

ESTUDO DA PRODUÇÃO DE ETANOL DE BAGAÇO DE CANA POR COMPLEXO ENZIMÁTICO E *Pichia stipitis*

J. FISCHER¹, V. S. LOPES¹, E. F. Q. SANTOS¹, B. MENDONÇA¹, S. L. CARDOSO¹, U. COUTINHO FILHO¹, V. L. CARDOSO¹

¹ Universidade Federal de Uberlândia, Faculdade de Engenharia Química.
E-mail para contato: janaffischer@hotmail.com

RESUMO- A crescente demanda comercial de etanol alavancou estudos sobre produção de etanol de segunda geração, como forma de reduzir a dependência do petróleo e ampliar a matriz energética brasileira. Neste contexto, se insere o presente trabalho, que estuda a produção de etanol por fermentações alcoólicas de *Saccharomyces cerevisiae* e *Pichia stipitis* com de bagaço de cana tratado. A produção de etanol foi realizada por processo de sacarificação e fermentação simultânea em reator batelada com os complexos enzimáticos brutos e 25 % de bagaço de cana-de-açúcar tratado por explosão a vapor, utilizando as leveduras *P. stipitis* e *S. cerevisiae* na forma conjuntas e sequencial, em diferentes pH, 6,5, 5,5 e 4,5 e tempos de fermentação alcoólica. Os melhores resultados foram obtidos com o uso sequencial de *S. cerevisiae* e *P. stipitis*: produtividade de 0,30 g/L.h para 48 de fermentação e concentração de etanol de 14,7 g/L com rendimento de 0,294 g etanol/g celulose para 72 h de fermentação.

1. INTRODUÇÃO

O esgotamento dos combustíveis fósseis incentiva a busca por fontes de energia renovável, como o etanol com base em matérias-primas ricas em carboidratos complexos, incluindo amido, oligossacarídeos e biomassa celulósica. Geralmente, o etanol produzido a partir de carboidratos complexos segue quatro etapas de processo: pré-tratamento da biomassa para abertura das fibras, hidrólise enzimática para obtenção de açúcares fermentescíveis, fermentação destes açúcares em etanol, separação e purificação (Binod *et al.*, 2012, Rocha *et al.*, 2013).

Em processos de produção de bioetanol celulósico, o aproveitamento de resíduos agroindustriais deve ser visto como um processo integrado, com utilização da lignina, assim como a fermentação dos açúcares, hexoses e pentoses, presentes na biomassa de celulose. Neste contexto, o uso de microorganismos capazes de fermentar as pentoses representa uma necessidade para pleno aproveitamento

da biomassa. Entre todos os micro-organismos capazes de fermentar pentoses (xilose e arabinose), a levedura *Pichia stipitis* se destaca pela sua capacidade natural de realizar estas fermentações e produzir diretamente etanol (Lin *et al.*, 2012; Agbogbo, Coward-Kelly, 2008).

As pentoses são geradas tanto no pré-tratamento de biomassas ricas em celulose, como no processo de hidrólise enzimática necessário para liberação de glicose da biomassa, de forma a favorecer a fermentação tradicional da glicose, por *Saccharomyces cerevisiae*. As fermentações alcoólicas podem ser realizadas de forma conjunta com a *Pichia*, visando conjugar o melhor crescimento e produção de etanol de *S. cerevisiae* a facilidade de fermentação de pentose em metabolismo diáuxico que só favorece a fermentação de pentoses ao fim da conversão de hexoses (Lin *et al.*, 2012; Grootjen *et al.*, 1990).

Entre as diferentes investigações de uso conjunto de *Saccharomyces* e *Pichia* tem-se o interesse de redução do custo de uso de celulases, que hoje é o principal obstáculo à utilização de biomassa celulósica. Neste contexto, o objetivo deste avaliar a utilização de *Pichia stipitis* e *Saccharomyces cerevisiae* na fermentação de alcoólica simultânea e ampliar os estudos do uso de complexos enzimáticos brutos produzidos por fermentação em estado sólido (FES) de resíduos agroindustriais na hidrólise enzimática dos materiais lignocelulósicos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Micro-organismos e biomassas

Foi utilizado *Aspergillus niger* (I5), selecionado entre 66 culturas de fungos coletados do Cerrado do Triângulo Mineiro (Uberlândia/MG) (Fischer *et al.*, 2013). A levedura utilizada nas fermentações alcoólicas foi a cepa *Saccharomyces cerevisiae* Y904, produzida pela Mauri Brasil Ind. Com. Ltda, na forma liofilizada e também foi utilizada *Pichia Stipitis* (ATCC 58376). As biomassas utilizadas foram: farelo do beneficiamento de arroz, obtido de uma beneficiadora da região, e bagaço de cana-de-açúcar, pré-tratado com explosão a vapor na condição de baixa severidade (12 kgf/cm², 8 min.), gentilmente cedido pelo CTC (Centro de Tecnologia Canavieira) de Piracicaba/SP. Todos os micro-organismos e biomassas foram estocados sob refrigeração (5 ± 1°C).

