

27 e 28 de junho de 2012 - Ribeirão Preto SP

## **PRODUÇÃO DE ETANOL A PARTIR DO HIDROLISADO HEMICELULÓSICO DE BAGAÇO DE CANA.**

Márcia Justino Rossini Mutton<sup>1</sup>; Tatiane Passa Lozano Fugita<sup>1</sup>; Maria das Graças de Almeida Felipe<sup>2</sup>.

<sup>1</sup>Docente e Pesquisadora do Departamento de Tecnologia, FCAV/UNESP, Jaboticabal, SP, Brasil, CEP: 14884-900; Email: [mjrmut@fcav.unesp.br](mailto:mjrmut@fcav.unesp.br); <sup>2</sup>Departamento de Biotecnologia, EEL/USP, Lorena, SP, Brasil.

### **RESUMO**

Objetivou-se avaliar a produção de etanol por leveduras assimiladoras de xilose, usando como substrato hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana. O experimento foi realizado no delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2x3, e 4 repetições. O primeiro fator analisado foram dois mostos (mosto proveniente do hidrolisado hemicelulósico concentrado do bagaço de cana e mosto sintético, nas mesmas concentrações do hidrolisado, porém livre de compostos inibidores), e o segundo três estirpes de levedura (J10, J19.1 e CG). Foram analisadas o consumo dos açúcares, a produção de etanol e de ácido acético. Observou-se que as três cepas produziram etanol a partir da xilose e glicose, sendo que o pico dessa produção ocorreu com 36 horas de cultivo.

**Palavras-chave:** Hidrolise de Bagaço, Fermentação Etanólica, leveduras, xilose

### **SUMMARY**

The objective was to evaluate the ethanol production by xylose assimilating yeasts, using hydrolyzed hemicellulosic sugarcane bagasse substrate. The experiment was conducted in a completely randomized in 2x3 factorial and 4 replicates. The first factor analyzed were two musts (concentrate from the hemicellulosic hydrolyzate of sugarcane bagasse and synthetic wine at the same concentrations of the hydrolyzate, free of inhibitory compounds), and the second three yeast strains (J10, J19.1 and CG). We analyzed the consumption of sugars to produce ethanol. It was observed that all the strains produced ethanol from xylose and glucose, since the peak of production occurred after 36 hours of cultivation.

**Key-word:** Hydrolysis of bagasse, ethanol fermentation, yeasts, xylose

### **INTRODUÇÃO**

O aproveitamento de diferentes biomassas vegetais como fontes de energia renovável, embora não venha substituir o petróleo em sua totalidade, contribuirá para diminuir a utilização de combustíveis fósseis e redução dos impactos negativos ao ambiente causados pelo seu consumo. A utilização do etanol como combustível traz

27 e 28 de junho de 2012 - Ribeirão Preto SP

como vantagens a não eliminação de enxofre na atmosfera, reduzindo significativamente as emissões dos precursores de “smog” fotoquímico (Marton, 2002).

Os materiais lignocelulósicos são fontes potenciais para a produção de etanol a baixo custo, sendo o bagaço de cana-de-açúcar considerado uma das maiores fontes no Brasil. A utilização desta matéria prima para a produção do etanol apresenta uma série de vantagens, tais como já se apresentar processada pelas moendas, disponibilidade em grandes quantidades e estar pronta para uso no local, evitando aumento de custo devido ao transporte (MORAES, 2008).

O Brasil é o maior produtor mundial de etanol derivado da cana-de-açúcar e o único país do mundo onde se integra totalmente a produção de açúcar e álcool na mesma planta, reduzindo custos de ambos os processos. Portanto, a integração do processo de hidrólise do bagaço nas usinas seria um passo importante e de fácil adaptação, segundo Camargo (2007). De acordo com Rodrigues (2007) para cada tonelada de cana, obtem-se aproximadamente 140 kg de bagaço seco, composto por 43% de celulose, 25% de hemicelulose e 23% de lignina.

Apesar do aproveitamento do bagaço de cana para geração de energia no próprio setor sucroalcooleiro, há excedente para utilizações como a produção de etanol.

A utilização de hidrolisados hemicelulósicos requer a disponibilidade de microrganismos fermentadores de pentoses, em particular a xilose. Inicialmente esta é convertida em xilitol. Este pode então ser excretado no meio ou ser oxidado à xilulose, que por sua vez é metabolizada através da via das fosfopentoses. Os metabólitos resultantes da via das fosfopentoses, frutose-6P e gliceraldeídos-3P, são metabolizados na glicólise até piruvato. Este pode ser oxidado pelo Ciclo dos Ácidos Tricarboxílicos, recuperando as coenzimas através da cadeia respiratória, ou ser fermentado a etanol, pela ação das enzimas piruvato descarboxilase e álcool desidrogenase, reoxidando o NADH resultante da oxidação de gliceraldeído 3P (Santos, 2007).

