

5º CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO EM PETRÓLEO E GÁS



TÍTULO DO TRABALHO:

Estudo da imobilização de *Saccharomyces cerevisiae* em bagaço de caju para a produção de bioetanol por fermentação

AUTORES:

Diego R. Gondim, Alexandre M. Pacheco e Luciana R. B. Gonçalves

INSTITUIÇÃO:

Universidade Federal do Ceará – Depto. de Engenharia Química; Campus do Pici: Bloco 709 – 60455-760

Estudo da imobilização de *Saccharomyces cerevisiae* em bagaço de caju para a produção de bioetanol por fermentação

Abstract

The high concentration of reducing sugars and the great waste of cashew apple peduncle allows the production of ethanol from this alternative and cheap material. The use of this agroindustrial residue may contribute for the reduction of production costs. Ethanol is a very important source of energy and its importance and use in the world is increasingly growing. In this work, cashew apple bagasse (CAB) was used for *Saccharomyces cerevisiae* immobilization. The support was prepared through a treatment with a solution of HCl 3% and deslignification with NaOH 2% was also conducted. Optical micrographs showed that high populations of yeast cell adhered to pretreated CAB surface. Ethanol concentrations (about 20,63 – 23,92 g.L⁻¹ in average value), and ethanol productivities (about 2.58 – 2.66 g.L⁻¹h⁻¹) in free and immobilization cell respectively were high and stable, and residual sugar concentrations were low only in immobilization cell (around 2.15 g. L⁻¹) in eight hours of fermentation. Those results shows that cashew apple bagasse is an efficient support for cell immobilization aiming at ethanol production and could be promising for scale-up operation.

Introdução

Apesar da evolução tecnológica em todas as cadeias da produção sucroalcooleira da indústria da cana, faz-se necessário o uso de outras fontes de biomassa para complementar a produção de etanol para que no futuro a demanda por esse combustível seja atendida. Segundo Lin e Tanaka (2006), biomassa é uma fonte interessante de energia por diversas razões. Este tipo de energia contribui para o desenvolvimento sustentável, criando novas oportunidades em regiões rurais. Além disso, se resíduos agroindustriais forem utilizados em processos biotecnológicos, não apenas se estabelecem substratos alternativos, mas também se resolve um problema de descarte.

A utilização de células de leveduras imobilizadas em suporte inerte e de baixo custo é hoje um dos enfoques para aplicação em processo de bioengenharia. Durante as últimas décadas, a tecnologia de imobilização celular tem sido bastante estudada e tem se demonstrado uma forma bem atrativa para a produção de etanol por fermentação (Jianling Yu et al., 2007).

No caso específico de produção de etanol por fermentação, a utilização de células livres oferece algumas vantagens em relação à utilização de células imobilizadas, como grande área de contato entre as células e os nutrientes do meio e sua reconhecida viabilidade econômica. Entretanto, certas desvantagens podem ser citadas, como o elevado custo do reaproveitamento do microrganismo, alta probabilidade de contaminação e limitação na taxa de diluição em fermentações contínuas (Vasconcelos et al., 2004).

Em vários estudos como os de Dragone et al (2006), Giordano et al (2000) e Santos et al (2007) têm se abordado o aumento da produtividade, redução do tempo dos processos, menor tamanho dos equipamentos, maior durabilidade e resistência das células quando utilizados microorganismos imobilizados nos mais diversos suportes. Um dos empecilhos ao uso de técnicas de imobilização tem sido o custo adicional do suporte e do processo de imobilização.

Nesse contexto, o uso de suportes de baixo custo como resíduos agroindustriais surgem como uma opção na redução dos custos de utilização de células imobilizadas. A agroindústria do caju no Nordeste brasileiro desempenha importante função em termos de geração de emprego e renda. A fibra do caju, resíduo proveniente da industrialização do pedúnculo de caju para produção de suco, representa cerca de 40% (m/m) do peso total do pseudofruto, que por sua vez não apresenta valor

comercial sendo geralmente rejeitado pela indústria local (Ferreira et al., 2004; Matias et al., 2005; Rocha et al., 2006).

