

# Otimização da produção de etanol por *Zymomonas mobilis* na fermentação do melão de cana-de-açúcar

## Optimization of ethanol production by *Zymomonas mobilis* in sugar cane molasses fermentation

Doumit Camilios Neto<sup>1</sup>; João Batista Buzato<sup>1\*</sup>; Maria Antonia Pedrine Colabone Celligoi<sup>2</sup>; Marcos Roberto Oliveira<sup>1</sup>

### Resumo

---

O presente estudo objetivou a otimização da produção de etanol por *Zymomonas mobilis* CP4, durante a fermentação do melão de cana-de-açúcar. Para a otimização do processo, foi aplicada a metodologia de superfície de resposta, empregando-se um delineamento fatorial incompleto 3<sup>3</sup>, sendo as variáveis independentes ou fatores: concentração de açúcar redutor total (ART) no melão de 10, 55 e 100 g/L ( $x_1$ ); concentração de extrato de levedura de 2, 11 e 20g/L ( $x_2$ ) e tempo de fermentação de 6, 15 e 24 horas ( $x_3$ ). As variáveis dependentes ou respostas foram produção e produtividade de etanol. Pela análise dos resultados, obteve-se bom ajuste do modelo aos dados experimentais. Nos níveis estudados, a melhor condição para produção de etanol foi com 100g/L de ART no melão, 2,0g/L de extrato de levedura e com tempo de fermentação entre 20 e 24 horas produzindo 30g/L de etanol.

**Palavras-chave:** Etanol. *Zymomonas mobilis*. Melão de cana-de-açúcar. Delineamento fatorial.

### Abstract

---

The present study aimed at the optimization of the ethanol production by *Zymomonas mobilis* CP4, during the fermentation of sugar cane molasses. As for the optimization process, the response surface methodology was applied, using a 3<sup>3</sup> incomplete factorial design, being the independent variables: total reducing sugar (TRS) concentration in the molasses from 10, 55 and 100 g/L ( $x_1$ ); yeast extract concentration from 2, 11 and 20 g/L ( $x_2$ ), and fermentation time from 6, 15 and 24 hours ( $x_3$ ). The dependant variables or answers were the production and productivity of ethanol. By the analysis of the results, a good adjustment of the model to the experimental data was obtained. In the levels studied, the best condition for the production of ethanol was with 100 g/L TRS in the syrup, 2.0 g/L of yeast extract and the fermentation time between 20 and 24 hours, producing 30 g/L of ethanol.

**Key words:** Ethanol. *Zymomonas mobilis*. Molasses. Factorial Design.

---

<sup>1</sup> Alunos do Mestrado em Biotecnologia.

\* Autor para correspondência Universidade Estadual de Londrina Departamento de Bioquímica e Biotecnologia – CCE Campus Universitário – 86051-990 Londrina PR Fone: 33714270, e-mail - buzato@uel.br

<sup>2</sup> Docentes do Departamento de Bioquímica e Biotecnologia – CCE – Universidade Estadual de Londrina. Caixa Postal:6001-CEP:86051-990, Londrina/Pr. Brasil.

## Introdução

A *Zymomonas mobilis* é uma bactéria gram-negativa, que utiliza sacarose, glicose e frutose como fonte de carbono e energia, produzindo quantidades equimolares de etanol e  $\text{CO}_2$  (SWINGS; DE LEY, 1977). Essa bactéria tem sido alvo de inúmeras pesquisas devido ao seu alto potencial fermentativo, do qual resulta em uma produção de etanol comparável ou até mesmo superior a obtida por leveduras (KANNAN; SANGILYANDI; GUNASEKARAN, 1998; DOELLE et al., 1993, YANASE et al., 1992). A elaboração de meios de cultivo de baixo custo é um importante fator em processos fermentativos industriais. O melaço de cana-de-açúcar é um subproduto da indústria do açúcar, apresenta uma alta concentração de sacarose, além de outras substâncias importantes para processos fermentativos (RHEE et al., 1984). A metodologia da superfície de resposta (MSR) é, atualmente, o mais popular conjunto de técnicas para otimização, devido a sua completa teoria, eficiência e simplicidade (BOX; DRAPER, 1987). O delineamento fatorial de Box-Behnken é um planejamento experimental utilizado para procedimentos de otimização e o modelo consiste na repetição do ponto central, para se medir a variabilidade experimental, mais um conjunto de pontos fatoriais ancorados no ponto central definindo a região de interesse (BOX; BEHNKEN, 1960). Nesse contexto o objetivo do presente trabalho foi à otimização da produção de etanol por *Zymomonas mobilis* durante a fermentação do melaço de cana-de-açúcar, utilizando o delineamento fatorial Box-Behnken.

