

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
CENTRO DE TECNOLOGIA  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA**

**DIEGO ROMÃO GONDIM**

**PRODUÇÃO DE BIOETANOL UTILIZANDO CÉLULAS IMOBILIZADAS EM  
BAGAÇO DE CAJU**

**FORTALEZA  
2009**

DIEGO ROMÃO GONDIM

**PRODUÇÃO DE BIOETANOL UTILIZANDO CÉLULAS IMOBILIZADAS EM  
BAGAÇO DE CAJU**

Trabalho Final de Curso submetida à  
Coordenação do Curso de Graduação em  
Engenharia Química, da Universidade  
Federal do Ceará como requisito parcial para  
obtenção de grau em bacharel em Engenharia  
Química.

ORIENTADORA: Profa. Dr. Luciana Rocha  
Barros Gonçalves

Fortaleza  
2009

DIEGO ROMÃO GONDIM

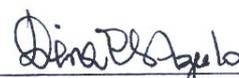
**PRODUÇÃO DE BIOETANOL UTILIZANDO CÉLULAS IMOBILIZADAS EM  
BAGAÇO DE CAJU**

Trabalho Final de Curso submetida à  
Coordenação do Curso de Graduação em  
Engenharia Química, da Universidade  
Federal do Ceará como requisito parcial para  
obtenção de grau em bacharel em Engenharia  
Química.

Aprovada em 30 / 11 / 09

**BANCA EXAMINADORA**

  
\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Luciana Rocha Barros Gonçalves (Orientadora)  
Universidade Federal do Ceará

  
\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Diana Cristina de Azevedo  
Universidade Federal do Ceará

  
\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Andrea Lopes de Oliveira Ferreira  
Universidade Federal do Ceará

Fortaleza  
2009

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus, por ter me concedido disposição para os estudos.

A minha família, irmãos Aurélia, Louise e Antônio, e meus pais, Maria do Socorro Romão e Antônio Gondim Pereira, pelo apoio moral, compreensão, atenção e incentivo na minha formação pessoal e profissional. E minhas adoráveis sobrinhas e afilhadas Cibelly e Livia, que são as pessoas mais preciosas do mundo.

A Profª. Dra. Luciana Rocha Barros Gonçalves, pela confiança, paciência e dedicação em repassar sua experiência para que fizesse parte do meu crescimento profissional.

A Agência Nacional do Petróleo pela oportunidade e suporte financeiro no desenvolvimento desse estudo, em especial ao Prof. Hosibeto Batista Sant'Ana.

Aos meus amigos do GPBio, que fazem desse grupo um ambiente divertido e agradável de trabalhar, meu carinho por todo o conhecimento e paciência repassados no desenvolvimento dos experimentos. Em especial, ao Alexandre Monteiro Pacheco.

Aos meus colegas de Graduação, que contribuíram para minha formação como Engenheiro Químico, sempre juntos nos estudos dividindo dúvidas e conhecimentos, cada um dando sua contribuição para o melhor aprendizado do grupo. Em especial aos meus amigos Lucas Barros e Francisco Edvar.

## RESUMO

O aproveitamento integral do pedúnculo de caju, uma matéria prima vastamente encontrada no Ceará e pouco aproveitada, aliado a produção de etanol, produto de valor energético são o foco desse projeto. A busca por melhorias na obtenção de etanol se deu através do estudo do uso de leveduras imobilizadas em suporte de bagaço de caju (SBC). A imobilização celular vem sendo estudada por inúmeros pesquisadores e tem se mostrado uma técnica importante devido aos benefícios e vantagens possibilitados como o aumento na produtividade. O bagaço de caju surge como uma matéria prima barata e de fácil obtenção para a aplicação da técnica de imobilização. O SBC foi pré-tratado com uma solução de HCl 3% e deslignificado com solução de NaOH 2%. Para comparação foram estudados os resultados com células livres e imobilizadas por adsorção em bagaço de caju. Foram verificados os seguintes parâmetros cinéticos: produtividade ( $Q_p$ ,  $\text{g.L}^{-1}\text{h}^{-1}$ ), eficiência ( $E_f$ , %), conversão substrato/biomassa ( $Y_{x/s}$ ,  $\text{g.g}^{-1}$ ) e conversão substrato/produto ( $Y_{p/s}$ ,  $\text{g.g}^{-1}$ ). As células foram quantificadas usando solução de azul de metileno utilizando a câmara de Neubauer. Concentrações de etanol variaram em torno de 20,63 e 23,92  $\text{g.L}^{-1}$  para fermentação em células livres e imobilizadas, respectivamente, e a produtividade variou de 2,58 e 2,99  $\text{g.L}^{-1}\text{h}^{-1}$  para ensaios com fermentação com células livres e imobilizadas, respectivamente, em oito horas de fermentação.

Palavras-chave: Bagaço de caju, etanol, fermentação alcoólica, levedura *Saccharomyces cerevisiae*, imobilização celular.

## ABSTRACT

The use of cashew apple peduncle, a vast by available material found in Ceará that is usually wasted, combined with production of ethanol, is the focus of this project. The search for improvements in ethanol production in this work was achieved through the study of yeast immobilization on cashew apple bagasse support, (SBC). Cell immobilization has been studied by many researchers and has been an important technique because of the possible benefits and advantages as the increase in productivity. Cashew apple bagasse is a cheap and easily accessible raw material to the application of the immobilization technique. The SBC was prepared through a treatment with a solution of HCl 3% and deslignification with NaOH 2% was also conducted. As comparison, results with free and immobilized cells by adsorption on SBC were studied. The following kinetic parameters were checked: productivity ( $Q_p$ ,  $\text{g.L}^{-1}\text{h}^{-1}$ ), efficiency ( $E_f$ , %), substrate / biomass yield ( $Y_x / s$ ,  $\text{g.g}^{-1}$ ) and substrate / product yield ( $Y_p / s$ ,  $\text{g.g}^{-1}$ ). The cells were quantified using a methylene blue solution, counted with a Neubauer camera. Ethanol concentrations (about 20,63 – 23,92  $\text{g.L}^{-1}$  in average value), and ethanol productivities (about 2.58 – 2.99  $\text{g.L}^{-1}\text{h}^{-1}$ ) in free and immobilization cell respectively were high and stable, in eight hours of fermentation.

Keywords: Cashew apple bagasse, ethanol, alcoholic fermentation, *Saccharomyces cerevisiae*, cell immobilization.

## SUMÁRIO

|  |     |
|--|-----|
| <b>LISTA DE FIGURAS</b> .....                                | i   |
| <b>LISTA DE TABELAS</b> .....                                | iii |
| <b>1. Introdução</b> .....                                   | 1   |
| <b>2. Revisão de Literatura</b> .....                        | 4   |
| 2.1. Bioquímica da fermentação alcoólica.....                | 4   |
| 2.2. Processo fermentativo para a produção de bioetanol..... | 4   |
| 2.3. Fermentação descontínua (batelada).....                 | 5   |
| 2.4. Fatores que afetam a fermentação alcoólica.....         | 5   |
| 2.4.1. pH.....   | 6   |
| 2.4.2. Temperatura.....                                      | 6   |
| 2.4.3. Concentração do Inóculo.....                          | 6   |
| 2.5. Imobilização Celular.....                               | 7   |
| 2.5.1. Métodos de Imobilização.....                          | 7   |
| 2.5.1.1 Ligação a superfícies.....                           | 8   |
| 2.5.1.2 Aprisionamento em matrizes porosas.....              | 8   |
| 2.5.1.3 Contenção por membranas.....                         | 8   |
| 2.5.1.4 Auto-agregação.....                                  | 9   |
| 2.5.2. Suporte de Imobilização.....                          | 9   |
| 2.6. Microrganismos Produtores de Etanol.....                | 10  |
| 2.6.1. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....                 | 10  |
| <b>3. Objetivos</b> .....                                    | 12  |
| 3.1. Objetivo Geral.....                                     | 12  |
| 3.2. Objetivos Específicos.....                              | 12  |
| <b>4. Materiais e Métodos</b> .....                          | 13  |
| 4.1. Matéria-prima.....                                      | 13  |
| 4.2. Tratamento do bagaço de caju.....                       | 13  |
| 4.2.1. Tratamento Ácido.....                                 | 14  |
| 4.2.2. Tratamento Básico.....                                | 14  |
| 4.3. Microrganismo.....                                      | 15  |
| 4.4. Meio de Manutenção e Ativação.....                      | 16  |
| 4.5. Preparo do Inóculo.....                                 | 16  |

|   |           |
|---|-----------|
| 4.6. Imobilização das células no Bagaço de Caju.....                    | 18        |
| 4.7. Ensaio fermentativo para a produção de etanol.....                 | 20        |
| 4.7.1. Ensaio com células livres.....                                   | 20        |
| 4.7.2. Ensaio com células imobilizadas.....                             | 21        |
| 4.8. Métodos Analíticos.....  | 21        |
| 4.8.1. Concentração de Biomassa.....                                    | 21        |
| 4.8.2. Contagem de células.....   | 21        |
| 4.8.2.1. Contagem de células livres.....                                | 21        |
| 4.8.2.2. Contagem de células imobilizadas.....                          | 23        |
| 4.8.2.3. Método de eficiência da imobilização.....                      | 24        |
| 4.8.3. Concentração de Glicose, Frutose, Glicerol e Etanol.....         | 24        |
| 4.8.4. Cálculos dos parâmetros cinéticos das fermentações.....          | 26        |
| <b>5. Resultados e Discussão.....</b>                                   | <b>27</b> |
| 5.1. Produção de etanol por <i>S. cerevisiae</i> em meio sintético..... | 27        |
| 5.1.1. Fermentação com células livres.....                              | 27        |
| 5.1.2. Fermentação com células imobilizadas.....                        | 29        |
| 5.1.2.1. Análise do crescimento celular no bagaço de caju.....          | 29        |
| 5.1.2.2. Eficiência da imobilização.....                                | 32        |
| <b>6. Conclusão.....</b>  | <b>34</b> |
| <b>7. Referências Bibliográficas.....</b>                               | <b>35</b> |

