

INFLUÊNCIA DA CARGA DE *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* NA FERMENTAÇÃO E ISOMERIAÇÃO SIMULTANEAS (SIF) DE XILOSE VISANDO APLICAÇÃO NA PRODUÇÃO DE ETANOL 2G

João Pedro Marques de Souza¹ (IC), Marcio Daniel Nicodemos Ramos² (PG), Juliana Passamani Sandri² (PG), Teresa Cristina Zangirolami² (PQ), Thais Suzane Milessi Esteves (PQ)^{1,2}

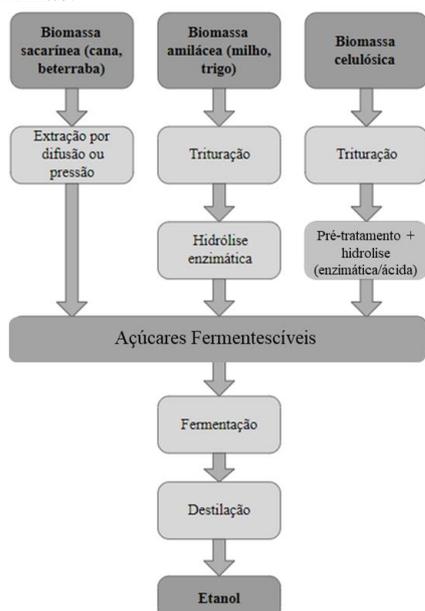
¹Universidade Federal de Itajubá
²Universidade Federal de São Carlos

Palavras-chave: Bioetanol. Fermentação. Xilose isomerase. SIF.

Introdução

Devido ao crescimento desenfreado da sociedade moderna seguido do uso indiscriminado de combustíveis fósseis, acarretou-se vários problemas ambientais que seguem como um dilema da atualidade (SILVA et al, 2012). Como uma possível forma de amenizar o impacto causado por esses combustíveis fósseis tem-se a fermentação para a produção de Biocombustíveis, sendo assim uma fonte de energia alternativa e renovável (DE ANDRADE et al., 2019), a qual pode ser obtida por diferentes matérias primas (Figura 1).

Figura 1 – Produção de etanol a partir de diferentes matérias primas.



Fonte: MILESSI (2017)

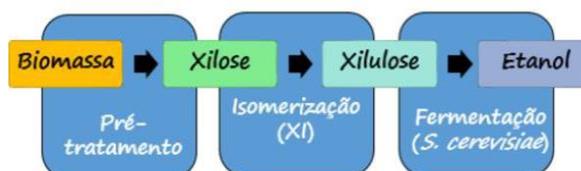
O Etanol é comumente produzido a partir da cana-de-açúcar, o que o torna um combustível renovável devido a sua origem vegetal, esse etanol é conhecido

como etanol de primeira geração (1G) (MONTEIRO et al, 2016). É possível também produzir etanol do bagaço da cana-de-açúcar, que é um material lignocelulósico, rico em açúcares, fazendo assim o etanol de segunda geração (2G). Um dos desafios ligados ao etanol 2G é a dificuldade de fermentar as pentoses extraídas do bagaço da cana, tornando o processo mais caro e complexo (SOUZA et al, 2012).

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é amplamente utilizada na fermentação para produção de etanol 1G no Brasil, principalmente pela sua eficiência, além de ser um microrganismo robusto e resistente diante das condições ideais de fermentação (AZHAR et al.,2017). Já para a produção de etanol 2G essa levedura é menos versátil, pois não possuem capacidade de transformação da xilose em etanol (APEL et al., 2016; ZHANG, 2019)

Uma das formas de contornar essa limitação é utilizando a xilose isomerase (XI, E.C. 5.3.1.5) que é uma enzima capaz de transformar xilose em xilulose o qual é um isômero assimilado pela *S. cerevisiae*, (MILESSI et al. 2018). Porém esse processo de isomerização é reversível e desfavorável para formação de xilulose, o equilíbrio químico entre elas fica em 5:1. Uma das maneiras de se contornar esse desfavorecimento é consumindo a xilulose na fermentação simultaneamente com a isomerização, deslocando o equilíbrio. Esse processo é chamado de Fermentação e Isomerização Simultânea (SIF) (Figura 2) (AQUINO, 2013).

Figura 2 – Esquema de processos da SIF.



Fonte: Milessi et al. (2020).

