

BIOFIXAÇÃO DE CO₂ DE FERMENTAÇÃO DE CERVEJA UTILIZANDO A MICROALGA *Dunaliella tertiolecta*

CHAGAS, A. L., JARENKOW, A., FOGAÇA, T. F., STECKERT, E. V., AYUB, M. A. Z., RECH, R.

Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos
E-mail para contato: arthurlygeros@gmail.com; rrech@ufrgs.br

RESUMO – O presente trabalho tem como objetivo avaliar o crescimento da microalga (MA) *Dunaliella tertiolecta* pela biofixação do CO₂ liberado pela produção de cerveja, determinando futuramente os carotenoides naturais produzidos. Para isso a microalga foi cultivada em sistemas integrados entre fotobiorreatores e fermentadores. A diferença nos cultivos foi o tipo e a quantidade de CO₂ produzida pelas fermentações. Inicialmente se fez fermentações com meio *Yeast Peptone Dextrose* (YPD) em fermentadores de 2 L sendo acoplados a cada 24 h ao fotobiorreatores em 4 condições distintas, sendo o último fermentador colocado sempre em 144 h de cultivo de MA: 30 g L⁻¹ de dextrose a partir de 72 h do de cultivo de MA, 60 g L⁻¹ de dextrose a partir de 72 h de cultivo de MA, 30 g L⁻¹ de dextrose a partir de 24 h de cultivo de MA e variando a concentração de (10 à 60) g L⁻¹ de dextrose a partir de 24 h de cultivo de MA (YPD (10 à 60) g L⁻¹ / 24 h). Os maiores valores de biomassa e produtividade foram obtidos na condição YPD (10 à 60) g L⁻¹ / 24 h sendo, respectivamente, 1,35 ± 0,112 g L⁻¹ e 0,22 ± 0,019 g L⁻¹ d⁻¹. Para reproduzir a condição YPD (10 à 60) g L⁻¹ / 24 h com a cerveja, foram colocados volumes diferentes de mosto diariamente integrados ao cultivo com MA e os valores obtidos foram menores, 1,10 ± 0,048 g L⁻¹ de biomassa, sem diferença significativa com YPD (10 à 60) g L⁻¹ / 24 h e 0,18 ± 0,011 g L⁻¹ d⁻¹ de produtividade, com diferença significativa através do teste Tukey.

1. INTRODUÇÃO

A emissão de gases do efeito estufa continua crescendo, chegando ao máximo já registrado em 2010. O dióxido de carbono (CO₂) representa atualmente 60 % destes gases (*Intergovernmental Panel on Climate Change*, 2014). Em comparação com o volume de CO₂ produzido pela combustão de combustíveis fósseis, a quantidade de CO₂ emitida por fermentação para se obter etanol - fonte renovável - é pequena. No entanto, há um crescimento na produção de biocombustíveis acompanhado a regulamentos mais restritivos quanto à liberação do seu CO₂ para a atmosfera. Com a sua captura, pode-se obter um balanço negativo de CO₂ na atmosfera (Mollersten *et al.*, 2003; Kheshgi and Prince, 2005 *apud* Xu, Isom e Hanna, 2010). Já a bebida alcoólica mais consumida no mundo, a cerveja, contribui com uma quantidade significativa de CO₂ se comparada aos biocombustíveis, conforme mostra a Tabela 1, e o seu percentual de pureza chega a 99 % (Xu, Isom e Hanna, 2010), muito mais elevado do que o CO₂ de combustíveis fósseis, permitindo a sua utilização na produção de alimentos, por exemplo.

Tabela 1 - Comparação de CO₂ liberado anualmente no mundo por fermentações alcoólicas e pelos combustíveis fósseis

Produção	Ano	Produto (10 ⁹ L ano ⁻¹)	CO ₂ liberado (Mt ^a ano ⁻¹)
Biocombustível	2009	65,6 ^b	49,8 ^b
Cerveja	2010	185 ^c	140 ^c
Combustíveis fósseis	2009	-	31900 ^d

^a Milhões de toneladas métricas.^b *Renewable Fuels Associate*, 2009, *apud* Xu, Isom e Hanna, 2010.^c BMG (2011).^e Estimativa através do cálculo comparativo com os valores de biocombustível (^b), considerando liberação de CO₂ equivalentes para as fermentações alcoólicas.^d *Agence France-Presse*, 2009 *apud* Xu, Isom e Hanna, 2010.

