

## Área: Engenharia de Alimentos

# PRODUÇÃO DE BIOETANOL A PARTIR DA BIOMASSA DA MICROALGA *Chlorella minutissima*

Ana Cláudia Freitas Margarites, Pâmela Goularte,  
Vitor Furlong, Jorge Alberto Vieira Costa\*

*Laboratório de Engenharia Bioquímica, Escola de Química e Alimentos,*

*Universidade Federal do Rio Grande*

*\*E-mail: jorgealbertovc@terra.com.br*

## RESUMO

As fontes renováveis de combustíveis, em especial o bioetanol, têm sido consideradas como alternativa à matriz energética convencional, porém, existe a necessidade de ampliação da oferta de matérias-primas para produção deste biocombustível. As microalgas, que possuem carboidratos em sua constituição, são uma alternativa como fonte de matéria-prima para esta produção. Neste contexto, objetivou-se cultivar a microalga *Chlorella minutissima* e utilizar a biomassa para a produção de bioetanol. Os cultivos foram realizados em fotobiorreatores fechados de 4 L, com concentração inicial de inóculo de 0,2 g/L. Os processos de sacarificação foram realizados com a adição das enzimas  $\alpha$ -amilase e amiloglicosidase. Para o processo fermentativo, os mostos foram filtrados e esterilizados, sendo o pH ajustado entre 4,5-5,0. Foram adicionados 10% (v/v) de inóculo de *Saccharomyces cerevisiae* e a temperatura mantida a 30°C. Após 12 horas de processo fermentativo, a concentração de bioetanol, a partir dos carboidratos da microalga *Chlorella minutissima*, foi de  $5,351 \pm 0,309$  g/L, com produtividade em etanol máxima de  $0,432 \pm 0,020$  g/L.h e eficiência do processo de  $52,762 \pm 1,234\%$ .

**Palavras-chave:** microalga, sacarificação, fermentação.

## 1 INTRODUÇÃO

Os biocombustíveis são considerados por ambientalistas e líderes de governo como alternativas renováveis mais promissoras para reduzir a dependência de combustíveis fósseis e diminuir emissões de gás carbônico. Ligado com medidas de conservação de energia eficazes, o aumento do uso de biocombustíveis tem potencial para reduzir a velocidade dos efeitos de alterações climáticas globais (GOUVEIA e OLIVEIRA, 2009).

Segundo Bastos (2007), as perspectivas de consolidação do mercado de etanol e alcance das metas de expansão de seu uso, exigem a ampliação da produção em níveis não passíveis de serem atendidos. A ampliação da produção de etanol, sem aumento da área cultivada, requer o uso de fontes alternativas, que poderá tornar o etanol competitivo em custos. Porém, existem diferenças marcantes de custo dependendo da matéria-prima utilizada e dos processos de produção do etanol. A necessidade de ampliação da oferta de matérias-primas para produção de etanol, sem pressionar a área plantada para produção de alimentos, tem levado empresas e países a investirem em pesquisas para maior utilização de outras matérias-primas.

As microalgas, que possuem carboidratos em sua constituição, são um recurso alternativo para a produção de bioetanol (SÁNCHEZ e CARDONA, 2008). Lourenço (2006) e Vidotti e Rollemberg (2004) afirmam que no caso de microalgas da divisão *Chlorophyta*, como microalgas do gênero *Chlorella*, acumulam amido como fonte de reserva. Segundo Lima et al. (2001), qualquer produto que contenha carboidrato, constitui-se em matéria-prima para a obtenção deste biocombustível.

De acordo com Miao e Wu (2004), as diferentes classes de microalgas diferem muito em seu conteúdo de carboidratos, assim como o de proteínas e lipídios. A composição bioquímica da biomassa das microalgas não é determinada somente pela natureza de cada espécie algal, também depende de fatores como, intensidade de luz, temperatura e nutrientes.

Segundo Brennan e Owende (2010) e Dismukes et al. (2008) a maioria das microalgas é fonte de proteínas quando cultivadas em condições repletas de nutrientes. Porém, quando se realiza a restrição de alguns nutrientes, estes cultivos podem ser facilmente induzidos para alterar a composição microalgal. O nitrogênio, importante elemento para o metabolismo das microalgas, contribui para a formação de proteínas (RIGANO, 1998). Quando se realiza técnicas de limitação de nutrientes nos cultivos, o conteúdo de proteína pode ser convertido a compostos de armazenamento de energia, como carboidratos e lipídios.

