

AValiação DA PRODUÇÃO DE ETANOL 2G PELA ROTA *IN-VIVO* COM A LEVEDURA *S. STIPITIS* EM HIDROLISADO DE PALHA DE CANA

Cristielle Terezinha dos Santos¹ (IC), Jennifer Rodrigues Soares (IC)¹, Thais Suzane Milessi Esteves (PQ)^{1,2}

¹Universidade Federal de Itajubá

²Universidade Federal de São Carlos

Palavras-chave: Alginato de cálcio. Bioetanol. Destoxificação. Fermentação. Palha de cana-de-açúcar.

Introdução

A crescente demanda mundial por energia, a dependência dos combustíveis fósseis e as mudanças climáticas são fatores críticos que induzem avanços no uso e estudo de biocombustíveis (AGUIAR *et al.*, 2021). Neste contexto, destaca-se o etanol de segunda geração (etanol 2G), produzido a partir de matérias-primas lignocelulósicas, como bagaço e palha de cana-de-açúcar (ZHANG, 2019), cujas vantagens são a não competitividade alimentícia e a ampla disponibilidade (MILESSI *et al.*, 2020).

O fato da levedura *Saccharomyces cerevisiae* não converter xilose em etanol permite a exploração de outras leveduras, como a *Scheffersomyces stipitis*, a qual é capaz de metabolizar todos os açúcares presentes na biomassa vegetal, entre eles xilose, glicose, manose e galactose (UNREAN; NGUYEN, 2012). Entretanto, essa levedura costuma apresentar baixa produtividade e ser altamente sensível à inibição dos compostos tóxicos do hidrolisado, os quais são oriundos da etapa de pré-tratamento da biomassa (LIN *et al.*, 2012).

Neste sentido, o presente trabalho propôs a viabilização da fermentação da fração hemicelulósica da palha da cana a etanol 2G pela utilização da *S. stipitis* e a superação do efeito dos inibidores do hidrolisado aplicando-se uma estratégia de destoxificação baseada nas propriedades adsorventes do gel de alginato de cálcio, sendo essa inédita, sustentável, simples e de baixo custo. Após a destoxificação do hidrolisado ácido bruto (HB), avaliou-se a redução da toxicidade no hidrolisado destoxificado (HD) pela produção de etanol 2G.

Metodologia

Pré-tratamento ácido e determinação da umidade da palha de cana: A palha da cana foi triturada e a determinação da sua umidade foi realizada em triplicata, baseada no APHA Method (APHA, 1995). O pré-tratamento ácido da palha foi realizado de acordo com Moutta *et al.* (2011),

utilizando-se H₂SO₄ a 2,92% (m/v) nas condições de 1:4 sólido/líquido, a 130°C por 30 min em autoclave. Ao final, filtrou-se o conteúdo para separação da fração sólida (celulignina) da parte líquida (hidrolisado hemicelulósico). O hidrolisado foi armazenado a 4°C.

Caracterização do Hidrolisado: A caracterização do hidrolisado foi realizada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) utilizando a coluna Sugar-PakTMI (300×6,5 mm) e água ultra-pura como fase móvel num fluxo de 0,6 mL.min⁻¹ e 80 °C. Antes da análise, a amostra foi devidamente filtrada em membrana de 0,2 µm ou em filtros Sep-Pak® C-18 (Waters) para remoção de derivados da lignina e outros produtos de degradação (MILESSI, 2017).

Cultivos com *S. stipitis*: Uma alçada de células da cultura estoque da *S. stipitis* foi transferida para frascos de Erlenmeyer de 125 mL contendo 50 mL de meio sintético (30,0 g.L⁻¹ de xilose, 10,0 g.L⁻¹ de extrato de levedura e 20,0 g.L⁻¹ de peptona) e as células foram cultivadas em incubadora, a 200 rpm, 30°C por 24 horas (MILESSI, 2012). As fermentações realizadas pela *S. stipitis* foram efetuadas em incubadora, a 200 rpm e 30°C, em frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo 40 mL de meio de cultivo e 50 g.L⁻¹ de células iniciais. O meio de cultivo consistiu em HB suplementado com os mesmos componentes usados por Milessi (2012).

