



## X Congresso Brasileiro de Engenharia Química Iniciação Científica

*“Influência da pesquisa em Engenharia Química no desenvolvimento tecnológico e industrial brasileiro”*

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro  
Universidade Severino Sombra  
Vassouras – RJ – Brasil

### **PRODUÇÃO DE ETANOL CELULÓSICO POR COMPLEXO ENZIMÁTICO DE FUNGO DO CERRADO: EFEITO DO MEIO SÓLIDO NA PRODUÇÃO DA ENZIMA E CARGA DE BAGAÇO NA FERMENTAÇÃO ETÍLICA**

**SOUSA\*<sup>1</sup>, V. C.; GUEDES<sup>2</sup>, K.; PLÁCIDO<sup>2</sup>, M.; LOPES, V.S.<sup>3</sup>;  
FISCHER<sup>3</sup>, J.; CARDOSO, V.L.; FILHO, U.C**

<sup>(1)</sup> Aluna do Curso de Bacharelado em Engenharia Química UFU;

<sup>(2)</sup> Bolsista de iniciação científica do Curso de Bacharelado em Engenharia Química UFU;

<sup>(3)</sup> Alunas do Curso de Pós-Graduação em Engenharia Química UFU

<sup>(4)</sup> Docentes – FEQUI/UFU

*Endereço - Faculdade de Engenharia Química da Universidade Federal de Uberlândia. Av. João Naves de Ávila, 2121, Bloco 1K, Campus Santa Mônica, Uberlândia - MG, CEP 38408-100, e-mail: ucfilho@feq.ufu.br*

**RESUMO** - Na produção de etanol de celulose, a geração de extrato enzimático bruto e a busca por novos microrganismos representam duas estratégias para reduzir o custo do processo. No presente trabalho foi feita a avaliação do potencial do fungo do cerrado, *Chrysonilia sitophila*, para a produção de etanol de segunda geração. A produção de complexos enzimáticos foi realizada com 12 meios de composições distintas, contendo farelo de arroz e bagaço de cana-de-açúcar explodido, e, uma vez selecionado o meio, foi feito o estudo do melhor tempo de produção de etanol, composição e carga. Foi observado que o meio composto de 1/3 de bagaço de cana explodido e 2/3 de farelo de arroz foi o que favoreceu a maior conversão de bagaço em etanol com geração de aproximadamente 5,3 g/L de etanol. No estudo da fermentação etílica, foi observado que ocorreu um aumento significativo na produção de etanol, quando a concentração de bagaço foi aumentada de 190 para 200 g/L, e uma significativa diminuição na produção de etanol, quando a concentração de bagaço foi aumentada de 200 para 220 g/L.

**Palavras chave:** *Chrysonilia sitophila*, bagaço de cana-de-açúcar, celulose.

### **INTRODUÇÃO**

O etanol é gerado desde o fim do século XIX, mas somente nos últimos 20 anos essa técnica se desenvolveu o suficiente para justificar seu uso de forma econômica no mercado de combustíveis. Na produção deste combustível, a sacarificação pelo uso de

complexo enzimático representa a etapa de maior custo e a fermentação em estado sólido (FES) surge como uma das técnicas mais utilizadas para a produção deste complexo enzimático (LEVER et al., 2010).

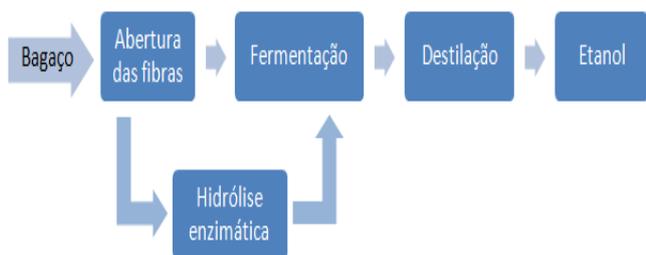
O estudo da produção de complexos enzimáticos pelo uso de diferentes microrganismos representa um tipo de pesquisa de interesse para redução de custos

da produção de etanol de celulose, e a busca por novos microrganismos é uma destas atividades, sendo que o Cerrado representa um dos ambientes de interesse por ter grandes dimensões e variada biodiversidade (MUSSATO et al.,2010).