Tecnologias de captura e sequestro de carbono (CCS - do inglês *Carbon Capture and Storage*) vêm sendo criadas para diminuir a concentração do CO₂ na atmosfera por promover a captura deste, entretanto, tais técnicas necessitam da aplicação de substâncias químicas e altos gastos de energia e o CO₂ capturado necessita ser armazenado, ou fixado, para que não retorne ao ar (Bilanovic *et al.*, 2009). Neste contexto, a utilização de microalgas (MA) para biofixação de CO₂ surge como uma alternativa ambientalmente efetiva para a diminuição deste gás na atmosfera, uma vez que é utilizado, através de reações fotoquímicas, por estes microrganismos para sua multiplicação, produção de carboidratos, lipídeos e carotenoides naturais de alto valor agregado como o β-caroteno e a luteína que podem ser utilizados como suplemento alimentar (Dewapriya e Kim, 2014 e Hosseini Tafreshi e Shariati, 2009).

O presente trabalho tem como objetivo avaliar o crescimento da MA *Dunaliella tertiolecta* pela biofixação de CO₂ produzido por dois tipos de fermentação alcoólica, a sintética em meio *Yeast Peptone Dextrose* (YPD) e a para produção de cerveja, determinando futuramente os pigmentos naturais produzidos. Dentre as vantagens da utilização deste sistema está a redução de custo pela utilização de um CO₂ de alta pureza da fermentação sem a necessidade de armazenamento e beneficiamento deste gás, ao passo que 40 % do valor das matérias-primas utilizadas para cultivo de microalgas estão na utilização de CO₂ comprimido (Molina Grima *et al.*, 2003), agregando valor ao CO₂ liberado pela cerveja como, por exemplo, utilizando as MA produzidas na própria cerveja: “*A super nutritious and healthy beer*” (Chacón-Lee e González-Mariño, 2010).

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Para determinação da taxa de geração de CO₂ e da conversão de dextrose em etanol ($Y_{D/E}$), foram realizadas fermentações em duplicatas de (20, 40 e 60) g L⁻¹ de dextrose em Erlenmeyers de 50 mL. A levedura utilizada foi a *Saccharomyces cerevisiae* CAT-1 do banco de leveduras do Laboratório de Biotecnologia (Bioteclab) do ICTA, sendo inoculada a 10 % (v v⁻¹). As concentrações de YPD utilizadas foram de 10 g L⁻¹ de extrato de levedura (Himedia), 20 g L⁻¹ de peptona bacteriológica (Himedia) e a concentração de dextrose (Nuclear) variou de acordo com os ensaios realizados. Os cultivos foram mantidos em câmara incubadora refrigerada com agitação orbital (Marconi MA-830) à 28 °C, 180 rpm e 24 h. Foram retiradas amostras a cada 3 h para determinar concentrações de etanol e açúcares em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Através dos resultados da concentração de

etanol fez-se a conversão por estequiometria para CO₂ acumulado e geraram-se curvas de CO₂ cumulado pelo tempo através de polinômios de grau 3. Essas curvas foram derivadas resultando em curvas de taxa de geração de CO₂ pelo tempo. A partir desses valores foi possível o planejamento e execução de fermentações integradas com fotobiorreatores. Os fermentadores utilizados foram de 2 L com camisa externa para troca térmica, mantidos a 28 °C, sendo posicionados acima dos fotobiorreatores e a saída de CO₂ do fermentador foi conectada ao fundo dos fotobiorreatores.

A *Dunaliella tertiolecta*, mantida pelo banco de algas do laboratório 117 do Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, foi inoculada a 10 % (em volume) em fotobiorreatores tipo placa e *airlift*, com volume útil de 2,4 L, providos de camisa interna mantida a 28 °C, o meio de cultivo utilizado foi o Guillard “f1/2” (Guillard, 1975) modificado com aumento de salinidade e concentração de nitrogênio (Da Fré, 2011), a iluminação foi realizada através de lâmpadas eletrônicas de 30 W gerando uma luminosidade de 18,0 klx e a aeração com vazão de 1 L min⁻¹ de ar comprimido filtrado.