O objetivo deste trabalho foi produzir bioetanol a partir dos carboidratos presentes na biomassa da microalga *Chlorella minutissima*.

## 2 DESENVOLVIMENTO

### 2.1 MATERIAL E MÉTODOS

#### 2.1.1 Microalga e condições de cultivo

A microalga *Chlorella minutissima* foi avaliada para a produção de bioetanol. A microalga pertence à Coleção do Laboratório de Engenharia Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande (FURG). A microalga foi cultivada em meio Bristol'S Modificado (MBM) (WATANABE, 1960), no qual foram adicionados apenas 50% do teor especificado de nitrato de potássio (0,125 g/L) para favorecimento do aumento da concentração de carboidratos.

A microalga foi cultivada em fotobiorreator fechado de 4 L, com volume útil de 3,6 L, com agitação contínua por meio de injeção de ar estéril a 0,3 vvm por bombas de diafragma, com iluminância de 2500 lux, fotoperíodo de 12 h claro/escuro e temperatura fixada em 30°C. A concentração celular inicial dos cultivos foi de 0,20 g/L.

#### 2.1.2 Determinações analíticas durante cultivo de microalga

##### 2.1.2.1 Crescimento celular

A concentração celular da microalga foi determinada a cada 24 h através da medida de densidade ótica em espectrofotômetro a 670 nm (COSTA et al., 2002), utilizando-se uma relação pré-estabelecida entre o peso seco de biomassa e a absorbância. Os cultivos foram mantidos até a fase estacionária de crescimento.

Foram avaliados os parâmetros cinéticos concentração máxima de biomassa ( $X_{m\acute{a}x}$ , g/L); a produtividade máxima ( $P_{m\acute{a}x}$ , g/L.dia), obtida segundo a equação  $P = (X_t - X_0)/(t - t_0)$ , onde  $X_t$  é a concentração de biomassa (g/L) no tempo  $t$  (dia), e  $X_0$  a concentração de biomassa (g/L) no tempo  $t_0$  (dia) e a velocidade específica máxima de crescimento ( $\mu_{m\acute{a}x}$ , 1/dia) por regressão exponencial aplicada à fase logarítmica de crescimento (SCHMIDELL et al., 2001).

### 2.1.2.2 Determinação de carboidratos

A concentração de carboidratos da biomassa seca (% p/p) foi avaliada ao final dos cultivos da microalga *Chlorella minutissima*. O método utilizado foi uma adaptação de DNS (MILLER, 1959), com prévia hidrólise ácida dos polissacarídeos (FURLAN et al., 2009).

### 2.1.2 Fermentação Alcoólica

#### 2.1.2.1 Micro-organismo

A cepa utilizada foi a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, sendo sua reativação realizada a 30°C por 48 h em meio contendo 20 g/L de glicose, 10 g/L de extrato de levedura e 20 g/L de peptona (BRINGHENTI e CABELLO, 2005).

Os inóculos foram preparados utilizando-se um meio contendo 30 g/L de carboidratos hidrolisados da biomassa da microalga, 20 g/L de glicose, 10 g/L de extrato de levedura e 20 g/L de peptona (BRINGHENTI e CABELLO, 2005).

#### 2.1.2.2 Processo Fermentativo

A 4 g de biomassa de *Chlorella minutissima*, seca a 50°C por 24 h, foram adicionados 50 mL de água e pH ajustado em 4,5. Esta mistura foi autoclavada a 121°C por 20 minutos, e após resfriada, foram adicionados 2 mL de  $\alpha$ -amilase e 2 mL de glicoamilase comerciais, com atividades enzimáticas específicas de 0,921 mg de açúcar redutor / min . mg de proteína e 1,207 mg de açúcar redutor / min . mg de proteína, respectivamente. Os mostos foram incubados por 24 horas a 58°C. O pH do hidrolisado foi ajustado entre 4,5 e 5,0. O mosto foi esterilizado e inoculado com 10% (v/v) de inóculo da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Os ensaios foram realizados em erlenmeyers de 200 mL, com volume útil de 100 mL O processo foi conduzido em shaker a 150 rpm em condições anaeróbicas.

Amostras foram coletadas nos tempos zero e 12 h de fermentação para a determinação da concentração de açúcares redutores (AR), concentração de etanol e concentração celular de *Saccharomyces cerevisiae*.

