

<https://eventos.utfpr.edu.br/sei/sei2018>

Aplicação de ultrassom na fermentação de carboidratos de *Spirulina platensis* para a produção de bioetanol

Application of ultrasound in the fermentation of *Spirulina platensis* carbohydrates for of bioethanol production

Larissa de Oliveira Bispo

larissa.obispo@gmail.com

Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Medianeira, Paraná, Brasil

Bianca Colombari Peron

bjaa.peron@gmail.com

Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Medianeira, Paraná, Brasil

Eliane Colla

ecolla@utfpr.edu.br

Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Medianeira, Paraná, Brasil

RESUMO

OBJETIVO: O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da aplicação de ondas ultrassônicas sobre o crescimento celular das leveduras na fermentação dos carboidratos de *Spirulina platensis* para a produção de bioetanol, otimizando os parâmetros adequados de forma a aumentar a eficiência deste processo. **MÉTODOS:** Para determinar as condições das variáveis potência (%) e tempo de exposição tratamento ultrassônico (segundos), aplicou-se um planejamento fatorial completo (PFC), avaliando-se as respostas de células viáveis, açúcares redutores (AR), biomassa celular e concentração de bioetanol. **RESULTADOS:** Para a resposta de concentração de bioetanol, o maior valor encontrado no planejamento foi de $0,55 \text{ g} \cdot (\text{L} \cdot \text{h})^{-1}$ no ensaio 7 (ponto central), representando um acréscimo de 17% na concentração de bioetanol em relação resultado obtido com o Meio Controle ($0,47 \text{ g} \cdot (\text{L} \cdot \text{h})^{-1}$). Já para o parâmetro Número de células viáveis, o ensaio 4, recebeu estímulo ultrassônico de alta intensidade (100% de potência), concluindo que nessa faixa estudada a sonicação incentivou a reprodução celular. No ensaio 6 (ponto central), recebeu um estímulo ultrassônico de média intensidade (70%), estimulando a produção de bioetanol. **CONCLUSÕES:** Pode-se também concluir que o estímulo ultrassônico não apresentou efeito significativo sobre o desempenho da produtividade de bioetanol. Porém apresentou efeito positivo no crescimento celular com estímulos intermediários dentro da faixa estudada.

PALAVRAS-CHAVE: Biomassa microalgal. Rendimento da fermentação alcoólica. Tratamento ultrassônico.

ABSTRACT

OBJECTIVE: The objective of this work was to evaluate the effect of ultrasonic waves on yeast cell growth in the fermentation of *Spirulina platensis* carbohydrates for the production of bioethanol, optimizing the appropriate parameters in order to increase the efficiency of this process. **METHODS:** A complete factorial design (PFC) was applied to determine the conditions of the power (%) and exposure time (s), evaluating the responses of viable cells, reducing sugars (AR), cellular biomass and bioethanol concentration. **RESULTS:** For the bioethanol concentration response, the highest value found in the planning was $0,55 \text{ g} \cdot (\text{L} \cdot \text{h})^{-1}$ in test 7 (central point), representing a 17% increase in the concentration of bioethanol in relation result obtained with the Control Medium ($0,47 \text{ g} \cdot (\text{L} \cdot \text{h})^{-1}$). For the number of viable cells, test 4 received high-intensity (100% power) ultrasound stimulation, concluding that in this study the sonication stimulated cell reproduction. In test 6 (central point), it received a medium intensity ultrasonic stimulus (70%), stimulating the production of bioethanol. **CONCLUSIONS:** It can also be concluded that the ultrasonic stimulus had no significant effect on the productivity performance of bioethanol. However, it had a positive effect on cell growth with intermediate stimuli within the studied range.

KEYWORDS: Microalgal biomass. Yield of alcoholic fermentation. Ultrasonic treatment.

Recebido: 02 set. 2018.

Aprovado: 13 set. 2018.

Direito autorial:

Este trabalho está licenciado sob os termos da Licença Creative Commons-Atribuição 4.0 Internacional.