2.2. Fermentações

Fermentação em estado sólido (FES): As FES destinadas à produção de complexo enzimático bruto foram realizadas em reator estático, contendo 10⁷ a 10⁸ células/g de *Aspergillus niger* e substrato sólido, sendo 60% de farelo do beneficiamento de arroz e 40% de bagaço de cana-de-açúcar tratado (composição média em base seca, %: celulose 62,4, hemicelulose 15,1 e lignina 23,2 Fischer, 2014). O tempo de fermentação foi de 72 h e a temperatura de 30 ± 1°C. Os complexos enzimáticos foram extraídos com solução de Tween 80 (1%) em água (Fischer *et al.*, 2013).

Fermentação alcoólica: a produção de etanol foi realizada com complexo enzimático bruto, com sacarificação e fermentação simultâneas de bagaço de cana tratado, em reator batelada de 250 mL com volume reacional de 100 mL (25 g de bagaço para 100 mL de extrato enzimático), sobre mesa

agitada a 150 rpm, $30 \pm 1^\circ\text{C}$. As leveduras *Pichia stipitis* e *Saccharomyces cerevisiae* foram utilizadas nas concentrações iniciais de inóculo de 10^8 células/mL e 30 g/L, respectivamente, em cinco condições distintas descritas na Tabela 1.

Tabela 1 – Condições de fermentação alcoólica conjunta por *P. stipitis* e *S. cerevisiae* com diferentes formas de adição de micro-organismo e correção de pH*

Experimento	Descrição
A	Inóculo com células de <i>P. stipitis</i> e <i>S. cerevisiae</i> foi adicionado no início da fermentação e o pH inicial de fermentação de 6,5.
B	pH de fermentação de 5,5 e demais condições idênticas das descritas no experimentos A
C	pH de fermentação de 4,5 e demais condições idênticas das descritas no experimentos A
D	Início da fermentação com inóculo de <i>S. cerevisiae</i> em pH 4,5, seguido pela adição de um segundo inóculo de <i>P. stipitis</i> após 24 h de fermentação, sendo que o pH no momento de adição de segundo inóculo foi corrido para 6,5.
E	Início da fermentação com inóculo de <i>P. stipitis</i> em pH 6,5, seguido pela adição de um segundo inóculo de <i>S. cerevisiae</i> após 48 h de fermentação com correção do pH no momento de adição de segundo inóculo para 4,5.

*Nota: ajuste do pH do meio feita pela adição de HCl 0,1M e NaOH 0,1M.

2.3. Métodos analíticos

A concentração de etanol, pentoses e hexoses foi determinada por cromatografia líquida (Shimadzu model LC-20A Prominence, coluna Ca Supelcogel), a solução de arraste utilizada foi água deionizada, a vazão de 0,5 mL/min, temperatura do forno de 80°C e volume de injeção de 20 μL . A atividade da celulase total (*FPase*) foi determinada pela hidrólise de papel de filtro Whatman n^o1. Para determinação da atividade das exoglucanases utilizou-se solução de celulose cristalina (Avicel) como substrato. A atividade da endocelulase foi determinada pela hidrólise de carboximetilcelulose (CMC) e a atividade de β -glicosidase (celobiase) determinada pela hidrólise de celobiose (Ghose, 1987; Adriano, 2008).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A avaliação dos extratos enzimáticos brutos produzidos mostrou que o mesmo apresentou atividade em *FPase* de 1,51 (UFP/mL), β -glicosidade 1,05 ($U_{\text{Celobiose}}/\text{mL}$), exoglucanase 0,23 ($U_{\text{Avicel}}/\text{mL}$) e endoglucanase 1,33 (U_{CMC}/mL), demonstrando que o mesmo tem potencial para degradação da celulose.

Na Tabela 2 são apresentados os resultados da fermentação de *P. stipitis* e *S. cerevisiae*, em pH 6,5, pode se observar que a *P. stipitis* tem a capacidade de fermentar pentoses e hexoses e o tempo de 24 h é adequado para o processo, pois para 48 h não houve aumento na concentração de etanol. O valor da concentração de etanol de 10,8 g/L obtido após 24 h sugere que o uso de hidrólise simultânea

a fermentação é uma proposta promissora, pois os resultados de etanol obtidos nesta configuração podem ser melhorados, tanto pelo uso de estratégias distintas de alimentação de bagaço durante a fermentação, como pelo uso de aditivos, a exemplo da lacase e líquidos iônicos (Li *et al.*, 2014; Lever *et al.*, 2010).

