

Fermentação contínua por *Zymomonas mobilis* ATCC 29191 em concentrações elevadas de sacarose

Fabiano Henrique Nunes Costa

Departamento de Genética e Melhoramento - UEL
86051-990 Londrina, PR

João Batista Buzato e Maria Antonia P. C. Celligoi

Departamento de Bioquímica - UEL
86051-990 Londrina, PR

Marcia Sadae Tano

Departamento de Microbiologia - UEL
86051-990 Londrina, PR

Recebido: 24 de abril de 2001

Resumo: Foi realizada a fermentação contínua de sacarose nas concentrações de 10 e 20 g% por *Z. mobilis* ATCC 29191. Em sacarose a 10 g%, a cultura atingiu o estado estacionário nas taxas de diluição (D) testadas. Em $D = 0,11, 0,21$ e $0,28 \text{ h}^{-1}$, a concentração de etanol foi respectivamente 38,1, 41,2 e 36,1 g/L, enquanto que a biomassa atingiu valores de 3,94, 4,75 e 4,10 g/L. Entretanto, em sacarose a 20 g% e $D = 0,11 \text{ h}^{-1}$, a cultura mostrou prolongado período de oscilação, caracterizando a impossibilidade, em atingir o estado estacionário.

Palavras-chave: fermentação contínua, *Z. mobilis*, etanol.

Abstract: Continuous fermentation of sucrose at 10 and 20 g% by *Z. mobilis* ATCC 29191 has been carried out. When sucrose at 10 g% was used, the culture reached steady state under dilution rates (D) tested. At $D = 0.11, 0.21$ and 0.28 h^{-1} , ethanol concentrations were, respectively, 38.1, 41.2 and 36.1 g/L, while biomass values were 3.94, 4.75 and 4.10 g/L. However, when sucrose at 20 g% was utilised and $D = 0,11 \text{ h}^{-1}$, prolonged period of oscillations was shown by the culture and steady state was not reached.

Key words: continuous fermentation, *Z. mobilis*, ethanol.

1 Introdução

Devido à exaustão de fontes de petróleo em futuro próximo, um considerável interesse é observado na busca de fontes alternativas e renováveis de energia, entre essas a produção de etanol por fermentação.

A bactéria *Zymomonas mobilis* fermenta açúcares pela via Entner-Doudoroff. Quando é comparada com *Saccharomyces cerevisiae*, a levedura responsável pela quase totalidade da produção de etanol apresenta absorção de açúcar e taxa de produção de etanol superiores, bem como elevada tolerância ao etanol. Contudo, a produção de biomassa é menor e utiliza apenas sacarose, glicose e frutose como substratos. Existe uma variedade de linhagens de *Zymomonas mobilis* com características fermentativas peculiares. Segundo Loss *et al.* (1994), *Zymomonas mobilis* ATCC 29191 é atualmente considerada promissora para a produção de sorbitol, devido à presença da enzima glucose-frutose oxidoreductase que converte glicose e frutose em sorbitol e ácido glicômico, quando o meio de cultivo apresenta elevada concentração de açúcar. Os trabalhos de Silveira *et al.* (1992) sobre produção de sorbitol, mostram que *Zymomonas mobilis* ATCC 29191, além de produzir sorbitol, mostrou ser também boa produtora de etanol. Mais recentemente, estudos com essa linhagem, conduzidos por Lawford e Rosseau (1998) na fermentação de glicose em ácido lático, a formação de etanol foi considerada elevada.

Este trabalho apresenta resultados de fermentação contínua de sacarose para a produção de etanol por *Zymomonas mobilis* ATCC 29191.

2 Materiais e métodos

Microorganismo: *Zymomonas mobilis* ATCC 29191 originalmente cedida pelo Dr. Maurício M. Silveira, do Centro de Desenvolvimento Biotecnológico de Joinville, SC, foi incubada em meio contendo sacarose 10 g%, extrato de levedura 1,0 g%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,1 g%, KH_2PO_4 0,2 g% e MgSO_4 0,05%. Após incubação por 30 horas, a cultura foi mantida a 4°C e reativada a cada 30 dias.

