

## CULTIVO CONTÍNUO DE *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* EM PRODUÇÃO DE ETANOL EM MEL INVERTIDO CLARIFICADO COM RECICLO DE CÉLULAS

Esther Rabbers (PIBIC/CNPq/FA/Uem), José Eduardo Olivo (Orientador), e-mail: ra103467@uem.br.

Universidade Estadual de Maringá / Centro de Tecnologia/Maringá, PR.

### Engenharias/Engenharia Química/Processos Bioquímicos

**Palavras-chave:** *Saccharomyces cerevisiae*, etanol, fermentação

#### Resumo:

O objetivo desse projeto foi identificar a interferência do reciclo de células em ensaios de fermentação contínua utilizando *Saccharomyces cerevisiae* para a produção de etanol. Primeiro, foi estudado a diferença de vazão nos ensaios e sua influência na estabilidade do processo, para depois escolher o melhor método para reciclo. Foi identificado nos dois primeiros ensaios sem reciclo, que a concentração de células diminui durante a fermentação devido a saída junto com o mosto, aumentando a concentração de açúcares e diminuindo a produção de etanol, logo, diminuindo também a eficiência da fermentação. Depois, utilizou-se o método de reciclo de células por membranas Millipore (1,2  $\mu\text{m}$ ), porém não foram eficientes ao filtrar devido seus pequenos poros ficarem sobrecarregados. Utilizou-se então o método de centrifugação do mosto de saída, devolvendo praticamente todas as células que saíam ao reator.

#### Introdução

O etanol é uma fonte de energia alternativa, substituto dos combustíveis fósseis que se encontram cada vez mais em falta, e, por isso, grande alvo de pesquisas. Pode-se obtê-lo através da fermentação alcoólica de açúcares utilizando microorganismos. Estes açúcares podem ser extraídos da cana-de-açúcar para a produção de etanol utilizando no processo de inversão de sacarose em glicose e frutose.

O processo de fermentação pode ser feito de forma descontínua, descontínua alimentada, semicontínua ou contínua. Na fermentação descontínua a solução nutriente esterilizada no fermentador é inoculada com microrganismos e incubada no instante inicial. No processo descontínuo alimentado, um ou mais nutrientes são adicionados ao fermentador durante o cultivo e os produtos permanecem até o final da fermentação. No processo semicontínuo, coloca-se no reator o meio de fermentação e o inóculo, retira-se parte do meio fermentado após o término da fermentação, mantendo-se o restante do mosto no reator e adiciona-se um novo meio de fermentação com volume equivalente àquele retirado.

A fermentação contínua caracteriza-se por possuir uma alimentação continua de meio de cultura a uma determinada vazão constante, sendo o volume de reação mantido constante através da retirada continua de caldo fermentado. (BORZANI et al 2001). Há muitas vantagens no processo de fermentação contínua, como, por

exemplo, manter estável o estado de cultura sob ótimo crescimento e produção em condições próprias por longos períodos de tempo, reduzindo o investimento de capital do fermentador, e ter a oportunidade de maximizar a eficiência de sua utilização quando há um ou mais nutrientes sendo alimentados. Porém, por causa dos longos períodos de operação, há alta suscetibilidade de contaminação, exigindo maiores cuidados com a esterilidade do meio, e perda de micro-organismos na retirada do fermentado, sendo necessária a manutenção da fisiologia do agente microbiano (devido a possibilidades de mutações) e com a homogeneidade do meio de cultivo. (COONEY, 1986). Para minimizar a perda de microrganismos, utiliza-se o reciclo de célula.

O objetivo deste trabalho é, então, estudar o melhor método de reciclo para células e sua influência na produção de etanol em processo contínuo através de *Saccharomyces cerevisiae*.