## LISTA DE FIGURAS

|                |  |    |
|----------------|--|----|
| FIGURA 1       | Fluxograma para o tratamento do bagaço de caju segundo o método utilizado por Dragone <i>et. al</i> para o bagaço de malte.....  | 13 |
| FIGURA 2       | Bagaço de caju triturado e peneirado em diâmetro de poros entre 0,84 e 0,35mm, após tratamento ácido (HCl 3%) e básico (NaOH 2%).....  | 14 |
| FIGURA 3       | Placa de petri com colônias isoladas de células de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....   | 15 |
| FIGURA 4 A e B | Procedimento de preparação do inóculo de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> em câmara asséptica.....  | 16 |
| FIGURA 5       | Meios para crescimento celular com células de <i>S. cerevisiae</i> em shacker sob agitação a 150 rpm e 30°C.....   | 17 |
| FIGURA 6       | Bagaço de caju com células imobilizadas.....   | 18 |
| FIGURA 7       | Fluxograma da imobilização de células no bagaço de caju.....   | 18 |
| FIGURA 8       | Microscópio óptico.....  | 21 |
| FIGURA 9       | Desenho esquemático da câmara de Neubauer evidenciando a área de contagem (quadrantes 1, 2, 3 e 4).....  | 21 |
| FIGURA 10      | Cromatógrafo líquido de alta eficiência (HPLC).....  | 24 |
| FIGURA 11      | Cromatogramas de amostras da fermentação para determinação da concentração de açúcares redutores, glicose (1) e frutose (2), glicerol (3) e etanol (4). Utilizando sistema de HPLC (Waters) na coluna Supelcogel C-610H..... | 24 |

FIGURA 12 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.....26

FIGURA 13 Consumo de glicose (●) e N° de células por grama de bagaço de caju (■).....29

FIGURA 14 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.....30

FIGURA 15 Gráfico da eficiência da imobilização de células no suporte de caju.....32

## LISTA DE TABELAS

|          |  |    |
|----------|--|----|
| TABELA 1 | Composição do meio inóculo para crescimento da levedura <i>S. cerevisiae</i> .....                 | 16 |
| TABELA 2 | Composição do meio para fermentação livre e imobilizada.....                                       | 19 |
| TABELA 3 | Comparação dos parâmetros cinéticos da fermentação com células livres.....                         | 27 |
| TABELA 4 | Parâmetros cinéticos para fermentação em células imobilizadas de alguns autores da literatura..... | 31 |

## 1. Introdução

A utilização de combustíveis renováveis tem despertado um interesse cada vez maior em todo o mundo. Os impactos positivos do uso dos renováveis, em substituição aos combustíveis fósseis, não se restringem apenas ao campo econômico, mas também a questões estratégicas e ambientais. Além de reduzir a dependência externa de petróleo e os gastos com energia, o uso de tais combustíveis resulta em uma diminuição significativa das emissões de gases tóxicos para a atmosfera. Esse último aspecto constitui um apelo cada vez maior para a substituição dos derivados de petróleo pelos assim chamados "biocombustíveis".

O Brasil atualmente se defronta com a perspectiva de um significativo aumento na demanda por etanol combustível. Esta previsão se sustenta em certas realidades de mercado como:

- Aumento do consumo interno de álcool hidratado devido ao sucesso do modelo *flex-fuel* no mercado de veículos automotivos leves;
- Expansão das exportações brasileiras de etanol em função do crescente interesse mundial pela mistura deste à gasolina, como forma de diminuir as emissões de gases de efeito estufa (GEE);
- Oscilações no preço do barril de petróleo, fonte não renovável de energia.

O etanol é um composto orgânico oxigenado de fórmula química  $C_2H_5OH$ . Em nosso país ele é utilizado como combustível automotivo em duas versões: álcool hidratado (em carros a álcool ou *flex fuel*) e álcool anidro (adicionado à gasolina na proporção de 25%). O primeiro tipo possui 7% de água na mistura, enquanto o segundo, no máximo, 0,7%. (CTBE, 2009)

Neste trabalho, buscou-se produzir etanol através da fermentação de açúcares diretamente fermentescíveis, tais como glicose e frutose, via ação de leveduras da espécie *Saccharomyces cerevisiae*. Em outros países, se utiliza milho (EUA e China), beterraba (União Européia), mandioca, trigo e uva como matéria-prima (CTBE, 2009).

A imobilização é um processo em que um material inerte age como suporte na biomassa, formando uma estrutura sólida que é quimicamente estável. Imobilização é

um termo que descreve muitas formas de células serem adsorvidas, encapsuladas ou aprisionadas (Veglio e Beolchini *et al.*, 1997). O método de adsorção é utilizado pela sua simplicidade, baixo custo, fácil manipulação e grande diversidade de suportes (Covizzi *et al.*, 2007). Pesquisas na área de imobilização de células têm aumentado consideravelmente no setor da biotecnologia e muitos trabalhos estão sendo desenvolvidos (Dragone *et al.*, 2006; Kopsahelis *et al.*, 2007; Santos *et al.*, 2008; Jianliang Yu *et al.*, 2007; Pacheco *et al.*, 2009). Nessa perspectiva, a utilização de células de leveduras imobilizadas em suportes inertes e de baixo custo é hoje um dos enfoques para aplicação em processos 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 (Giordano *et al.*, 2000; Vasconcelos *et al.*, 2004; Najafpour *et al.*, 2004; Yu *et al.*, 2007; Plessas e Bekatorou, 2007; Kopsahelis *et al.*, 2007; Santos *et al.*, 2007; Liang *et al.*, 2008; Pacheco *et al.*, 2009).

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 no reaproveitamento do microrganismo, alta probabilidade de contaminação e limitação na taxa de diluição em fermentações contínuas (Vasconcelos *et al.*, 2004).

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. Um resíduo agroindustrial, que pode ser transformado em suporte de baixo custo, é o bagaço de caju. A agroindústria do caju no Nordeste brasileiro desempenha importante função em termos de geração de emprego e renda. O bagaço 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). Por ser rico em fibras não digeríveis e carente em vitaminas e proteínas, o rejeito das indústrias de aproveitamento do pedúnculo de caju tem seu valor nutritivo

limitado, sendo simplesmente utilizado como ração animal ou descartado no meio ambiente (Campos *et al.*, 2005).

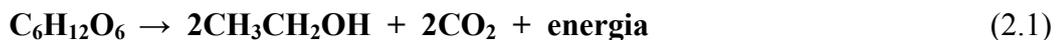
Desta forma, procurou-se através deste trabalho avaliar o uso do bagaço de caju, como suporte para imobilização das células buscando-se tanto eficiência na produção de etanol como redução do desperdício dessa matéria-prima. E na produção de etanol por fermentação, avaliou-se a utilização de *Saccharomyces cerevisiae*, um microrganismo muito utilizado industrialmente e de fácil manipulação.

## 2. Revisão de Literatura

### 2.1. Fermentação alcoólica

A fermentação alcoólica é um processo anaeróbico que ocorre com a transformação de açúcares, em etanol e CO<sub>2</sub>, catalisado por enzimas. Este processo é realizado principalmente por leveduras, a nível citoplasmático, com o objetivo de produzir energia a qual será empregada na realização de suas atividades fisiológicas, e ainda para seu crescimento e reprodução, sendo, o etanol, tão somente, um subproduto desse processo (Lima *et al.*, 2001).

De forma global, pode-se representar a fermentação alcoólica pela equação de Gay-Lussac, na qual se observa que 1 mol de glicose produz 2 moles de etanol e 2 moles de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) e 57 Kcal de energia (Lehninger *et al.*, 1995; Kolb, 2002).



O glicerol, também conhecido como glicerina, um dos produtos secundários mais importantes da fermentação alcoólica, é um álcool simples formado pela redução do fosfato dihidroxiketona. Desempenha uma importante função fisiológica, pois é um protetor osmótico. Este composto está presente em quase todas as bebidas alcoólicas (Zoeckleim *et al.*, 2001).

Durante a fermentação alcoólica o principal papel do glicerol é equilibrar o potencial de oxidação e redução endocelular da levedura e ainda, atua como osmoregulador em resposta a altas pressões osmóticas da solução de açúcar na fermentação (Balli, 2003).

### 2.2. Processo fermentativo para a produção de bioetanol

Tradicionalmente os processos fermentativos, importantes fontes de produtos biológicos, empregados nas indústrias farmacêutica, química de alimentos, são também

conhecidos como bioprocessos (Oliveira, 2006). Esses processos, conduzidos por microrganismos, compreendem um conjunto de operações que incluem a caracterização e o tratamento da matéria-prima, o preparo do meio de propagação e produção, a esterilização, a transformação do substrato em produto, bem como, a separação e purificação do produto obtido (Kosaric, 1996).

A fermentação pode ser conduzida mediante dois tipos de processos: o descontínuo (batelada), que pode ser simples ou alimentada (Melle-Boinnot) e o contínuo que utiliza biorreator único ou em série, com ou sem reciclo de células. O foco deste trabalho foi fermentação descontínua ou batelada (Oliveira, 2006).

### 2.3. Fermentação descontínua (batelada)

O processo em batelada pode ser considerado como um sistema fechado, onde nada é adicionado ao meio, exceto oxigênio. Neste processo o microrganismo passa por várias fases, seguindo uma curva típica de crescimento, e o substrato é todo disponível no início do processo (Ward e Owen, 1991) diferente do processo contínuo, onde o processo inicia-se com o cultivo em fase exponencial (Facciotti, 2001).