Tabela 2 – Concentrações dos diferentes constituintes de meio para diferentes tempos de fermentação alcoólica e pH 6,5 - Teste A

	<i>P. stipitis</i> + <i>S. cerevisiae</i> 24 h	<i>P. stipitis</i> + <i>S. cerevisiae</i> 48 h
Glicose (g/L)	-	-
Celobiose (g/L)	-	-
Xilose (g/L)	5,79	1,05
Manose (g/L)	2,65	2,20
Arabinose (g/L)	2,58	2,83
Glicerol (g/L)	-	0,80
Etanol (g/L)	10,8	10,8

Também pode ser observado na Tabela 2, que uso dos micro-organismos conjuntamente, no pH testado, deve ser reavaliado em outras condições de pH ou ainda de adição de micro-organismos em diferentes etapas de fermentação, pois a concentração de etanol (10,8 g/L) esteja próxima da citada na literatura por diversos pesquisadores para utilização de *S. cerevisiae* (SUKUMARAN *et al.*, 2009; LEVER *et al.*, 2010; ROCHA *et al.*, 2013). Há a possibilidade de comportamento diáuxico da *P. stipitis*, competindo com a *S. cerevisiae*, que faz com que na abundância de glicose ela venha à só utilizar pentoses ao esgotamento da glicose (GROOTJEN, 1991; LIN *et al.*, 2012).

Nas Tabelas 3 e 4 são apresentados os resultados da fermentação conjunta de *P. stipitis* e *S. cerevisiae* em condições dos experimentos B e C (Tabela 1). Pode-se observar que a redução do pH favorece o crescimento da *Saccharomyces* e consequentemente a produção de maior quantidade de etanol. Este fato deve-se ao pH próximo a 4,5 ser valor usual nas fermentações com esta levedura.

Tabela 3 – Concentrações dos diferentes constituintes de meio para diferentes tempos de fermentação alcoólica pH 5,5 - Teste B

Componentes	<i>P. stipitis</i> + <i>S. cerevisiae</i> 24 h	<i>P. stipitis</i> + <i>S. cerevisiae</i> 48 h
Glicose (g/L)	-	-
Celobiose (g/L)	-	2,67
Xilose (g/L)	4,26	3,98
Manose (g/L)	2,38	2,44
Arabinose (g/L)	3,65	2,32
Glicerol (g/L)	1,06	0,79
Etanol (g/L)	8,38	7,9

Tabela 4 – Concentrações dos diferentes constituintes de meio para diferentes tempos de fermentação alcoólica pH 4,5 - Teste C

Componentes	<i>P. stipitis</i> + <i>S. cerevisiae</i> 24 h	<i>P. stipitis</i> + <i>S. cerevisiae</i> 48 h
Glicose (g/L)	-	-
Celobiose (g/L)	-	-
Xilose (g/L)	5,49	5,92
Manose (g/L)	2,52	2,30
Arabinose (g/L)	2,43	2,60
Glicerol (g/L)	1,22	1,18
Etanol (g/L)	10,2	10,1

A comparação entre os melhores resultados dos experimentos A, B e C (Tabela 2 a 4) mostram que na fermentação com adição simultânea dos micro-organismos, os valores de pHs de 4,5 e 6,5 foram mais adequados, e por esta razão, estes pHs foram usados nos experimentos D e E.

Nas Tabelas 5 e 6 são apresentados os resultados da concentração de etanol para o uso de sequencial da adição de *S. cerevisiae* e *P. stipitis*, com adição inicial de *P. stipitis* em 24 h de processo (Tabela 5) e com adição inicial de *P. stipitis* seguida de *S. cerevisiae* após 48 h (Tabela 6). Pode-se observar que a fermentação nestas seqüências favorece a maior produção de etanol, pois reduz o metabolismo diáuxico que leva a *Pichia* a consumir primeiro a glicose. Outro fato que pode ser observado é a que fermentação com a *P. stipitis* é mais favorecida para pH de 6,5 comparado com pH 4,5.

A comparação entre os resultados das Tabelas 5 e 6 (adição sequencial de micro-organismos) com os resultados de adição simultânea (Tabelas 2, 3 e 4), mostra que a adição sequencial dos microrganismos representam a estratégia de cofermentação mais favorável, sendo que no uso sequencial de *S. cerevisiae* e *P. stipitis* a produtividade de 0,30 g/L.h para 48 h de fermentação a concentração de etanol foi de 14,7 g/L com rendimento de 0,294 g etanol/g celulose para 72 h de fermentação, este resultado favorece 1,11 vezes mais etanol do que o processo sequencial de *P. stipitis* e *S. cerevisiae*.