Preparação do inóculo: O inóculo foi preparado cultivando-se a bactéria a 28°C por 24 horas em meio contendo sacarose 10 ou 20 g%, extrato de levedura 1,0 g%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,1 g%, KH_2PO_4 0,2 g% e MgSO_4 0,05%.

Condução da fermentação: As fermentações foram realizadas em meio de sacarose nas concentrações de 10 e 20 g%, enriquecido com extrato de levedura e sais, conforme preparação do inóculo. *Zymomonas mobilis* ATCC 29191 foi inoculada, na proporção de 10%, no fermentador de 0,5 L de capacidade e 0,3 L de volume de trabalho, com agitação de aproximadamente 150 rpm e temperatura de 28°C. Após aproximadamente 6 horas, iniciou-se o fluxo contínuo de meio estéril. O fluxo contínuo de meio variou de acordo com as seguintes taxas de diluição (D) e vazão (mL/h), respectivamente: 0,11 e 33; 0,21 e 63; 0,28 e 76. O acompanhamento do processo foi feito por coletas de amostras para análise de biomassa (absorvância: 620 nm), etanol (cromatógrafo Shimadzu modelo CG 17A, coluna DBWAX, detector

FID e fase móvel gás Nitrogênio) e açúcares redutores totais (ART: segundo Somogyi e Nelson mas adaptado por Amorim *et al.* (AMORIN *et al.*1982)).

3 Resultados e discussão

A tabela 1 e a figura 1 mostram os valores obtidos da fermentação de sacarose a 10 %, em diferentes valores de taxa de diluição (D).

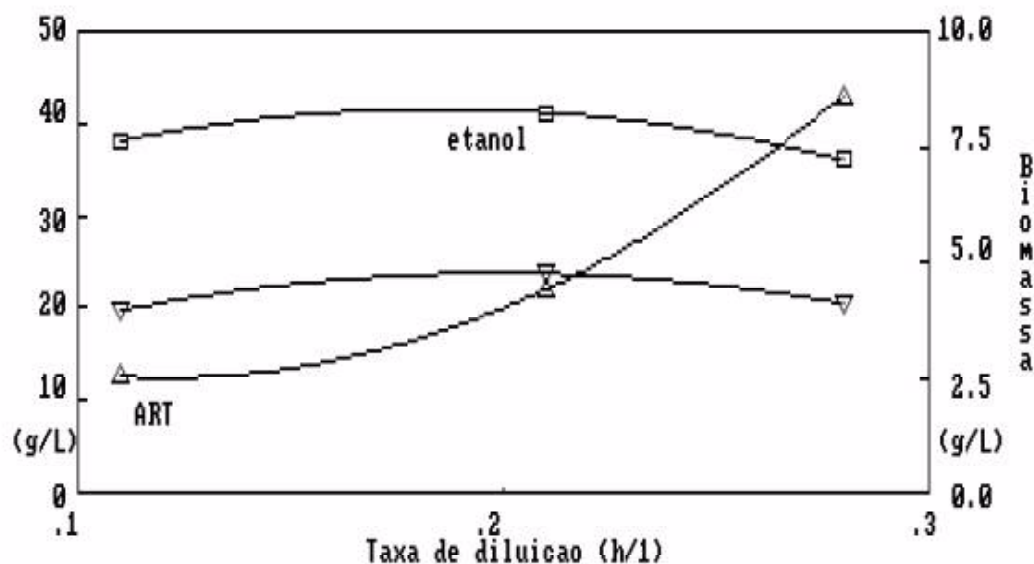


Figura 1. Valores em estado estacionário de cultivo contínuo de *Z. mobilis* ATCC 29191 em meio de sacarose a 10g%

Taxa de diluição (h^{-1})	0,11	0,21	0,28
Etanol (g/L)	38,1	41,2	36,1
Biomassa (g/L)	3,94	4,75	4,10
ART residual (g/L)	12,6	23,1	43,02

□ Açúcares redutores total

Tabela 1. Valores em estado estacionário de cultivo de *Z. mobilis* ATCC 29191 em meio de sacarose a 10g%

Nos diferentes valores de D testados, a cultura atingiu estado estacionário de acordo com Stanbury e Whitaker (1984). O cultivo demonstrou concordância com os fundamentos teóricos do cultivo contínuo, revisado por Pirt (1985).