Esta forma de operação proporciona certas vantagens bem como menor suscetibilidade à contaminação, visto que o sistema é mantido intacto/fechado durante todo o processo. De acordo com Pereira Jr. (1999), as principais desvantagens deste processo são decorrentes dos clássicos fenômenos de inibição pelo substrato, produto ou outros metabolitos, pois concentrações elevadas de substrato podem ocasionar fenômenos osmóticos que resultam em plasmólise celular.

### 2.4. Fatores que afetam a fermentação alcoólica

Sabe-se que processos fermentativos devem ser controlados de forma que os carboidratos sejam assimilados e convertidos a etanol e/ou em compostos desejáveis ao processo, que minimizem formação de aromas e sabores indesejáveis (Ward e Owen, 1991).

Existem inúmeros fatores que afetam a fermentação dentre os quais podemos citar: pH, temperatura, concentração de microrganismo no meio (Lima *et al*, 2001). Todos estes fatores podem afetar o rendimento, ou seja, a eficiência de conversão de substrato em produto.

#### 2.4.1. pH

O pH é um fator importante para se determinar no meio de fermentação, pois pode inibir o crescimento celular e a formação do produto. Ward e Owen (1991) menciona que valores na faixa de pH entre 3 e 6 são na maioria das vezes favoráveis não só ao crescimento celular e atividade fermentativa como na formação de subprodutos, como glicerol.

#### 2.4.2. Temperatura

A temperatura pode ser considerada outro parâmetro de alta relevância, pois influencia na eficiência e desenvolvimento do processo fermentativo (Oliveira, 2006). Para microrganismos produtores de etanol, a temperatura ideal é considerada a ambiente, em torno de 30 °C.

#### 2.4.3. Concentração do Inóculo

Experimentalmente constata-se que, maiores concentrações de leveduras no biorreator permitem fermentações mais rápidas, com maior produtividade e controle contra contaminantes, além de restringir o crescimento do próprio microrganismo. Deve-se ressaltar que para altas concentrações celulares são necessários elevadas concentrações de substrato para suportar tal concentração celular. (Oliveira, 2006).

O gênero *Saccharomyces* constitui o grupo de leveduras de maior importância industrial sendo *S. cerevisiae* a mais utilizada na indústria de alimentos. No Brasil, são

comumente utilizadas como agentes de bioprocessos na panificação, na elaboração de bebidas, como cerveja, vinho, cachaça e na produção de álcool (Macedo, 1993; Ogawa *et al.*, 2000; Pacheco *et al.*, 2002).

## 2.5. Imobilização Celular

De acordo com a 1ª Conferência em Engenharia de Enzimas (Henniker, Estados Unidos, 1971), biocatalisadores imobilizados, enzimas ou células, são catalisadores fisicamente confinados ou localizados em uma região definida do espaço, com retenção de suas atividades catalíticas, e que podem ser utilizados repetida ou continuamente (Katchalski-Katzir e Kraemer, 2000).

O uso de sistemas com células imobilizadas tem sido considerado como uma alternativa viável para se aumentar a produtividade em razão das elevadas densidades celulares normalmente obtidas (Rama-Krishna, *et al.*, 1999). Em sistemas com células imobilizadas consegue-se maior massa de células por unidade de volume de trabalho do que em sistemas com células livres, sejam eles descontínuos, contínuos ou com recuperação de células (Pilkington *et al.*, 1998).

A técnica de imobilização celular pode ser definida como um procedimento que confina fisicamente células íntegras e cataliticamente ativas num sistema reacional e impede que elas passem à fase móvel que contém substrato e produto (Nunez e Lema., 1987).

### 2.5.1. Métodos de Imobilização

Existem quatro princípios básicos para a preparação de biocatalisadores: Ligação a superfícies, aprisionamento em matrizes porosas, contenção por membranas e auto-agregação (Gerbsch e Buchholz, 1995). A seguir, descrever-se-ão estes quatro métodos.

#### 2.5.1.1. Ligação a superfícies

O método de imobilização por meio de ligação a superfícies pode ser realizado por meio de interações iônicas ou adsorptivas, ou através de ligações covalentes entre grupos reativos do suporte e das células. A ligação por meio de adsorção e/ou interações iônicas é um método simples e barato, sendo a principal desvantagem a vulnerabilidade de perdas de células imobilizadas para o meio reacional (Park *et al.*, 2000; Groboillot. *et al.*, 1994; Canilha *et al.*, 2006; Carvalho *et al.*, 2006; Dragone *et al.*, 2006; Jianliang Yu *et al.*, 2007; Vasconcelos *et al.*, 2004; Pacheco *et al.*, 2009).

#### 2.5.1.2. Aprisionamento em matrizes porosas

A imobilização por meio de aprisionamento em matrizes porosas normalmente envolve a sintetização *in situ* da matriz porosa em torno das células a serem imobilizadas. Este método tem sido extensivamente estudado para a imobilização de células viáveis, devido à possibilidade de uso de polímeros hidrofílicos biocompatíveis como suportes de imobilização (Groboillot *et al.*, 1994). Além disso, as células imobilizadas em uma matriz hidrofílica podem ser protegidas de condições não adequadas de pH, temperatura, solventes orgânicos e/ou compostos inibidores presentes no meio de fermentação (Park *et al.*, 2000). Como principais desvantagens, são citados o pequeno volume disponível para a contenção das células imobilizadas, a perda de células para o meio de fermentação, que limitam a quantidade de células imobilizadas nas esferas, e a instabilidade dos suportes normalmente utilizados, que limita a utilização dos agregados por longos períodos (Park *et al.*, 2000).

#### 2.5.1.3. Contenção por membranas

O método de imobilização por meio de contenção em membranas envolve a utilização de membranas pré-formadas (reatores do tipo *hollow fiber*) ou a formação *in situ* da membrana em torno das células a serem imobilizadas (Karel *et al.*, 1985). Este

método, também conhecido como encapsulamento, tem sido utilizado como uma tecnologia alternativa ao aprisionamento em matrizes porosas, uma vez que oferece vantagens como maior capacidade de contenção de células e prevenção da perda de células para o meio de fermentação.

#### 2.5.1.4. Auto-agregação

A imobilização por meio de auto-agregação envolve a agregação ou a floculação das células de maneira natural ou artificialmente induzida. Desta forma, as células ligadas entre si sem a necessidade de uso de um suporte de imobilização. A floculação natural é uma propriedade de relativamente poucas células. Além disso, agregados celulares naturais são geralmente instáveis e sensíveis a tensões de cisalhamento, sendo necessária a adição de agentes químicos que formam ligações cruzadas entre células, como glutaraldeído, durante a imobilização (Groboillot *et al.*, 1994).

#### 2.5.2. Suporte de Imobilização

Existem na literatura outros suportes para imobilização celular além do bagaço de caju, podemos citar o bagaço de cana-de-açúcar (Bofo *et al.*, 2005), alginato de cálcio (Oliveira, 2006), dentre outros. Na atualidade há poucos trabalhos utilizando o suporte de caju que é quase em sua totalidade rejeitado na agroindústria do caju

O bagaço de caju pode ser aproveitado como suporte de imobilização visando maiores e melhores resultados na fermentação. Para tornar o bagaço de caju um eficiente suporte de imobilização, neste trabalho, utilizou-se tratamento similar ao efetuado por Dragone *et al.* (2006) e Pacheco *et al.*, (2009), que consiste em retirar lignina e hemi-celulose após tratamento ácido e básico.

A cultura do cajueiro, nativa da região Nordeste do Brasil, é responsável por um dos mais importantes itens da sua pauta de exportações: a castanha do caju. O pedúnculo do caju, representando cerca de 90% do peso do caju, é pouco aproveitado apesar de suas reconhecidas propriedades terapêuticas e nutricionais. Diante do restrito

mercado existente para bebidas a base do caju, a utilização do pedúnculo como fonte de produtos de valor agregado pode representar uma alternativa atraente para a Região Nordeste. Durante o processamento do pedúnculo para produção de suco, em torno de 40% (m/m) de bagaço é obtido, sendo quase em sua totalidade descartado pela indústria local. Contudo, a fibra do caju, sendo matéria-prima de baixo custo, pode ser uma fonte alternativa para bioprocessos, por exemplo, como suporte para imobilização de células.

## 2.6. Microrganismos Produtores de Etanol

Existem vários microrganismos capazes de produzir etanol, porém nenhum com a eficiência de *Saccharomyces cerevisiae*. *Kluyveromyces marxianus*, por exemplo, é uma levedura fermentadora de lactose e faz parte dos grãos de kefir utilizado na produção da bebida feita de leite fermentado. Lintong *et al.*, (2007) conseguiu, fermentando caldo de cana-de-açúcar como substrato, produtividade de  $1,45 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$  na produção de etanol utilizando essa levedura.

### 2.6.1. *Saccharomyces cerevisiae*

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é utilizada em cerca de 30% da produção do etanol brasileiro. Enquanto a levedura consome o açúcar, ela se multiplica, formando outras células, liberando gás carbônico ( $\text{CO}_2$ ) e formando etanol. (I.T., 2009).

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é um dos mais importantes microrganismos produtores de etanol devido a sua versatilidade em processos fermentativos submersos. Apesar de serem leveduras tolerantes a certas condições operacionais, podem ser limitadas por altas concentrações de açúcares e etanol, e apresenta baixa resistência quando utilizadas livres no meio de fermentação. Em vários estudos como os de Dragone *et al.* (2006) e Santos *et al.* (2008), os autores têm abordado o aumento da produtividade, redução do tempo dos processos, menor tamanho dos equipamentos, maior durabilidade e resistência das células quando se utilizam microrganismos 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.