Destoxificação do hidrolisado: Primeiramente, fez-se as esferas de alginato de cálcio pelo gotejamento de uma solução de Na-alginato 1% (m/v) em uma solução de CaCl₂ (0,25 M). As esferas foram filtradas e armazenadas em água destilada até a utilização. O hidrolisado destoxificado foi feito utilizando a proporção de 1:10 (m/v) de alginato:hidrolisado, avaliando a adsorção em hidrolisado com pH em estado bruto (pH ~ 0,5) e em pH ajustado para 5,2 com NaOH (6 M). Os ensaios foram realizados em tubos tipo Falcon mantidos em incubadora rotatória a 30°C e 120 rpm. Amostras de 100 µL foram retiradas nos intervalos de 0, 1, 2, 4 e 6 horas.

Cultivos com *S. cerevisiae*: Devido a elevada toxicidade do hidrolisado, ensaios fermentativos com *S. cerevisiae* (Fleischmann®) foram realizados devido à maior robustez desta levedura. Para que o consumo de xilose fosse possível, a enzima xilose isomerase (XI da DuPont™ Genencor®) foi utilizada para a conversão de xilose em xilulose, caracterizando um processo de isomerização e fermentação simultâneas (SIF). Os ensaios foram conduzidos em incubadora a 150 rpm, pH 5,2 e 35°C em mini-reatores contendo 4 mL de volume reacional, 120 UI.mL⁻¹ da enzima xilose isomerase (XI) e 50 g.L⁻¹ de células (MILESSI *et al.*, 2020). Os ensaios foram conduzidos em HB e HD.

Concentração de células e viabilidade celular: A concentração de células foi determinada por turbidimetria em espectrofotômetro, a 600 nm, e correlacionada com o peso seco de células (g.L⁻¹) através de uma curva de calibração correspondente. A viabilidade da levedura foi avaliada por coloração com azul de metileno e contagem em câmara de Neubauer (MILESSI *et al.*, 2020).

Quantificação de compostos fenólicos totais: A quantificação de fenóis totais dos hidrolisado HB e HD foi realizada pelo método de Folin, no qual 20 µL de amostra foram adicionados a 1,58 mL de água destilada e 100 µL de reagente de Folin e mantidos em temperatura ambiente por 3 minutos. Passado o tempo, acrescentou-se 300 µL de Na₂CO₃ (200 g.L⁻¹) e aguardou-se 25 minutos. Ao final, as leituras de absorvância foram realizadas em espectrofotômetro a 765 nm e correlacionadas com uma curva de ácido gálico previamente determinada. O ensaio branco (controle) foi realizado com 20 µL água destilada em substituição à amostra.

Cálculo da capacidade de adsorção dos compostos fenólicos pelas esferas de alginato: A quantidade de compostos fenólicos adsorvidos nas esferas de alginato (mg_{removida}/g_{alginato}), foi calculada por meio da Equação 1, em que V_L é o volume da reação (mL), A é a quantidade de alginato utilizada (g), y₀ e y são a concentração inicial e final de fenóis totais no hidrolisado (mg.mL⁻¹), respectivamente.

$$q = \frac{V_L}{A} (y_0 - y) \quad (1)$$

Resultados e discussão

Após o pré-tratamento ácido, o hidrolisado hemicelulósico obtido apresentou composição de acordo com a Tabela 1.

Tabela 1 – Composição do hidrolisado ácido de palha de cana-de-açúcar.

