

Cultivo Contínuo de *Saccharomyces cerevisiae* em Produção de Etanol com Mel Invertido Clarificado

Fernanda Liu, José Eduardo Olivo

Resumo: O presente trabalho teve, por objetivos, a realização de fermentação contínua para produção de etanol pela levedura *Saccharomyces cerevisiae*, avaliando as concentrações de massa celular, substrato, glicose e produto presentes no reator ao longo do tempo. Para tanto, foram utilizados um reator tanque agitado contínuo (CSTR), melação como substrato, bem como foram empregadas metodologias de análise como espectrofotometria e cromatografia a gás. Assim, constatou-se que a máxima velocidade específica de crescimento celular foi de $0,12 \text{ h}^{-1}$, a concentração final de substrato no meio foi de, aproximadamente, $12,3 \text{ g/L}$ e a de glicose $3,42 \text{ g/L}$, gerando uma concentração final de etanol de $45,7 \text{ g/L}$. Não obstante, observou-se que a produtividade de etanol com relação ao substrato foi de $0,45 \text{ g de etanol/g de substrato}$, resultado que revela a importância e vantagem do emprego do processo fermentativo contínuo.

Palavras chave: Fermentação contínua, Etanol, Melação, Levedura.

Continuous cultivation of yeast *Saccharomyces cerevisiae* in ethanol production from inverted and clarified molasses

Abstract: The present research aimed to apply a continuous fermentation process for ethanol production from yeast *Saccharomyces cerevisiae*, assessing parameters such as cellular mass, substrate, glucose and product concentrations in the reactor over time. To reach the goals of this project, a continuous stirred-tank reactor (CSTR) was used, with molasses as substrate. In order to analyze the experiments' results, spectrophotometry and gas chromatography methodologies were applied. Thereby, the maximum specific growth rate obtained in the experiments was $0,12 \text{ h}^{-1}$, and also the final concentrations of remaining substrate, glucose and ethanol in the reactor were, approximately, $12,3 \text{ g/L}$, $3,42 \text{ g/L}$ and $45,7 \text{ g/L}$, respectively. Nevertheless, the result of ethanol yield from substrate was $0,45 \text{ g of ethanol/g of substrate}$, indicating the significance and advantage of using the continuous fermentation process.

Key-words: Continuous fermentation, Ethanol, Molasses, Yeast.

1. Introdução

No ramo de processos fermentativos, é possível utilizar diferentes tipos de micro-organismos para a produção de produtos, como antibióticos, enzimas, etanol, dentre outros. No caso da produção de etanol, especificamente, pode-se afirmar que a via fermentativa é a mais relevante para a obtenção dessa substância no Brasil (BORZANI et al., vol. 2, 2001), sendo as rotas sintética e destilatória menos favoráveis econômica e ambientalmente para o país.

Para a produção do etanol, é possível empregar diferentes substratos, como matérias primas açucaradas, amiláceas e feculentas, ou até mesmo celulósicas, a exemplo da obtenção de etanol de segunda geração (CGEE, 2009). No Brasil, observa-se que a cana de açúcar, uma matéria prima açucarada, é a mais amplamente empregada na produção de etanol, contudo também é possível obter esse composto a partir de substratos como beterraba, melação, sorgo sacarino, palhas, bagaço, dentre outros.

As matérias primas açucaradas, largamente aplicadas, podem ser diretamente

fermentescíveis ou não. Em geral, é necessária a etapa de hidrólise do carboidrato, denominada inversão, para que a fermentação possa ocorrer, sendo os substratos açucarados que precisam dessa etapa chamados de não diretamente fermentescíveis (BORZANI et al., vol. 2, 2001). Além da etapa de hidrólise, faz-se necessário também preparar o mosto e o inóculo, para que se estabeleça as condições do meio fermentativo e se obtenha os resultados desejados, em termos de rendimento e produtividade.