Os seguintes experimentos em duplicatas foram realizados: em 72 h de cultivo de MA foi acoplado o primeiro fermentador com 2 L de YPD e 30 g L⁻¹ de dextrose, após 24 h de cultivo foi retirado e colocado um novo com a mesma concentração. Este procedimento se repetiu até 144 h (YPD 30 g L⁻¹ / 72 h); o mesmo procedimento foi realizado com 60 g L⁻¹ de dextrose (YPD 60 g L⁻¹ / 72 h); em 24 h de cultivo de MA foi acoplado o primeiro fermentador com 2 L de YPD e 30 g L⁻¹ de dextrose, após 24 h de cultivo foi retirado e colocado um novo com a mesma concentração. Este procedimento se repetiu até 144 h (YPD 30 g L⁻¹ / 24 h); em 24 h de cultivo de MA foi acoplado o primeiro fermentador com 2 L de YPD e 10 g L⁻¹ de dextrose, após 24 h de cultivo foi retirado e colocado um novo aumentando a concentração em 10 g L⁻¹ de dextrose em relação ao anterior. Este procedimento se repetiu até 60 g L⁻¹ de dextrose em 144 h (YPD (10 à 60) g L⁻¹ / 24 h).

Para as fermentações com mosto de cerveja, foram utilizados malte tipo pilsen, lúpulo *nugget* 11 % AM T-90 e fermento liofilizado S-33 de alta fermentação, levedura *Saccharomyces cerevisiae*. O preparo foi realizado de forma artesanal. Fermentações foram realizadas em duplicatas e amostras foram retiradas a cada 3 h para determinar concentrações de etanol em CLAE possibilitando a obtenção do CO₂ acumulado e da taxa de geração de CO₂, assim como no realizado com YPD. Para as fermentações integradas com fotobiorreatores e para que a concentração de CO₂ liberada fosse similar à liberada pela fermentação YPD (10 à 60) g L⁻¹ / 24 h, fez-se a variação do volume de mosto de cerveja equivalente calculado através do $Y_{D/E}$ obtido: no início do cultivo de MA foi acoplado o primeiro fermentador com 257 mL de mosto de cerveja. Após 24 h de cultivo foi adicionado o segundo, aumentando o volume em 257 mL de mosto em relação ao anterior. Este procedimento se repetiu até 144 h.

O crescimento da *Dunaliella tertiolecta* foi acompanhado a cada 24 h, com espectrofotômetro Amersham Biosciences modelo Ultrospec 3100 Pro, através da densidade óptica (750 nm) de amostras em duplicatas retiradas diretamente do fotobiorreator (Lourenco, 2006). As leituras de pH foram realizadas através de fita de pH Alkalit® da marca Merck e a intensidade luminosa foi monitorada através de luxímetro digital MS6610 da Akson. O consumo de nitrogênio foi acompanhado diariamente por método colorimétrico, com espectrofotômetro Amersham Biosciences modelo Ultrospec 3100 Pro, através da densidade

ótica (410 nm) de amostras em duplicatas retiradas do fotobiorreator de acordo com Cataldo *et al.* (1975), adaptado. Todas as concentrações de açúcar e etanol foram determinadas por CLAE através do equipamento Shimadzu, empregando-se coluna Bio-Rad Aminex HPX-87H a 45 °C, utilizando H₂SO₄ (Nuclear) como eluente, com fluxo de 0,6 mL min⁻¹ e detector por índice de refração. O volume de amostra injetada foi de 20 µL. As amostras foram previamente centrifugadas, diluídas e filtradas por filtro “Step-Pack” C18 (Milipore).

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Para verificar os instantes em que ocorreu maior liberação de CO₂, quantificar o CO₂ e observar o término das fermentações foi traçado o perfil de produção de etanol em YPD conforme mostra a Figura 1.

