

# DETERMINAÇÃO DA EFICIÊNCIA ALCOÓLICA DE DIFERENTES MICRO-ORGANISMOS VISANDO A PRODUÇÃO DE ETANOL 2G

M. S. MONTAGNOLI<sup>1</sup>, L. P. JUST<sup>2</sup>, N. SELLIN<sup>3</sup>, C. MARANGONI<sup>3</sup>, O. SOUZA<sup>3</sup>.

<sup>1</sup>Universidade da Região de Joinville - UNIVILLE, Departamento de Engenharia Química

<sup>2</sup>Universidade da Região de Joinville - UNIVILLE, Departamento de Engenharia Ambiental

<sup>3</sup>Universidade da Região de Joinville – UNIVILLE, Mestrado em Engenharia de Processos

E-mail para contato: osouza@univille.br

**RESUMO** – O etanol apresenta uma alternativa viável como combustível a partir de vias fermentativas, reconhecido como bioetanol. O bioetanol é produzido por micro-organismos fermentadores de carboidratos, os quais podem ser derivados de materiais lignocelulósicos, possuindo a glicose como um dos principais açúcares desta matéria-prima. Neste trabalho avaliaram-se a cinética de consumo do substrato e a produção de etanol por quatro diferentes micro-organismos fermentadores (*Saccharomyces cerevisiae*, *Zymomonas mobilis*, *Pichia stipitis* e *Pachysolen tannophilus*) para o ensaio padrão, empregando a glicose como fonte de carbono. As fermentações em mistura sintética foram realizadas em Erlenmeyers com 80% (v/v) de meio de cultivo e 20% de inóculo. Para a análise das amostras, retiradas periodicamente, foram realizadas a determinação de açúcares redutores (AR) e de etanol (P). O melhor valor de conversão de substrato em produto foi encontrado para o micro-organismo *Z. mobilis* (0,45 g/g).

## 1. INTRODUÇÃO

Com a geração de impactos ambientais pelo uso de combustíveis fósseis, torna-se importante a procura de novas fontes alternativas de energia. O etanol apresenta uma alternativa viável como combustível a partir de vias fermentativas, reconhecido como bioetanol. De acordo com Gottschalk (2012), o bioetanol é produzido por micro-organismos fermentadores de carboidratos, os quais são encontrados em materiais lignocelulósicos (compostos por celulose, hemicelulose e lignina), possuindo a glicose como um dos principais açúcares deste recurso.

O uso de micro-organismos na produção de biocombustíveis apresenta-se em grande desenvolvimento no mundo todo. A produção industrial de etanol utiliza o melaço da cana-de-açúcar ou o amido (hidrolisado por enzimas) para fermentação com *Saccharomyces cerevisiae* (ANTUNES, 2011). De fato, diversos grupos de pesquisa trabalham para o desenvolvimento de medidas tecnológicas inovadoras em bioprocessos, como a produção de etanol pela fermentação (ALMEIDA, 2012).

A conversão de resíduos lignocelulósicos (biomassa) em açúcares fermentescíveis está sendo considerada uma fonte alternativa de energia promissora para atender a demanda mundial por combustíveis renováveis (BUCKERIDGE *et al.*, 2010; SANTOS *et al.*, 2012; MAITI *et al.*, 2011). Materiais lignocelulósicos hidrolisados contêm uma variedade de pentoses e hexoses, porém, não existe um único organismo conhecido capaz de converter eficientemente todos esses açúcares em etanol (YANASE, 2012). Esse material pode ser aproveitado como biomassa na produção de etanol de 2ª geração (etanol 2G ou bioetanol) e, com isto, além de contribuir com a redução do impacto ambiental ocasionado pela degradação da biomassa no campo, pode levar à valorização do resíduo e agregar valor à matéria-prima.

Dentre os diversos micro-organismos utilizados em pesquisa e na indústria, *Saccharomyces cerevisiae* e *Zymomonas mobilis* são mundialmente conhecidos e utilizados para degradação de hexoses visando a produção de etanol. Outros como os gêneros *Pichia* e *Pachysolen* estão entre os micro-organismos estudados na degradação das pentoses para obtenção de etanol.

