

UTILIZAÇÃO DE UM PLANEJAMENTO COMPOSTO CENTRAL PARA A OBTENÇÃO DAS MELHORES CONDIÇÕES DE TEMPERATURA, pH E CONCENTRAÇÃO DE GLICOSE PARA A PRODUÇÃO DE ETANOL UTILIZANDO A LEVEDURA *Pachysolen tannophilus*.

A. F. KLAFKE, A. V. MORCELLI, M. A. Z. AYUB

Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Departamento de Engenharia Química
E-mail para contato: andrefk@enq.ufrgs.br

RESUMO – Neste trabalho foram estudadas a dinâmica de crescimento e a produção de etanol a partir de glicose pela levedura *Pachysolen tannophilus* ATCC-32691. A velocidade de crescimento celular máxima ($\mu_{\text{máx}}$) foi calculada através da curva de crescimento e equivale a $0,34 \text{ h}^{-1}$. Cultivos foram realizados em diferentes condições de temperatura, pH e concentração de glicose com o objetivo de se obter a melhor condição para a conversão da glicose a etanol através de um planejamento composto central. Obteve-se um modelo quadrático para a conversão de glicose a etanol, o qual foi validado por experimento em triplicata nas condições ótimas obtidas de $33,6 \text{ }^{\circ}\text{C}$, pH igual a 4,37 e concentração de glicose igual a $42,3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, que geraram um $Y_{\text{Etanol}} = 0,47 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$.

1. INTRODUÇÃO

Bioetanol é considerado o combustível alternativo renovável com o maior potencial para substituir combustíveis fósseis, com uma produção mundial de mais de 100 milhões de m^3 em 2012 (Renewable Fuels Association, 2013a), e com um potencial para uma significativa redução de emissões de gases do efeito de estufa (Dias et al., 2013).

A levedura *Pachysolen tannophilus* pode fermentar alguns açúcares a etanol, sendo a primeira levedura identificada que tem uma capacidade significativa de converter xilose em etanol (Slininger et al., 1982; Schneider et al., 1981).

Neste trabalho foram estudadas a dinâmica de crescimento celular e de formação de metabólitos da levedura *P. tannophilus*, sendo realizado planejamento composto central a fim de avaliar as condições ótimas de temperatura, pH e concentração de glicose para a fermentação de glicose a etanol, sob condição de microaerofilia em escala de frasco.

2. MATERIAS E MÉTODOS

2.1. Manutenção do microrganismo e preparo de inóculo

O microrganismo utilizado nessa pesquisa foi a *P. tannophilus* ATCC-32691. Estoques dessa levedura são mantidos na Coleção de Culturas Microbiológicas do Bioteclab (UFRGS,

Brasil). As culturas foram mantidas em tubos de Eppendorf contendo meio YMA (composto por 3 g·L⁻¹ de extrato de levedura, 3 g·L⁻¹ de extrato de malte, 5 g·L⁻¹ de peptona bacteriológica e 10 g·L⁻¹ de glicose), estocadas a -80°C, com subculturas sendo feitas em placas de Petri. Os pré-inóculos foram preparados retirando alçadas de células das placas de Petri, transferindo-as a frascos de Erlenmeyer de 500 mL com 200 mL de meio YPD, permitindo crescimento em incubadoras de agitação orbital a 200 rpm e 30°C por 12h (*overnight*). Os inóculos foram preparados a partir da transferência de 5 mL dos pré-inóculos para novos frascos de Erlenmeyer de 500 mL com 200 mL de meio YPD, incubando-os a 200 rpm e 30°C até que os inóculos atingissem a densidade ótica (DO) alvo de 1,0 lida a $\lambda = 600$ nm. Este procedimento foi utilizado como padrão para o inóculo de todos os experimentos.

2.2. Planejamento de experimentos

Um delineamento composto central (DOE) de três variáveis foi realizado a fim de obter as condições ótimas para conversão de glicose a etanol. As variáveis e seus valores codificados e não-codificados são apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1 – Variáveis testadas e seus níveis no planejamento composto central.