A fermentação alcoólica é um processo anaeróbio, que ocorre com a transformação de um açúcar em etanol e gás carbônico no interior de um micro-organismo, como as leveduras. Dessa forma, existem diversos fatores que influenciam esse processo, sejam estes físicos (temperatura, pressão, aeração), químicos (pH) ou microbiológicos (contaminação, concentração de levedura), bem como as condições de operação (batelada, contínuo, semi contínuo ou descontínuo alimentado) (BORZANI et al., vol. 3, 2001). Tais aspectos afetam o rendimento e a produtividade dos processos fermentativos e, por isso, devem ser previamente definidos e controlados ao longo do tempo, de acordo com as características mais favoráveis de operação para cada sistema em estudo, no que diz respeito a micro-organismos, tipo de reator, substrato, dentre outros aspectos.

Para se evitar problemas microbiológicos, por exemplo, torna-se necessário realizar etapas de esterilização e assepsia, seja pela mudança de temperatura, exposição à radiação ultravioleta ou outros mecanismos que possibilitem a remoção de agentes patogênicos ou contaminantes que possam afetar o micro-organismo em estudo e influenciar negativamente no rendimento do processo.

Desse modo, o estudo da aplicabilidade de micro-organismos para a geração de produtos desejados e de relevância no mercado, como o etanol, torna-se importante, devendo-se, portanto, considerar os aspectos econômicos, ambientais, e fatores que influenciam no processo como um todo. Dessa forma, o presente trabalho teve, por objetivo geral, a produção de etanol por fermentação contínua, a partir de mel invertido clarificado, utilizando levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Os objetivos específicos consistiram em determinar o teor de etanol por cromatografia em fase gasosa, bem como quantificar os açúcares redutores totais, glicose e determinar o crescimento celular, em cada etapa do processo fermentativo.

2. Metodologia

2.1. Materiais

Melaço da Usina de Santa Terezinha, unidade Iguatemi (PR), foi utilizado como substrato do processo fermentativo. Foram utilizados também a enzima invertase, levedura seca *Saccharomyces cerevisiae*, autoclave para esterilização das vidrarias e do meio de cultivo, um reator do tipo CSTR de 1 L, bombas peristálticas, controladores de vazão, um equipo de soro fisiológico para adição do melaço, cromatógrafo a gás, reagentes DNS, GOD-PAP e espectrofotômetro.

2.2. Métodos

2.2.1. Preparo do Substrato

Primeiramente, foram definidas as condições do ensaio a ser realizado. Dessa forma, estabeleceu-se a realização de um processo fermentativo de, aproximadamente, 120 horas, mantendo-se a temperatura de fermentação em 32 °C, sob agitação de 180 rpm em anaerobiose. Uma vez que, inicialmente, a fermentação seria descontínua durante

aproximadamente 24 horas, definiu-se a concentração inicial do substrato em regime descontínuo de 150 g/L, sendo o inóculo de levedura de 2 g em massa seca. A velocidade específica de crescimento a ser atingida foi estipulada em $0,1 \text{ h}^{-1}$, considerando uma concentração inicial de substrato em regime contínuo de 50 g/L, tendo-se um retil de substrato de 70 g/L e vazões de entrada e saída do reator equivalentes a 1 mL/min.

Após definidas as condições, foi feito o preparo do melão, pesando-se aproximadamente 350 g em erlenmeyer de 5 L. Em seguida, acrescentou-se água destilada, solução tampão e a enzima invertase e colocou-se o sistema sob agitação em banho a $50 \text{ }^\circ\text{C}$, durante 2 horas.

Durante o período de inversão do melão, foi preparado o polímero, pesando-se a quantidade do polímero catiônico (0,2 % do volume total). Em seguida, adicionou-se água destilada e manteve-se o sistema sob agitação em agitador magnético durante 30 minutos, até que o polímero fosse completamente dissolvido. Armazenou-se o polímero em frasco de vidro e, após o mel invertido ter sido autoclavado, despejou-se o polímero no melão e deixou-se o sistema em repouso, devidamente isolado, por um dia. Depois de decorrido este período, centrifugou-se o melão contendo o polímero, descartando-se o coloide (corpo de fundo) e retirando-se uma amostra para a quantificação dos açúcares redutores totais. Logo após, o melão foi autoclavado novamente.