No presente trabalho, foi feita a avaliação do potencial de um dos fungos do Cerrado na produção de complexo enzimático celulósico pelo uso do fungo *Chrysonilia sitophila*. A produção de complexos enzimáticos foi realizada com composições de meio sólido distintas em 72 h de FES e com a melhor composição de meio sólido, foi estudado o efeito do tempo de fermentação gasto na produção do extrato enzimático (FES) na geração de proteínas, crescimento celular da FES e produção de etanol pelo uso do extrato enzimático gerado na FES.

Na produção de energia por resíduos agroindustriais, tem-se o interesse na produção de etanol de segunda geração, com o uso do bagaço de cana-de-açúcar que representa uma fonte potencial de etanol, pois é um resíduo lignocelulósico abundante no Brasil (SANTOS et al., 2008, PANDEY et al., 2000).

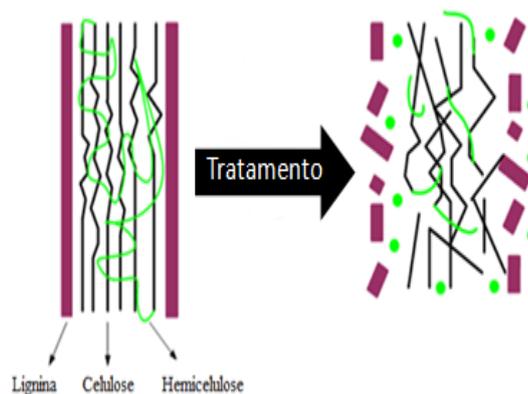
O processo de produção de etanol celulósico de bagaço de cana pode ser descrito em quatro etapas principais de acordo com a Figura 1: pré-tratamento do bagaço de cana para a abertura das fibras, hidrólise enzimática, fermentação e destilação.



**Figura 1.** Principais processos utilizados para a produção de etanol celulósico.

A etapa de abertura das fibras pode ser realizada de diversas formas como, por exemplo, pela explosão a vapor, na qual vapor de água em condições de temperatura e pressão gera a ruptura do material

lignocelulósico em celulose, hemicelulose e lignina como mostrado a Figura 2.



**Figura 2.** Representação do complexo lignocelulósico antes e depois de um tratamento para abertura das fibras.

Na produção de etanol de segunda geração, concentrações de etanol variáveis entre 12 g/L e 21 g/L são citadas na literatura (SUKUMARAN et al, 2009; LEVER et al, 2010), sendo que os desafios deste processo são o aumento da concentração de etanol e redução do custo operacional, principalmente na etapa de hidrólise, a qual vem sendo estudada de diferentes formas na busca de novos microrganismos e evolução da produção de enzima por fermentação em estado sólido (FES) como etapa adicional do processo fermentativo (Figura 3).



**Figura 3.** Principais processos utilizados para a produção de etanol celulósico com destaque para a hidrólise enzimática (Fonte: autores).

No presente trabalho, foram avaliadas tanto a etapa de geração de enzima quanto a etapa de produção de etanol, utilizando complexo de enzima de fungo do Cerrado e bagaço de cana-de-açúcar tratado por explosão a vapor.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Microrganismos

Na produção do extrato enzimático, foi utilizado o fungo do Cerrado da região do Triângulo Mineiro/MG *Chrysonilia sitophila*, que foi isolado pelos autores pela técnica de esgotamento em placa de petri, com semeadura feita estria e identificação por características morfológicas no Laboratório Exame SA (Uberlândia, MG). O mesmo era preservado em tubos de ensaio, contendo meio ágar Czapek incubado em estufa ( $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ) por 5 dias para o crescimento e posteriormente, conservado sob refrigeração com renovação de cultivo a cada 20 dias. Na produção de etanol foi utilizada a *Saccharomyces cerevisiae* Y904 (Sc) na forma liofilizada, que era ressuspensa em extrato enzimático da FES nas fermentações alcoólicas.

### Fermentação em estado sólido (FES)

Foram realizadas fermentações em estado sólido para produção de extrato enzimático destinado a hidrólise da celulose em açúcares para uso nas fermentações alcoólicas (itens 2.3 e 2.4). Em cada FES os meios sólidos foram inoculados com  $10^5$  a  $10^6$  esporos/g de *Chrysonilia sitophila* suspenso em água. Os esporos foram obtidos por centrifugação de células geradas por fermentação em meio Czapek líquido ( $30^{\circ}\text{C}$ , 48h), e a FES foi realizada em erlenmeyers de 500 mL contendo 50 g de meio sólido com 51% de umidade, 34 mL de soro de leite na concentração 60g/L e 34 mL do inóculo.

