

Produção de etanol a partir de meio de cultura hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar

Maciel MJM¹, Farias JA², Silva IR², Souza FRF², Procópio REL²

¹ Universidade Federal do Amazonas – UFAM, Manaus, AM, ²Centro de Biotecnologia da Amazônia – CBA, Manaus, AM. Emails: marciajaque7@gmail.com, saraaraujo.farias@gmail.com, ingridreis.alvrinho@hotmail.com, flavia.cba@sufrema.gov.br, procopio@usp.br

Resumo

O bagaço da cana-de-açúcar é um dos resíduos advindos da intensa atividade das indústrias da cana-de-açúcar sendo o Brasil destaque mundial no uso de energias renováveis. Para conversão do açúcar do bagaço de cana em etanol são utilizadas as leveduras desde a antiguidade. As leveduras utilizadas no trabalho foram a *Pichia stipitis*, a CBAFB07 e CBAFB09. O meio de cultura líquido utilizado foi o hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar a 50%. Cada levedura foi inoculada no período de 10 dias em 3 litros de meio líquido, no fermentador BIOFLO 110, para verificar a produção de etanol foram retiradas alíquotas de 100 ml a cada 24 horas, e para verificar o crescimento das leveduras, elas foram crescidas em meio ágar sabouraud no intervalo de 12 horas até 96 horas. A produção de etanol foi verificada, e desde o primeiro dia foi obtido álcool, a levedura CBAFB09 apresentou maior produção no quarto dia com 5,7% em comparação com as outras leveduras. No crescimento em placas de Petri a levedura *Pichia stipitis* foi a que apresentou o maior crescimento em 48 horas de incubação.

Palavras-chave: Metabolismo microbiano, fermentação, biocombustível.

Introdução

O Brasil possui uma ampla diversidade de ecossistemas, devido à sua extensão, possui diferentes habitats, assim como muitas espécies de animais, plantas e micro-

organismos. A região amazônica ainda abriga espécies desconhecidas, dentre eles algumas espécies de fungos, que se reproduzem com grande facilidade nesta área (Bruce *et al.*, 2012; Rodrigues *et al.* 2012).

Os fungos são seres heterotróficos, eucariontes, que se alimentam de matéria morta, sendo muito importantes para o ambiente por decomporem matéria orgânica, ajudando na ciclagem de nutrientes. Além de serem ubíquos, encontrando-se em animais, solos e plantas. Eles podem ser unicelulares, como as leveduras, ou multicelulares, como os fungos filamentosos (Womack *et al.* 2015; Souza *et al.* 2004). Os fungos têm sido muito utilizados na Biotecnologia, por serem capazes de degradar diversos resíduos agroindustriais, gerando produtos diversos como o etanol, por exemplo.

O Brasil gera diversos resíduos agroindustriais. Entre estes, o bagaço de cana-de-açúcar é predominante com relação a outros países. Ele também gera outros resíduos agroindustriais como palha de cana-de-açúcar, palha de soja, palha de arroz e sabugo de milho (Sarrouh *et al.* 2014).



Fig. 1. Cana-de-açúcar e seu bagaço triturado

Os resíduos agroindustriais, fontes renováveis de carbono e energia, têm sido objeto de intensa pesquisa, para a produção de alimentos, forragens, químicos, além de combustíveis líquidos.

A biotecnologia industrial tem sido considerada uma das rotas mais promissoras para sustentabilidade das atividades industriais. Utilizar leveduras da microbiota amazônica capazes de crescer em meio de cultura contendo hidrolisado ácido do bagaço da cana-de-açúcar como fonte de carbono e verificar a capacidade de produção de etanol dessas leveduras utilizando o bagaço de cana-de-açúcar foram os objetivos deste estudo.

Material e métodos

As leveduras utilizadas foram a *Pichia stipitis*, como padrão, e a CBAFB07 e CBAFB09, que são leveduras selvagens isoladas de fezes de bovinos. As leveduras foram crescidas em meio de extrato de levedura por 48 horas. O meio de cultura líquido utilizado foi o meio de cultura de hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar, que foi feito utilizando a proporção de 50 g de bagaço seco de cana-de-açúcar adicionando 250 ml de ácido sulfúrico a 1%, a mistura foi deixada em repouso por 24 horas, autoclavada por 40 minutos. O bagaço foi prensado e neutralizado com NaOH, até chegar ao pH 5, depois a mistura foi filtrada à vácuo. Para compor o meio hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar a 50%, foram adicionados 1,25 g/L de extrato de levedura, 1,1 g/L de KH₂PO₄ e 40 ml/L de solução de sais e ácido cítrico.