#### 2.1.2.2.1 Determinação do pH

A determinação do pH foi realizada através do método potenciométrico segundo a AOAC (1995). Durante a fermentação o pH foi mantido na faixa de 4,5 a 5,0, através da correção pela adição de NaOH 1 mol/L e HCl 1 mol/L

#### 2.1.2.2.2 Determinação da concentração de biomassa de *Saccharomyces cerevisiae*

A concentração de biomassa foi obtida através da determinação de massa seca, obtida por filtração (Milipore 0,2  $\mu\text{m}$ ).

#### 2.1.2.2.3 Determinação de açúcares redutores

O consumo do substrato pela levedura foi verificado através da determinação de açúcares redutores (AR), o qual foi quantificado pelo método 3,5 DNS (MILLER, 1959), utilizando-se uma curva padrão, obtida a partir de solução estoque de glicose anidra.

#### 2.1.2.2.4 Determinação da concentração de etanol

A concentração de etanol foi determinada através do método espectrofotométrico para determinação de teores alcoólicos em misturas hidroalcoólicas (SALIK e POVH, 1993). Foram determinadas a Produtividade em etanol (g/L.h) e Eficiência do processo fermentativo (%).

## 2.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 2.2.1 Cultivo

A Figura 1 mostra a curva de crescimento da microalga *Chorella minutíssima* cultivada nos ensaios.

A partir da Figura 1, verificou-se que a fase estacionária de crescimento iniciou-se por volta de dezoito dias de cultivo. A concentração de nitrato de potássio adicionado no meio de cultivo foi 0,12 g/L, apenas 50% do recomendado no meio MBM, mostrando que a microalga *Chlorella minutíssima* se adaptou à diminuição na concentração de nitrogênio.

A microalga apresentou concentração celular máxima ( $X_{\text{máx}}$ ) de  $0,545 \pm 0,015$  g/L velocidade específica máxima de crescimento de  $0,062 \pm 0,008$  1/dia e produtividade máxima

de  $0,012 \pm 0,004$  g/L.dia. A concentração de carboidratos da biomassa de *Chlorella minutissima* foi de  $37,74 \pm 1,75\%$  ao final do cultivo.

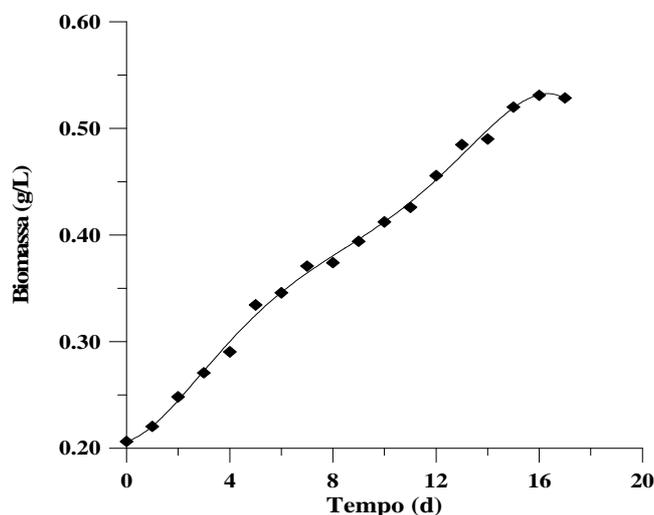


Figura 1 Curva de crescimento da microalga *Chlorella minutissima*

### 2.2.2 Fermentação Alcoólica

Após o processo de hidrólise enzimática dos polissacarídeos de *Chlorella minutissima* foram obtidos  $19,226 \pm 0,025$  g/L de açúcares redutores que foram utilizados como substrato no processo de fermentação alcoólica.

No processo de fermentação alcoólica utilizando-se o amido como fonte de carbono, é necessário o processo de hidrólise deste para obtenção de açúcares redutores, assimiláveis pela levedura, uma vez que este não é assimilado diretamente pelo metabolismo dos microorganismos em geral. (REICKS et al., 2009). A ação sinérgica da  $\alpha$ -amilase e amiloglucosidase no processo de hidrólise vêm sendo estudada por diversos pesquisadores em amidos de diferentes origens. Abrahm et al. (1990) estudaram a eficiência do uso destas duas enzimas em grânulos de amido de mandioca e concluíram que esta combinação apresenta bons rendimentos na conversão do amido a glicose.

A Tabela 1 apresenta as concentrações de açúcar redutor, biomassa da levedura *Saccharomyces cerevisiae* e de etanol nos tempos inicial e final (12 horas) do processo de fermentação alcoólica utilizando os carboidratos da microalga *Chlorella minutissima* como substrato.

