

Supervisores:

Prof. Dr. Carlos Eduardo Vaz Rossell – PIN – CTBE

Dr. Elmer Alberto Ccopa Rivera – PAT – CTBE

Eng. Celina Kiyomi Yamakawa – PIN - CTBE

Título do projeto de iniciação científica:

Investigação da adaptabilidade da levedura *Saccharomyces cerevisiae* aos inibidores do pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar.

Resumo: No processo de produção de etanol a partir de material lignocelulósico há formação de subprodutos de efeito inibitório aos micro-organismos na etapa de conversão de açúcares a etanol. Os principais subprodutos inibidores são ácido acético, furfural e hidroximetilfurfural (HMF). Segundo Taherzadeh (1999) os dois principais inibidores furanos citados são formados pela decomposição de pentoses e hexose devido à desidratação por catálise ácida durante a etapa de pré-tratamento e sua formação depende da temperatura e da concentração de ácidos empregados. O ácido acético é formado durante a hidrólise do grupo acetil da hemicelulose, segundo Lawford e Rousseau (1993), citado por Taherzadeh (1999). Os principais efeitos inibitórios produzidos pelo furfural (ROSSELL, 2006) nas leveduras são: diminuição da taxa específica de crescimento; diminuição da produtividade volumétrica ou específica de etanol; e redução de síntese de biomassa.

A justificativa do projeto é a necessidade de analisar a capacidade adaptativa do micro-organismo aos inibidores como ácido acético, furfural e hidroximetilfurfural em um quimiostato, que é essencialmente um biorreator contínuo controlado com limitação de substrato e sob condições de temperatura, pH, oxigênio dissolvido constantes. Esclarecendo-se a capacidade adaptativa do micro-organismo por meio da determinação da velocidade máxima específica e os fatores de conversão de substrato em células e produtos, será possível configurar o processo de fermentação alcoólica com licor hidrolisado celulósico de bagaço de cana-de-açúcar de forma a mitigar os efeitos inibitórios dos compostos gerados na etapa de pré-tratamento do material lignocelulósico. Esse projeto será desenvolvido no Laboratório de Desenvolvimento de Bioprocessos, especificadamente no Laboratório de Fermentação Alcoólica do CTBE. O projeto contribuirá para o desenvolvimento do processo de etanol de segunda geração a partir de bagaço de cana-de-açúcar.

O CTBE contribuirá na formação acadêmica da aluna de graduação de engenharia química da Unicamp através da aplicação prática de conhecimento de bioquímica industrial, reações bioquímicas, reatores contínuos e desenvolvimento experimental de pesquisa científica.

Objetivo principal: é investigar as faixas de concentração de furfural e ácido acético que as leveduras *Saccharomyces cerevisiae* são capazes de se adaptar ou tolerar, sem detrimento da taxa de manutenção celular e conversão a etanol.

Os demais objetivos são avaliar o efeito inibitório em frascos erlenmeyer para determinar a concentração inibitória; montagem do biorreator contínuo em um fermentador New Brunswick Bioflo 115 de 2 L; e avaliar comparativamente a cinética da levedura adaptada para a produção de etanol em composição similar ao licor de hidrólise a partir de bagaço de cana de açúcar.

Metodologia: Inicialmente o micro-organismo será repicado por meio da transferência de uma alçada de uma cultura estoque armazenado refrigerada em nitrogênio líquido, para um *slant* ou placas de cultivo contendo YPD ágar composto por 1,5% de ágar-ágar, 1,0% de levedura, 2,0% de peptona de caseína e 2,0% de glicose e será incubado em estufa bacteriológica a 33°C durante 48 horas. Em seguida, o micro-organismo será reativado em um meio líquido contendo 1,0% de levedura, 2,0% de peptona de caseína e 2,0% de glicose e será incubado em um incubador orbital a 250 rpm e 33°C por 24 horas. Em seguida esse inóculo será centrifugado em uma centrífuga de chão a 8.000 rpm durante 10 minutos. O sobrenadante será descartado e o inóculo resuspenso em água estéril. Em seguida o inóculo será transferido ao biorreator que contém um meio definido com 5,0 g/L de ureia, 0,003 g/ L de tiamina, 20,0 g/ L de glicose, 5,0 g/ L de KH₂PO₄, 1,0 g/ L de KCl, 1,0 g/ L CaCl₂.H₂O, 1,0 mL/ L de oligoelementos, 5,0 g/ L de extrato de levedura. Após um determinado período de tempo inicia-se a alimentação e retira de meio e produto, respectivamente na razão de taxa de diluição em torno de 0,1 h⁻¹. O meio alimentado conterá uma concentração conhecida do inibidor em estudo. Será mantido nessa configuração até aproximadamente 250 gerações e durante esse período haverá retiradas de amostras para avaliação microbiológica e para análise de açúcares, etanol, ácido acético, glicerol e furfural. Para a avaliação cinética de produção de etanol, será transferida uma alíquota do micro-organismo do biorreator para frascos Erlenmeyer com meio

contendo o inibidor em estudo e outro contendo meio sem inibidor e serão incubados em shaker orbital a 33°C e 150 rpm por 12 horas.

Em relação à cepa de levedura, será utilizada uma cepa de levedura da usina Santa Adélia gentilmente cedida pelo Laboratório de Engenharia Bioquímica da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Unicamp. Essa cepa de levedura tem sido repicada periodicamente e mantida refrigerada em nitrogênio líquido.

Durante os repiques serão realizadas análises em microscópio para verificar a presença e crescimento das leveduras por meio da coleta de uma alçada da colônia seguida de uma diluição prévia para ser transferida a uma lâmina. A determinação de células viáveis, brotamento e morte serão realizados pelo método de contagem em câmara de Neubauer e corante azul de metileno com o auxílio de um microscópio ótico. Para determinação da concentração celular por análise gravimétrica em que um volume conhecido será centrifugado por 3 minutos a 10.000 rpm, a fase líquida será descartada e a fase sólida contendo células será lavada com água Milli-Q e centrifugada por duas vezes, e em seguida as células serão secas em estufa a 80°C até obter massa constante. Os açúcares, ácidos, etanol, glicerol e furfural serão determinados por cromatografia líquida de alta eficiência.

Resultados esperados: Determinação de parâmetros cinéticos em função da variação do número de gerações do micro-organismo do processo desenvolvido no quimiostato e determinação dos fatores de conversão de substrato em produto nos testes de fermentação alcoólica em frascos Erlenmeyer. Espera-se que com esses dados concluir se há um processo adaptativo do micro-organismo aos inibidores avaliados.