

COMPARAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ETANOL POR *Zymomonas mobilis* EM MEIO DE MELAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR PURO E PRÉ-TRATADO COM INVERTASE

FRANCIELLE GUILMAN ¹
JOÃO BATISTA BUZATO ²
MARIA ANTONIA P. COLABONE CELLIGOI ²

GUILMAN, F.; BUZATO, J. B.; CELLIGOI, M. A. P. C. Comparação da produção de etanol por *Zymomonas mobilis* em meio de melaço de cana-de-açúcar puro e pré-tratado com invertase. *Semina: Ci. Biol. Saúde*, Londrina, v. 20/21, n. 2, p. 39-43, jun. 1999/2000.

RESUMO: Foi estudada a produção de etanol por *Zymomonas mobilis* em melaço de cana-de-açúcar e melaço pré-tratado com invertase. Os cultivos foram realizados em batelada por 48 horas, em melaço a 120 g/L de açúcares redutores totais e temperatura constante de 30^o C. A produção de etanol e consumo de açúcares foram determinados. A melhor produção de etanol foi 39,5 g/L, no cultivo em melaço pré-tratado com e 1 mL de invertase por 30 minutos. Representando um aumento de 52,8% em relação ao cultivo sem adição de invertase.

PALAVRAS-CHAVE: *Zymomonas mobilis*; Etanol; melaço de cana-de-açúcar.

INTRODUÇÃO

Zymomonas mobilis tem sido alvo de inúmeras pesquisas devido ao seu alto potencial fermentativo que utiliza sacarose, glicose e frutose pela via de Entner-Doudoroff resultando em grande produção de etanol comparável ou mesmo superior ao das leveduras. (Kannan *et al.*, 1998; Stanley & Pamment, 1992; Yanase *et al.*, 1992),

Vários substratos podem ser utilizados como fonte de carbono na realização dos processos fermentativos. Geralmente procura-se estabelecer um meio de baixo custo e favorável ao desenvolvimento do microrganismo. O melaço de cana-de-açúcar é um dos principais substratos utilizados em fermentação que apresenta sacarose como principal fonte de carbono. (Park & Barati, 1992; Duarte *et al.*, 1996; Diez & Yokoya 1996).

A produção de etanol a partir de meios ricos em sacarose pela *Z mobilis* é consideravelmente reduzida pela formação de subprodutos tais como levana e sorbitol, assim o pré-tratamento do melaço com invertase pode reduzir a formação desses produtos e aumentar a produção de etanol. (Basseti, 1995)

Invertase ou frutofuranosidase (E.C. 3.2.126) é uma enzima produzida por várias plantas e microrganismos, mas aquelas produzidas por

leveduras têm importância industrial, que hidrolisa a sacarose, um dissacarídeo não redutor, em D – glicose e D – frutose (Bergamasco, 1989).

A quebra catalisada pela invertase de *Saccharomyces cerevisiae* tem a vantagem de produzir um produto de melhor qualidade, já que não resulta subproduto indesejável, proveniente de reações paralelas e não ocorre perda de açúcares totais (Basseti, 1995).

Considerando que *Zymomonas mobilis* ATCC 29191 pode durante o processo fermentativo levar uma hidrólise incompleta da sacarose resultando numa menor formação de etanol, (Doelle & Doelle, 1990). Este trabalho teve como objetivo pré tratar o melaço de cana-de-açúcar com invertase de *Saccharomyces cerevisiae* para melhorar a produção de etanol por *Zymomonas mobilis*.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

Microrganismo: *Zymomonas mobilis* ATCC 29191 foi mantida em meio líquido contendo glicose 20g/L; extrato de levedura 10g/L; (NH₄)₂ SO₄ 1g/L; KH₂PO₄ 2g/L; MgSO₄.7H₂O 0,5g/L; FeSO₄ 0,5g/L e peptona 5g/L. Após incubação por 24 horas a 30^o C, as culturas foram mantidas a 4^oC e reativadas a cada 30 dias.

¹ Aluna do Curso de Química – Universidade Estadual de Londrina

² Docentes do Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Exatas, Universidade Estadual de Londrina, Caixa Postal 6001, Londrina/Pr, CEP 86051-990, E-mail: celligo@inbrapenet.com.br

Matéria Prima: Melaço de cana-de-açúcar foi utilizado como fonte de carbono. Cedido pela Cooperativa Agrícola de Rolândia – PR

Invertase: A enzima foi extraída da levedura de panificação, *Saccharomyces cerevisiae*, segundo Nepomuceno (1998). Apresentando atividade de 267,609 Umol/mL/min,

Meios de fermentação: Melaço de cana-de-açúcar diluído a 12 % de açúcares redutores totais (ART), e melaço pré-tratado com 1ml da solução de invertase por 15 e 30 minutos.