Porém, as condições ótimas de operação para a XI e a levedura diferem significativamente (pH 7/60°C e pH 5/35°C, respectivamente) (CHIANG, 1981), adicionalmente por se tratar de um processo em cascata, as etapas do mesmo devem estar sincronizadas, com a relação ideal enzima/levedura de forma que o processo ocorra de forma eficiente e otimizada. Assim, faz-se necessário estudos sobre o comportamento SIF em diversas condições para otimização do processo. Neste sentido, o presente trabalho tem por objetivo avaliar o impacto da variação da concentração celular no desempenho do processo SIF utilizando uma quantidade fixa de enzimas, de forma a se obter diferentes razões enzima/levedura e identificando assim a importância da etapa de fermentação no processo.

Metodologia

Foram utilizadas em todos os experimentos a levedura *S. cerevisiae* liofilizada (Itaiquara®, Brasil) e xilose isomerase (XI, EC 5.3.1.5, comercializada como Gensweet SGI, Genencor-Dupont/USA).

As células foram ativadas de acordo com metodologia estabelecida por Ramos et al. (2022) (Figura 3) e inoculadas em meio YPD, o qual é composto de 5 g/L de extrato de levedura, 10 g/L de peptona e 20 g/L de glicose, por 12h a 30°C e 150 RPM até atingir-se uma densidade óptica (DO) no espectrofotômetro igual a 8 (correspondente a fase exponencial de crescimento microbiano) verificada no espectrofotômetro a 600 nm. As células foram recuperadas por centrifugação (3500 rpm por 15 min) e utilizadas nos cultivos.

O meio de cultivo SIF foi composto por xilose (65 g/L), KH_2PO_4 (5 g/L), MgSO_4 (2 g/L), CoCl_2 (0,1 g/L) e ureia (1,5 g/L). Os ensaios foram realizados em mini-reatores com volume total de 4 mL, com enzima fixa em 120 UI/mL e variando-se a carga de células, em 25 g/L (Ensaio A) e 100 g/L (Ensaio B), de forma a se obter uma razão enzima levedura de 4,8 e 1,2. Os ensaios SIF foram feitos a 35°C, pH 5,5 e de forma estática. Os reatores eram dotados de uma saída para o CO_2 de forma que o acompanhamento foi dado pela liberação de massa de CO_2 até estabilização da massa dos mini-reatores, uma vez que pela estequiometria a mesma é um indicativo da produção de etanol (Equação 1). Um reator foi preenchido apenas com meio para servir de controle e medir a evaporação do meio nas condições de processo.

Equação 1 – Estequiometria da reação de xilose em Etanol e formação de CO_2 .



Xilose e etanol foram quantificados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), utilizando um cromatógrafo Waters e2695 equipado com detectores de índice de refração e UV-visível. Foram utilizadas a coluna Sugar-PakTMI (300×6,5 mm) e água ultra pura como fase móvel num fluxo de 0,6 mL/min e temperatura de 80 °C.

A viabilidade da levedura após os cultivos foi feita por meio de coloração com azul de metileno e contagem em câmara de Neubauer. A viabilidade celular foi definida como a razão entre células viáveis e células totais (viáveis e não viáveis) computadas num espaço definido da câmara de contagem (SILVA,2013).

Os cultivos foram avaliados quanto à conversão, rendimento em etanol, produtividade e eficiência, de acordo com as equações 2-5 (SHULER, 1992).

Equação 2 – Conversão de Xilose na SIF.

$$\text{Conversão}(\%) = \frac{S_0 - S}{S_0} 100$$

Onde S_0 é a concentração de substrato inicial (g/L) e S é a concentração de substrato final (g/L).

Equação 3 – Fator de rendimento($Y_{P/S}$) de xilose em etanol

$$Y_{P/S} = \frac{P - P_0}{S_0 - S}$$

Onde P_0 é a concentração de etanol inicial (g/L) e P é a concentração de etanol final (g/L).

Equação 4 – Produtividade volumétrica de etanol na SIF.

$$Q_P = \frac{P - P_0}{t_f}$$

Em que t_f é o tempo final do processo.

Equação 5 – Eficiência do processo.

