo fermentativo industrial através da implantação de tecnologias limpas. Neste âmbito, uma vertente de estudo é o uso da energia de ultrassom no processo fermentativo. Pesquisas mostraram que a aplicação do ultrassom de baixa intensidade pode incitar a atividade de enzimas, estimular o crescimento das células e aumentar a permeabilidade celular. A partir desse cenário o presente trabalho teve como objetivo o estudo exploratório da aplicação do ultrassom de baixa intensidade em ensaios de fermentação com levedura *Saccharomyces cerevisiae* para avaliar a influência dessa aplicação no rendimento fermentativo. O ultrassom foi aplicado combinando-se os parâmetros tempo de estímulo, tempo de intervalo e tempo total de aplicação. Os resultados apresentados são ainda exploratórios e indicam que realmente a aplicação do ultrassom influencia o processo fermentativo, havendo ainda a necessidade de confirmar a faixa operacional dos parâmetros do ultrassom que interferem positivamente na fermentação.

1 .Bolsista CNPq: Graduação em Eng. de Alimentos, UNICAMP, Campinas-SP, glaucianedoutor@hotmail.com

2 .Orientadora: Pesquisadora, GEPC/ITAL, Campinas-SP.

3 .Colaborador: Pesquisador, GEPC/ITAL, Campinas-SP.



ABSTRACT

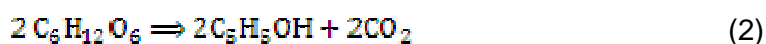
Aiming at reducing the dependence from fossil fuels, many countries are stimulating and financing research programs on new technologies along the productive chain of ethanol, towards the implementation of means to expand such a bio-fuel production. Besides that, several other factors converge to favoring a greater usage of ethanol: worldwide knowledge of environmental consequences from the global warming caused by the widespread use of fossil fuels; competitive production cost as compared to the gasoline production; higher productivity of ethanol from sugarcane per unit area and the best energy balance, among others. Brasil occupies a position of prestige within the world scenery, as the main ethanol exporter and principal sugarcane producer, a condition that is promoting studies and research around the country aiming at improving the performance of the industrial fermentative processes through the implementation of clean technologies. In this concern, one of the study aspects is the use of ultrasound energy in the fermentative process. A few research works have shown that the application of low intensity ultrasound leads to incite the enzyme activity, to stimulate the cells growth and to increase the cellular permeability. Thus, the present work had as its objective the preliminary study of low intensity ultrasound application to fermentation experiments with *Saccharomyces cerevisiae* yeast in order to evaluate the influence of this treatment on the fermentative yield. Ultrasound was applied by combining the parameters stimulation time, interval time and total time of application. The results obtained up to now are still of a exploratory nature, but suggest that ultrasound application really influences the fermentative process, lacking from now on to confirm the operational range of ultrasound parameters which are responsible for a positive interference to the fermentation.

INTRODUÇÃO

O Brasil é hoje o maior exportador mundial de etanol e o principal produtor de açúcar, contando com 437 usinas produtoras localizadas principalmente na região centro-sul e nordeste do país (Unica, 2011). A fermentação alcoólica ocorre por meio de um complexo sistema de reações enzimáticas no microrganismo que transforma a glicose em CO₂ e etanol pela via anaeróbia. Esse processo pode ser dividido em três fases com características distintas: preliminar (fase lag), fermentação principal (fase



exponencial) e pós-fermentação (fase estacionária e declínio). A primeira etapa consiste na adaptação da levedura e multiplicação das células com consequente consumo de açúcares e lenta produção de álcool. A segunda etapa caracterizada pela intensa produção de álcool e liberação de CO₂, aumento da temperatura, a qual deve ser controlada, progressivo aumento de espumas e elevação da acidez do mosto. A fermentação principal cessa quando diminui a liberação de gás e, consequentemente, a turbulência característica do mosto. Na pós-fermentação verifica-se a diminuição da temperatura, elevação da acidez e a diminuição da atividade de fermentação da levedura pela ação do acúmulo de determinadas substâncias, do esgotamento dos carboidratos e das toxinas dos contaminantes. (Corazza, 2001; Alcarde, 2012). As equações 1 e 2 descrevem esse mecanismo de fermentação.