Em $D = 0,11 h^{-1}$ verificou-se o consumo de sacarose de 88%, enquanto que, em $D = 0,21$ e $0,28 h^{-1}$, o consumo diminuiu para 78,04 e 59,13%, respectivamente.

A concentração de etanol produzido atingiu valores de 38,1, 41,2 e 36,1 g/L em $D = 0,11$, $0,21$ e $0,28 \text{ h}^{-1}$, respectivamente.

Esses valores de etanol são similares àqueles encontrados por Diez e Yokoya (1996) e Baratti e Torres (1987). Ainda que o maior consumo de sacarose tenha sido em $D = 0,11 \text{ h}^{-1}$, verificou-se que parte do açúcar não foi revertido nem para produção de etanol e tampouco para biomassa, uma vez que estes apresentaram valores inferiores quando comparados com os de $D = 0,21 \text{ h}^{-1}$. Buzato (1994) demonstrou que *Z. mobilis* linhagem CP4, quando cultivada em velocidades de crescimento baixas (valores de D baixos), a eficiência de conversão de substrato, tanto em etanol como em biomassa, foi baixa. Em cultivos submetidos a velocidades de crescimento baixas, as células gastam energia para manutenção e são caracteristicamente células maduras. Viikari e Linko (1986) demonstraram que *Z. mobilis* linhagem VTT-E-78082, cultivada em sacarose, formava subproduto (sorbitol e levana), em detrimento da formação de biomassa e etanol, quando a taxa de diluição era baixa. Sendo assim em $D = 0,11 \text{ h}^{-1}$, a produção teórica de etanol atingiu valor de 67,1% e a biomassa 3,94 g/L.

Na taxa de diluição $0,21 \text{ h}^{-1}$, submeteu a cultura a uma velocidade de duplicação celular que é o dobro do que na taxa de diluição anterior. Recentemente, Lawford e Rosseau (1998) demonstraram que, em cultivo contínuo de *Z. mobilis* linhagem ATCC 39676, à medida que os valores de velocidade de duplicação foram elevados de $0,05$ a $0,20 \text{ h}^{-1}$, os valores de biomassa também aumentaram. Essas observações também foram feitas por Allais *et al.* (1987) em cultivo de *Z. mobilis* linhagem ZMAF. No presente trabalho, em $D = 0,21 \text{ h}^{-1}$ o valor de biomassa atingiu 4,75 g/L, que representa 17% superior que a biomassa de $D = 0,11 \text{ h}^{-1}$. É também importante notar que a concentração de etanol de 41,2 g/L representa elevação de 10% se comparada ao valor anterior. Entretanto, quando a cultura é submetida em $D = 0,28$, evidenciou-se a lavagem celular. Isso sugere que o fluxo de nutrientes estava sendo fornecido em velocidade superior à velocidade de duplicação celular. Esses resultados estão em concordância com os de Lawford e Rosseau (1998). Esses autores afirmam que a acomodação do estado estacionário aumenta na medida que o valor de D diminui. Schmidt e Schugerl (1987) testaram valores de D de $0,1$ a $0,5 \text{ h}^{-1}$ e ocorreu forte lavagem celular em $D = 0,32 \text{ h}^{-1}$. Os trabalhos de Koutinas e Kanellaki (1990) ilustram também essas características quando utilizaram *Z. mobilis* linhagem ATCC 10998 na fermentação de glicose. Assim, o valor de biomassa diminuiu para 4,0 g/L. Devido à alta velocidade de fornecimento de nutrientes e à concentração de biomassa menor, a consequência foi um menor aproveitamento de sacarose, bem como elevado valor de açúcar residual, de 59,13% e 43 g/L, respectivamente.

