

Efeitos de parâmetros de fermentação na produção de etanol a partir de resíduo líquido da industrialização da mandioca (manipueira)

Priscila Aparecida Suman¹, Luíz Henrique Urbano¹, Magali Leonel^{2*} e Martha Maria Mischan³

¹Programa de Pós-graduação em Energia na Agricultura, Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, São Paulo, Brasil. ²Centro de Raízes e Amidos Tropicais, Universidade Estadual Paulista, Rua José Barbosa de Barros, 1780, 18610-307, Botucatu, São Paulo, Brasil. ³Departamento Bioestatística, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, São Paulo, Brasil. *Autor para correspondência. E-mail: mleonel@cerat.unesp.br

RESUMO. A manipueira, resíduo líquido resultante do processamento da fécula e da farinha de mandioca, apresenta potencial poluidor reconhecidamente elevado. Visando uma possível utilização da manipueira como matéria-prima para obtenção de etanol, neste trabalho objetivou-se avaliar o efeito da porcentagem de levedura inoculada e da temperatura sobre os componentes do vinho. A manipueira caracterizada para o teor de amido, açúcares solúveis, pH e acidez titulável foi hidrolisada pela ação de enzimas Termamyl 120 L e AMG 300 L, sendo o hidrolisado obtido fermentado em diferentes condições. Foi utilizado o delineamento fatorial do tipo central composto rotacional com duas variáveis independentes (2²) e a metodologia de superfície de resposta para avaliar os resultados. Os produtos de cada etapa foram caracterizados em cromatografia líquida. Os resultados obtidos mostraram efeito significativo dos parâmetros variáveis sobre os componentes do vinho. As condições de baixa temperatura de fermentação e menores porcentagens de levedura inoculada foram as mais adequadas para a obtenção de etanol de manipueira.

Palavras-chave: mandioca, resíduo, etanol, cromatografia.

ABSTRACT. Effect of fermentation parameters on ethanol production from cassava liquid residue (manipueira). “Manipueira”, a liquid residue from the processing of cassava starch and flour, has recognized high pollution potential. Aiming at a possible use of “manipueira” as raw material for ethanol production, this study aimed to evaluate the effect of the percentage of inoculated yeast and fermentation temperature on the chromatographic profile of the components of wine of “manipueira”. The residue was characterized for starch and sugar content, as well as pH and total acidity. The residue was hydrolyzed by the action of enzymes Termamyl 120 L and AMG 300 L. The hydrolysate obtained was fermented under different experimental conditions. A factorial central composite design (2²) with two independent variables and the response surface methodology were used to evaluate the results. The results showed a significant effect of variable parameters on the components of wine. The conditions of low fermentation temperature and lower percentages of inoculated yeast were the most appropriate to obtain ethanol from “manipueira”.

Keywords: cassava, residue, ethanol, chromatography.

Introdução

A busca por aprimoramentos no sistema de produção é uma atividade básica e constante, sendo fundamental promover melhorias que ampliem as condições de sustentabilidade do setor, diminuindo os impactos da produção no meio ambiente.

Na industrialização da mandioca são gerados diversos resíduos, tais como casca, farelo e manipueira, que é o resíduo líquido. Na maioria das indústrias, a manipueira gerada tem como destino as

lagoas de estabilização, permanece depositada sob ação de agentes naturais, tais como fotodecomposição, precipitação e atividade microbiana local, sem haver qualquer tratamento adicional no sentido da otimização do processo para o aproveitamento como subproduto.

A manipueira, resíduo líquido resultante do processamento da fécula e da farinha de mandioca, apresenta potencial poluidor reconhecidamente elevado. De acordo com Barana e Cereda (2001),

para cada tonelada de raiz processada nas farinheiras são gerados 300 L de manipueira com uma demanda química de oxigênio (DQO) de 60 g L⁻¹.

Quanto à composição, a manipueira caracteriza-se por sua elevada carga orgânica e presença de cianeto (CN⁻) resultante da hidrólise dos glicosídeos cianogênicos presentes na mandioca, que durante o processamento são carregados para o líquido residual. Segundo Damasceno et al. (2001), a composição média da manipueira em carbono é: 58,18 g L⁻¹ de açúcares totais dos quais 37,96 g L⁻¹ de açúcares redutores (com 14,90 g L⁻¹ de frutose; 22,34 g L⁻¹ de glicose e 0,72 g L⁻¹ de maltose) e 20,22 g L⁻¹ de açúcares não-redutores (1,52 g L⁻¹ de dextrinas e 18,70 g L⁻¹ de sacarose). Já Leonel e Cereda (1995) relatam a presença de 5,71% de amido e 2,93% de açúcares redutores totais na manipueira coletada na prensa, antes do processo de decantação.

