

Produção de Bioetanol a partir de hidrolisado lignocelulósico com ênfase no aproveitamento das pentoses

Palavras-Chave: Bioetanol, Otimização, Biomassa

Heitor Pacheco Inoue, Instituto de Biologia – IB/UNICAMP

Allan Henrique Félix de Mélo, Faculdade de Engenharia de Alimentos – FEA/UNICAMP

Prof.^a Dr.^a Rosana Goldbeck, Faculdade de Engenharia de Alimentos – FEA/UNICAMP

1. INTRODUÇÃO

A produção de bioetanol é considerada uma tecnologia de energia sustentável, limpa e renovável, assim estudos vêm avaliando tal produto para substituir os combustíveis derivados do petróleo (CHEN et al., 2019).

O Brasil é referência na produção de etanol de cana de açúcar, e seu bagaço é uma enorme fonte de biomassa lignocelulósica, cerca de 250 kg de resíduo por tonelada de cana são gerados. (BANOTH et al., 2017). Porém os açúcares encontrados na biomassa se apresentam de forma polimerizada em: celulose (Fração C6) e hemicelulose (Fração C5) com o envolvimento de uma estrutura resistente (lignina), desta forma para que haja a liberação dos açúcares é preciso um pré-tratamento e hidrólise da biomassa para a obtenção de açúcares fermentescíveis e estes serem convertidos a etanol (MILÃO et al., 2019).

As novas etapas do processo acabam gerando mais custos comparado a primeira geração do etanol (1G) Processos eficientes vêm sendo estudados, sobretudo, na produção de etanol a partir de hexoses, contudo poucos vem operando pentoses como um substrato efetivo, sendo que esta fração representa aproximadamente 40% do total dos açúcares presentes na biomassa e este potencial não deve ser negligenciado (DE ARAUJO GUILHERME et al., 2019; SAHA, 2003).

Neste sentido, determinar um microrganismo robusto com capacidade de converter as pentoses da biomassa em bioetanol é essencial. As leveduras *Spathaspora passalidarum* e *Scheffersomyces stipitis* são exemplos de microrganismos promissores, no entanto, as condições de cultivo e composição do substrato precisam ser otimizadas para garantir a viabilidade econômica do processo. A técnica de planejamento experimental é uma ferramenta útil para avaliar os efeitos das variáveis do processo e determinar as suas condições ótimas. (ROSA; PINHEIRO, 2021).

Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar os principais microrganismos e condições de processo descritos na literatura sobre o aproveitamento, sobretudo, de pentose advindas do hidrolisado lignocelulósico e mediante a ferramenta de planejamento experimental, verificar a concentração de açúcares necessária para otimizar a produção de bioetanol.

2. METODOLOGIA

2.1 Revisão Bibliográfica

Para avaliar os melhores microrganismos e delimitar as faixas de estudo para a otimização da produção de bioetanol a partir de pentoses foi realizado uma revisão de literatura, em que foram pesquisados dados de Microrganismos, condições de processo e parâmetros produtivos, mediante artigos científicos nas bases de dados: Scopus e Google Scholar; com as seguintes combinações de palavras-chaves principais: "ethanol", "hemicelulose" e "biorreator", além da palavra-chave secundária (mais específica), "spathaspora passalidarum".

2.2 Delineamento de Mistura para composição ótima dos açúcares

A fim de avaliar a influência da composição ótima de açúcares para a produção de bioetanol foi realizado um planejamento experimental de mistura do tipo "Simplex Centróide" (sete ensaios), com os componentes: glicose, xilose e sacarose* (* - hidrolisada) como variáveis independentes; avaliados em 4 níveis: 0 (0%), 1/3 (33%), 1/2 (50%) e 1 (100%); para um total de 50 g/L de açúcar, enquanto para variáveis resposta (dependente) foram avaliados a velocidade máxima de crescimento (μ_{\max}) e produção de etanol. As fermentações foram realizadas em microplacas de 96 poços em leitor de microplaca TECAN, com suplementação de peptona 20 g/L e 10 g/L de extrato de levedura. Foram avaliadas as cepas de *Spathaspora passalidarum* NRRL Y-27907 (ARS Culture Collection) e *Scheffersomyces stipitis* Y-7124 a 30° C e 200 rpm. A significância estatística da regressão foi determinada usando o teste t de Student ($p \leq 0,10$) e o modelo de regressão polinomial foi determinado por análise de variância (ANOVA) ($p \leq 0,10$), mediante o software STATISTICA (Statsoft, Oklahoma, EUA) versão 10.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Revisão Bibliográfica – Microrganismos e condições para fermentação de pentoses

A tabela 1 apresenta um conjunto dos principais microrganismos descritos como fermentadores de pentoses, substratos avaliados, condições empregadas no processo e na otimização da produção de bioetanol. Majoritariamente a faixa de temperatura aplicada nos processos é de 28°C a 30°C, exceto para *Kluyveromyces marxianus* que apresenta perfil termotolerante. Agitação e aeração com condições médias de 200rpm e aeração de 0,1vvm, respectivamente.

