

# PRODUÇÃO DE BIOETANOL DE PAPEL DE ESCRITÓRIO DESCARTADO POR *Spathaspora passalidarum* HMD 14.2 UTILIZANDO HIDRÓLISE ÁCIDA E ENZIMÁTICA

B. R. A. ALENCAR, J. M. T. S. ROCHA, H. G. MOTA e E. R. GOUVEIA.

Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Antibióticos

**RESUMO** – O descarte de papel representa cerca de 40 % do total de dejetos sólidos. Visto que a sua composição contém 50 % de celulose e 15 % de hemicelulose, o papel tem potencial para a produção de bioetanol economicamente competitivo. O objetivo deste trabalho foi a produção de bioetanol de papel de escritório descartado utilizando *Spathaspora passalidarum* HMD 14.2, após hidrólise enzimática. Foram realizados pré-tratamentos em mesa incubadora rotativa e em autoclave, com 8 % m/V de papel e ácido sulfúrico diluído. O pré-tratamento em autoclave, com ácido sulfúrico, gerou a perda de açúcares fermentescíveis, sendo selecionado o pré-tratamento em mesa incubadora rotativa para a posterior hidrólise enzimática. O hidrolisado enzimático foi utilizado para a fermentação. Foi realizada a quantificação de glicose, xilose e etanol por cromatografia líquida de alta eficiência. Rendimento de 0,37 g/g e eficiência de 72,6 %, em relação à glicose e xilose consumidas pela *Spathaspora passalidarum* HMD 14.2, foram obtidos, indicando o potencial desta levedura para a produção de bioetanol, a partir de meios contendo glicose e xilose.

## 1. INTRODUÇÃO

A utilização dos açúcares oriundos da etapa de pré-tratamento das frações celulósica e hemicelulósica presentes na biomassa de composição lignocelulósica é essencial para a produção viável de etanol. Entretanto, a levedura industrialmente utilizada, *Saccharomyces cerevisiae*, não pode metabolizar xilose, o segundo açúcar mais abundante em hidrolisados lignocelulósicos (Hahn-Hägerdal *et al.*, 2001). Recentemente, uma levedura fermentadora de xilose, *Spathaspora passalidarum*, foi isolada de besouro, que preferencialmente habita em madeiras (Nguyen *et al.*, 2006). Estudos com esta levedura mostraram que a mesma pode

fermentar simultaneamente glicose e xilose, com alto rendimento em etanol (Long *et al.*, 2012).

Os processos de hidrólise enzimática da celulose e da hemicelulose, para obtenção de açúcares, em meio aquoso, catalisado por celulasas, possuem valores de rendimentos baixos, principalmente devido a elevada cristalinidade da estrutura da celulose. Para tornar a hidrólise mais eficiente, são necessárias etapas de pré-tratamento da matéria-prima, visando aumentar a acessibilidade do substrato à ação enzimática (Mosier *et al.*, 2005).

O objetivo do presente trabalho visa à produção de Bioetanol a partir da fermentação de hidrolisado enzimático de papel de escritório, por *Spathaspora passalidarum* HMD 14.2.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1. Material Lignocelulósico

Inicialmente, uma quantidade suficiente de papel de escritório descartado foi aproveitada para a execução do presente trabalho. Os equipamentos envolvidos na etapa de pré-tratamento foram uma mesa incubadora rotativa e uma autoclave. Os parâmetros avaliados para os estudos envolvendo a determinação das condições ideais de pré-tratamento e liberação de açúcares estão descritos na Tabela 1. Em ambas as estratégias de pré-tratamento, os seguintes procedimentos foram adotados: 8 % m/V de papel, cortados em dimensões de 2 mm, com o auxílio de um perfurador de papel. O material pré-tratado foi, na sequência, centrifugado por 10 min a 10.000 rpm e o material decantado foi encaminhado para a hidrólise enzimática.

