UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

Escola de Química

Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos



PRODUÇÃO CONTÍNUA DE ETANOL A
PARTIR DE HIDROLISADO ENZIMÁTICO DE
GRÃOS DE SORGO SACARINO [Sorghum
bicolor (L.) Moench] COM CÉLULAS
IMOBILIZADAS DE Saccharomyces cerevisiae EM
REATOR DE LEITO FIXO

Suzana Pimentel Soares

Orientador: Prof. Nei Pereira Jr., PhD

Rio de Janeiro

2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

Escola de Química

Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de

Processos Químicos e Bioquímicos

SUZANA PIMENTEL SOARES

PRODUÇÃO CONTÍNUA DE ETANOL A PARTIR DE HIDROLISADO ENZIMÁTICO DE GRÃOS DE SORGO SACARINO [Sorghum bicolor (L.) Moench] COM CÉLULAS IMOBILIZADAS DE Saccharomyces cerevisiae EM REATOR DE LEITO FIXO

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências (MSc).

Orientador

Professor Nei Pereira Jr., PhD

Rio de Janeiro

2014

Ficha Catalográfica

CIP - Catalogação na Publicação

Pimentel Soares, Suzana

Produção Contínua de Etanol a Partir de Hidrolisado Enzimático de Grãos de Sorgo Sacarino [Sorghum bicolor (L.) Moench] com Células Imobilizadas de Saccharomyces cerevisiae em Reator de Leito Fixo / Suzana Pimentel Soares. - - Rio de Janeiro, 2014. 82 f.

Orientador: Nei Pereira Jr.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Programa de Pós Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, 2014.

produção contínua de etanol.
 grãos de sorgo sacarino
 célula imobilizada.
 biorreator de leito fixo. Pereira Júnior, Nei, orient.
 Título.

Elaborado pelo Sistema de Geração Automática da UFRJ com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

PRODUÇÃO CONTÛNUA DE ETANOL A PARTIR DE HIDROLISADO ENZIMÁTICO DE GRÃOS DE SORGO SACARINO [Sorghum bicolor (L.) Moench] COM CÉLULAS IMOBILIZADAS DE Saccharomyces cerevisiae EM REATOR DE LEITO FIXO

Suzana Pimentel Soares

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos da Universidade Federal do Río de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do titulo de Mestre em Ciências (MSc).

Aprovada por:

Nei Pereira Jr., PhD (DEB/UFR) - Orientador Presidente

Eliana Mossé Alhadeff, DSc (DEB/OFRI)

Lidio Mario Melo Fanta aury Lidia Maria Melo Santa Anna, DSC (CENPES/PETROBRAS)

Apronio Carlos Augusto da Costa, DSc (IQ/IJERJ)

À Deus, dedico este trabalho, fruto de um amadurecimento pessoal e acadêmico abençoado por Ele

"Se o Senhor não edificar a casa, em vão trabalham os que edificam; se o Senhor não guardar a cidade, em vão vigia a sentinela.

Inútil vos será levantar de madrugada, repousar tarde, comer o pão de dores, pois assim dá Ele aos seus amados o sono." (Salmos 127, 1-2)

Agradecimentos

Agradeço a Deus, pelo sustento, pela provisão de minhas necessidades e por separar pessoas tão incríveis para passar por minha vida. Pessoas que agradeço nestas poucas páginas, de uma forma muito breve, mas com os melhores dos meus sentimentos.

Agradeço aos meus pais, Margarida e Soares, por todo o incentivo me dado, pelo suporte, por encarar esse projeto de frente comigo e, mesmo sem entender muitos dos experimentos, pensaram em alternativas e ficaram ansiosos pelos resultados;

Ao meu amor, Bruno, pelo companheirismo, preocupação e cuidados;

Ao meu orientador, Prof. Nei Pereira Jr., pelas palavras certas nas horas certas, pela exigência de um padrão de qualidade Pereira Jr., pela confiança em minhas ideias e por seus ensinamentos. Agradeço pelo acolhimento, pelas conversas construtivas que espantaram o "mimimi" e pela autonomia incentivada em seus laboratórios;

À minha co-orientadora, Carolina Barcelos, que me ensinou com suas atitudes a não desistir dos meus objetivos, a enxergar possibilidades quando tudo parece estar perdido, a ser forte e continuar. Agradeço pelo comprometimento em me orientar, por tomar o projeto como seu também e pela compreensão;

Agradeço com todo carinho e respeito ao Luiz Claudio, pelo seu incentivo, conhecimento e preocupação com o bem-estar dos alunos, inclusive, o meu. O meu muito obrigada, por se sentir envolvido com o projeto, por ir à bancada comigo e compartilhar minhas aflições;

Ao amigo, Roberto Maeda, pelo exemplo de humildade e inteligência que o torna um "consultor" de protocolos. Agradeço pela ajuda oferecida, pelas risadas e, claro, pela paciência;

Agradeço, em especial, à Johana, Fiora, Daiana, Ana e Túlio, companheiros de jornadas noturnas de trabalho, fins de semana científicos e feriados no laboratório, pela parceria, horas de sono possíveis, refeições e novelas, que tornaram noites e madrugadas muito mais que etapas cumpridas, mas também muito divertidas;

Aos alunos de iniciação científica Mônica, Nathália e Caio, pelo comprometimento com as atividades, pontualidade e interesse, além da amizade construída;

À amiga Ana Cristina Pantoja, meu agradecimento em especial não apenas por compartilhar momentos prazerosos, mas pela amizade e pelos desabafos. Passar pelo mestrado com a sua companhia transformou momentos difíceis em momentos de leveza, muito humor negro e alegria. Presença indispensável nos meus agradecimentos;

À Mariana Faber, pelo carinho, dicas, questionamentos, rascunhos e risadas;

Aos amigos do laboratório, Juliana, Patrícia, Camylle, Áurea, Carol, Élcio, Dani, Mônica, Lizete e aos demais alunos de iniciação científica, que foram e são muito importantes na minha história;

Aos secretários Janaína e Jorge, pela presteza e responsabilidade;

À professora Eliana Alhadeff, pela disponibilidade em conversar, trocar ideias, compartilhar experiências e pela confiança;

À Universidade Federal do Rio de Janeiro, pela estrutura e pelos projetos dispostos aos alunos:

Ao CENPES pelo financiamento e interesse prestados;

A todos o meu muito obrigada.

Resumo

PIMENTEL-SOARES, Suzana. Produção Contínua de Etanol a Partir de Hidrolisado Enzimático de Grãos de Sorgo Sacarino [Sorghum bicolor (L.) Moench] com Células Imobilizadas de Saccharomyces cerevisiae em Reator de Leito Fixo. Dissertação de Mestrado. Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2014.

Orientador: Nei Pereira Jr., PhD

A inserção do bioetanol na matriz energética mundial tem sido cada vez mais cogitada devido às incontestes vantagens ambientais que o seu uso promove, associadas à conscientização para a redução da demanda energética de fontes fósseis. Por isso, inovações tecnológicas devem ser incorporadas a fim de se reduzirem os custos de produção do bioetanol, incluindo a diversificação de matérias-primas para uma utilização mais eficiente e racional das destilarias anexas e autônomas já instaladas no Brasil. Neste contexto, o presente estudo objetivou investigar a produção contínua de etanol a partir do hidrolisado enzimático de grãos de sorgo sacarino, utilizando células imobilizadas de uma linhagem industrial de Saccharomyces cerevisiae. Inicialmente, foram realizados experimentos em frascos agitados para definição das melhores condições a serem empregadas em biorreator do tipo coluna, com volume nominal de 1 litro, projetado e construído para os objetivos deste trabalho. Estes experimentos preliminares permitiram eleger a concentração de alginato de cálcio de 2% (m/v) como a melhor, o que resultou em esferas com diâmetro médio de 4 mm, resistentes o suficiente e com estabilidade adequada para uso em processos fermentativos. No tocante à hidrólise enzimática do amido dos grãos de sorgo, o emprego de enzimas comerciais (20 μL α-amilase.g-1 grão e 40 μL glucoamilase.g-1 grão) e de uma relação sólido:líquido de 1:3 resultou em uma concentração de glicose de, aproximadamente, 245 g.L⁻¹, correspondendo a uma eficiência de hidrólise de 98%, ao final de apenas 90 minutos. A fermentabilidade do hidrolisado enzimático foi avaliada para duas concentrações iniciais de glicose, com meios suplementados ou não com nutrientes. Os melhores resultados foram obtidos com o meio contendo glicose em uma concentração inicial de 180 g.L⁻¹, sem suplementação de nutrientes. As células imobilizadas foram reutilizadas por 10 ciclos de fermentação em bateladas repetidas, tendo apresentado um excelente desempenho, confirmado por uma concentração média de etanol de 85 g.L-1, correspondente a um fator de rendimento médio em etanol por substrato consumido de 0,47 g.g⁻¹ (eficiência de fermentação de 92%). O biorreator foi recheado com células imobilizadas (1.075 esferas biocatalíticas contendo 16,2 x 10¹⁰ células/esfera) e operado continuamente com o leito fixo por aproximadamente 80 horas. Com uma porosidade do leito de 0,42, o biorreator foi alimentado com meio de fermentação contendo substrato em uma concentração de 130 g.L⁻¹, tendo sido aplicadas três taxas de diluição, 0,25 h⁻¹, 0,33 h⁻¹ e 0,5 h⁻¹, e estimados os respectivos estados estacionários. O maior valor para a produtividade volumétrica em etanol foi de, aproximadamente, 23 g.L⁻¹.h⁻¹, obtido na taxa de diluição de 0,33 h⁻¹(tempo de residência de apenas 3 horas). Nesta taxa de diluição, o fator de rendimento em etanol por substrato consumido foi praticamente estequiométrico e a redução percentual de substrato foi de aproximadamente 95%. O sistema contínuo com células imobilizadas em alginato de cálcio para a fermentação de hidrolisado enzimático de grãos de sorgo, desenvolvido neste trabalho, apresentou excelentes resultados no que concerne a elevados valores de taxas de produção e rendimentos em etanol, sinalizando para futuros desenvolvimentos.

Palavras-chave: Produção contínua de etanol, Grãos de sorgo sacarino, Célula imobilizada, biorreator de leito fixo

Abstract

PIMENTEL-SOARES, Suzana. Continous Production of Ethanol from Enzymatic Hydrolyzate of Sorghum Grains [Sorghum bicolor (L.) Moench] with Immobilized Cells of Saccharomyces cerevisiae in a Fixed Bed Bioreactor. Master Dissertation. School of Chemistry. Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2014.

Supervisor: Nei Pereira Jr., PhD

The insertion of bioethanol in the global energy matrix has been increasingly considered due to the undeniable environmental benefits that its use promotes, associated to the awareness with the reduction of energy demand from fossil sources. Therefore, technological innovations should be incorporated in order to reduce production costs of bioethanol, including diversification of raw materials for more efficient and rational utilization of attached and independent distilleries already installed in Brazil. In this context, the present study aimed at investigating the continuous ethanol production from enzymatic hydrolyzate of sorghum grains using immobilized cells of an industrial strain of Saccharomyces cerevisiae. Initially, experiments were performed in shake flasks to define the best conditions to be employed in a column-type bioreactor, with a nominal volume of 1 liter, designed and built for the purposes of this work. These preliminary experiments allowed choosing a calcium alginate concentration of 2 (w/v) as the best, resulting in beads with an average diameter of 4 mm, sturdy enough and with stability suitable for use in fermentative processes. Regarding the enzymatic hydrolysis of starch grain sorghum, the use of commercial enzymes (20 μL αamylase.g⁻¹ grain e 40 µL glucoamylase.g⁻¹ grain) and a solid:liquid ratio of 1:3 resulted in a concentration of glucose of approximately 245 gL⁻¹, corresponding to an efficiency of hydrolysis of 98% at the end of only 90 minutes. The fermentability of the enzymatic hydrolyzate was evaluated for two initial glucose concentrations, with media supplemented or not with nutrients. The best results were obtained with medium containing glucose at an initial concentration of 180 g.L⁻¹ without supplementation of nutrients. The immobilized cells were reused for 10 cycles of repeated batch fermentations, presenting an excellent performance, confirmed by a mean ethanol concentration of 85 g L⁻¹, corresponding to an average yield of ethanol per substrate consumed of 0.47 g.g⁻¹ (fermentation efficiency of 92%). The bioreactor was packed with immobilized cells (1.075 biocatalytic spheres containing 16.2x10¹⁰ cells/bead) and operated continuously with the fixed bed for about 80 hours. With a porosity of 0,42, the bioreactor was fed with the fermentation medium containing the substrate in a concentration of 130 g.L⁻¹. Three dilution rates were applied to the bioreactor (0.25 h⁻¹, 0.33 h⁻¹ and 0.5 h⁻¹) and the respective steady states were estimated. The highest value for the volumetric ethanol productivity was approximately 23 g.L⁻¹.h⁻¹, obtained with a dilution rate of 0.33 h⁻¹ (residence time of only 3 hours). At this dilution rate, the ethanol yield per substrate consumed was almost stoichiometric, with a percentage of substrate reduction of approximately 95%. The continuous system with immobilized cells in calcium alginate for the fermentation of enzymatic hydrolyzate of sorghum grains, developed in this work, showed excellent results with respect to high levels of production rates and ethanol yields, which points out for future developments.

Keywords: Continuous production of ethanol, Sweet sorghum grains, Immobilized cells, Fixed bed bioreactor

Sumário

Resumo	viii
Abstract	ix
Liste de Finance	
Lista de Figuras Lista de Tabelas	xii
	xiv
Lista de Siglas e Abreviaturas Capítulo 1. Introdução	xv 1
Capítulo 2. Revisão Bibliográfica	5
2.1. Sorgo Sacarino [Sorghum bicolor (L.) Moench]	6
2.2. A Fração Amilácea: Os Grãos de Sorgo Sacarino	9
2.3. Hidrólise Enzimática	11
2.4. Imobilização Celular	13
2.5. Imobilização com Alginato de Cálcio	17
2.6. Processo Fermentativo Contínuo	21
Capítulo 3. Justificativa e Objetivos	24
Capítulo 4. Materiais e Métodos	27
4.1. Matéria-Prima, Enzimas, Microrganismos e Suporte	28
para Imobilização	20
4.2. Caracterização dos Grãos de Sorgo	28
4.3. Quantificação das Atividades Enzimáticas	29
4.4. Quantificação Celular	29
4.5. Meio de Manutenção, Ativação e Propagação do	31
Microrganismo	22
4.6. Determinações Analíticas	33
4.7. Hidrólise Enzimática dos Grãos de Sorgo	34
4.8. Sistema de Imobilização Celular em Alginato de Cálcio	35
4.9. Definição da Concentração de Alginato de Sódio	36
4.10. Imobilização da Levedura <i>S. cerevisiae</i> (JP1)	37
4.11. Avaliação da Fermentabilidade com a Levedura	38
S. cerevisiae (JP1) e Levedura de Panificação	20
4.12. Ensaios Preliminares de Fermentação do Hidrolisado	39
dos Grãos de Sorgo 4.13. Biorreator Contínuo de Leito Fixo	39
	42
4.14. Microscopia Eletrônica de Varredura das Esferas Contendo as Células Imobilizadas da Levedura <i>S. cerevisiae</i> (JP1)	42
Contendo as Celulas Informzadas da Levedura 5. cerevistae (31 1)	
Capítulo 5. Resultados e Discussão	43
5.1. Caracterização dos Grãos de Sorgo	44
5.2. Hidrólise Enzimática	44
5.3. Definição da Concentração de Alginato de Sódio para a	45
Imobilização da Levedura	
5.4. Microscopia Eletrônica de Varredura das Esferas com	50
Células de S. cerevisiae (JP1) imobilizadas	

5.5. Avaliação da Capacidade Fermentativa da Levedura S.				
cerevisiae (JP1) em Comparação à Levedura de Panificação				
5.6. Ensaios Preliminares de Fermentação do Hidrolisado dos	55			
Grãos de Sorgo Sacarino				
5.7. Experimento em Biorreator Contínuo de Leito Fixo	63			
5.7.1. Crescimento Celular e Imobilização	63			
5.7.2. Hidrolisado Enzimático dos Grãos de Sorgo Sacarino	64			
5.7.3. Processo Fermentativo em Biorreator de Leito Fixo	65			
Capítulo 6. Conclusões e Sugestões para Trabalhos Futuros	74			
Referências Bibliográficas	78			

Lista de Figuras

- **Figura 2.1 -** Divisões da estrutura do sorgo
- **Figura 2.2** Os diferentes tipos de sorgo: granífero (A), forrageiro (B), vassoura (C) e sacarino (D)
- Figura 2.3 Os grãos de sorgo
- Figura 2.4 Estrutura da molécula de amido (1), respectivamente, amilase e amilopectina (2)
- Figura 2.5 Esquema da hidrólise enzimática dos grãos de sorgo sacarino
- **Figura 2.6** Diferentes métodos de imobilização celular
- **Figura 2.7 -** Estrutura linear dos ácidos manurônico (M) e gulurônico (G) presentes na estrutura molecular de alginatos
- **Figura 2.8** Esquema das esferas com células imobilizadas ilustrando a matriz porosa de alginato de cálcio (A), as camadas celulares no interior das esferas (B) e o desprendimento celular juntamente com a rachadura das esferas (C)
- **Figura 4.1** Câmara de Neubauer (A) e as marcações em quadrantes (B) para contagem (H1, H2, H3, H4, H5)
- **Figura 4.2 -** Propagação celular em biorreator (A) e microscopia óptica (aumento de 400 vezes) da levedura JP1 (B)
- Figura 4.3 Cromatograma padrão para a determinação de glicose, xilose e etanol
- Figura 4.4 Metodologia de imobilização celular
- **Figura 4.5** Fermentômetro utilizado nos ensaios de avaliação da fermentabilidade de meios sintético e formulados com hidrolisado de grãos de sorgo sacarino
- Figura 4.6 Esquema do processo de fermentação contínua em biorreator de leito fixo
- Figura 4.7 Curva de calibração da bomba peristáltica
- Figura 5.1 Perfil cinético da hidrólise enzimática dos grãos de sorgo sacarino
- **Figura 5.2** Imobilização na concentração de 1 % (m/v)
- **Figura 5.3** Imobilização na concentração de 2 % (m/v)
- **Figura 5.4 -** Fermentação alcoólica com células imobilizadas de *S. cerevisiae* em alginato de cálcio. Ensaios conduzidos em fermentômetros apresentando o desprendimento gasoso do processo bioquímico

- **Figura 5.5** Microscopia eletrônica de varredura da superfície da esfera, matriz porosa de alginato de cálcio 2% (m/v) (aumento de 1.100 vezes)
- **Figura 5.6** Microscopia eletrônica de varredura da matriz porosa de alginato de cálcio 2% (m/v) com a indicação de leveduras e a identificação do tamanho de poros e células (aumento de 4.000 vezes)
- **Figura 5.7** Microscopia eletrônica de varredura do interior da esfera com células imobilizadas de *S. cerevisiae* (JP1) em alginato de cálcio 2% (m/v) (aumento de 4.000 vezes)
- **Figura 5.8** Cromatograma da amostra do ensaio com hidrolisado não diluído e com suplementação de nutrientes
- **Figura 5.9** Perfil da concentração de etanol equivalente (g.L⁻¹) nos ensaios com HDSN, HDCN, HNDCN e HNDSN
- **Figura 5.10** Desempenho da fermentação alcoólica em termos de concentração final de etanol, conduzida por bateladas simples repetidas com uma concentração de glicose inicial de 180 g.L⁻¹
- **Figura 5.11** Desempenho da fermentação alcoólica em termos de fator de rendimento de etanol por substrato consumido, conduzida por bateladas simples repetidas com uma concentração inicial de 180 g.L⁻¹
- Figura 5.12 Perfil cinético de crescimento da levedura JP1
- **Figura 5.13** Progresso da operação contínua com células da linhagem de *Saccharomyces cerevisiae* JP1 imobilizadas em alginato de cálcio em função da taxa de diluição em biorreator de leito fixo. Pontos (1): entupimento, aumento de vazão; (2): contaminação
- Figura 5.14 Jarro de alimentação do biorreator contínuo com indicativos de contaminação
- **Figura 5.15** Região próxima à entrada de substrato no biorreator: depósito de esferas partidas
- **Figura 5.16** Perfil da produtividade volumétrica e das concentrações de etanol e açúcar em função das taxas de diluição aplicadas em biorreator de leito fixo recheado com células de leveduras imobilizadas em alginato de cálcio e com alimentação contínua de hidrolisado de grãos de sorgo sacarino
- **Figura 5.17** Redução percentual de substrato e fator de rendimento $Y_{P/S}$ em função das taxas de diluição aplicadas ao biorreator contínuo
- **Figura 5.18** Biomassa desprendida (células livres) de acordo com as taxas de diluição empregadas no biorreator de leito fixo

Lista de Tabelas

- Tabela 2.1 Composição das frações de sorgo sacarino
- Tabela 4.1 Composição do meio de ativação e propagação celular
- **Tabela 4.2** Composição da solução de sais minerais
- Tabela 4.3 Composição do meio sintético de fermentação
- Tabela 5.1 Caracterização dos grãos de sorgo sacarino em distintas condições
- Tabela 5.2 Características das células imobilizadas nas diferentes concentrações de alginato
- **Tabela 5.3** Processo fermentativo nas diferentes concentrações de alginato
- **Tabela 5.4** Propriedades e aparência física das esferas
- **Tabela 5.5** Características das células imobilizadas
- **Tabela 5.6** Resultados dos ensaios
- **Tabela 5.7** Células imobilizadas nos ensaios preliminares
- **Tabela 5.8** Avaliação da fermentabilidade de meios contendo hidrolisado enzimático de grãos de sorgo sacarino em diferentes condições com a linhagem *S. cerevisiae* JP1

Lista de Siglas e Abreviaturas

°C: grau Celsius

%: por cento

Å: angstrom

AR: açúcares redutores

atm: atmosfera Ca⁺²: íon cálcio

CaCl₂: cloreto de cálcio

CLAE: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

cm: centímetro

F₂: segunda vazão

F₃: terceira vazão

F₄: quarta vazão

(G): ácido gulurônico

g: grama

g.g⁻¹: grama/grama

g.L⁻¹: grama/litro

g.mL⁻¹: grama/mililitro

g.mol⁻¹: grama/mol

H₂SO₄: ácido sulfúrico

HDSN: hidrolisado diluído sem nutriente

HDCN: hidrolisado diluído com nutriente

HNDSN: hidrolisado não diluído sem nutriente

HNDCN: hidrolisado não diluído com nutriente

L: litro M: molar

(M): ácido manurônico

mL: mililitro

mL.L⁻¹: mililitro/litro

mL.min⁻¹: mililitro/minuto

mm: milímetro

mm³: milímetro cúbico

m/v: massa/volume

Na⁺: íon sódio μL: microlitro

μL.g-1 grão: microlitro/grama grão

pH: potencial hidrogeniônico

psi: unidade de pressão rpm: rotações por minuto

Capítulo 1. Introdução

Das características que destacam a economia brasileira, sabe-se que se trata de um país historicamente agrário, beneficiado pelos aspectos tropicais, fornecedor de matérias-primas e ainda, recentemente, propulsor de um desenvolvimento tecnológico junto às grandes potências mundiais. No âmbito das matrizes energéticas, onde são frisados temas como o esgotamento das reservas de petróleo, os frequentes impactos ambientais dessa exploração e o entusiasmo do interesse internacional pelos então chamados biocombustíveis, o Brasil se revela líder mundial de exportações de etanol produzido com cana-de-açúcar e, caminha para mais que dobrar a sua produção. Tornou-se inusitado admitir que um fato que marcou os primórdios do Brasil e, afetou politicamente e até socialmente a sua história, viera receber um toque contemporâneo, onde o antigo termo "engenho" passou a ser substituído por "biorrefinaria" e, que a cana, de onde derivava tantas especiarias, viera iniciar um novo ciclo, dividindo a sua colocação no mercado com outras matérias-primas, mais inusitadas ainda, a partir do momento que se compreendeu que qualquer material vegetal que contenha açúcares pode ser considerado matéria-prima para obtenção de etanol, desde que haja viabilidade econômica, rendimento industrial e fácil processamento (CARVALHO, 2006).