As FES foram realizadas em dois conjuntos de ensaios destinados à produção de extratos enzimáticos de sacarificação. No primeiro, fermentações em estado sólido foram conduzidas por 72 horas, utilizando 12 composições de meio sólido distintas, como mostrado a Tabela 1, nas quais foi avaliada a concentração de etanol ao final da fermentação alcoólica. No segundo conjunto de ensaios, avaliou-se o efeito do tempo de FES na qualidade do extrato enzimático, com a utilização de composição de meio de FES fixo correspondente ao meio sólido que gerou o

melhor extrato enzimático do primeiro conjunto de ensaios.

Tabela 1 – Composição do meio de fermentação em estado sólido (proporção em volume)

Meio	Bagaço de cana tratado	Farelo de arroz	Palha de arroz
1	0%	50%	50%
2	0%	33%	67%
3	0%	67%	33%
4	50%	50%	0%
5	67%	33%	0%
6	33%	67%	0%
7	50%	0%	50%
8	33%	0%	67%
9	67%	0%	33%
10	33%	33%	33%
11	100%	0%	0%
12	0%	100%	0%

### Produção de etanol

O substrato utilizado para a produção de etanol foi composto de bagaço de cana *in natura* e bagaço de cana tratado por explosão de vapor, pelo método de Cromatografia de Alta Eficiência (HPLC). Foram usados 200 g/L de bagaço (16 g de bagaço de cana tratado e 4 g de bagaço *in natura* para 100 mL de extrato enzimático) em fermentações em erlenmeyers, sobre mesa agitada com volume total de 250 mL. Todas as fermentações de produção de etanol, foram realizadas na temperatura de  $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , concentração de inóculo de 30 g/L e tempo de fermentação de 48 h.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram apresentadas na Figura 3 as concentrações de etanol associadas à hidrólise do bagaço, pois testes de fermentação alcoólica do extrato enzimático puro, não apresentados neste trabalho, mostram que não há formação de etanol associada à fermentação do extrato enzimático. Pode-se notar que o meio M6, composto de 33% de bagaço de cana tratado e 67% de farelo de arroz foi o que favoreceu a maior conversão de bagaço em etanol com geração de aproximadamente 5,3

g/L de etanol. Assim este meio foi utilizado nos estudos seguintes.

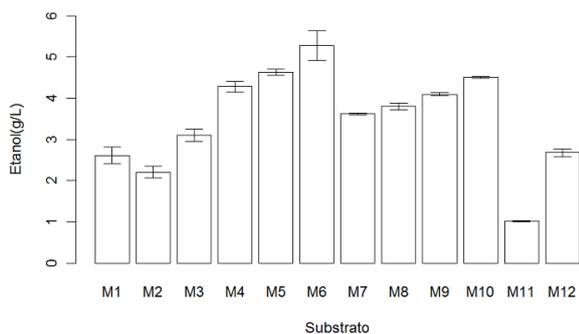


Figura 3 – Efeito da composição do meio de FES na produção etanol

A Figura 4 é mostrada a avaliação da produção de etanol na melhor composição de meio, formulação M6, para diferentes tempos de FES. Pode-se observar que, entre os tempos testados, o de maior concentração de etanol foi o de 72 horas de fermentação em estado sólido.

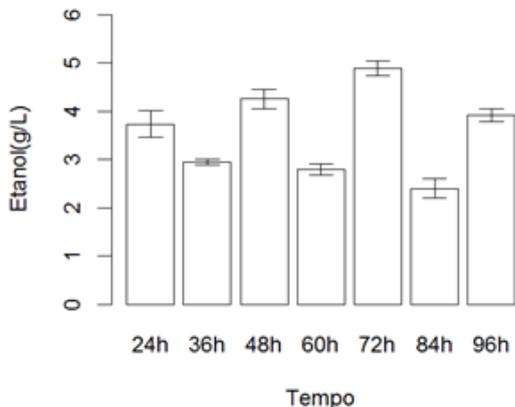


Figura 4 – Concentração de etanol para diferentes tempos de FES

O efeito da carga do reator e percentagem de bagaço, para o melhor tempo de desempenho (72h) é apresentado na figura 5 que mostra que, tanto a carga quanto a porcentagem de bagaço de cana-de-açúcar são variáveis importantes na fermentação alcoólica, sendo que os melhores resultados foram, para a situação de menor carga e menor porcentagem de bagaço. Outro fato observado é que a produção de etanol, utilizando o fungo do Cerrado, foi expressiva quando comparada com a literatura. Sukumaran e colaboradores,