Variáveis	Nome	Variáveis codificadas				
		-1,68	-1	0	1	1,68
X ₁	Temperatura (°C)	23,6	27,0	32,0	37,0	40,4
X ₂	pH	3,63	5,0	7,0	9,0	10,36
X ₃	Concentração de glicose no meio de cultivo (g/L)	6,36	20,0	40,0	60,0	73,63

A Tabela 2 apresenta os 17 tratamentos obtidos para as três variáveis, cada uma a cinco níveis. O delineamento constituiu-se de oito pontos fatoriais, seis pontos axiais (dois pontos axiais no eixo da variável) e uma triplicata do ponto central. A equação polinomial de segunda-ordem para as variáveis é dada:

$$Y = \beta_0 + \sum \beta_i X_i + \sum \beta_{ij} X_i X_j + \sum \beta_{ii} X_i^2 \quad (1)$$

onde Y é a variável de resposta, β_0 a constante, β_i , β_{ii} e β_{ij} são os coeficientes para o efeito linear, quadrático e de interação entre variáveis, respectivamente, e X_i e X_j o nível codificado das variáveis x_i e x_j , respectivamente. A equação quadrática acima foi utilizada para plotar as superfícies de todas as variáveis.

2.3. Métodos analíticos

As amostras das culturas foram preparadas por centrifugação a 3000·g durante 15 min para sedimentar as células, seguido por filtração utilizando filtros de membrana de acetato de

Tabela 2 – Delineamento experimental e resultados do Planejamento Composto Central.

Tratamento	X ₁	X ₂	X ₃	Y _{Etanol} (g·g ⁻¹)
1	-1,00	-1,00	-1,00	0,44
2	-1,00	-1,00	1,00	0,47
3	-1,00	1,00	-1,00	0,38
4	-1,00	1,00	1,00	0,49
5	1,00	-1,00	-1,00	0,46
6	1,00	-1,00	1,00	0,48
7	1,00	1,00	-1,00	0,42
8	1,00	1,00	1,00	0,40
9	-1,68	0,00	0,00	0,39
10	1,68	0,00	0,00	0,42
11	0,00	-1,68	0,00	0,51
12	0,00	1,68	0,00	0,33
13	0,00	0,00	-1,68	0,35
14	0,00	0,00	1,68	0,43
15	0,00	0,00	0,00	0,50
16	0,00	0,00	0,00	0,50
17	0,00	0,00	0,00	0,46

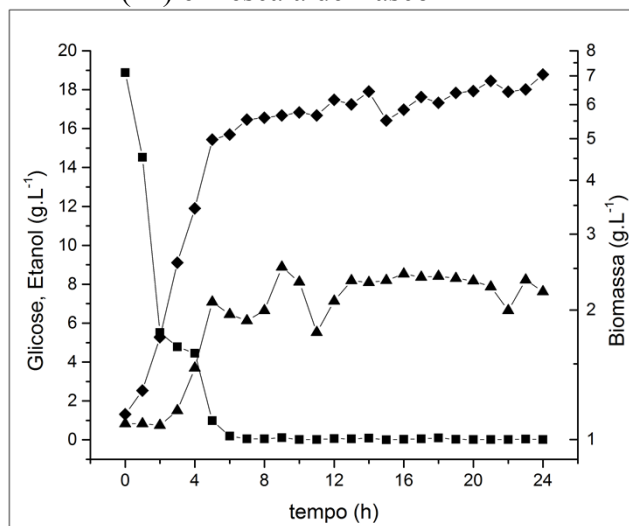
celulose (tamanho do poro de 0,45 µm; Sartorius, Alemanha). A composição do sobrenadante das culturas foi analisada utilizando HPLC (Shimadzu Corp.). A fase estacionária e a fase móvel utilizadas foram uma coluna Aminex HPX-87H (300×7.8 mm, Bio-Rad, USA) e uma solução 0,005 mol·L⁻¹ de H₂SO₄, respectivamente. As condições utilizadas foram 0,8 mL·min⁻¹ de vazão da fase móvel e 65°C. A concentração de biomassa foi estimada através do método de peso seco. Todas as amostras recolhidas para análise das experiências foram realizadas em duplicata.