Foram preparados também os nutrientes necessários à fermentação, consistindo em soluções de 5 L, 1,5 L e 1 L, contendo melão concentrado e, respectivamente, 2 g, 0,6 g e 0,4 g de ureia, 5 g, 1,5 g e 1 g de fosfato monopotássico, e 5 g, 1,5 g e 1 g de sulfato de magnésio.

2.2.2. Fermentação

Com as peças do reator devidamente higienizadas e esterilizadas, sob atmosfera inerte, adicionou-se 900 mL de melão ao reator, inoculando-se 2 g de levedura. Manteve-se o sistema a $32 \text{ }^\circ\text{C}$, a uma agitação de 180 rpm e retirou-se amostras às 7 h, 11 h, 15 h e 18 h. As amostras, quando retiradas, eram resfriadas em banho de gelo e, em seguida, centrifugadas durante 10 minutos para a separação da massa celular. Em seguida, após a etapa de centrifugação, as alíquotas de sobrenadante eram armazenadas em *freezer*, ao passo que o corpo de fundo contendo as células era submetido à adição de 15 mL de água destilada e armazenado em refrigerador.

Durante os 5 primeiros pontos, o sistema foi mantido em batelada. Após isso, o reator passou a operar de modo contínuo, por meio da ligação de uma bomba em cada extremidade, isto é, na entrada e na saída do reator. A vazão de saída foi regulada por meio de um controlador, sendo que sua aferição era feita com o auxílio de uma proveta e um cronômetro, obtendo-se o valor real de vazão em mL/min. Já a vazão de entrada foi ajustada por meio de um equipo de soro fisiológico, adaptado para gotejar de modo que a vazão de entrada permanecesse equivalente à de saída. O retil de melão era preenchido no recipiente de armazenamento de soro, alimentando o reator continuamente.

2.2.3. Quantificação da Massa Celular

Primeiramente, as amostras armazenadas em refrigerador contendo o corpo de fundo e 15 mL de água eram lavadas, por meio de sucessivas ressuspensões, centrifugação e adição de 15 mL de água destilada novamente. Após este procedimento, a quantificação de massa celular era feita por espectrofotometria, com auxílio de curva padrão.

2.2.4. Quantificação de Açúcares Redutores Totais (DNS)

Para se determinar a concentração dos açúcares redutores totais, utilizou-se o método DNS. Este consistiu em diluir as amostras conforme o necessário para que a leitura no espectrofotômetro pudesse ser realizada. Após a diluição, foram pipetados 0,5 mL de amostra para 2 tubos de ensaio (duplicata). Em seguida, adicionou-se 2,5 mL de reagente DNS e tampou-se os tubos de ensaio com rolhas perfuradas (o branco da análise era constituído de 0,5 mL de água e 2,5 mL de DNS). Logo após, colocou-se as amostras e o branco em banho sob fervura, durante 10 minutos. Decorrido esse período, resfriou-se as amostras em banho de gelo e adicionou-se 3 mL de água destilada em cada tubo. Agitou-se as amostras e realizou-se a leitura em espectrofotômetro a 600 nm.

2.2.5. Quantificação de Glicose

Para a determinação da concentração de glicose no meio, foi utilizado o método GOD-PAP. Este consistiu em realizar a diluição das amostras conforme necessário e, em seguida, pipetou-se 0,1 mL de amostra em 2 tubos de ensaio (duplicata). Depois, acrescentou-se 2 mL do reagente GOD-PAP, agitou-se as amostras e colocou-se os tubos com rolha em incubadora a 37 °C, sob agitação, durante 15 minutos. Decorrido esse tempo, adicionou-se 3 mL de água destilada a cada tubo, agitou-se novamente e submeteu-se as amostras à leitura em espectrofotômetro a 525 nm.

2.2.6. Teor de Etanol

O teor de etanol presente nas amostras foi determinado por meio de cromatografia a gás. A temperatura do injetor utilizada foi de 120 °C, do detector 150 °C e da coluna 100 °C. A análise tinha duração igual a 3 minutos e o volume de amostra injetado era de 10 µL. Os resultados consistiam em picos com diferentes áreas, as quais, para efeitos de análise dos dados obtidos, foram corrigidas por fatores de 0,64 e 0,55 para etanol e água, respectivamente.