### **3. Objetivos**

#### 3.1. Objetivo Geral

Desenvolver um biocatalisador de baixo custo que possa ser utilizado na produção de bioetanol.

#### 3.2. Objetivos Específicos

- Desenvolver metodologia de preparação da matéria-prima a ser usada como suporte para imobilização celular;
- Determinação da eficiência de imobilização em bagaço de caju pré-tratado;
- Estudo do processo da produção de bioetanol a partir de açúcares diretamente fermentescíveis utilizando células livres e imobilizadas;

## 4. Materiais e Métodos

### 4.1. Matéria-prima

O bagaço de caju utilizado neste trabalho foi fornecido pela Embrapa Agroindústria Tropical e Sucos do Brasil S/A. O material foi conservado em freezer dividido em vários recipientes até sua utilização.

### 4.2. Tratamento do bagaço de caju

Realizou-se o tratamento do bagaço de caju segundo o método utilizado por Dragone *et al.*, (2006) para o tratamento do bagaço de malte para produção de cervejas, com algumas alterações e semelhante ao tratamento utilizado por Pacheco *et al.*, (2009). Inicialmente, lavou-se o bagaço com água para retirada de impurezas, que em seguida foi seco em estufa (Tecnal Modelo TE-397/4) a 50°C e posteriormente triturado, em liquidificador e estocado em recipientes a temperatura ambiente. Após triturado o suporte foi submetido ao tratamento ácido com adição de HCl 3% e básico com NaOH 2%. A Figura 1 esquematiza o fluxograma utilizado de acordo com Dragone *et al.*, (2006), com algumas modificações, para o tratamento do bagaço de caju.

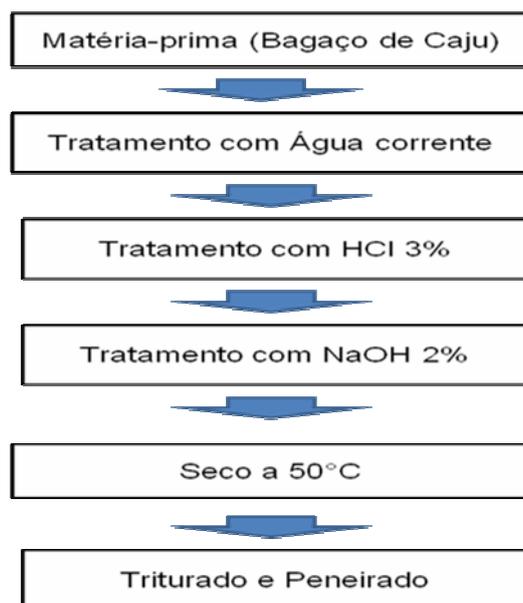


Figura 1. Fluxograma para o tratamento do bagaço de caju segundo o método utilizado por Dragone *et. al* (2006) para o bagaço de malte.

#### 4.2.1. Tratamento Ácido

O tratamento ácido consistiu na adição de HCl 3%, que tem por objetivo retirar a hemi-celulose (Pacheco *et al.*, 2009). Para cada 100 g de bagaço de caju utilizaram-se 1,5 L de HCl 3% (v/v) em becker de 4L sob agitação constante em banho termostático (Tecnal, TE/0541) à 60 °C por 2,5 horas. Em seguida, realizou-se filtração à vácuo e corrigiu-se o valor do pH utilizando solução tampão fosfato de sódio 0,2 M de pH 8,0. Posteriormente, lavou-se o bagaço com água na mesma proporção para retirar o excesso do tampão fosfato e depois secou o mesmo a 50 °C em estufa.

#### 4.2.2 Tratamento Alcalino ou tratamento de deslignificação

O tratamento alcalino foi realizado em agitador orbital a 120 rpm e 30 °C por 24 h. O tratamento de deslignificação com base (NaOH 2%) foi conduzido na mesma proporção utilizada no tratamento ácido, ou seja, para cada 100 g de bagaço utilizaram-

se 1,5 L de NaOH 2%. Posteriormente, filtrou-se o bagaço tratado e neutralizou-se com solução tampão acetato de sódio 0,2 M e pH 4. Em seguida, lavou-se o material com água, que foi posteriormente 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 (Figura 2) no tamanho desejado.

A remoção da lignina tem como objetivo expor mais grupos hidrofílicos de carga positiva presentes na celulose, aumentando as chances de adsorção das leveduras, possuidoras de cargas negativas (Lei Liang *et al.*, 2008).



Figura 2. Bagaço de caju triturado e peneirado em diâmetro de poros entre 0,84 e 0,35mm, após tratamento ácido (HCl 3%) e básico (NaOH 2%).

#### 4.3. Microrganismo

Neste trabalho, utilizou-se a levedura de panificação, *Saccharomyces cerevisiae*, que foi isolada do fermento Saf-momento (SAF Argentina, Buenos Aires), marca disponível no mercado durante o período de compra.

#### 4.4. Meio de Manutenção e Ativação

O meio Ágar sabouraud (AS) da empresa Biolife (Itália), contendo em sua composição: extrato de levedura 3 g.L<sup>-1</sup>, peptona 5 g.L<sup>-1</sup> e ágar 15 g.L<sup>-1</sup>, foi usado como meio de manutenção e ativação. Depois de preparado, o meio foi distribuído em Erlenmeyers e esterilizado em autoclave a 121 °C por 15 minutos. Em seguida, 15 a 20 L do meio AS foi distribuído em placas de Petri. Por fim, fez-se o repique de placas contendo a levedura *Saccharomyces cerevisiae* conservada a temperatura entre 15 a 20 °C, retirando uma colônia com alça de inoculação e transferindo para uma nova placa de forma sistematizada para permitir o crescimento ordenado em forma de colônias (Figura 3) por 48 h.



Figura 3. Placa de petri com colônias isoladas de células de *Saccharomyces cerevisiae*.

#### 4.5. Preparo do Inóculo

Na preparação do inóculo, utilizou-se o meio descrito na Tabela 1. Após a propagação da cultura em forma de colônias em placa retiraram-se 3 alças do *slant* contendo o microrganismo e transferiram-se para 100 mL de meio de propagação do inóculo. A seguir, realizou-se a incubação a 150 rpm e 30 °C por 24 horas, em agitador orbital (*Shaker Tecnal – TE 420*). Posteriormente, centrifugou-se (*Sigma C15, Osterode am Harz, Alemanha*) o inóculo a 10000 rpm por 10 min para se obter a biomassa inicial

do ensaio fermentativo. As Figuras 4A e 4B mostram o procedimento de preparação do inóculo realizado em câmara de fluxo laminar.

TABELA 1 - Composição do meio inóculo para crescimento da levedura *S. cerevisiae*.

| Componente  | Concentração (g.L <sup>-1</sup> ) |
|---|-----------------------------------|
| Glicose (C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub> )                  | 30,00                             |
| Extrato de Levedura   | 5,00                              |
| Sulfato de amônio ((NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )      | 10,00                             |
| Fosfato de potássio monobásico (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )         | 4,50                              |
| Sulfato de Magnésio Heptahidratado (MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O) | 1,00                              |
| Sulfato de zinco (ZnSO <sub>4</sub> )                                     | 0,65                              |



(A)



(B)

Figura 4 A e B. Procedimento de preparação do inóculo de *Saccharomyces cerevisiae* em câmara asséptica.

A Figura 5 mostra o meio inóculo, após a inoculação de células, em shaker sob agitação constante a 150 rpm a 30 °C durante 24 h para o crescimento da levedura no meio.



Figura 5. Meios para crescimento celular com células de *S. cerevisiae* em shaker sob agitação a 150 rpm e 30 °C.

#### 4.6. Imobilização das células no Bagaço de Caju

O meio de cultivo para imobilização da levedura apresentou a mesma composição do meio de preparo do inóculo, descrito na Tabela 1. Inicialmente, adicionaram-se 10% (m/v) do suporte de bagaço de caju tratado ao meio de cultura. Em seguida, realizou esterilização a 110 °C por 10 min. Em paralelo preparou-se o inóculo contendo as células que iriam ser imobilizadas, conforme metodologia descrita no item 4.6. Após 24h de cultivo, a levedura foi separada por centrifugação e inoculou-se 1% (m/v) de biomassa no meio contendo o bagaço de caju, previamente esterilizado, para possibilitar imobilização no suporte (Figura 6). O tempo de contato células/suporte foi de 24 h.



Figura 6. Bagaço de caju com células imobilizadas.

A Figura 7 mostra o fluxograma para a imobilização celular no bagaço de caju. Realizou-se o processo em duplicata em erlenmeyers de 500 ml contendo 125 ml de meio em cada.

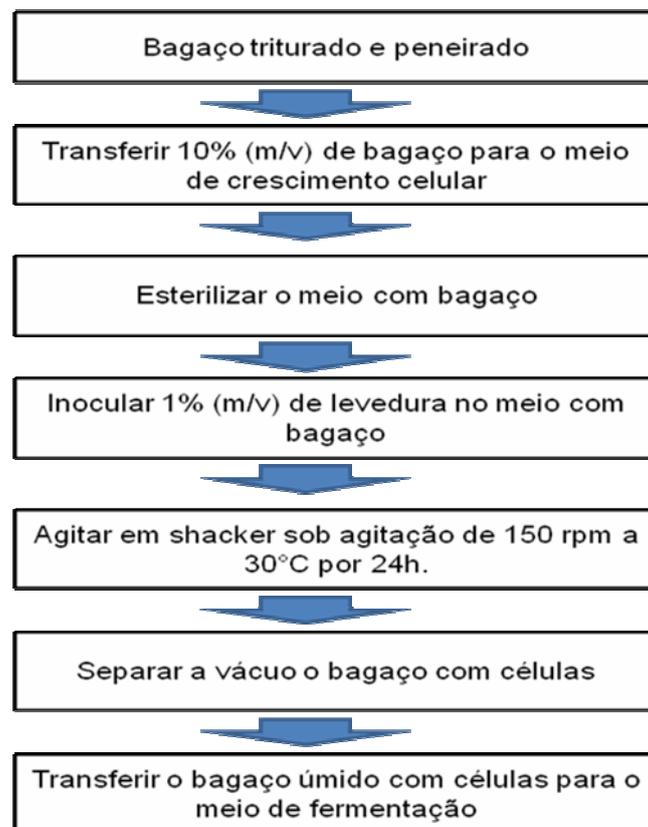


Figura 7. Fluxograma da imobilização de células no bagaço de caju.