Nesse estudo, objetivou-se avaliar o desempenho de estirpes de leveduras para produção de etanol a partir da fração hemicelulósica do bagaço de cana, obtido através de hidrólise ácida.

## MATERIAIS E MÉTODOS

O bagaço de cana-de-açúcar utilizado neste experimento foi cedido por Unidade de Produção da Região de Jaboticabal-SP, durante a safra 2009/2010.

Após coleta, o bagaço foi mantido em estufa com circulação de ar a 60 °C até atingir peso constante. A umidade contida no bagaço de cana foi determinada por exposição do material à radiação infravermelha, em um aparelho à temperatura de 105°C durante 20 minutos (ORION, modelo MB200) (MORAES, 2008).

Para hidrólise do bagaço utilizou-se reator de aço inoxidável com capacidade para 100L, que foi carregado com bagaço de cana, água e ácido sulfúrico P.A. (MORAES, 2008). Foram realizadas quatro hidrólises, sob temperatura constante de 150°C durante 30 minutos, para se obter 80L de hidrolisado. A fração líquida (hidrolisado hemicelulósico) foi obtida após filtração para separação da fração sólida, denominada celulignina. Os hidrolisados foram misturados, homogeneizados e armazenados em câmara fria a 4°C, para posterior concentração e preparo de mosto.

A concentração do hidrolisado ocorreu em concentrador à vácuo, com capacidade útil de 30L, operando a 70±5°C. Após a concentração de xilose era 45-50 g/L.

27 e 28 de junho de 2012 - Ribeirão Preto SP

O processo de destoxificação foi conduzido como descrito em Marton (2002). A seguir, ao hidrolisado destoxificado foram adicionados sulfato de amônia (0,1 g/L) e fosfato de potássio (0,1 g/L) para enriquecimento do meio.

As cepas de leveduras utilizadas (J01, J03, J08, J10, J16, J19.1, J25, J70 e CG), pertencem ao Banco de Leveduras do Laboratório de Microbiologia das Fermentações do Departamento de Tecnologia da FCAV/UNESP e foram selecionadas pela sua habilidade em metabolizar xilose (GUIDI, 2000).

Nos hidrolisados hemicelulósicos original e concentrado, foram quantificados as concentrações de açúcares e ácido acético através de Cromatografia Líquida de Alta eficiência (Waters, Milford, MA), utilizando coluna Biorad Aminex HPX-87H (300 x 7,8mm) empregando-se as condições descritas por MORAES (2008). Também se analisou a concentração dos compostos fenólicos totais (FOLIN & CIOCALTEAU, 1927).

O hidrolisado hemicelulósico utilizado como mosto apresentou as seguintes características: Xilose – 47,71 g/L; Glicose 9,87 g/L; Arabinose – 6 g/L; Ácido Acético – 0 g/L; Fenóis Totais – 0,82 g/L e pH 4,0. A partir dessas características, simulou-se um mosto sintético, com as mesmas características do mosto proveniente do hidrolisado, porém isento de fenóis e outros compostos inibidores do processo fermentativo.

As fermentações foram realizadas em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 120 mL de mosto, inoculado com células de leveduras na concentração de  $10^7$  UFC/mL. Os frascos foram mantidos sob agitação a 30 °C. Coletou-se amostras para avaliações tecnológicas e microbiológicas nos períodos de 0, 36, 48 e 72 horas.

Utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2x3, com 2 mostos (mosto proveniente do hidrolisado e mosto sintético), 3 estirpes de leveduras e 4 repetições. Os resultados foram submetidos à análise de variância (teste F) e comparação entre as médias pelo teste de Tukey.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 1 apresenta as características do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana, obtido em cada uma das quatro hidrólises. Verifica-se a predominância de xilose em relação aos demais açúcares, reduzida concentração de ácido acético e baixos valores de pH. Resultados semelhantes aos obtidos para outras biomassas, como bagaço de cana (Rodrigues, 2007) e palhas de cevada (Moraes, 2008).