Os biocombustíveis são combustíveis baseados em biomassa, que, por sua vez, é formada por carboidratos, lignina, proteínas, gorduras e em uma menor extensão por substâncias secundárias como vitaminas (RODRIGUES, 2011), podendo substituir parcial ou totalmente combustíveis derivados do petróleo e gás natural (PORTAL BRASIL, 2013). A exemplo tem-se o etanol e o biodiesel, onde o primeiro é oriundo da fermentação de açúcares vegetais e, o segundo a partir de óleos vegetais e animais. Através de uma série de tecnologias e processos, esses materiais podem ser transformados em produtos úteis e de valor comercial, encaixados no perfil sustentável que se tem apreciado ultimamente. E é nesse quesito que continuam ganhando espaço no mercado, visto o impressionante potencial redutor de gases do efeito estufa, classificando o biocombustível avançado, por exemplo, capaz de reduzir tais emissões em pelo menos 61% em comparação com a gasolina (RODRIGUES, 2011).

Dentre os biocombustíveis, a produção brasileira se destaca com o etanol, produzido a partir de matérias-primas das mais variadas e, segundo a sua composição química estão distribuídas nas seguintes categorias de acordo com Pereira Jr. e colaboradores (2008): (1)

substratos solúveis tais como a sacarose, glicose, frutose e lactose que podem ser facilmente extraídos e convertidos em produtos e são provenientes da cana-de-açúcar, beterraba, melaço, soro de leite, etc.; (2) polissacarídeos insolúveis, em geral materiais amiláceos, onde há a necessidade de pré-tratamento para solubilização e hidrólise, advindos estes do milho, mandioca, trigo, cevada, batata e outros; e (3) polissacarídeos insolúveis de natureza celulósica, hemicelulósica e lignocelulósica, oriundos de vegetais, que necessitam de pré-tratamento físico e químico vigorosos.

Porém, a fermentação só é proveitosa na produção industrial de álcool se seus rendimentos forem compatíveis com o preço do produto, já mencionava autores como Nuñez & Lema (1987). Entendendo que a produtividade da fermentação alcoólica tem um potencial que pode atingir cerca de 200 g.L⁻¹.h⁻¹, incluindo altas concentrações de etanol, alguns processos convencionais ainda revelam uma produtividade limitada, frente a eventualidades que a própria fermentação está sujeita, como a inibição pelo produto e também pelo substrato, a partir do momento em que as reações ocorrem em grandes concentrações desses e, também se encontra dificuldade para reter o catalisador viável dentro do biorreator. Quanto em termos de preço do produto, a época atual se mostra receptível a investimentos, principalmente, quando o assunto se remete ao panorama energético, recebendo muitos incentivos na área dos biocombustíveis, onde o etanol já é participante conhecido e encontra consumidores, havendo uma indústria pronta a atender novas tendências e elaborar, por exemplo, os automóveis "flex".

Se há então condições de incentivar o consumo do produto, como solucionar as eventualidades que comprometem rendimentos e produtividade e concentrações na fermentação alcoólica? Nuñez & Lema (1987) também discutem essas soluções, assim como muitos autores prévios e posteriores a eles dedicaram suas pesquisas para o aprimoramento do processo, traçando dois critérios base: como diminuir o efeito inibitório causado pelo produto e como aumentar a concentração celular. Uma das formas sugeridas de reverter a inibição pelo produto é a forma de fermentação contínua e, das formas citadas para aumentar a concentração celular tem-se: o reciclo das células, o emprego de técnicas de destilação, centrifugação, ultrafiltração e também da imobilização celular.

A imobilização celular é um procedimento que visa manter a célula biologicamente ativa e íntegra alojada dentro ou na superfície de um agente imobilizador, também conhecido como suporte. Percebe-se que a imobilização possibilita trabalhar com uma grande densidade

celular, porém, sem requerer volumes muito grandes de biorreator (SANCHEZ, 1995), visto que o agente fermentativo se encontra confinado em suportes e assume formatos diversos, como as esferas de alginato de cálcio e as células aderidas naturalmente a materiais como bagaço e distintos resíduos da indústria.

Para a união desses quesitos em uma produção bem sucedida, este trabalho propõe a utilização de uma matéria-prima alternativa ao uso da cana-de-açúcar, visando a principal característica de interesse para a utilização: a elevada concentração de açúcares redutores totais, sendo os grãos de sorgo sacarino a matéria-prima proposta. A realização de um processo fermentativo contínuo se faz objetivo da pesquisa através da associação do hidrolisado enzimático dos grãos de sorgo com o agente fermentativo *S. cerevisiae* da linhagem JP1 imobilizado, para enfrentar as possíveis questões de inibição e contaminação.

Dos capítulos que se seguem, o Capítulo 2 faz uma revisão desses principais itens da proposta do trabalho: o sorgo sacarino, a fração amilácea que é aproveitada, a hidrólise enzimática dessa fração amilácea, a imobilização celular juntamente com informações reunidas acerca do suporte de imobilização, o alginato de cálcio, e as características principais de um processo fermentativo contínuo. A justificativa e os objetivos geral e específicos são apresentados no Capítulo 3 e, os materiais e métodos definidos para a realização dos experimentos, no capítulo seguinte, o Capítulo 4.

Os resultados alcançados e a discussão dos mesmos estão reunidos no Capítulo 5, de modo a seguir uma ordem de organização e sequência dos objetivos específicos traçados para a execução de um experimento em biorreator. Da discussão abordada, considerações finais e propostas para trabalhos futuros são feitos no Capítulo 6, que seguem com as referências bibliográficas aqui consideradas como leitura.

Capítulo 2. Revisão Bibliográfica

A Revisão Bibliográfica aqui apresentada consiste em um conjunto de informações acerca dos principais temas abordados neste trabalho: o sorgo sacarino como matéria-prima proposta, a fração amilácea a qual se refere os grãos da matéria-prima, o processo de hidrólise para aproveitamento dos açúcares ofertados por essa fração, o processo de imobilização como um todo e o emprego de alginato de sódio no processo de imobilização e, a fermentação alcoólica contínua. O que tange esses temas vem nortear os resultados e a discussão a que se pretende desenvolver, vinculados ao capítulo 5. As referências bibliográficas utilizadas para a construção desse capítulo se encontram ao final deste trabalho, assim como as referências empregadas nos demais capítulos para elaboração dos métodos, interpretação e discussão dos experimentos.

2.1. Sorgo Sacarino [Sorghum bicolor (L.) Moench]

Segundo estudos, o sorgo se refere a um vegetal do grupo das angiospermas, pertencendo à família *Poaceae*, originária da África. É uma das plantas mais eficientes fotossinteticamente, com taxas que se aproximam às do milho e da cana (CANAVIALIS, 2012), tendo um desempenho que reflete em um rápido crescimento e por isso, o grande acúmulo de açúcares. Trata-se de uma planta do tipo C4, que apresenta um ciclo vegetativo curto, que oscila em uma média de 90 a 130 dias, possibilitando colheitas de três vezes ao ano, tornando esse vegetal como uma opção para a entressafra da cana (TEIXEIRA et al., 1986) e para rotação de culturas, desconstruindo o conceito de plantações monocultoras e possibilitando um período de renovação do solo, considerando o diferente consumo de nutrientes.

O sorgo, independente do tipo em questão, tem a sua estrutura vegetal dividida em grãos, colmo e raízes, apresentando uma folhagem distribuída ao longo dos seus colmos, como na figura 2.1. Nos grãos, concentra-se a fração amilácea do vegetal, rica em açúcares que após tratamento pode ser empregada na produção de etanol. Do caule (colmos) extrai-se um caldo também rico em açúcares, possivelmente empregado em processos fermentativos, enquanto que do bagaço desse colmo, as frações lignocelulósicas também podem ser tratadas e utilizadas com o objetivo do mesmo processo.

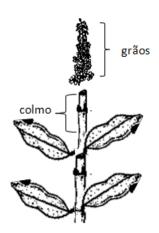


Figura 2.1 - Divisões da estrutura do sorgo (PIMENTEL-SOARES, 2014)

Os diferentes tipos de sorgo podem ser classificados em quatro grupos: granífero, forrageiro, sacarino e vassoura. A figura 2.2 traz a imagem desses, cujas principais características e aplicações são ressaltadas adiante.

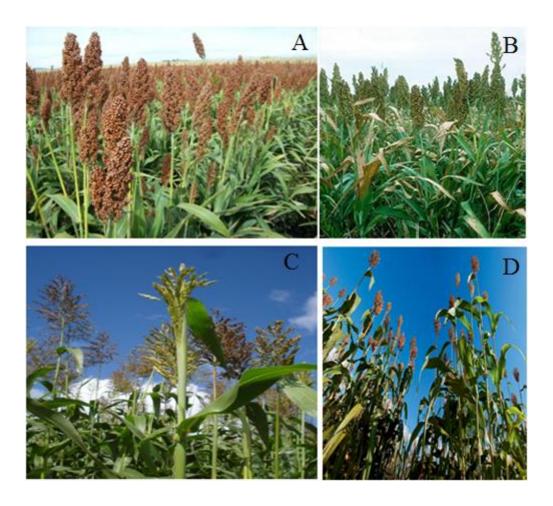


Figura 2.2 – Os diferentes tipos de sorgo: granífero (A), forrageiro (B), vassoura (C) e sacarino (D) (Fonte: CANAVIALIS, 2012)

As semelhanças entre os tipos de sorgo são muito grandes e as diferenças entre eles são muito sutis, estando vinculadas ao tamanho dos colmos, à estrutura formada pelos grãos e pela concentração de açúcares presente nos caldos. O sorgo granífero, por exemplo, é um tipo de sorgo de porte baixo, com uma altura média de 1,7 m. Das utilidades associadas ao sorgo granífero, lista-se o uso como feno ou pastejo, na ração animal e na alimentação humana. Quanto ao sorgo forrageiro, o porte já é considerado alto, com alturas superiores a 2 m, utilidades para forragem e pastejo. Já o sorgo vassoura, tem a sua panícula (cacho formado pelos grãos) na forma de vassoura, o que caracteriza bem esse tipo de sorgo. A importância do sorgo vassoura é bem regionalizada quando se pensa na distribuição desse tipo no Brasil, focando o Sul do país e o interior de São Paulo, onde é usado na fabricação de vassouras e também como produto artesanal (DIPAP, 2010). Em relação ao sorgo sacarino, o porte atinge um tamanho médio de 2,5 m, concentrando grande quantidade de açúcares em seu colmo e por isso, despertando grande interesse no setor sucroalcooleiro e energético.

Quanto ao plantio, a técnica mais empregada é a da semeadura, quando a semente é posta junto ao solo não revolvido, usando semeadeiras especiais. A colheita do sorgo é totalmente mecanizável e os mesmos equipamentos usados para a colheita de outros cultivos, como o milho, a soja, o arroz e o trigo, podem ser empregados na colheita do sorgo. Também há a possibilidade da colheita manual, caso comum quando o cultivo do sorgo é realizado por pequenos produtores (EMBRAPA MILHO E SORGO, 2008).

Informações sobre o cultivo de sorgo sacarino são discretas quando se considera o conhecimento geral da população, no entanto, profissionais envolvidos direta ou indiretamente na área agrícola fazem saber, havendo, inclusive, um Centro Nacional de Pesquisa Milho e Sorgo, em Sete Lagoas (MG), onde pesquisas com sorgo sacarino são intensificadas em um programa de melhoramento que objetiva a obtenção de cultivares com boa produção de colmos com alto teor de açúcares redutores totais (TEIXEIRA et al., 1986). A difusão em países como África, Sul da Ásia e América Central, com características tão peculiares, deve-se ao fato da capacidade dessa planta adaptar-se a regiões de condições climáticas adversas e a variações do solo, como salinidade e acidez, superando, principalmente, condições de deficiência hídrica, fator condicionado a seus aspectos fisiológicos.

A composição das plantas de sorgo se diferencia quanto ao teor de açúcares, amido e demais constituintes quando se refere a frações como os grãos, o caldo e o bagaço. Em relação ao sorgo sacarino, por exemplo, as semelhanças se aproximam à cana-de-açúcar, inclusive, a eficiência energética do bagaço. A composição das frações de sorgo sacarino pode ser observada na tabela 2.1 a seguir.

O caldo extraído do sorgo sacarino contém quantidades elevadas de carboidratos solúveis, como a glicose e a sacarose, enquanto que o bagaço é rico em carboidratos insolúveis, como a celulose e a hemicelulose, o que o faz ser considerado uma matéria-prima alternativa promissora para a produção de etanol e butanol (YU et al., 2012). Os grãos de sorgo sacarino contém cerca de 70,1%, em base úmida, de amido, além de porcentagens de proteínas e lipídeos relevantes para uma composição vegetal, no caso do sorgo sacarino, 11,2 % de proteínas e 3,54 % de lipídeos, base úmida. A composição das frações de sorgo sacarino pode, certamente, variar de cultivar para cultivar ou de híbrido para híbrido, visto as intenções que se pretende alcançar. A CanaVialis, marca comercial da Monsanto para os negócios de cana-de-açúcar e sorgo sacarino no Brasil, por exemplo, desenvolve híbridos de

acordo com o ambiente de maior ou menor fertilidade, amplitude da colheita requerida, adaptabilidade e relação custo/benefício.

Tabela 2.1 - Composição das frações de sorgo sacarino

Grãos (% base úmida)		Caldo (% base úmida)		Bagaço (% base seca)	
Amido	70,1	Sólidos solúvei	s 18	Celulose	38,5
Proteínas	11,2	Sacarose	8,5 – 12,4	Hemicelulose	21,4
Umidade	11,6	Glicose	2,1	Lignina	17,6
Fibras	1,82	Frutose	1,2	Proteínas	1,1
Lipídeos	3,54	Amido	0,5	Extrativos	13,7
Cinzas	1,8	Água	84	Cinzas	3,7

Fonte: WU et al. (2007)

O aproveitamento dos grãos de sorgo sacarino ainda precisa ser difundido e intensificado, entendido que os grãos, por se tratar de uma fonte de açúcares indiretamente fermentáveis, ainda são comumente destinados para elaboração de ração animal e, em poucos casos é tratado para complementação da produção de etanol. Ainda que o custo de processos enzimáticos se mostre alto, um investimento nesse sentido também se faz válido, avaliando possivelmente novas fontes de extração ou até mesmo adequações no processo de hidrólise.

2.2. A Fração Amilácea: Os Grãos de Sorgo Sacarino

O amido é um polissacarídeo constituído de centenas ou milhares de unidades de glicose, encontrado naturalmente em vegetais, atuando como reserva energética e, por isso se concentrando nas sementes, nos tubérculos, raízes, bulbos e rizomas, além de ser a principal fonte de energia para animais. Em alimentos, o amido é o principal constituinte de uma grande variedade de produtos, sendo responsável pela textura, estrutura e/ou consistência, enquanto que nos vegetais, o amido se encontra em pequenos grânulos, contendo as duas frações que o constituem: amilose (de 15 a 30 %) e amilopectina (de 85 a 70 %) (KOBLITZ, 2008). A figura 2.3 apresenta uma parte relevante da fração amilácea disposta no sorgo sacarino, os grãos de sorgo.



Figura 2.3 – Os grãos de sorgo (Fonte: http://ruralcentro.uol.com.br/noticias/sorgo-sacarino-origem-finalidades-e-vantagens-60576)

O amido é insolúvel em água fria. Quando tratado com água quente, intumesce-se e origina um líquido viscoso não redutor, que por resfriamento produz consistência gelatinosa (CORN, 2005). A constituição das frações amiláceas, a amilose e a amilopectina, se refere a polímeros de glicose, que ao passarem pelo processo de hidrólise, liberam moléculas de glicose. A amilose é um polímero linear formado por unidades de glicose, ligadas entre si por ligações glicosídicas do tipo α -1,4 e, a amilopectina é um polímero ramificado, formado por cadeias de glicose semelhantes à amilose, que são unidas por ligações do tipo α -1,6. A estrutura da molécula de amido, amilose e amilopectina são representadas na figura 2.4.

Das características físico-químicas do amido, a birrefringência, a gelatinização e a retrogradação são propriedades que devem ser levadas em consideração para melhor conhecimento da molécula. A birrefringência, por exemplo, é uma característica relacionada aos grânulos de amido, que quando observados ao microscópio apresentam uma espécie de cruz, devido ao aparecimento de regiões amorfas sempre que formado pontes de hidrogênio entre as moléculas de amido. Quanto à gelatinização, essa é atribuída à afinidade do amido pelo solvente (CORN, 2005), de modo que a fração amilácea em uma suspensão aquosa, sofrendo a influência de alguma fonte de calor, tem o seu sistema molecular enfraquecido através do rompimento das ligações de hidrogênio. Com a gelatinização, as moléculas de amilose se agrupam e formam pontes de hidrogênio, criando regiões cristalinas através da retrogradação. Tais características físico-químicas da fração amilácea estão relacionadas com a hidrólise enzimática, explicando a condição molecular gerada durante esse processo.

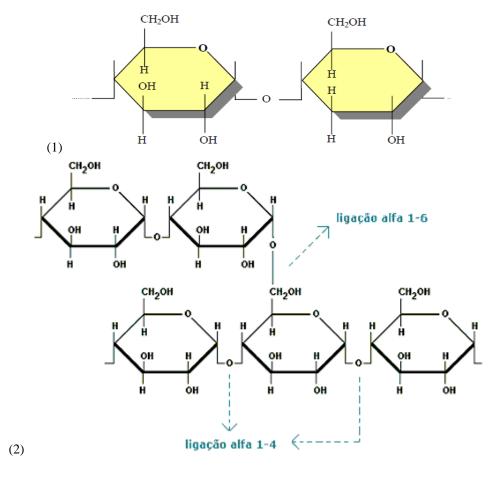


Figura 2.4 – Estrutura da molécula de amido (1), respectivamente, amilose e amilopectina (2) (Fonte: CORN, 2005)

2.3. Hidrólise Enzimática

Para dar início a processos de fermentação cuja fonte de açúcares é o amido, faz-se necessário uma etapa prévia de sacarificação, isto é, a hidrólise do amido para obtenção de açúcares fermentáveis. Diferentes processos de hidrólise são empregados em duas etapas, sendo divididos em hidrólise parcial e hidrólise extensiva, a fim de operar sobre as moléculas constituintes da fração amilácea. A hidrólise parcial ou liquefação consiste na hidrólise com α-amilases do amido gelatinizado, onde tal processo recebe o nome de liquefação porque a ação das enzimas sobre a suspensão de amido provoca considerável redução de sua viscosidade (KOBLITZ, 2008). Quanto à hidrólise extensiva do amido, a sacarificação, consiste na conversão dos açúcares redutores totais surgidos na etapa de liquefação em até 97 % de glicose, pela aplicação de glucoamilases.

As α -amilases são enzimas que têm como substrato o amido, o glicogênio e sacarídeos derivados e por isso são entendidas como endocarboidrases capazes de catalisar a hidrólise das ligações glicosídicas α -1,4 existentes na amilose e na amilopectina de forma aleatória, na porção central das moléculas. As glucoamilases ou amiloglicosidades são exoenzimas que removem unidades de glicose a partir da extremidade não redutora das cadeias de amilose e amilopectina, rompendo tanto as ligações α -1,4 como as ligações α -1,6, com isso, as glucoamilases são, teoricamente, capazes de converter completamente amido em glicose (BERTOLDO & ANTRANIKIAN, 2002).

Em seu estado nativo, grânulos de amido são resistentes à ação da maior parte de enzimas amilolíticas, no entanto, quando aquecidos em água até uma determinada temperatura, os grânulos absorvem grande quantidade de água, sofrendo gelatinização e tornando-se suscetíveis à hidrólise enzimática (KOBLITZ, 2008). Inicialmente, a ação das α -amilases geram uma mistura de dextrina ou maltodextrina, ocasionando tempos depois a produção de glicose e maltose. Quanto à atuação da glucoamilase, apesar de sua eficiência na prática, na ausência de α -amilases, a conversão final a moléculas de glicose nunca é completa, motivo pelo qual as duas enzimas são usadas em conjunto (BERTOLDO & ANTRANIKIAN, 2002). As glucoamilases são enzimas liquidificantes e sacarificantes, que atacam as ligações $\alpha(1\rightarrow 4)$ a partir das extremidades não redutoras liberando moléculas de D-glicose. A hidrólise ocorre também nas ligações $\alpha(1\rightarrow 6)$, com atividade desramificadora, mas em proporção menor da que ocorre nas ligações $\alpha(1\rightarrow 4)$ (BARCELOS & PEREIRA JR, 2010).

As α-amilases mais aplicadas em processos na indústria de alimentos são as obtidas de bactérias do gênero *Bacillus* (*B. lincheniformis e B. subtilis*) que operam em um pH ótimo na faixa de 6,0 a 7,0 e a temperaturas ideais de 60 a 85°C e, as obtidas em fungos do gênero *Aspergillus* (*A. oryzae e A. niger*), cujas condições ótimas são pH 5,0 e temperatura de 50°C (KOBLITZ, 2008). Amilases que necessitam de altas temperaturas são preferencialmente escolhidas pelo ramo industrial, de modo que o uso de altas temperaturas de reação reduz consideravelmente o risco de contaminação microbiana no meio reacional e, porque o amido da maior parte das fontes amiláceas gelatiniza em temperaturas superiores a 50°C, dessa forma, enzimas que requerem altas temperaturas de atividade evitam a necessidade de gelatinização prévia do amido e subsequente resfriamento do meio reacional (KOBLITZ, 2008). A figura 2.5 apresenta um esquema da hidrólise enzimática dos grãos de sorgo sacarino.