3. Resultados e Discussão

3.1. Massa Celular Úmida e Crescimento Celular

Para a determinação da concentração celular presente no sistema em cada intervalo de tempo, foram utilizados os valores de absorvância obtidos por espectrofotometria, bem como uma curva padrão para a conversão dos valores. Dessa forma, foi possível confeccionar o gráfico de concentração celular em função do tempo de fermentação, apresentado na Figura 1.

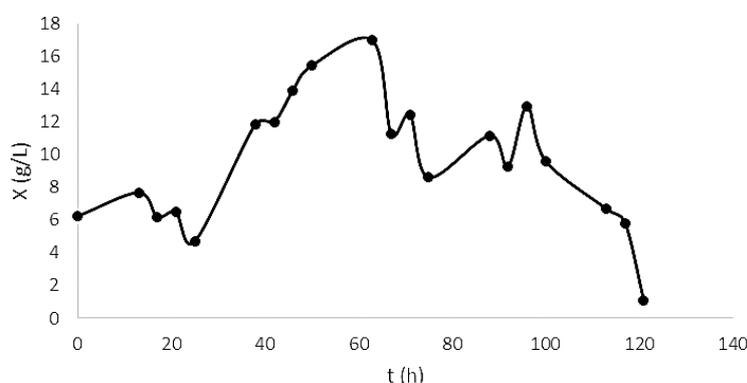


Figura 1 – Gráfico da concentração celular em função do tempo

Com os dados apresentados na Figura 1, construiu-se o gráfico da velocidade específica de crescimento celular em função do tempo.

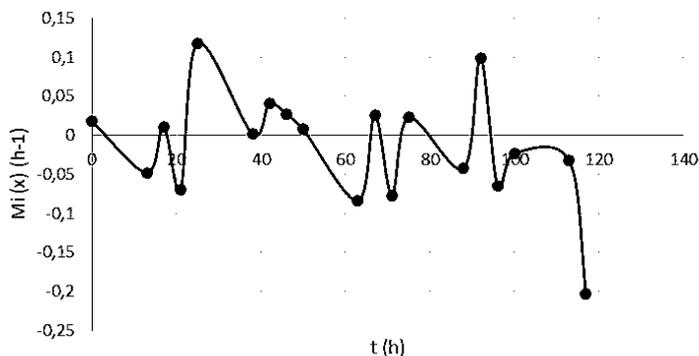


Figura 2 – Gráfico da velocidade específica de crescimento celular em função do tempo

A partir da análise dos gráficos, verifica-se que, após 38 horas de fermentação, aproximadamente, no ponto 6, houve um aumento na concentração de células no reator. Tal fato pode ter sido ocasionado devido à alteração da característica do processo, isto é, o processo foi mantido em batelada até o ponto 5, sendo que, a partir do ponto 6, o regime foi alterado para contínuo. Além disso, entre os pontos 5 e 6, houve uma variação no volume do reator, devido a alterações nas vazões de entrada e saída, sendo que foi adicionado refil de substrato após a retirada da amostra 6. Dessa forma, o aumento do crescimento celular, foi também influenciado pela adição de substrato ao sistema. A adição de refil ao reator foi realizada intermitentemente, de modo a se manter o volume constante.

Verifica-se que, a partir do ponto 17, a concentração e o crescimento celulares decaem, devido ao tempo de ensaio, que completava aproximadamente 100 horas e, como esperado, o micro-organismo passa a apresentar a fase de declínio de seu crescimento.

Observa-se ainda que o valor máximo de velocidade específica de crescimento celular obtida foi igual a, aproximadamente, 0,12 h⁻¹, o que se apresenta em conformidade com as condições estabelecidas antes da realização do ensaio.

3.2. Açúcares Redutores Totais

Para a quantificação dos açúcares redutores totais remanescentes no sistema, utilizou-se o método DNS. Dessa forma, com os dados de concentração de substrato no meio ao longo do tempo, foi possível confeccionar o gráfico da Figura 3.