Inóculo: O inóculo foi preparado cultivando a bactéria em meio de preservação por 24 horas a 30°C. Para a propagação do inóculo, 10% (v/v) desta cultura foi transferida para novo meio e incubado nas mesmas condições.

Fermentações: As fermentações foram realizadas em frascos erlenmeyer com 50 mL dos meios de melaço ou melaço com invertase, pH 6,0 por 0, 24 e 48 horas a 30°C, cultivo estático. Após cada tempo as fermentações foram interrompidas por centrifugação e do líquido metabólico foram quantificados os açúcares redutores e redutores totais, por somogyi e Nelson, segundo Amorim, (1982) e a produção de etanol por Kaye & Haag (1954).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos da fermentação em batelada, por *Zymomonas mobilis* ATCC 29191, utilizando como substrato melaço de cana-de-açúcar a 12% e pré-tratado com invertase estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 – Resultados da fermentação de *Zymomonas mobilis* ATCC 29191 em meio de melaço de cana-de-açúcar a 12% e melaço pré-tratado com 1 de invertase por 15 e 30 minutos.

TRATAMENTOS	TEMPO (Horas)	ART RESIDUAL (g/L)	AR (g/L)	CONSUMO DE AÇÚCARES (g/L) (%)		ETANOL (p) (g/L)	Ypr (%)	Yp (g/L.h)
0 mL	0	116.40	26.6	0	0	0	0	0
0 mL	24	90.1	54.5	26.3	22.15	20.48	33.5	0.85
0 mL	48	26.45	5.95	89.95	77.05	25.85	41.75	0.54
1mL + 15	0	111.0	31.7	0	0	0	0	0
1mL + 15	24	66.4	17.3	44.6	40.2	29.47	49.96	1.23
1mL + 15	48	39.5	6.6	71.5	64.4	32.34	54.8	0.67
1mL + 30	0	109.0	36.2	0	0	0	0	0
1mL + 30	24	64.4	15.7	44.6	41.0	31.26	53.0	1.3
1mL + 30	48	46.8	10.0	61.2	56.1	39.5	66.97	0.82

O meio de melaço, pré-tratado com 1 mL de invertase por 30 minutos elevou a concentração de açúcares redutores de 26,6 para 36,2 g/L, disponibilizando mais açúcares para a produção de etanol pela bactéria.

As Figuras de 1, 2 e 3 mostram a cinética do consumo de açúcares e a produção de etanol que tanto no melaço puro quanto no tratado com 1 mL de invertase por 15 e 30 minutos, a produção de etanol foi melhor em 48 horas de cultivo..

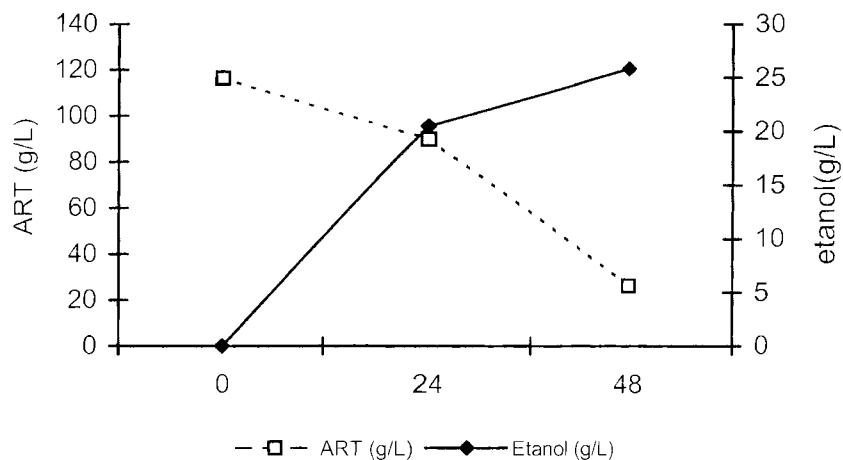


Figura 1 – Avaliação do Açúcar residual (g/L) e a produção de etanol (g/L) por *Zymomonas mobilis* em melão a 12%.