Através da estequiometria das reações e dos pesos moleculares dos compostos envolvidos determina-se o rendimento teórico de 1,05% na conversão da sacarose por peso em glicose (Eq. 1) e de 51,1% na conversão de glicose em etanol e gás carbônico (Eq. 2). Esse último valor apresentado é conhecido por coeficiente de Gay-Lussac, pesquisador que quantificou esse rendimento pela primeira vez. Através dos experimentos realizados por Luis Pasteur, averigou-se que o máximo rendimento possível de obter durante uma fermentação é de 94,7% do rendimento teórico, o que representa 48,4% de conversão de glicose em etanol (Bu'lock e Kristiansen, 1991).

O ultrassom é uma onda mecânica, com frequência superior a 16 kHz e imperceptível aos ouvidos humanos, sendo uma das maneiras mais naturais de transferência de energia. A energia mecânica é transformada em onda que irradia energia e a transfere através de vibrações das moléculas do meio no qual esteja viajando (Lirani, 2004; Zanella, 2006).

É usual a aplicação de ultrassom de alta intensidade visando a inativação enzimática, destruição de micro-organismos (Chemat et al., 2011; Bettsa et al., 2004; Sinisterra, 1992), porém algumas pesquisas também demonstram o promissor efeito no ultrassom de baixa intensidade em incitar a atividade de enzimas, estimular o crescimento de células e melhorar a permeabilidade na parede celular (Lanchun et al., 2003; Wood et al., 1997; Chisti, 2003; Mason et al., 1996 e Chu et al., 2000).



6º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica - CIIC 2012
13 a 15 de agosto de 2012– Jaguariúna, SP

Um estudo da influência do uso de ultrassom de baixa intensidade durante a atividade da *S. cerevisiae*, mostrou um aceleração no crescimento nas fases lag e exponencial sob condições apropriadas, mas não mostrou influência no crescimento da levedura durante a fase estacionária (Lanchun et al., 2003). A aplicação do ultrassom como um meio de auxílio ao processo de iogurte acarretou uma redução de mais de 40% no tempo de processo (Mason, 1998).

Este trabalho visou avaliar a viabilidade de aplicação de ultrassom de baixa intensidade durante o processo fermentativo, com o propósito de estimular a atividade da levedura e aumentar a eficiência da produção de etanol.

MATERIAIS E MÉTODO

Solução modelo

Para ser possível avaliar o efeito do ultrassom, sem outras interferências do meio optou-se por utilizar nos testes uma solução modelo a partir de água e sacarose, padrão analítico da marca Shynth, com concentrações de 150 ou 100 g/L, acrescida de extrato de levedura (1% em volume), da marca Difco, e sulfato de magnésio (2,5% em volume), da marca Shynth, compostos básicos para desenvolvimento da levedura. A utilização de soluções modelo é uma alternativa viável em pesquisas quando se objetiva evitar interferências na avaliação de um tratamento específico e, além disso, pode simplificar os testes, diminuir os custos e evitar o desperdício de matéria-prima sem que haja uma significativa alteração dos resultados obtidos. (Berto et al., 2003; Augusto et al., 2009). A solução foi esterilizada a 121°C por 15 minutos em autoclave horizontal, marca Phoenix modelo AB.

Levedura:

Utilizou-se *Saccharomyces cerevisiae* liofilizada isolada pela usina Santa Adélia, denominada SA. A levedura liofilizada foi hidratada em 500 ml de água destilada estéril e mantida sobre agitação por 30 minutos.

Nos ensaios F1 e F2 utilizou-se 60 gramas de levedura liofilizada enquanto que nos ensaios F3, F4 e F5 utilizou-se 56,25 gramas da levedura. Essa mudança ocorreu porque o volume da solução modelo também foi reduzido, para que a fermentação completa pudesse ocorrer durante 8 horas.