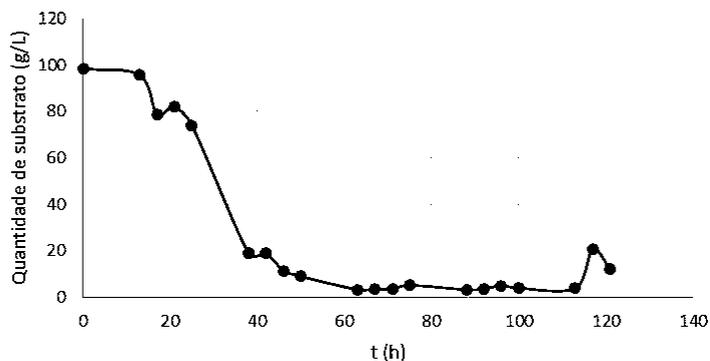


Figura 3 – Gráfico da concentração de substrato em função do tempo

Com a análise do gráfico da Figura 3, é possível notar que a concentração de substrato sofreu uma redução de, aproximadamente, 55 g/L entre os pontos 5 e 6. Tal fato foi ocasionado devido à mudança do processo de batelada para contínuo, em que houve uma alteração no volume útil do reator. Verifica-se ainda que, no ponto 6, a concentração de células havia sofrido aumento, ao passo que a quantidade de substrato reduziu, fato possivelmente causado pelo uso dos açúcares para o crescimento do micro-organismo.

Nota-se ainda que, em alguns pontos, houve ligeiro aumento da quantidade de substrato remanescente no meio, devido às adições de refil feitas intermitentemente ao longo do processo. Entretanto, observa-se que a quantidade de substrato diminuiu com o decorrer do experimento, evidenciando que houve seu consumo, tanto para o crescimento celular, quanto para a produção de produto.

3.3. Glicose

Para a quantificação da glicose presente no sistema ao longo do processo fermentativo, foi realizado o método GOD-PAP. Com os valores de absorbância e com o auxílio de curva padrão, calculou-se as concentrações de glicose remanescente no meio fermentativo ao longo do ensaio, construindo-se o gráfico da Figura 4.

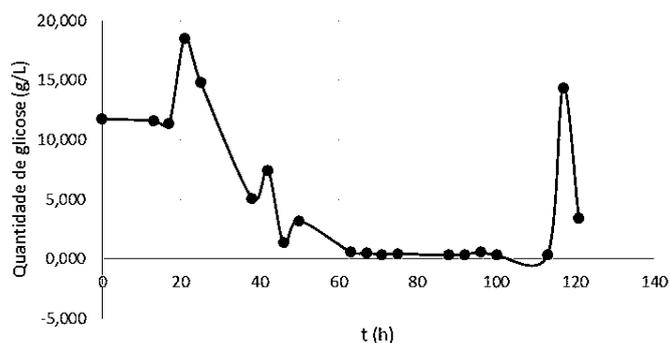


Figura 4 – Gráfico da concentração de glicose remanescente em função do tempo

Novamente, verifica-se que a quantidade de glicose sofreu uma redução de, aproximadamente, 9 g/L entre os pontos 5 e 6, devido à variação do volume de substrato no reator. Não obstante, é possível notar que a concentração de glicose apresentou decaimento ao longo do tempo, o que indica seu consumo para crescimento celular e formação de produto. Verifica-se ainda que, no ponto 19, houve aumento da concentração de glicose no meio, devido à adição de refil de substrato ao sistema.

3.4. Teor de Etanol

Para a determinação do teor de etanol obtido no processo fermentativo, as amostras foram submetidas à destilação e posterior análise em cromatógrafo a gás. Os valores de área dos picos, bem como frações molares de etanol presentes em cada intervalo de tempo foram dispostos na Tabela 1.