Este trabalho tem como objetivo avaliar o uso do bagaço de caju como suporte para imobilização celular e analisar a eficiência na produção de etanol como redução do desperdício dessa matéria-prima. Na produção de etanol por fermentação, buscou-se avaliar a utilização de *Saccharomyces cerevisiae*, um microrganismo muito utilizado industrialmente e de fácil manipulação. A imobilização do microrganismo provavelmente trará uma maior produtividade na geração de etanol.

Metodologia

1. Preparação do suporte de imobilização

Realizou-se o tratamento do bagaço de caju segundo o método utilizado por Dragone (Dragone et al., 2006) no tratamento do bagaço de malte para produção de cervejas. Inicialmente, lavou-se o bagaço com água para retirada de impurezas, em seguida seco em estufa a 50°C e posteriormente triturado, em liquidificador e estocado em recipientes a temperatura ambiente.

1.1 Tratamento Ácido

Consistiu da adição de HCl 3% (v/v) ao bagaço de caju sob agitação à 60°C por 2,5 horas. Em seguida realizou-se filtração à vácuo no material e seu pH ajustado para 8,0 com solução tampão fosfato 0,2M.

1.2 Tratamento Alcalino

Realizou-se em agitador orbital a 120 rpm e 30 °C por 24 h o tratamento de deslignificação com base NaOH 2%. Posteriormente, filtrou-se o bagaço tratado e neutralizou com solução tampão acetato 0,2M de pH 4. Depois, lavou-se o material com água, em seguida seco em estufa a 50°C, triturado em liquidificador e por último peneirado em peneiras com diâmetro de poros entre 0,84 e 0,35 mm para obtenção do bagaço no tamanho desejado.

2. Microrganismo e preparação do inóculo para imobilização

Neste trabalho utilizou-se a levedura, *Saccharomyces cerevisiae*, que foi isolada do fermento Saf-momento (SAF Argentina, Buenos Aires), marca disponível no mercado durante o período de compra. Cultivou-se células de *S. cerevisiae* para imobilização em meio composto por glicose (30 g/L), extrato de levedura (5,0 g/L), NH₄SO₄ (10 g/L), KH₂PO₄ (4,5 g/L), MgSO₄.7H₂O (1,0 g/L) e ZnSO₄ (0,65 g/L). O cultivo foi realizado em agitador orbital em erlenmeyers de 250 mL, contendo 150 mL de meio em cada, a 30°C e 150 rpm por 24 h. Em seguida a biomassa foi separada por centrifugação a 10000 g.

3. Imobilização das células no suporte

O meio de cultivo para imobilização da levedura apresentou mesma composição do meio para cultivos de células de *S. cerevisiae*. Inicialmente pesou-se 10% (m/v) do suporte de bagaço de caju tratado realizando esterilização a 110°C por 10 min. Em seguida inoculou 1% (m/v) de biomassa no meio contendo o bagaço de caju para possibilitar o crescimento destas no bagaço por 24 h. Realizou-se o processo em duplicata em erlenmeyers de 500 ml contendo 125 ml de meio em cada.

4. Condições de fermentação

4.1 Fermentação em células imobilizadas

O meio de fermentação a base de glicose (40 g/L), frutose (40g/L), NH_4SO_4 (10 g/L), KH_2PO_4 (4,5 g/L), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (1,0 g/L) e ZnSO_4 (0,65 g/L). Antes da fermentação, pesou-se o suporte de bagaço de caju com células imobilizadas e distribuiu assepticamente em erlenmeyers de 500 ml contendo 125 mL de meio de. Os frascos foram então colocados em agitador rotativo à 30°C e 150 rpm. Amostras foram coletadas em tempos pré-determinados.

4.2 Fermentação em células livres

O meio de fermentação foi o mesmo utilizado com células imobilizadas e foi inoculado 1% (m/v) de biomassa. Os frascos foram então colocados em agitador rotativo 30°C e 150 rpm. Amostras foram coletadas em tempos pré-determinados.