Uma alternativa para o aproveitamento da manipueira como subproduto seria o uso como matéria-prima para a obtenção de etanol.

Na produção de etanol, a partir de manipueira, é necessário o processo de hidrólise e sacarificação do amido presente, pois este carboidrato não é diretamente fermentável necessitando de uma hidrólise prévia de suas cadeias para a obtenção de glicose.

O processo de hidrólise enzimática do amido é realizado em duas etapas: a liquefação e a sacarificação. No processo de liquefação, os grânulos de amido são dispersos em solução aquosa, aquecidos (causando a gelatinização) e hidrolisados parcial e irreversivelmente, com auxílio de uma α -amilase. Após a liquefação, a solução de maltodextrina é hidrolisada a glicose por uma enzima desramificante, seja endoenzima (isoamilase e pululanase) ou uma exoenzima (β -amilase e glicoamilase). O resultado dessa segunda etapa é uma solução de sacarídeos de baixo peso molecular como glicose e maltose (MAAREL et al., 2002).

A habilidade de converter açúcares em etanol é característica de um pequeno grupo de microrganismos, sendo *Saccharomyces cerevisiae*, dentre as leveduras, a que mais se destaca pela alta produção e tolerância a concentrações elevadas de etanol (SCHWAN; CASTRO, 2001).

Muitos são os fatores que exercem efeito significativo sobre o rendimento ou eficiência da fermentação: a qualidade da matéria-prima, as condições fisiológicas do inóculo e fatores ambientais como pH, nível inicial de contaminantes, temperatura, concentração do substrato no mosto, composição nutricional do mosto e concentração do álcool produzido (HORII, 1978).

Diante do exposto, este trabalho teve por objetivo avaliar o efeito da concentração inicial de leveduras e temperatura de fermentação no perfil de componentes do vinho.

Material e métodos

A manipueira foi coletada diretamente na etapa de prensagem da massa ralada na farinha Plaza Ind. Alim. Ltda, localizada no município de Santa Maria da Serra, Estado de São Paulo. A manipueira foi caracterizada quanto ao pH, acidez titulável, açúcares redutores (AACC, 1983) e amido (ISO, 1987).

O processo de hidrólise-sacarificação foi realizado em reator em aço inox com capacidade de 30 L, controle de temperatura e agitação. Em 18 kg de manipueira foi adicionado hidróxido de sódio 4 M para a correção do pH para 6,28 e 70 ppm de Ca⁺⁺ e, em seguida, a enzima Termamyl 120 L na concentração de 0,5 g kg⁻¹ de amido. A temperatura foi elevada até 90-95°C, permanecendo nesta sob agitação por 2h. Decorrido este período, a temperatura foi abaixada para 60°C, o pH foi corrigido com ácido sulfúrico 4 M até 4,5, sendo então adicionada a enzima AMG 300 L na concentração de 1,13 mL kg⁻¹ de amido e permanecendo nesta temperatura sob agitação por 24h.

O perfil dos açúcares do hidrolisado foi analisado em HPLC, marca Varian modelo pró-star com duas bombas binárias e índice de refração (detector) com amostrador automático, sendo a coluna de marca BIORAD, modelo AMINEX HPX 87P (fase estacionária Pb) 300 x 0,25 mm, utilizando como fase móvel água e fluxo da amostra de 0,6 mL min⁻¹, na temperatura de 80°C.

Os perfis em área foram convertidos em concentração (g L⁻¹) a partir dos padrões. As soluções padrões foram feitas a partir de soluções PA dos açúcares: glicose, frutose, maltose e sacarose em concentrações de 1 a 10 g L⁻¹.

A partir de 18 L de hidrolisado de manipueira foi realizado o processo de fermentação, o qual foi conduzido em frascos de Erlenmeyers de 4 L, com 1,5 L de hidrolisado, colocados em incubadora refrigerada com agitação de 100 rpm.

O processo seguiu o delineamento central composto rotacional para dois fatores, segundo Barros Neto et al. (2007), com um total de 11 tratamentos (Tabela 1).