INTRODUÇÃO

Atualmente, devido à preocupação com o esgotamento de fontes energéticas não renováveis ocorreu um aumento pela busca de biocombustíveis de fontes renováveis, surgindo assim os biocombustíveis de segunda e terceira geração. Os biocombustíveis de terceira geração são os obtidos através da biomassa de microrganismos, especial de microalgas. As justificativas para a produção de biocombustíveis microalgais em comparação com os de primeira e segunda geração são que o cultivo pode ser realizado em terras com baixo potencial agrícola e, portanto, pode reduzir a competição por terras agricultáveis (MAGRO et al., 2016; SCHENK et al., 2008).

Nos últimos anos, houve um crescimento significativo nos estudos abordando os efeitos provocados pelas ondas ultrassônicas de baixa frequência nos processos fermentativos (MARTINES et al., 2000). Neste sentido objetivou-se a estudar o efeito causado pelo estímulo ultrassônico na produção de bioetanol a partir de carboidratos da microalga *Spirulina platensis*.

MÉTODOS

A biomassa inativa de microalga *Spirulina platensis*, foi adquirida no comércio local da cidade de Medianeira, Paraná. As enzimas utilizadas na hidrólise enzimática dos carboidratos da biomassa de *Spirulina* (α -amilase (Liquozyme® Supra 2.2X) e a amiloglicosidase (AMG 300L)), foram cedidas pela LNF Latino Americana (Bento Gonçalves/RS). Para a fermentação alcoólica foi utilizada a levedura *Saccharomyces cerevisiae* (saf-instant®), adquirida em mercado local. A biomassa foi desengordurada pelo método *Soxhlet* (AOAC, 1998) utilizando hexano como solvente (50-60°C). Para extração das proteínas e carboidratos foi utilizado método descrito por Lupatini (2017), por meio de tratamento ultrassônico com agitação em meio alcalino, seguida de precipitação ácida das proteínas (pH 3,0 com HCl 2,0 mol.L⁻¹) e repouso por 30 a 60 minutos (10°C).

Para obtenção de açúcares fermentescíveis realizou-se o processo de hidrólise enzimática, por 12 horas em reator de hidrólise de 3 litros (TE-2003/3,0-E2, Tecnal) com agitação de 100 rpm. Para ajuste do pH ideal para atuação das enzimas (5,5), utilizou-se solução de HCl 2 mol.L⁻¹, com posterior aquecimento até 50°C, momento em que adicionou-se as enzimas α -amilase e amiloglicosidase simultaneamente, na proporção de 1% v/v.

A fermentação foi conduzida em Erlenmeyers de 250 mL, contendo 90 mL do hidrolisado esterilizado, com pH ajustado para 5,0 utilizando-se de soluções de hidróxido de sódio e HCl (2 mol.L⁻¹). A inoculação foi realizada na proporção de 10% (v/v) com *Saccharomyces cerevisiae* previamente ativada a 30°C por 24 horas em meio composto por glicose (2% m/v), peptona de carne (0,5% m/v) e extrato de levedura (1% m/v); utilizando-se 0,2% (m/v) da levedura liofilizada. A determinação da concentração de células do meio após inoculação foi realizada em Câmara de Neubauer. Os ensaios foram realizados em *shaker* de agitação orbital (SL 221, SOLAB CIENTÍFICA) sob temperatura de 30 °C. A aplicação de ultrassom se deu em banho ultrassônico (Elma E 30H, Ultra-Bohn), no tempo de 4 horas de fermentação. Os níveis reais e codificados das variáveis estudadas no planejamento estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 – Níveis reais e codificados das variáveis estudadas no PFC 2²

Variáveis/Níveis	Potência (%)	Tempo de aplicação do tratamento ultrassônico (segundos)
-1	40	5
0	70	10
+1	100	15

Fonte: A autora (2018)

Utilizou-se a frequência de 37 kHz, com tempo de intervalo entre as sonicações de 15 segundos, com aplicação total de 15 minutos de tratamento.