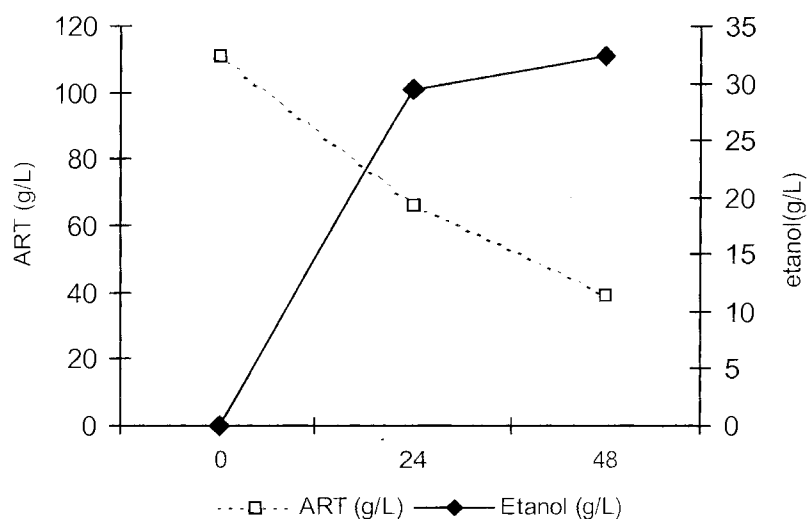


Figura 2 – Avaliação do Açúcar residual (g/L) e a produção de etanol (g/L) por *Zymomonas mobilis* em melão a 12% pré-tratado com 1 mL de invertase por 15 minutos.

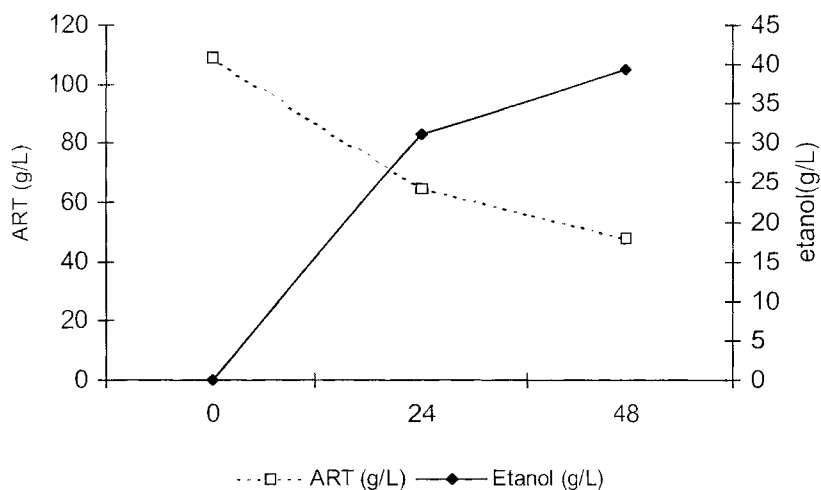


Figura 3 – Avaliação do Açúcar residual (g/L) e a produção de etanol (g/L) por *Zymomonas mobilis* em melão a 12% pré-tratado com 1 mL de invertase por 30 minutos.

A melhor produção de etanol 39,5 g/L foi obtida no cultivo utilizando melão suplementado com 1 mL de invertase por 30 minutos em 48 horas de cultivo (Figura 3), representando um aumento de 52,8% em relação ao cultivo sem tratamento com invertase no mesmo tempo de fermentação.

As melhores produtividades de etanol foram 1,23 e 1,3 g/L.h em 24 horas de cultivo nas diferentes condições estudadas. A adição de invertase aumentou significativamente este parâmetro quando comparado ao controle (Tabela 1).

Segundo Menezes (1980), o rendimento industrial do processo depende, em grande parte, dos nutrientes presentes no mosto de fermentação, e a redução do tempo é importante para aumentar a produtividade.

O rendimento da fermentação (Ypr%) foi melhor nos cultivos com invertase atingindo 54,8% e 66,97% com 15 e 30 minutos de tratamento respectivamente.

Doelle & Doelle (1990) justificam que no melão ocorrem menores rendimentos devido ao grande número de compostos inorgânico e outros materiais que inibem o processo.

A Figura 4 traz uma comparação da produção de etanol dos experimentos desenvolvidos, mostrando que a bactéria apresentou um comportamento positivo, no sentido de aumentar a produção de etanol com o aumento do tempo de tratamento do melão com a invertase.

Durante as fermentações o pH praticamente não se alterou, permanecendo próximo de pH 6,0. Este comportamento é totalmente diferente quando sacarose é utilizada para fermentação; nesse caso, sofre uma queda gradual. O melão apresenta, portanto, efeito tamponante. Segundo Diez & Yokoya (1996) esta ação estabilizadora do pH depende da composição química do melão.