#### 4.7. Ensaio fermentativos para a produção de etanol

A Tabela 2 mostra a composição utilizada para os meios de fermentação em células livres e imobilizada.

TABELA 2 - Composição do meio para fermentação livre e imobilizada.

| <b>Componente</b>  | <b>Concentração (g.L<sup>-1</sup>)</b> |
|--|--|
| Glicose (C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub> )                     | 40,00                                  |
| Frutose (C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub> )                     | 40,00                                  |
| Sulfato de amônio ((NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )         | 10,00                                  |
| Fosfato de potássio monobásico<br>(KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )         | 4,5                                    |
| Sulfato de Magnésio Heptahidratado<br>(MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O) | 1,00                                   |
| Sulfato de zinco (ZnSO <sub>4</sub> )  | 0,65                                   |

##### 4.7.1 Ensaio com células livres

Inicialmente, pesou-se a massa centrifugada de levedura obtida do inóculo e adicionou-se 1% (m/v) de biomassa no meio de fermentação. Os frascos foram colocados em agitador rotativo a 30 °C e 150 rpm. Amostras foram coletadas em tempos pré-determinados para acompanhamento dos parâmetros da fermentação. Todos os ensaios foram realizados em duplicata.

#### 4.7.2. Ensaio com células imobilizadas

Antes da fermentação, pesou-se o suporte de bagaço de caju com células imobilizadas (Figura 7) e distribuiu assepticamente em erlenmeyers de 500 ml contendo 125 mL de meio. Os frascos foram então colocados em agitador rotativo à 30 °C e 150 rpm. Amostras foram coletadas em tempos pré-determinados para acompanhamento dos parâmetros da fermentação. Todos os ensaios foram realizados em duplicata.

#### 4.8. Métodos Analíticos

##### 4.8.1. Concentração de Biomassa

Acompanhou-se a concentração celular pela densidade óptica (DO) do caldo fermentado à 660nm utilizando o espectrofotômetro (Marca: BIOCHROM LIBRA 322, Cambridge Inglaterra).

##### 4.8.2. Contagem de células

Realizou-se a contagem de células livres e imobilizadas utilizando a câmara de Neubauer (marca: New Optik). Utilizou o corante azul de metileno para determinar a viabilidade celular (Vasconcelos *et al.*, 2004), sendo viáveis as células que não absorveram o corante e inviáveis as que absorveram (Oliveira, 2006) e neste trabalho determinou o número total de células, tanto viáveis como inviáveis.

##### 4.8.2.1. Contagem de células livres

Para determinar o número total de células no meio inóculo, retiraram-se amostras de 0,1 ml do meio que foram diluídas em 1,4 ml de água destilada, para

facilitar a contagem, deixando na proporção 1:15. Após agitação e homogeneização da mistura retirou-se 0,1 ml e adicionou 0,3 ml de azul de metileno. Uma alíquota dessa mistura foi colocada por capilaridade entre a câmara de Neubauer e uma lamínula. E esperou aproximadamente 2 minutos para iniciar a contagem de células no microscópio óptico (Figura 8).



Figura 8. Microscópio óptico

Na Figura 9 mostra os 4 quadrantes que foram utilizados na contagem seguindo o procedimento adotado por (Vasconcelos *et al.*, 2004). Pela equação 1 pode-se calcular o número total de células livres no meio ( $N^{\circ} \text{ céls}(L)$ ).

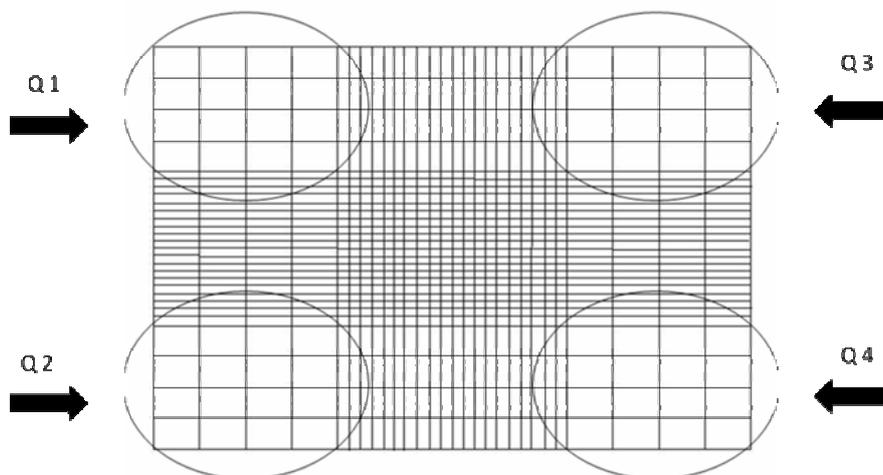


Figura 9. Desenho esquemático da câmara de Neubauer evidenciando a área de contagem (quadrantes 1, 2, 3 e 4)

$$N^{\circ} \text{ céls}(L) = \frac{nq}{4} \times fa \times 10000 \times Vi \times fb \quad (1)$$

Onde,

“*nq*” é o número de células contadas nos quatro quadrantes;

“*fa*” é o fator de diluição sendo igual 4, já que houve diluição de 0,1 ml de células para 0,4 ml;

“*Vi*” é o volume inicial do meio de fermentação;

O fator 10000 foi utilizado para corrigir unidades, pois o volume de um quadrante é 0,00002 mL (0,02 mm x 1 mm x 1mm).

#### 4.8.2.2. Contagem de células imobilizadas

Utilizou uma solução salina de NaCl para extração das células imobilizadas. Adicionaram-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 foi adicionada a 0,3 ml de uma solução de azul de metileno 0,2%. E uma alíquota dessa mistura foi colocada por capilaridade entre a câmara de Neubauer e uma lamínula. Após 2 minutos esperando as células sedimentarem a câmara foi utilizado o microscópio óptico (Figura 9) para contagem.

Pela equação 2 pode-se calcular o número total de células imobilizadas no bagaço de caju ( $N^{\circ} \text{ céls}(I)$ ).

$$N^{\circ} \text{ céls}(I) = \frac{nq}{4} \times fa \times 10000 \times 100 \times m \times fb \quad (2)$$

Onde,

“*fb*” é o fator de diluição da amostra em água destilada;

“*m*” é a massa total de bagaço 10% (m/v) no início da fermentação.

E o fator 100 mL é específico para as células imobilizadas no bagaço, visto que utilizou 50 mL de solução para extrair células de 0,5 g de bagaço de caju.

#### 4.8.2.3. Método de eficiência da imobilização

Foi utilizado como base o método adotado por Santos *et al.*, (2008), onde avalia a massa de células imobilizadas no suporte e sua concentração de células no volume médio de fermentação.

No decorrer do procedimento para o crescimento de células no suporte foi realizado um estudo da análise da eficiência de imobilização. Inicialmente retiraram-se amostras de bagaço e de meio inóculo e realizou contagem em ambos os casos como descrito no procedimento do item 4.9.2.1. Pela equação 3, determinou-se quanto de células estavam sendo imobilizadas no decorrer da análise.

$$Ef = \frac{N^{\circ}c\acute{e}ls(I)}{N^{\circ}c\acute{e}ls(I)+N^{\circ}c\acute{e}ls(L)} \times 100 \quad (3)$$

#### 4.8.3. Concentração de Glicose, Frutose, Glicerol e Etanol

Acompanhou-se a concentração de açúcares redutores (glicose e frutose), etanol e glicerol durante o processo fermentativo por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) como mostrado na Figura 10, utilizando sistema de HPLC (Waters, Milford, MA, EUA) equipado com um detector de índice de refração Waters 2414 e coluna Supelcogel C-610H. Utilizou-se uma solução 0,1 mol.L<sup>-1</sup> H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> como fase móvel com vazão de 0,5 mL.min<sup>-1</sup> a temperatura ambiente.

Figura 11 mostra cromatogramas de amostras da fermentação para determinação da concentração de açúcares redutores, evidenciando os picos de glicose (1), frutose (2), glicerol (3) e etanol (4). Utilizando sistema de HPLC (Waters) na

coluna Supelcogel C-610H. Essa figura representa as áreas encontradas para a fermentação com células livres no início e no fim.