Amostras foram retiradas a cada 2 horas para acompanhamento da fermentação, iniciando no tempo zero até 12 horas, avaliando-se as respostas de células viáveis, açúcares redutores (AR), biomassa celular e concentração de bioetanol.

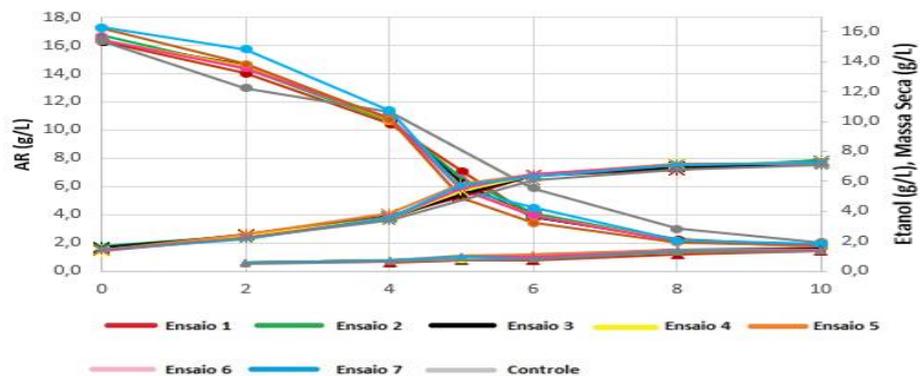
A contagem de células foi realizada conforme método descrito por Lafforgue, Delorme e Goma (1994). A concentração dos açúcares presentes no hidrolisado foi determinada por UHPLC (DIONEX, Ultimate 3000, São Paulo) equipado com Índice de Refração (Shodex). A concentração da biomassa celular foi determinada pela leitura da densidade ótica (DO) de uma alíquota do meio de cultivo, em espectrofotômetro (Lambda XLS, PerkinElmer) a 600 nm. A concentração de bioetanol foi determinada em Cromatógrafo Líquido de Ultra-alta Pressão (UHPLC, DIONEX, U3000) equipado com detector de Índice de Refração. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o *software* STATISTICA 11.0 (Statsoft Inc. 2325 East 13th Street, Tulsa, OK, 74104, USA). O teste de Tukey foi usado para avaliar as diferenças entre as médias ao nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

RESULTADOS E DISCUSSÕES

A fermentação alcoólica do hidrolisado de *Spirulina platensis* foi realizada, conforme estabelecido no planejamento fatorial completo, com realização paralela da fermentação de um Meio Controle, o qual não recebeu tratamento ultrassônico durante o processo.

A contagem inicial de células foi, em média, de $7 \cdot 10^7$ cél·mL⁻¹ para todos os ensaios. Os resultados obtidos para a cinética da fermentação alcoólica estão apresentados nas Figuras 3 e para o planejamento.

Figura 3 – Perfil cinético de fermentação do planejamento e Meio Controle: Massa Seca (▲), Etanol (*), AR (●).



De acordo com a Figura 3, os ensaios do planejamento apresentaram comportamentos cinéticos semelhantes ao Meio Controle. No tempo de 12 horas de fermentação, houve consumo praticamente total dos açúcares redutores, produzindo-se, em média, 7,30 g/L de bioetanol e 1,47 g/L de biomassa celular.

Na Tabela 2, são apresentados os rendimentos de todos os ensaios do planejamento, bem como do Meio Controle na etapa de fermentação alcoólica, assim como os fatores de conversão.

Tabela 2 – Eficiência da fermentação alcoólica e fator de conversão de substrato em produto ($Y_{P/S}$), fator de conversão de substrato em biomassa ($Y_{X/S}$) fator de conversão de biomassa em produto ($Y_{P/X}$), obtidos no processo de fermentação alcoólica do hidrolisado de *Spirulina Platensis* para o planejamento e Meio Controle

Ensaio	Eficiência (%)	$Y_{P/S}$	$Y_{X/S}$	$Y_{P/X}$
1	87,98	0,45	0,07	6,34
2	81,90	0,42	0,05	7,62
3	83,57	0,43	0,06	7,12
4	86,89	0,44	0,06	7,96
5	83,15	0,42	0,04	10,26
6	86,89	0,44	0,04	10,79
7	85,76	0,44	0,06	7,44
Meio Controle	84,19	0,43	0,15	8,20

Fonte: A autora (2018).