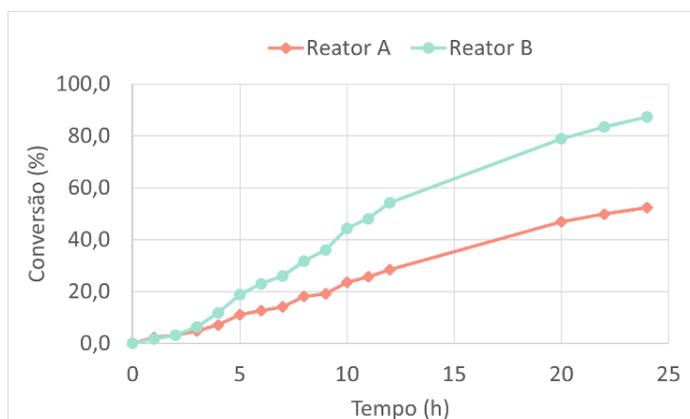
$$\eta = \frac{Y_{P/S}}{Y_{P/S(\text{teórico})}} 100$$

Onde $Y_{P/S(\text{teórico})}$ é verificado na literatura como sendo 0,51 (FIORIO, 2015).

Resultados e discussão

O processo SIF utilizando diferentes cargas de biomassa celular foi acompanhado por 24h a fim de identificar a influência desta variável na conversão do processo. O reator B, contendo maior carga celular, apresentou uma velocidade de conversão consideravelmente mais alta que o reator A (Figura 3), atingindo uma conversão de xilose de 87,4%, comparada a 52,4% obtida no reator com menor carga celular.

Figura 3 – Gráfico de perda de CO₂ ao longo de 24h de fermentação a 35°C e pH 5,5.



Fonte: Autor.

Consequentemente, o reator B produziu uma maior quantidade de Etanol e apresentou menos xilose residual que o reator A (Tabela 1).

Tabela 1 – Parâmetros fermentativos dos cultivos SIF realizados com diferentes cargas de levedura (enzima fixa em 120 UI/mL, 35°, pH 5,5 e estático).

	Reator A	Reator B
Levedura (g/L)	25	100
Conversão (%)	52,4	87,4
Etanol (g/L)	8,0	10,0
Xilose residual (g/L)	31,0	8,2
Y _{P/S} (g/g)	0,23	0,27
Q _p (g/L.h)	0,32	0,41
η (%)	45	55
Viabilidade (%)	(~100)	(~100)

Fonte: Autor.

Esta relação também está diretamente ligada as razões (enzima/célula), como observado por Milessi (2018), já que por se tratar de um processo em cascata, se a velocidade de isomerização no processo for superior a de fermentação, esta última passará a ser a etapa limitante do processo. Adicionalmente, a velocidade de fermentação da xilulose já é naturalmente mais lenta,

sendo da ordem de 10 vezes menor que a fermentação de sacarose (açúcar do caldo de cana usado no etanol 1G) (AQUINO, 2013), assim, observa-se que o aumento de carga celular no reator foi benéfico para o processo SIF, aumentando o consumo de xilulose e deslocando o equilíbrio de reação. A baixa eficiência de ambos os cultivos pode ser justificada pelo fato dos ensaios não terem sido realizados sob controle de pH. A pHs abaixo de 5,0 a atividade da XI diminui consideravelmente, de forma que a levedura precisa recorrer a rotas alternativas para manter o balanço redox do meio, desviando o metabolismo para a produção de xilitol, um subproduto do processo (AQUINO, 2013) Milessi et al. (2018) avaliaram a SIF de xilose com e sem controle de pH utilizando levedura e XI co-imobilizadas em alginato de cálcio e observaram resultados semelhantes de eficiência em etanol (0,21 g/g) nos ensaios sem controle, e um aumento significativo (0,34 g/g) quando o pH foi mantido em 5,5. Porém, ainda de acordo com os autores, no contexto de biorrefinaria a co-produção de xilitol não é um empecilho para a produção de etanol 2G uma vez que este co-produto possui auto valor agregado e pode integrar o portfólio de bioprodutos e contribuir para a viabilidade econômica da planta.

Vale ainda ressaltar que em ambos os cultivos a viabilidade celular manteve-se próxima de 100%, reiterando a robustez desta levedura para a produção de etanol

Conclusões

A carga de leveduras, assim como a razão enzima/levedura, representam fator de grande influência no processo SIF, melhorando o desempenho com o aumento da concentração de células uma vez que a fermentação indicou ser a etapa limitante do processo em cascata. Desta forma, tornam-se necessários estudos futuros para se otimizar esta relação e definir as cargas mais adequadas de enzima e células.

