

Fermentação contínua usando baixa concentração de açúcar da cana e *Zymomonas mobilis* CP4 para produção de etanol

Continuous fermentation using low concentration of sugar cane and *Zymomonas mobilis* CP4 for ethanol production

Marcia Sadae Tano¹; João Batista Buzato²

Resumo: Efeito da taxa de diluição na fermentação contínua de 20g de sacarose/L e *Z. mobilis* CP4 foi estudada para produção de etanol a 28°C ± 1, sem controle de pH. Quatro taxas de diluições foram comparadas: 0.045; 0.14; 0.23 e 0.34 h⁻¹. Nas taxas de diluições 0.045; 0.14 e 0.23 h⁻¹ foram produzidos 9,4 g/L de etanol e na taxa de diluição de 0.34 h⁻¹ foi produzido 8,8 g/L. A eficiência de conversão para etanol foram de 91% nas taxas de diluições de 0.045; 0.14 e 0.23 h⁻¹. Na taxa de diluição de 0.34 h⁻¹ a eficiência da conversão foi de 85%.

Palavras-chave: sacarose, etanol, cultura contínua, taxa de diluição.

Abstract: Effect of dilution rate in continuous fermentation of 20g sucrose/L and *Z. mobilis* CP4 was studied for ethanol production at 28°C ± 1, without pH control. Four dilution rates were compared: 0.045; 0.14; 0.23 and 0.34 h⁻¹. In dilution rates 0.045; 0.14 and 0.23 h⁻¹ were produced 9,4g/L of ethanol and in dilution rate 0.34 h⁻¹ was produced 8,8 g/L. Ethanol conversion efficiency were of 91% in dilution rates 0.045; 0.14 and 0.23 h⁻¹. In dilution rate 0.34 h⁻¹ the conversion efficiency was of 85%.

Keywords: sucrose, ethanol, continuous culture, dilution rate.

1 Introdução

Z. mobilis CP4 foi isolada por Gonçalves de Lima et al. (1970) de uma bebida fermentada, chamada localmente no Pernambuco de "caldo de cana picado". É uma bactéria obrigatoriamente fermentativa, que usa exclusivamente a via de Entner-Doudoroff. Produz pouca biomassa mas possui elevada taxa de conversão do açúcar para etanol (FALCÃO DE MORAIS, 1993). Utiliza como substratos somente frutose, glicose e sacarose (BUCHHOLZ et al., 1987). Segundo Cruz e Borzani (1980) e Buzato (1994) a utilização máxima do açúcar e a maior produção de etanol com *Z. mobilis* ocorre na fermentação da glicose. Com a sacarose a produção fica comprometida pela formação de subprodutos como a levana e o sorbitol (BUZATO, 1994; ROGERS et al., 1982).

As matérias-primas mais usadas para a obtenção da sacarose são beterraba sacarina nos países nórdicos e a cana-de-açúcar nos países tropicais. Alguns estudos foram desenvolvidos com o caldo e melaço da cana para produção de etanol (DIEZ; YOKOYA, 1996a; TANO et al., 2000).

No Brasil, a fermentação contínua destacou-se após 1940. Mas não é um sistema operante na indústria do álcool. O interesse pelo sistema foi

retomado nos últimos anos como alternativa para se reduzir os custos da produção de etanol (BUZATO, 1994; DIEZ; YOKOYA, 1996a). Na fermentação contínua são restritos os estudos conduzidos com *Z. mobilis* em concentração limitante de substrato.

O objetivo deste trabalho foi comparar o efeito da taxa de diluição na fermentação da sacarose da cana com *Z. mobilis* CP4 para a produção de etanol.

2 Materiais e Métodos

Microrganismo- manutenção e reativação: *Z. mobilis* CP4 var. *recifensis*. Meio de manutenção (g/%) (p/v): sacarose 15, extrato de levedura 1, KH₂PO₄ 0,2; (NH₄)₂SO₄ 0,1; MgSO₄·7H₂O 0,05. Após incubação (20 horas estática a 28°C) a cultura foi mantida a 4°C e reativada mensalmente.

Preparação do inóculo: Foram feitas pré-reativação e reativação de células (12 e 18 horas). Após, foram semeadas na superfície de meio sólido (meio de manutenção + 2,5% de ágar) e incubada a 28°C até crescimento. O inóculo foi preparado pela transferência aleatória de colônias isoladas do meio sólido para 4 tubos de ensaio contendo 10 ml do meio de fermentação (28°C ± 1 por 20 horas) e introduzidos no frasco fermentador.

¹ Farmacêutica-Bioquímica. Pós- graduada em Microbiologia (UEL).