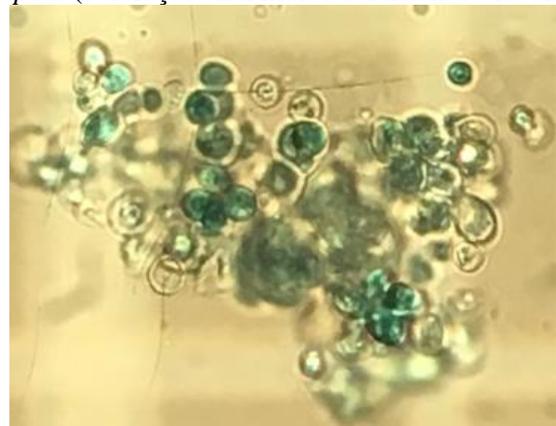
Componente	Concentração (g/L)
Glicose	9,17
Xilose	57,96
Arabinose	11,30
Ácido Acético	9,64
HMF	0,162
Furfural	0,348
Fenóis totais	1,8

A quantificação desses compostos permite constatar que as condições de hidrólise promoveram um hidrolisado rico em xilose, com uma concentração cerca de 6 vezes maior que a de glicose, indicando que a hemicelulose foi suscetível a hidrólise nas condições utilizadas, permanecendo a celulose sem considerável degradação. Este comportamento corrobora com a literatura, uma vez que a hemicelulose, devido a sua estrutura, é mais facilmente hidrolisada que a celulose (FENGEL; WENEGER, 1983).

Além disso, esses resultados revelam que, além dos açúcares fermentescíveis, há a presença de compostos tóxicos aos microorganismos, como ácido acético, originado dos grupos acetila presentes na fração hemicelulósica, e furfural e hidroximetilfurfural (HMF), originados da degradação dos açúcares durante o processo de hidrólise.

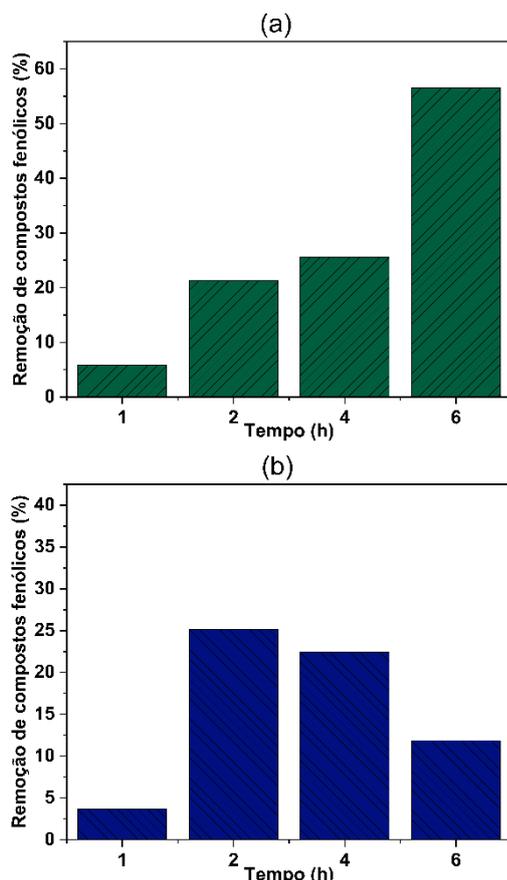
Após a obtenção do hidrolisado de palha com alto teor de açúcares, seguiu-se para os estudos de fermentação do mesmo pela *S. stipitis*. Infelizmente, o HB se mostrou extremamente tóxico para essa levedura, não sobrando células vivas após 12h de processo, conforme visto na Figura 1, e não havendo consumo de açúcares e produção de etanol significativas. Assim, impossibilitando a continuidade dos estudos com esta cepa.

Figura 1 – Microscopia das células de levedura *S. stipitis* (coloração azul indica células não viáveis).



Desta forma, a destoxificação do hidrolisado se mostrou extremamente necessária. Assim, optou-se por destoxificar o hidrolisado ácido da palha da cana por meio da adsorção em gel de alginato de cálcio, tendo em vista que o alginato consiste em um polímero natural (biocompatível), de baixo custo e capaz de remover compostos de soluções aquosas por interação eletrostática quando gelificado (NASTAJ *et al.*, 2016). Além disso, o experimento obteve como variável resposta a concentração de fenóis totais do hidrolisado, uma vez que estes inibidores são facilmente quantificados por espectrofotometria. Sendo assim, as porcentagens de compostos fenólicos removidos em cada condição proposta são apresentadas na Figura 2.