Os parâmetros temperatura de fermentação e porcentagem de inóculo (levedura), estabelecidos como variáveis independentes, foram estudados em três níveis codificados como -1, 0 e +1. Este delineamento apresenta também dois níveis de

variáveis axiais que são codificadas como $-a$ e $+a$. O valor depende do número fatorial ($F = 2^k$) do delineamento e do número de variáveis independentes ($K = 2$), sendo o valor definido pela equação: $a. = (F)^{1/4} = (2^k)^{1/4} = 1,4142$

Os parâmetros fixos do processo foram a agitação da incubadora refrigerada (110 rpm) e o tempo de fermentação (20h).

Tabela 1. Parâmetros variáveis do processo de fermentação.

Axiais	Níveis		
	Codificados	Fatores ou variáveis independentes	
		Temperatura (°C)	Levedura (%)
	1,41	19	1,0
	-1	22	1,5
	0	27	3,0
	+1	32	4,5%
	+1,41	35	5,0%

Após o processo de fermentação, as amostras foram centrifugadas para separação do vinho fermentado e da levedura. As análises dos açúcares residuais, etanol, metanol e glicerol foram realizadas em HPLC. A coluna utilizada para detecção dos compostos foi a AMINEX HPX 87H (fase estacionária H+) 300 x 0,25 mm, sendo utilizado como fase móvel ácido sulfúrico 0,001 N, fluxo da amostra 0,6 ml min.⁻¹ e temperatura de 50°C. Os perfis em área dos componentes dos vinhos foram convertidos para concentração (g L⁻¹), a partir de soluções padrões.

O processamento dos dados e a análise estatística foram realizados com o auxílio do RSREG e do STEP-WISE do sistema SAS (SAS, 2003). A significância do modelo foi testada pela análise de variância (ANOVA). Foi adotado o nível de significância de 5%.

Para análise dos resultados experimentais, a metodologia descreve o comportamento de um sistema no qual estão combinadas as variáveis independentes (X_k) e a variável dependente ou resposta (Y_i). A resposta é função dos níveis nos quais estes fatores foram combinados e definidos, conforme Box e Wetz (1973): $Y_i = F(X_1, X_2, \dots, X_k)$.

Por meio de uma análise de regressão, pôde ser ajustado para cada resposta (Y) um polinômio de segunda ordem com as variáveis explicativas.

$$Y_i = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{12} X_1 X_2 + \varepsilon$$

onde,

Y_i = função resposta;

X_1, X_2 = valores das variáveis independentes;

β_0 = coeficiente relativo à intercepção do plano com o eixo de resposta;

β_1, β_2 = coeficientes lineares estimados pelo método dos mínimos quadrados;

β_{11}, β_{22} = coeficiente das variáveis quadráticas;

β_{12} = coeficiente de interação entre as variáveis independentes;

ε = erro experimental.

Na construção das superfícies de resposta, duas variáveis independentes variaram dentro das regiões estudadas e a terceira foi mantida fixa no ponto central, sendo os gráficos de superfície de resposta construídos no programa Estatística (STATSOFT, 1995).

Resultados e discussão

A composição química da manipueira é variável, dependendo da variedade da mandioca utilizada, que por sua vez está correlacionada com as condições climáticas e de solo do local onde é cultivada.

As análises da manipueira mostraram que esta apresentava 10,5% de matéria seca, sendo 6,3% amido e 1,96% de açúcares solúveis totais. A acidez titulável encontrada foi de 12 mL NaOH 1N/100 g e o pH 5,6. Leonel e Cereda (1995), caracterizando a manipueira armazenada à temperatura ambiente, encontraram no resíduo armazenado por 24h 13,06% de matéria seca, 5,4% de amido e pH 4,0.

Após o processo enzimático de hidrólise e sacarificação, a análise do perfil de açúcares do hidrolisado indicou a presença de glicose (2,13%), maltose (2,88%), frutose (3,09%) e sacarose (0,2%).

A fermentação tem três fases distintas: fase preliminar (4h), em que ocorre uma rápida multiplicação celular com baixa produção de CO₂ e pouco aumento da temperatura; fase principal ou turbulenta (12-16h), em que há alta produção de CO₂ e etanol e com atividade celular; redução na densidade e aumento na acidez, na quantidade de álcool e temperatura, e fase final (4-6h), que se caracteriza pela diminuição da intensidade de desprendimento do CO₂, por menor agitação do líquido e diminuição da temperatura (LEA; PIGGOTT, 2003; LIMA et al., 2001).

O açúcar que se encontra no mosto é utilizado pela levedura para a produção de etanol, gás carbônico, massa celular, ácidos succínico e acético, glicerol, álcoois superiores, ésteres, aldeídos, entre outros produtos (BRAGA, 2006).