Condições anaeróbicas são promissoras, uma vez que simulam as condições industriais reais, mas apresentam desvios metabólicos para produção de xilitol; os quais podem ser ressignificados no contexto da biorrefinaria (FURLAN; BOUILLAUD; DE CASTRO, 1994; BONAN et al., 2021).

A co-fermentação aparece como uma das estratégias para otimização da produção de etanol (FARIAS; MAUGERI-FILHO, 2019). Hickert et al aplicaram a combinação dos microrganismos *S. cerevisiae* e *Spathaspora arborariae* obtendo alto rendimento de 0,48 g/g. As concentrações de inóculos observadas foram variadas (0,33 – 20 g/L), mas a alta concentração celular apresenta a vantagem de maior tolerância a inibidores nos hidrolisados lignocelulósicos (SOARES et al., 2020). Sobre os substratos a maioria observada foram hidrolisados lignocelulósicos provindos do bagaço da cana de açúcar e resíduos agroindustriais, e os meios sintéticos, quando estudados, referem-se às porções dos açúcares nos hidrolisados.

Tabela 1: Principais Microrganismos, Substratos e Condições de Processo para a Produção de Etanol a partir de substratos Hemicelulósicos

Microrganismo	Cepa/Coleção	Substrato	Modo Fermentativo	Condições de operação	Inóculo	Rendimento	Produtividade	Referências
<i>Scheffersomyces stipiti</i>	NRRL Y-7124	Hidrolisado de bagaço de cana	Batelada	28 °C, 0,05 vvm 200 rpm	1 g/L	0,390g/g 0,430g/g	1 g/L.h	(FARIAS et al., 2017)
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	DMB 13	40 g/L de Glicose e 20 g/L de Xilose	Batelada	40 °C; 100 rpm *	0,3%	0,402g/g	nc	(SUZUKI; HOSHINO; MATSUSHIKA, 2019b)
<i>Scheffersomyces stipitis</i>	NRRL Y-7124	Hidrolisado de bagaço de cana	Batelada	30° C 400 rpm 0.1 vvm	1,0 g/L	0,221g/g 0,416g/g	0,086 g/L.h 0,253 g/L.h	(DUSSÁN et al., 2016)
<i>Scheffersomyces shehatae</i>	UFMG HM 52.2							
<i>S. cerevisiae</i>	ICV D254	Hidrolisado de casca de arroz	Batelada	28°C; 1vvm; 180 rpm	1,0 OD	0,480g/g	nc.	(HICKERT et al., 2013)
<i>Spathaspora arborariae</i>	NRRL Y-48658							
<i>Scheffersomyces stipitis</i>	NRRL-Y7124	Xarope de cana	Batelada	30°C; 0,1 vvm 200 rpm	10g/L	0,520g/g	1,53 g/L.h	(SANTOS et al., 2016)
<i>Spathaspora passalidarum</i>	NN 245	D-glucose D-xilose	Batelada	30°C; 500 rpm 0,25 vvm	20 g/L	0,41g/g 0,31g/g	1,14 g/L.h 0,72 g/L.h	(LONG et al., 2012)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	DX123	65 g/L Xilose	Batelada	30°C 200 rpm; *	0,33 g/L	0,427g/g	0,96g/L.h	(JO et al., 2017)

legenda: a = co-fermentação/ OD = Densidade óptica/ nc = Não comentado/ * = processo sem aeração

3.2 Planejamento Experimental de Mistura

Após a etapa de revisão bibliográfica foi observado a carência de estudos que determinem a concentração ótima de açúcares para a máxima produção de bioetanol, mesmo já sendo descrito a necessidade de glicose em fermentações com hidrolisados hemicelulósicos. Além disso, a sacarose hidrolisada foi avaliada no planejamento, uma vez que o melaço disponível no processo 1G, pode fornecer tal suplemento, sendo um elemento importante para ser avaliado.