## Materiais e métodos

### *Materiais*

Foi aplicado como inóculo a *Saccharomyces cerevisiae* da marca Itaiquara, uma levedura seca, mesófila e aeróbia facultativa. O mel utilizado nos experimentos foi disponibilizado pela Usina Santa Terezinha - Unidade Iguatemi, e foi invertido com a enzima invertase. Para esterilização dos vidros e do meio de cultura foi utilizada autoclave. O reator foi um fermentador da marca Tecnal com volume total de 5L, cuja temperatura foi mantida constante em 32°C durante todo o experimento. Para destilação, foi operado um microdestilador da marca Tecnal. Para analisar a concentração de célula e ART, usou-se um espectrofotômetro da marca Scimadzu. Para analisar a concentração de etanol foi manuseado um cromatógrafo Agilent.

### *Métodos*

#### *Preparação do mel*

O mel deve ser diluído, nutrido, invertido e esterilizado antes da fermentação. Nutre-se o mel com ureia [concentração 0,5g L<sup>-1</sup>] e KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> [concentração 1,17g L<sup>-1</sup>]. A inversão é realizada utilizando 0,02% de enzima em relação a massa de sacarose presente no mel e 5% em volume de tampão pH 4,5. O mel é deixado em banho a 50°C com agitação durante 2h até que toda sacarose tenha se invertido em glicose e frutose. Esse processo de hidrólise da sacarose é utilizado a fim de liberar glicose e frutose para serem consumidas para a produção de etanol sem a necessidade do microrganismo ter de produzir/secretar enzimas para realizar esta hidrólise (SILVA, 2016). Após a inversão, o mel e todas as vidrarias utilizadas durante o ensaio são esterilizados em autoclave por 20 min e 1 atm.

#### *Fermentação*

No reator montado com todas as suas peças já esterilizadas, adiciona-se o mel diluído com os nutrientes, as leveduras em suspensão e água destilada na quantidade calculada para a concentração final desejada. Retira-se uma amostra inicial para análise e então inicia-se o ensaio com o reator vedado.

#### *Análise de concentração celular (Olivo, 1985)*

A levedura é ressuspensa, centrifugada e lavada por 3 vezes. Dilui-se a amostra para que a concentração de células fique entre  $0,1 \text{ g L}^{-1}$  e  $10 \text{ g L}^{-1}$ . O espectrofotômetro deve ser usado com comprimento de onda de 610 nm.

#### *Análise de concentração de glicose*

Dilui-se a amostra para que a concentração do sobrenadante esteja entre  $0 \text{ g L}^{-1}$  e  $1 \text{ g L}^{-1}$ . Adiciona-se 2 mL de reagente GOD-PAP a 0,1 mL de amostra. Leva-se a banho Dubnhofer a  $37^\circ\text{C}$  por 15 min. Adiciona-se 3 mL de água destilada e usa-se o espectrofotômetro com comprimento de onda de 525 nm.

#### *Análise de concentração de açúcares redutores totais (ART)*

Dilui-se a amostra para que a concentração do sobrenadante esteja entre  $0 \text{ g L}^{-1}$  e  $1 \text{ g L}^{-1}$ . Adiciona-se 2,5 mL de DNS a 0,5 mL de amostra. Levar à banho de água fervente por 10 min para inativar as leveduras restantes e resfriar após por 5 min. Adiciona-se 3 mL de água destilada e lê-se no espectrofotômetro com comprimento de onda de 600 nm.

#### *Análise de concentração de frutose*

Subtrai-se a medida de concentração de ART pela concentração de glicose.

#### *Análise de concentração de etanol*

Injeta-se 1  $\mu\text{L}$  da amostra no cromatógrafo após a microdestilação, em que é completado o volume de destilado para 10 mL (igual ao volume de sobrenadante inserido no microdestilador). O cromatógrafo deve ser usado com tempo de retenção de 3 min.

## Resultados e Discussão

O estudo começou analisando a interferência da variação da vazão no processo, utilizando mel invertido por hidrólise não clarificado, afim de comparar posteriormente a influência da clarificação na fermentação. Foi preparado, então, 2 ensaios com diferença de vazão.