Ensaios experimentais:

Um sistema de fermentação de bancada foi montado utilizando um reator de vidro, com 1,7 litros de capacidade, acoplado com um agitador, da marca Merse e modelo IKS RW 20 digital, um sensor de temperatura (termopar tipo J) e um condensador na saída de CO₂, evitando assim a perda de etanol por arraste. Esse sistema é apresentado na Figura 1.

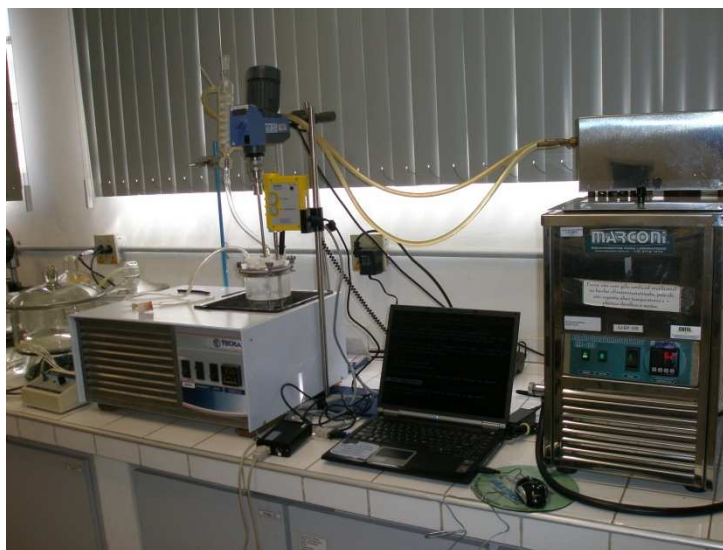


Figura 1- Sistema de Fermentação de bancada.

Após a inserção da solução modelo e da levedura já hidratada, de maneira asséptica em câmara de fluxo laminar, o reator foi submerso em um banho termostático para a manutenção constante da temperatura em 33°C (Tecnal, modelo TE-184). O Banho Marconi, modelo MA184 forneceu água na temperatura de 15°C ao condensador do sistema.

Nos ensaios em que foram aplicados ultrassom, foi inserido um probe conectado com um gerador de ultrassom de baixa potência, modelo UP50H, da marca Hielscher, que tem como potência teórica máxima de saída 50 W. Ainda segundo o fabricante, a potência máxima atingida em solução aquosa é 45W. Os parâmetros configuráveis neste equipamento são: amplitude, que é potencia a ser aplicada, sendo um percentual de 50W; períodos “on” e “off”, correspondente ao tempo de aplicação e não aplicação do ultrassom; e o ciclo, que é a porcentagem de tempo de aplicação “on” dentro do período total “on + off”. A configuração dos parâmetros dos ensaios realizados teve como principal referência trabalho de Lanchun et al (2003). Neste trabalho foram testadas várias condições e a aplicação de ultrassom de baixa



6º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica - CIIC 2012
13 a 15 de agosto de 2012– Jaguariúna, SP

intensidade durante a fase lag da fermentação da *S. cerevisiae* apresentou os resultados mais positivos em relação ao aumento de sua atividade.

A aplicação de ultrassom foi realizada sempre após decorridos os primeiros 30 minutos de fermentação. Visando avaliar somente a influência da combinação dos tempos on, off e tempo total de aplicação, a amplitude foi fixada em 66% (29,7 W) e ciclo de 100% em um volume de 1,5L de meio. Esta energia acarreta uma densidade de 19,8 W/L, valor dentro da melhor faixa aplicada em Lanchun et al (2003).

Foram realizadas 5 fermentações sendo 2 sem aplicação de ultrassom, F1 e F2, e as restantes com diferentes combinações de tempo de aplicação. A Tabela 1 mostra as condições de aplicação do ultrassom e a energia total aplicada no sistema em cada teste. Esta energia total foi um parâmetro fornecido pelo aplicador de ultrassom após a finalização das aplicações.