## Materiais e Métodos

**Microrganismo:** *Zymomonas mobilis* CP4, originalmente isolada da bebida do Nordeste brasileiro denominada de “caldo de cana picado” (SWINGS ; DE LEY, 1977), mantida em placas a  $4^\circ\text{C}$ , em meio que contém sacarose (20,0 g/L); extrato de levedura (2,5 g/L);  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (1,0 g/L);  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (1,0 g/L);  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0,5 g/L); e ágar (20,0 g/L). Essas placas são repicadas a cada 30 dias.

**Meio de Fermentação:** Melaço concentração em g/L de açúcar redutor total (ART) (Tabela -1); Extrato de Levedura (g/L) (Tabela -1);  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (1,0 g/L);  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0,5g/L).

**Processo Fermentativo:** Os experimentos foram realizados segundo os princípios da metodologia estatística de superfície de resposta. Utilizou-se um delineamento fatorial incompleto  $3^3$ , com duas repetições no ponto central (Box; Behnken, 1960). A região experimental, ou seja, os limites superior e inferior da concentração de ART no melaço de cana-de-açúcar ( $x_1$ ), a concentração do extrato de levedura ( $x_2$ ) e tempo de fermentação em horas ( $x_3$ ) são mostrados na Tabela-1. Os cultivos em batelada utilizaram frascos Erlenmeyers de 125 mL com 25mL de meio, sem agitação, na temperatura de  $30^\circ\text{C}$ . O inóculo foi produzido a partir de células crescidas, centrifugadas e ressuspensas em salina estéril com concentração ajustada para 2,0g/L. Cada frasco de fermentação recebeu uma alíquota de 2,5mL dessa suspensão.

**Métodos Analíticos:** Os açúcares redutores totais foram quantificados de acordo com Dubois et al. (1956). A concentração do etanol foi determinada pelo método do dicromato de potássio (KAYE; HAAG, 1954).

**Tabela 1.** Delineamento Fatorial de Box-Behnken com as variáveis independentes originais e codificadas e a respostas produção e produtividade de etanol.

Ensaios	Melão	Extrato de Levedura	Tempo de Fermentação	Etanol (g/L)	Produtividade (g.L <sup>-1</sup> .h)	Biomassa (g/L)
1	-1	-1	0	4,74	0,32	0,58
2	1	-1	0	30,78	2,05	1,08
3	-1	1	0	5,07	0,34	0,74
4	1	1	0	28,41	1,89	1,38
5	-1	0	-1	4,40	0,73	0,51
6	1	0	-1	16,57	2,76	1,23
7	-1	0	1	4,74	0,20	0,72
8	1	0	1	29,43	1,23	1,64
9	0	-1	-1	11,84	1,97	0,82
10	0	1	-1	11,84	1,97	0,70
11	0	-1	1	18,94	0,79	1,30
12	0	1	1	19,62	0,82	1,81
13	0	0	0	19,28	1,29	1,48
14	0	0	0	19,96	1,33	1,57
15	0	0	0	19,96	1,33	1,45

Variáveis originais			
Níveis	Melão (g/L)*	Extrato de Levedura (g/L)	Tempo de fermentação (horas)
-1	10,0	2,0	6
0	55,0	11,0	15
1	100,0	20,0	24