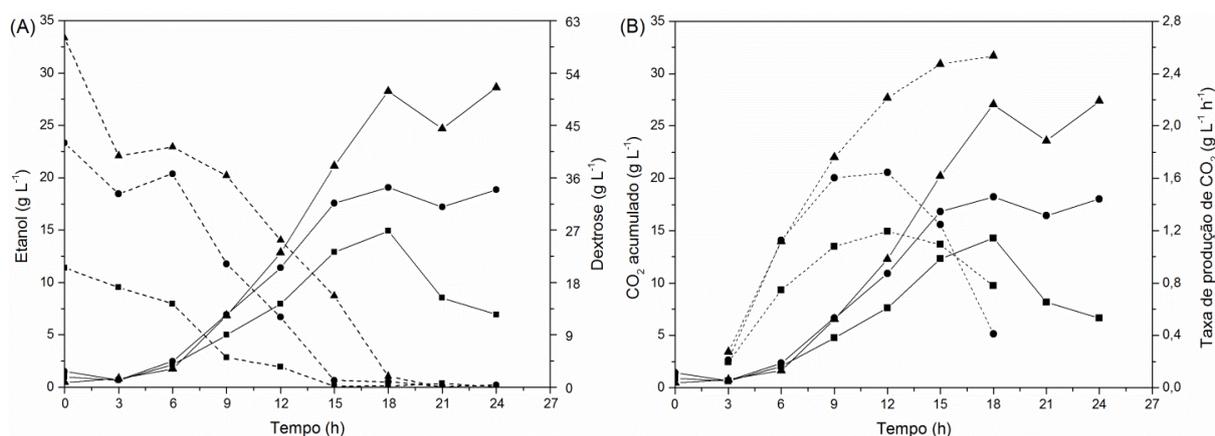


Figura 1 – (A) Curvas de consumo de dextrose e formação de etanol pela *Saccharomyces cerevisiae* CAT-1 em meio YPD. (B) Curvas da massa de CO₂ acumulado por unidade de volume de meio fermentativo e da taxa de produção de CO₂ ao longo das fermentações com YPD. As linhas sólidas representam o eixo esquerdo da ordenada e as tracejadas representam o direito. (■), (●) e (▲) representam, respectivamente, (20, 40 e 60) g L⁻¹ de dextrose.

Com 20 g L⁻¹ de dextrose, foram liberados 14,3 g L⁻¹ de CO₂ e a maior taxa de geração de CO₂ foi 1,15 g L⁻¹ h⁻¹ no tempo 12 h de cultivo. Com 40 g L⁻¹ de dextrose, foram liberados 18,2 g L⁻¹ de CO₂ com taxa de geração de CO₂ foi 1,64 g L⁻¹ h⁻¹ em 12 h de cultivo; com 60 g L⁻¹ de dextrose, foram liberados 27,0 g L⁻¹ de CO₂ e a maior taxa de geração de CO₂ foi 2,05 g L⁻¹ h⁻¹ em 15 h de cultivo. Estes dados foram utilizados para planejar fermentações alcoólicas integradas com fotobiorreatores, as quais foram comparadas com cultivos controle, sem a utilização de CO₂ de fermentações (Figura 2).

Inicialmente foram realizados cultivos com MA colocando os fermentadores em 72 h de cultivo, dando tempo para uma maior formação de biomassa capaz de fixar o CO₂ liberado e para o pH não baixar da faixa ótima (Figura 3 (A) e (B)). O pH dos cultivos de MA foi acompanhado para observar se o pH mínimo ficasse abaixo da faixa entre 6 e 9, considerada ótima para *Dunaliella* (Oren, 2005). Como o pH mínimo obtido foi 7, foram realizadas bateladas integrando os fermentadores em 24 h de cultivo de MA (Figuras 3 (C) e (D)). O pH caiu à 6,5 em 30 h e 57 h de cultivo para YPD 30 g L⁻¹ / 24 h e YPD (10 à 60) g L⁻¹ / 24 h e novamente em 153 h para YPD (10 à 60) g L⁻¹ / 24 h.