5. Métodos analíticos

5.1 Concentração de biomassa

Acompanhou-se a concentração celular pela densidade óptica (DO) do caldo fermentado à 660 nm.

5.2 Contagem de células imobilizadas em bagaço de caju

Realizou-se contagem de células imobilizadas utilizando a câmara de Neubauer. Utilizou-se o corante azul de metileno para determinar a viabilidade celular, sendo viáveis as células que não absorveram o corante e inviáveis as que absorveram o corante (Oliveira, 2006) e neste trabalho determinou o número total de células, tanto viáveis como inviáveis. Adicionou-se 50 ml de NaCl 0,85% a uma amostra de 0,5 g do bagaço contendo células imobilizadas e deixou sob agitação de 150 rpm por 24 h. Uma alíquota de 0,1 ml da solução de leveduras extraídas foram adicionados a 0,3 ml de uma solução de azul de metileno 0,2%.

5.3 Concentração de açúcares redutores, glicerol e etanol

Acompanhou a concentração de açúcares redutores (glicose e frutose), etanol e glicerol durante o processo fermentativo por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), utilizando sistema de HPLC (Waters, Milford, MA, EUA) equipado com um detector de índice refrativo Waters 2414 e coluna Supelcogel C-610H. Utilizou-se uma solução 0,1 mol.L^{-1} H_3PO_4 como fase móvel com vazão de 0,5 mL.min^{-1} a temperatura ambiente.

5.4 Parâmetros cinéticos

Os parâmetros cinéticos estudados neste trabalho foram produtividade (Q_p), eficiência (η), conversão substrato/biomassa ($Y_{x/s}$) e conversão substrato/produto ($Y_{p/s}$) e foram calculados pelas equações 1, 2, 3, e 4, respectivamente.

$$Q_p = \frac{P_f}{t} \quad (1)$$

Onde Q_p ($\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$) é a produtividade, P_f é a concentração de etanol (g.L^{-1}) no final da fermentação e t (h) é o tempo de duração da fermentação.

$$\eta = \frac{Pf}{(Si - Sf) \times 0,5111} \times 100 \quad (2)$$

Sendo η (%) a eficiência, Si a concentração inicial de substrato, glicose e frutose (g.L^{-1}), Sf a concentração final (g.L^{-1}). O fator 0,5111 deve ser multiplicado ao denominador devido ao balanço de massa que a produção anaeróbica máxima possível que pode ser gerada a partir de uma grama de açúcares é 0,511g de etanol já que é produzido também gás carbônico (Hashizume e Aquarone, 2005).

$$Y_{x/s} = \frac{(X_f - X_i)}{(S_i - S_f)} \quad (3)$$

Onde $Y_{x/s}$ o fator de conversão de substrato em biomassa, valor adimensional, X_i a concentração inicial de biomassa e X_f a concentração de biomassa final.

$$Y_{p/s} = \frac{Pf}{(S_i - S_f)} \quad (4)$$

Resultados e Discussão

1. Análise do crescimento de células no suporte

Uma importante etapa do estudo deste trabalho foi analisar o crescimento de células no suporte de imobilização no período que antecede a fermentação, logo após o microrganismo ser inoculado no meio inóculo com o bagaço devidamente esterelizado. Acompanhou-se o crescimento do número de células imobilizadas no bagaço de caju pela câmara de Neubauer, o crescimento da biomassa pela DO e o consumo de glicose em g.L^{-1} durante o período de 20 h. Pela Figura 1 verificou que após de 12 h de fermentação ocorreu o consumo total de glicose no meio e o número de células imobilizadas permaneceu constante. A Figura 2 mostra um perfil semelhante do crescimento de células livres e imobilizadas ao longo da fermentação.