De acordo com a Tabela 1, após 12 horas do processo fermentativo, verificou-se a diminuição da concentração celular da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. A concentração de açúcares redutores residual do processo fermentativo ficou em  $1,368 \pm 0,015$  g/L.

Tabela 1 Concentrações de açúcar redutor ( $\text{g.L}^{-1}$ ), biomassa de *Saccharomyces cerevisiae* ( $\text{g.L}^{-1}$ ) e etanol ( $\text{g.L}^{-1}$ ) nos tempos inicial e final (12 horas) do processo de fermentação alcoólica a partir de carboidratos de *Chlorella minutíssima*.

Tempo (h)	Açúcar redutor* ( $\text{g.L}^{-1}$ )	Biomassa* ( $\text{g.L}^{-1}$ )	Etanol* ( $\text{g.L}^{-1}$ )
0	$19,226 \pm 0,025$	$9,820 \pm 0,134$	$0,01 \pm 0,086$
12	$1,368 \pm 0,015$	$9,180 \pm 0,209$	$5,351 \pm 0,309$

\* Valores médios de ensaios realizados em duplicata  $\pm$  desvio padrão

A concentração de bioetanol, a partir dos carboidratos da microalga *Chlorella minutíssima*, foi de  $5,351 \pm 0,309$  g/L. A produtividade em etanol máxima foi obtida após 12 horas de fermentação, sendo verificado a formação de  $0,432 \pm 0,020$  g/L.h de etanol. A eficiência do processo fermentativo foi de  $52,762 \pm 1,234\%$ .

Shirai et al. (1998) utilizaram a biomassa da microalga *Duanliella salina* para a produção de bioetanol, com prévia hidrólise enzimática dos polissacarídeos, e verificaram uma eficiência no processo de apenas 35%.

Durante a fermentação alcoólica, a levedura *Saccharomyces cerevisiae* pode converter 1 g de glicose a 0,51 g de etanol, porém esta é um microrganismo que consegue alcançar rendimento máximo de 90% deste valor estequiométrico, pois ao metabolizar anaerobicamente o açúcar, esta levedura gera energia (ATP) que é empregada na realização de diversas atividades fisiológicas e biossínteses, necessários à manutenção da espécie (SCHIMIDELL et al., 2001; LIMA et al., 2001).

De acordo com Dismukes (2008), embora ainda exista a necessidade de estudos para a implantação da biomassa de microalgas para a produção de biocombustíveis, estas apresentam inúmeras vantagens em relação aos vegetais superiores. As microalgas são inerentemente mais eficientes coletores solares; usam menos ou nenhuma terra para seu crescimento; podem ser convertidas em combustível líquido, usando tecnologias mais simples do que as necessárias, por exemplo, para a conversão de celulose em etanol.

As microalgas são potencialmente adequadas para a produção de combustíveis, entretanto, os dados presentes na literatura acerca desta produção são limitados. Desta forma, a discussão sobre a utilização destes microorganismos na produção de combustíveis ainda necessita de muitos estudos.

### 3 CONCLUSÃO

A microalga apresentou concentração celular máxima ( $X_{\text{máx}}$ ) de  $0,545 \pm 0,015$  g/L velocidade específica máxima de crescimento ( $\mu_{\text{máx}}$ ) de  $0,062 \pm 0,008$  1/dia e produtividade máxima ( $P_{\text{máx}}$ ) de  $0,012 \pm 0,004$  g/L.dia. A concentração de carboidratos da biomassa de *Chlorella minutissima* foi de  $37,74 \pm 1,75\%$  ao final do cultivo.

Após 12 horas de processo fermentativo, a concentração de bioetanol, a partir dos carboidratos da microalga *Chlorella minutissima*, foi de  $5,351 \pm 0,309$  g/L.

A produtividade em etanol máxima foi de  $0,432 \pm 0,020$  g/L.h de etanol. A eficiência do processo fermentativo foi de  $52,762 \pm 1,234\%$ .

### REFERÊNCIAS

ABRAHM, T. E.; KRISHNASWAMY, C.; RAMAKRISHNA, S. V. Effects of hydrolysis conditions of cassava on the oligosaccharide profile and alcohol fermentation. *Starch Stärke*, v. 39, p. 237-240, 1990.

AOAC, *Official Methods of Analysis Association*, Method 923.05, chapter 32, Supplement, 1995. 15 p.