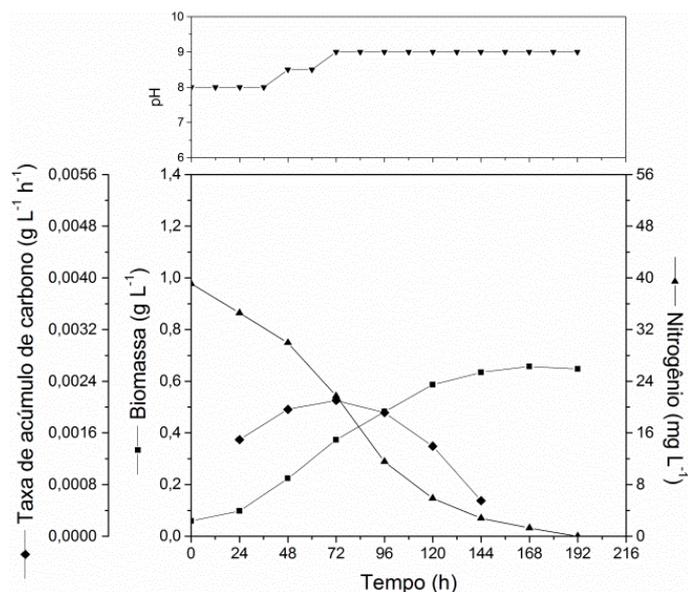


Figura 2 – Curvas das médias dos cultivos controle de *Dunaliella tertiolecta*, sem CO_2 de fermentação.