Tabela 1. Parâmetros de configuração dos testes com aplicação de ultrassom

Teste	Tempo on (s)	Tempo off (s)	Tempo total (s)	Energia total aplicada (Ws)
F3	1	29	1800	2066,13
F4	30	15	900	26101,33
F5	15	30	900	22703,31

As fermentações foram realizadas por 8 horas sendo retiradas amostras em intervalos de aproximadamente uma hora. As amostras retiradas foram imediatamente centrifugadas, em centrífuga de bancada, a 7000 rpm por 15 minutos e posteriormente filtradas por membrana (Millex 0,22 µm) garantindo assim a completa retirada das células de levedura. Após esse tratamento as amostras foram congeladas e assim mantidas até análise.

Análise das amostras:

As amostras foram analisadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) através do equipamento Waters e2695 acoplado a um Refractive Index Detector 2414. A fase móvel utilizada foi ácido sulfúrico 0,01 N e o tempo de corrida foi igual a 28 minutos.

Os resultados obtidos mostram a evolução da fermentação através do monitoramento da concentração de açúcares (sacarose, glicose e frutose) e de etanol presentes em cada amostra.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As Figuras 2 e 3 mostram os gráficos da cinética das fermentações obtidos pela análise por HPLC levando em consideração o consumo dos açúcares redutores totais (ATR) e a produção de etanol, respectivamente.

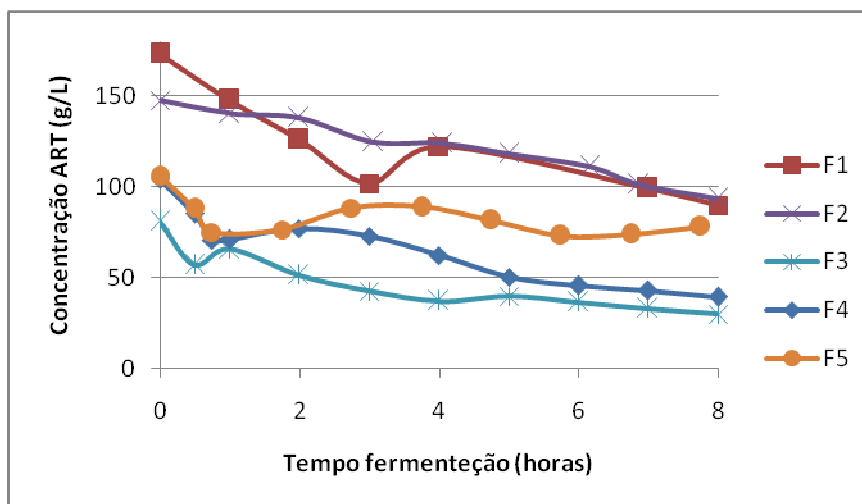


Figura 2- Gráfico de consumo de Açúcar Redutor Total (ART) por tempo de fermentação

Através da Figura 2 observa-se que o tempo de fermentação de 8 horas não foi suficiente para o consumo total dos açúcares presentes, mesmo quando a concentração inicial de sacarose foi reduzida de 150 (F1 e F2) para 100 g/L (F3, F4, F5). Este fato pode ser indicativo que o tempo de hidratação da levedura por meia hora pode não ter sido suficiente para ativação total da mesma e indica também a necessidade de continuar o processo fermentativo por tempo suficiente para o consumo total do açúcar.