² Docente do Departamento de Bioquímica / CCE - Universidade Estadual de Londrina, C.P. 6001, CEP 86051-990, Londrina, PR, Brasil.

Meio de fermentação (g/%) (p/v) – volume total de 20 Litros: Sacarose da cana (açúcar cristalizado) 2; Extrato de levedura 0,5; KH_2PO_4 0,1; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,1; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,05.

Condução da fermentação: *Z. mobilis* foi inoculada no frasco fermentador com capacidade de 0,5L e 0,3L de volume de trabalho. Após atingir considerável turvação o sistema foi iniciado sob agitação branda e controle de temperatura em $28^\circ\text{C} \pm 1$. O fluxo contínuo do meio variou de acordo com as seguintes taxas de diluições (D): 0.045; 0.14; 0.23 e 0.34 h^{-1} , sem controle do pH. O acompanhamento do processo foi feito por coletas de amostras para análise de biomassa (absorbância em 605 nm contra água destilada), etanol por cromatografia gasosa e açúcares redutores (AR). O açúcar redutor total (ART) foi dosado como AR segundo Somogyi-Nelson, em 540 nm, adaptado por Amorim et al. (1982). A dosagem de levana precipitável pelo etanol a 75% foi realizada no caldo sobrenadante como AR por Somogyi-Nelson (1945), em 540nm. A Eficiência de Conversão (%) foi dada pela fórmula: $\text{EC} = 100 \cdot [\text{Etanol}] / (0,511 \cdot \text{concentração de sacarose})$.

3 Resultados e Discussão

O desempenho de *Z. mobilis* CP4 para produção de etanol foram comparativamente estudados nas diferentes D da fermentação contínua de 20,3 g de sacarose/L. A baixa concentração de sacarose foi escolhida para evitar a inibição celular pela ação da osmolaridade. Foram comparadas quatro D diferentes, em ordem crescente: 0.045; 0.14; 0.23 e 0.34 h^{-1} .

Na Tabela 1 são mostrados os parâmetros da fermentação da sacarose, as produções e os coeficientes de rendimentos em biomassa (Yx/s) e etanol (Yp/s) obtidos nas diferentes D.

A biomassa produzida na $D = 0.045 \text{ h}^{-1}$ foi de 0,3 g/L e nas $D = 0.14; 0.23$ e 0.34 h^{-1} produziram-se 0,5 g/L. Com microrganismo fermentador como a *Z. mobilis* pode ocorrer *crescimento desacoplado*, isto é, a biomassa e a produção de etanol podem estar desacoplados (Figura 1). As biomassas produzidas foram compatíveis aos descritos por outros autores (BUZATO, 1994; GARRO et al., 1995). Garro et al. (1995) utilizaram 20 g de glicose/L e *Z. mobilis mobilis* PRO 910, em bateladas.

Tabela 1 – Parâmetros cinéticos da fermentação contínua da sacarose da cana (20,3 g/L) por *Z. mobilis* CP4, dos estados estacionários de diferentes taxas de diluições, a $28^\circ\text{C} \pm 1$.

Parâmetros	Taxa de diluição (h^{-1})			
	0.045	0.14	0.23	0.34
ART cons (g/L)	19,3	18,7	18,3	18,0
ART res (g/L)	0,6	0,8	0,9	1,2
Biomassa (g/L)	0,3	0,5	0,5	0,5
Etanol (g/L)	9,4	9,4	9,4	8,8
Levana (g/L)	ND*	bc*	bc*	bc*
Yp/s (g/g)	0,49	0,50	0,50	0,48
Yx/s (g/g)	0,015	0,027	0,027	0,028
EC (%)	91	91	91	85

(*) ND=não detectado; bc = baixíssima concentração.

A taxa de crescimento específico deste trabalho foi de $0,29 \text{ h}^{-1}$. Este valor foi igual ao obtido por King e Hossain (1982) com *Z. mobilis* ATCC 10988 em glicose a 34°C . A 30°C obtiveram $0,17 \text{ h}^{-1}$.

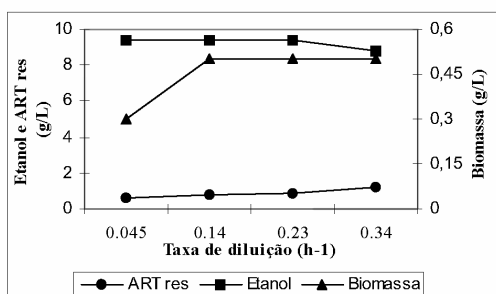
O ART consumido foi seqüencialmente de 19,3; 18,7; 18,3 e 18 g/L que representam um consumo de 95; 92; 90 e 89% nas $D = 0.045; 0.14; 0.23$ e 0.34 h^{-1} , respectivamente. Houve um decréscimo no consumo quando as D aumentaram.