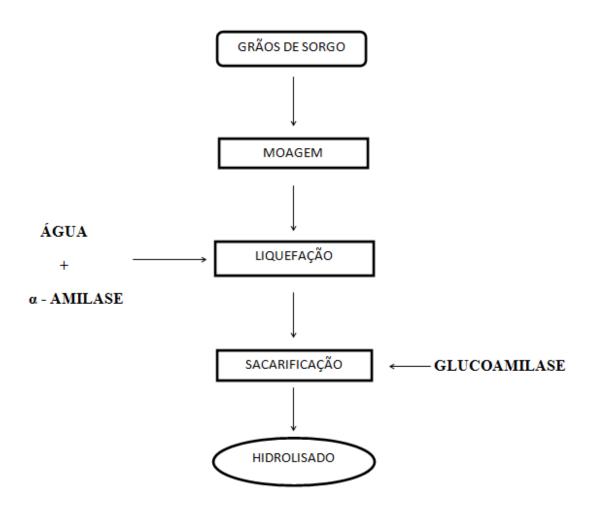


Figura 2.5 - Esquema da hidrólise enzimática dos grãos de sorgo sacarino (BON et al., 2008)

2.4. Imobilização Celular

A imobilização celular consiste em promover a adaptação da célula ao meio, através de todo um procedimento que se dispõe de características peculiares das células para agregálas, envolvê-las, contê-las ou ligá-las por ou em algum agente imobilizador, caracterizando uma forma de imobilização específica. Com a célula biologicamente ativa e íntegra, alojada dentro ou na superfície de um agente imobilizador, porém, sem realizar um movimento independente como as células livres assim fazem, a imobilização tende a aumentar a estabilidade da célula frente a variações de pH, temperatura, concentração de nutrientes e muitos outros fatores, permitindo, inclusive, a reutilização ou reciclo dos agentes biológicos.

A primeira vez em que se empregou imobilização celular foi em 1820, assim relata Nuñez & Lema (1987), em um momento em que o álcool era percolado através de um leito de lascas de madeira, dito um sistema "quick vinegar". Em outro momento, na década de 1970, a

imobilização celular desenvolveu com um enorme sucesso o chamado xarope de alta-frutose, como conta Kosseva (2010). O potente adoçante e ainda mais barato que o açúcar tradicional foi desenvolvido com a imobilização da bactéria *Streptomyces albus*, que acrescida de uma lise para obtenção da enzima glicose isomerase, possibilitava a modificação do amido de milho, obtendo-se 45 % de glicose e 55 % de frutose. Hoje, são diversos os ramos que empregam a técnica de imobilização celular, Kosseva (2010) segue sua narrativa com a produção de bebidas alcoólicas como vinhos, champanhe, cidras e espumantes, que dependem do controle da produção de espuma para garantir um caráter efervescente e então gerar categorias distintas de uma mesma bebida. As carnes processadas, os aromatizantes, os biossensores e, as indústrias farmacêuticas, de tratamento de efluentes e a própria indústria petroquímica, se dispõem de técnicas de imobilização para obtenção de produtos comerciais.

Não há uma predileção pelo microrganismo a ser empregado na imobilização. A literatura científica relata pesquisas com células imobilizadas em que o agente biológico se refere a bactérias e leveduras, não só empregados em processos de fermentação alcoólica, mas também na produção de produtos naturais de interesse comercial, por exemplo, levanas. Hoje em dia já são inúmeros os experimentos que comparam processos com células livres e imobilizadas, apontando vantagens que vão desde à estabilidade do sistema, como a facilidade da separação do meio reacional para reutilização e preparo de reciclos, onde os ganhos estão vinculados ao tempo, ao custo e à dinâmica envolvente. Dentre as técnicas atualmente empregadas pode-se destacar a adsorção superficial, o envolvimento em matriz porosa, contenção em barreira e autoagregação/floculação, esquematizados na figura 2.6.

Além da singularidade das técnicas de imobilização abordadas, essas podem ser classificadas como naturais ou artificiais. Uma imobilização do tipo natural se aproveita de algum episódio celular convencional, como a adesão/adsorção das células a superfícies, a formação de biofilmes e a floculação celular (COVIZZI et al., 2007). Um modo artificial inclui a participação de agentes ligantes, por exemplo, agentes químicos, para induzir o que não se consegue naturalmente.

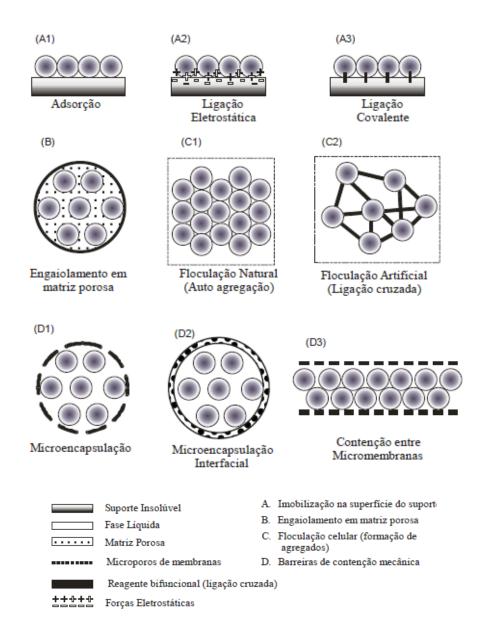


Figura 2.6 – Diferentes métodos de imobilização celular (Fonte: COVIZZI, 2007)

A adsorção é uma técnica natural de imobilização por ligação à superfície, onde o microrganismo se fixa naturalmente ou simplesmente secreta exopolissacarídeos para sua fixação. Outro método também de imobilização na superfície de suportes, como por ligação química (ligação eletrostática e ligação covalente), são ditos artificiais, de modo que a fixação natural da célula seja reforçada ou até mesmo garantida por ligantes químicos. As técnicas de engaiolamento ou aprisionamento em matrizes porosas, como o alginato e a carragenana, são consideradas artificiais por incluírem a participação de um gel ou de um suporte pré-formado para a imobilização, envolvendo o agente biológico. Quanto à autoagregação/floculação, assim como as técnicas de ligação à superfície, podem ser naturais ou artificiais, visto a floculação ser uma propriedade relativa a poucas células. Uma floculação artificial é

proporcionada por um agente floculante, que força uma agregação celular em suspensão, associada a uma rápida sedimentação. Técnicas de contenção em barreiras, também conhecidos como encapsulamento, são artificiais e considerados alternativos à técnica de aprisionamento em matriz porosa (CANILHA et al., 2006). Nessa última técnica, o microrganismo fica confinado em membranas porosas e permeáveis.

Canilha e colaboradores (2006) afirmam que o método e o tipo de suporte de imobilização a serem empregados em um determinado processo devem ser estabelecidos empiricamente, recaindo a escolha do binômio suporte-método sobre aquele que apresentar maior retenção da atividade. A afirmação prossegue ressaltando que a escolha do método e o tipo de suporte dependerá basicamente de dois fatores: das características peculiares do material biológico e das condições de uso do sistema imobilizado. Pode-se então concluir que não existe um método geral de imobilização e nem um suporte universal adequado para qualquer processo (CANILHA et al., 2006).

Quando comparada à imobilização de enzimas, a imobilização celular pode apresentar algumas vantagens, já que se evita etapas de extração, isolamento e purificação (COVIZZI, 2007), para então fixá-las a um suporte e também, diminui-se os custos quando o processo com enzimas requer cofatores, visto que as células possuem a capacidade de regenerar seus cofatores naturalmente, além de apresentar alta estabilidade operacional e de funcionamento (CANILHA et al., 2006). No entanto, os primeiros experimentos que envolveram imobilização se deram com enzimas, podendo garantir a facilidade de se recuperar a mesma ao final do processo, e também de aumentar sua estabilidade quando as reações químicas envolviam participação em presença de solventes.

O uso de microrganismos imobilizados pode gerar muitas vantagens, como as ressaltadas por Sanchez (1995): maiores rendimentos em produto já que a imobilização limita o crescimento celular; altas produtividades volumétricas ainda que em operações com vazão elevada; uso de altas concentrações celulares, que de uma forma ou de outra diminuem a contaminação, permite a obtenção de altas taxas de retenção e longos tempos de operação. No entanto, as desvantagens devem ser então abordadas, como narrado por Covizzi (2007), que de maneira geral, afirmam que todos os métodos de imobilização celular induzem alterações no crescimento, na fisiologia e na atividade metabólica de bactérias, leveduras e fungos, ocasionando problemas como limitações na transferência de massa por difusão, efeito

na pressão osmótica, diminuição da viabilidade de nutrientes e crescimento de populações não-homogêneas.

2.5. Imobilização com Alginato de Cálcio

Na literatura científica, encontra-se uma série de materiais inertes que podem ser empregados como suportes na imobilização celular, onde a natureza física desses suportes varia desde aspectos geliformes, como o alginato de sódio e a carragenana, até superfícies sólidas, como o vidro poroso e a alumina (CANILHA et al., 2006). Como relatado por Alhadeff (1984), o suporte pode ser de origem orgânica ou inorgânica, sendo inerte às degradações químicas, físicas e, principalmente, biológicas, possuindo boa resistência mecânica e à abrasão, que pode ocorrer quando o suporte é exposto a um fluxo contínuo ou a uma agitação constante. O alginato de sódio assume tais características, sendo natural de algas, cujos géis formam micro-leitos capazes de incorporar enzimas ou células vivas inteiras (GARCIA-CRUZ et al., 2008), além de apresentar vantagens quanto ao custo e à forma de preparo, sendo de fácil manuseio e aplicabilidade.

Outros suportes também originários de algas, como o ágar e a carragenana, apresentam características que o diferem grandemente. O ágar é um suporte que forma géis termicamente reversíveis não cátion-dependentes, enquanto que a carragenana apesar de também formar géis termicamente reversíveis, requerem íons potássio (GUISELEY, 1989). Quanto ao alginato, esse forma géis termicamente irreversíveis quando associados a íons divalentes como íons cálcio, durante processos de imobilização celular. Em critérios de solubilidade, o alginato é insolúvel em água quando em temperatura ambiente, porém, se torna solúvel em temperaturas elevadas, além de transformar uma estrutura linear em uma estrutura tridimensional, porém, uniforme e altamente porosa.

A propriedade dos géis de alginato serem termicamente irreversíveis possibilita o uso desse suporte em experimentos onde o agente biológico exige temperaturas elevadas. Porém, se houver a necessidade de desfazer o produto da imobilização, o desfazer pode ocorrer na presença de substâncias sequestradoras de íons cálcio, como EDTA, o citrato ou polifosfato, sendo o cálcio rapidamente extraído e as esferas desfeitas. Por isso, em experimentos longos com células imobilizadas em alginato de cálcio, o rompimento das esferas contendo as células imobilizadas se faz frequente, não só apenas por fatores de pressão interna dos gases quando

se refere à fermentação, mas também, à interação das esferas de alginato de cálcio com produtos do próprio metabolismo celular que atuam na remoção dos íons cálcio. Nesses casos, o experimento pode ser conduzido com uma solução extra de CaCl₂ ao meio para suprir a carência.

O termo alginato se refere a um grupo de polissacarídeos que ocorre naturalmente na parede celular de algas marinhas marrons, onde eles existem como um sal misto de cálcio-sódio-potássio de ácido algínico (GARCIA-CRUZ et al., 2008), promovendo rigidez e ao mesmo tempo flexibilidade à parede celular. Desse sal de ácido algínico, o alginato de sódio é comumente comercializado e, o produto da imobilização de suspensões celulares com o gel de alginato de sódio ocorre em presença de uma solução de CaCl₂, quando ocorre a troca iônica de sódio por cálcio. O alginato é utilizado em uma ampla variedade de fins industriais, como agente estabilizante, espessante e gelificante no ramo alimentício, e também para imobilizar células nas indústrias farmacêutica e biotecnológicas (GARCIA-CRUZ et al., 2008). Das possíveis espécies de algas que pode ser extraído os alginatos, destacam-se: *Macrocystys, Ascophyllum, Laminaria, Ecklonia* e *Sargassum* (CUNHA, 2009), onde é importante salientar que o próprio alginato de sódio tem sua composição dependente do tipo, idade e parte da alga usada além do processo de extração (SANCHEZ, 1995).

Quando não empregados na imobilização celular, os suportes para imobilização podem ser empregados em áreas aleatórias e com propostas distintas, como as pesquisas botânicas de Guedes e colaboradores (2007), que utilizaram a técnica do emprego de suportes para imobilização para isolamento de sementes pré-germinadas, a fim de garantir o sucesso do processo germinativo. Outra área que se apodera dessa técnica é a chamada Gastronomia Molecular, que utiliza suportes comestíveis, frequentemente usados em laboratórios, para inovar em pratos que prometem texturas e riquíssimas experiências sensoriais.

Pesquisas sobre a estrutura molecular linear desse polissacarídeo revelam que dois componentes estruturais se encontram presentes em todas as moléculas de alginato, formando três tipos de grupos: blocos alternando resíduos de ácido manurônico (M) e ácido gulurônico (G) (MGMGMGMGMGMG) e, blocos só de ácido manurônico (MMMMM) ou só de ácido gulurônico (GGGGG) (GUISELEY, 1989; MILER, 1995), onde a ligação do íon sódio ocorre com o ácido gulurônico. A distribuição desses ácidos ao longo da molécula de alginato, assim como a razão M/G, influenciam fortemente nas propriedades do gel, onde longos blocos de ácido gulurônico, variando de 6 a 10 unidades seguidas fazem com que esse polissacarídeo

seja muito rígido, forme géis mais fortes e tenha maior capacidade de formar ligações com íons divalentes (CUNHA, 2009), enquanto que géis formados por muitas sequências de ácido manurônico formam estruturas deformadas justamente por serem mais fluidas (GUISELEY, 1989). A figura 2.7 apresenta a estrutura linear dos ácidos manurônico (M) e gulurônico (G) presentes na estrutura molecular de alginatos.

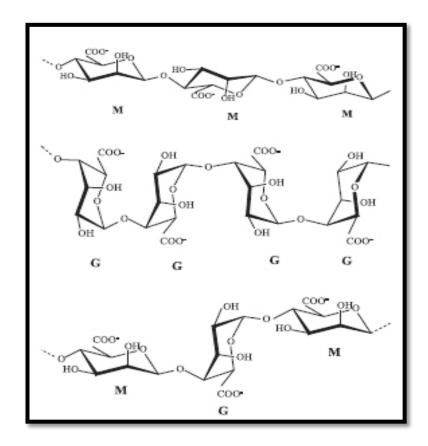


Figura 2.7 - Estrutura linear dos ácidos manurônico (M) e gulurônico (G) presentes na estrutura molecular de alginatos (Fonte: GARCIA-CRUZ et al., 2008)

A característica principal dos géis de alginato é a porosidade, o que certamente permite a difusão de substratos, produtos e co-produtos durante a realização de processos fermentativos. Quando a referência são células livres, os nutrientes são recebidos a partir do momento que são dispersos por meio de transportes celulares, ativos ou passivos, que implicam seletividade. Quando as células estão imobilizadas em matrizes como o alginato de cálcio, essa dispersão é um pouco mais complicada, porque agora os nutrientes devem ser primeiramente difundidos ao longo dos labirintos de passagem criados por esse gel, influenciando taxas e velocidades de transporte. O tamanho do poro formado pelo gel é uma das características mais importantes e discutidas em imobilização com alginato de cálcio, onde a porosidade do gel formado é função da concentração de alginato de sódio e da

concentração da solução de CaCl₂, ressaltando que a porosidade decresce quando se produz géis com um maior grau de polimerização obtidos ao utilizar soluções de CaCl₂ e/ou suspensões de alginato de sódio mais concentradas (ALHADEF, 1984).

A taxa de difusão complementa o conhecimento a cerca da porosidade, visto que a difusão de moléculas menores através dos poros, aparentemente, não é muito afetada, enquanto que moléculas maiores, como proteínas, tendem a ter seu transporte restrito ou se difundem mais lentamente, principalmente, quando a biomassa celular é muito intensa, dificultando a chegada a camadas de células mais internas. Por isso, as taxas de difusão de substrato e produto dependem não só do tamanho do poro, mas também da concentração de célula imobilizada dentro da esfera (SMIDSROD & SKJAK-BRAED, 1990).

A elevada concentração celular dentro das esferas além de implicar em problemas com as taxas de difusão implica também no aumento da pressão interna de gás carbônico em processos de fermentação. Tal aumento pode ocasionar a rachadura das esferas e consequentemente o rompimento das mesmas, promovendo perda de célula para o sistema e partículas em suspensão oriundas do rompimento. Não necessariamente a elevada concentração celular está vinculada ao crescimento celular dentro das esferas, visto que o emprego da técnica de imobilização não estimula esse evento, posto que a célula está mantida em um micro-ambiente desfavorável a sua multiplicação, onde, principalmente, a condição do espaço e oferta de substrato direcionam suas rotas metabólicas basicamente para gerar uma energia de manutenção. O crescimento celular em condições de imobilização ocorre, porém, em uma margem muito menor do que ocorre em células livres.

A alta estabilidade química e mecânica das esferas de alginato, juntamente com, o tamanho de poro formado pelo gel e, um baixo teor de toxicidade, estabelecem critérios que definem a melhor composição de alginatos de sódio (GARCIA-CRUZ et al, 2008), tornando-o um dos fatores decisivos para o sucesso das técnicas de imobilização por envolvimento. Abaixo, a figura 2.8 esquematiza as principais informações a cerca dos produtos da imobilização com alginato de cálcio, como a matriz porosa por onde se difunde substrato (S), produto (P) e células desprendidas (X); as camadas celulares imobilizadas, que implicam em problemas com as taxas de difusão quando a concentração celular é muito elevada e dificulta a chegada de substrato (S) nas camadas mais internas; e as rachaduras nas esferas ocasionadas pela perda de cálcio ou aumento da pressão interna de gás carbônico, que também pode ocasionar perda celular.

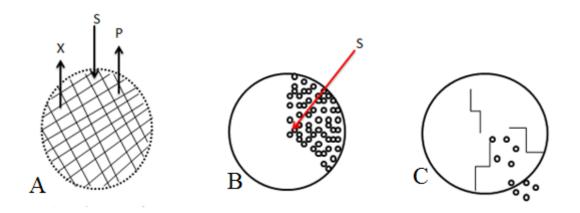


Figura 2.8 – Esquema das esferas com células imobilizadas ilustrando a matriz porosa de alginato de cálcio (A), as camadas celulares no interior das esferas (B) e o desprendimento celular juntamente com a rachadura das esferas (C) (PIMENTEL-SOARES, 2014)

2.6. Processo Fermentativo Contínuo

Bioprocessos são um conjunto de operações que vão desde o tratamento da matériaprima, à transformação do substrato em produto(s) e à separação e purificação do produto obtido, incluindo nesta categoria as produções industriais de álcool para fins de consumo humano e combustível (PEREIRA JR., 1999). Nesse sentido, quando os bioprocessos são conduzidos pelos microrganismos, estes são entendidos como processos fermentativos e, se constituem em importante fonte de insumos ou produtos biológicos usados nas indústrias farmacêutica, química e de alimentos (PEREIRA JR., 1999).

Quanto à fermentação, trata-se da oxidação parcial da molécula de glicose, originando somente uma fração da energia disponível nessa molécula. A razão fundamental para o sucesso dessa via metabólica é a não participação do oxigênio, tratando-se de um processo anaeróbio, também ocorrente sob condições de parcial anaerobiose (10 mg.L⁻¹). A fermentação alcoólica, a qual nos referimos no atual trabalho, ocorre com a formação de etanol e gás carbônico como produtos principais e, como sub-produtos o glicerol, os ácidos pirúvico e succínico e álcoois superiores (BORZANI et al., 2001). É, principalmente, realizada por leveduras do gênero *Saccharomyces* e, bactérias como *Zymomonas mobilis* e as do gênero *Clostridium*.

Quanto à condução dos processos, estes podem ser: em batelada, simples ou alimentada e, sistema contínuo. Na condução do sistema em batelada simples, o substrato é

oferecido em sua totalidade no início do processo e, quando ofertado ao longo deste, diz-se batelada alimentada, sem haver, em momento algum, retirada de produto. Em um sistema contínuo, ocorre uma oferta gradativa de substrato e retiradas periódicas de produto formado (PEREIRA JR., 1999).

A definição da condução do bioprocesso ocorre a partir do momento que se conhece possíveis agentes de interferência no processo fermentativo, dos quais podemos citar: a temperatura, o pH, a concentração de acúcares e inóculo, a nutrição mineral e o próprio etanol. A temperatura e o pH estão relacionados com as exigências dos microrganismos, requerendo faixas ótimas desses parâmetros para expressarem uma atividade metabólica ideal para a geração de produtos da fermentação. A concentração de açúcares e inóculo andam lado a lado, visto que metabolicamente altas concentrações de açúcares inibem as rotas de crescimento celular, visto o consumo preferencial pela glicose seguido de repressão catabólica, além de acarretar diferenças osmóticas na célula (BORZANI et al., 2001). Enquanto que os açúcares fornecem energia para os agentes da fermentação, a questão nutritiva do meio contribui para a manutenção desses, fornecendo vitaminas, sais inorgânicos e compostos nitrogenados. A privação de compostos nutritivos pode interferir na atuação de enzimas que exigem cofatores, por exemplo, e a não ser que a linhagem do microrganismo garanta grande resistência, o bioprocesso pode se encontrar comprometido sem a suplementação dos nutrientes adequados. O etanol já é conhecido como solvente, causando danos à membrana celular, o que ocasiona em células livres menor tempo de vida útil do microrganismo, diminuindo as chances de reaproveitamento do mesmo.

A estratégia de condução adotada no processo fermentativo também pode ser um inibidor em potencial do bioprocesso. Processos em Batelada podem interferir no sucesso da produção, devido a proporcionar comprometimento do microrganismo e acúmulo de produto no meio. Ao contrário, processos fermentativos contínuos buscam diminuir o tempo de contato do meio, rico em substrato e em produto, com o agente fermentativo, esteja esse livre ou imobilizado, sem comprometer a produção. Esse tempo de contato está relacionado com o tempo de residência, tempo total para que todo o meio que entrou no biorreator contínuo seja renovado com uma nova entrada de meio, que é determinada por uma vazão, implicando a cada nova vazão, uma taxa de diluição. No processo contínuo, o meio a ser fermentado é transportado por toda a coluna do biorreator, fazendo com que possíveis agentes inibidores sejam transportados juntamente com parte desse meio, não havendo acúmulo de produto. É

essa performance de fermentação contínua que se objetiva neste trabalho, sendo acompanhada através de um biorreator de leito fixo.