O processo de concentração à vácuo do hidrolisado homogeneizado resultou no aumento dos teores dos açúcares, além da redução de ácido acético, favorecendo a realização do processo fermentativo (Tabela 2). Este resultado está de acordo com os obtidos por pesquisas já realizadas com bagaço de cana (Rodrigues, et al. 2001) e palha de arroz (Santos, 2007), evidenciando que sob condições de pH baixo, o acetato, apresenta-se na forma de ácido molecular, sendo portanto volátil. Os resultados obtidos nesta pesquisa foram próximos aos reportados por Santos (2007), que quando concentrou o hidrolisado obtido através de palha de arroz, observou redução de 75% na concentração de ácido acético.

Pode-se observar que quando as leveduras foram inoculadas tanto no mosto sintético quanto no mosto hidrolisado consumiram xilose de modo semelhante (Figura 1A), tendo quase todo o consumo ocorrido nas primeiras 36 horas de cultivo (Figura 1B). De acordo com Toivari et al (2001), a conversão de xilose a etanol, quando se utiliza a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, ocorre até que a concentração residual esteja ao redor de 10 g/L, devido à uma limitação no metabolismo desse microrganismo.

27 e 28 de junho de 2012 - Ribeirão Preto SP

A concentração de glicose no meio encontrava-se relativamente baixa (Figura 2), da ordem de 9,35g/L, e foi consumida nas primeiras 36 horas de fermentação. Este fato é resultante da glicose ser fonte de carbono universal, para a grande maioria dos microrganismos. Segundo Schirmer-Michel et al (2008), nas primeiras 24 horas de cultivo as hexoses (glicose e maltose) são esgotadas, seguidas por xilose e posteriormente arabinose.

A avaliação da capacidade e desdobramento dos substratos e produção de etanol (g/L) pode ser avaliada através da Figura 3. Verificou-se maior produção de etanol quando as leveduras foram inoculadas em mosto hidrolisado (Figura 3A), sendo que a maior produção ocorreu com 36 horas de fermentação (Figura 3B), destacando-se a estirpe J10.

**Tabela 1.** Concentração de açúcares, ácido acético e valor de pH do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana obtido por hidrólise ácida diluída.

	Hidrolisado 1	Hidrolisado 2	Hidrolisado 3	Hidrolisado 4
<b>Xilose (g/L)</b>	17,14	16,19	18,87	16,34
<b>Glicose (g/L)</b>	3,25	2,73	3,77	3,47
<b>Arabinose (g/L)</b>	2,14	2,18	2,24	19,42
<b>Ácido Acético (g/L)</b>	2,12	1,91	2,49	1,72
<b>pH</b>	1.13	1,30	0.92	0.91

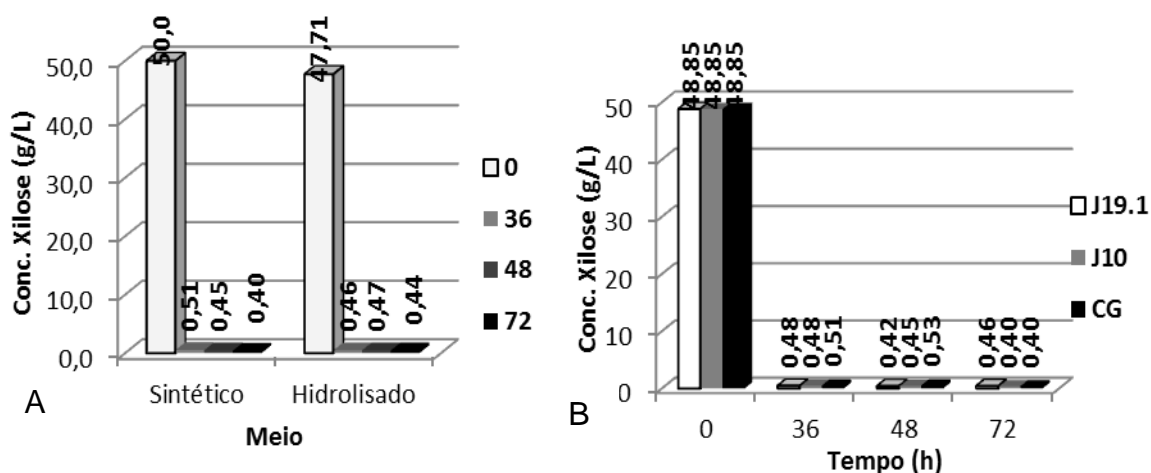
**Tabela 2.** Concentração de açúcares, ácido acético, fenóis e pH do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana homogeneizado obtido por hidrólise ácida diluída.