As produções de etanol nas $D = 0.045; 0.14$ e 0.23 h^{-1} foram de 9,4 g/L e na $D = 0,34 \text{ h}^{-1}$ foi de 8,8 g/L (Tabela 1 e Figura 1). Buzato (1994) conduziu seu estudo em condições semelhantes (cepa e D), em 35°C , utilizando sacarose, frutose e glicose ao redor de 20 g/L. Na fermentação da sacarose as produções de etanol obtidas foram de 8,5 g/L e 6,1 g/L. Na fermentação da glicose as produções foram de 9,4 g/L e 7,1 g/L. Na fermentação da frutose as produções

foram de 9,2 g/L e 6,7 g/L. Neste trabalho a produção de etanol obtida da sacarose foi compatível com a produção obtida da glicose.

Os rendimentos em etanol nas $D=0.14$ e 0.23 h^{-1} foram de 0,50. Na $D=0.045$ e 0.34 h^{-1} foi de 0,49 e 0,48, respectivamente. Os rendimentos foram compatíveis com os resultados de vários autores utilizando a glicose e *Z. mobilis* CP4 na fermentação contínua (BORREGO et al., 1988; BUZATO, 1994).

Figura 1 – Parâmetros cinéticos (g/L): Etanol, ART residual e Biomassa, dos estados estacionários em diferentes taxas de diluições, na fermentação contínua da sacarose (20,3 g/L) por *Z. mobilis* CP4 a $28^{\circ}\text{C} \pm 1$.



A eficiência de conversão (EC) foi de 91% nas $D=0.045$; 0.14 e 0.23 h^{-1} . Na $D=0.34\text{ h}^{-1}$ a EC diminuiu para 85% (Tabela 1). Quando Buzato (1994) utilizou sacarose as EC foram de 79% e 57%; com a glicose foram de 94% e 71% e com a frutose foram de 90% e 66%. Na última D deste trabalho a EC foi 28% maior do que a obtida por Buzato (1994) com a sacarose em $D=0.35\text{ h}^{-1}$. Obtivemos aqui com a sacarose uma EC equivalente ao do uso da frutose. Buchholz et al. (1987) apresentaram como EC de açúcar para etanol de 96% para *Z. mobilis* com temperatura ótima de $25\text{-}30^{\circ}\text{C}$.

Como informação adicional foram necessárias 102 horas para se atingir o estado estacionário na $D=0.045\text{ h}^{-1}$, indicando o período de adaptação celular ao meio, sugerindo baixa disponibilidade de nutrientes. Reforçando esta idéia, Rogers et al. (1982) utilizaram alta concentração de sacarose na fermentação contínua e não detectaram açúcar em D menor que 0.1 h^{-1} .

Levana só foi detectada em baixíssimas quantidades. Estes resultados vêm de encontro com vários autores que concluíram que na limitação da fonte de carbono não observaram a formação de subprodutos (9; 18). Em contraste, Buzato (1994) teve produção de 2 g/L de levana nas $D=0.32$ e 0.35 h^{-1} e observou a existência de 1,5 e 4 g/L de ART residuais nestas mesmas D respectivas.

Paradoxalmente, Crittenden e Doelle (1994) e posteriormente, Ananthalakshmy e Gunaseka (1999) a hidrólise da sacarose, esteve em níveis baixos.

Neste trabalho podemos concluir que a fermentação de 20,3 g/L de sacarose da cana por *Z. mobilis* CP4 nas $D=0.045$; 0.14 e 0.23 h^{-1} foram equivalentes para a produção de etanol. Ressaltando a observação da difícil estabilização da biomassa ocorrida na $D=0,045\text{ h}^{-1}$. A $D=0.34\text{ h}^{-1}$ foi a menos eficiente na produção de etanol.

Obtivemos aqui com a sacarose e *Z. mobilis* CP4 uma produção de etanol equivalente aos parâmetros descritos com a utilização da glicose e frutose. Indicando-se que a bactéria pode atingir um bom desempenho metabólico, para a produção de etanol, com a sacarose da cana.

Agradecimentos

À CAPES e aos Departamentos - de Bioquímica e de Química - da UEL.