A Figura 1 apresenta os dados de validação estatística para os modelos quadráticos obtidos como saída do planejamento de mistura para a levedura *Scheffersomyces stipitis*. Os resultados para *Spathaspora passalidarum* (dados não mostrados) não apresentaram modelos com significância estatística a 90% de confiança, sendo seus efeitos analisados para definir novos ensaios.

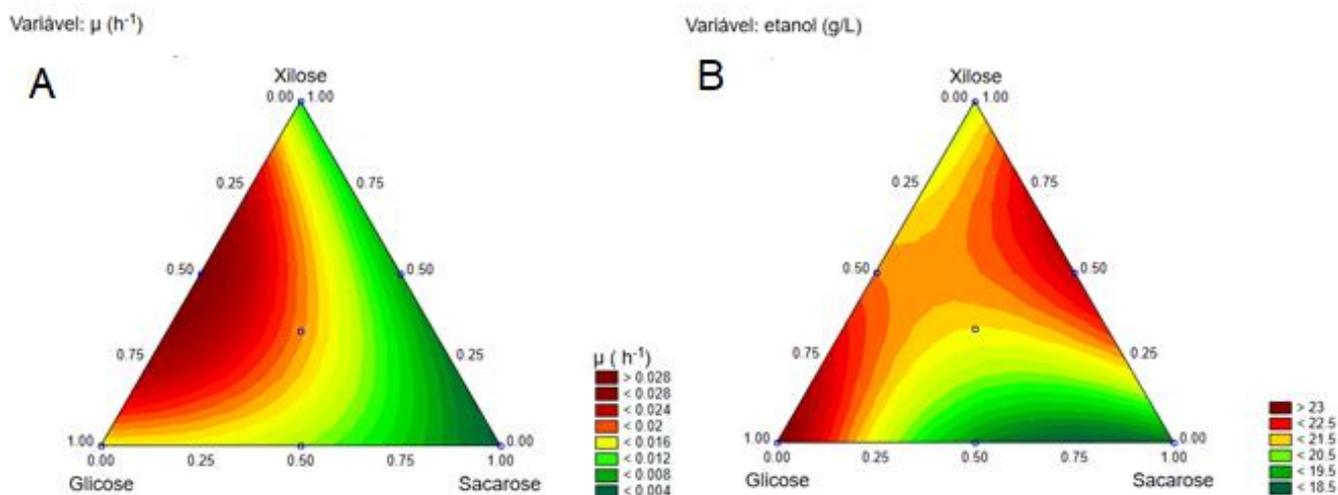
O máximo crescimento específico foi obtido na região da linha binária glicose-xilose, em que pelo menos 25% de glicose se faz necessário para maximizar o crescimento, enquanto em relação a produção de etanol, duas regiões ótimas foram obtidas. A primeira, na faixa entre 75% e 100% de glicose, enquanto a segunda na região xilose-sacarose, em que pensando no aproveitamento de hidrolisados hemicelulósicos (majoritariamente xilose), tem-se a proporção ótima de 75% de xilose para 25% de sacarose*.

Bonan et al. (2021) obtiveram melhor rendimento na produção de etanol com *S. passalidarum* na proporção de 35% de glicose e 65% de xilose, em que também otimizaram a produção de xilitol, demonstrando um potencial a ser explorando no âmbito de uma biorrefinaria com base em pentoses do hidrolisado lignocelulósico.

Figura 1: Análise de Variância (ANOVA) e Regressão para validação estatística dos Modelos de Velocidade máxima específica de crescimento e produção de etanol.

Perfil	Modelo	p-valor	R ²	R ² ajustado
A - $\mu_{\text{máx}}$	Quadrático	0,0950	0,9956	0,9737
B - Etanol	Quadrático	0,0276	0,9641	0,7846

Figura 2: Gráfico de Curva de Contorno - Otimização da produção de Etanol pela mistura de açúcares



4. CONCLUSÕES

As leveduras *S. passalidarum* e *S. stipitis* apresentam potencial para plataforma de produção de etanol a partir de pentoses, em que para a última, a proporção de 25% sacarose* e 75% xilose apresentou condição ótima com cerca de 90% do rendimento teórico. Vale destacar ainda que a produção de xilitol (desvio metabólico) deve ser considerada como uma estratégia para garantir um melhor rendimento econômico do processo.

5. BIBLIOGRAFIA

BANOTH, C.; SUNKAR, B.; TONDAMANATI, P. R.; BHUKYA, B. Improved physicochemical pretreatment and enzymatic hydrolysis of rice straw for bioethanol production by yeast fermentation. **3 Biotech**, [s. l.], v. 7, n. 5, p. 334, 2017.