Diante do exposto, este trabalho tem como objetivo contribuir com a otimização da produção de bioetanol a partir de biomassa vegetal, estabelecendo a cinética do consumo de substrato e da produção de etanol por quatro diferentes micro-organismos (*Saccharomyces cerevisiae* ATCC 26603, *Zymomonas mobilis* ATCC 35001, *Pichia stipitis* ATCC 58376 e *Pachysolen tannophilus* ATCC 32691), empregando um meio de cultivo sintético contendo glicose como principal fonte de carbono. Estes micro-organismos foram escolhidos em função das suas características e com objetivo de indicar aqueles que podem ser utilizados futuramente em um cultivo com co-cultura, apresentando alto rendimento na obtenção de etanol sem serem inibidos pela alta concentração inicial de substrato e nem pela concentração do produto.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1. Micro-organismos

Culturas puras de *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 26603, *Zymomonas mobilis* ATCC 35001, *Pichia stipitis* ATCC 58376 e *Pachysolen tannophilus* ATCC 32691, todos fornecidos pelo banco de cepas da Fundação André Tosello. A manutenção dos micro-organismos foi realizada a partir do cultivo de superfície em placas de Petri, com repiques semanais, empregando como meio de cultivo base o meio proposto por Schulz (2010).

### 2.2. Inóculo

Foi realizado em Erlenmeyers de 500 mL contendo 100 mL de meio de cultivo composto por (em g/L): **a)** para *S. cerevisiae* e *P. tannophilus* - glicose, 20,0; extrato de levedura, 3,0; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,5; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,5; Mg(SO<sub>4</sub>)<sub>7</sub>H<sub>2</sub>O, 0,1 e CaCl<sub>2</sub>, 0,1; **b)** para *Z. mobilis* e *P. stipitis* - glicose, 20,0; extrato de levedura, 5,0; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1,0 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,0; Mg(SO<sub>4</sub>)<sub>7</sub>H<sub>2</sub>O, 1,0. Todos os cultivos foram conduzidos em agitador orbital (shaker) com frequência de agitação de 100 min<sup>-1</sup> durante 24 h.

### 2.3. Temperatura e pH

Foram específicos para cada micro-organismo, conforme literatura: *S. cerevisiae*, 30 °C e 4,5 (TOSETTO, 2008 e PARK, 2010); *Z. mobilis*, 30 °C e 6,0 (PATLE & LAL, 2008; YANASE *et al.*, 2012 e MAITI *et al.*, 2011; PINILLA *et al.*, 2011); *P. stipitis*, 32 °C e 5,5 (SLININGER *et al.*, 1990 *apud* OLIVEIRA, 2010); *P. tannophilus*, 30 °C e 6,0 (CONVERTI *et al.*, 2011; SATHESCH-PRABU & MURUGESAN, 2011).

### 2.4. Ensaio de fermentação

Foram realizados ensaios padrões empregado como principal fonte de carbono glicose (100 g/L) e as mesmas concentrações dos demais nutrientes utilizados na produção do inóculo específicas para cada um dos micro-organismos. De forma isolada, cada um dos quatro micro-organismos avaliados foi cultivado em frascos de Erlenmeyer de 250 mL contendo 80% (v/v) de meio de cultivo e 20% de inóculo. Os frascos foram acondicionados em agitador orbital com frequência de agitação de 100 min<sup>-1</sup>. A temperatura de incubação e o pH inicial do meio de fermentação foram estabelecidos de acordo com o item 2.3.

### 2.5. Esterilização

Todos os meios de cultivo foram previamente esterilizados em autoclave a 121 °C durante 15 min.

### 2.6. Metodologia analítica

Durante os ensaios de fermentação foram retiradas amostras periódicas para as determinações das concentrações de açúcares e de etanol. As concentrações de açúcares redutores (AR) foram determinadas pelo método do cuproarsenato proposto por Somogy (1952) e Nelson (1944); e as concentrações de etanol por Cromatografia Gasosa (CG) utilizando cromatógrafo Agilent, 6890 e a coluna da Hewlett-Packard HP-1 com fase estacionária 100% dimetil polisiloxano.