Referências Bibliográficas

- AMORIM, H.V.; ZAGO, E. A.; OLIVEIRA, A.J. *Novos métodos analíticos para o controle da fermentação alcoólica*. São Paulo: Sociedade Brasileira de Microbiologia, 1982. 58p.
- ANANTHALAKSHMY, V.K.; GUNASEKARAN, P. Optimization of levan production by *Zymomonas mobilis*. *Braz. Arch. Biol. Technol.* v.42, n.3, p.292-297, 1999.
- BORREGO, R.; OBÓN, J. M.; CÁNOVAS, M.; MANJÓN, A.; IBORRA, J.L. pH influence on ethanol production and retained biomass in a passively immobilized *Zymomonas mobilis* system. *Biotechn. Lett.* v. 10, n.6, p. 437-442, 1988.
- BUCHHOLZ, S.E.; DOOLEY, M.M.; EVELEIGH, D.E. *Zymomonas* – an alcoholic enigma. *Trends Biotechnol.*, v.5, n.7, p.199-204, 1987.
- BUZATO, J.B. Continuous fermentation of glucose, fructose and sucrose by *Zymomonas mobilis* CP4. *Arq. Biol. Technol.* v.37, n.3, p.527-538, 1994.
- CRITTENDEN, R.G.; DOELLE, H.W. Identification and characterisation of the extracellular sucrases of *Zymomonas mobilis* UQM 2716 (ATCC 39676). *Appl. Microbiol. Biotechnol.* v.41, p.302-308, 1994.
- CRUZ, M.R.; BORZANI, W. Ethanol fermentation of blackstrap molasses and sugar cane syrup by *Zymomonas*. *Rev. Bras. Technol.*, v.11, p.51-57, 1980.
- DIEZ, J.C.; YOKOYA, F. Cinética da produção de etanol em processo contínuo a partir de melaço de cana-de-açúcar por *Zymomonas mobilis*. *Arq. Biol. Technol.* v.39, n.1, p.139-148, 1996a.
- DIEZ, J.C.; YOKOYA, F. Efeito da temperatura e pH na produção de etanol e levana durante a fermentação de sacarose por *Zymomonas mobilis*. *Arq. Biol. Technol.* v.39, n.1, p.129-137, 1996b.
- FALCÃO DE MORAIS, J.O.; RIOS, E.M.M.M.; CALAZANS, G.M.T.; LOPES, C.E. *Zymomonas mobilis* research in the Pernambuco Federal University. *J. Biotechnol.* v.31, p.75-91, 1993.
- 11.GARRO, O.A.; RODRÍGUES, E.; UNDA, R.P.; CALLIERI,

11. GARRO, O.A.; RODRÍGUES, E.; UNDA, R.P.; CALLIERI, D.A.S. Mathematical modelling of the alcoholic fermentation of glucose by *Zymomonas mobilis mobilis*. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* v.63, p.367-373, 1995.

GONÇALVES DE LIMA, O.; ARAÚJO, J.M.; SCHUMACHER, I.E.; CAVALCANTI DA SILVA, E. Estudos de microrganismos antagonistas presentes nas bebidas fermentadas usadas pelo povo do Recife. I. sobre uma variedade de *Zymomonas mobilis* (Lindner) (1928) Kluyver e Van Niel (1936): *Zymomonas mobilis* var. *recifensis* (Gonçalves de Lima, Araújo, Schumacher & Cavalcanti) (1970), isolada de bebida popular denominada "caldo-de-cana-picado". *Rev. Inst. Antibiót.* v.10, n.1/2, p.3-15, 1970.

KING, F.G.; HOSSAIN, M.A. The effect of temperature, pH, and initial glucose concentration on the kinetics of ethanol production by *Zymomonas mobilis* in batch fermentation. *Biotech. Lett.* v.4, n.8, p.531-536, 1982.

LYNESS, E.; DOELLE, H.W. Ethanol production from cane juice by *Zymomonas mobilis*. *Biotechnol. Lett.* v.3, n.5, p.257-260, 1981.

ROGERS, P.L.; LEE, K.J.; SKOTNICKI, M.L.; TRIBE, D.E. Ethanol production by *Zymomonas mobilis*. *Adv. Biochem. Eng.* v.23, p.37-84, 1982.

SOMOGYI, M.A. A new reagent for the determination of sugar. *Bio. Chem.* 160:61-68, 1945.

TANO, M.S.; BUZATO, J.B.; CELLIGOI, M.A.P.C. Sugar cane juice fermentation by *Zymomonas mobilis* CP4 subjected to inhibition by ethanol and high initial concentration of substrate. *Braz. Arch. Biol. Technol.* v.43, n.4, p.425-430, 2000.

VIKARI, L. Formation of levan and sorbitol from sucrose by *Zymomonas mobilis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* v.19, p.252-255, 1984.