\* Concentração em g/L de ART

## Resultados e Discussão

Os modelos obtidos pela superfície de resposta, são representados pelas equações ajustadas mostradas abaixo:

$$\hat{Y}_1 = 19,730 + 10,781x_1 - 0,169x_2 + 3,509x_3 - 2,128x_1^2 - 0,352x_2^2 - 3,819x_3^2 - 0,676x_1x_2 + 3,129x_1x_3 + 0,169x_2x_3$$

(1,18)    (0,72)    (0,72)    (0,72)    (1,07)    (1,07)    (1,07)    (1,02)    (1,02)

$$\hat{Y}_2 = 1,315 + 0,794x_1 - 0,013x_2 - 0,551x_3 - 2,128x_1^2 - 0,003x_2^2 + 0,076x_3^2 - 0,045x_1x_2 - 0,250x_1x_3 + 0,007x_2x_3$$

(0,04)    (0,02)    (0,02)    (0,02)    (0,03)    (0,03)    (0,03)    (0,03)    (0,03)    (0,03)

Onde:  $\hat{Y}_1$  representa a concentração de etanol em g/L esperada;  $\hat{Y}_2$  representa a produtividade de etanol esperada em g/L.h<sup>-1</sup>;  $x_1$  concentração de ART no melão de cana-de-açúcar;  $x_2$  a concentração do

extrato de levedura;  $x_3$  o tempo de fermentação em horas; e entre parênteses o erro-padrão respectivo.

Os valores dos coeficientes de determinação total ( $R^2$ ), observados para as respostas  $\hat{Y}_1$  (produção de

etanol em g/L) e  $\hat{Y}_2$  (produtividade de etanol esperada em g/L.h<sup>-1</sup>) foram de 0,982 e 0,997, respectivamente, sugerindo um bom ajuste do modelo aos dados experimentais. A análise de variância do modelo quadrático indicou que a intersecção, o termo linear da concentração de meloço de cana-de-açúcar, o termo linear e quadrático do tempo de fermentação, bem como a interação entre a concentração do meloço e o tempo de fermentação foram os fatores que mais influenciaram ( $p < 0,05$ ) a produção de etanol. A falta de ajuste foi significativa ( $p < 0,05$ ) o que não invalida o modelo para fins preditivos, pois a equação apresentou um  $R^2$  de alto valor (0,982) e a análise de variância mostrou um modelo muito significativo (Tabela 2). Enquanto que a resposta produtividade de etanol os termos linear e quadrático da concentração de meloço de cana-de-açúcar, o termo linear do tempo de fermentação e a interação entre a concentração do meloço e o tempo de fermentação foram os fatores que mais influenciaram ( $p < 0,05$ ). A falta de ajuste, para a equação da resposta produtividade de etanol, foi não significativa (Tabela 3), indicando que a equação preditiva pode ser utilizada para qualquer combinação dos valores das variáveis estudadas. Os termos lineares e

quadráticos da concentração de extrato de levedura não foram significativos ( $p > 0,05$ ), indicando que a concentração de extrato de levedura estabelecida para o limite inferior do delineamento (2,0 g/L) mostrou-se suficiente para o processo, nas duas respostas estudadas. Valores superiores a essa concentração causaram um efeito negativo na produção e na produtividade de etanol. O aumento da concentração de extrato de levedura provocou um excesso de fonte de nitrogênio no meio, uma vez que esse composto apresenta uma diversidade de peptídeos e aminoácidos, além de sais que podem ser utilizados como fontes de nitrogênio (SANCHEZ; DEMAIN, 2002). Assim, a diminuição da produção de etanol pode ter sido causada pelo excesso de fonte de nitrogênio. Entretanto, a alta concentração de extrato de levedura proporcionou um aumento na concentração de biomassa, uma vez que a *Zymomonas* utiliza esse composto não apenas como fonte de nitrogênio, mas também como blocos para biossíntese (BELAÏCH; SENEZ, 1965), implicando em uma menor necessidade de energia, o que justificaria a diminuição na produção de etanol e, conseqüentemente, a menor formação de ATP.