A análise do perfil de componentes do vinho indicou a presença de etanol com concentrações que variam de 3,14 a 4,08%; metanol (0 a 0,1%); glicerol (0,03 a 0,35%); frutose (0,03 a 0,65%); glicose (0,03 a 0,04%); sacarose (0,04 a 1,02%) e maltose (0,04 a 0,77%) (Tabela 2).

Tabela 2. Componentes do vinho de manipueira nas diferentes condições experimentais.

Codificadas		Variáveis independentes		Variáveis dependentes (%)						
X1	X2	Reais		etanol	metanol	glicerol	frutose	glicose	sacarose	maltose
		Levedura (%)	Temperatura (°C)							
-1	-1	1,5	22	3,14	0,06	0,03	0,06	0,03	0,04	0,06
-1	1	1,5	32	3,78	0,07	0,03	0,06	0,03	0,1	0,62
1	-1	4,5	22	3,76	0,07	0,04	0,28	0,04	0,09	0,6
1	1	4,5	32	4,02	0,1	0,03	0,06	0,03	0,09	0,62
-1,41	0	1	27	3,28	0,07	0,03	0,06	0,04	0,1	0,67
1,41	0	5	27	3,83	0,07	0,038	0,033	0,04	0,09	0,04
0	-1,41	3	19	4,08	0,07	0,03	0,05	0,04	0,09	0,58
0	1,41	3	35	3,86	0,07	0,03	0,55	0,04	0,09	0,514
0	0	3	27	3,74	0,07	0,34	0,64	0,04	1,02	0,74
0	0	3	27	3,64	0	0,35	0,6	0,04	0,96	0,64
0	0	3	27	3,24	0	0,35	0,65	0,04	1,03	0,77

A análise dos coeficientes de regressão indicou não ter ocorrido efeito dos parâmetros variáveis sobre os teores de etanol, glicose e maltose. Para o teor de metanol no vinho foram observados os efeitos quadráticos dos dois parâmetros estudados, bem como, da interação destes. Já para os demais componentes (glicerol, frutose e sacarose) foi observado o efeito quadrático da porcentagem de levedura inoculada e da temperatura de fermentação sobre o teor destes componentes no vinho de manipueira (Tabela 3).

Tabela 3. Coeficientes de regressão (modelo $y_k = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_{12} x_1 x_2$) para os parâmetros analisados no vinho de manipueira.

Parâmetros	Variáveis dependentes						
	Etanol	Metanol	Glicerol	Frutose	Glicose	Sacarose	Maltose
β_0	3,54	0,02	0,35	0,63	0,04	1,003	0,7166
β_1	0,24	0,005	0,003	0,023	0,001	0,003	-0,0437
β_2	0,074	0,005	-0,0012	0,061	-0,0012	0,007	0,061
β_{11}	0,019	0,025*	-0,157***	-0,307***	-0,002	-0,459***	-0,175
β_{22}	0,182	0,025*	-0,159***	-0,180**	-0,002	-0,461***	-0,079
β_{12}	0,095	0,005**	-0,0025	-0,055	-0,0025	-0,015	-0,135
R ²	0,6652	0,6091	0,995	0,835	0,373	0,997	0,4771

β_1 = levedura (linear); β_2 = temperatura (linear); β_{11} = levedura (quadrático); β_2 = temperatura (quadrático); β_{12} = levedura x temperatura (interação); R² = coeficiente de determinação. * = p < 0,1; ** = p < 0,05; *** = p < 0,01.

As Figuras 1 e 2 indicam que nas condições centrais de porcentagem de levedura inoculada e temperatura de fermentação são obtidos os menores teores de metanol e os maiores valores de glicerol.

Segundo Lopes et al. (2005), a obtenção do fermentado se dá pela fermentação alcoólica, por difusão, que é o tipo de fermentação em que se obtêm essencialmente etanol, mas que compreende um grupo de reações onde são produzidos também outros alcoóis, como o metanol, por exemplo.

A temperatura é um dos parâmetros mais importantes que afetam a fermentação, influenciando o metabolismo da levedura e a produção de compostos voláteis. A realização da fermentação em baixas temperaturas indica, como efeito inicial, o prolongamento da fase Lag, assim

como a formação de alguns outros metabólitos como o glicerol, e a assimilação e metabolismo de nitrogênio se modificam nestas condições (BRAGA, 2006).