Capítulo 3. Justificativa e Objetivos

Na atual esfera mundial, tanto ao nível econômico quanto ao nível ambiental, tem se repensado os impactos ocasionados pela atividade industrial e exploratória, remetendo o contexto energético a novas possibilidades de existência frente a utilização de novas matrizes diferenciais e concorrentes ao petróleo, principal objeto de investimentos. O cenário que surge traz os biocombustíveis renovando projetos como o Pró-álcool e, inserindo o Brasil como forte produtor/consumidor dos mesmos e, provedor de energia limpa, em uma fase que se preza pela sustentabilidade (RODRIGUEZ, 2011).

O etanol, como exemplo desse processo, galga espaço frente a uma combinação de diversos fatores que cooperam para sua permanência, como a substituição do MTBE (Éter Metil Térc-Butílico) como aditivo da gasolina (para aumento da octanagem do combustível e como aditivo oxigenado) devido ao impacto ambiental associado ao uso deste éter, aspecto também semelhante quando se discute as emissões dos gases precursores do efeito estufa (PIACENTE, 2006). Esse papel do etanol, impulsiona instituições e órgãos fomentadores de pesquisa para o estudo de novas formas de produção, aprimoramento de matérias-primas e otimização de técnicas, caracterizando novos perfis de bioprocessos.

A imobilização de células ou enzimas representa uma das alternativas para a condução de bioprocessos (CANILHA et al., 2006), elevando a atividade fermentativa de microrganismos como leveduras, promovendo a adaptação das células ao meio e eliminando a fase lag em bateladas sucessivas de fermentação (DURAN & BAILEY, 1986). São diversas as possibilidades de imobilização, sendo o alginato de cálcio o método definido para esse projeto, visto sua expressiva utilização, compensações econômicas e disponibilidade no mercado, além dos estudos já realizados com *S. cerevisiae*, levedura também optada para a realização do projeto, que durante a imobilização, fica alojada nas esferas formadas pelo gel de alginato.

O sorgo tem se revelado um vegetal em potencial, no que diz respeito aos estudos voltados para a produção de biocombustíveis, visto as grandes concentrações de açúcares fermentáveis obtidas durante o processamento e aproveitamento de todo o vegetal, considerando a utilidade das frações amilácea, sacarínea e lignocelulósica. Dentro dessa perspectiva, o sorgo sacarino é a opção escolhida dentre as matérias-primas possíveis para o fornecimento da fração amilácea, através do aproveitamento de seus grãos para produção de etanol de primeira geração.

As características mais expressivas do sorgo são as que em comparação com a canade-açúcar, o tornam mais destacado, como um ciclo de cultivo curto, considerando um período médio de 90 a 130 dias; a possibilidade de ser cultivado a partir de sementes (IPA, 2012), o que também facilita a produção de diversos cultivares; a resistência ao estresse hídrico, consumindo 33 a 50 % menos água que a cana-de-açúcar (EMBRAPA, 2008) e, a possibilidade de ser empregado como espécie vegetal para rotação de cultura (PAZIANI & DUARTE, 2006), diminuindo os impactos ocasionados ao solo em regiões monocultoras, ou até mesmo atuando como co-cultura, aumentando o tempo ativo de trabalho nas usinas, principalmente, durante a entressafra da cana. Sobre a utilidade dos grãos, são também utilizados no preparo de ração animal, sendo essa prática comum em diversos locais, visto a possibilidade de cultivo tanto em zonas temperadas como em zonas tropicais.

Baseado nessas considerações, o presente projeto visa cooperar para o cenário da produção de biocombustíveis e todo o seu contexto, sendo apresentados os objetivos a seguir que justificam toda a relevância do mesmo.

Objetivo Geral

Atingir rendimentos ótimos na produção de etanol, empregando condições ideais que viabilizem a utilização de açúcares de grãos de sorgo sacarino e de células imobilizadas de *S. cerevisiae* da linhagem JP1 em gel de alginato de cálcio, através de um processo fermentativo contínuo.

Objetivos Específicos

- Caracterizar os grãos de sorgo quanto ao teor de umidade e de amido para realizar a hidrólise enzimática visando obter concentrações elevadas de açúcares redutores no hidrolisado a ser fermentado por células de levedura imobilizadas em alginato de cálcio;
- Empregar a técnica de microscopia eletrônica de varredura a fim de se observarem os aspectos internos e externos das esferas com células de levedura imobilizadas;
- 3. Avaliar a atividade fermentativa da levedura *S. cerevisiae* (JP1) imobilizada em alginato de cálcio e compará-la com a levedura de panificação (fermento biológico fresco *Fleischmann*) também imobilizada no mesmo agente de imobilização;
- 4. Realizar ensaios preliminares de fermentação do hidrolisado dos grãos de sorgo sacarino, com a linhagem da levedura JP1 imobilizada, empregando diferentes concentrações iniciais de substrato e avaliando a suplementação nutritiva;
- Avaliar a estabilidade das esferas biocatalíticas da levedura JP1, em ensaios sequenciais com hidrolisado dos grãos de sorgo sacarino na melhor concentração inicial de substrato e suplementação encontradas no ensaio anterior;
- 6. Realizar ensaios para propagação da levedura *S. cerevisiae* JP1 em biorreator, empregando-se a técnica de batelada alimentada por pulsos, a fim de se obterem elevadas quantidades de células a serem contidas nas esferas de alginato de cálcio;
- 7. Operar e avaliar o desempenho de um biorreator do tipo coluna, construído para a realização desta dissertação de mestrado, em processo contínuo com as células da levedura JP1 imobilizadas, ensaiando diferentes taxas de diluição.

Capítulo 4. Materiais e Métodos

O Capítulo de Materiais e Métodos reúne as informações técnicas sobre os experimentos desenvolvidos neste trabalho. A apresentação dos principais materiais envolvidos segue com os tratamentos vinculados à matéria-prima e, posteriormente com as enzimas, que estão diretamente relacionadas com essa primeira etapa de métodos. Itens deste capítulo como a imobilização celular, o crescimento do microrganismo e os ensaios em fermentômetro propostos também são esclarecidos, de modo a convergir informações para aplicação em biorreator.

4.1. Matéria-Prima, Enzimas, Microrganismo e Suporte para Imobilização

Os grãos de sorgo cedidos pela empresa Monsanto do Brasil Ltda. (Uberlândia –MG)

foram estocados a -5°C para conservação até o seu uso em etapas específicas do projeto. As

enzimas comerciais utilizadas para a hidrólise dos grãos de sorgo, α-amilase de Bacillus

licheniformis e, glucoamilase de Aspergillus niger, foram doadas pela LNF Latino Americana

(Bento Gonçalves-RS). Quanto ao microrganismo, refere-se à linhagem industrial de

Saccharomyces cerevisiae (JP1) isolada da destilaria Japungu Agroindustrial (Santa Rita –

PB), mantida a 5°C em meio YED contendo 20 g.L⁻¹ de glicose, 10 g.L⁻¹ de extrato de

levedura e 15 g.L⁻¹ de ágar-ágar, em pH 6. Para a imobilização celular, o reagente alginato de

sódio comercializado pela Farmos Ltda. foi usado como suporte para confinamento da

levedura empregada em uma matriz porosa.

4.2. Caracterização dos Grãos de Sorgo

Os grãos de sorgo foram caracterizados quanto ao teor de umidade e de amido,

verificando-se ainda o teor de proteínas, lipídeos, fibra bruta e cinzas dos grãos in natura, pós

hidrólise e pós fermentação, de modo a conhecer a composição da matéria-prima em questão.

A quantificação do teor de umidade foi verificada, em triplicata, por pesagem de uma massa

equivalente de 10 g de grãos de sorgo com um tamanho de partícula de 0,5 mm, incubadas a

90°C até peso constante. O teor de amido nos grãos de sorgo foi determinado através da

quantificação de glicose liberada na hidrólise enzimática, conforme descrito por AOAC

(1994), porém, utilizando em uma etapa pré-hidrólise, uma carga de celulase com atividade de

250 U.mL⁻¹, com a finalidade de liberar o amido da casca dos grãos. A reação com a celulase

ocorreu 72 horas antes da hidrólise enzimática, em pH 5,0 ajustado a partir de uma solução de

H₂SO₄, à temperatura de 50°C. A hidrólise foi então iniciada após o ajuste do pH para 6,0,

sendo o teor de amido calculado através da equação:

Amido peso seco (%) = $(GT - GR) \times Vt \times 100 / MSG \times 1,1$

onde,

GT: concentração de glicose total (g.L⁻¹)

GR: concentração de glicose residual (g.L⁻¹)

Vt : volume total (L)

MSG: massa seca do grão (g)

42

O fator de conversão 1,1, na equação para teor do amido, está relacionado à adição de uma molécula de água (18 g.mol⁻¹) para liberação de uma molécula de glicose (180 g.mol⁻¹), considerando cada ligação covalente rompida durante a hidrólise do amido. O teor de proteínas, lipídeos, fibra bruta e cinzas dos grãos foi descrito por Barcelos (2012).

4.3. Quantificação das Atividades Enzimáticas

As atividades das enzimas amilolíticas utilizadas neste trabalho, α -amilase e glucoamilase, foram quantificadas a partir de uma solução de amido solúvel a 1% (m/v), onde o amido foi solubilizado a 90°C. A adequação do substrato para administração das enzimas foi feita a partir de soluções de citrato e ácido cítrico a 0,1 M para ajuste do pH, sendo a solução de amido com pH 6 para quantificação da atividade da α -amilase e, a de pH 4,5 para a quantificação da atividade da glucoamilase.

As amostras foram levadas ao banho a 90°C, no caso da α -amilase e, a 55°C, no caso da glucoamilase, ambas por 5 minutos. A quantificação foi feita em espectrofotômetro (Spectrumlab 22PC spectrophotometer) com comprimento de onda de 540 nm para as amostras com α -amilase e, de 505 nm para as amostras com glucoamilase, considerando o fator de diluição na obtenção dos resultados das atividades investigadas. A atividade enzimática é medida em unidades internacionais (U), que expressa a quantidade de enzima capaz de liberar 1 μ mol de produto por minuto em condições ótimas, sendo o produto da reação com α -amilase, açúcares redutores totais e, glicose, o produto da reação com glucoamilase.

4.4. Quantificação Celular

A concentração celular obtida nos experimentos de ativação e propagação foi determinada por turbidez, que correlaciona densidade ótica com massa seca, sendo as absorvâncias determinadas em espectrofotômetro (Spectrumlab 22PC spectrophotometer) a 600 nm, utilizando água destilada como branco. A quantificação de células por esfera em Câmara de Neubauer foi realizada com a coleta de 10 gotas da suspensão de células em alginato em uma proveta de volume 10 mL, completando o volume da mesma com água destilada após o gotejar. O objetivo da quantificação em Câmara de Neubauer é definir a viabilidade celular e o número de células em determinado volume de suspensão através de um método direto de contagem. A Câmara é uma lâmina de uso microscópico, que apresenta

marcações em quadrantes, usados para fazer a contagem, como apresentado na figura 4.1. A verificação da viabilidade celular através do uso da Câmara foi possível devido ao emprego de 100 μL do corante azul de metileno. O corante não se faz capaz de atravessar membranas íntegras, sendo assim, células vivas não permitem a passagem do corante e, logo, não adquirem nenhuma coloração. A quantificação de células por esfera em Câmara de Neubauer é expressa de acordo com a equação:

$$N = \frac{(X \div 0,004)(10^3)D}{n}$$

onde,

N: número de célula por esfera

X: número médio de células por quadrante da Câmara de Neubauer

0,004: área do quadrante da Câmara, em mm³, onde foi feita a leitura

10³: mudança da ordem de medida para L

D: fator de diluição

n: número de gotas coletadas

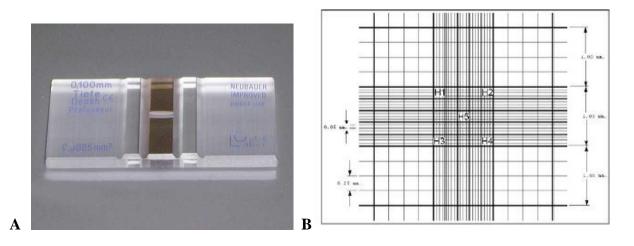


Figura 4.1 – Câmara de Neubauer (A) e as marcações em quadrantes (B) para contagem (H1, H2, H3, H4, H5)

4.5. Meio de Manutenção, Ativação e Propagação do Microrganismo

A linhagem *S. cerevisiae* JP1 foi ativada e propagada em meio descrito por Pereira Jr. (1991), com composição apresentada na tabela 4.1. Os ensaios foram realizados em frascos agitados (New Brunswick Scientific – Edison N. J., U.S.A.) a 200 rpm, 35°C, como também em biorreator (Biostat B, B. Braun Biotech International – Germany). A propagação celular realizada em biorreator foi conduzida em batelada, com alimentação por pulsos com uma solução de glicose (700 g.L⁻¹) de acordo com Barcelos (2012). Ainda neste ensaio, a concentração de oxigênio dissolvido foi mantida a 60% da saturação, temperatura 35°C e pH 4,5. Os experimentos de propagação, tanto em frascos agitados como em biorreator, foram inoculados com 5 % (v/v) do cultivo de ativação.

Tabela 4.1 - Composição do meio de ativação e propagação celular

Componente	Frascos Agitados	Biorreator
Glicose (g.L ⁻¹)	20,0	40,0
Uréia (g.L ⁻¹)	1,25	1,25
KH_2PO_4 (g.L ⁻¹)	1,1	1,1
Extrato de levedura (g.L ⁻¹)	2,0	2,0
Sol. de Sais Minerais (mL.L ⁻¹)	40,0	40,0

Fonte: Pereira Jr. (1991)

A solução de sais minerais descrita por Pereira Jr. (1991) tem sua composição apresentada na tabela a seguir:

Tabela 4.2 – Composição da solução de sais minerais

Componente	Concentração(g.L ⁻¹)	Componente	Concentração (g.L ⁻¹)
MgSO ₄ .7H ₂ O	12,5	CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025
CaCl ₂ .2H ₂ O	1,25	CaCl ₂ .6H ₂ O	0,025
Ácido cítrico	12,5	NaMoO ₄ .2H ₂ O	0,035
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,9	H_3BO_3	0,050
MnSO ₄	0,19	KI	0,009
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,30	$Al_2(SO_4)_3$	0,0125

Fonte: Pereira Jr. (1991)

Amostras foram coletadas ao final de cada ativação e propagação, centrifugadas a 10.000 rpm, 10 minutos e então, observadas em microscópio óptico (Leica DM 2.000) para verificação da pureza da amostra e viabilidade celular. A massa seca foi determinada pelo método também descrito por Barcelos (2012) e a taxa específica de crescimento celular, o

rendimento da produção de células e a produtividade volumétrica em células foram calculados de acordo com as equações abaixo. Na figura 4.2, a propagação celular em biorreator e uma microscopia óptica (aumento de 400 vezes) da levedura JP1 podem ser visualizadas.

$$Y_{X/S} = \frac{\left(X - X_o\right)}{\left(S_o - S\right)}$$

$$Q_X = \frac{\left(X - X_o\right)}{t}$$

$$\mu = \frac{1}{X} \frac{dX}{dt}$$

onde,

μ: taxa específica de crescimento celular (h⁻¹)

X: concentração celular no tempo t (g.L⁻¹)

t: tempo (h)

 $Y_{\text{X/S}}\!\!:$ fator de rendimento de produção de células (g.g $^{\text{-1}}\!\!)$

X: concentração final de células (g.L⁻¹)

X_o: concentração inicial de células (g.L⁻¹)

S: concentração final de glicose (g.L⁻¹)

 S_{o} : concentração inicial de glicose (g.L $^{\text{-1}}$)

 Q_X : produtividade volumétrica em células $(g.L^{\text{-1}}.h^{\text{-1}})$



Figura 4.2 - Propagação celular em biorreator (A) e microscopia óptica (aumento de 400 vezes) da levedura JP1 (B)

4.6. Determinações Analíticas

A quantificação de açúcar nos processos de hidrólise e atividades enzimáticas foi realizada por DNS e pelo método Glicose Oxidase (GOD). O método DNS funciona para a medição de açúcares redutores, enquanto que o método GOD, para glicose. A dosagem de açúcares redutores baseia-se na reação do ácido 3,5-dinitro-salicílico (DNS) com esses açúcares, que reduzem o DNS fornecendo um produto de cor característica.

A determinação das concentrações de açúcar e etanol de amostras coletadas em ensaios em fermentômetro e durante a execução do biorreator foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (Waters, Milford, MA, U.S.A.) com detector de índice de refração (Waters 2414, Milford, MA, U.S.A). A separação dos componentes a serem investigados em uma mesma amostra contou com uma coluna de troca iônica HPX-87P Aminex 300, empregando água milliQ como fase móvel a uma vazão de 0,6 mL.min⁻¹ e pressão máxima de 0,5 psi. A temperatura do detector foi mantida a 40°C e a temperatura do forno, 80°C. Abaixo, a figura 4.3 apresenta um cromatograma padrão para a determinação de glicose, xilose e etanol.

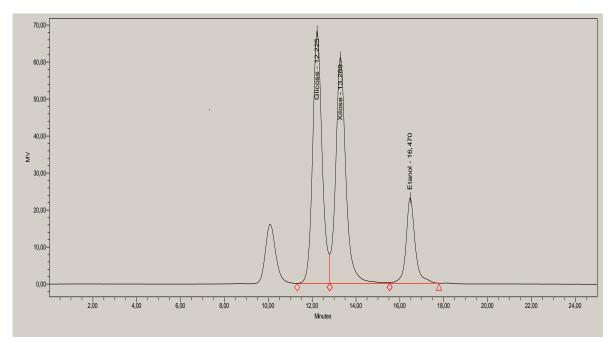


Figura 4.3 - Cromatograma padrão para a determinação de glicose, xilose e etanol

4.7. Hidrólise Enzimática dos Grãos de Sorgo

Quando o substrato se encontra sob a forma de amido, a matéria-prima amilácea necessita de um tratamento prévio à hidrólise enzimática para que ocorra liberação das moléculas de amido contidas nos grãos cominuídos em moinho (IKA MF10 BASIC - IKA WORKS INC., USA), diâmetro de partícula de 0,5 mm e, então ocorra a liberação das primeiras concentrações de açúcares redutores totais. A etapa de liquefação emprega uma solução de α-amilase e água e a etapa de sacarificação emprega a glucoamilase, subsequentemente. As condições para a primeira enzima são uma temperatura de 90°C, em uma faixa de pH 6,0, considerando um período de 1 hora para uma carga enzimática de 20 μL.g⁻¹ grão e uma relação sólido:líquido de 1:3 g.mL⁻¹. Para a glucoamilase, objetiva-se trabalhar com uma concentração de 40 µL.g-1 grão, a uma temperatura constante de 55°C durante 30 minutos, com pH 4,5, para eventual sacarificação do amido, como relatado por Barcelos (2012). Com o cumprimento de cada etapa, amostras são coletadas e centrifugadas (Sorvall fresco/Thermo Electron Corporation/Germany) para a determinação de açúcares redutores e glicose presentes no sobrenadante, através dos métodos de reação com DNS, no primeiro caso, e GOD, no segundo. A eficiência da hidrólise enzimática pode ser calculada de acordo com a equação a seguir:

$$E.H.(\%) = (ART/CS \times TA \times 1,1) \times 100$$

onde,

E.H.: eficiência da hidrólise enzimática (%)

ART: concentração de açúcares redutores totais liberados após hidrólise enzimática (g.L⁻¹)

CS: concentração de sólidos (g.L⁻¹)

TA: teor de amido nos grãos de sorgo (g.L⁻¹)

1,1: fator de conversão relacionado à adição de uma molécula de água (18 g.mol⁻¹) para liberação de uma molécula de glicose (180 g.mol⁻¹), após rompimento de cada ligação covalente durante a hidrólise

A determinação do diâmetro dos grãos e as condições de administração das enzimas foram empregadas de acordo com os experimentos de Barcelos et al (2013), que objetivavam obter a maior concentração de açúcares empregando a menor carga enzimática. Durante o processo de hidrólise enzimática dos grãos de sorgo, neste atual trabalho, amostras foram coletadas em intervalos de 10 minutos para a construção do perfil cinético da hidrólise

enzimática. Com a obtenção do hidrolisado, esse foi filtrado e mantido a -5°C até o seu uso no processo fermentativo.

4.8. Sistema de Imobilização Celular em Alginato de Cálcio

A técnica de imobilização em questão é a técnica por envolvimento em gel de alginato de sódio, empregando um sistema para imobilização constituído por um frasco Mariotte acoplado a uma mangueira. Nesse sistema, o frasco Mariotte contém a suspensão de células misturada ao gel de alginato de sódio, que é constantemente homogeneizada por um agitador magnético. Esta suspensão foi gotejada em um recipiente contendo uma solução de CaCl₂ a 0.1 M.

O controle da vazão de gotejamento é feito por um tubo oco, fechado na extremidade superior, inserido na tampa do frasco Mariotte, intencionando a diminuição da pressão dentro do mesmo, o que possibilita delimitar a velocidade do gotejar e, consequentemente, a quantificação do número de esferas produzidas. Na figura 4.4, a metodologia de imobilização celular é apresentada.

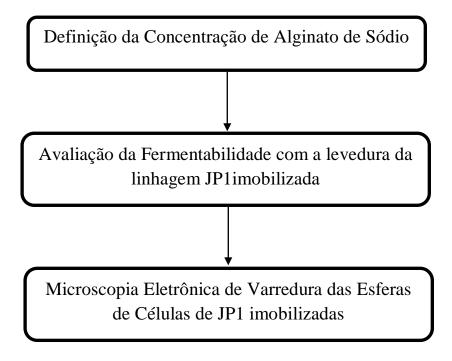


Figura 4.4 – Metodologia de imobilização celular

4.9. Definição da Concentração de Alginato de Sódio

Para determinar a melhor concentração de alginato de sódio a ser empregada como suporte, fez-se necessário a execução de ensaios em fermentômetro, de modo a avaliar o desempenho das esferas produzidas nas concentrações 1%, 2%, 3%, 4% e 5% (m/v) durante o processo de fermentação. O fermentômetro é um dispositivo que funciona sob diferença de pressão e, por isso permite acompanhar o processo fermentativo pela perda de peso do sistema, sendo essa perda de peso decorrente do desprendimento de gás carbônico. Para isso, o sistema é formado por um frasco Erlenmeyer de 500 mL, tampado com o fermentômetro preenchido com água destilada estéril, como mostrado pela figura 4.5. O frasco Erlenmeyer contém as células imobilizadas e o meio de fermentação. A composição deste meio é descrito na tabela 4.3.