Tabela 5 - Concentrações dos diferentes constituintes de meio para diferentes tempos de fermentação alcoólica - Teste D

Componentes	<i>S. cerevisiae</i> 24 h	<i>P. stipitis</i> 24 h	<i>P. stipitis</i> 48 h	<i>P. stipitis</i> 72 h
Xilose (g/L)	3,82	1,68	0,18	-
Manose (g/L)	2,31	2,91	2,42	0,37
Arabinose (g/L)	2,15	0,71	1,08	0,91
Glicerol (g/L)	1,32	1,30	1,11	0,47
Etanol (g/L)	12,8	14,4	14,7	14,2

Tabela 6 - Concentrações dos diferentes constituintes de meio para diferentes tempos de fermentação alcoólica - Teste E

Componentes	<i>P. stipitis</i> 24 h	<i>P. stipitis</i> 48 h	<i>S. cerevisiae</i> 24 h	<i>S. cerevisiae</i> 48 h
Xilose (g/L)	3,31	0,93	-	-
Manose (g/L)	2,23	1,47	0,82	0,82
Arabinose (g/L)	2,00	0,15	0,14	0,30
Glicerol (g/L)	1,29	1,23	0,98	0,40
Etanol (g/L)	11,9	13,7	13,3	13,1

4. CONCLUSÃO

A comparação entre uso de fermentações sequenciais de *S. cerevisiae* e *P. stipitis* e fermentações sequências de *P. stipitis* e *S. cerevisiae* mostram que a primeira situação favorece mais a produção de etanol sendo que o pH 4,5 foi o mais favorável para *S. cerevisiae* e pH 6,5 para *P. stipitis*. Estes resultados mostram caminhos promissores na produção de etanol de resíduos lignocelulósicos e extratos enzimáticos brutos.

5. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao CNPq (Projeto 550940/2010-3, Edital 046/2009), FAPEMIG (Processo PCE-00089-14) e UFU pelo apoio financeiro e ao Centro de Cultura Canavieira (CTC) pela parceria em estudos conjuntos relacionados à produção de etanol.

6. REFERÊNCIAS

- AGBOGGO, F.K.; COWARD-KELLY, G. Cellulosic ethanol production using the naturally occurring xylose-fermenting yeast, *Pichia stipitis*. *Biotechnol Lett.*, v. 30, n.9, p.1515-1524, 2008.
- ADRIANO, W. S. *Preparação e Caracterização de Derivados de Enzimas Industriais em Quitosana*. 2008. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP.
- BINOD, P.; KUTTIRAJA, M.; ARCHANA, M.; USHA, J.K.; SINDHU, R.; SUKUMARAN R.K.; PANDEY, A. High temperature pretreatment and hydrolysis of cotton stalk for producing sugars for bioethanol production, *Fuel*, v. 92, p. 340-345, 2012.
- FISCHER, J. *Produção de etanol de segunda geração pelo uso de complexo enzimático de cepas selecionadas do ecossistema do Cerrado*, 2014. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Uberlândia. Faculdade de Engenharia Química, Uberlândia, MG.
- FISCHER, J.; LOPES, V.; GALVÃO, C.; TEODORO, J.; FILHO, U.; CARDOSO, V. Utilization of Cheese Whey and Cellulosic Biomass for Production of Ethanol by Selected Fungi Strain from Brazilian Savannas. *Chem. Eng. Trans.*, v. 32, p. 1075-1080, 2013.

- GHOSE, T. K. Measurement of Cellulase Activities. *Pure and Applied Chemistry*, v. 59, n. 2, p. 257-268, 1987.
- GROOTJEN, D.R.J.; MEIJLIK, H.H.M.; LANS, R.G.K.M.; LUBEN, A.M. Cofermentation of glucose and xylose with immobilized *Pichia stipitis* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Enzyme Microb. Technol.*, v.12, p. 859-864, 1990.
- LEVER, M.; HO, G.; CORD-RUWISCH, R. Ethanol from lignocellulose using crude unprocessed cellulose from solid-state fermentation. *Bioresour. Technol.*, v. 101, n. 18, p. 7083-7087, 2010.
- LI, J.; LIN, J.; ZHOU, P.; WU, K.; LIU, H.; XIONG, C.; GONG, Y.; XIAO, W.; LIU, Z. One-pot simultaneous saccharification and fermentation: a preliminary study of a novel configuration for cellulosic ethanol production. *Bioresour. Technol.*, v. 161, p. 171-178, 2014.
- LIN, T.H.; HUANG, C.F.; GUO, G.L.; HWANG, W.S.; HUANG, S.L. Pilot-scale ethanol production from rice straw hydrolysates using xylose-fermenting *Pichia stipitis*. *Bioresour. Technol.*, v.116, p. 314-319, 2012.
- ROCHA, N.R.A.F.; BARROS, M.A.; FISCHER, J.; FILHO, U.C.; CARDOSO, V. L. Ethanol production from agroindustrial biomass using a crude enzyme complex produced by *Aspergillus niger*. *Renewable Energy*, v. 57, p. 432-435, 2013.
- 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.