por exemplo, em estudo semelhante obtiveram 12,3 g/L de etanol.

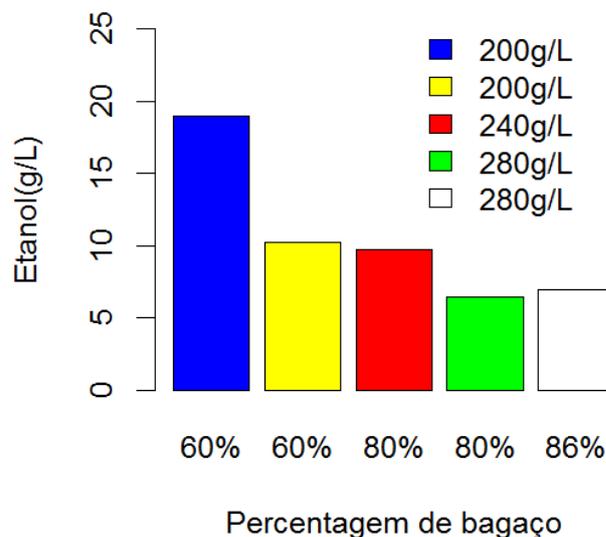


Figura 5- Concentração de etanol para diferentes cargas de bagaço de cana-de-açúcar e inerte no reator.

## CONCLUSÃO

Os resultados indicaram a potencialidade do emprego do fungo *Chrysonilia sitophila* para degradação da celulose. A FES apresentou os melhores resultados quando conduzida em 72 horas com substrato composto por 33% de bagaço de cana tratado com explosão a vapor e 67% de farelo de arroz.

A produção de etanol utilizando fungo do Cerrado nas condições estudadas foi satisfatória e é influenciada tanto pela carga de bagaço de cana-de-açúcar quanto pela proporção do mesmo.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

FISCHER, J.; LOPES, V. S.; RAMADAN, L.; FERREIRA, J. V. G.; GALVÃO, C. M. A.; TEODORO, J. C.; FILHO, U. C.; CARDOSO, V. L. Produção de extrato enzimático e etanol celulósico. 7º Congresso Internacional de Bioenergia, São Paulo – SP, 2012.

FISCHER, J.; SILVA, N. K. G.; ROCHA, N. R. A. F.; FILHO, U. C.; CARDOSO, V. L.

Avaliação do potencial de fungos do Cerrado na produção de celulase: um estudo bidimensional. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS, 18., 2011, Caxias do Sul. **Anais...** Caxias do Sul, 2011.

LEVER, M; HO, G.; F RUWISCH, R. Ethanol from lignocellulose using crude unprocessed cellulase from solid-state fermentation *Bioresource Technology*, v. 101, p.7083–7087, 2010.

LEVER, M.; HO, G.; CORD-RUWISCH, R. Ethanol from lignocellulose using crude unprocessed cellulase from solid-state fermentation. **Bioresource Technology**, n. 101, p. 7083-7087, 2010.

MOSIER, N.; WYMAN, C.; DALE, B.; ELANDER, R.; LEE, Y. Y.; HOLTZAPPLE, M.; LADISCH, M. R. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, n. 96, p. 673-686, 2005.

SUKUMARAN, R., K.; SINGHANIA, R. R.; MATHEW, G. M.; PANDEY, A. Cellulase production using biomass feed stock an its application in lignocelluloses saccharification for bio-ethanol production. **Renewable Energy**, n. 34, p. 421-424, 2009.

### **AGRADECIMENTOS**

Os autores agradecem a CAPES, CNPq e FAPEMIG pelo apoio financeiro, e ao CTC pela doação do bagaço de cana-de-açúcar.