### 2.2. Hidrólise Enzimática

As hidrólises foram realizadas em frascos de Erlenmeyers, com tampão citrato de sódio (pH igual a 4,8). Preparações comerciais de celulasas (Celluclast 1.5 L – 2 mL; 119 FPU/mL) e  $\beta$ -glucosidase (1 mL), ambas da Novozyme, foram utilizadas. A atividade enzimática da Celluclast 1.5 L foi determinada com unidade de papel de filtro por mL, segundo o método de Ghose (1987). Os frascos, em todas as hidrólises enzimáticas, foram mantidos em mesa incubadora rotativa, a 50°C e 150 rpm. Após a filtração das amostras em membrana de 0,45  $\mu$ m, os filtrados foram utilizados para a quantificação de glicose e xilose por cromatografia líquida

de alta eficiência.

**Tabela 1.** Condições dos pré-tratamentos em mesa incubadora rotativa e em autoclave.

Pré-tratamento	Temperatura (°C)	Agitação (rpm)	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (% V/V)	Tempo (h)
Mesa incubadora rotativa	50	50	1	3
Autoclave	121	-	5	1

### 2.3 Microrganismo e Meios de Cultura

Foi utilizada uma linhagem de levedura, *Spathaspora passalidarum* HMD 14.2, cedida pelo Departamento de Micologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG. O meio de cultura utilizado para a conservação, em tubo de ensaio inclinado, foi composto de glicose (20 g/L), extrato de levedura (4 g/L), peptona (3 g/L) e ágar (15 g/L). Na preparação do inóculo, também foi utilizada a mesma composição de meio, mas sem adição de ágar. O pH foi  $6,8 \pm 0,2$  em ambos os meios. As fermentações foram realizadas utilizando um meio de cultura contendo (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (2 g/L), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (2 g/L), MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (0,75 g/L) e extrato de levedura (4 g/L). Estes nutrientes foram dissolvidos no hidrolisado enzimático. A fonte de glicose foi derivada da celulose (glicose) e hemicelulose (xilose) presentes no hidrolisado enzimático do papel.

### 2.4 Fermentações do Hidrolisado Enzimático

Na preparação do inóculo, a linhagem foi repicada em tubos de ensaio contendo o meio de conservação, os quais foram mantidos em estufa a 30°C durante 24 horas. Após esse período, todo o microrganismo do tubo de ensaio foi transferido para frascos de

Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL do meio de inoculo. O frasco foi submetido a 200 rpm e 30°C, por 7 horas, em mesa incubadora rotativa. Posteriormente, todo o volume de suspensão do frasco de Erlenmeyer, foi filtrado em membrana de 0,45  $\mu$ m. Um volume de 10 mL de água destilada estéril foi adicionado à biomassa e, em seguida, 5 mL da suspensão microbiana foi transferida para um dos dois frascos de Erlenmeyer de 125 mL contendo 45 mL do meio de fermentação. Os frascos foram mantidos a 30 °C e sem agitação, durante 24 horas.

## 2.5. Rendimento

O rendimento das hidrólises com relação à formação de glicose e xilose foi determinado pela equação (1).

$$Y(\%) = \frac{G + X}{m} * V * 100 \quad (1)$$

G: concentração de glicose (em g/L);

X: concentração de xilose (em g/L);

V: volume da mistura reacional (em L);

m: massa de papel (em g).

O rendimento em relação à formação de etanol foi determinado de acordo com a equação (2).

$$Y_{P/S} = \frac{\lambda E}{\lambda S} \quad (2)$$

$\lambda E$ : variação da concentração de etanol (em g/L);

$\lambda S$ : variação da concentração de glicose e xilose (em g/L).

A eficiência da fermentação foi determinada pela equação (3), considerando o rendimento teórico igual a 0,511 g/g.

$$E_f = \frac{Y_{P/S}}{0,511} * 100 \quad (3)$$

A produtividade volumétrica foi determinada pela equação (4).

$$Q_p \square \frac{E}{t} \quad (4)$$

E: concentração de etanol com 24 horas de fermentação (em g/L);

t: tempo final da fermentação (24 horas).