### 2.7. Cálculo

Para calcular o fator de conversão de açúcares redutores em etanol ( $Y_{P/S}$ ) utilizou-se a Equação 1, empregando os valores obtidos de concentrações iniciais e finais de glicose e etanol.

$$Y_{P/S} = \frac{(P_f - P_0)}{AR_0 - AR_f} \quad (1)$$

Onde:

$P_f$  – concentração máxima de etanol obtida durante a fermentação (g/L)

$P_0$  – concentração de etanol no início da fermentação (g/L)

$AR_0$  – concentração de açúcar redutor no início da fermentação (g/L)

$AR_f$  – concentração de açúcar redutor presente no meio de fermentação no instante  $P_f = P_{\text{máximo}}$  (g/L)

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os valores das concentrações de açúcares redutores (AR) e etanol (P) obtidos durante a fermentação alcoólica por *S. cerevisiae*, *Z. mobilis*, *P. stipitis* e *P. tannophilus* empregando a glicose (100 g/L) como principal fonte de carbono são apresentados nos gráficos da Figura 1.

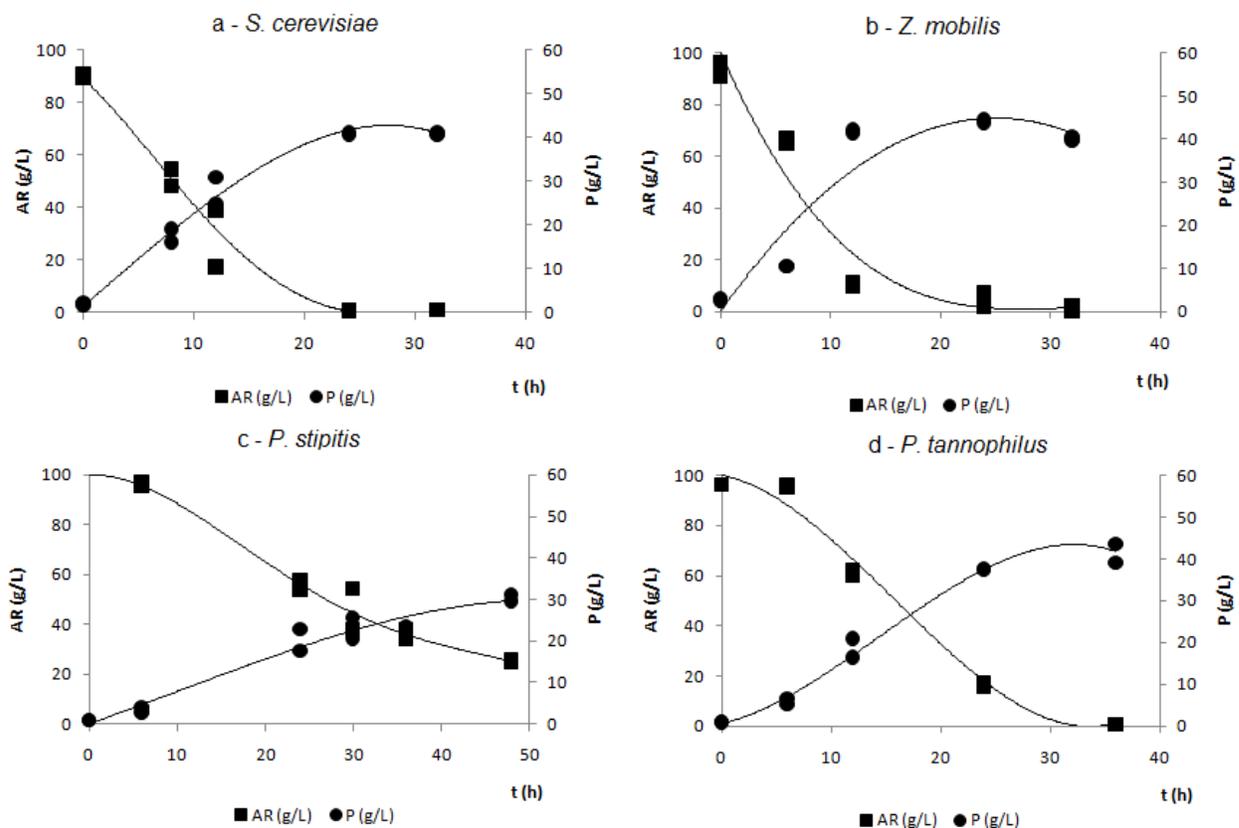


Figura 1 – Gráficos das cinéticas de consumo de substrato (AR) e produção de etanol (P) por: (a) *Saccharomyces cerevisiae*; (b) *Zymomonas mobilis*; (c) *Pichia stipitis*; (d) *Pachysolen tannophilus*.