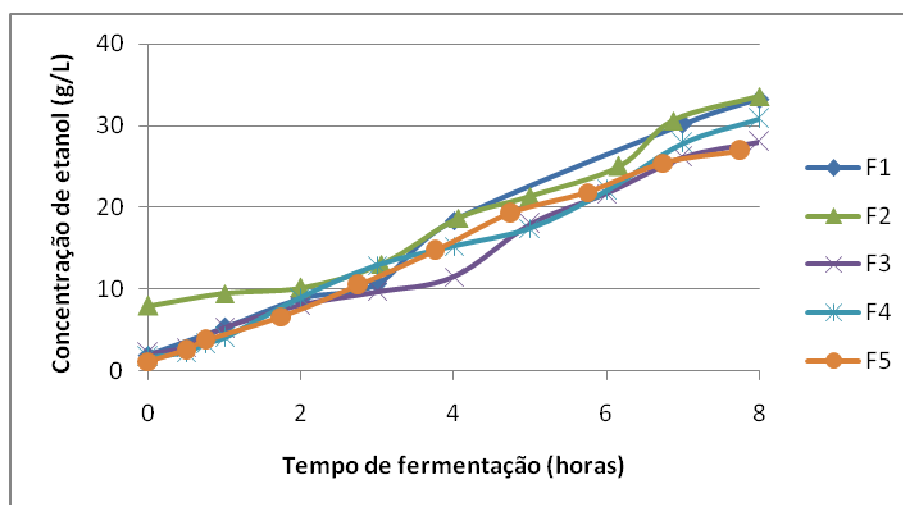


Figura 3- Gráfico da produção de etanol por tempo de fermentação



6º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica - CIIC 2012
13 a 15 de agosto de 2012– Jaguariúna, SP

A Figura 3 apresenta o perfil de produção de etanol das cinco fermentações. A não estabilização deste perfil num patamar confirma que o processo foi interrompido ainda na fase acentuada de produção de etanol.

Para avaliar o efeito do ultrassom foi calculado rendimento das fermentações através do parâmetro $Y_{p/s}$, que relaciona a produção de etanol (p) em razão do consumo de substrato (s), que no caso é o total de açúcares redutores (ART). Conforme citado anteriormente, na conversão teórica total de um processo fermentativo obtém-se um $Y_{p/s} = 0,511$, entretanto, na prática o valor máximo constatado é de 0,484. A Tabela 2 apresenta os valores de rendimento $Y_{p/s}$ e a concentração de açúcares redutores remanescente ao final das 8 horas de cada fermentação realizada.

Tabela 2. Rendimento fermentativo e percentual de açúcares redutores totais (ART) remanescente.

Teste	$Y_{p/s}$	% ART remanescente
F1	0,37	59,9
F2	0,47	62,3
F3	0,51	29,9
F4	0,45	39,5
F5	0,33	47,9

Mesmo $Y_{p/s}$ sendo um valor relativo, a porcentagem de ART remanescente de no mínimo 40% interfere numa análise mais conclusiva dos resultados obtidos. A diferença considerável entre as duas fermentações sem aplicação de ultrassom levam à necessidade de realizar mais testes sem ultrassom para que se obtenha uma media experimental representativa. Considerando o consumo de açúcar, constata-se que as fermentações com aplicação de ultrassom consumiram maior porcentagem de ART em relação às fermentações sem ultrassom. O alto valor de $Y_{p/s}$ na fermentação 3 pode indicar uma interferência positiva da aplicação do ultrassom no processo, enquanto os rendimentos das fermentações 4 e 5 podem indicar que a energia aplicada excedeu o limite de estimulação da levedura, não interferindo (F4) ou até diminuindo a eficiência da mesma (F5).



6º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica - CIIC 2012

13 a 15 de agosto de 2012– Jaguariúna, SP

CONCLUSÃO

Os resultados apresentados são ainda exploratórios, confirmam que a aplicação do ultrassom interfere no processo fermentativo, porém não convergem à uma conclusão mais efetiva no sentido de indicar as melhores condições de aplicação.

O grau de inovação do escopo deste trabalho, as dificuldades encontradas durante o estudo e o curto tempo para execução dos ensaios após a chegada do equipamento justificam a não execução de mais testes durante este período e a necessidade da continuidade dos ensaios experimentais para confirmação e elucidação dos resultados obtidos até o momento, bem como para otimização das melhores condições de aplicação de ultrassom, no sentido de aumentar a produtividade de etanol no processo fermentativo.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPQ – PIBIC, pela bolsa concedida. Ao GEPC – ITAL, pela oportunidade de estágio.