Figura 2 – Remoção de fenóis totais do ensaio de destoxificação com a proporção 1:10 (m/v) de gel:hidrolisado em pH Bruto (a) e pH 5,2 (b).



Conforme pode ser observado na Figura 2, com o pH bruto, no tempo de 6 horas, obteve-se a maior porcentagem de remoção de fenóis (56,56%). Por sua vez, o pH 5,2 alcançou a máxima remoção no tempo de 2 horas, entretanto, seu valor foi menos da metade do que o visto na outra condição (25,17%). Além disso, para o pH 5,2, também se observou a ocorrência da dessorção, evidenciando a fragilidade das interações responsáveis

pela adsorção. Biswas *et al.* (2020) também observou que valores altos de pH culminam em menores remoções de fenóis.

Dessa forma, evidencia-se que o pH da solução tem efeito na capacidade de adsorção. Esse fato pode ser explicado pela forma em que os compostos fenólicos se encontram em solução, dado que a forma molecular domina em valores de pH baixo e a forma aniônica é a espécie predominante em meio alcalino (Nadavala *et al.*, 2009).

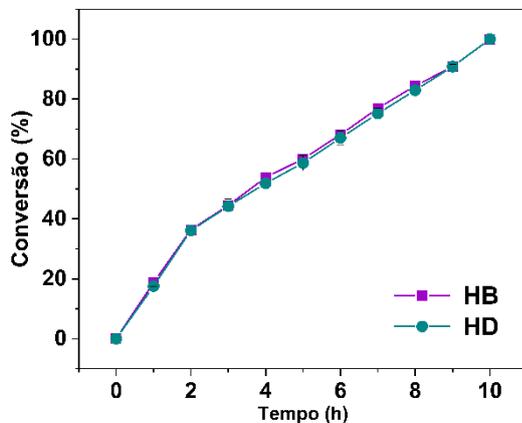
Nesse sentido, diferentes testes para otimizar as condições para a máxima remoção são pertinentes, dado que além do pH da solução, parâmetros como a quantidade de adsorvente, concentração de adsorvato e temperatura exercem efeito na remoção. Como visto por Nadavala *et al.* (2009), em que à medida que a proporção de adsorvente (grânulos de quitosana-alginato de cálcio) aumentou, obteve-se uma maior remoção do adsorvato, devido à maior disponibilidade de sítios de ligação nas esferas. Em relação a temperatura, Biswas *et al.* (2020) notaram que o incremento desse parâmetro favoreceu à adsorção até um certo ponto e, com respeito ao aumento da concentração de fenóis, a porcentagem de remoção decaiu.

Além da porcentagem de remoção dos compostos inibidores deve-se avaliar também a eficiência do processo da adsorção, a qual é demonstrada pela quantidade de composto adsorvida por massa de adsorvente (q). Desse modo, dentre as condições estudadas, o processo em pH bruto também se apresentou superior (160 mg_{fenóis totais}/g_{alginato}, em 6 horas) ao pH 5,2 (33,62 mg_{fenóis totais}/g_{alginato}, em 2 horas). Adicionalmente, neste processo tem-se a vantagem de se dispensar o ajuste do pH, isentando esse gasto do processo de destoxificação.

Assim sendo, o hidrolisado destoxificado com o pH bruto foi selecionado para a etapa de fermentação seguinte. A avaliação da melhoria da toxidez do hidrolisado foi realizada utilizando-se a levedura *S. cerevisiae* em um processo intermediado pela adição da enzima xilose isomerase, a qual permite que a xilose seja fermentada por esta levedura na forma de seu isômero xilulose pelo processo SIF (MILESSI, 2017).

O acompanhamento da conversão de xilose em etanol nos processos é apresentado na Figura 3. Apesar da elevada remoção de inibidores proporcionada pela adsorção em alginato de cálcio, não houve diferença significativa no perfil de fermentação entre HB e HD, de forma que se conclui que o processo de destoxificação proposto não foi eficiente para tornar o hidrolisado um meio propício para a fermentação, sendo necessários maiores estudos para viabilizar a fermentação do hidrolisado de palha.