Figura 10. Cromatógrafo líquido de alta eficiência (HPLC)

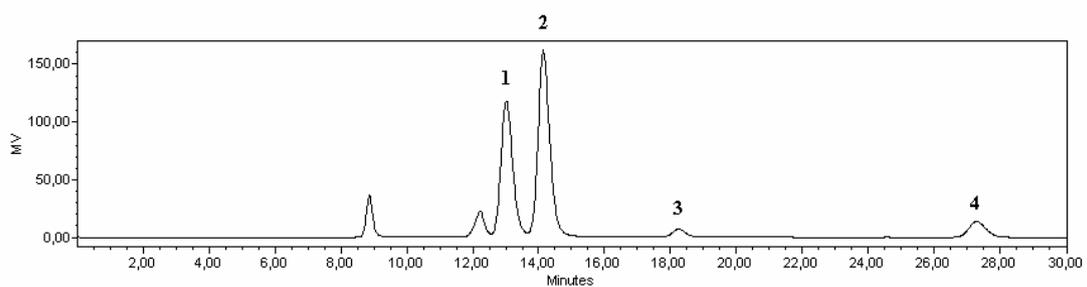
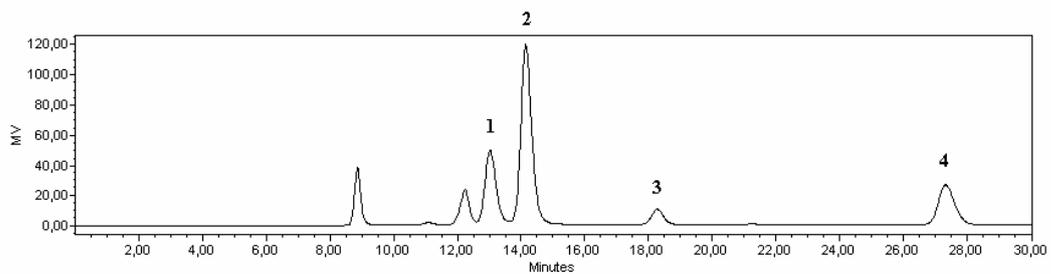


Figura 11. Cromatogramas de amostras da fermentação para determinação da concentração de açúcares redutores, glicose (1) e frutose (2), glicerol (3) e etanol (4). Utilizando sistema de HPLC (Waters) na coluna Supelcogel C-610H.

#### 4.8.4. Cálculos dos parâmetros cinéticos das fermentações

Os parâmetros cinéticos estudados foram produtividade ( $Q_p$ ), eficiência ( $\eta$ ), conversão substrato/biomassa ( $Y_{x/s}$ ) e conversão substrato/produto ( $Y_{p/s}$ ) e foram calculados pelas equações 4.4, 4.5, 4.6 e 4.7, respectivamente.

$$Q_p = \frac{Pf}{t} \quad (4)$$

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

$$\eta = \frac{Pf}{(Si - Sf) \times 0,5111} \times 100 \quad (5)$$

Sendo  $\eta$  (%) a eficiência,  $Si$  a concentração inicial dos substratos, 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).

$$Y_{x/s} = \frac{(Xf - Xi)}{(Si - Sf)} \quad (6)$$

Em que  $Y_{x/s}$  é o fator de conversão de substrato em biomassa, valor adimensional,  $Xi$  e  $Xf$  são as concentrações inicial e final de biomassa, respectivamente.

$$Y_{p/s} = \frac{Pf}{(Si - Sf)} \quad (7)$$

## 5. Resultados e Discussão

### 5.1. Produção de etanol por *S. cerevisiae* em meio sintético

#### 5.1.1. Fermentação com células livres

A Figura 12 apresenta os perfis de glicose, frutose, biomassa, etanol e glicerol durante a fermentação alcoólica utilizando células livres de *S. cerevisiae* durante 8 h. Verifica-se uma produção de etanol em torno de  $20 \text{ g.L}^{-1}$ . Consta-se que o consumo de glicose foi mais rápido que o de frutose ao longo da fermentação indicando maior afinidade da levedura pelo substrato glicose. Este resultado também foi obtido por outros autores (Pinheiro, *et al.*, 2008; Pacheco *et al.*, 2009), sendo que ambos os autores utilizaram suco de caju como substrato. Observa-se que o perfil de biomassa se manteve constante durante o processo. Houve produção de glicerol, obtendo concentração ( $2,7 \text{ g.L}^{-1}$ ) após 8 h de fermentação. Caso continuasse a fermentação todo o substrato do meio seria consumido, visto que ainda encontrasse no meio alta concentração de biomassa.

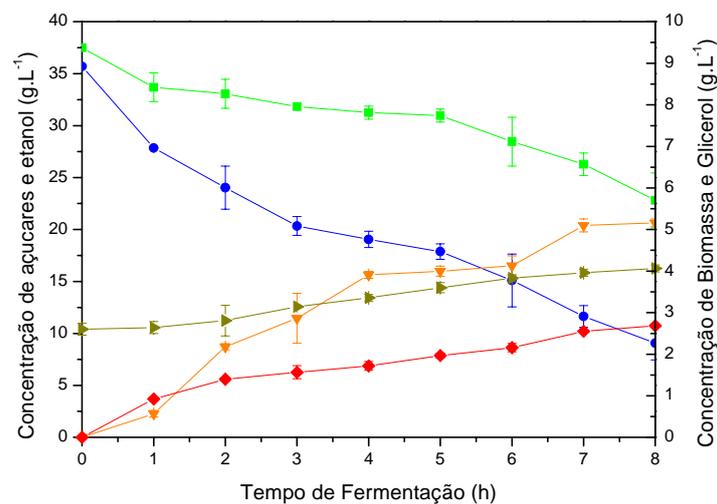


Figura 12. Fermentação em células livres com formação de etanol ( $\blacktriangle$ ) e glicerol ( $\blacklozenge$ ), consumo de glicose ( $\bullet$ ), frutose ( $\blacksquare$ ) e crescimento da biomassa ( $\blacktriangledown$ ) versus tempo de fermentação a 150 rpm e  $30^\circ\text{C}$ .

A Tabela 3 mostra os parâmetros cinéticos calculados a partir da Figura 12, produtividade ( $Q_p$ ), eficiência ( $\eta$ ), e conversão substrato/produto ( $Y_{P/S}$ ), além dos resultados obtidos por outros autores. Neste trabalho, obteve-se, para ensaios com células livres, eficiência de 97,66%, conversão de Açúcares Redutores Totais (ART) em etanol de 0,50 e produtividade igual a 2,58  $\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ . Segundo a Tabela 3, os resultados de produtividade obtidos neste trabalho foram similares aos de outros autores (Pinheiro *et al.*, 2008) para concentração inicial de ART em torno de 70  $\text{g.L}^{-1}$ . O valor obtido por Pacheco *et al.*, (2009) foi superior, mas da mesma ordem de grandeza. Porém estes autores utilizaram uma maior concentração inicial de açúcares, 86  $\text{g.L}^{-1}$ , o que pode levar a maiores velocidades de reação. Como esperado, a eficiência do processo fermentativo foi superior aos demais trabalhos, visto que utilizou-se meio sintético sem a presença de possíveis interferentes da fermentação.

Tabela 3 – Comparação dos parâmetros cinéticos da fermentação com células livres.

| Substrato   | Produtividade<br>$Q_p$<br>( $\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ) | Eficiência<br>$\eta$<br>(%) | Conversão de<br>substrato/produto<br>$Y_{P/S}$<br>(g/g) |
|---|---|-----------------------------|---|
| Meio Sintético (Glicose + Frutose)                                      | 2,58  | 97,66                       | 0,50  |
| Meio de cultivo a base de Suco de caju (Glicose + Frutose) <sup>1</sup> | 3,02  | 84,30                       | 0,43  |
| Meio de cultivo a base de Suco de caju (Glicose + Frutose) <sup>2</sup> | 4,29  | 88,95                       | 0,47  |

<sup>1</sup>Pinheiro *et al.*, 2008

<sup>2</sup>Pacheco *et al.*, 2009

## 5.1.2. Fermentação com células imobilizadas

### 5.1.2.1. Análise do crescimento celular no bagaço de caju

Inúmeros processos biotecnológicos mostram que a imobilização celular é uma alternativa na redução dos custos dos processos fermentativos. Devido a isso, diferentes técnicas e materiais para suporte de imobilização são profundamente estudados (Carvalho *et al.*, 2006; Sarrouh *et al.*, 2007 Santos *et al.*, 2008). Neste trabalho, uma importante etapa no estudo da imobilização consistiu no acompanhamento do crescimento celular no suporte durante o período que antecede a fermentação, ou seja, logo após a inoculação do microrganismo no meio de cultivo com o bagaço de caju. A Figura 13 apresenta os resultados do crescimento celular e consumo de glicose, única fonte de carbono presente, durante a imobilização de *Saccharomyces cerevisiae* no bagaço de caju. Observa-se o consumo de toda glicose presente no meio de cultivo após 10 h de imobilização, embora o número de células tenha atingido seu valor máximo em 4 h, e a partir desse tempo o número de células imobilizadas se manteve constante.

Verifica-se, na Figura 13, um número total de células (viáveis e ou não) imobilizadas no bagaço de caju após 20 h de análise em torno de  $4,5 \times 10^8$  células imobilizadas/g, resultado próximo ao número de células imobilizadas por Vasconcelos *et al.*, (2004),  $3 \times 10^9$  células imobilizadas/g, utilizando bagaço de cana-de-açúcar como suporte de imobilização. No trabalho de Pacheco (2009), que estudou a reutilização de células imobilizadas no mesmo suporte (bagaço de caju) em bateladas consecutivas, o autor obteve  $1,13 \times 10^8$  células imobilizadas/g após o ensaio de imobilização, ou seja, similar ao obtido neste trabalho.

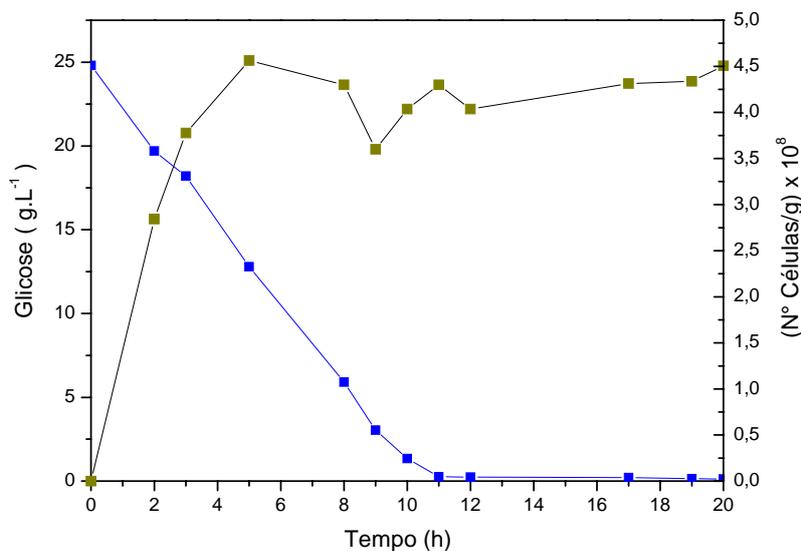


Figura 13. Consumo de glicose (●) e crescimento da biomassa (▼) durante 20 h de fermentação.