À FAPESP pelo apoio financeiro (Projeto BIOEN-FAPESP 2008/58047-4).

Ao Dr. Alfredo de Almeida Vitali pela colaboração no projeto.

Ao doutorando Thiago Inácio B. Lopes e sua orientadora Profª. Dra. Anita J. Marsaioli, do IQ/ UNICAMP, pela participação nas análises por HPLC.

REFERÊNCIAS

Alcarde, A. R. **Fermentação**. Disponível em: <Disponível em: <EMBRAPA>. Acesso em: FEVEREIRO/ 2012.>.

Augusto, P. E. D.; Tribst, A. A. L. e Cristianini, M. Thermal inactivation of lactobacillus plantarum in a model liquid food. **Journal of Food Process Engineering**, 2009.

Berto, M. I.; Gratão, A. C. A.; Silveira Junior, V. e Vitali, A. A. Solução modelo de Sacarose e CMC: análise do tempo de hidratação, caracterização reológica e estabilidade térmica. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.6, n.107, p.9-14, 2003.

Bettsa, G. D.; Williams, A. e Oakley, R. M. Inactivation of Food-borne Microorganisms using Power Ultrasound. **Ultrasonic standing waves**, p.2202-2208, 2004.

Bu'lock, J. e Kristiansen, B. **Biotecnologia Basica**. Zaragoza: Editorial Acribia S.A., 1991. 557p.

Chemat, F.; Zill-E-Humaa e Khan, M. K. Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation and extraction **Ultrasonics Sonochemistry**, v.18, n.4, p.813-835, 2011.

Chisti, Y. Sonobioreactors: using ultrasound for enhanced microbial productivity. **Trends in Biotechnology**, v.21, n.2, p.89-93, 2003.



6º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica - CIIC 2012

13 a 15 de agosto de 2012– Jaguariúna, SP

- Chu, J.; Li, B.; Zhang, S. e Li, Y. On-line ultrasound stimulates the secretion and production of gentamicin by *Micromonospora echinospora*. **Process Biochemistry**, v.35, p.569-572, 2000.
- Corazza, M. L. R., D. G. E Nozaki, J. Preparação e caracterização do vinho de laranja. **Química Nova**. 2001. v. 24, p.449-452.
- Lanchun, S.; Bochu, W.; Liancai, Z.; Jie, L.; Yanhong, Y. e Chuanren, D. The influence of low-intensity ultrasonic on some physiological characteristics of *Saccharomyces cerevisiae* **Colloids and Surfaces**, v.30, n.1-2, p.61-66, 2003.
- Lirani, A. P. R. **Estudo comparativo dos efeitos do ultra-som e do laser de baixa intensidade no reparo ósseo de tíbia de ratos**. São Carlos, Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo, 2004.
- Mason, T. J. **Power ultrasound in food processing – the way forward. Ultrasound in Food Processing**. London: Academic & Professional, Edited by Povey, M. J. W., Mason, T. J., Blackie, 1998. 105-126p.
- Mason, T. J.; Paniwnyk, L. e Lorimer, J. P. The uses of ultrasound in food technology **Ultrasonics Sonochemistry**, v.3, n.3, p.S253-S260 1996.
- Sinisterra, J. V. Application of ultrasound to biotechnology: an overview. **Ultrasonics**, v.30, n.3, p.180-185, 1992.
- Unica. **Produção de etanol do Brasil** Disponível em: <<http://www.unica.com.br/dadosCotacao/estatistica>>. Acesso em: Abr/2011.
- Wood, B. E.; Aldrich, H. C. e Ingram, L. O. Ultrasound stimulates ethanol production during the simultaneous saccharification and fermentation of mixed waste office paper. **Biotechnology Progress**, v.13, n.3, p.232-237, 1997.
- Zanella, F. P. **Sistema multicanal de geração e recepção de ondas ultrassônicas para transdutor matricial linear**. Campinas, 2006. Dissertação de Mestrado. Unicamp - Faculdade de engenharia elétrica e de computação.