Figura 3 – Comparação entre a conversão do processo SIF em Hidrolisado Bruto (HB) e Hidrolisado Destoxificado (HD) (35°C, pH 5.2 e 150 rpm).



Conclusões

O presente trabalho contribuiu com informações importantes para o desenvolvimento de um processo de produção de etanol 2G a partir de palha de cana-de-açúcar. O hidrolisado produzido apresentou elevado teor de açúcar, porém mostrou-se extremamente tóxico à levedura *S. stipitis*. Um novo protocolo de destoxificação utilizando-se esferas de alginato como adsorvente dos inibidores do hidrolisado foi avaliado e removeu mais de 50% dos compostos fenólicos presentes no mesmo, porém ainda assim o processo não foi suficiente para viabilizar a eficiência do processo fermentativo, não apresentando diferenças entre as fermentações de hidrolisado bruto e destoxificado, necessitando assim de mais estudos para se desenvolver um método eficiente de destoxificação.

Agradecimento

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pela concessão da bolsa por meio do Programa de Apoio à Iniciação Científica e Tecnológica (PIBIC) e do projeto APQ 01559-21. Ao Prof. Sílvio Silvério pela doação das leveduras *S. stipitis* e a Cachaça da Pedra (Pedralva - MG) pela doação da palha de cana-de-açúcar.

Referências

AGUIAR, A. *et al.* Sugarcane straw as a potential second generation feedstock for biorefinery and white biotechnology applications. **Biomass and Bioenergy**, v. 144, p. 105896, 2021.

APHA. Método 2540 G. Total, fixo, e sólidos voláteis no sólido e semi-sólido amostras. No: Métodos Padrão para a Exame do

Água e Águas residuais, 19 Ed. americano Público Saúde Associação, Washington, DC, EUA. p. 2-58, 1995.

FENGEL, D.; WENEGER, G. Wood – Chemistry Ultrastructure Reactions. Berlin: Walter de Gruyter, 1983.

LIN, T. H.; HUANG, G. F.; GUO, G. L.; HWANG, W. S.; HUANG, S. L. Pilot-scale ethanol production from rice straw hydrolysates using xylose-fermenting *Pichia stipitis*. **Bioresource Technology**, v. 116, p. 314-319, 2012.

MILESSI, T. S. S. **Imobilização de células de Scheffersomyces stipitis para obtenção de etanol de segunda geração em biorreator STR tipo cesta**. Dissertação de mestrado (Biotecnologia Industrial) – Departamento de Biotecnologia, Universidade de São Paulo, 2012.

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**. 190 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2017.

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. **Biotechnology for Biofuels**, v. 13, p. 85, 2020.

MOUTTA, R. O.; CHANDEL, A. K.; RODRIGUES, R. C. L. B.; SILVA, M. B.; ROCHA, G. J. M.; SILVA, S. S. Statistical optimization of sugarcane leaves hydrolysis into simple sugars by dilute sulfuric acid catalyzed process. **Sugar Technology**, v. 14, n. 1, p. 53-60, 2012.

NADAVALA, S. K.; SWAYAMPKULA, K.; BODDU, V. M.; ABBURI, K. Biosorption of phenol and o-chlorophenol from aqueous solutions on to chitosan–calcium alginate blended beads. **Journal of Hazardous Materials**, v. 162, p. 482–489, 2009.

NASTAJ, J.; PRZEWIOCKA, A.; RAJKOWSKA-MYŚLIWIEC, M. Biosorption of Ni(II), Pb(II) and Zn(II) on calcium alginate beads: equilibrium, kinetic and mechanism studies. **Polish Journal of Chemical Technology**, v. 18, p.81–87, 2016.

UNREAN, P.; NGUYEN, N. H. A. Metabolic pathway analysis of *Scheffersomyces (Pichia) stipitis*: effect of oxygen availability on ethanol synthesis and flux distributions. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 94, p. 1387-1398, 2012.

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