Importantes são as vantagens da fermentação com células imobilizadas: redução no tempo de fermentação, facilidade nos processos de separação e purificação do produto, aumento da produtividade, evitando gastos desnecessários (Carvalho *et al.*, 2006; Najafpour *et al.*, 2007; Santos *et al.*, 2008). A Figura 14 mostra os perfis de glicose, frutose, biomassa, etanol e glicerol da fermentação utilizando células imobilizadas no suporte de caju. Observa-se na Figura 14 que as células de *S. cerevisiae* imobilizadas consumiram todo o substrato presente no meio após 8 h de fermentação com produção de glicerol e etanol. A máxima concentração de etanol obtida foi de 23,9 g.L<sup>-1</sup> após 8 h de fermentação, com produtividade de 2,99 g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>. Ao final da fermentação, a concentração de glicerol foi de 3,34 g.L<sup>-1</sup>. Em relação à concentração de biomassa, calculada com base na Densidade Ótica (DO), observa-se que houve crescimento microbiano no meio fermentativo em torno de 6,65 g.L<sup>-1</sup> ao final do processo. Acredita-se que esse crescimento celular seja relacionado a uma possível migração das células do bagaço de caju para o meio de cultivo. No trabalho de Pacheco (2009), observou-se também o crescimento de biomassa (6,58 g.L<sup>-1</sup>) após 6 h de fermentação no caldo fermentado (suco de caju) utilizando células de *S. cerevisiae*

imobilizadas. Não se identificou em outros trabalhos da literatura o comportamento da biomassa utilizando outros suportes de imobilização para a levedura utilizada neste estudo.

Comparando estes resultados com os obtidos pelo gráfico da Figura 13, para ensaios com células livres, verifica-se que a fermentação em células imobilizadas diminuiu o tempo de fermentação e aumentou a produtividade do processo, visto que ao final da fermentação todo o substrato foi consumido para uma produção de etanol superior a de células livres.

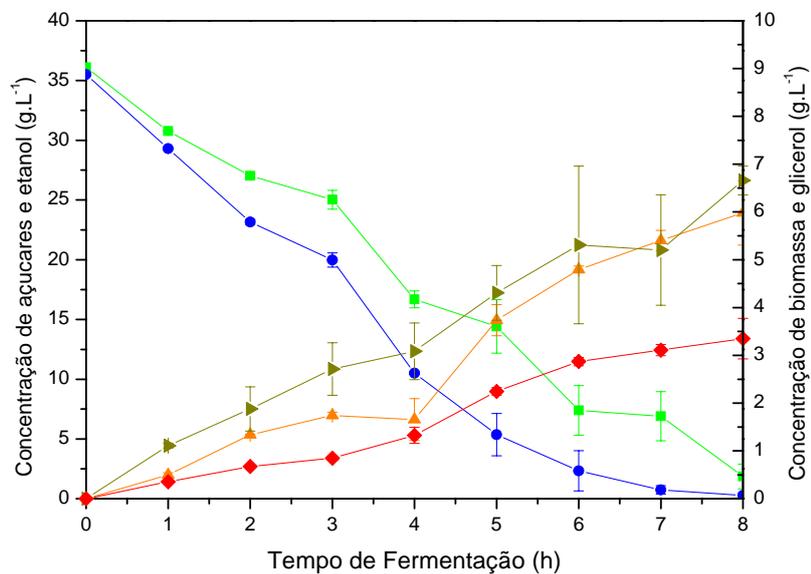


Figura 14. Fermentação em células imobilizadas com formação de etanol (▲) e glicerol (◆), consumo de glicose (●), frutose (■) e crescimento de biomassa (▼) versus tempo de fermentação a 150 rpm e 30 °C.

Diante dos resultados, constatou-se que o suporte estudado é interessante para imobilização uma vez que apresentou bons resultados preliminares de eficiência (67,4%), conversão de substrato em produto (0,32) e produtividade (2,98 g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>), comparáveis aos processos fermentativos com células imobilizadas disponíveis na literatura, mencionados na Tabela 4.

Observa-se na Tabela 4 que os suportes naturais demonstraram ser mais interessantes para imobilização celular, pois segundo Santos *et al.*, (2008) os suportes artificiais apresentam limitações quanto a transferência de oxigênio, que afetam diretamente o crescimento das células no suporte.

Tabela 4 – Parâmetros cinéticos para fermentação em células imobilizadas de alguns autores da literatura.

| Microrganismo                              | Produtividade<br>Qp<br>(g.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> ) | Eficiência<br>η<br>(%) | Conversão de<br>substrato/produto<br>Y <sub>P/S</sub><br>(g/g) | Suporte de<br>Imobilização           |
|--|--|------------------------|--|--------------------------------------|
| <i>S. cerevisiae</i>                       | 2,98   | 67,4                   | 0,32   | Bagaço de caju                       |
| <i>S. cerevisiae</i> <sup>1</sup>          | 1,79   | 81,62                  | 0,42   | Bagaço de caju                       |
| <i>Candida guilliermondii</i> <sup>2</sup> | 0,44   | 58,9                   | 0,54   | Alginato de Calcio                   |
| <i>Candida guilliermondii</i> <sup>3</sup> | 0,32-0,33  | 56,7-57,8              | 0,52-0,53  | Combinação de Zeólita e vidro poroso |
| <i>Candida guilliermondii</i> <sup>4</sup> | 0,66   | 70,8                   | 0,65   | Bagaço de cana de açúcar             |

<sup>1</sup> Pacheco, (2009)

<sup>2</sup> Carvalho et al., (2003)

<sup>3</sup> Santos, et al., (2005)

<sup>4</sup> Santos, et al., (2008)

#### 5.1.2.2. Eficiência da imobilização

A imobilização de células na superfície de um sólido é realizada por adsorção física devido a forças eletrostáticas ou por ligações covalentes entre a membrana celular microbiana e o suporte (Navarro *et al.*, 1977; Norton *et al.*, 1994). Isso facilita o processo de imobilização e valoriza a utilização de suportes sólidos a exemplo do bagaço de caju (Santos *et al.*, 2008).

Pode-se observar pela Figura 15, que a imobilização das células no suporte de bagaço de caju alcança eficiência de cerca de 57% com apenas 1 h de contato. Após 2 h, esse valor chega a 60%. A partir desse período a eficiência se mantém constante até o final do processo de imobilização, caracterizando uma saturação de células na superfície do suporte. Parte das células que foram imobilizadas no bagaço foram transferidas para o meio de fermentação.

Santos *et al.*, (2008) obteve máximos valores de eficiência (50,5%), somente após 21 h de imobilização para células de *Candida guilliermondii* FTI 20037 imobilizadas em bagaço de cana de açúcar para produção de xilitol. Estes autores procuraram explicar a demora expressiva da imobilização de acordo com Veliky e McLean (1994), os quais descreveram a ocorrência de duas etapas sucessivas que prejudicaram a imobilização. Na primeira, influenciado principalmente pelas interações físico-químicas, as células foram provavelmente transferidas e efetivamente ligadas à superfície do suporte sólido. Em seguida, há formação de uma substância adesiva capaz de alterar a matriz do suporte (Veliky e Mclean, 1994).

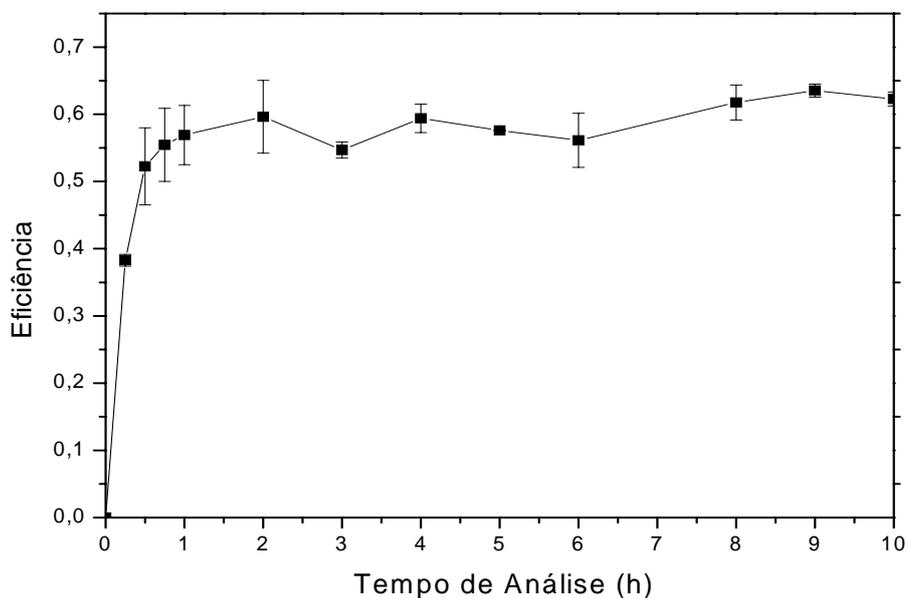


Figura 15. Eficiência de imobilização de células no suporte de caju.