A glicose foi totalmente consumida por *S. cerevisiae* em 24 horas, produzindo em torno de 41 g/L de etanol. O valor obtido da conversão de substrato em produto foi de 0,41 g/g. Nos estudos de Singh & Bishnoi (2012), foi utilizado palha de trigo como substrato para fermentação por *S. cerevisiae*, e foram obtidos 14,5 g/L de etanol a partir de 50 g/L de substrato. A temperatura e o pH foram de 30 °C e 5,0, respectivamente. O rendimento obtido pelos autores foi de 0,48 g/g. Mesmo a *S. cerevisiae* não degradando pentoses (açúcares de cinco carbonos disponíveis em materiais

lignocelulósicos), o rendimento foi superior ao deste trabalho, porém a produção de etanol foi inferior. Hickert *et al.* (2013) avaliaram a produção de etanol por *S. cerevisiae* com casca de arroz como substrato, nas condições de 30 °C e pH de 5,0, e obtiveram o consumo total de 27 g/L de glicose (proveniente da biomassa) em 100 h, porém a produção máxima de etanol foi de 10 g/L em 72 h. O rendimento obtido foi de, aproximadamente, 0,38. As diferenças de rendimento dos trabalhos podem ser devido à utilização de cepas distintas.

*Z. mobilis* consumiu toda glicose (100 g/L) em torno de 24 horas e produziu, aproximadamente, 42 g/L de etanol. O rendimento obtido foi de 0,45 g/g. Yanase *et al.* (2012) utilizaram, entre outros açúcares, 20 g/L de glicose como substrato de fermentação para avaliar a produção de etanol por *Z. mobilis*. A temperatura e pH utilizados foram 30 °C e 5,5, respectivamente. Em 24 h, a glicose foi totalmente consumida, foi produzido em torno de 9 g/L de etanol e o rendimento obtido foi de, aproximadamente, 0,39 g/g. A diferença de rendimento pode ter ocorrido pela utilização de cepas distintas e diferença de pH. Pinilla *et al.* (2011) obtiveram um rendimento de 0,83 g/g, utilizando 160 g/L de glicose, com uma temperatura de 35 °C e pH 6,0. Em 60 h, *Z. mobilis* produziu, aproximadamente, 50 g/L de etanol e consumiu 60 g/L de glicose. A diferença de temperatura e da cepa utilizada (comercial) pode ter influenciado em rendimento maior no estudo de Pinilla *et al.* (2011).

O consumo de glicose por *P. stipitis* apresentou-se mais lento, em 48 h foram consumidos 75 g/L de glicose, e a produção de etanol para este mesmo tempo foi em torno de 30 g/L. O rendimento obtido foi de 0,38 g/g. Nos estudos de Cho *et al.* (2010), analisaram a produção de etanol utilizando, entre outros substratos, 60 g/L de glicose. *P. stipitis* consumiu toda glicose em 36 h, produzindo 25 g/L de etanol, obtendo um rendimento de 0,42 g/g. As condições de fermentação foram 30 °C e pH de 6,0. A diferença no rendimento pode ter ocorrido pelo fato de não constituírem a mesma cepa de *P. stipitis*. Singh & Bishnoi (2012) também avaliaram o rendimento de etanol por *P. stipitis* utilizando palha de trigo como substrato. Com 50 g/L de açúcar, foi produzido em torno de 12,2 g/L de etanol, obtendo um rendimento de 0,43 g/g. A temperatura do meio de cultivo foi 30 °C e o pH de 5,0. Como palha de trigo é um material lignocelulósico, possuindo hexoses e pentoses, e *P. stipitis* tem a capacidade de degradar pentoses, é aceitável que seu rendimento seja maior, comparando-se com o meio sintético de glicose. Nos dois casos, as temperaturas foram distintas da utilizada neste estudo.