### *Ensaio 1*

#### Planejamento:

- Tempo de duração do período descontínuo alimentado: 1h52min
- Vazão de entrada do período descontínuo alimentado:  $24,5 \text{ mL min}^{-1}$
- Tempo de duração do período descontínuo: 1h48min
- Tempo de duração do período contínuo: 5h20min
- Vazão de entrada/ Vazão de saída do período contínuo: 12,5 ml/min
- Concentração de açúcar inicial [S]:  $178 \text{ g min}^{-1}$
- Concentração de célula inicial [X]:  $23 \text{ g min}^{-1}$

#### Resultados:

Durante o processo contínuo, houve uma queda da concentração celular de aproximadamente  $17,2 \text{ g L}^{-1}$  devido à alta vazão de saída. Esta quantidade é significativa para a produtividade da fermentação.

Ao fim do período descontínuo, percebe-se que a célula havia consumido quase toda glicose no reator. Ao iniciar o contínuo, a glicose passou a sobrar no reator devido à perda de célula pela saída. Ao desligar a bomba de entrada devido à instabilidade, a concentração de glicose diminui, indicando maior consumo. Depois de ligá-la novamente, a concentração voltou a subir.

Ao contrário da glicose, percebe-se na Figura 1 que a célula não consumiu toda frutose ao fim do período descontínuo. Isso aconteceu porque a levedura consome glicose e frutose ao mesmo tempo, porém possui uma preferência pela glicose. A sobra de frutose até o fim do período contínuo também pode ser percebida, influenciada pelo decréscimo da concentração de células.

O etanol atingiu seu pico de produção um pouco antes do fim do período descontínuo. Ao longo do processo contínuo permaneceu praticamente constante até o ponto 15, mas depois houve uma queda na concentração. Pode-se destacar que isso ocorreu logo após a instabilidade do volume do mosto no reator. Segue abaixo a Figura 1 como o gráfico das concentrações do ensaio 1:

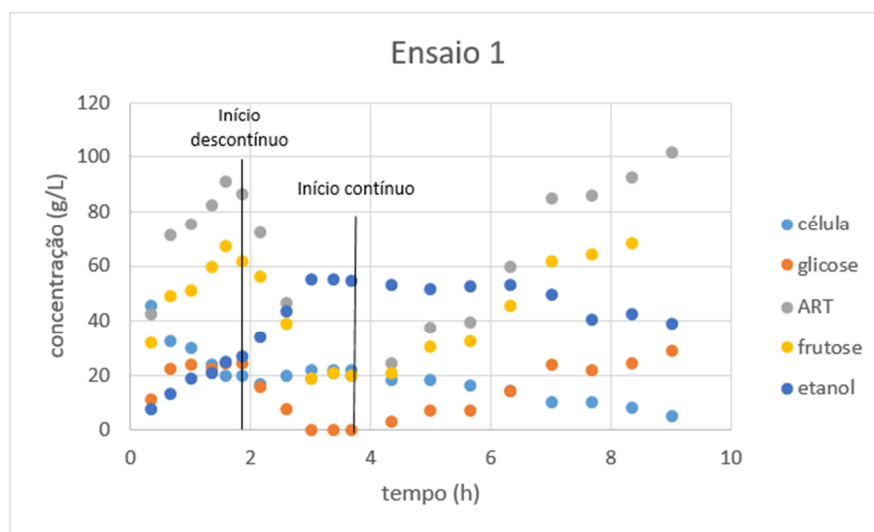


Figura 1. Resultados das concentrações das substâncias do Ensaio 1

## Ensaio 2

### Planejamento:

- Tempo de duração do período descontínuo alimentado: 51 min
- Vazão de entrada do período descontínuo alimentado:  $54 \text{ mL min}^{-1}$
- Tempo de duração do período descontínuo: 2h39min
- Tempo de duração do período contínuo: 5h20min
- Vazão de entrada/ Vazão de saída do período contínuo:  $14 \text{ mL min}^{-1}$
- Concentração de açúcar inicial [S]:  $178 \text{ g L}^{-1}$
- Concentração de célula inicial [X]:  $23 \text{ g L}^{-1}$

### Resultados:

Após o início do processo contínuo, também houve um decréscimo na concentração de levedura de  $17,9 \text{ g L}^{-1}$  causado pela alta vazão de saída.