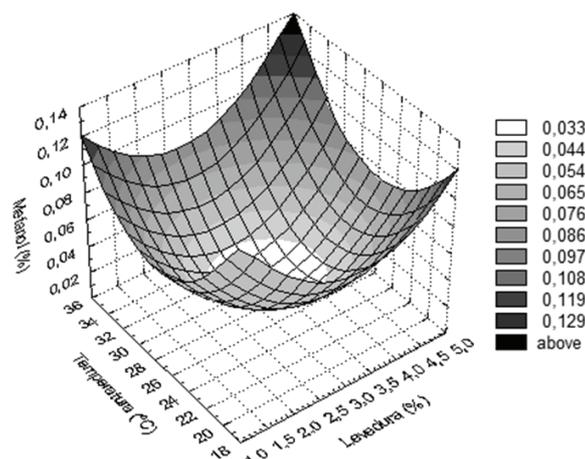


Figura 1. Efeito da porcentagem de levedura inoculada e da temperatura de fermentação sobre o teor de metanol no vinho de manipueira.

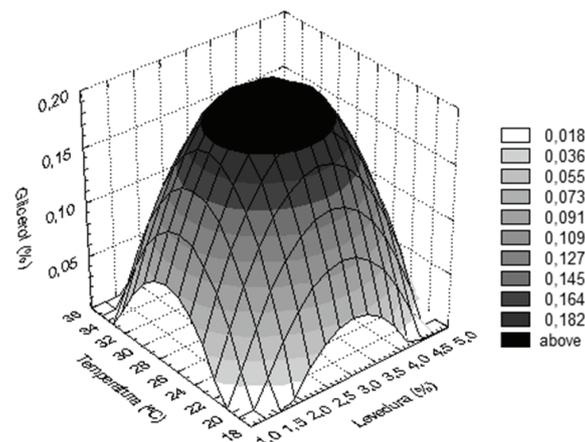


Figura 2. Efeito da porcentagem de levedura inoculada e da temperatura de fermentação sobre o teor de glicerol no vinho de manipueira.

Geralmente, a maior produção de glicerol resulta em menor produção de álcool e menor rendimento do processo. De acordo com a literatura, a

concentração de glicerol é afetada pela temperatura de fermentação e diminui com o abaixamento da mesma (BALLI et al., 2003).

Na fermentação bem sucedida, praticamente todo o açúcar é convertido em etanol; contudo, é normal que uma pequena porcentagem seja convertida em outros subprodutos.

As superfícies de resposta dos modelos ajustados mostram que nas condições extremas de porcentagem de levedura e temperatura são observados os menores teores de açúcares residuais no vinho. Já nas condições centrais dos dois fatores são observados os maiores teores de açúcares residuais (Figuras 3 e 4).

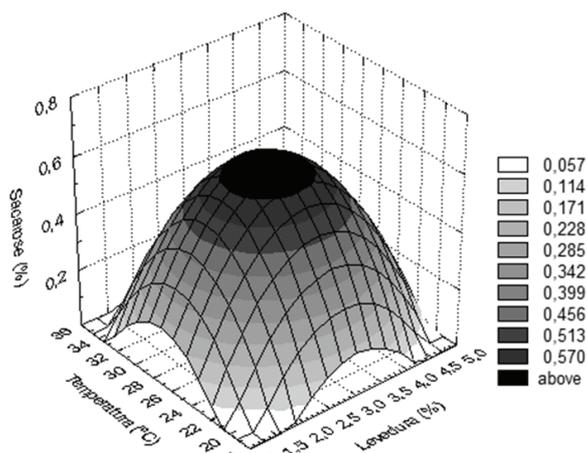


Figura 3. Efeito da porcentagem de levedura inoculada e da temperatura de fermentação sobre o teor de sacarose no vinho de manipueira.

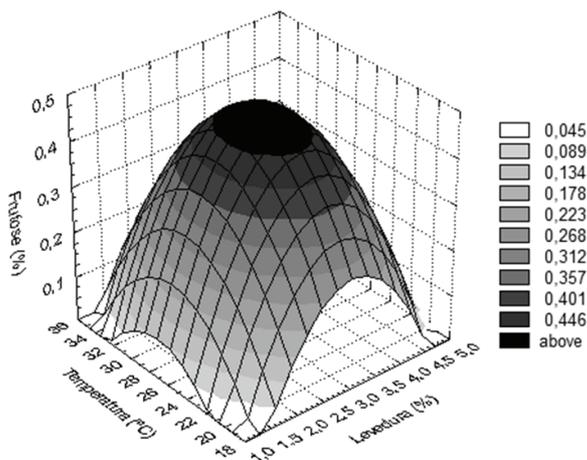


Figura 4. Efeito da porcentagem de levedura inoculada e da temperatura de fermentação sobre o teor de frutose no vinho de manipueira.