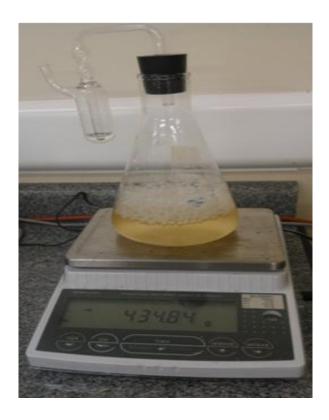


Figura 4.5 – Fermentômetro utilizado nos ensaios de avaliação da fermentabilidade de meios sintético e formulados com hidrolisados de grãos de sorgo sacarino

Os ensaios foram conduzidos em duplicata, sob agitação de 120 rpm e temperatura 35°C. O agente fermentativo, nesse caso, foi a levedura de panificação (fermento biológico fresco *Fleischmann*) a partir de uma suspensão celular de fermento e água destilada previamente autoclavada. A suspensão celular foi misturada a aproximadamente 200 g de gel

de alginato de sódio autoclavado, preparado em banho quente para dissolução, após um tempo hábil para a eliminação das bolhas de ar incorporadas durante o preparo e seu resfriamento. As condições de autoclavagem foram: 1,0 atm, 20 minutos e a montagem do sistema para o ensaio foi realizada em condições estéreis.

Tabela 4.3 – Composição do meio sintético de fermentação

Componente	Concentração
Glicose (g.L ⁻¹)	200,0
Uréia (g.L ⁻¹)	1,25
KH_2PO_4 (g.L ⁻¹)	1,1
Extrato de levedura (g.L ⁻¹)	2,0
Sol. de Sais Minerais (mL.L ⁻¹)	40,0

Após o processo de imobilização e quantificação celular, as esferas foram mantidas sob refrigeração a 4°C, sendo usadas após um período de, no mínimo, 12 horas em solução de CaCl₂ e, então o diâmetro destas foi determinado com o uso de um paquímetro (King Tools 0-150 mm/Digital Caliper). Ao final do ensaio, foram coletadas amostras para determinação de glicose e etanol por CLAE e, a eficiência do processo foi calculada a partir da equação:

$$E.F.(\%) = \frac{(Y_{P/S})_{\text{exp}}}{0.511} \times 100$$

onde,

E.F.: eficiência de fermentação (%)

 $Y_{P/S}$: fator de conversão de substrato consumido em produto (g.g⁻¹)

0,511: fator de conversão máximo teórico de substrato em etanol

4.10. Imobilização da Levedura S. cerevisiae (JP1)

A imobilização do microrganismo a ser empregado como agente fermentativo, a levedura *S. cerevisiae* da linhagem JP1, foi realizada com alginato de sódio na concentração 2% (m/v), previamente selecionada, em solução de CaCl₂ a 0,1 M. As células propagadas foram centrifugadas (Thermo Scientific/Sorvall Lynx 4.000 Centrifuge) a 6.000 rpm, 20 minutos, preservando-se as condições estéreis. Após imobilização, as esferas produzidas foram mantidas sob refrigeração a 4°C, por no mínimo, 12 horas antes de serem utilizadas,

sendo verificado o diâmetro médio com o auxílio de um paquímetro. A massa média das esferas também foi verificada através da pesagem em balança (Bel Engineering) e a quantificação do número de células por esfera foi contabilizada através do método de quantificação em Câmara de Neubauer.

4.11. Avaliação da Fermentabilidade com a Levedura S. cerevisiae (JP1) e Levedura de Panificação

A fim de avaliar o desempenho da *S. cerevisiae* (JP1) em um processo fermentativo, foi proposto um ensaio em fermentômetro com a levedura imobilizada em alginato de sódio na concentração 2 % (m/v), realizando em paralelo, ensaios com a levedura de panificação (fermento biológico fresco *Fleischmann*) nas mesmas condições. A escolha do fermento biológico fresco como agente fermentativo se deu pelo fato do fácil manuseio, baixo custo e desempenho já conhecido em diversos experimentos que, inclusive, o empregam de modo imobilizado.

Os ensaios foram conduzidos em duplicata, sob agitação de 120 rpm e temperatura 35 °C. A quantificação celular e a medição das esferas com paquímetro foram realizadas e, as esferas foram mantidas sob refrigeração a 4°C em solução de CaCl₂. Ao final do ensaio, foram coletadas amostras para determinação de glicose e etanol por CLAE. Além da determinação da eficiência da fermentação, a redução percentual do substrato e o fator de rendimento da produção de etanol também foram calculados, de acordo com as equações a seguir:

$$RPS(\%) = \left(\frac{S_o - S}{S_o}\right) \times 100$$

$$Y_{P/S} = \frac{\left(P - P_o\right)}{\left(S_o - S\right)}$$

onde,

RPS: redução percentual de substrato (%)

P: concentração final de etanol (g.L⁻¹)

 P_0 : concentração inicial de etanol (g.L⁻¹)

 S_0 : concentração inicial de glicose (g.L⁻¹)

S: concentração final de glicose (g.L⁻¹)

 $Y_{P/S}$: fator de rendimento de produção de etanol (g.g⁻¹)

4.12. Ensaios Preliminares de Fermentação do Hidrolisado dos Grãos de Sorgo

Após a realização de ensaios em fermentômetro para verificação do desempenho da levedura *S. cerevisiae* (JP1) imobilizada, fez-se necessário avaliar a fermentabilidade do hidrolisado enzimático de grãos de sorgo. Para isso, foram propostos ensaios preliminares com hidrolisado em diferentes concentrações iniciais de açúcar e com e sem suplementação de nutrientes, para que fosse encontrada a melhor condição a ser empregada no experimento em biorreator contínuo de leito fixo, considerando como resposta parâmetros como tempo de fermentação, consumo de glicose e concentração de etanol.

A diluição do hidrolisado foi feita com água destilada de modo que a concentração de glicose atingisse 180 g.L⁻¹, enquanto que o hidrolisado não diluído apresentava uma concentração de glicose de 235 g.L⁻¹. A composição da solução nutritiva, empregada nos ensaios com a suplementação, é a mesma apresentada na seção de materiais e métodos referente ao meio de ativação e propagação. Os ensaios foram realizados em frascos de 500 mL com volume reacional de 200 mL, em duplicata, sob agitação de 120 rpm e temperatura 35°C, em condições estéreis.

Ao final dos ensaios, foram coletadas amostras para determinação de glicose e etanol por CLAE. A partir dos resultados, foi calculado o fator de rendimento de produção de etanol, a redução percentual do substrato e a eficiência do processo fermentativo. O ensaio da condição do hidrolisado mais expressiva teve as esferas submetidas a bateladas consecutivas para avaliar a viabilidade e a estabilidade do sistema.

4.13. Biorreator Contínuo de Leito Fixo

O processo de fermentação contínua em biorreator de leito fixo requer o tratamento da matéria-prima, o crescimento e a imobilização do agente fermentativo e dados referentes ao biorreator, como a curva de calibração da bomba empregada e as medições de porosidade e volume útil, que são apresentados a seguir. O esquema do processo de fermentação contínua em biorreator de leito fixo é apresentado na figura 4.6, em que um jarro de alimentação armazena o hidrolisado enzimático de grãos de sorgo que é conduzido até o biorreator, cuja temperatura é controlada através da camisa de aquecimento (35°C) e o efluente é direcionado até uma proveta.

Nesse esquema para realização do processo em biorreator de leito fixo, o jarro de alimentação, de volume total 18 L, continha o hidrolisado enzimático de grãos de sorgo e antibiótico tetraciclina a 15 mg.L⁻¹, a fim de preservar as condições estéreis que o próprio hidrolisado já estava submetido. Foram produzidos cerca de 30 L de hidrolisado enzimático de grãos de sorgo, onde todo o processo foi realizado em uma concentração de glicose de 130 g.L⁻¹, sendo verificado o consumo de substrato através do método DNS e também por CLAE.



Figura 4.6 – Esquema do processo de fermentação contínua em biorreator de leito fixo

O experimento em biorreator foi realizado diretamente em um modo contínuo, a partir de um tempo de residência de 4 horas, mantido até alcançar um primeiro estado estacionário e então, ajustada a vazão da bomba para um novo tempo de residência, no caso, 3 horas, mantendo-se esse mesmo tempo até um novo estado estacionário ser estabelecido e, assim por diante. A curva de calibração da bomba a ser empregada é apresentada a seguir, na figura 4.7.

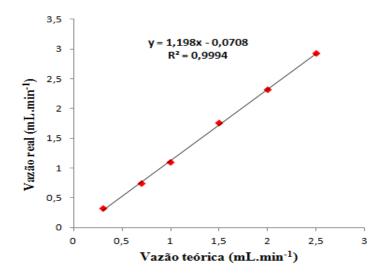


Figura 4.7 – Curva de calibração da bomba peristáltica

O cálculo da vazão a ser empregada está relacionado com a porosidade do biorreator. Para a determinação da porosidade, o biorreator foi preenchido com uma solução de CaCl₂ e então, recheado com as esferas de células imobilizadas até determinado ponto, cerca de 70% do volume da coluna. Conforme o biorreator ia recebendo as esferas, um volume da solução de CaCl₂ ia sendo deslocado, considerando então o cálculo para a porosidade através da equação:

$$\mathcal{E} = V_{ ilde{u}ti} / V_{coluna}$$

onde,

E: porosidade

 V_{util} :volume útil (mL)

 V_{coluna} : volume da coluna (mL)

A vazão real era calculada através da equação:

$$F_{real} = V_{columa} \cdot \varepsilon / t$$

onde,

F real: vazão real (mL.min⁻¹)

 V_{coluna} : volume da coluna (mL)

 \mathcal{E} : porosidade

t: tempo de residência (min)

O biorreator de formato tubular com um volume total de 1,0 L, diâmetro interno de 7 cm, 26 cm de altura, apresentava telas de aço inox em suas extremidades para impedir a

passagem das esferas pelas mesmas. O biorreator era continuamente alimentado pela parte inferior do sistema, onde as entradas de conexão com as mangueiras mediam 1 cm de diâmetro. Apesar do conhecimento dos danos causados às esferas em experimentos muito longos, não foi adicionado ao meio solução de CaCl₂ e a possível perda de íons cálcio foi assumida. Algumas vezes, em determinados momentos do bioprocesso foi necessário realizar uma espécie de drenagem da área inferior do biorreator, onde se formava um volume morto e produtos da degradação das esferas ocasionalmente se acumulavam. Entende-se que tal episódio se torna inevitável ainda que o reforço com uma solução de CaCl₂ seja feito e, por isso a adição dessa solução não foi feita.

As amostras para quantificação de açúcar e etanol foram coletadas em intervalos regulares de 1 hora através do efluente, medindo a temperatura de saída e realizando também a leitura de células desprendidas durante o bioprocesso, sendo a amostra centrifugada a 10.000 rpm por 10 minutos, retirado o sobrenadante, ressuspendendo-as em água destilada e realizando a leitura em espectrofotômetro, 600 nm. A determinação de etanol foi feita por CLAE.

4.14. Microscopia Eletrônica de Varredura das Esferas Contendo as Células Imobilizadas da Levedura S. cerevisiae (JP1)

Com o objetivo de visualizar a disposição dos poros da matriz de alginato de cálcio, a conformação e tamanho dos mesmos para difusão de substrato e produto e, a acomodação das células dentro da esfera, uma amostra de esferas desidratadas em estufa a 65°C foi encaminhada para o Laboratório de Permeação Através de Membranas (PEQ – COPPE/UFRJ) para a realização de microscopia eletrônica de varredura. A amostra foi preparada para o emprego da técnica de elétrons secundários/ alto vácuo em Microscópio FEI Company – Modelo Quanta 200.

O microscópio eletrônico de varredura produz diretamente uma imagem da estrutura tridimensional da superfície de uma amostra, enquanto os elétrons são espalhados ou emitidos a partir da superfície da mesma. A amostra desidratada costuma ser coberta com uma camada de metal pesado antes de ser bombardeada por um feixe de elétrons, obtendo-se uma grande profundidade de foco e imagens com partes claras e sombras que dão uma aparência tridimensional (COOPER, 2005).

Capítulo 5. Resultados e Discussão

Os resultados obtidos com os experimentos propostos são apresentados nesse capítulo e discutidos à luz da literatura científica, reunindo as etapas pré-biorreator, a fim de se compreender a dinâmica dos principais fatores envolvidos no bioprocesso, como a matéria-prima e o agente fermentativo imobilizado e, a etapa de resultados referentes ao biorreator. O Capítulo 5 é então iniciado com a caracterização dos grãos de sorgo, seguindo com os resultados obtidos na hidrólise enzimática desses grãos, obtendo-se um perfil cinético dessa hidrólise que revela certo potencial dos grãos de sorgo. A sequência de resultados referentes à imobilização celular começa no item 5.3 e prossegue com experimentos que envolvem os ensaios em fermentômetro e os chamados ensaios preliminares, também em fermentômetro, que de certa forma, definem as melhores condições a serem empregadas no biorreator. A seção que corresponde aos resultados obtidos com o biorreator de leito fixo em um processo contínuo é dividida em três partes: a primeira se refere ao crescimento celular do microrganismo e sua imobilização, a segunda reúne os resultados do hidrolisado preparado para o experimento e a terceira apresenta e discute os resultados do processo fermentativo realizado continuamente.

5.1. Caracterização dos Grãos de Sorgo

Os grãos de sorgo foram caracterizados quanto ao teor de umidade, amido, proteínas, lipídeos, fibra bruta e cinzas dos grãos *in natura*, pós hidrólise e pós fermentação, de acordo com Barcelos (2012). O teor de umidade dos grãos foi de 14,03 % ± 0,11, enquanto que o teor de amido correspondeu a 79,05 % ± 0,62, em massa seca. A caracterização dos grãos nas distintas condições propostas está relatada na tabela 5.1, onde a porcentagem de lipídeos dos grãos pós hidrólise se mostra ligeiramente maior que a mesma porcentagem nas condições *in natura*, 3,37 % e 3,41 %, respectivamente. Quanto ao teor proteico, os grãos em um estágio pós hidrólise possuem cerca de 13 % de proteínas, superior aos grãos em um estágio *in natura*, com 10,06 % . A tabela 2.1, apresentada no capítulo de revisão bibliográfica, traz a composição básica das frações de sorgo sacarino, na qual podemos identificar a compatibilidade da análise feita com os grãos empregados no presente trabalho, considerando que possíveis diferenças cabem às particularidades do vegetal utilizado, como também já mencionado, em relação ao cultivar ou a casos de híbridos.

Tabela 5.1 - Caracterização dos grãos de sorgo sacarino em distintas condições

Amostras	Lipídeos (%)	Cinzas (%)	Fibra Bruta	Proteínas (%)
Grãos in natura	$3,37 \pm 0,04$	$1,15 \pm 0,04$	$1,40 \pm 0,03$	$10,06 \pm 0,07$
Grãos pós hidrólise	$3,41 \pm 0,10$	$1,44 \pm 0,02$	$2,34 \pm 0,02$	$13,00 \pm 0,10$
Grãos pós fermentação	$4,45 \pm 0,22$	$3,25 \pm 0,01$	$4,02 \pm 0,17$	$23,36 \pm 0,33$

5.2. Hidrólise Enzimática

O perfil da hidrólise enzimática dos grãos de sorgo, cominuídos a um diâmetro de partícula de 0,5 mm, com uma carga de α-amilase de 20 μL.g⁻¹ grão, a 90°C, e carga de glucoamilase de 40 μL.g⁻¹ grão, 55°C e pH 4,5, em uma relação sólido:líquido de 1:3 g.mL⁻¹, é apresentada na figura 5.1. O perfil mostra que na primeira hora do processo de hidrólise, ou seja, na fase de liquefação, a liberação de açúcares redutores (AR) aumenta gradativamente,

conforme aumenta o tempo de contato com a enzima α -amilase. O tempo de atuação da enzima glucoamilase corresponde aos 30 minutos restantes do perfil, obtendo-se ao final da hidrólise, aproximadamente, uma concentração de açúcares redutores de 245 g.L⁻¹, o que corresponde a uma eficiência de 98%. A obtenção desses resultados se deu com a enzima α -amilase operando com atividade enzimática de 2,28.10⁴ U.mL⁻¹ e glucoamilase com atividade de 1,33.10⁴ U.mL⁻¹.

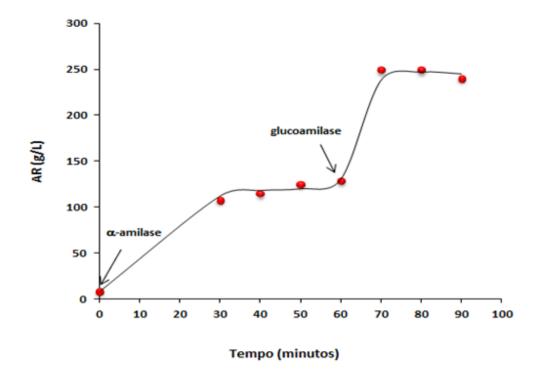


Figura 5.1 – Perfil cinético da hidrólise enzimática dos grãos de sorgo sacarino

5. 3. Definição da Concentração de Alginato de Sódio para a Imobilização da Levedura

Dos experimentos realizados para definir a melhor concentração de alginato de sódio a ser empregada, considerando as concentrações testadas 1%, 2%, 3%, 4% e 5% (m/v), observou-se que o processo de imobilização com alginato na concentração 1% (m/v) não se mostrou capaz de produzir esferas propriamente ditas, apresentando um produto da imobilização com formato irregular e aleatório. Tal característica do formato interfere em aspectos fundamentais para o sucesso de um bioprocesso, como a quantificação celular, a difusão de substrato e produto e a resistência frente à força de cisalhamento de um processo

fermentativo sob agitação constante. Na figura 5.2, observa-se o produto da imobilização com alginato de sódio na concentração de 1% (m/v).



Figura 5.2 – Imobilização na concentração de 1% (m/v)

As concentrações de 2%, 3%, 4% e 5% (m/v) de alginato permitiram a obtenção de esferas capazes de atender aspectos considerados fundamentais e também usados para excluir a concentração de 1% (m/v). Os ensaios em fermentômetro foram conduzidos com células imobilizadas nessas concentrações, no entanto, Alhadeff (1984), por exemplo, realizaram suas pesquisas com alginato de sódio na concentração 1,5% (m/v), obtendo esferas adequadas para experimentos em biorreatores ou frascos agitados. O emprego da concentração utilizada por Alhadef (1984) possivelmente está relacionado à natureza do alginato, ou seja, espécie e idade da alga e, forma de extração, que tornam-se fatores importantes para garantir a formação esférica nos processos de imobilização. A figura 5.3 mostra o produto da imobilização em alginato na concentração de 2% (m/v), realizada no presente trabalho.

As características das esferas produzidas nas concentrações de 2%, 3%, 4% e 5% (m/v) foram levantadas de acordo com as características das células imobilizadas expressas na tabela 5.2 a seguir. A obediência à quantidade de célula participante em cada um dos experimentos é fundamental para as comparações entre os ensaios. A quantificação de células por esfera foi realizada em Câmara de Neubauer e, o número de esferas a serem utilizadas foi calculado de acordo com esse dado. O número de esferas utilizadas foi correspondente ao número calculado através da quantificação por massa média de cada esfera.



Figura 5.3 – Imobilização na concentração de 2 % (m/v)

Tabela 5.2 – Características das células imobilizadas nas diferentes concentrações de alginato

Concentração de alginato (% m/v)	Número de esferas	Número de células/esfera	Massa média da esfera (g)	Número total de células
2	1.253	24,4.10 ¹⁰	0,06	30,5. 10 ¹³
3	874	35.10 ¹⁰	0,06	30,5. 10 ¹³
4	849	36.10 ¹⁰	0,06	30,5. 10 ¹³
5	1.194	25,6.10 ¹⁰	0,06	30,5. 10 ¹³

Os experimentos nas diferentes concentrações de alginato de sódio aconteceram com um número total de células de 30,5.10¹³, com esferas de massa média de 0,06 g. As características do processo fermentativo nas diferentes concentrações de alginato são relatadas na tabela 5.3, na qual a concentração inicial de substrato de 160 g.L⁻¹ foi totalmente consumida em todos os ensaios. O menor tempo de fermentação, 6 horas, foi para o ensaio com as esferas de concentração de 2% (m/v), seguido das concentrações de 3%, 4% e 5% (m/v), com tempos de fermentação de 7 horas. A concentração de etanol de 67,8 g.L⁻¹, maior

resultado encontrado para esse quesito, foi obtida no ensaio com concentração de alginato de 4% (m/v), acompanhada da maior eficiência de fermentação, 83%.

Tabela 5.3 – Processo	fermentativo	nas diferentes	concentrações de alginato

Conc. alginato (% m/v)	Glicose inicial (g.L ⁻¹)	Glicose final (g.L ⁻¹)	Etanol (g.L ⁻¹)	Tempo de fermentação (h)	Eficiência de fermentação (%)
2	160	0	58,6	6	71,6
3	160	0	67,0	7	82,0
4	160	0	67,8	7	83,0
5	160	0	64,2	7	78,5

Os resultados dos ensaios de fermentação mostraram que o melhor desempenho, dado pela eficiência de fermentação, foi obtido com a concentração de alginato de 4% (m/v), que estão acompanhados da figura 5.4 a seguir com o gráfico de gás carbônico desprendido. O gráfico nos mostra o desprendimento gasoso com o curso da fermentação, quando as concentrações de alginato de 2% a 5% (m/v) apresentaram desempenhos equivalentes.

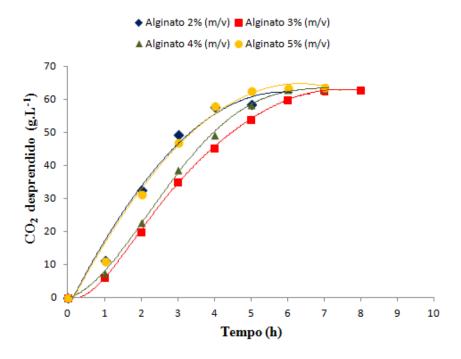


Figura 5.4 – Fermentação alcoólica com células imobilizadas de *S. cerevisiae* em alginato de cálcio. Ensaios conduzidos em fermentômetros apresentando o desprendimento gasoso do processo bioquímico

Do ponto de vista da fermentação, as diferentes concentrações de alginato de sódio avaliadas não apresentaram justificativas suficientes entre os parâmetros considerados. Porém,

determinadas propriedades e a aparência física das esferas podem interferir significativamente na condução de um bioprocesso, principalmente, na duração desse, pois esferas muito duras e rígidas podem se romper facilmente devido à pressão interna causada pelo gás carbônico. Najafpour et al (2004) realizaram pesquisa empregando células imobilizadas em meio sintético para a produção de etanol, considerando concentrações distintas de alginato e avaliaram aspectos possivelmente também notados no atual trabalho. As propriedades e a aparência física das esferas são registradas na tabela 5.4, somando argumentos para definir a concentração de alginato a ser escolhida.