## 2.6. Métodos Analíticos

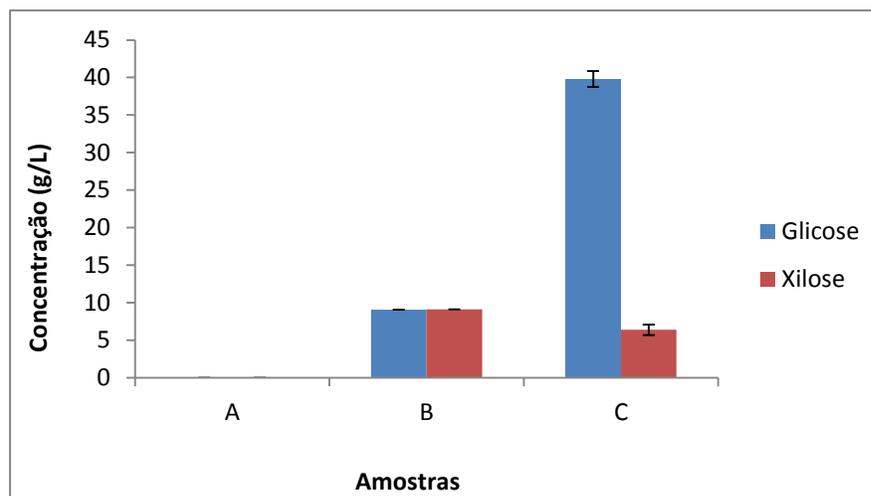
Foram retiradas alíquotas, ao final de cada hidrólise e das fermentações. As amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm durante 10 min, sendo o sobrenadante destinado para quantificação de carboidratos e etanol, após de filtração em membrana de celulose, com uma porosidade de 0,45  $\mu$ m. A quantificação das amostras, contendo glicose, xilose e etanol, foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em cromatógrafo da Agilent HP 1100, com uma coluna de troca catiônica HPX-87H+ (300 mm x 7,8 mm, Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, USA), a 60°C e detecção por índice de refração. Foram realizadas injeções de 5  $\mu$ L, com vazão de 0,6 mL/min, utilizando como fase móvel H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 5 mM.

## 3. RESULTADOS

O pré-tratamento com ácido sulfúrico diluído em mesa incubadora rotativa foi fundamental para as hidrólises enzimáticas com alta carga de sólidos (8 ou 10 % m/V). Na produção de bioetanol, a concentração inicial de açúcares fermentescíveis é um fator preponderante para a obtenção de maior concentração do produto. Daí a seleção de 8 % m/V para a carga de enzimas utilizada neste trabalho, uma vez que nesta condição foi obtida a maior concentração de glicose e xilose.

Foi realizado um pré-tratamento apenas com 8 % m/V em autoclave, uma vez que este foi o melhor resultado obtido. As condições operacionais foram descritas na Tabela 1. Comparando-se a fração líquida, após os pré-tratamentos, aquela resultante do uso da autoclave (B) apresentou

concentrações de glicose e de xilose iguais a 9,09 g/L e 9,10 g/L, respectivamente (Figura 1). Por outro lado, o pré-tratamento realizado em mesa incubadora rotativa (A) não apresentou quantidades significativas de glicose e xilose na fração líquida, mantendo a concentração de açúcares na fração sólida e disponível para a ação enzimática.



**Figura 1.** Concentração de glicose e xilose na fração líquida após pré-tratamento com (A) ácido sulfúrico (1 % v/v) em mesa incubadora rotativa a 50 °C, 150 rpm, por 3 horas; (B) com ácido sulfúrico (5 % V/V) na autoclave a 121 °C, por 1 hora e (C) após hidrólise enzimática.

A Figura 1 (C) apresenta as concentrações de glicose e de xilose após a hidrólise enzimática da fração sólida obtida após o pré-tratamento em mesa incubadora rotativa. Após 96 horas de hidrólise enzimática desta fração sólida, foram obtidas concentrações de glicose e xilose iguais a 40 g/L e 6 g/L, respectivamente. O hidrolisado enzimático (A) foi utilizado para a fermentação. As Tabelas 2 e 3 apresentam as concentrações de glicose, xilose e etanol obtidas com 24 horas de fermentação, bem como os parâmetros da fermentação (rendimento, produtividade e eficiência).