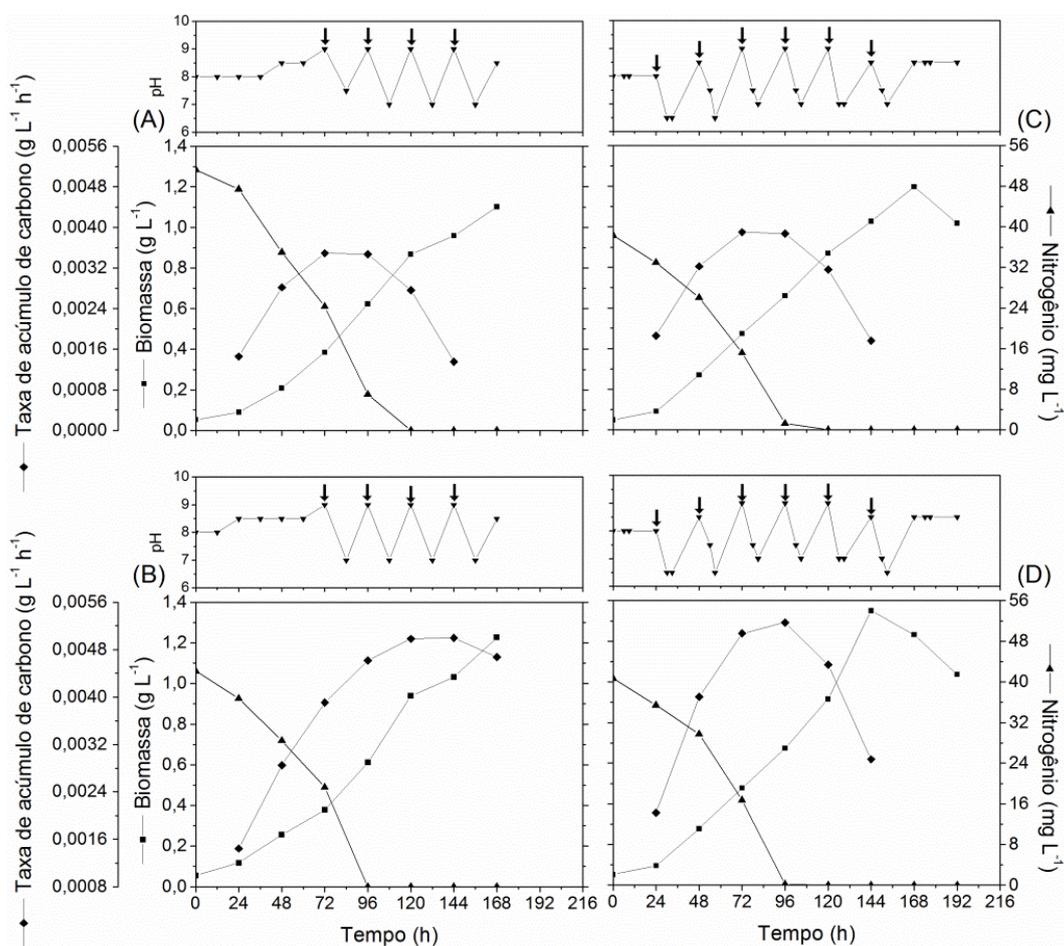


Figura 3 – Curvas do cultivo de *D. tertiolecta* com CO_2 de (A) YPD 30 g L^{-1} / 72 h, (B) YPD 60 g L^{-1} / 72 h, (C) YPD 30 g L^{-1} / 24 h e (D) YPD (10 à 60) g L^{-1} / 24 h. As setas demonstram os instantes em que foram acoplados os fermentadores.

A quantidade de nitrogênio foi suficiente para os cultivos controle, chegando próximo à zero no final das bateladas, já para os cultivos com YPD houve uma maior demanda, pela maior disponibilidade da fonte de carbono e maior produção de biomassa, caindo à zero entre 96 h e 120 h. Com nitrogênio em abundância no meio há uma tendência ao aumento de proteínas e clorofilas nas células, com quantidades baixas verifica-se a diminuição da taxa de divisão celular, proteínas e clorofilas, já os carotenoides e polissacarídeos podem aumentar (Lourenco, 2006).

Os maiores valores obtidos para a taxa de acúmulo de carbono e para biomassa foram, respectivamente, de $0,0052 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ e $1,35 \text{ g L}^{-1}$ no cultivo YPD (10 à 60) $\text{g L}^{-1} / 24 \text{ h}$. Para reproduzir esta condição substituindo o YPD pelo mosto de cerveja, fez-se inicialmente o experimento durante a fermentação da cerveja para verificar o instante em que ocorreu maior liberação de CO_2 , quantificar o CO_2 e observar o término das fermentações, com as mesmas observações sobre o pH feitas nos cultivos com YPD (Figura 4).

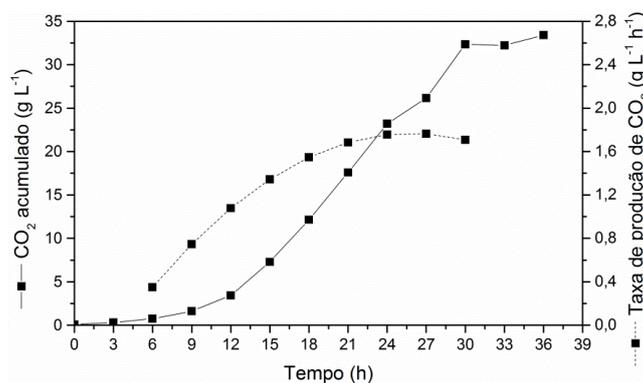


Figura 4 – Curvas da massa de CO_2 acumulado por unidade de volume do mosto de cerveja e da taxa de produção de CO_2 ao longo da fermentação.

Foram liberados $33,4 \text{ g L}^{-1}$ de CO_2 e a maior taxa de geração de CO_2 foi $1,76 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ em 27 h de fermentação. Estes valores ficaram próximos aos da fermentação com 60 g L^{-1} de dextrose. A fermentação cessou entre 30 h e 36 h, sendo mais lenta que a fermentação com YPD, esse fator fez com que o primeiro fermentador fosse integrado ao fotobiorreator no início do cultivo de MA com um volume inicial de mosto de 257 mL calculado através da comparação com 10 g L^{-1} de dextrose e com $Y_{D/E}$ de $0,44 \pm 0,04$. Pode-se observar na Figura 5 os resultados dos cultivos com CO_2 da fermentação da cerveja. Como os fermentadores foram acoplados a cada 24 h e a fermentação de cada reator durou entre 30 h e 36 h, sempre houve CO_2 de fermentação disponível até 156 h de cultivo e o pH se manteve em 7 neste intervalo. O nitrogênio foi consumido de forma mais lenta que em YPD ($10 \text{ à } 60$) $\text{g L}^{-1} / 24 \text{ h}$ sendo esgotado em 168 h de cultivo. A maior taxa de acúmulo de carbono foi de $0,0039 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ficando abaixo do valor de YPD ($10 \text{ à } 60$) $\text{g L}^{-1} / 24 \text{ h}$. Os valores de biomassa, produtividade e velocidade específica de crescimento dos diferentes cultivos de MA estão mostrados na Tabela 2. Todos cultivos com CO_2 de fermentação alcoólica mostraram diferença significativa na biomassa quando comparados com o controle, produzindo praticamente o dobro de biomassa, porém não apresentaram diferença entre si. A maior produtividade foi obtida no cultivo YPD ($10 \text{ à } 60$) $\text{g L}^{-1} / 24 \text{ h}$. Para a velocidade específica de crescimento, o maior valor foi o da cultura com CO_2 de cerveja seguida pelas culturas com YPD iniciando a fermentação