Conclusão

A partir dos resultados obtidos, é possível concluir que as condições de baixa temperatura de fermentação e menores porcentagens de levedura

inoculada são as mais adequadas para a obtenção de destilado alcoólico de manipueira.

Referências

- AACC-American Association of Cereal Chemists. **Approved methods of the American Association of Cereal Chemists**. 7th ed. Rev. St. Paul: Minnesota, 1983.
- BALLI, A.; FLARI, V.; SAKELLARAKI, E.; SCHOINA, V.; ICONOMOPOULOU, M.; BEKATOROU, A.; KANELAKI, M. Effect of yeast cell immobilization and temperature on glycerol content in alcoholic fermentation with respect to wine making. **Process Biochemistry**, v. 39, n. 4, p.499-506, 2003.
- BARANA, A. C.; CEREDA, M. P. Avaliação do tratamento de manipueira de farinhas em biodigestores fase acidogênica e metanogênica. **Energia na Agricultura**, v. 4, n. 15, p. 69-81, 2001.
- BARROS NETO, B.; SCARMÍNIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos** – Pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria. 3. ed. Campinas: Unicamp, 2007.
- BOX, G. E. P.; WETZ, J. **Criteria for judging adequacy of estimation by an approximate response function**. Wisconsin: University of Wisconsin, 1973. (Tec. Report. n. 9).
- BRAGA, V. S. **A influência da temperatura na condução de dois processos fermentativos para produção de cachaça**. 2006. 90f. Dissertação (Mestrado em Ciências)-Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006
- DAMASCENO, S.; CEREDA, M. P.; PASTORE, G. M.; OLIVEIRA, J. G. Compostos de aroma por *Geotrichum fragans* cultivado em manipueira. In: CEREDA, M. P. (Ed.). **Manejo, uso e tratamento de subprodutos da industrialização da mandioca**. São Paulo: Fundação Cargill, 2001. v. 4, p. 96-106.
- HORII, J. Problemas especiais de fermentação alcoólica. Fermentações industriais, biodegradação e transformações microbianas no solo. **Sociedade Brasileira de Microbiologia**, v. 4, n. 17, p. 70-74, 1978.
- ISO-International Organization for Standardization. **Norme internationale: Rice- Determination of amylase content**. Genève: ISO Central Secretariat, 1987. (ISO, 6647).
- LEA, A. G. H.; PIGGOTT, J. R. **Fermented beverage production**. New York, Boston, Dordrecht, London, Moscow: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2003.
- LEONEL, M.; CEREDA, M. P. Manipueira como substrato na biossíntese de ácido cítrico por *Aspergillus niger*. **Scientia Agricola**, v. 52, n. 2, p. 299-304, 1995.
- LIMA, U. A.; BASSO, L. C.; AMORIM, H. V. Produção de etanol. In: LIMA, U. A. (Coord.). **Biotecnologia industrial: Processos Fermentativos e Enzimáticos**. São Paulo: Edgard Blücher, 2001. p. 1-43. (Biotecnologia Industrial, v. 3)
- LOPES, R. V. V.; ROCHA, A. S.; SILVA, F. L. H.; GOUVEIA, J. P. G. Aplicação do planejamento factorial para otimização do estudo da produção de fermentado da

palma forrageira. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 7, n. 1, p. 25-32, 2005.

MAAREL, M. J. E. C.; VEEN, B.; UITDEHAAG, J. C. M.; LEEMHUIS, H.; DIJKHUIZEN, L. Properties and applications of starch-converting enzymes of the α -amylase family. **Journal of Biotechnology**, v. 94, n. 2, p. 137-155, 2002.

SAS Institute Incorporation. **The SAS for Windows, release 9.1**. Cary, 2003.

STATSOFT. **Statistic for Windows, release 5.0**. Tulsa, 1995.

SCHWAN, R. F.; CASTRO, H. A. Fermentação. In: CARDOSO, M. G. (Ed.). **Produção de aguardente de cana de açúcar**. Lavras: UFLA, 2001. p. 113-128.

Received on January 21, 2010.

Accepted on February 23, 2011.

License information: This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.