A tabela 2 e a figura 2 mostram os valores obtidos na fermentação de sacarose a 20%. A cultura foi submetida a um valor de $D = 0,11 \text{ h}^{-1}$.

As amostras foram coletadas no intervalo de 75 a 207 horas. Durante esse período não ocorreu a acomodação da cultura no estado estacionário. Durante o período, observaram-se oscilações nos valores de biomassa, etanol e açúcar residual. Bruce *et al.* (1991) propuseram que o efeito inibidor do etanol era a causa das oscilações, pois

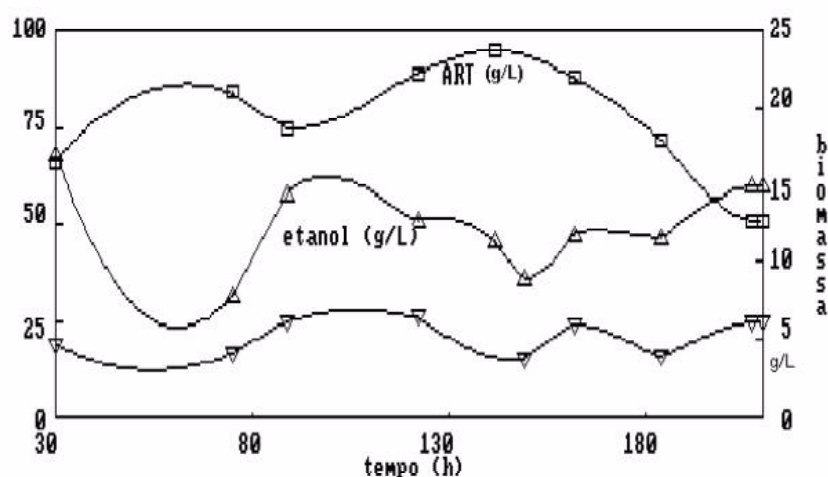


Figura 2. Oscilações em cultivo de *Z. mobilis* ATCC 29191 em meio de sacarose a 20g% em taxa de diluição de $0,1 \text{ h}^{-1}$

T (h)	ART residual (g/L)	Etanol (g/L)	Biomassa (g/L)
30	66,0	67,70	4,74
75	84,0	31,53	4,10
89	75,0	57,50	6,12
122	89,0	51,00	6,45
142	95,0	45,44	
149		36,17	3,77
162	88,0	47,29	5,93
184	72,0	46,37	3,93
207	51,0	59,72	6,11

Tabela 2. Cultivo de *Z. mobilis* ATCC 29191 em meio de sacarose a 20g% e taxa de diluição de $0,1 \text{ h}^{-1}$.

o crescimento celular foi inibido em concentrações de etanol elevadas. Na medida em que a concentração de etanol aumentou, houve diminuição da biomassa e aumento de substrato não consumido. O crescimento celular e a produção de etanol voltaram a elevar-se após a diminuição da concentração de etanol para valores abaixo do nível inibidor. Essas observações também foram feitas no trabalho de Jobses e Roels (JOBSES *et al.*, 1986) e Lee *et al.* (LEE *et al.*, 1985). Nas condições de sacarose a 20%, a concentração inibidora de etanol mostrou ser 57,5 g/L e, assim, promoveu uma diminuição na biomassa de 6,45 g/L para valores inferiores, bem como evidenciou também o aumento de sacarose residual.

4 Conclusão

Nas condições experimentais do presente trabalho, concluiu-se que a melhor condição para fermentação de sacarose a 10% (p/v) por *Z. mobilis* linhagem ATCC, por processo contínuo, mostrou ser na taxa de diluição de $0,21 \text{ h}^{-1}$. Entretanto, para a fermentação de sacarose a 20% (p/v), mesmo em taxa de diluição baixa, a cultura mostrou prolongado período de oscilação, indicando di-culdade, senão impossibilidade, em atingir o estado estacionário.