Tempo (h)	Área Referente ao Etanol	Área Referente à Água	Área Total	Fração Molar de Etanol
0	8675,00	3665791,00	3674466,00	0,27
13	5307,00	3969249,00	3976110,00	0,16
17	15918,00	4078864,00	4095407,00	0,45
21	19869,00	3535655,00	3555524,00	0,65
25	72731,00	3693803,00	3766534,00	2,24
38	110854,00	3770171,00	3881025,00	3,31
42	77186,00	3589149,00	3666335,00	2,44
46	115091,00	3900227,00	4015318,00	3,32
50	90181,00	3668983,00	3759164,00	2,78
63	107810,00	3697165,00	3804975,00	3,28
67	126718,00	4025212,00	4151930,00	3,53
71	105406,00	3778865,00	3884271,00	3,14
75	105753,00	4389603,00	4495356,00	2,73
88	95054,00	3608182,00	3703236,00	2,97
92	91099,00	3920923,00	4012022,00	2,63
96	96565,00	3717250,00	3813835,00	2,93
100	102945,00	4234463,00	4337408,00	2,75
113	84545,00	3872730,00	3957275,00	2,48
117	45602,00	4294831,00	4340433,00	1,22
121	58337,00	3629008,00	3687345,00	1,84

Tabela 1 – Resultados da análise por cromatografia a gás

Para o cálculo da fração molar de etanol em cada tempo, foram utilizadas as áreas dos picos de água e álcool, as quais foram corrigidas de acordo com os fatores adequados (0,55 e 0,64, respectivamente). De posse dos dados de fração molar da Tabela 1, calculou-se as respectivas frações mássicas de etanol, bem como suas concentrações em cada amostra, cujos dados foram apresentados na Tabela 2.

Tempo (h)	Fração Mássica de Etanol	Concentração de Etanol
0	0,70	6,99
13	0,40	3,96
17	1,15	11,48
21	1,64	16,45
25	5,53	55,35
38	8,05	80,45
42	6,01	60,14
46	8,07	80,72
50	6,82	68,15
63	7,98	79,84
67	8,57	85,65
71	7,66	76,64
75	6,69	66,89
88	7,27	72,69
92	6,47	64,67
96	7,18	71,75
100	6,75	67,46
113	6,10	61,00
117	3,06	30,63
121	4,57	45,65

Tabela 2 – Resultados de fração mássica e concentração de etanol nas amostras

De posse dos dados da Tabela 2, confeccionou-se o gráfico de concentração de etanol em função do tempo, conforme mostra a Figura 5.

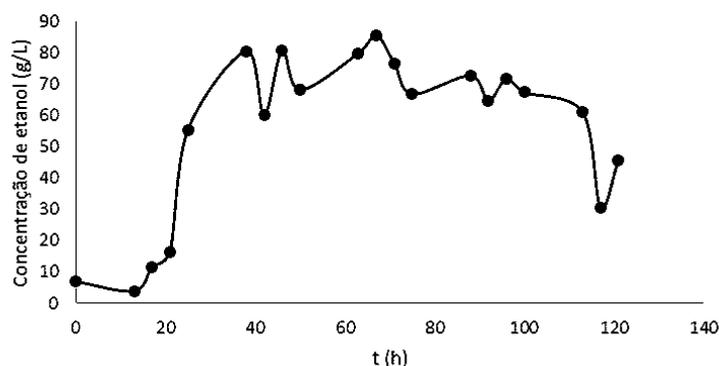


Figura 5 – Gráfico da concentração de produto em função do tempo

Observou-se, pela Figura 5, que após o período de fermentação em batelada (aproximadamente 24 horas), houve um aumento significativo na produção de etanol pelo micro-organismo, isto é, os valores mais expressivos foram encontrados na etapa de fermentação contínua, o que justifica a escolha do processo contínuo em detrimento do descontínuo, pois em geral espera-se, de fato, uma maior produtividade.

Notou-se também que a maior concentração de etanol alcançada durante o período de fermentação foi de, aproximadamente, 85,7 g/L, sendo que foi verificada uma oscilação dos valores de concentração do produto, a partir de 40 horas. Tal fato possivelmente foi ocasionado devido à adição de refil de substrato ao reator intermitentemente, bem como à variação do volume útil do reator nesses intervalos de tempo, nos quais a concentração de etanol apresentou redução.

Dessa forma, apesar do processo ter sido contínuo a partir do ponto 6, não foi estabelecido estado estacionário, justamente pelas adições sucessivas de substrato. Entretanto, foi possível obter uma concentração satisfatória de produto ao longo do período de fermentação, evidenciando que o substrato foi, de fato, transformado em etanol a uma conversão de, aproximadamente, 87,5 % de hexoses em etanol, considerando as quantidades de substrato no início e no fim do ensaio.