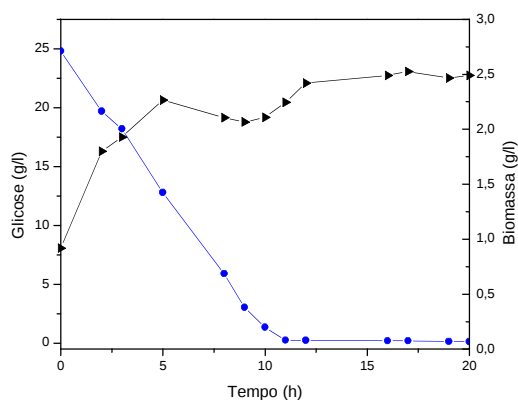


Figura 1. Consumo de glicose (●) e crescimento da biomassa (►) durante 20 h de fermentação.

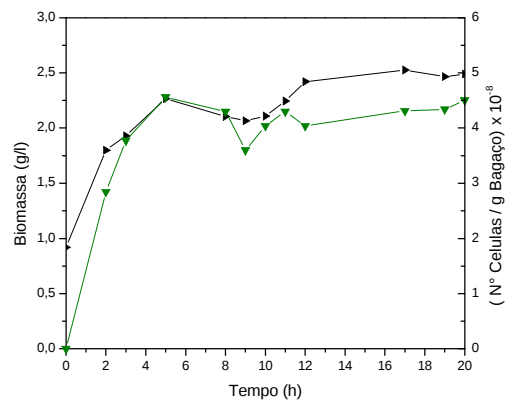


Figura 2. Crescimento da biomassa (►) e N° de células por grama de bagaço de caju durante 20 h de fermentação.

2. Fermentação em meio sintético com células livres e imobilizadas no suporte de caju

Inúmeras são as vantagens da fermentação em células imobilizadas, pois reduz o tempo de fermentação e evita o uso de processos de separação evitando gastos desnecessários. As Figuras 3 e 4 mostram a produção de etanol e glicerol a partir da fermentação em células livres e imobilizadas no suporte de caju, respectivamente. Pela Figura 3 verificou-se que ocorreu o consumo total dos substratos ao final da fermentação em células imobilizadas com produção de etanol em torno de 24 g.L⁻¹. Pela Figura 4 verificou-se uma produção de etanol em torno de 20 g.L⁻¹ para um consumo de substrato inferior ao de células imobilizadas. E pelas Figuras 3 e 4 constatou-se um consumo de glicose mais rápido que o de frutose ao longo da fermentação comprovando maior afinidade do substrato glicose com a levedura *S. cerevisiae*.

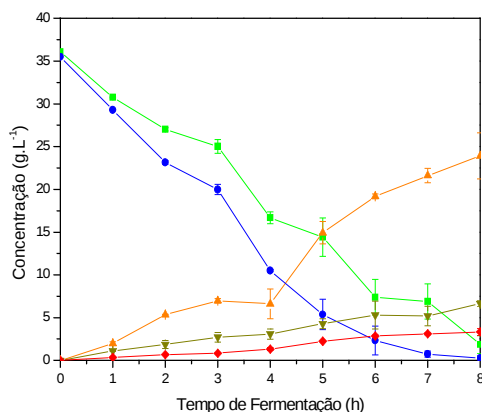


Figura 3. Fermentação em células imobilizadas com formação de etanol (▲) e glicerol (◆), consumo de glicose (●), frutose (■) e crescimento de biomassa (▼) versus tempo de fermentação a 150 rpm e 30°C.

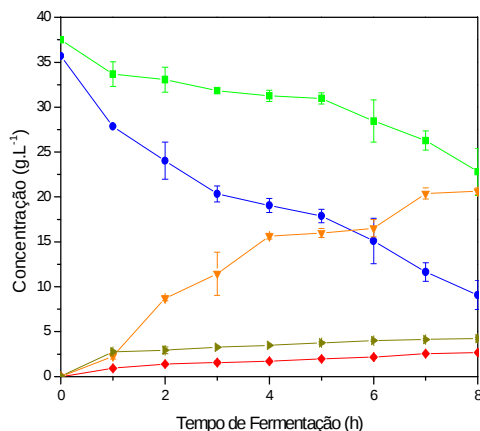


Figura 4. Fermentação em células livres com formação de etanol (▲) e glicerol (◆), consumo de glicose (●), frutose (■) e crescimento da biomassa (▼) versus tempo de fermentação a 150 rpm e 30°C.