A glicose é quase totalmente consumida no fim do período descontínuo, mas após o início do contínuo ela passou a sobrar. Devido à diminuição do volume do mosto no reator, percebe-se novamente uma queda da concentração, mas, após o volume retornar ao original, o comportamento do gráfico na Figura 2 indica que a glicose praticamente não é mais consumida.

A concentração de açúcares redutores totais cresceu após o início do processo contínuo, sofreu uma queda devido à instabilidade do volume do mosto, e após isso a concentração subiu, indicando que a levedura consome menos a glicose e a frutose.

A concentração de etanol atingiu seu máximo no fim do processo descontínuo. A produção ficou constante nos primeiros instantes do contínuo, aumentou após a diminuição do volume do mosto, e caiu significativamente após voltar a estabilidade, pois a concentração de células também caiu. Segue abaixo a Figura 2 com o gráfico das concentrações do ensaio 2:

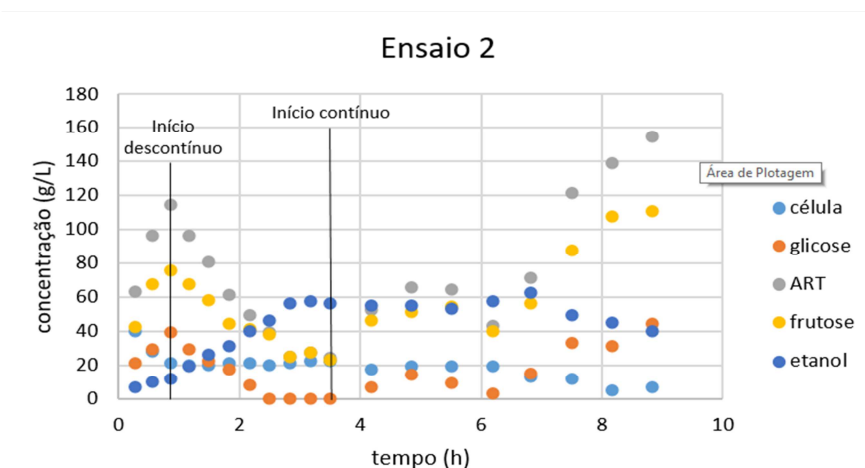


Figura 2. Resultados das concentrações das substâncias do Ensaio 2

## Conclusões

Através destes 2 ensaios foi possível perceber que qualquer instabilidade no processo pode interferir no andamento da fermentação. Realizando uma análise mais profunda, percebe-se que quando o volume do reator diminuiu devido à alguma variação nas bombas de entrada ou saída, a levedura consumiu uma maior quantidade de açúcares. Consumindo mais açúcar, a produção de etanol também aumentou.

Também é possível perceber que ao longo do processo contínuo, devido à saída de mosto, a concentração de célula diminuiu significativamente. Logo, açúcar passou a sobrar e a produção de etanol também diminuiu.

## Agradecimentos

Agradeço ao professor doutor José Eduardo Olivo, por ter me oferecido este projeto de pesquisa, me instruindo e passando seus conhecimentos com muita dedicação e paciência, e a Fundação Araucária pela bolsa oferecida.

Agradeço ao Victor Henrique Silva e ao Fernando Henrique da Silva por terem me auxiliado durante o projeto enquanto realizavam seu mestrado e doutorado, respectivamente.

## Referências

- BORZANI, W., SCHMIDELL, W., LIMA, U. A., AQUARONE, E. **Biotecnologia Industrial – Volume 2: Engenharia Bioquímica**. São Paulo, Edgard Blucher, 2001
- COONEY C.L. **Continuous Culture: A Tool for Research, Development and Production**. In: Alani D.I.; Moo-Young M. (eds) Perspectives in Biotechnology and Applied Microbiology. Springer, Dordrecht. 1986..
- SILVA, F. H. **Cultivo de *saccharomyces cerevisiae* em processos descontínuo e descontínuo alimentado utilizando mel invertido para produção de etanol**. 2016. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2016.
- 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 Raspa de Mandioca**. 1985. Dissertação (Mestrado), Universidade de São Paulo, São Paulo, 1985.