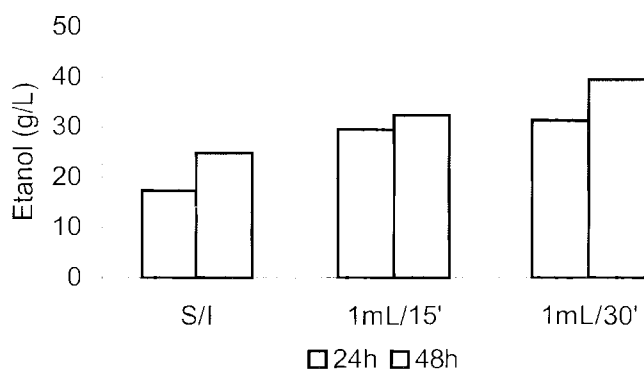


Figura 4 – Comparação da produção de etanol (g/L) em melão 12% e melão pré-tratado com invertase nos tempos de 24 e 48 horas.

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos nestes experimentos permitem relatar que: o pré-tratamento do melão de cana-de-açúcar com invertase aumentou a disponibilidade de açúcares redutores, que conseqüentemente aumentou a produção de etanol por *Zymomonas mobilis*.

A melhor condição para a produção de etanol foi com melão pré-tratado com 1 mL de invertase por 30 minutos e 48 horas de cultivo. A melhor produtividade foi em 24 horas também em melão pré-tratado. Assim esta técnica pode representar uma alternativa viável, para melhorar a produção de etanol, no meio de melão de cana-de-açúcar.

ABSTRACT: *The comparison of ethanol production by Zymomonas mobilis utilizing sugar-cane molasses in “natural” and pre-treated with invertase has been carried out. Batch fermentation were performed for 48 hours and sugar concentration was 120 g/L at 30°C. The highest ethanol concentration was 39.5 g/L when molasses was pre-treated with 1 mL of invertase, The value is 52,8 % higher than molasses in “natural” was used.*

KEY WORDS: *Zymomonas mobilis; Ethanol; sugar-cane molasses.*

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMORIM, H. V.; ZAGO, E. A.; OLIVEIRA, A. J. *Novos métodos analíticos para controle da fermentação alcoólica*. São Paulo: Sociedade Brasileira de Microbiologia, 1982. 58 p. Série: Manuais Técnicos e Científicos.
- BASSETI, F.J. *Caracterização da invertase imobilizada em sílica de porosidade controlada e sua aplicação em reator de leito fixo e fluidizado*. Londrina, 1995. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Estadual de Londrina.
- BERGAMASCO, R. *Cinética da Hidrólise de sacarose pela invertase: modelagem matemática*. Londrina, 1989. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Estadual de Londrina,
- DIEZ, J. C.; YOKOYA, F. Efeito da temperatura e pH na produção de etanol e levana durante a fermentação de sacarose por *Zymomonas mobilis*. *Arquivos de Biologia e Tecnologia*, v. 39, n. 1, p. 129-137, 1996 .
- DOELLE, M. B.; DOELLE, H. M. Sugar-cane molasses fermentation by *Zymomonas mobilis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. v. 33, p. 31-35, 1990.
- DUARTE, J. C.; CELLIGOI, M. A. P. C.; BUZATO, J. B. Fermentação alcoólica por *Zymomonas mobilis* CP4 ou por *Saccharomyces cerevisiae* em caldo-de cana com e sem suplemento lipídico. *Arquivos de Biologia e Biotecnologia*, v. 39, n. 2, p. 285-293, 1996.
- KANNAN, T.R.; SANGILIYANDI, G; GUNASEKARAN, P. Improved ethanol production from sucrose by a mutant of *Zymomonas mobilis* lacking sucrases in immobilized cell fermentation. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 22, p.179-184, 1998.
- KAYE, S.; HAAG, H.B. Determination of alcoholic content. *Journal Forenses Medical*. v.1. p. 373, 1954.
- MENEZES, T.J.B. de. *Etanol, o combustível do Brasil*. São Paulo: Agronômica Ceres, 1980. 233p.,
- NEPOMUCENO, M.F. *Bioquímica experimental*. Piracicaba: UNIMEP, 1998 Cinética enzimática II. Cinética enzimática da invertase. p.57-60.
- PARK, Y. K.; BARATI, J. C. Continuous ethanol production from sugar beet molasses using osmotoierant mutant strain of *Zymomonas mobilis*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*. v.73, n.1, p. 16-21, 1991.
- STANLEY, G. A.; PAMMENT, N. B. Transport and intracellular accumulation of acetaldehyde in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology Biotechnology*. v. 38, p. 656-663, 1992.
- YANASE, H.; IWATA, M.; NAKAHIGASHI, R.; KITA, K.; KATO, N.; TONOMURA, K. Purification, crystallisation and properties of the extracelular levansucrase from *Zymomonas mobilis*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. v. 56, p. 1335-1337, 1992.