Ao analisar os fatores de conversão verifica-se que nos ensaios 5 e 6 (pontos centrais), obtiveram-se os maiores fatores de conversão de células em produto indicando que, em relação a massa celular, alcançaram-se maiores quantidades de bioetanol produzido quando aplicada a energia de ultrassom em ciclos de 10 segundos com potência nominal de 70%. Da mesma forma, este valor foi superior quando comparado ao ensaio controle, demonstrando os efeitos positivos do estímulo sobre as células de levedura em relação à sua bioconversão de substrato em produto.

No processo de conversão direta, sem pré-tratamento ou hidrólise enzimática da *Spirulina platensis* ao bioetanol, Aikawa et al. (2013) alcançou $6,5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ de bioetanol (produtividade de $1,08 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$).

A matriz dos ensaios realizados no planejamento com os valores reais e codificados das variáveis estudadas, e respostas, assim como os resultados obtidos para o Meio Controle, estão apresentadas na Tabela 3. Analisando-se os resultados da Tabela 3, foi possível calcular os efeitos das duas variáveis estudadas no planejamento, os quais estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 3 – Matriz do PFC 2² com valores codificados e reais (entre parênteses) das variáveis estudadas e respectivas respostas para o Planejamento

Ensaio	x ₁ ^a	x ₂ ^b	P.C ^c (g·L·h ⁻¹)	P.E ^d (g·L·h ⁻¹)	N.C ^e (cél·mL ⁻¹)	E ^f (%)	P.E ^g (g·L·h ⁻¹)
1	-1 (40)	-1 (5)	0,09	0,50	2,55·10 ⁷	87,98	0,33
2	+1 (100)	-1 (5)	0,07	0,47	3,85·10 ⁷	91,89	0,43
3	-1 (40)	+1 (15)	0,08	0,47	6,65·10 ⁷	83,57	0,41
4	+1 (100)	+1 (15)	0,07	0,49	1,25·10 ⁸	86,88	0,46
5	0 (70)	0 (10)	0,05	0,47	9,40·10 ⁷	83,15	0,50
6	0 (70)	0 (10)	0,05	0,49	1,18·10 ⁸	86,88	0,50
7	0 (70)	0 (10)	0,08	0,48	9,55·10 ⁷	85,76	0,55
Meio Controle _h	-	-	0,07	0,47	-	84,19	-

^a Potência (%); ^b Tempo de aplicação do ultrassom; ^c Produtividade Celular; ^d Produtividade em Bioetanol; ^e Número de Células Viáveis (imediatamente após aplicação do ultrassom); ^f Eficiência; ^g Produtividade em Bioetanol (imediatamente após aplicação do ultrassom); ^h Sem aplicação de ultrassom

Tabela 4 – Efeitos dos efeitos das variáveis Potência(%) e Tempo de aplicação do ultrassom para as respectivas respostas do planejamento

Fator	Produtividade Celular				Produtividade em Bioetanol				Número de Células Viáveis			
	Efeito (g·L·h ⁻¹)	Erro Pad.	t (3)	p-valor	Efeito (g·L·h ⁻¹)	Erro Pad.	t (3)	p-valor	Efeito (cél·mL ⁻¹)	Erro Pad.	t (3)	p-valor
Média	0,060	0,005	11,11	0,0015	0,4815	0,004	116,70	<0,0001	8,04·10 ⁷	1,1·10 ⁷	6,85	0,0063
(x ₁) ^a	-0,010	0,014	-0,721	0,5228	-0,002	0,010	-0,229	0,8335	3,57·10 ⁷	3,0·10 ⁷	-1,15	0,3322
(x ₂) ^b	0,006	0,014	0,445	0,6864	0,005	0,010	0,4580	0,6780	-6,37·10 ⁷	3,0·10 ⁷	-2,05	0,1318
(x ₁)×(x ₂)	-0,005	0,014	-0,383	-0,3837	-0,019	0,010	-1,7557	0,1774	-2,27·10 ⁷	3,0·10 ⁷	-0,73	0,5160
	Eficiência				Produtividade em Bioetanol após o tratamento ultrassônico ^d							
	Efeito (%)	Erro Pad.	t (3)	p-valor	Efeito (g·L·h ⁻¹)	Erro Pad.	t (3)	p-valor				
	85,16	0,593	143,446	0,0001	0,9914	0,0388	25,53	0,0001				
	-1,38	1,570	-0,88	0,4428	0,0712	0,1027	0,69	0,5378				
	-0,28	1,570	-0,18	0,8659 ^c	-0,0387	0,1027	-0,377	0,7311				
	-4,69	1,570	-2,990	0,0580	-0,0412	0,1027	-0,401	0,7149				