Tabela 5.4 – Propriedades e aparência física das esferas

Conc. Alginato (m/v %)	2	3	4	5
Diâmetro médio das esferas (mm)	4,0	4,0	4,0	4,3
Resistência física	Resistente o suficiente	Dura	Dura	Muito dura
Estabilidade	Boa estabilidade	Estável	Estável	Estável

O diâmetro médio das esferas revelou um tamanho semelhante entre elas, apenas a concentração de 5% (m/v) apresentou esferas ligeiramente maiores, com um diâmetro médio de 4,3 mm. A resistência física foi demonstrada através do toque, realizando um simples pressionar das esferas entre os dedos. Nesse quesito, a dureza da esfera explica a resistência a deformações, onde todas as concentrações se mostraram satisfatórias, alternando entre resistente o suficiente para a concentração de 2% (m/v) e, muito dura na concentração de 5% (m/v), o que não torna esta concentração tão interessante quando se trata da propriedade estabilidade. A estabilidade também está relacionada à resistência, porém, através da interpretação da rigidez em células imobilizadas, o que pode ocasionar esferas com boa estabilidade ou simplesmente estáveis, respectivamente, nas concentrações de 2%, 3% e 4% (m/v) e, esferas muito rígidas, na concentração de 5% (m/v), o que poderia acarretar uma bipartição precoce das esferas frente à pressão de gás carbônico durante um processo fermentativo, implicando em arraste de células e substâncias dissolvidas capazes de se acumular em um biorreator e causar inconvenientes entupimentos.

Considerando todos os resultados obtidos com os experimentos propostos, a concentração de alginato de sódio escolhida foi a de 2% (m/v), visto sua atividade no ensaio

em fermentômetro e, comprovadas as propriedades e aparência física. A concentração de 2% (m/v) também foi considerada a mais adequada visto a menor quantidade de reagente (alginato de sódio) necessária para obtenção de características desejáveis.

5.4. Microscopia Eletrônica de Varredura das Esferas com Células de S. cerevisiae (JP1) imobilizadas

O auxílio da técnica empregada para microscopia eletrônica de varredura possibilitou alcançar os objetivos propostos para melhor entendimento do interior das esferas, visualizando a disposição dos poros da matriz de alginato de cálcio, a conformação e o tamanho dos mesmos para difusão de substrato e produto. A figura 5.5 mostra a microscopia da superfície de uma esfera qualquer, uma enorme trama da matriz porosa de alginato de cálcio, em que grandes filamentos do gel fazem parecer formar verdadeiros "labirintos" capazes de conter as células.

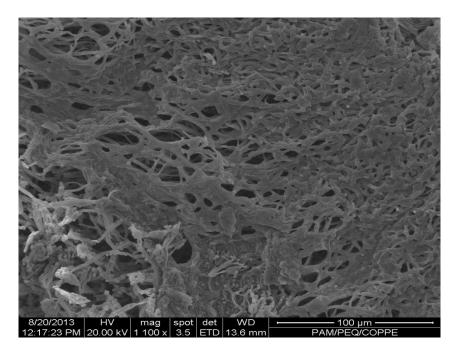


Figura 5.5 – Microscopia eletrônica de varredura da superfície da esfera, matriz porosa de alginato de cálcio 2% (m/v) (aumento de 1.100 vezes)

A matriz formada pelo gel de alginato de cálcio deve apresentar seus poros com tamanho apropriado para atuar como suporte em experimentos de imobilização, ou seja, o poro deve apresentar um tamanho suficientemente grande para a entrada de nutrientes e, ao mesmo tempo pequeno, a tal ponto, que seja capaz de garantir a retenção das células dentro da esfera. Na figura 5.6, a mesma micrografia eletrônica é apresentada em duas formas de representação, sem e com medição, apresentando uma matriz porosa de alginato de cálcio com a indicação de leveduras e a identificação do tamanho de poros e de células. Através da imagem, permite-se averiguar que os poros não apresentam um tamanho único, havendo variações de tamanho que vão de uma margem de 1,89 a 3,79 μm só nesta imagem. Como esperado, as células também apresentam tamanhos distintos, com variações, nessa imagem, de 1,89 μm a 2,04 μm.

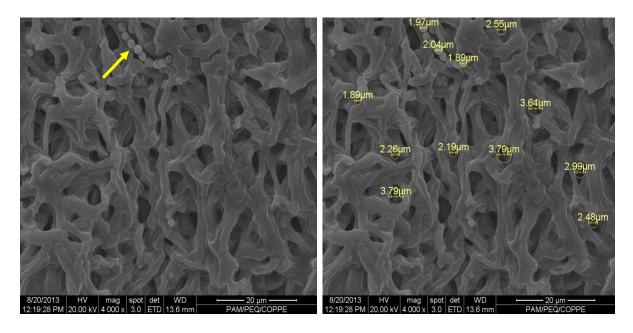


Figura 5. 6 – Microscopia eletrônica de varredura da matriz porosa de alginato de cálcio 2% (m/v) com a indicação de leveduras e a identificação do tamanho de poros e células (aumento de 4.000 vezes)

Sanchez (1995) referencia autores que afirmam que o tamanho dos poros de alginato de cálcio formados também ocorre em função da massa molecular e da estrutura do carreador e, admite que há uma tendência no sentido em que os poros da superfície costumam ser menores que os encontrados na estrutura da esfera. Smidsrod & Skjak-Braed (1990) ressaltam não só a importância do tamanho do poro, mas também a distribuição do tamanho do poro e, juntamente com o que é abordado por Thu et al. (1996), conclui-se que a distribuição do tamanho do poro deve ser limitada, ou seja, a variação de tamanho não deve ser muito grande.

Sanchez (1995) prossegue afirmando que o tamanho dos poros resultantes costuma ser bastante variável e seu diâmetro ficará entre 150 e 10⁵ Å. Os diâmetros médios de glicose e etanol são, respectivamente, 7,2 Å e 4,5 Å, o que permite considerar que de acordo com os tamanhos de poro e a sua distribuição ao longo da matriz de alginato de cálcio, encontrados nesse atual trabalho, há compatibilidade física entre o suporte e a aplicação do mesmo na fermentação alcoólica, visto que o tamanho do poro é suficiente para a difusão de substrato e produto.

A respeito das células, a figura 5.7 revela o interior da esfera com as células imobilizadas. A questão dos poros da matriz de alginato de cálcio em relação às células mostrou adequação para a imobilização das esferas.

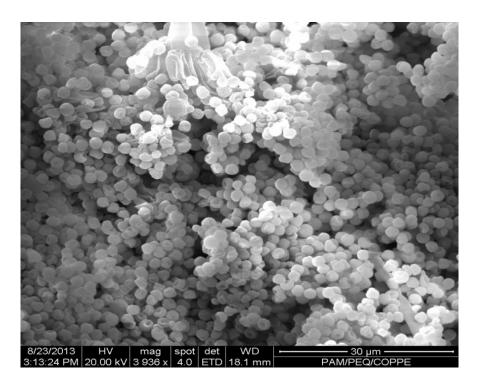


Figura 5.7 – Microscopia eletrônica de varredura do interior da esfera com células imobilizadas de *S. cerevisiae* (JP1) em alginato de cálcio 2% (m/v) (aumento de cerca 4.000 vezes)

5.5. Avaliação da Capacidade Fermentativa da Levedura S. cerevisiae (JP1) em Comparação à Levedura de Panificação

Para que os ensaios em fermentômetro, conduzidos com a linhagem de *S. cerevisiae* (JP1) imobilizada em alginato de cálcio, fossem passíveis de comparação com os ensaios que ocorriam em paralelo com fermento biológico, também imobilizado, sob as mesmas condições, a quantificação celular em cada ensaio fez-se primordial para a normalização da quantidade de células a fim de se determinar o número de esferas participantes. O preparo do inóculo foi realizado em frascos agitados com uma concentração inicial de glicose de 20 g.L⁻¹, quando ao final das 7 horas de propagação, a concentração de células foi de 4,13 g.L⁻¹, com uma produtividade em células de 0,6 g.L⁻¹.h⁻¹ e um fator de rendimento, Y _{X/S}, de 0,20 g.g⁻¹.

A tabela 5.5 apresenta as características das células imobilizadas para três tipos de ensaios distintos: um primeiro ensaio, com a linhagem JP1, empregando 750 esferas e um número total de células de 4,8.10¹³, seguido de um ensaio com a levedura de panificação empregando o mesmo número de esferas, ainda que o número total de células, nesse caso, fosse evidentemente maior (23,1. 10¹³). Com o propósito de se normalizar a quantidade de células por ensaio, outro experimento foi planejado com a levedura de panificação imobilizada, porém, considerando o número total de células do experimento realizado com a linhagem JP1, empregando-se um menor número de esferas (156). O número de esferas utilizadas se faz correspondente ao número previsto através da quantificação por massa média de cada esfera, como também apresentado na tabela 5.5.

Tabela 5.5 – Características das células imobilizadas

Linhagem	Número de esferas	Número de células/esfera	Massa média da esfera (g)	Número total de células
JP1	750	6,4.10 ¹⁰	0,04	4,8.10 ¹³
Fermento	750	30,8.10 ¹⁰	0,05	23,1. 10 ¹³
Fermento *	156	30,8.10 ¹⁰	0,05	4,8. 10 ¹³

Fermento* se refere ao experimento que empregou levedura de panificação imobilizada, porém, considerando o número total de células.

Todos os ensaios propostos iniciaram com uma concentração de substrato correspondente a 160 g.L⁻¹, referindo-se unicamente à solução de glicose contida no meio sintético de fermentação. Ao final das 10 horas do processo fermentativo, o ensaio com a linhagem JP1 apresentou uma concentração final de glicose equivalente de 4,1 g.L⁻¹, enquanto que o ensaio com fermento biológico, mantendo o mesmo número total de células, resultou em um tempo de fermentação de 14 horas, com uma concentração de glicose residual de 20,7 g.L⁻¹. Os resultados deste ensaio são expressos na tabela 5.6, na qual verificou-se consumo total de substrato em um período de 8 horas para o experimento com fermento biológico conduzido com uma maior quantidade de células.

Tabela 5.6 – Resultados dos ensaios

Linhagem	JP1	Fermento	Fermento*
Glicose inicial (g.L ⁻¹)	160	160	160
Glicose final (g.L ⁻¹)	4,1	0	20,7
Tempo de fermentação (h)	10	8	14
Etanol (g.L ⁻¹)	68,0	63,1	61,9
$\mathbf{Y}_{\mathrm{P/S}}$ $(\mathbf{g.g}^{-1})$	0,42	0,39	0,38
Eficiência da fermentação (%)	83,2	77,1	75,7
Redução percentual do substrato (%)	97,4	100,0	87,1
Produtividade g.L ⁻¹ .h ⁻¹	6,8	8,0	4,4

Fermento* se refere ao experimento que empregou levedura de panificação imobilizada, porém, considerando o mesmo número total de células do experimento conduzido com a linhagem JP1.

Com base nestes resultados, o destaque da linhagem JP1 se faz notório não apenas pelo menor tempo de fermentação e consumo de glicose quando comparados ao ensaio em

que foi empregado o fermento biológico considerando o mesmo número total de células, mas é reforçado quando comparado ao ensaio realizado com a maior quantidade total de células. Este experimento mostrou que as células de *S. cerevisiae* de panificação precisaram de 2 horas a menos que a linhagem JP1 para consumir toda a glicose, porém, com uma concentração celular muito maior que aquela com a linhagem industrial. A robustez da linhagem de *S. cerevisiae* JP1 é confirmada pelos resultados de CLAE apresentados e pelas variáveis de respostas obtidas (tabela 5.6).

O substrato residual influencia na eficiência do processo e na redução percentual do mesmo, entendido que em um processo fermentativo a glicose é convertida em etanol e gás carbônico, sendo o etanol o produto de interesse. O ensaio com a maior concentração de etanol foi aquele em que se empregou a linhagem JP1, correspondente a 68,0 g.L⁻¹, correspondendo a um fator de rendimento de substrato consumido em etanol de 0,42 g.g⁻¹, que foi também o maior quando comparado aos outros experimentos. Os ensaios com fermento biológico, independente da metodologia proposta, atingiram resultados muito próximos, principalmente, no que diz respeito à concentração de etanol. Da mesma forma, o fator de rendimento em etanol nos ensaios com fermento biológico foram praticamente iguais: 0,39 a 0,38 g.g⁻¹, ocorrendo para o ensaio com o mesmo número total de células, os menores valores de eficiência e redução percentual do substrato, sendo respectivamente, 75,7% e 87,1%.

Com o objetivo de se avaliar a capacidade de fermentação da linhagem de *S. cerevisiae* (JP1) imobilizada, os experimentos realizados foram suficientemente satisfatórios para comprovar a viabilidade, a potência e a estabilidade da linhagem. Os próximos experimentos ainda visam avaliar o desempenho da linhagem JP1 imobilizada, nos quais o meio de fermentação passa a ser o hidrolisado enzimático de sorgo sacarino em condições e concentrações diferentes. Os resultados da metodologia proposta para a fermentação com a levedura JP1 imobilizada e com a utilização do hidrolisado são apresentados na seção seguinte.

5.6. Ensaios Preliminares de Fermentação do Hidrolisado dos Grãos de Sorgo Sacarino

Estes ensaios tiveram por objetivo decidir a melhor forma de utilização do hidrolisado dos grãos de sorgo em um processo fermentativo com a levedura *S. cerevisiae* (JP1) imobilizada, visando uma posterior utilização em um biorreator contínuo de leito fixo. Para

isso, o hidrolisado enzimático dos grãos de sorgo foi utilizado nas seguintes condições: hidrolisado diluído sem nutrientes (HDSN), hidrolisado diluído com nutrientes (HDCN), hidrolisado não diluído sem nutrientes (HNDSN) e hidrolisado não diluído com nutrientes (HNDCN). A concentração original de glicose no hidrolisado que caracteriza a condição não diluída foi de 235 g.L⁻¹, enquanto que a condição diluída continha uma concentração de 180 g.L⁻¹ de glicose.

Em relação às células do agente fermentativo, o preparo do inóculo foi realizado em frascos agitados em uma concentração inicial de glicose de 20 g.L⁻¹, obtendo-se, ao final da propagação, uma concentração de células de 4,65 g.L⁻¹, correspondendo a um fator de rendimento de substrato consumido em células, Y_{X/S}, de 0,23 g.g⁻¹ e produtividade em células de 0,31 g.L⁻¹.h⁻¹. Após a centrifugação das células e descarte do sobrenadante, a imobilização ocorreu em alginato de sódio a 2% (m/v) com gotejamento em solução de CaCl₂ a 0,1M. A tabela 5.7 apresenta as características das células imobilizadas participantes destes ensaios preliminares, que continham um número total de células de 10,6.10¹³, sendo o número de esferas participantes condizente com o número de células/esfera (10,6.10¹⁰ nos ensaios com hidrolisado diluído e, 42.10¹⁰ na versão do hidrolisado não diluído). A massa média das esferas foi de 0,06 g em todos os ensaios.

Tabela 5.7– Células imobilizadas nos ensaios preliminares

Ensaio	Número de esferas	Número de células/esfera	Número total de células
HDSN	1000	10,6.10 ¹⁰	10,6. 10 ¹³
HDCN	1000	10,6.10 ¹⁰	10,6. 10 ¹³
HNDSN	252	42,10 ¹⁰	10,6. 10 ¹³
HNDCN	252	42,10 ¹⁰	10,6. 10 ¹³

HDSN: Hidrolisado diluído sem nutriente; HDCN: Hidrolisado diluído com nutriente;

HNDSN: Hidrolisado não diluído sem nutriente; HNDCN: Hidrolisado não diluído com nutriente

Os resultados destes experimentos são apresentados na tabela 5.8, que mostra que o consumo de glicose se dá por completo nos experimentos com o hidrolisado diluído. Na condição não diluída, verificou-se que a glicose não foi integralmente consumida, havendo concentrações residuais nos meios sem suplementação (24,2 g.L⁻¹) e com suplementação (20,1 g.L⁻¹), o que correspondeu a reduções percentuais de substrato de 90,1% e 91,7%, respectivamente. O fator "tempo de fermentação" mostrou um valor maior para os ensaios com o hidrolisado não diluído, como esperado já que nesta condição a concentração inicial de subtrato era muito maior (235 g.L⁻¹).

Tabela 5.8 – Avaliação da fermentabilidade de meios contendo hidrolisado enzimático de grãos de sorgo sacarino em diferentes condições com a linhagem *S. cerevisiae* JP1

Ensaio	HDSN	HDCN	HNDSN	HNDCN
Glicose inicial (g.L ⁻¹)	180	180	235	235
Glicose final (g.L ⁻¹)	0	0	24,2	20,1
Tempo de fermentação (h)	9	6,5	14,5	13
Etanol (g.L ⁻¹)	67,7	57,2	117,0	117,4
$\mathbf{Y}_{ ext{P/S}}$ $(\mathbf{g}.\mathbf{g}^{-1})$	0,37	0,31	0,49	0,50
Eficiência (%)	73,6	62,2	98,0	98,0
Redução percentual do substrato (%)	100,0	100,0	90,1	91,7
Produtividade (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)	7,5	8,8	8,1	9,0

HDSN: Hidrolisado diluído sem nutriente; HDCN: Hidrolisado diluído com nutriente;

HNDSN: Hidrolisado não diluído sem nutriente; HNDCN: Hidrolisado não diluído com nutriente

As elevadas concentrações residuais de substrato nos experimentos com hidrolisado não diluído estão provavelmente associadas às elevadas concentrações de etanol produzido. É fato amplamente conhecido que o principal fator limitante na produção de etanol é o seu

efeito inibidor sobre a fermentação e o crescimento da levedura. Torna-se fácil entender este efeito pois a levedura poluiu o seu ambiente com produtos finais do seu metabolismo até cessar o crescimento e, eventualmente, o consumo de subtrato, bem com a perda de sua viabilidade (PEREIRA JR, 1982).

A elevada concentração de substrato como ação geradora do estresse osmótico pode atuar juntamente com a concentração de etanol ao se tornar elevada no sistema, podendo resultar em perda da viabilidade e da atividade fermentativa. No entanto, tais pontos são estritamente significativos quando se trata de agentes fermentativos livres no sistema, já que células imobilizadas se encontram fixas a uma matriz porosa, que gera uma primeira ação protetora, o que faz com que o inconveniente esteja vinculado às faixas difusionais de substrato e produto ao longo da esfera.

O artigo de Jin et al (2012) relata experimentos conduzidos em batelada para verificação da produção de etanol em três diferentes concentrações de glicose: 85 g.L⁻¹, 113 g.L⁻¹ e 156 g.L⁻¹, cujo agente fermentativo foi a levedura *S. cerevisiae* imobilizada em alginato de cálcio 2% (m/v) e, o meio a ser fermentado era caldo de sorgo sacarino. As conclusões de Jin et al neste trabalho foram, obviamente, que a concentração final de etanol aumenta com o aumento da concentração inicial de açúcar e, o aumento da concentração de substrato inibe o crescimento celular. Tais conclusões reafirmam conceitos de processos com células imobilizadas, onde o crescimento celular não é um fator a ser estimulado, visto o emprego de altas concentrações celulares, pois o crescimento de células imobilizadas poderia ocasionar desprendimento de biomassa.

A concentração elevada de açúcar nos ensaios com hidrolisado não diluído oferta substrato suficiente para gerar uma concentração de etanol de 117,0 g.L⁻¹ e 117,4 g.L⁻¹, respectivamente, nos ensaios sem e com nutrientes. O fator de rendimento de substrato em produto, consequentemente, também foi maior nessas condições de experimento, 0,49 g.g⁻¹ e 0,50 g.g⁻¹, nas condições de não diluído sem nutriente e com nutriente, enquanto que os ensaios com o hidrolisado diluído foi de 0,37 g.g⁻¹ e 0,31 g.g⁻¹, nas condições sem nutriente e com nutriente. A figura 5.10 apresenta o cromatograma da amostra do ensaio com hidrolisado não diluído e com suplementação de nutrientes, no qual a alta concentração de etanol produzido foi de 117,4 g.L⁻¹.

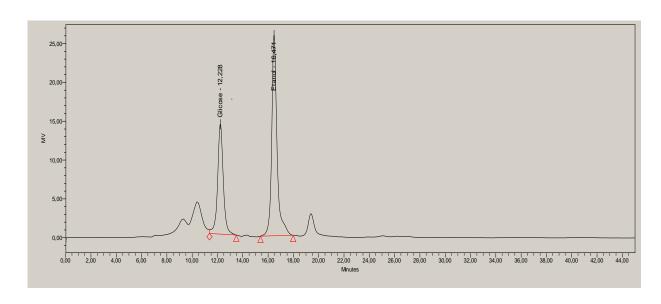


Figura 5.10 – Cromatograma da amostra do ensaio com hidrolisado não diluído e com suplementação de nutrientes

A figura 5.11 apresenta um perfil da concentração de etanol equivalente nos ensaios com HDSN, HDCN, HNDCN e HNDSN, que mostra que o tempo de fermentação nas condições do hidrolisado não diluído é maior devido à maior concentração de glicose presente no meio, requerendo um tempo maior para a fermentação. No entanto, dentro da mesma condição, a questão da suplementação de nutrientes também influencia no perfil traçado, quando os ensaios que incluíam a suplementação apresentaram tempos de fermentação menores.

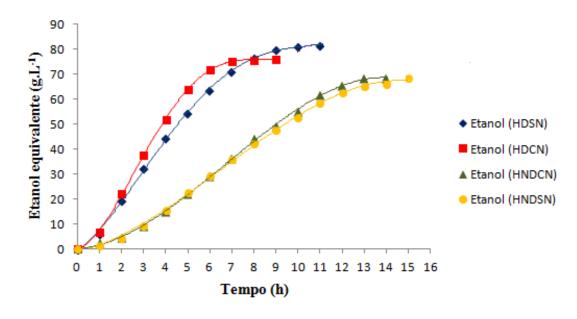


Figura 5.11 – Perfil da concentração de etanol equivalente (g.L⁻¹) nos ensaios com HDSN, HDCN, HNDCN e HNDSN

O fator suplementação de nutrientes foi um fator decisivo na definição do desempenho dos ensaios com hidrolisado de sorgo, visto que a composição do meio de fermentação tem grande influência sobre o desempenho da levedura (SANCHEZ, 1995), inclusive no que diz respeito à produção de níveis elevados de etanol, em que as condições nutricionais podem aumentar a capacidade do microrganismo nesse sentido. Nutrientes que atuam como fonte de nitrogênio são fundamentais para a síntese proteica, íons Mg⁺² têm sua importância quando se menciona sua atuação como ativador de enzimas nas leveduras e, muitos sais inorgânicos contribuem para ajustar e estabilizar o pH do meio (LIU et al., 2008).