	CONCENTRAÇÃO	
	Hidrolisado Original	Hidrolisado Concentrado
<b>Xilose (g/L)</b>	17,80	47,71
<b>Glicose (g/L)</b>	3,44	9,87
<b>Arabinose (g/L)</b>	2,06	6,00
<b>Ácido Acético (g/L)</b>	2,29	0,0
<b>pH</b>	1.04	1,34
<b>Fenóis (g/L)</b>	1,8	2,4

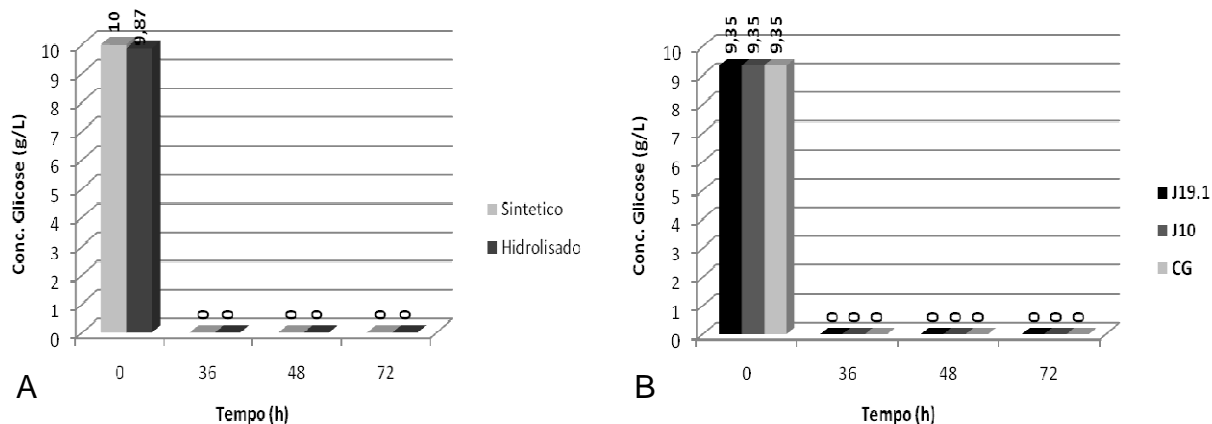
Observou-se (Figura 3) que o pico de produção de etanol ocorreu com 36 horas de fermentação, e em seguida houve um decréscimo na sua concentração. A produção de etanol por leveduras e o decréscimo da sua concentração ao longo das fermentações tem sido constatada em outras pesquisas que empregaram hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana obtido por hidrólise ácida diluída como substrato para o processo, utilizando as leveduras *Candida guilliermondii* FTI 20037 (ARRUDA & FELIPE, 2009) e *Pichia stipitis* DSM 3651 (Canilha, et al. 2010).

Segundo (Kipper, 2009), em pesquisas com a levedura *Pachysolen tannophilus* o ápice da produção de etanol em meio hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar ocorreu

27 e 28 de junho de 2012 - Ribeirão Preto SP  
 após 24 horas de fermentação, resultando em concentração de 0,216% de etanol no vinho. A partir de 48 horas essa concentração foi reduzida, uma vez que provavelmente o microrganismo passou a utilizar o etanol como fonte de carbono. Nesse ensaio, esse comportamento foi observado a partir de 36 horas de fermentação (Figura 3).



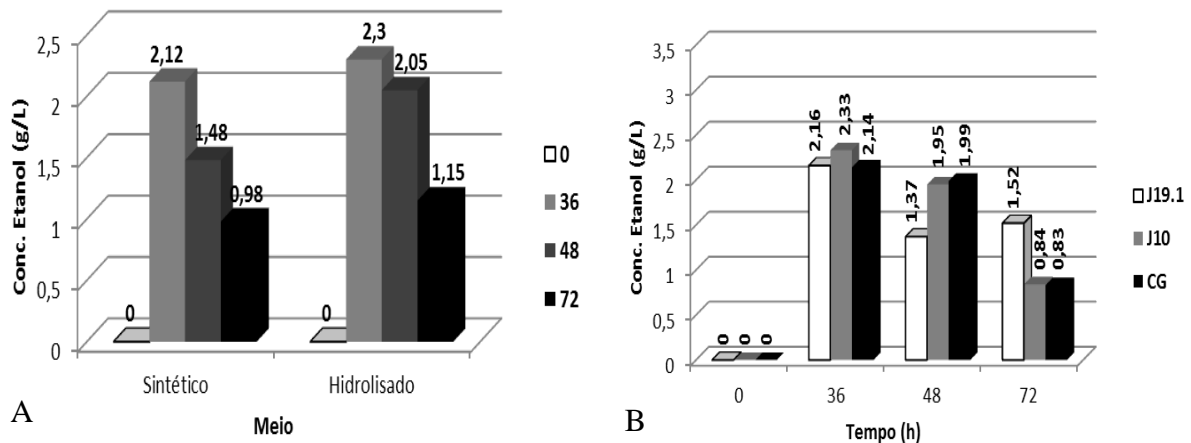
**Figura 1.** Consumo de xilose (g/L). **1A.** Consumo de xilose durante o período de 72 horas, em mosto sintético e hidrolisado de bagaço de cana. **1B.** Consumo de xilose pelas cepas J10, J19.1 e CG durante o período de 72 horas.