Fonte: A autora (2018)

Pode-se verificar pela Tabela 4 que, nenhuma das variáveis estudadas no processo teve efeito significativo ($p \leq 0,05$) sobre as respostas estudadas. Podendo-se trabalhar com qualquer valor dentro da faixa estudada para potência (%) e tempo de exposição ao tratamento (segundos) que não irá alterar significativamente as respostas avaliadas.

Comparando-se as respostas do planejamento com o resultado obtido para o Meio Controle, observa-se que a eficiência foi maior com a aplicação de ultrassom para todos os ensaios. Para a resposta concentração de bioetanol, o maior valor encontrado no planejamento foi de $0,55 \text{ g} \cdot (\text{L} \cdot \text{h})^{-1}$ no ensaio 7, representando um acréscimo de 17 % na concentração de bioetanol em relação ao resultado obtido com o Meio Controle ($0,47 \text{ g} \cdot (\text{L} \cdot \text{h})^{-1}$).

Stobienia (2018), em seus estudos com Farelo de Arroz, observou que a variável tempo de exposição ao ultrassom causou efeito significativo positivo sobre a resposta de produtividade em bioetanol logo após a aplicação da energia ultrassônica, alcançando concentração de $1,55 \text{ g} \cdot (\text{L} \cdot \text{h})^{-1}$ em bioetanol logo após a aplicação de ultrassom na 4ª hora de fermentação, o que representou mais da metade da produtividade total média de todos os ensaios ao final das 10 h de fermentação.

Sulaiman et al. (2012) também obteve resultado satisfatório na produção de etanol a partir de fermentação da lactose pela levedura *Kluyveromyces marxianus* assistida por ultrassom, alcançando uma concentração final cerca de 3,5 vezes maior que o ensaio controle, sem sonicação.

Embora pela análise de efeitos a potência não tenha tido efeito significativo, ao avaliar os resultados do número de células antes e depois do tratamento ultrassônico. Observa-se que em uma potência superior ou intermediária houve um estímulo do crescimento celular, portanto pode-se sugerir o uso de potência intermediária dentro da faixa estudada.

Foram realizadas busca de patentes em bancos nacionais (INPI) e internacionais (USPTO, Espacenet, google patents, PatentScope (WIPO), Derwent innovation index), com as palavras chave "*Spirulina platensis*", "ethanol production", "ultrasound". Não foram encontradas patentes relacionadas ao assunto proposto. Pode-se considerar portanto, que a aplicação de estímulo ultrassônico durante a fermentação de carboidratos da biomassa de *Spirulina platensis* tem carácter de inovação na área de pesquisa proposta..

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados demonstram efeitos positivos sobre o crescimento celular com estímulos de média potência (pontos centrais). Verificou-se também que o ensaio no ponto central, quando aplicado o ultrassom na 4ª hora de fermentação, obteve-se o maior valor ($0,55 \text{ g} \cdot (\text{L} \cdot \text{h})^{-1}$) para produtividade em bioetanol, confirmando que o estímulo de média potência é uma variável benéfica para a produtividade de bioetanol. Concluindo que o estímulo ultrassônico não apresentou efeito significativo sobre o desempenho da produtividade de bioetanol, porém apresentou efeito positivo no crescimento celular com estímulos intermediários dentro da faixa estudada.