3.5. Produtividade

A partir dos gráficos obtidos para a concentração de substrato, células, glicose e produto ao longo do tempo, foi possível confeccionar o gráfico contendo as informações como um todo, conforme apresentado na Figura 6.

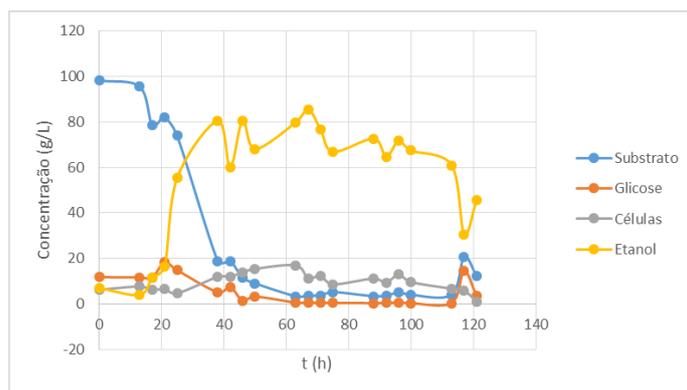


Figura 6 – Gráfico das concentrações de substrato, glicose, células e etanol em função do tempo

Observou-se na Figura 6, que o consumo de substrato provocou o aumento da produção de etanol, evidenciando que houve, de fato, a conversão das hexoses em produto desejado.

De posse dos dados apresentados, foi possível ainda determinar a produtividade do processo, em termos de células em relação ao substrato ($Y_{X/S}$), produto em relação ao substrato ($Y_{P/S}$) e produto em relação à massa celular ($Y_{P/X}$). Com os valores iniciais e finais de concentração apresentados nos gráficos, calculou-se as respectivas produtividades, obtendo-se $Y_{X/S} = -0,06$ g célula/g substrato, $Y_{P/S} = 0,45$ g etanol/g substrato, e $Y_{P/X} = 34,89$ g etanol/g célula.

Observou-se que a produtividade de massa celular em relação ao substrato foi negativa, isto é, a concentração de células tendeu a diminuir no reator, fato que pode ter sido causado pelas intermitentes adições de substrato ao reator.

4. Conclusão

A análise dos resultados obtidos permitiu verificar que os objetivos do presente trabalho foram alcançados, visto que foi realizado o processo de fermentação contínua e determinou-se a quantidade de massa celular, glicose, substrato e teor de etanol ao longo do experimento. Pôde-se verificar que a máxima velocidade específica de crescimento celular foi de $0,12 \text{ h}^{-1}$, a concentração final de substrato no meio foi de, aproximadamente, 12,3 g/L e a de glicose 3,42 g/L, gerando uma concentração final de etanol de 45,7 g/L. Entretanto, a maior concentração de etanol alcançada no ensaio foi de 85,7 g/L, porém seu valor foi reduzido ao final do experimento, devido às sucessivas adições de refil de substrato ao reator. Não obstante, verificou-se ainda que a produtividade de etanol com relação ao substrato foi de 0,45 g de etanol/ g de substrato, resultado que evidencia que o processo fermentativo proposto se apresenta adequado, sustentando a aplicação de processos de fermentação contínua preferencialmente à batelada.

Referências

CENTRO DE GESTÃO E ESTUDOS ESTRATÉGICOS. **Bioetanol combustível**: uma oportunidade para o Brasil, 1ª ed., Brasília, CGEE, 2009.

LIMA, U.A., AQUARONE, E., BORZANI, W., SCHMIDELL, W. **Biotecnologia Industrial**, Volume 3, Fundamentos, 1a ed., São Paulo, Ed. Edgard Blücher Ltda., 2001.

SCHMIDELL, W., LIMA, U.A., AQUARONE, E., BORZANI, W. **Biotecnologia Industrial**, Volume 2, Engenharia Bioquímica, 1a ed., São Paulo, Ed. Edgard Blücher Ltda., 2001.