**Tabela 2.** Análise de Variância da equação da produção de etanol

	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F calculado
Modelo	1140,758	9	126,751	29,958**
Erro	21,154	5	4,231	
Falta de Ajuste	20,848	3	6,949	45,418*
Erro Puro	0,306	2	0,153	

\*\* significativo  $p < 0,01$  \* = significativo  $p < 0,05$

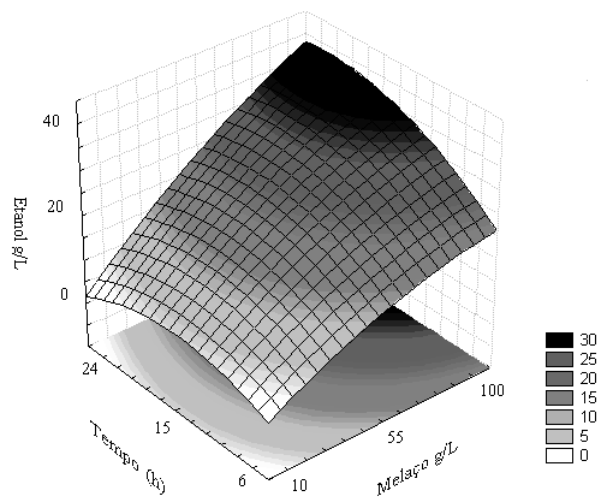
**Tabela 3.** Análise de Variância da equação da produtividade de etanol

	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F calculado
Modelo	7,8513	9	0,8724	212,780**
Erro	0,0205	5	0,0041	
Falta de Ajuste	0,0192	3	0,0064	9,460 (ns)
Erro Puro	0,0014	2	0,0007	

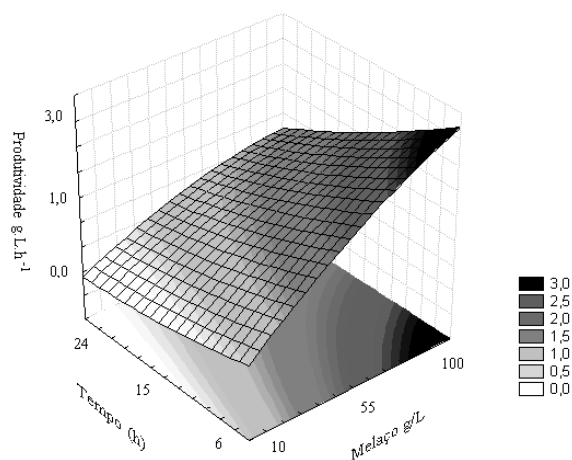
\*\* significativo  $p < 0,01$  ns = não significativo  $p < 0,10$

Neste trabalho, optou-se em se trabalhar com concentrações de ART no melaço inferiores a 150 g/L, pois nestas concentrações não há perdas de fonte de carbono para formação de sorbitol ou frutoligosacarídeos (KIRK; DOELLE, 1993), além de apresentarem maior eficiência de conversão e menor quantidade de açúcar residual (DOELLE; GREENFIELD, 1985). O aumento da concentração de ART do melaço e o aumento do tempo de fermentação apresentaram efeito positivo significativo na produção de etanol por *Zymomonas mobilis*. Assim, nos níveis estudados, a melhor condição para produção de etanol foi com 100g/L de ART no melaço, 2,0 g/L de extrato de levedura e o tempo de fermentação entre 20 e 24 horas com uma produção de 30 g/L de etanol. A produtividade segue a mesmas concentrações de melaço e extrato de levedura, entretanto tempo de fermentação ótimo situou-se no nível inferior do delineamento, uma vez que a redução do tempo de fermentação é um importante fator para o aumento da produtividade (MENEZES, 1980). A região de combinação binária entre as variáveis concentração de ART no melaço ( $x_1$ ) e tempo de fermentação ( $x_3$ ) para respostas, produção e produtividade de etanol pode também ser observada na Figura 1 e Figura 2 respectivamente, obtidas fixando-se a variável  $x_2$  no nível codificado -1 (2,0 g/L de extrato de levedura). Dessa forma, obtidos os modelos pela MSR, é possível deslocar-se sobre a superfície de resposta ajustada, a fim de localizar regiões que satisfaçam as condições de interesse, priorizando a produção ou produtividade de etanol.