AGRADECIMENTOS

A Profª Drª Eliane Colla pela oportunidade do desenvolvimento deste trabalho, as minhas colegas de laboratório Bianca e Mônica. E ao apoio da Pró-Reitoria de Relações Empresariais e Comunitárias (PROREC) da UTFPR pela bolsa do programa de Iniciação à Inovação.

REFERÊNCIAS

AIKAWA, S.; JOSEPH, A.; YAMADA R.; IZUMI, Y.; YAMAGISHI, T.; MATSUDA, F.; KAWAI, H., CHANG, J.; HASUNUMA, T.; KONDO, A. Direct conversion of *Spirulina* to ethanol without pretreatment or enzymatic hydrolysis processes. **Energy & Environmental Science**, v. 6, p. 1844–1849, 2013.

CHISTI, Yusuf; MOO-YOUNG, Murray. Disruption of microbial cells for intracellular products. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 8, n. 4, p. 194-204, 1986.

AOAC. **Official methods of analysis of AOAC international**. 16 ed. Estados Unidos: AOAC International, 1998.

CHRONAKIS, I. S. et al. The behaviour of protein preparations from blue-green algae (*Spirulina platensis* strain Pacifica) at the air/water interface. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 173, n. 1–3, p. 181–192, 2000.

LUPATINI, Anne Luize et al. Protein and carbohydrate extraction from *S. platensis* biomass by ultrasound and mechanical agitation. **Food Research International**, v. 99, p. 1028-1035, 2017.

MAGRO, Francisco Gerhardt et al. Produção de Bioetanol Utilizando Microalgas: Uma Revisão. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, [s.l.], v. 37, n. 1, p.159-174, 16 mar. 2016.

MARKOU, G.; ANGELIDAKI, I.; NERANTZIS, E.; GEORGAKAKIS, D. Bioethanol production by carbohydrate-enriched biomass of *Arthrospira (Spirulina) platensis*. **Energies**, v. 6, n. 8, p. 3937–3950, 2013.

MARTINES, M. A. U. et al. O Efeito Do Ultra-Som Em Reações Químicas. **Quimica Nova**, v. 23, n. 2, p. 251–256, 2000.

NELSON, N. A photometric adaptation of Somogyi Method for the determination of glucose. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 3, n. 2, p. 375–380, 1944.

PERON, Bianca Colombari. **Frações residuais do processo de extração de proteínas da biomassa de Spirulina platensis como matéria-prima para produção de bioetanol.** 2018. 67 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia de Alimento, Ppgta, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Medianeira, 2018.

SCHENK, P. M.; THOMAS-HALL, S. R.; STEPHENS, E.; MARX, U. C.; MUSSGNUG, J. H.; POSTEN, C.; KRUSE, O.; HANKAMER, B. Second generation biofuels: high-efficiency microalgae for biodiesel production. **Bioenergy Research**, v. 1, p. 20–43, 2008.

SINISTERRA, J.V. **Application of ultrasound to biotechnology: an overview.** **Ultrasonics**. Oxford, v. 30, nº 7 3, p.180 – 185, 1992.

SOMOGYI, M. A new reagent for the determination of sugars. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 160, p. 61–68, 1945.

STOBIENIA, mônica. **Efeito da Aplicação de Ultrassom em Fermentação Alcoólica de Hidrolisado de Farelo de Arroz Desengordurado.** 2018. 54 f. Trabalho de Conclusão de Curso. Curso de Engenharia de Alimentos. Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Câmpus Medianeira.

SULAIMAN, Ahmad Ziad et al. Ultrasound-assisted fermentation enhances bioethanol productivity. **Biochemical Engineering Journal**, v. 54, n. 3, p. 141-150, 2011.

REMPEL, Alan et al. Saccharification of Spirulina platensis biomass using free and immobilized amylolytic enzymes. **Bioresource technology**, v. 263, p. 163-171, 2018.