Referências

- ALLAIS, J. J., FAVELA-TORRES, E. e BARATTI, J. Continuous production of ethanol with *Z. mobilis* growing on Jerusalem Artichoke juice. *Biotechnol. Bioeng.* v. 29, p. 778-782, 1987.
- AMORIM, H. V., ZAGO, E. A. e OLIVEIRA, A. J. *Novos métodos analíticos para o controle da fermentação alcoólica*. São Paulo. Sociedade Brasileira de Microbiologia, 58p., 1982.
- BARATTI, J. e TORRES, F. The effect of pH, temperature and sucrose concentration on high productivity continuous ethanol fermentation using *Zymomonas mobilis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* V. 27, p. 121-128, 1987.
- BRUCE, L. J., AXFORD, D. B., CISZEK, B. e DAUGULIS, A. J. *Biotechnol. Lett.* v. 13. p. 291-296, 1991.
- BUZATO, J. B. Continuous fermentation of glucose, fructose and sucrose by *Z. mobilis* CP4. *Arq. Biol. Technol.* v. 37, p. 527-538, 1994.
- DIEZ, J. C. e YOKOYA, F. Effect of temperature and pH on ethanol and levan production during sucrose fermentation by *Zymomonas mobilis*. *Arq. Biol. Technol.* v. 39, p. 129-137, 1996.
- JOBSES, I. M. L. e ROELS, J. A. The inhibition of maximum specific growth and fermentation rate of *Z. mobilis* by ethanol. *J. Biotechnol. Bioeng.* v. 28, p. 554-563, 1986.
- KOUTINAS, A. A. e KANELLAKI, M. Continuous potable alcohol production by immobilized *Z. mobilis* on alumina pellets. *J. Food Science.* v. 55, p. 525-531, 1990.
- LAWFORD, H. G. e ROSSEAU, J. Conditions that promote productions of lactic acid by *Zymomonas mobilis* in batch and continuous culture. *Appl. Biochem. Biotechnol.* v. 70-72, p. 173-185, 1998.
- LAWFORD, H. G. e ROSSEAU, J. D. Conditions that promote production of lactic acid by *Z. mobilis* in batch and continuous culture. *Appl. Biochem. Biotechnol.* v. 70-72, p. 173-185, 1998.

- LEE, K. J., KWON, S. H. e ROGERS, P. L. Effect of ethanol concentration on the rates of cell growth and ethanol production in *Zymomonas mobilis*. *Kor. Jour. Microbiol.* v. 23, p. 101-166, 1985.
- LOOS, H., KRAMER, R., SAHM, H. e SPRENGER, G. A. Sorbitol promotes growth of *Zymomonas mobilis* in environments with high concentrations of sugars: evidence for a physiological function of glucose-fructose oxidoreductase in osmo-protection. *J. Bacteriol.* v. 176, p. 7688-7693, 1994.
- PIRT, S. J. *Principles of microbe and cell cultivation*. Blackwell Scientific Publication: 1985.
- SCHMIDT, W. e SCHUGERL, K. Continuous ethanol production by *Z. mobilis* on a synthetic medium. *Chem. En. J.* v. 36, p. B39-B48, 1987.
- SILVEIRA, M. M., LEMMEL, C., ERZINGER, G. S., KOEHN-TOPP, P. I. e JONAS, R. Production of sorbitol and gluconic acid by *Z. mobilis*: comparison of strains. *Arq. Biol. Technol.* v. 35, p. 591-594, 1992.
- STANBURY P. F. e WHITHAKER, A. *Principles of fermentation technology*. São Paulo: Pergamon Press, 1984.
- VIIKARI, L. e LINKO, M. Rate and Yield limiting factors in continuous fermentation of sucrose by *Z. mobilis*. *Biotechnol. Lett.* v. 8, p. 139-144, 1986.