Para *P. tannophilus*, a glicose foi consumida em 36 h, a produção de etanol foi de 40 g/L e o rendimento alcançou o valor de 0,41 g/g. Zhao *et al.* (2008) utilizaram 22 g/L de glicose para avaliar a produção de etanol por *P. tannophilus*, obtiveram o consumo total da glicose em 12 h e produção de 6,90 g/L de etanol. O rendimento foi de, aproximadamente, 0,30 g/g. A fermentação ocorreu a uma temperatura de 30 °C. Neste estudo, em 12 h de fermentação, *P. tannophilus* havia consumido 30 g/L e produzido 18,6 g/L de etanol. Os estudos de Sathesh-Prabu & Murugesan (2011) demonstram a produção de etanol por *P. tannophilus* a partir de 150 g/L de glicose. Em 72 h, foi consumido 100 g/L de glicose e produzido 40 g/L de etanol. O rendimento obtido pelos autores foi de 0,40 g/g. Os estudos também apontaram as melhores condições de fermentação para *P. tannophilus* como temperatura de 30 °C e pH de 6,0 a 5,5. Comparando o trabalho dos autores com este trabalho, *P. tannophilus* consumiu o substrato em menor tempo e alcançou melhores valores de rendimento.

## 6. CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos, o micro-organismo que apresentou a melhor conversão de substrato em produto foi a *Z. mobilis* (0,45 g/g). Este micro-organismo também apresentou os melhores resultados em produto final (42 g/L) e menor tempo de cultivo (24 h).

## 7. REFERÊNCIAS

ALMEIDA, João Ricardo Moreira de. Microrganismos e Agroenergia. Agroenergia em revista: Microrganismo em agroenergia. Ano III, nº 5, dez. de 2012. Disponível em: <[http://www.cnpae.embrapa.br/imprensa/agroenergia-em-revista/Agroenergia\\_em\\_revista.pdf](http://www.cnpae.embrapa.br/imprensa/agroenergia-em-revista/Agroenergia_em_revista.pdf)>. Acesso em: 07 dez. 2013.

ANTUNES, Raquel; SILVA, Inês Cristóvão. O papel dos microorganismos no futuro dos biocombustíveis. Instituto Nacional da Propriedade Industrial – Inpi. 2011. Disponível em: <[http://www.marcaspatentes.pt/files/collections/pt\\_PT/1/300/302/O%20Papel%20dos%20Microorganismos%20no%20futuro%20dos%20Biocombust%C3%ADveis.pdf](http://www.marcaspatentes.pt/files/collections/pt_PT/1/300/302/O%20Papel%20dos%20Microorganismos%20no%20futuro%20dos%20Biocombust%C3%ADveis.pdf)>. Acesso em: 07 dez. 2013.

BUCKERIDGE, M. S.; SANTOS, W.D.; SOUZA, A.P. As rotas para o etanol celulósico no Brasil. In: CORTEZ, L.A.B., Bioetanol de cana-de-açúcar: P&D para a produtividade e sustentabilidade. Editora Blucher, São Paulo, 2010. p. 365-380.

CHO, Dae Haen; SHIN, Soo-Jeong; BAE, Yangwon; PARK, Chulhwan; KIM, Yong Hwan. Enhanced ethanol production from deacetylated yellow poplar acid hydrolysate by *Pichia stipitis*. Bioresource Technology, v.101, p. 4947–4951, 2010.

CONVERTI, A.; PEREGO, P.; DOMINGUES, J. M.; SILVA, S. S. Effect of temperature on the microaerophilic metabolism of *Pachysolen tannophilus*. Enzyme and Microbial Technology, p. 339–345, 2001.

GOTTSCHALK, Leda Maria Fortes; MAIOR, Ana Maria Souto; ELEUTHERIO, Elis Cristina Araujo; BON, Elba P. S.. Microrganismos na produção de etanol. Agroenergia em revista: Microrganismo em agroenergia. Ano III, nº 5, dez. de 2012. Disponível em: <[http://www.cnpae.embrapa.br/imprensa/agroenergia-em-revista/Agroenergia\\_em\\_revista.pdf](http://www.cnpae.embrapa.br/imprensa/agroenergia-em-revista/Agroenergia_em_revista.pdf)>. Acesso em: 07 dez. 2013.