**Figura 2.** Consumo de glicose (g/L). **2A.** Consumo de glicose durante o período de 72 horas, em mosto sintético e hidrolisado de bagaço de cana. **2B.** Consumo de glicose pelas cepas J10, J19.1 e CG durante o período de 72 horas.

Com base nos resultados obtidos, pode-se constatar que as cepas de leveduras produziram etanol a partir da xilose, porém em baixa concentração. Sendo assim, novos estudos devem ser conduzidos, utilizando maiores concentrações desse açúcar em meio sintético, ou ainda enriquecendo o mosto com nutrientes, para avaliar o potencial fermentativo desses microrganismos.

27 e 28 de junho de 2012 - Ribeirão Preto SP



**Figura 3.** Consumo de xilose (g/L). **3A.** Produção de etanol durante o período de 72 horas, em mosto sintético e hidrolisado de bagaço de cana. **3B.** Produção de etanol pelas cepas J10, J19.1 e CG durante o período de 72 horas.

## REFERÊNCIAS

- Canilha, L.; Carvalho, W.; Felipe, M. G. A.; Almeida e Silva, J.B. ; Giuliatti, M. (2010). Ethanol production from sugarcane bagasse hydrolysate using *Pichia stipitis*. *Appl Biotechnol* 161:84-92.
- Felipe, M. G. A., Vieira, D.C., Vitolo, M., Silva, S.S., Roberto, I.C., Mancilha, I.M., (1995). Effect of acetic acid on xylose cultivation by *Candida guilliermondii*. *J. Basic Microbiol.* 35 (3), 171–177.
- Folin, O.; Ciocalteau, V. (1927). On tyrosine and tryptophane determinations in proteins. *J. Biol. Chem.*, 73 (2), 627-650.
- Guidi, R. H. (2000). *Caracterização, classificação e determinação de marcadores genético moleculares de estirpes e leveduras contaminantes do processo fermentativo*. Jaboticabal, Brasil, p. (M.Sc., UNESP).
- Kipper, P. G. (2009). *Estudo da pré-hidrólise ácida do bagaço de cana-de-açúcar e fermentação alcoólica do mosto de xilose por *Pachysolen tannophilus**. Rio Claro, Brasil, 100p. (M.Sc., UNESP).
- Marton, J. M. (2002). *Avaliação dos diferentes carvões ativadas e das condições de adsorção no tratamento do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana de açúcar para a obtenção biotecnológica de xilitol*. Lorena, Brasil, 105p. (M.Sc. FAENQUIL, USP).
- Moraes, E. J. C. (2008). *Estudo de Viabilidade econômica da produção de xilitol a partir de hidrolisado hemicelulósico de palha de cevada*. Lorena, Brasil, 157p. (PhD. Thesis. FAENQUIL, USP).
- Rodrigues, F. A. (2007). *Avaliação da Tecnologia de Hidrólise Ácida de Bagaço de Cana*. Campinas, Brasil, p. (UNICAMP).
- Schirmer-Michel, A. C.; Flôres, S. H.; Hertz, F.; Matos, G. S.; Ayub, M. A. (2008). Production of ethanol from soybean hull hydrolysate by osmotolerant *Candida guilliermondii* NRRL Y-2075. *Bior. Tech.*, 99, 2898–2904.
- Santos, J. P. A. (2007). *Estudo da produção de etanol por *Pichia stipitis* empregando hidrolisado de palha de arroz*. Lorena, Brasil, 144p. (M.Sc. Dissertation. FAENQUIL, USP).

27 e 28 de junho de 2012 - Ribeirão Preto SP

Toivari, M.H., Aristidou, A., Ruohonen, L., Pentilla, M. (2001). Conversion of xylose to ethanol by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*: Importance of xylulokinase (XKS1) and oxygen viability. *Metabol. Eng.* 3, 236–249.