3. RESULTADOS

3.1. Cinética de crescimento e formação de metabólitos

Foram feitos experimentos de acompanhamento do crescimento de biomassa e produção de metabólitos pela levedura *P. tannophilus*, utilizando glicose como fonte de carbono. Os resultados deste acompanhamento são mostrados na Figura 1. Neste experimento observou-se uma produção de biomassa igual a 7,05 g·L⁻¹ ao final de 24h e uma concentração máxima de etanol de 8,53 g·L⁻¹ após 16h de cultivo. O consumo de glicose foi quase total ao final das 24h de experimento. Em adição, houve produção de ácido acético e ácido láctico, porém, em níveis baixos, com concentrações máximas de 0,72 g·L⁻¹ e 0,82 g·L⁻¹, respectivamente. A velocidade específica de crescimento máxima ($\mu_{\text{máx}}$) foi calculada a partir dos dados da curva de crescimento e equivale a 0,34 h⁻¹ (R² = 0,998).

Figura 1 – Cinética de crescimento de biomassa (◆) e formação de glicose (■) e etanol (▲) em escala de frasco



3.2. Planejamento composto central

A análise estatística dos dados obtidos no planejamento composto central (Tabela 2) levou à exclusão do efeito linear da temperatura (X_1) bem como os efeitos de interação entre temperatura e pH (X_1X_2) e entre pH e concentração de glicose (X_2X_3), uma vez que apresentaram valor de p calculado consideravelmente superior ao intervalo de confiança de 10%. A tabela ANOVA resultante é apresentada abaixo.

Segundo a Tabela 3, mostraram-se significativas as contribuições linear e quadrática da concentração de glicose e a contribuição linear do pH. Dessa forma, obteve-se a equação representativa do modelo obtido para a conversão de glicose a etanol:

$$Y = 0,484 - 0,068 * X_2 + 0,039 * X_3 - 0,049 * X_3^2 \quad (2)$$

O modelo apresentou coeficiente de regressão múltipla $R^2 = 0,7$ e sua significância foi comprovada pelo teste F-Fischer ($F_{\text{calculado}} = 3,77 > F_{\text{tabelado}} = 3,21$). A Figura 2 apresenta superfície de resposta para uma temperatura fixada em 32 °C.

Através do modelo quadrático foram obtidos os valores críticos de temperatura, pH e concentração de glicose exibidos na Tabela 4. Para tais valores, a conversão de glicose a etanol prevista pelo modelo é de 0,51.

Validação do planejamento composto central: foi realizado um experimento de validação do modelo obtido de forma análoga aos demais experimentos, que constituiu-se de cultivo em triplicata do microrganismo testado nas condições ótimas obtidas pelo modelo quadrático. Observou-se uma média de conversão de glicose a etanol (Y_{Etanol}) de 0,47, com desvio padrão de 0,015. Em comparação ao valor previsto pelo modelo para tal variável nas condições ótimas, de $Y_{\text{Etanol}} = 0,51$, a diferença observada consiste em um erro de 7,98%. Desta forma, considera-se o modelo satisfatório.

Tabela 3 – Análise estatística do planejamento composto central realizado (avaliada a intervalo de confiança de 10%).

Variável	Efeito	p
Efeitos Lineares		
X_2	-0,068	0,007
X_3	0,039	0,087
Efeitos Quadráticos		
X_1	-0,038	0,124
X_2	-0,028	0,245
X_3	-0,049	0,051
Interações		
X_1X_3	-0,036	0,212

Tabela 4 – Valores críticos do modelo quadrático obtido (resposta prevista, $Y_{\text{Etanol}} = 0,51$)