em 72 h, porém sem diferenças significativas. O cultivo controle (sem CO₂) apresentou a menor velocidade específica de crescimento.

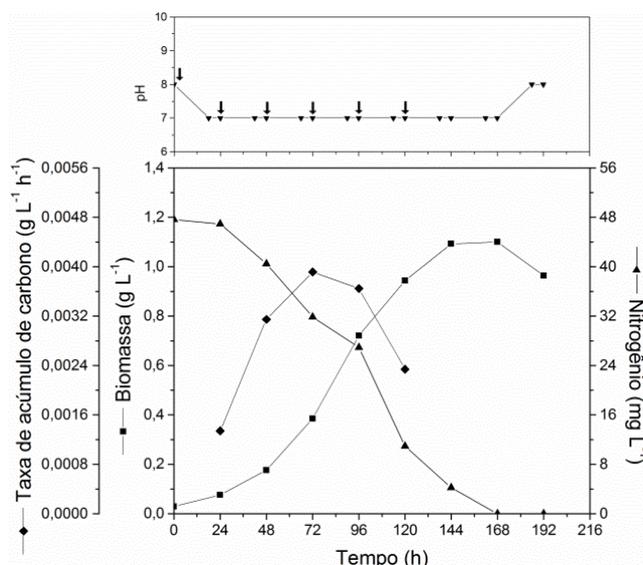


Figura 5 – Curvas do cultivo com CO₂ de fermentação do mosto da cerveja. As setas demonstram os instantes em que foram acoplados os fermentadores.

Tabela 2 – Resultados de biomassa (X), produtividade de biomassa (Q_X) e velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{m\acute{a}x}$) para os cultivos de *D. tertiolecta*

Cultura	X (g L ⁻¹)	Q_X (g L ⁻¹ d ⁻¹)	$\mu_{m\acute{a}x}$ (d ⁻¹)
Controle	0,66 ± 0,066 ^a	0,11 ± 0,002 ^a	0,31 ± 0,018 ^a
YPD 30 g L ⁻¹ / 72 h	1,10 ± 0,006 ^b	0,16 ± 0,006 ^a	0,49 ± 0,064 ^{bcd}
YPD 60 g L ⁻¹ / 72 h	1,23 ± 0,009 ^b	0,18 ± 0,008 ^a	0,44 ± 0,019 ^{abcd}
YPD 30 g L ⁻¹ / 24 h	1,20 ± 0,162 ^b	0,16 ± 0,016 ^a	0,38 ± 0,004 ^{ab}
YPD (10 à 60) g L ⁻¹ / 24 h	1,35 ± 0,112 ^b	0,22 ± 0,019 ^b	0,39 ± 0,016 ^{abc}
Cerveja	1,10 ± 0,048 ^b	0,18 ± 0,011 ^a	0,58 ± 0,056 ^d

Letras iguais na mesma coluna mostram resultados sem diferença significativa entre si pelo teste de Tukey com nível de significância de 5 %.

Rosenberg *et al.* (2011) projetaram o cultivo de *Chlorella vulgaris* em lagoas *ranceway* recebendo CO₂ de biorefinarias de etanol e estimaram uma produtividade de 20 g m⁻² d⁻¹ considerada alta para sistemas abertos. Já *Arthrospira platensis* foi cultivada por Bezerra *et al.* (2013) em fotobiorreatores tubulares, em bateladas alimentadas, utilizando ureia como fonte de nitrogênio e CO₂ de fermentação alcoólica do mosto de melado de cana de açúcar, a biomassa máxima obtida foi de 2960 ± 35 g m⁻³ e a produtividade 425 ± 5,9 g m⁻³ d⁻¹.