HICKERT, Lilian Raquel; SOUZA-CRUZ, Priscila Brasil de; ROSA, Carlos Augusto; AYUB, Marco Antônio Záchia. Simultaneous saccharification and co-fermentation of un-detoxified rice hull hydrolysate by *Saccharomyces cerevisiae* ICV D254 and *Spathaspora arborariae* NRRL Y-48658 for the production of ethanol and xylitol. Bioresource Technology, v. 143, p. 112–116, 2013.

MAITI, Bodhisatta; RATHORE, Ankita; SRIVASTAVA, Saurav; SHEKHAWAT, Mitali; SRIVASTAVA, Pradeep. Optimization of process parameters for ethanol production from sugar cane molasses by *Zymomonas mobilis* using response surface methodology and genetic algorithm. Appl Microbiol Biotechnol, v. 90, p. 385-395, 2011.

- NELSON, N. A photometric adaptation of Somogy method for determination of glucose. *Biochemistry*, v. 153, p. 375-380, 1944.
- OLIVEIRA, F. P. Avaliação da aclimação de *Pichia stipitis* ao hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana e hierarquização da toxicidade dos inibidores celulares. Dissertação de Mestrado em Ciências, Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro, 2010, 140 p.
- PARK, I.; KIM, I.; KANG, K.; SOHN, H.; RHEE, I.; JIN, I.; JANG, H. Cellulose ethanol production from waste newsprint by simultaneous saccharification and fermentation using *Saccharomyces cerevisiae* KNU5377. *Process Biochemistry*, v. 45, p. 487–492, 2010.
- PATLE, Sonali; LAL, Banwari. Investigation of the potencial of agro-industrial material as low cost substrate for ethanol production by using *Candida tropicalis* and *Zymomonas mobilis*. *Biomass and Bioenergy*, v. 32, p. 596-602, 2008.
- PINILLA, Laura; TORRES, Rodrigo; ORTIZ, Claudia. Bioethanol production in batch mode by a native strain of *Zymomonas mobilis*. *World J Microbiol Biotechnol*, v. 27, p. 2521-2528, 2011.
- SANTOS, F.A.; QUEIRÓZ, H. de.; COLODETTE J. L.; FERNANDES, S. A.; GUIMARÃES, V. M.; REZENDE, S. T.. Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol. *Química Nova*, 35-5, p. 1004-1010, 2012.
- SATHESH-PRABU, C.; MURUGESAN, A.G. Potential utilization of sorghum field waste for fuel ethanol production employing *Pachysolen tannophilus* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioresource Technology*, v. 102, p. 2788–2792, 2011.
- SCHULZ, M. A. Produção de bioetanol a partir de rejeitos da bananicultura: polpa e cascas de banana. Dissertação de mestrado em Engenharia de Processos, Universidade da Região de Joinville – UNIVILLE, Joinville, SC, 2010, 102 p.
- SINGH, Anita; BISHNOI, Narci R. Enzymatic hydrolysis optimization of microwave alkali pretreated wheat straw and ethanol production by yeast. *Bioresource Technology*, v 108, p. 94–101, 2012.
- SOMOGYI, M. Notes on sugar determination. *Journal of Biological Chemistry*, 1952, 195, p. 19.
- TOSETTO, G. M.. Comportamento de linhagens industriais de *Saccharomyces* frente a compostos inibitórios presentes no melaço de cana-de-açúcar na produção de bioetanol. Tese de Doutorado em Engenharia Química, Univesidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 2008, 255 p.
- YANASE, Hideshi; MIYAWAKI, Hitoshi; SAKURAI, Mitsugu; KAWAKAMI, Akinori; MATSUMOTO, Mari; HAGA, Kenji; KOJIMA, Motoki; OKAMOTO, Kenji. Ethanol production from Wood hydrolysate using genetically engineered *Zymomonas mobilis*. *Appl Microbiol Biotechnol*, p. 1667-78, 2012.
- ZAO, Lei; ZHANG, Xu; TAN, Tianwei. Influence of various glucose/xylose mixtures on ethanol production by *Pachysolen tannophilus*. *Biomass and Bioenergy*, v. 32, p. 1156–1161, 2008.