**Tabela 2.** Concentrações de glicose, xilose e etanol no início e no final da fermentação do hidrolisado enzimático com 8 % m/V e pré-tratamento em mesa incubadora rotativa.

Composto	Concentração inicial	Concentração final

	(g/L)	(g/L)
Glicose	32,39	0,60
Xilose	6,03	1,52
Etanol	0,00	13,69

A glicose foi praticamente consumida durante a fermentação. Por outro lado, após 24 horas, a concentração de xilose foi cerca de 2 g/L. Isso indica a preferência de consumo da glicose pela *S. passalidarum* HMD 14.2. Segundo Long *et al.* (2012), *S. passalidarum* assimila simultaneamente glicose, celobiose e xilose durante a produção de etanol. Lima *et al.* (2014), em fermentação de hidrolisado ácido de papel de escritório descartado, por *S. passalidarum* HMD 14.2 também observaram um consumo preferencial da glicose.

**Tabela 3.** Produtividade, rendimento e eficiência obtida na fermentação do hidrolisado enzimático com 8 % m/V e pré-tratamento em mesa incubadora rotativa.

Parâmetro	Valor
$Q_P$ (g/L.h)	0,57
$Y_{P/S}$ (g/g)	0,37
Eficiência (%)	72,65

Rendimento de 0,37 g/g e eficiência de 72,6 %, em relação à glicose e xilose, consumidas pela *Spathaspora passalidarum* HMD 14.2 foram obtidos, indicando o potencial desta levedura para a produção de bioetanol a partir de meios contendo glicose e xilose.

Wanderley *et al.* (2013) obtiveram 0,39 g/g e 78,5 % de eficiência, em fermentações de hidrolisados enzimáticos de bagaço de cana-de-açúcar após o uso de pré-tratamento pela técnica da explosão a vapor e deslignificação alcalina, utilizando *Saccharomyces cerevisiae* UFPEDA 1238.

## 6. REFERÊNCIAS

HAHN-HAGERDAL, B.; WAHLBOM, C. F.; GARDONYI, M.; VAN ZYL, W. H.; CORDERO, R.; JONSSON, L. J. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for xylose utilisation. *Advance in Biochemical Engineering and Biotechnology*, v. 73, p. 53–84, 2001.

LIMA, D. A.; LUNA, R. L. N.; MARTÍN, C.; GOUVEIA, E. R. Comparison of bioethanol production from acid hydrolyzates of waste office paper using *Saccharomyces cerevisiae* and *Spathaspora passalidarum*. *Cellulose Chemistry and Technology*, 2014 (aceito).

LONG, T. M.; SU, YI-KAL; HEADMAN, J.; HIGBEE, A.; WILLIS, L. B.; JEFFRIES, T. W. Cofermentation of Glucose, Xylose, and Cellobiose by the Beetle- Associated Yeast *Spathaspora passalidarum*. *Current Opinion in Chemical Biology*, v. 78, p. 5492-5500, 2012.

MOSIER, N. et al. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, v. 96, p. 673-686, 2005.

NGUYEN, H.; SUH, S. O.; MARSHALL, C. J.; BLACKWELL, M. Morphological and ecological similarities: wood-boring beetles associated with novel xylose-fermenting yeasts, *Spathaspora passalidarum* sp. nov. and *Candida jeffriessii* sp. nov. *Mycology Research*, v. 110, p. 1232 -1241, 2006.

WANDERLEY, M. C. A.; MARTÍN, M.; ROCHA, G. L. M.; GOUVEIA, E. R. Increase in ethanol production from sugarcane bagasse based on combined pretreatments and fed-batch enzymatic hydrolysis. *Bioresource Technology*, v. 128, p. 448–453, 2013.