4. CONCLUSÕES

O cultivo integrado entre fermentações do mosto de cerveja e fotobiorreatores se mostrou uma boa alternativa para a indústria alimentícia e para o meio ambiente. Uma vez que o CO₂ desprendido pela fermentação é reciclado pelas microalgas, aumentando a sua biomassa e a sua produtividade, reduzindo custos e podendo gerar mais produtos como os carotenoides

naturais. Os resultados deste trabalho demonstraram que esta biomassa ($1,10 \text{ g L}^{-1}$) e esta produtividade ($0,18 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$) praticamente duplicaram em relação ao cultivo com CO_2 atmosférico.

5. REFERÊNCIAS

BEZERRA, R. et al. Fed-Batch Cultivation of *Arthrospira platensis* Using Carbon Dioxide from Alcoholic Fermentation and Urea as Carbon and Nitrogen Sources. *Bioenergy Res.*, v. 6, n. 3, p. 1118-1125, 2013.

BILANOVIC, D. et al. Freshwater and marine microalgae sequestering of CO_2 at different C and N concentrations – Response surface methodology analysis. *Energy Convers. Manage.*, v. 50, n. 2, p. 262-267, 2009.

BMG. (2011). World beer production increased again in 2010. (B.Manager, Ed.). Beverage Manager. Acesso em 7 de abril de 2014, <http://beveragemanager.net>

CATALDO, D. A. et al. Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid 1. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.*, v. 6, n. 1, p. 71-80, 1975.

CHACÓN-LEE, T. L.; GONZÁLEZ-MARIÑO, G. E. Microalgae for “Healthy” Foods— Possibilities and Challenges. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.*, v. 9, n. 6, p. 655-675, 2010.

DA FRÉ, N. C. et al. Influência da Temperatura e da Salinidade no Cultivo da Microalga *Dunaliella tertiolecta* em Fotobiorreator *Airlift*. X Oktoberforum. Disponível em: <http://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/37248/000821420.pdf?sequence=1>

DEWAPRIYA, P.; KIM, S.-K. Marine microorganisms: An emerging avenue in modern nutraceuticals and functional foods. *Food Res. Int.*, v. 56, n. 0, p. 115-125, 2014.

GUILLARD, R. L. Culture of Phytoplankton for Feeding Marine Invertebrates. In: *Culture of Marine Invertebrate Animals*: Springer US, 1975.

HOSSEINI TAFRESHI, A.; SHARIATI, M. *Dunaliella* biotechnology: methods and applications. *J. Appl. Microbiol.*, v. 107, n. 1, p. 14-35, 2009.

INTERGOVERNMENTAL PANEL ON CLIMATE CHANGE, W. G., III. Climate change 2014 mitigation of climate change. [Geneva, Switzerland], 2014. Disponível em: < <http://ipcc.ch/report/ar5/wg3/> >.

LOURENCO, S. D. O. *Cultivo de microalgas marinhas: princípios e aplicações*. São Carlos: RiMa, 2006.

MOLINA GRIMA, E. et al. Recovery of microalgal biomass and metabolites: process options and economics. *Biotechnol. Adv.*, v. 20, n. 7–8, p. 491-515, 2003.

OREN, A. A hundred years of *Dunaliella* research: 1905–2005. *Saline Syst.*, v. 1, n. 1, p. 1–14, 2005.

ROSENBERG, J. N. et al. Microalgal biomass production and carbon dioxide sequestration from an integrated ethanol biorefinery in Iowa: A technical appraisal and economic feasibility evaluation. *Biomass Bioenergy*, v. 35, n. 9, p. 3865-3876, 2011.

XU, Y.; ISOM, L.; HANNA, M. A. Adding value to carbon dioxide from ethanol fermentations. *Bioresour. Technol.*, v. 101, n. 10, p. 3311-3319, 2010.