BASTOS, V.D. Etanol, Alcoolquímica e Biorrefinarias. *BNDES Setorial*, Rio de Janeiro, n. 25, p. 5-38, 2007.

BERTOLDI, F. C.; SANT'ANA, E.; OLIVEIRA, J.L.V. Revisão: Biotecnologia de Microalgas. *B.CEPPA*, v. 26, n. 1, p. 9-20, 2008.

BRENNAN, L.; OWENDE, P. Biofuels from microalgae-A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renew Sustainable Energy Reviews*, v.14, p. 557-577, 2010.

BRINGHENTI, L.; CABELLO, C. Qualidade do álcool produzido de resíduos amiláceos da agroindustrialização da mandioca. *Energ. Agric.*, v. 20, n. 2, p.36-52, 2005.

- COSTA, J.A.V.; COLLA, L.M.; DUARTE FILHO, P.; KABKE, K.; WEBER, A. Modeling of *Spirulina platensis* growth in fresh water using response surface methodology. *World J. Microb. Biot.*, v. 18, p. 603-607, 2002.
- DISMUKES, G. C. ; CARRIERI, D.; BENNETTE, N.; ANANYEV, G. M.; POSEWITZ, M.C. Aquatic phototrophs: efficient alternatives to land-based crops for biofuels. *Curr. Opin. Biotechnol.*, n.19, p. 235-240, 2008.
- FURLAN, V. J. M.; MARGARITES, A. C. F.; MOREIRA, J. B.; SCHMIDT, V. W., COSTA, J. A. V. Quantificação de Carboidratos em Microalgas In: *XX III Congresso Regional de Iniciação Científica e Tecnológica em Engenharia (Cricte)*, 2009, Joinville/SC.
- GOUVEIA, L.; OLIVEIRA, A. C. Microalgae as a raw material for biofuels production. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, v. 36, p. 269-274, 2009.
- LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. *Biotechnologia Industrial: Processos Fermentativos e Enzimáticos*. 1. ed. v. 3. São Paulo: Edgard Blücher, 2001.
- LOURENÇO, S. O. *Cultivo de microalgas marinhas: Princípios e aplicações*. São Carlos: Rima, 2006. 606 p.
- MIAO, X.; WU, Q. High yield bio-oil production from fast pyrolysis by metabolic controlling of *Chlorella protothecoides*. *J. Biotechnol.*, v.110, p. 85-93, 2004.
- MILLER, G. L. Use of de dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.*, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.
- OURA, E. Effect of aeration intensity on the biochemical composition of Baker's yeast. I Factors affecting the type of metabolism. *Biotechnol. Bioeng.*, v.26, n. 6, p. 1197-1212, 1974.
- REICKS, G.; WOODARD, H. J.; BLY, A. Improving the Fermentation Characteristics of Corn through Agronomic and Processing Practices. *Agronomy J.*, v. 101, 2009.
- RIGANO, V. D. M.; VONA, V.; ESPORITO, S.; CARILLO, P.; CARFAGNA, S.; RIGANO, C. The physiological significance of light and dark NH<sub>4</sub><sup>+</sup> metabolism in *Chlorella sorokiniana*. *Phytochemistry*, v. 47, p. 177-181, 1998.
- SALIK, F.L.M; POVH, N.P. (1993), Método electrofotométrico para determinação de teores alcoólicos em misturas hidroalcoólicas. *Congresso Nacional da Sociedade dos Técnicos Açucareiros e Alcooleiros do Brasil*. São Pedro/SP, p.262-266, 1993.
- SÁNCHEZ, O.J.; CARDONA, C.A., Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. *Bioresour. Technol.*, v. 99, p. 5270-5295, 2008.

SCHMIDELL, W.; LIMA, A. U.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. *Biotechnologia Industrial*. v. 2. São Paulo: E. Blücher, 2001. 254 p.

SHIRAI, F.; KUNII, K.; SATO, C.; TERAMOTO, Y.; MIZUKI, E.; MURAO, S.; NAKAYAMA, S. Cultivation of microalgae in the solution from the desalting process of soy sauce waste treatment and utilization of the algal biomass for ethanol fermentation. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, v. 14. p. 839-842, 1998.

VIDOTTI, E. C.; ROLLEMBERG, M. E. Algas: da economia nos Ambientes Aquáticos à Bioremediação e à Química Analítica. *Quim. Nova*, v. 27, n. 1, p.139-145, 2004.

WATANABE, A. List of algal strains in collection at the Institute of applied microbiology University of Tokyo. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, v. 6, p. 1-4, 1960.