A Tabela 1 mostra os parâmetros cinéticos calculados para estes ensaios: produtividade (Q_p), eficiência (η), e conversão substrato/produto ($Y_{p/s}$). Através dos dados da Tabela 1 verificou-se eficiência de 67,40% para a fermentação em células imobilizadas e 97,66% para células livres, tal diferença deve-se ao fato das concentrações finais de substrato do meio serem diferentes, visto que na imobilizada restou apenas 2,15 g.L⁻¹ enquanto que na livre 32 g.L⁻¹ para uma produção de etanol semelhante.

TABELA 1: Parâmetros cinéticos para a fermentação livre¹ e imobilizada² no suporte de caju

Tempo de Fermentação h	ART (glicose e frutose) g.L ⁻¹	ART Residual g.L ⁻¹	Etanol g.L ⁻¹	Produtividade Q_p (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)	Eficiência η (%)	$Y_{p/s}$ (g/g)
¹ 8	73,19	31,85	20,63	2,58	97,66	0,50

² 8	71,6	2,15	23,92	2,98	67,40	0,32
----------------	------	------	-------	------	-------	------

Conclusões

Conseguiu-se realizar a fermentação com células imobilizadas no suporte de caju com alta concentração de etanol produzida em torno de 24 g.L⁻¹. Pelos resultados alcançados o suporte comprovou ser um excelente agente imobilizador quando comparado com a fermentação em células livres, visto que em um menor intervalo de tempo alcançou concentração de etanol semelhante comparado com as células livres consumindo praticamente todo o substrato do meio.

Agradecimentos

Os autores agradecem a ANP e FINEP.

Referências Bibliográficas

- Aquarone, E.; Schmidell, W.; Lima, U. A.; e Borzani W., editor Edgard Blucher, Brazil, 2001.
- Dragone, G., Mussato, S. I., Silva, J. B. A., Fermentación de Cervezas de Altas Densidades por Processo Continuo Utilizando Levaduras Inmovilizadas, 2006.
- Ferreira, A.C. H., Neiva, J. N. M., Rodríguez, N. M., Lobo, R. N. B. e Vasconcelos, V. R., Valor nutritivo das silagens de capim-elefante com diferentes níveis de subprodutos da indústria do suco de caju, Revista Brasileira de Zootecnia, v. 33 (6), p. 1380-1385, 2004.
- Jianliang Yu, Xu Zhang, Tianwei Tan., An novel immobilization method of *saccharomyces cerevisiae* to sorghum bagasse for ethanol production, 2007.
- Matias, M. F. O., Oliveira, E. L., Gertrudes, E. e Magalhães, M. M. A., , Use of fibres obtained from the cashew (*Anacardium occidentale*, L.) and guava (*Psidium guayava*) fruits for enrichment of food products, Brazilian Archives of Biology Technology, v.48, p. 143-150, 2005.
- Rocha, M. V. P., Oliveira, A. H. S., Souza, M. C. M. e Gonçalves, L. R. B., Natural cashew apple juice as fermentation medium for biosurfactant production by *Acinetobacter calcoaceticus*, World Journal of Microbiology and Biotechnology, v.22 (12), p. 1295-1299, 2006.
- Santos, D. T., Sarrouh, B. F., Rivaldi J. D., Converti A., e Silva S. S., Use of sugarcane bagasse as biomaterial for cell immobilization for xilitol production, *Journal of Food Engineering*, v.86, p. 542-548, 2007.
- Vasconcelos, J. N., Lopes C. E. e França F. P., Continuous ethanol production using yeast immobilized on sugar-cane stalks, 2004.