A aplicação do modelo fatorial de Box-Behnken na produção de etanol por *Zymomonas mobilis*, apresentou-se como um progresso na previsão das condições de cultivo. A superfície de resposta mostrou-se como ferramenta eficiente para a otimização convertendo o bioprocessamento a um modelo matemático que prediz onde o ótimo provável será localizado.



**Figura 1.** Superfície de Resposta da Produção de Etanol por *Zymomonas mobilis* em melaço de cana-de-açúcar



**Figura 2.** Superfície de Resposta da Produtividade de Etanol por *Zymomonas mobilis* em melaço de cana-de-açúcar

## Referências

- BELAÏCH, J. P.; SENEZ, J. C. Influence of aeration and of pantothenate on growth yields of *Zymomonas mobilis*. *Journal of Bacteriology*, Washington, v. 89, n. 5, p. 1195-1200, 1965.
- BOX, G. E. P.; BEHNKEN, D. W. Some new three level designs for the study of quantitative variables. *Technometrics*, Washington, v. 2, p. 455-475, 1960.
- BOX, G. E. P.; DRAPER, N. R. *Empirical Model-Building and response surfaces*. New York: John Wiley & Sons, 1987.

- DOELLE, M. B.; GREENFIELD, P. F. The production of ethanol from sucrose using *Zymomonas mobilis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, Berlin, v. 22, p. 405-410, 1985.
- DOELLE, H. W.; KIRK, L.; CRITTENDEN, R.; TOH, H.; DOELLE, M. B. *Zymomonas mobilis* Science and Industrial Application. *Critical Reviews in Biotechnology*, Boca Raton, v. 13, p. 57-98, 1993.
- DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Analytical Chemistry*, Washington, v. 28, p. 350-356, 1956.
- KANNAN, T. R.; SANGILYANDI, G.; GUNASEKARAN, P. Improved ethanol production from sucrose by a mutant of *Zymomonas mobilis* lacking sucrases in immobilized cell fermentation. *Enzyme and Microbial Technology*, New York, v. 22, p. 179-184, 1998.
- KAYE, S.; HAAG, H.B. Determination of alcohol content. *Journal Forensic Medical*, v. 1, p. 373, 1954.
- KIRK, L. A.; DOELLE, H. W. Rapid ethanol production from sucrose without by-product formation. *Biotechnology Letters*, Dordrecht, v. 15, p. 985-990, 1993.
- MENEZES, T. J. B. *Etanol, o combustível do Brasil*. São Paulo: Agronômica Ceres, 1980.
- RHEE, S. K.; PAGAN, R. J.; LEFEBVRE, M. F.; ROGERS, P. L. Ethanol production from desalted molasses using *Saccharomyces* and *Zymomonas mobilis*. *Journal of Fermentation Technology*, Osaka, v. 62, p. 297-300, 1984.
- SANCHEZ, S.; DEMAINE, A. L. Metabolic regulation of fermentation processes Review. *Enzyme and Microbial Technology*, New York, v. 31, p. 895-906, 2002.
- SWINGS, J.; DE LEY, J. The Biology of *Zymomonas*. *Bacteriological Reviews*, Baltimore, v. 41, p. 1-46, 1977.
- YANASE, H.; IWATA, M.; NAKAHIGASHI, R.; KITA, K.; KATO, N.; TONOMURA, K. Purification, crystallization, and characterization of the extracellular levansucrase from *Zymomonas mobilis*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, Tokyo, v. 56, p. 1335-1337, 1992.