Bonan, C.I.D.G., Tramontina, R., dos Santos, M.W. et al. Biorefinery Platform for *Spathaspora passalidarum* NRRL Y-27907 in the Production of Ethanol, Xylitol, and Single Cell Protein from Sugarcane Bagasse. **Bioenerg. Res.** (2021).

DE ARAUJO GUILHERME, A.; DANTAS, P. V. F.; PADILHA, C. E. de A.; DOS SANTOS, E. S.; DE MACEDO, G. R. Ethanol production from sugarcane bagasse: Use of different fermentation strategies to enhance an environmental-friendly process. **Journal of Environmental Management**, [s. l.], v. 234, n. December 2018, p. 44–51, 2019.

DUSSÁN, K. J.; SILVA, D. D. V.; PEREZ, V. H.; DA SILVA, S. S. Evaluation of oxygen availability on ethanol production from sugarcane bagasse hydrolysate in a batch bioreactor using two strains of xylose-fermenting yeast. **Renewable Energy**, [s. l.], v. 87, p. 703–710, 2016.

FARIAS, D.; IBRAIM, D.; ATALA, P.; MAUGERI, F. Improving bioethanol production by *Scheffersomyces stipitis* using retentostat extractive fermentation at high xylose concentration. **Biochemical Engineering Journal**, v. 121, p. 171–180, 2017.

FARIAS, D.; MAUGERI-FILHO, F. Co-culture strategy for improved 2G bioethanol production using a mixture of sugarcane molasses and bagasse hydrolysate as substrate. **Biochemical Engineering Journal**, v. 147, n. January, p. 29–38, 2019.

FURLAN, S. A.; BOUILLAUD, P.; DE CASTRO, H. F. Influence of oxygen on ethanol and xylitol production by xylose fermenting yeasts. **Process Biochemistry**, [s. l.], v. 29, n. 8, p. 657–662, 1994.

HICKERT, L. R.; SOUZA-CRUZ, P. B. De; ROSA, C. A.; AYUB, M. A. Ô. Z. 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**, [s. l.], v. 143, p. 112–116, 2013.

JO, J. H.; PARK, Y. C.; JIN, Y. S.; SEO, J. H. Construction of efficient xylose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae* through a synthetic isozyme system of xylose reductase from *Scheffersomyces stipitis*. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 241, p. 88–94, 2017.

LONG, T. M.; SU, Y.; HEADMAN, J.; HIGBEE, A.; WILLIS, L. B.; JEFFRIES, T. W. Cofermentation of Glucose, Xylose, and Cellobiose by the Beetle-Associated Yeast *Spathaspora passalidarum*. **Applied and environmental microbiology**, [s. l.], v. 78, 2012.

MILÃO, R. D. F. D., Carminati, H. B., OFÉLIA DE QUEIROZ, F. A., & DE MEDEIROS, J. L. (2019). Thermodynamic, financial and resource assessments of a large-scale sugarcane-biorefinery: Prelude of full bioenergy carbon capture and storage scenario. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, 113, 109251.

ROSA, J. M. A., & PINHEIRO, I. R. (2021). Produção de bioetanol a partir do hidrolisado de bagaço de laranja em biorreator coluna de bolhas utilizando *Saccharomyces cerevisiae* em alginato de cálcio. **Brazilian Journal of Development**, 7(1), 3297-3316.

SAHA, B. C. Hemicellulose bioconversion. [s. l.], p. 279–291, 2003.

SANTOS, S. C.; DE SOUSA, A. S.; DIONÍSIO, S. R.; TRAMONTINA, R.; RULLER, R.; SQUINA, F. M.; VAZ ROSSELL, C. E.; DA COSTA, A. C.; IENCZAK, J. L. Bioethanol production by recycled *Scheffersomyces stipitis* in sequential batch fermentations with high cell density using xylose and glucose mixture. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 219, p. 319–329, 2016.

SOARES, L. B.; BONAN, C. I. D. G.; BIAZI, L. E.; DIONÍSIO, S. R.; BONATELLI, M. L.; ANDRADE, A. L. D.; RENZANO, E. C.; COSTA, A. C.; IENCZAK, J. L. Investigation of hemicellulosic hydrolysate inhibitor resistance and fermentation strategies to overcome inhibition in non-saccharomyces species. **Biomass and Bioenergy**, v. 137, n. July 2020.

SUZUKI, T.; HOSHINO, T.; MATSUSHIKA, A. High-temperature ethanol production by a series of recombinant xylose-fermenting *Kluyveromyces marxianus* strains. **Enzyme and Microbial Technology**, [s. l.], v. 129, n. June, 2019.a.