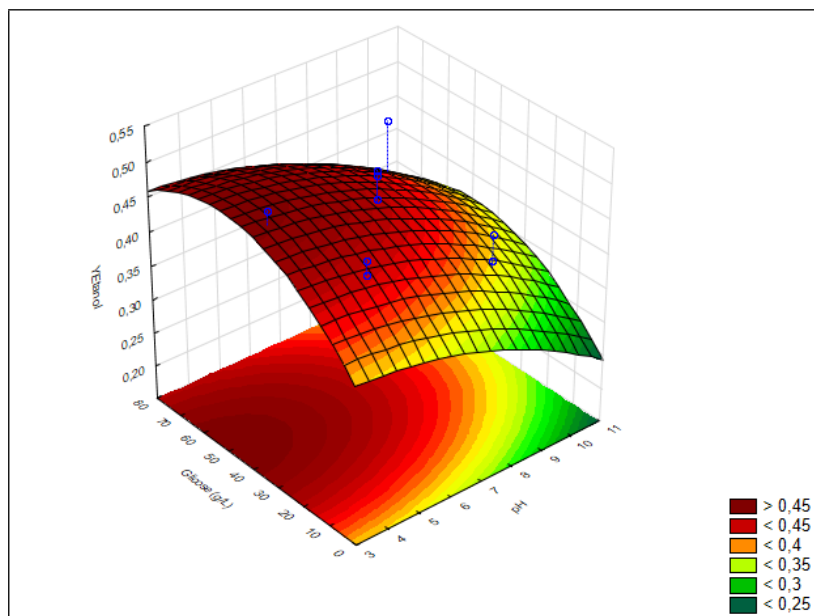
Variável	Valor codificado	Valor Real
Temperatura	0,325	33,6
pH	-1,315	4,37
Glicose (g.L^{-1})	0,113	42,3

triplicata do microrganismo testado nas condições ótimas obtidas pelo modelo quadrático. Observou-se uma média de conversão de glicose a etanol (Y_{Etanol}) de 0,47, com desvio padrão de 0,015. Em comparação ao valor previsto pelo modelo para tal variável nas condições ótimas, de $Y_{\text{Etanol}} = 0,51$, a diferença observada consiste em um erro de 7,98%. Desta forma, considera-se o modelo satisfatório.

4. CONCLUSÃO

O acompanhamento da cinética de crescimento da levedura mostrou que a glicose consumida foi direcionada, principalmente, para crescimento celular e produção de etanol, e

Figura 2 – Superfície de resposta para a conversão de glicose a etanol em função da variação de pH e da concentração de glicose a temperatura fixa de 32 °C



possibilitou o cálculo da velocidade específica de crescimento máxima ($\mu_{\text{máx}} = 0,34 \text{ h}^{-1}$). A partir do planejamento composto central foi possível obter um modelo para as condições ótimas para a conversão de glicose a etanol, sendo essas 33,6 °C, pH igual a 4,37 e concentração de glicose igual a 42,3 g·L⁻¹. O modelo foi validado por experimento em triplicata, uma vez que apresentou erro inferior a 10%. Assim, foi mostrado que a levedura *P. tannophilus* ATCC-32691 é capaz de fermentar glicose a etanol sob condições de microaerofilia de maneira eficiente e em condições brandas. A continuidade do presente estudo consiste no escalonamento de processo para o qual se sugere a condução de experimentos em escala de biorreator de bancada, a fim de avaliar os melhores parâmetros de aeração para reproduzir as condições de microaerofilia obtidas em escala de frasco. Observa-se potencial para aumento da conversão a etanol mediante a utilização de outros modos de operação, sobretudo o de batelada alimentada.

5. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

DIAS, M. O. S. et al. *Evaluation of process configurations for second generation integrated with first generation bioethanol production from sugarcane*. Fuel Processing Technology, v. 109, n. 0, p. 84–89, 2013.

RENEWABLE FUELS ASSOCIATION. World fuel ethanol production. Disponível em: <<http://ethanolrfa.org/pages/World-Fuel-Ethanol-Production>>, acessado em 27/02/2015.

SCHNEIDER, H. et al. *Conversion of D-xylose into ethanol by the yeast Pachysolen tannophilus*. Biotechnology Letters, v. 3, n. 2, p. 89–92, 1981.

SLININGER, P. J. et al. *Conversion of D-xylose to ethanol by the yeast Pachysolen tannophilus*. Biotechnology and Bioengineering, v. 24, n. 2, p. 371–384, 1982.