Liu et al (2008) realizaram um trabalho de pesquisa para verificar a concentração ótima de sais inorgânicos a ser empregada na fermentação alcoólica, a partir de células imobilizadas em alginato de cálcio em concentração de 2,5% e 3% (m/v), em que a matéria-prima foi caldo de sorgo sacarino. Os pesquisadores concluíram que maiores rendimentos de etanol dependem dessa concentração ótima de sais inorgânicos e que, experimentos tanto em frascos agitados como em biorreator que não usaram nenhuma forma de suplementação foram menos eficientes, apresentando um desempenho menor. Os autores relatam que mesmo que o caldo de sorgo sacarino apresente concentrações de sais inorgânicos muito baixas, as chamadas concentrações ótimas desses sais seriam: 0 % de K₂HPO₄, 0,20 % de (NH₄)₂SO₄ e 0,05 % de MgSO₄, dentro das condições ensaiadas em sua pesquisa.

O emprego do hidrolisado diluído nos experimentos em biorreator foi definido como a melhor condição a ser empregada porque a utilização do hidrolisado nesta condição apresentou consumo total. O emprego de um hidrolisado sem suplementação de nutrientes foi entendido como a melhor opção de uso, visto que o ensaio nessa condição apresentou produção de etanol maior, acarretando maiores eficiências de fermentação e o fator de rendimento em etanol, da mesma forma que não houve discrepância quanto ao tempo de fermentação. A não utilização de nutrientes foi interpretada como uma boa opção por não envolver custos com a utilização de nutrientes específicos. Quanto ao tipo de condução do processo em biorreator, o uso de um hidrolisado diluído não comprometeria as principais variáveis do processo frente às taxas de diluição aplicadas no modo contínuo.

Com a definição da melhor condição de hidrolisado a ser empregada, o experimento de reaproveitamento das esferas de células imobilizadas em ciclos fermentativos em fermentômetro, foi conduzido à temperatura de 35°C e agitação de 110 rpm. Para isso, ao final do primeiro ensaio com o hidrolisado diluído sem suplementação de nutrientes, os

frascos dos ensaios foram conservados em geladeira, a 4°C, por um período de 12 horas. Após esse período, a separação das esferas para inserção em um meio novo de fermentação foi realizada em condições estéreis do sistema. Os ensaios sequenciais foram realizados a 110 rpm, 35°C. A figura 5.10 apresenta as concentrações de etanol obtidas em cada batelada realizada, em que a linha tracejada representa o valor médio das concentrações de etanol obtidas.

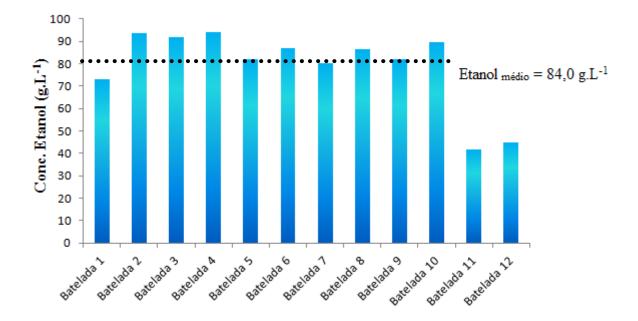


Figura 5.10 – Desempenho da fermentação alcoólica em termos de concentração final de etanol, conduzida por bateladas simples repetidas com uma concentração de glicose inicial de $180~{
m g.L^{-1}}$

Foram realizadas 12 bateladas de reaproveitamento das células imobilizadas. A reutilização dessas células se mostrou eficiente até o décimo ciclo, batelada 10, visto que a concentração de etanol diminui consideravelmente nas bateladas 11 e 12. As elevadas concentrações de etanol nestes experimentos, geraram uma média de 84,0 g.L⁻¹, medidas após um período de *overnight*, já que foi verificado que o etanol não se difundia livremente após interrupção dos ciclos, que demandam tempo para que o produto passasse do interior da esfera para o meio externo. Esta declaração foi comprovada por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), no ensaio com hidrolisado diluído sem nutrientes, quando a concentração de etanol foi de 67,7 g.L⁻¹ (tabela 5.8) e, após um período de 12 horas indicou uma concentração de etanol de 80,0 g.L⁻¹. Antes da retirada da amostra para análise por CLAE, os frascos foram agitados a 80 rpm e temperatura 35°C por cinco minutos, para

homogeneização do conteúdo e posterior retirada de amostras. O desempenho das células de levedura imobilizadas é corroborado pelos valores do fator de rendimento em etanol, apresentado na figura 5.13, em que a linha tracejada representa o valor médio desta variável de resposta.

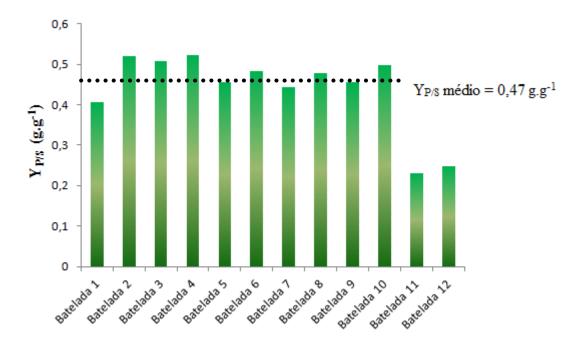


Figura 5.11– Desempenho da fermentação alcoólica em termos de fator de rendimento de etanol por substrato consumido, conduzida por bateladas simples repetidas

O fator de rendimento de etanol por substrato consumido corrobora os resultados apresentados na figura 5.11, na qual a partir de altas concentrações de etanol, altos rendimentos são obtidos, como um valor médio para este parâmetro de 0,47 g.g⁻¹até a batelada 10. Um fator interessante nesse sentido é o estado das esferas de células imobilizadas, que desde a batelada 7 se encontravam "bipartidas" ou com a sua integridade alterada. Estas modificações das esferas resultam no desprendimento de células e diminuição do número de células participantes nos ciclos posteriores, já que a cada transferência das esferas um novo meio de fermentação é adicionado ao sistema reacional.

O excelente desempenho da levedura *S. cerevisiae* JP1 imobilizada foi comprovado com esses experimentos preliminares e sinalizou para ensaios em biorreator do tipo coluna com as células desta linhagem imobilizadas funcionado como leito fixo.

5.7. Experimento em Biorreator Contínuo de Leito Fixo

Os resultados obtidos com o experimento em biorreator em um processo contínuo estão divididos em três partes, de modo a facilitar o entendimento e a disposição dos resultados de cada parte para a execução do mesmo. A primeira parte compete ao crescimento celular da levedura da linhagem JP1 e sua imobilização, enquanto que a segunda aborda os resultados do hidrolisado preparado para o experimento e a terceira apresenta e discute os resultados do processo fermentativo realizado. As partes dessa seção de resultados se iniciam a seguir.

5.7.1. Crescimento Celular e Imobilização

Para a obtenção de um número de esferas suficiente para preenchimento do biorreator, da mesma forma que para a obtenção de um número total de células suficientemente grande para a execução de um processo contínuo, a levedura *S. cerevisiae* (JP1) foi propagada em reator através de uma batelada alimentada por pulsos, realizando duas alimentações com solução de glicose a 700 g.L⁻¹, concentração de oxigênio dissolvido mantida a 60% da saturação, temperatura 35°C e pH 4,5. A figura 5.12 apresenta o perfil cinético de crescimento da levedura JP1 nesse processo de propagação em biorreator.

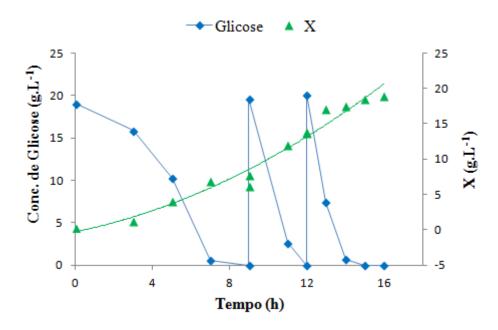


Figura 5.12 - Perfil cinético de crescimento da levedura JP1

Quando ao final das 16 horas de propagação em reator, a concentração de células foi de 18,93 g.L⁻¹, correspondendo a um fator de rendimento em células de 0,19 g.g⁻¹ e uma produtividade volumétrica em células equivalente a 1,18 g.L⁻¹.h⁻¹, que foram centrifugadas para posterior imobilização em alginato de sódio 2% (m/v). O perfil cinético de crescimento na figura 5.14 mostra também o momento das duas alimentações realizadas, como nos tempos de 9 horas e 12 horas do experimento.

Para a imobilização celular foram preparados 1,8 L de alginato de sódio, para mistura com a suspensão de células produzidas e posterior gotejamento em solução de CaCl₂, preparado um total de 2,25 L e distribuída em um volume de 250 mL em frascos Erlenmeyer devidamente fechados. Após a imobilização, as esferas de células imobilizadas foram mantidas sob refrigeração a 4°C, por no mínimo, 12 horas antes de serem utilizadas, sendo verificado o diâmetro médio com o auxílio de um paquímetro e a quantificação celular por meio de Câmara de Neubauer. Das esferas produzidas, foram utilizadas 1.075 esferas, de massa média 0,62 g, onde cada continha 16,2.10¹⁰ células/esfera, totalizando 17,4.10¹³ células participantes.

5.7.2 – Hidrolisado Enzimático dos Grãos de Sorgo Sacarino

Com a administração das enzimas α-amilase e glucoamilase para hidrólise dos grãos de sorgo e posterior filtração para obtenção de um hidrolisado límpido, foi realizada a autoclavagem desse material para uso. Após o processo de autoclavagem, a presença de um precipitado nos frascos contendo o hidrolisado tornou-se enormemente evidente, acarretando a formação de um meio não homogêneo, inadequado para o processo. Possivelmente, a formação do precipitado está vinculada à desnaturação das enzimas empregadas no processo de hidrólise e ao teor lipídico presente no hidrolisado dos grãos de sorgo.

Considerando os experimentos prévios com o hidrolisado, realizado em ensaios em fermentômetro, também ocorreu a formação de precipitado, porém, devido ao pequeno volume útil ocupado nos frascos, tal formação não foi significativa, não se mostrando capaz de interferir no processo fermentativo, visto que os ensaios incluíam agitação. No caso do biorreator contínuo, o experimento foi conduzido sem agitação, logo, as condições ideais do hidrolisado precisavam ser adequadas para o funcionamento pleno do mesmo, considerando também que a alta precipitação ocorrente, possivelmente, poderia acarretar quadros de

entupimentos e problemas de difusão para as células imobilizadas. A questão da não-homogenização do hidrolisado foi solucionada com a centrifugação, 8.000 rpm por 20 minutos e posterior filtração, com bomba à vácuo, do sobrenadante, sendo mantidas as condições estéreis propostas ao hidrolisado.

5.7.3 – Processo Fermentativo em Biorreator de Leito Fixo

O experimento em biorreator de leito fixo foi iniciado com um tempo de residência de 4 horas, vazão real de 1,7 mL.min⁻¹ e com uma porosidade do leito de 0,42. A partir das primeiras horas de experimento, as esferas com as células imobilizadas ficaram suspensas ao longo da coluna, atingindo a extremidade superior do biorreator, com um volume morto sendo formado. A suspensão dessas esferas deve-se à produção de gás carbônico, que as tornam mais leves e, à peculiar difusão desse gás pela esfera.

Próximo à saída do biorreator, as esferas mais superficiais não encontram uma quantidade de substrato suficiente devido ao ocasional empacotamento de esferas gerado, o que promove dentro do biorreator uma distribuição não homogênea de substrato. Essa distribuição não homogênea resulta em uma região de entrada de hidrolisado uma área mais concentrada, onde possivelmente as esferas que estão em contato direto com o hidrolisado dessa região são maiores, em comparação às esferas mais superficiais da região de saída do efluente. O aumento das esferas está associado ao microambiente formado em função da disposição de hidrolisado, que fornece às células melhores condições de oferta de açúcares, diferentemente das esferas superficiais, que apresentam um microambiente desfavorável à manutenção de suas células. Segundo Sanchez (1995), o crescimento celular associado às propriedades elásticas do gel pode fazer o diâmetro da esfera aumentar ao longo da operação do sistema. O perfil geral da concentração residual de açúcar e da produção de etanol durante todo o experimento é apresentado na figura 5.13.

Nas primeiras horas do experimento em biorreator, as concentrações residuais de açúcar e a de etanol variaram, já que o sistema havia sido iniciado diretamente com alimentação contínua e não por uma batelada prévia. Após esta fase, o sistema tende a alcançar um estado estacionário correspondente à taxa de diluição imposta (0,25 h⁻¹). Foi possível estimar este estado estacionário no intervalo de tempo de 22 às 26 horas para a concentração residual de açúcar e de 16 às 26 horas de funcionamento do biorreator para o etanol formado. A concentração média de etanol, neste intervalo, foi de aproximadamente 68,4 g.L⁻¹, resultando em um valor de produtividade volumétrica de 17,1 g.L⁻¹.h⁻¹ e a de substrato residual de 0,6 g.L⁻¹, correspondendo à uma redução percentual de substrato de 99,5%. A conversão do substrato em produto (Y_{P/S}) forneceu o valor de 0,52 g.g⁻¹, ligeiramente acima do teórico (0,511 g.g⁻¹), o que pode ser justificado pelos erros experimentais associados à quantificação de etanol (CLAE) e de açúcar (DNS). De toda forma, o elevado valor para esta importante variável de resposta é um indicativo de que as células utilizaram eficientemente o acúcar para a obtenção do produto-alvo e não para o seu crescimento. Esta situação é comumente encontrada em sistemas reacionais altamente impactados em células (PEREIRA JR et al., 2008)

A estimativa do estado estacionário foi definida pela aproximação dos pontos analisados, ou seja, pela convergência das concentrações verificadas com o passar do tempo à determinada taxa de diluição, notando-se certa estabilidade de consumo e produção. Observase que o estado estacionário para a produção de etanol é atingido antes daquele correspondente ao consumo de açúcar, o que se deve à diferença nos coeficientes de difusão de etanol e de glicose como sinalizado por Hannoun & Stephanopoulos (1986). Neste trabalho, os autores estimaram valores para o coeficiente de difusão de glicose e de etanol de 0,6 e 1,0 cm².s¹1x10⁵, respectivamente, para "biopartículas" contendo células de levedura imobilizada em alginato de cálcio em uma concentração de 2% (m/v). Desta forma, fica claro que o etanol se difunde no meio poroso mais facilmente do que a glicose, já que a molécula deste álcool possui um diâmetro médio (4,5 Å) menor do que o de glicose (7,2 Å).

Alcançado o primeiro estado estacionário, o sistema foi perturbado com o aumento da vazão da bomba, conduzindo o sistema a uma vazão real de 2,3 mL.min⁻¹, sendo 3 horas o novo tempo de residência, o que correspondeu à taxa de diluição de 0,33 h⁻¹. O sistema foi alimentado com esta vazão por um período de 18 horas, tendo alcançado o segundo estado estacionário, no intervalo de tempo de 34 às 39 horas, considerando a concentração de etanol.

Essa fase foi marcada por eventos de entupimento que obrigaram algumas vezes a aumentar a vazão do sistema após realizar uma drenagem forçada, visto ao acúmulo de partículas geradas com a degradação parcial das esferas e à formação de um conteúdo coloidal próximo à região de entrada de meio no biorreator.

Com a taxa de diluição de 0,33 h⁻¹, a concentração residual de açúcar foi em torno de 9,1 g.L⁻¹, correspondente a uma redução percentual de substrato de aproximadamente 93%. Em comparação à primeira taxa de diluição, o desempenho do sistema nesta nova vazão se mostrou mais eficiente, resultando em uma concentração de etanol de 67,03 g.L⁻¹ e consequentemente uma produtividade volumétrica de 22,11 g.L⁻¹.h⁻¹, maior do que aquela obtida com a menor taxa de diluição aplicada (0,25 h⁻¹). A conversão do substrato em produto (Y_{P/S}) correspondeu a 0,55 g.g⁻¹; novamente valor maior do que o máximo obtenível pela estequiometria. As explicações para este resultado estão ligadas aos métodos de determinação de etanol e açúcar como mencionado anteriormente.

Segundo Bouallagui et al. (2013), o aumento da taxa de diluição causa um aumento da quantidade de substrato que entra nas esferas de células imobilizadas, estimulando o metabolismo fermentativo a produzir uma quantidade maior de etanol. Os autores prosseguem sua afirmação ressaltando que, de fato, a produtividade depende da concentração de etanol, mas também da taxa de diluição que tem sido crescida.

Alcançado a confirmação do segundo estado estacionário às 45 horas de experimento, o sistema foi novamente perturbado com a aplicação de uma nova vazão de 3,5 mL.min⁻¹, correspondendo a um tempo de residência de 2 horas e, consequente taxa de diluição de 0,5 h⁻¹. A aplicação desta taxa de diluição foi levada a cabo até às 80 horas de experimento, quando foi percebido visivelmente contaminação no vaso de alimentação com a formação de espuma e coloração mais clara do hidrolisado enzimático dos grãos de sorgo, como apresentado na figura 5.14.

O longo período de funcionamento do biorreator fez com que as esferas de células imobilizadas assumissem um novo perfil decorrente de sua utilização prolongada, como mostrado na figura 5.15. Nesta figura, na região inferior, próxima da entrada de meio de alimentação no biorreator, há um verdadeiro depósito de esferas partidas devido à pressão de gás carbônico gerada com o aumento da taxa fermentativa e, à perda de íons cálcio. A nova

configuração das esferas gerou um desprendimento celular, o que fez com que as esferas se depositassem ao fundo do biorreator, evento que será analisado posteriormente.



Figura 5.14 – Jarro de alimentação do biorreator contínuo com indicativos de contaminação

Com a taxa de diluição de 0,5 h⁻¹, a concentração residual de açúcar foi em torno de 5,3 g.L⁻¹, o que resultou em uma redução percentual de substrato de aproximadamente 96%. No entanto, o desempenho da levedura imobilizada, nesse caso, resultou na menor concentração de etanol (37 g.L⁻¹) quando comparada às três vazões empregadas. Os valores de produtividade volumétrica (18,5 g.L⁻¹.h⁻¹) e fator de rendimento de substrato em etanol (0,30 g.g⁻¹), também assumiram valores menores do que nos casos anteriores.



Figura 5.15 – Região próxima à entrada de substrato no biorreator: depósito de esferas partidas

O aumento da taxa de diluição indica aumento na taxa de oferta do substrato, o que ocasionaria um aumento da atividade fermentativa da levedura, agente do processo. Por outro lado, em um sistema contínuo, a aplicação de altas taxas de diluição causa uma progressiva diminuição da concentração de etanol. Altas taxas de diluição diminuem o tempo de contato do agente biológico imobilizado com o substrato, ou seja, parte do substrato sai na corrente de efluente antes de ser consumido. O perfil da produtividade volumétrica e das concentrações médias de etanol e açúcar, estimadas nos estados estacionários, em função das taxas de diluição aplicadas, é apresentado na figura 5.16.

Esta figura caracteriza o sistema desenvolvido. Mesmo que se tenham estabelecidos apenas três estados estacionários, os resultados foram bastante promissores. Medidas no efluente reportam a um comportamento clássico para biorreator contínuo de mistura completa (CSTR), ou seja, um aumento na vazão resulta na redução da concentração de produto e aumento na concentração de substrato. O processo desenvolvido no presente estudo apresentou um máximo de produtividade volumétrica de, aproximadamente, 23 g.L⁻¹.h⁻¹. Quando se comparam os valores desta importante variável de resposta com os obtidos na tradicional produção industrial de etanol (5 a 8 g.L.h⁻¹) verifica-se que é possível aumentar significativamente a produção deste biocombustível de 3,0 a 4,5 vezes. É obvio que este aumento impactará positivamente os custos de capital (CAPEX) caso esta tecnologia seja transferida para o setor industrial.

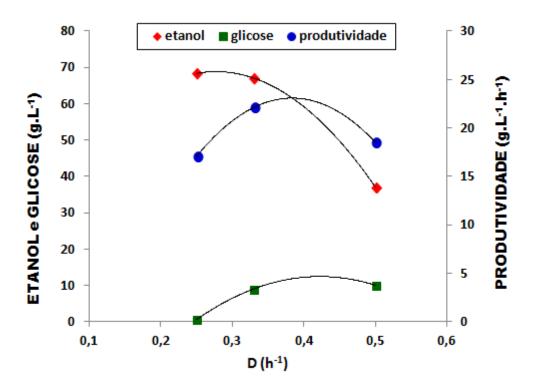


Figura 5.16 – Perfil da produtividade volumétrica e das concentrações de etanol e açúcar em função das taxas de diluição aplicadas, em biorreator de leito fixo recheado com células de leveduras imobilizadas em alginato de cálcio e com alimentação contínua de hidrolisado de grãos de sorgo sacarino

A conversão do substrato em produto e a redução percentual de substrato de acordo com as taxas de diluição aplicadas estão organizadas na figura 5.17, o que permite uma melhor interpretação dos resultados atingidos com o biorreator contínuo.

Atingiram-se valores máximos (próximos ao estequiométrico) para o fator de rendimento Y _{P/S} nos tempos de residência de 4 horas e 3 horas. O valor deste parâmetro foi reduzido (0,3 g.g⁻¹) para o menor tempo de residência (2 horas). Os elevados valores para o fator de rendimento de substrato em produto seguramente foram devidos à operação do biorreator contínuo com altas densidades celulares, resultando em conversões praticamente estequiométricas.