## 6. Conclusão

A produção de etanol por fermentação utilizando células imobilizadas no suporte de caju foi eficiente, sendo uma alta concentração de etanol atingida, cerca de 24 g.L<sup>-1</sup>. A fermentação com células imobilizadas, quando comparada com a fermentação com células livres, apresentou maior produção de etanol em menor tempo de fermentação com consumo total de substrato. Obteve-se um número apreciável de células imobilizadas, aproximadamente 4×10<sup>8</sup> células/g de bagaço. Pelos resultados alcançados, o suporte de bagaço de caju é apropriado como agente imobilizador, visto que obteve alto valor de eficiência (60%), quando comparado com outros suportes da literatura.

## 7. Referências Bibliográficas

BALLI, D., FLARI, V., SAKELLARAKI, E., SCHOINA, V., ICONOMOPOULOU, M., BEKATOROU, A. e KANELLAKI, M. Effect of yeast cell immobilization and temperature on glycerol content in alcoholic fermentation with respect to wine making. Elsevier Science Ltd. Process Biochemistry. v. 39, p. 499-506, (2003).

BOFO D. C. S., CASTRO H. F., MEDEIROS M. B. Comparação da eficiência de imobilização das leveduras *Saccharomyces cerevisiae* CB-IX (osmotolerante) e *S. cerevisiae* ATCC 9763, em bagaço de cana-de-açúcar. Braz. J. Food Technol, (2005).

CAMPOS A. R. N., SANTANA R. A. C., DANTAS J. P., OLIVEIRA L. S. C. E SILVA F. L. H. Revista de Biologia e Ciências da terra ISSN 1519-5228 (2005).

CANILHA, L., CARVALHO, W. e SILVA, J. B. A. Biocatalizadores imobilizados: uso de células e enzimas imobilizadas em processos biotecnológicos. Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento ano IX – nº 36 – (2006).

CARVALHO, W., CANILHA, L. e SILVA, S.S. Uso de biocatalisadores imobilizados: uma alternativa para a condução de bioprocessos. Revista Analytica nº 23, p. 60-70, (2003).

CTBE - CENTRO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA DO BIOETANOL  
<http://www.bioetanol.org.br/interna/index.php?chave=bioetanol>.  
Acesso em 05/11/2009 às 19:30 h.

DRAGONE, G., MUSSATO, S. I. e SILVA, J. B. A., Fermentación de Cervezas de Altas Densidades por Processo Continuo Utilizando Levaduras Inmovilizadas, (2006).

FACIOTI, M. C. R. Fermentação Contínua. In: Biotecnologia Industrial: engenharia bioquímica. São Paulo-SP, v. 2, p. 223-246, (2001).

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).

GERBSCH, N. e BUCHHOLZ, R. *New processes and actual trends in biotechnology*. FEMS Microbiology Reviews. v. 16, p. 259-269, (1995).

GIORDANO, R. L. C., HIRANO, P. C., GONÇALVES, L. R. B. e Schmidell Netto, W. *Appl. Biochem. Biotechnol.* v. 84-86. p. 643-654 (2000).

GROBOILLOT, A, BOADI, D. K., PONCELET, D e NEUFELD, R. J. *Immobilization of cells for application in the food industry*. Critical Reviews in Biotechnology. v.14, p.75-107, (1994).

HASHIZUME T., AQUARONE E. *Biotecnologia Industrial*. Vol 4. 1ª edição pg 43. 1ª reimpressão 2005.

#### INOVAÇÃO TECNOLÓGICA

:<http://www.inovacaotecnologica.com.br/noticias/noticia.php?artigo=sequenciado-genoma-bacteria-produtora-etanol&id=>  
Acesso 01/11/2009 às 19:00

JIANLIANG YU, XU ZHANG, TIANWEI TAN. An novel immobilization method of *saccharomyces cerevisiae* to sorghum bagasse for ethanol production, (2007).

KAREL, S. F., LIBICKI, S. B. e ROBERTSON, C. R. *The immobilization of whole cells: Engineering principles*. Chemical Engineering Science. v.40, p. 1321-54, (1985).

KATCHALSKI-KATZIR, E. e KRAEMER, DM. *Eupergit C, a carrier for immobilization of enzymes of industrial potential*. Journal of Molecular Catalysis. v.10, p.157-176, (2000).

KOLB, E. *Vinos de frutas – Elaboración artesanal e industrial*. Zaragoza – Espanha. Ed. Acibia, p. 232, (2002).

KOPSAHELIS, N. *Bioresour. Technol.* doi:10.1016/j.biortech.2006. v. 03. p. 030, (2007).

KOSARIC, N. J., REED, G., PÜHLER, A. e STADLER, P. *Products Etanol – Potential source of energy and chemical products*. In: Rehm, H. of primary metabolism – Botechnology. 2 ed., Vch, p.121-203, (1996).

LEHNINGER, A. L., NELSON, D. L. e COX, M. M. Princípio de bioquímica. Traduzido por SIMÕES, A. A.; LODE, W. R. N. São Paulo: Ed. Sarvier, 2ªed., p. 839 tradução de: *Principles of biochemistry*, (1995).

LIANG, L., ZHANG, Y., ZHANG, L., ZHU, M. J., LIANG, S. e HUANG, Y. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. v. 35. p. 1605–1613, (2008).

LIMA, U. A., BASSO, L. C. e AMORIM, H. V. Fadiga. In: Biotecnologia industrial: processos fermentativos e enzimáticos. Produção de etanol. São Paulo-SP. v.3, p. 1-43 (2001).

LINTONG, S., SRINGIEW, C. e YONGMANITCHAI, W. Production of fuel ethanol at high temperature from sugar cane juice by a newly isolated *Kluyveromyces marxianus*. *Bioresource Technology* v. 98, p. 3367–3374, (2007).

MACEDO, L. C. H. Alcool Etílico. São Paulo. Ed. ICONI, p.157, (1993).

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).

NAJAFPOUR, G., YOUNESI, H., KU, S. and KU, I. *Bioresour. Technology*. v. 92, p. 251–260, (2004).

NUNEZ, M. J. e LEMA, J. M. Cell immobilization: application to alcohol production. *Enzyme Microb. Technol.* v. 9, p. 642-651, (1987).

OGAWA, Y., NITTA, A., UCHIYAMA, H., IMAMURA, T., SHIMOI, H., Ito, K. Tolerance mechanism of the ethanol-tolerant mutant of sake yeast. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. V. 90, n.3, p. 313-320, (2000).

OLIVEIRA, L. P. Seleção e aproveitamento Biotecnológico de frutos encontrados na Amazônia para elaboração de bebida alcoólica fermentada utilizando levedura imobilizada. Tese de doutorado UFAM Manaus-amazonas (2006).

PACHECO, M. T. B., SGARBIERi, V. C. Diferentes métodos de concentração de proteína de levedura e suas implicações nas propriedades funcionais. *Bol. SBCTA*, v. 36, n.2, p. 83-94,(2002).

PACHECO A. M. Estudo da viabilidade da produção de etanol a partir de suco de caju (*Anacardium occidentale* L.) Utilizando células imobilizadas em bagaço de caju. Tese de mestrado UFC Fortaleza-ceará (2009).

PACHECO A. M., GONDIM D. R., e GONÇALVES L. R. B. *Appl. Biochem. Biotechnol.* Ethanol production by fermentation using immobilized cells of *Saccharomyces cerevisiae* in cashew apple bagasse (2010) (no prelo).

PARK, J. K. e CHANG, H., N. Microencapsulation of microbial cells. *Biotechnology Advances*. v.18, p. 303-319, (2000).

PILKINGTON, P., MARGARITIS, A. e MENSOUR, N. Mass transfer characteristics of immobilized cells used in ermentation processes. *Critical Reviews in Biotechnology*. v. 18, p. 237-55, (1998).

PINHEIRO, A. D. T.; ROCHA, M. V. P.; MACEDO, G. R.; e GONÇALVES, L. R. B., Evaluation of Cashew Apple Juice for the Production of Fuel Ethanol. *Appl Biochem Biotechnol*, v.148, p.227-234, (2008).

PLESSAS, S. e BEKATOROU, A *Bioresour. Technol.* v.98. p. 860–865, (2007).

RAMAKRISHNA, S. V. e PRAKASHAM, R. S. *Microbial fermentations with immobilized cells*. *Current Science*. v.77, p.87-100, (1999).

SANTOS, J. C., MUSSATTO, S. I., DRAGONE, G., CONVERTI, A., SILVA S. S., Evaluation of porous glass and zeolite as cells carriers for xylitol production from sugarcane bagasse hydrolysate. *Biochem. Engineering Journal* v. 23 n. 1, p. 1-9 (2005).

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 xylitol production, *Journal of Food Engineering*, v.86, p. 542-548, (2008).

SARROUH, B. F., SANTOS, D. T., SILVA, S. S., Biotechnological production of xylitol in a three phase fluidized bed biorreactor with immobilized yeast cells in Calcium alginate beads. *Biotech. Journal* v. 2 n.6, p. 759-763 (2007).

VASCONCELOS, J. N., LOPES C. E. e FRANÇA F. P. Continuous ethanol production using yeast immobilized on sugar-cane stalks, (2004).

VEGLIO, F.E; BEOLCHINI, F. *Hydrometallurgy*, v. 44, p. 301. (1997).

VELICK, I. A., MACLEAN, R. J. C. Immobilized biosystems theory and practical applications. Chapman & Hall, Glasgow, UK., (1994).

WARD, OWEN. P. Biotecnología de La fermentación: principios, procesos y productos. Zaragoza (España). Ed. Acribia, (S. A), p. 155, (1991).

YU, J., ZHANG, X. e TAN, T. *Journal of Biotechnol.* v. 129. p. 415–420, (2007).

ZOECKLEIM, B. W., FUGLSANG, K. C., GUMP, B. H. e NURY, F. S. Análisis e Producción de Vino. Ed. Acribia S. A., p. 613., (2001) .