Agradecimento

O presente trabalho foi realizado com o apoio do Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica da Universidade Federal de Itajubá (PIBIC-UNIFEI). Agradecimentos ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq (Processos 130409/2021-9 e 407716/2021-1), a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES (Código Financeiro 001), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais - FAPEMIG (APQ01559-21) e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP

(2016/10636-8). Agradecemos também à Dupont/Genencor International Inc. pela doação da enzima XI.

Referências

AQUINO, Patrícia Marina de. Produção de etanol a partir de xilose com glicose isomerase e *Saccharomyces cerevisiae* coimobilizadas em gel de alginato. 2013.

APEL, A.R.; OUELLET, M.; MIDDLETON, H.S.; KEASLING, J.D.; MUKHOPADYAY, A. Evolved hexose transporter enhances xylose uptake and glucose-xylose co-utilization in *Saccharomyces cerevisiae*, *Nature*, 6, 19512, 2016.

AZHAR, SHM; ABDULLA, R; JAMBO, AS; MARBAWI, H; GANSAU, JÁ; FAIK, AZM; RODRIGUES, KF. Yeasts in sustainable bioethanol production: A review. *Biochemistry and Biophysics Reports*, 10, 52-61, 2017.

DE ANDRADE, EDNILTON TAVARES; DE CARVALHO, S. R. G.; DE SOUZA, L. F.. Programa do Proálcool e o etanol no Brasil. *Engvista*, 2009.

CHIANG, Lin-Chang et al. D-Xylulose fermentation to ethanol by *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 42, n. 2, p. 284-289, 1981.

FIORIO, Jhonatan Luiz et al. Potencial de Utilização de Uva-do-japão (*Hovenia Dulcis* T.) para Produção de Fermentado Alcoólico. *Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais*, v. 17, n. 3, p. 277-284, 2015.

MILESSI, TS; AQUINO, PM; SILVA, CR; MORAES, GS; ZANGIROLAMI, TC; GIORDANO, RC; GIORDANO, RLC. Influence of key variables on the simultaneous isomerization and fermentation (SIF) of xylose by a native *Saccharomyces cerevisiae* strain co-encapsulated with xylose isomerase for 2G ethanol production. *Biomass and Bioenergy*, 119, 277-283, 2018.

MILESSI, T. S. S. et al. Repeated batches as a strategy for high 2G ethanol production from undetoxified hemicellulose hydrolysate using immobilized cells of recombinant *Saccharomyces cerevisiae* in a fixed-bed reactor. *Biotechnol. Biofuels.*, v. 13, p. 85, 2020.

MILESSI, T. S. S. Produção de etanol 2g a partir de hemicelulose de bagaço de cana-de-açúcar utilizando *Saccharomyces cerevisiae* selvagem e geneticamente modificada imobilizadas. 2017. 190 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos. 2017.

MONTEIRO, Matheus Frigato; ROSA, Helton Aparecido; DOS SANTOS REIS, Ana Claudia Cabral. Produção de etanol

de primeira e segunda geração. *Acta Iguazu*, v. 5, n. 5, p. 211-217, 2016.

RAMOS, M. D. N., SOUZA, J. P. M., MILESSI, T. S., ZANGIROLAMI, T. C., Development of a protocol for commercial baker yeast propagation aiming its application in bioprocess. In: International conference “advances renewable and clean energy technologies”- ARCT. 2022.

SHULER, Michael L. *Bioprocess engineering*. Prentice-Hall, p. 412-420, 1992.

SILVA, C. R. Produção de etanol a partir da fração hemicelulósica do bagaço de cana usando glicose isomerase coimobilizada com *Saccharomyces cerevisiae*. 2013.

SILVA, C. R., ZANGIROLAMI, T. C., RODRIGUES, J. P., MATUGI, K., GIORDANO, R. C., GIORDANO, R. L. C., 2012. An innovative biocatalyst for production of ethanol from xylose in a continuous bioreactor, *Enzyme and Microbial Technology*, vol. 50, n. 1, pp. 35-42, 2012.

E SOUZA, A.P. et al. Composition and structure of sugarcane cell walls: implications for cell wall hydrolysis and second generation bioethanol. *BioEnergy Research*. No prelo. set. 2012.

ZHANG, C. Lignocellulosic Ethanol: Technology and Economics. In: YUN, Y., editors. *Alcohol Fuels - Current Technologies and Future Prospect*. 2019. p. 1 – 21.