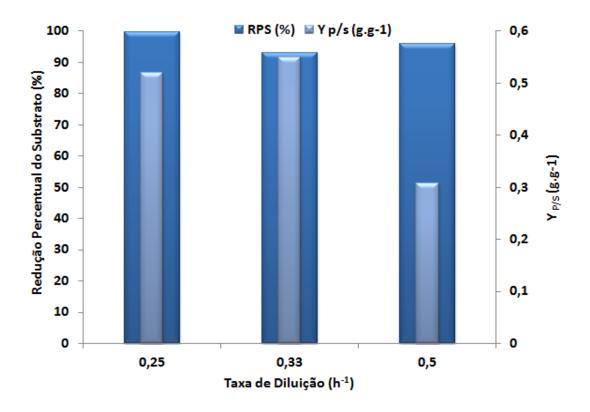


Figura 5.17 – Redução percentual de substrato e fator de rendimento Y _{P/S} em função das taxas de diluição aplicadas ao biorreator contínuo

O comportamento da biomassa desprendida é apresentado na figura 5.18, de acordo com as taxas de diluição empregadas. De modo geral, a concentração de células desprendidas foi baixa, com exceção para o tempo compreendido entre 32 e 36 horas, fato este referente ao entupimento relatado anteriormente durante a segunda taxa de diluição aplicada (D = 0,33 h⁻¹), em que foi necessário aumentar a vazão para contornar o inconveniente ocasionado. O aumento da vazão acarretou, consequentemente, o arraste de células livres, que foi normalizado com a nova vazão estabelecida.

O gráfico da figura 5.18 permite traçar conclusões acerca da influência da taxa de diluição e da utilização de células imobilizadas. A aplicação de uma taxa de diluição de 0,5 h⁻¹ é considerada alta por Bouallagui et al. (2013), capaz de causar arraste de células livres. Tais autores prosseguem, nesse sentido, relatando Taherzedeh (2008), que conduzem à discussão da influência da taxa de diluição sobre a concentração de células desprendidas, afirmando que a fermentação contínua de hidrolisados fermentados por leveduras pode resultar em sucesso a partir de taxas de diluição de 0,1 h⁻¹, porém, taxas a partir de 0,2 h⁻¹ ou maiores podem comprometer o desempenho do experimento, em termos do desprendimento celular.

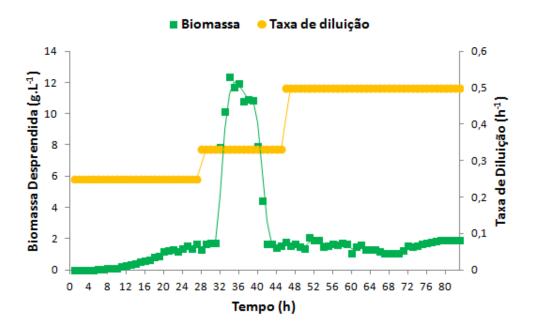


Figura 5.18– Biomassa desprendida (células livres) de acordo com as taxas de diluição empregadas no biorreator de leito fixo

A operação de biorreatores no modo contínuo com células imobilizadas interfere na taxa específica de crescimento das células, muda a fisiologia celular devido ao microambiente físico-químico ao redor da célula, e reduz os efeitos inibitórios de produto, substrato ou ambos. A combinação de efeitos desses fatores interfere na eficiência do sistema e aumentam a produtividade (TYAGI et al., 1992).

A questão da imobilização do agente fermentativo traz à discussão o tipo de suporte escolhido e sua influência exercida sobre a biomassa desprendida e eficiência do sistema. Tyagi et al. (1992) realizaram um estudo comparativo com leveduras imobilizadas em palha, bagaço ativado e alginato de cálcio, investigando parâmetros que devem ser considerados na escolha do suporte, como a atividade metabólica e fisiológica. Os resultados revelaram que a imobilização com alginato de cálcio estava relacionada com a menor taxa metabólica e fisiológica apresentada das três formas de imobilização, confirmando a limitação difusional de nutrientes e gases do metabolismo para o meio. No entanto, como visto neste trabalho nos experimentos em batelada simples, a difusão do produto também sofre a mesma limitação e, por isso os experimentos podem resultar em concentrações de etanol menores, quando na verdade o produto gerado ainda se encontra dentro da esfera. A imobilização de leveduras em alginato de cálcio para a fermentação de hidrolisado de grãos de sorgo sacarino pode ser considerada eficaz frente aos resultados aqui obtidos.

Capítulo 6. Conclusões e Sugestões para Trabalhos Futuros

Com a finalização dos experimentos, reúnem-se, neste capítulo, as principais conclusões obtidas, juntamente com sugestões para trabalhos futuros, apontando possíveis ajustes nos processos e propostas de investigação. Logo, os resultados obtidos com os experimentos propostos neste trabalho permitem concluir que:

1. O processo de hidrólise enzimática dos grãos de sorgo gerou uma concentração elevada de açúcares redutores (≅ 245 g.L⁻¹), obtida com as seguintes condições de processo: grãos cominuídos com um diâmetro de partícula de 0,5 mm; carga de α-amilase de 20 μL.g⁻¹ grão e de glucoamilase de 40 μL.g⁻¹ grão e relação sólido:líquido de 1:3 g. mL⁻¹, atingindo uma eficiência de hidrólise de, aproximadamente, 98%;

- 2. Ensaios de imobilização celular permitiram eleger a melhor concentração de alginato de sódio de 2% (m/v), que resultou em esferas biocatalítcas de 4,0 mm de diâmetro médio, resistentes o suficiente e com estabilidade adequada para uso em processos fermentativos;
- 3. A porosidade, entendida aqui por **tamanho dos poros**, das esferas biocatalíticas foi também evidenciada por meio de microscopia eletrônica de varredura, na qual foram determinadas dimensões na matriz de alginato de cálcio, que variaram entre **1,89 μm** a **3,79 μm**. Isto permitiu constatar que o tamanho dos poros era suficientemente grande para possibilitar a livre difusão de glicose e etanol, que apresentam tamanhos moleculares de 7,2 Å e 4,5 Å, respectivamente;
- 4. O desempenho da linhagem *S. cerevisiae* JP1 foi avaliado em frascos agitados e em meio sintético, e comparado com uma linhagem de levedura de panificação, ambas imobilizadas em alginato de cálcio. Em condições padronizadas (concentração inicial de glicose de 160 g.L⁻¹ e número total de células de 4,8.10¹³ no meio de fermentação), os resultados mostraram a superioridade da linhagem JP1, que produziu etanol em uma concentração de 68 g.L⁻¹, correspondendo a um fator de rendimento, Y _{P/S}, de 0,42 g.g⁻¹ (EF: 83%), ao longo de 10 horas de fermentação. Adicionalmente, a linhagem foi capaz de consumir quase que integralmente a glicose disponibilizada (R%≅97%), contrastando com a levedura de panificação (R%≅87%);
- 5. A fermentabilidade do hidrolisado amiláceo de grãos de sorgo sacarino foi avaliada em fermentômetro com a levedura *S. cerevisiae* (JP1) imobilizada em alginato de sódio 2% (m/v). Os melhores resultados foram obtidos com o uso do hidrolisado diluído sem suplementação, com uma concentração inicial de glicose de 180 g.L⁻¹. Ainda que com uma eficiência de fermentação de, aproximadamente, 75% (Y_{P/S} de 0,37 g.g⁻¹), produziuse uma concentração de etanol de 68 g.L⁻¹, em apenas 9 horas de processo, correspondendo a um valor de produtividade volumétrica de 7,5 g.L⁻¹.h⁻¹;
- 6. A reutilização das esferas biocatalíticas, contendo a linhagem da levedura *S. cerevisiae* JP1 em **meio hidrolisado de sorgo sacarino diluído sem suplementação de nutrientes** e com uma concentração inicial de **glicose** de, aproximadamente, **180 g.L⁻¹**, gerou um aproveitamento da levedura imobilizada por **10 ciclos consecutivos**, sem que o desempenho do processo fosse comprometido. Estes ensaios resultaram em uma concentração média de etanol de **85 g.L⁻¹** durante os 10 ciclos e em um valor médio do fator de rendimento, **Y**_{P/S}, de até **0,470 g.g⁻¹**, o que corresponde a uma eficiência de fermentação de **92%**;

- 7. A adoção da batelada alimentada por pulsos na propagação de células da linhagem JP1 permitiu que a concentração celular aumentasse consideravelmente. Após uma primeira batelada simples que resultou na concentração de células de 6,5 g.L⁻¹, duas alimentações com meio sintético contendo glicose (700 g.L⁻¹) foram realizadas, o que levou a um aumento da concentração celular de, aproximadamente, 3 vezes. Esta estratégia se mostrou importante já que a imobilização da levedura demandava altas densidades celulares:
- 8. A operação contínua de um biorreator de leito fixo, com volume nominal de 1,05 litros, recheado com células de uma linhagem de levedura industrial, *S. cerevisiae* JPI, apresentou resultados altamente promissores. O biorreator foi alimentado com meio hidrolisado enzimático de grãos de sorgo sacarino, com uma concentração inicial de glicose de 130 g.L⁻¹, tendo operado por aproximadamente 80 horas em uma temperatura controlada em 35°C. Foi possível estimar a ocorrência de três estados estacionários, obtidos com as seguintes taxas de diluição (D): 0,25 h⁻¹; 0,33 h⁻¹ e 0,5 h⁻¹. As principais variáveis operacionais relacionadas às condições do meio reacional foram: 1.075 esferas biocatalíticas, contendo 16,2. 10¹⁰ células/esfera e com uma porosidade do leito de 0,42.
- 9. Os valores das concentrações de glicose (g.L⁻¹) nos três estados estacionários foram: 0,6 (D=0,25 h⁻¹), 9,1 (D=0,33 h⁻¹) e 10,0 (D=0,5 h⁻¹) e, as de etanol (g.L⁻¹), 68,3 (D=0,25 h⁻¹), 67,0 (D=0,33 h⁻¹) e 37,0 (D=0,5 h⁻¹). Estes valores permitiram caracterizar a operação contínua do biorreator, o que levou a estimar uma produtividade volumétrica máxima em etanol de 23,5 g.L⁻¹.h⁻¹, atingida em uma taxa de diluição de aproximadamente 0,4 h⁻¹, ou seja correspondente a um tempo de residência de apenas 2,5 horas. Estes valores são expressivamente elevados quando comparados àqueles obtidos na prática industrial com a fermentação de caldo de cana, cujos valores de produtividade em etanol situam-se na faixa de 5-8 g.L⁻¹.h⁻¹. No tocante ao fator de rendimento em etanol por substrato consumido, verificou-se que para as duas primeiras taxas de diluição aplicadas a conversão foi praticamente estequiométrica, decaindo para a maior taxa de diluição.

Sugestões:

Visando continuar com as pesquisas científicas focadas na utilização de matérias-primas renováveis que ainda não tiveram o seu potencial adequadamente explorado, como é o caso do sorgo sacarino, bem como no desenvolvimento de novas técnicas para o processamento

destas matérias-primas para a produção de etanol e de outras substâncias químicas de interesse industrial, elencam-se as seguintes sugestões para trabalhos futuros:

- Investigar uma nova forma de esterilização do hidrolisado enzimático para uso em processos fermentativos que demandem grau de esterilidade, a fim de se evitar a formação de um precipitado de difícil separação e que torna o meio inadequado para uso em processos fermentativos, principalmente, para a operação contínua;
- Aprimorar a técnica de imobilização por envolvimento em alginato de cálcio, principalmente, no que se refere à integridade das esferas biocatalíticas, avaliando, por exemplo, o uso de sais contendo cátions trivalentes, como o alumínio, em conjunto com o cálcio (bivalente);
- 3. Avaliar a estabilidade do sistema contínuo com uma taxa de diluição determinada por um maior tempo de operação.
- 4. Buscar formas para contornar os problemas de entupimento, observados com o meio hidrolisado utilizado no presente estudo. O acúmulo de material coloidal no corpo do biorreator levava a bloqueios no fluxo ascendente de meio e à alteração na vazão de alimentação, aumentando consequentemente a perda de carga. Acreditamos, que isto se deva fundamentalmente à elevada concentração de proteínas existentes neste meio, oriundas da própria matéria-prima e das enzimas utilizadas no processo de hidrólise do amido, bem como do rompimento das esferas ocasionado pelo forte desprendimento gasoso, que também lançava no meio substância de natureza coloidal.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALHADEFF, E. M. Fermentação alcoólica com células de leveduras imobilizadas em alginato de cálcio. 1984. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Bioquímicos) Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.
- AOAC ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 12. ed. Washington, 1975, p. 1994.
- BARCELOS, C. A. & PEREIRA JR., N. **Hidrólise enzimática de material amiláceo e avaliação da fermentabilidade do hidrolisado**. 2010. 32p. Apostila (Programa de Pós-Graduação Multi-Institucional em Biotecnologia) Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2010.
- BARCELOS, C. A.; MAEDA, R. N.; BETANCUR, G. J. V.; PEREIRA JR, N. Ethanol production from sorghum grains [*Sorghum bicolor* (L.) Moench]: evaluation of the enzymatic hydrolysis and the hidrolysate fermentability. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, n. 04, v. 28, p. 597-604, 2011.
- BARCELOS, C. A. Aproveitamento das frações sacarínea, amilácea e lignocelulósica do sorgo sacarino [Sorghum bicolor (L.) Moench] para produção de bioetanol. 2012. 242p. Tese (Doutorado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.
- BERG, J. M.; TYMOCZKO, J. L.; STRYER, L. Bioquímica. Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 6ºEdição, p. 451, 2010.
- BERTOLDO, C. & ANTRANIKIAN, G. Starch-hydrolyzing enzymes from thermophilic archaea and bacteria. **Chemical Biology**, v. 6, p. 151-160, 2002.
- BON, E. P. S.; GÍRIO, F.; PEREIRA JR, N. Enzimas na Produção de Etanol. Editora Interciência Ltda, Rio de Janeiro, p. 241 271, 2008
- BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E. Biotecnologia Industrial, volume 1, fundamentos. Editora Bluccher, São Paulo, p. 184-186, 2001.
- BOUALLAGUI, H.; TOUHAMI, Y.; HANAFI, N.; GHARIANI, A.; HAMDI, M. Performances comparison between three technologies for continuous production from molasses. **Biomass and Bioenergy**, v. 48, p. 25-32, 2013.
- CANAVIALIS MONSANTO COMPANY. **Sorgo Sacarino**. 2012. Disponível em: http://www.canavialis.com.br/produtos/sorgo-sacarino/index.aspx . Acesso em: 13 maio de 2013.
- CANILHA, L.; CARVALHO, W.; ALMEIDA & SILVA, J.B. Biocatalisadores imobilizados: uso de células e enzimas imobilizadas em processos biotecnológicos. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, n. 36, p. 48-57, ano IX, 2006.

CARVALHO, S. M. S. **Desenvolvimento de bioprocesso para produção de etanol em meio melaço-vinhoto empregando leveduras imobilizadas**. 2006. 187p. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2006.

COOPER, G. M. The Cell: a Molecular Aprouach. Boston University, cap. 9, p. 565, 2005.

CORN PRODUCTS INTERNATIONAL. **A química do amido**. Corn Products Brasil, p. 1-10, 2005.

COVIZZI, L. G.; GIESE, E. C.; GOMES, E.; DEKKER, R. F. H.; SILVA, R. Imobilização de células microbianas e suas aplicações biotecnológicas. **Semina:** Ciências Exatas e Tecnológicas. Londrina, v. 28, n. 2, p. 143-160, 2007.

CUNHA, P. L. R. Polissacarídeos na biodiversidade brasileira: uma oportunidade de transformar conhecimento em valor econômico. **Química Nova**, v.32, n. 3, p. 649-660, 2009.

DIPAP – Diretoria de Pesquisa e Desenvolvimento Rural. **Aspectos gerais do cultivo de sorgo para o semiárido alagoano.** 2010. 5p. Disponível em: http://agricultura.al.gov.br/informativo/SORGO%20DIPAP-2010.pdf/view. Acesso em: 02 junho de 2013.

DURAN, P.M.; BAILEY, J.E. Effects of immobilization on growth, fermentation properties and macromolecular compositions of Saccharomyces cerevisiae attached to gelatin. Biotechnology and Bioengineering, v.28, p.73-87, 1986.

EMBRAPA MILHO E SORGO. (2008). **Sistemas de Produção, 2. Cultivo do sorgo** – Plantio. ISSN 1679-012X. Versão Eletrônica - 4° edição. Set. 2008. Disponível em: http://www.cnpms.embrapa.br/publicacoes/sorgo/plantio.htm. Acesso em: 15/08/2012.

GARCIA-CRUZ, C. H.; FOGGETTI, U.; DA SILVA, A. N. Alginato bacteriano: aspectos tecnológicos, características e produção. **Química Nova**, v.31, n.7, p. 1800-1806, 2008.

GUEDES, R. S.; COSTA, F.H.S.; PEREIRA, J. E. S. Características físicas e nutricionais da matriz de encapsulamento na produção de sementes sintéticas de pimenta longa (*Piper hispidinervum* C. DC.). **R. Árvore**, Viçosa, MG, v. 31, n. 06, p. 1005 – 1011, 2007.

GUISELEY, K. B. Chemical and physical properties of algal polysaccharides used for cell immobilization. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 11, p. 706-716, 1989.

HANNOUN, B.J.M.; STEPHANOPOULOS, G. Diffusion coefficients of glucose and ethanol in cell-free and cell-occupied calcium alginate membranes. **Biotechnol. Bioeng**, v. 28, p. 829-835.

- IPA INSTITUTO AGRONÔMICO DE PERNAMBUCO. Publicações e folhetos informativos. Disponível em: http://www.ipa.br/resp3.php. Acesso em: 01/09/2012.
- JIN, H.; LIU, R.; HE, Y. Kinetics of batch fermentations for ethanol production with immobilized *Saccharomyces cerevisiae* growing on sweet sorghum stalk juice. **Procedia Environmental Sciences**, v. 12, p. 137 145, 2012.
- KASHIMA, K.; IMAI, M. Impact factors to regulate mass transfer characteristics of stable alginate membrane performed superior sensitivity on various organic chemicals. **Procedia Engineering**, v. 42, p. 964 977, 2012.
- KOBLITZ, M. G. B. Bioquímica de Alimentos: Teoria e Aplicações Práticas. Editora Guanabara, São Paulo, p. 22-34, 2008.
- KOSSEVA, M. R. Immobilization of Microbial cells in food fermentation process. **Food Bioprocess Technol**, 2010.
- LIU, R.; LI, J.; SHEN, F. Refining bioethanol from stalk juice of sweet sorghum by immobilized yeast fermentation. **Renewable Energy**, v. 33, 1130 1135 p., 2008.
- LORENZ, J. G. Comparação dos métodos de emulsificação e *spray drying* na microencapsulação de *Lactobacillus Acidophilus* (LA-5) e aplicação em sorvete. 2009. 74p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) Universidade Federal de Santa Catarina, Santa Catarina, 2009.
- MILER, I. J. Alginate composition of some New Zealand brown seaweeds. **Phytochemistry**, v. 41, n. 5, 1315 1317 p., 1995.
- NAJAFPOUR, G.; YOUNESI, H.; KU ISMAIL, K. S. Ethanol fermentation in an immobilized cell reactor using *Saccharomyces cerevisiae*. **Bioresource Technology**, v. 92, p. 251-260, 2004.
- NÚÑEZ, M. J.; LEMA, J. M. Cell immobilization: application to alcohol production. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 9, p. 642-651, 1987.
- PAZIANI, S. F.; DUARTE, A. P. (2006). **Avaliação de cultivares de milho e sorgo para** silagem. Disponível em: http://www.aptaregional.sp.gov.br/artigo.php?id artigo=444. Acesso: 12/08/2012.
- PEREIRA JR., N. **Seleção de leveduras para a fermentação alcoólica**. 1982. 111p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1982.
- PEREIRA JR., N. (1991). **Investigation of D-xylose fermenting yeast**. Ph.D. Thesis. Department of Chemistry. The University of Manchester, U.K., 1991.

PEREIRA JR., N.; N & BON, E. P. S. **Tecnologia enzimática**. Rio de Janeiro, 109 p, 1999.

PEREIRA JR., N.; BON, E. P. S.; FERRARA, M. A. (2008a). Tecnologia de Bioprocessos. Séries em Biotecnologia. Biblioteca Nacional: Rio de Janeiro, v. I, 2008. 62p.

PIACENTE, E. A. Perspectivas do Brasil no mercado internacional de etanol. 2006. 57p. Dissertação (Mestrado em Planejamento de Sistemas Energéticos) – Faculdade de Engenharia Mecânica, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.

PORTAL BRASIL. **Energia-Biocombustíveis**. Disponível em: http://www.brasil.gov.br/sobre/economia/energia/matriz-energetica/biocombustiveis.
Acesso em: 31 maio de 2013.

RODRIGUES, J. A. R. Do engenho à biorrefinaria. A usina de açúcar como empreendimento industrial para a geração de produtos bioquímicos e biocombustíveis. **Química Nova**, v.34, n.7, p.1242-1254, 2011.

SANCHEZ, E. N. **Desempenho de um biorreator com levedura imobilizada na fermentação alcoólica contínua de meio melaço-vinhoto.** 1995. 95p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Bioquímicos) — Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1995.

SMIDISRØD, O.; SKJÅK-BRAED, G. Alginate as immobilization matrix for cells. **TIBTECH**, v. 8, p. 71-78, 1990.

TEIXEIRA, C. G.; FERREIRA, C. U.; SCHAFFERT, R. C.; RODRIGUES-AMAYA, D. B.; GODOY, H. T. **Produção de álcool etílico de colmos de sorgo sacarino em microdestilaria.** p.128-149, 1986.

TEIXEIRA, V. F. T. Estudo da obtenção de biocatalisadores com matrizes de alginato de cálcio visando a produção de biodiesel. 2011. 80p. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) — Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos dos Goitacazes, Rio de Janeiro, 2011.

THU, B.; SMIDISRØD, G.; SKJÅK-BRAED, G. Alginate gels - Some structure-function correlations relevant to their use as immobilization matrix for cells. **Immobilized Cells: Basics and Applications**, p. 19-30, 1996.

TYAGI, R. D.; GUPTA, S. K.; CHAND, S. Process engineering studies on continuous ethanol production by immobilized *S. cerevisiae*. **Process Biochemistry**, v. 27, p. 23-32, 1992.

WALSH, P. Q.; ISDELL, F. V.; NOONE, S. M.; O'DONOVAN, M. G.; MALONE, D. M. Growth patterns of Saccharomyces cerevisiae microcolonies in alginate and carrageenan gel particles: Effect of physical and chemical properties of gel. **Enzyme and Microbial Technology,** v. 18, p. 366-372, 1996.

WU, X.; ZHAO, R.; BEAN, S. R.; SEIB, P. A.; MCLAREN, J. S.; MADL, R. L.; TUINSTRA, M.; LENZ, M. C.; WANG, D. Factors impacting ethanol production from grain sorghum in the dry-grind process. **Cereal Chemistry**, v.84, p.130-136, 2007.

YU, J.; ZHANG, T.; ZONGH, J.; ZHANG, X.; TAN, T. Biorefinary of sweet sorghum stem. **Biotechnologies Advances**, v. 30, p. 811-816, 2012.