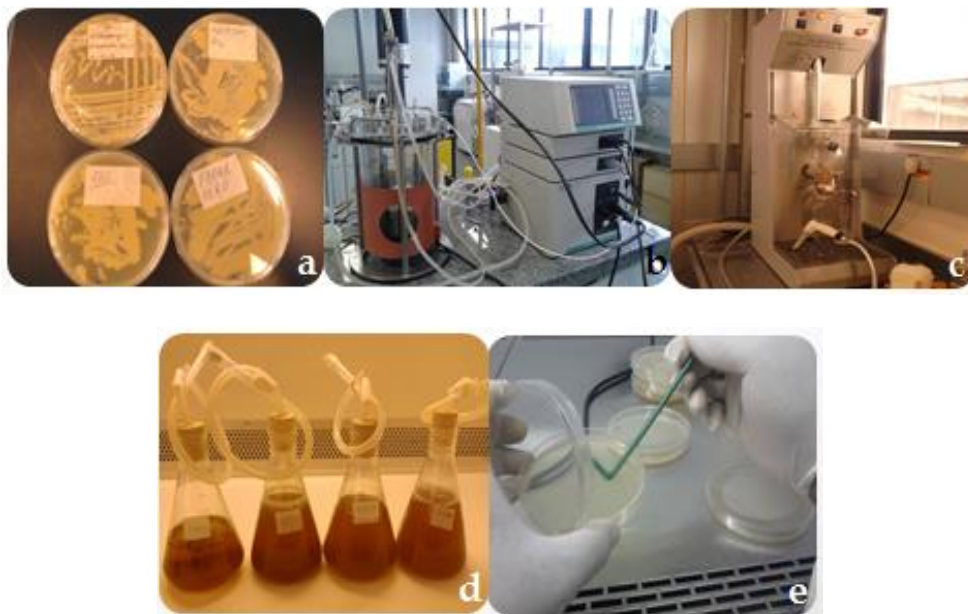


Fig 2. a) placas de Petri contendo as quatro leveduras. b) fermentador BIOFLO 110. c) alcoômetro utilizado para verificar a produção alcoólica. d) erlenmeyers contendo o meio de cultura hidrolisado de cana de açúcar. e) plaqueamento das leveduras em meio ágar sabouraud para crescimento.

Cada levedura foi inoculada no período de 10 dias em 3 litros de meio líquido, no fermentador BIOFLO 110 com béquer de 5 litros, a 35 graus celsius, 103 rpm e pH inicial 5.

Para verificar a produção de etanol foram retiradas alíquotas de 100 ml a cada 24 horas, adicionou-se 5 ml de hidróxido de cálcio e 3 gotas de antiespumante, depois foram colocadas no destilador eletrônico, as amostras foram resfriadas a 20 graus celsius para leitura no alcoômetro.

Para verificar o crescimento das leveduras, elas foram crescidas em meio ágar sabouraud no intervalo de 12 horas até 96 horas, totalizando 8 contagens, a 35 graus celsius em BOD. As placas foram feitas em triplicata, e retirada uma média da contagem delas para demonstrar o seu desenvolvimento.

Resultados e Discussão

As leveduras tiveram crescimento em todas as placas de onde se fez a média de crescimento das triplicatas, a levedura CBAFB07 foi a que teve menor crescimento, apresentando um pico somente às 24 horas com 9 UFC, e não apresentando crescimento nos outros horários verificados.

A levedura CBAFB09 teve um pico de crescimento até às 48 horas, e tendo um declínio nas próximas 12 horas, permanecendo estável nas 12 horas seguintes, e teve mais um pico de crescimento às 84 horas de incubação, mesmo assim ela cresceu em todos os horários, e apresentou picos maiores de crescimento às 48 e 72 horas.

A levedura *Pichia stipitis* foi a que apresentou o maior crescimento às 48 horas de incubação, diminuindo o crescimento nas 12 horas seguintes, apresentando o segundo pico semelhante ao primeiro às 72 horas.

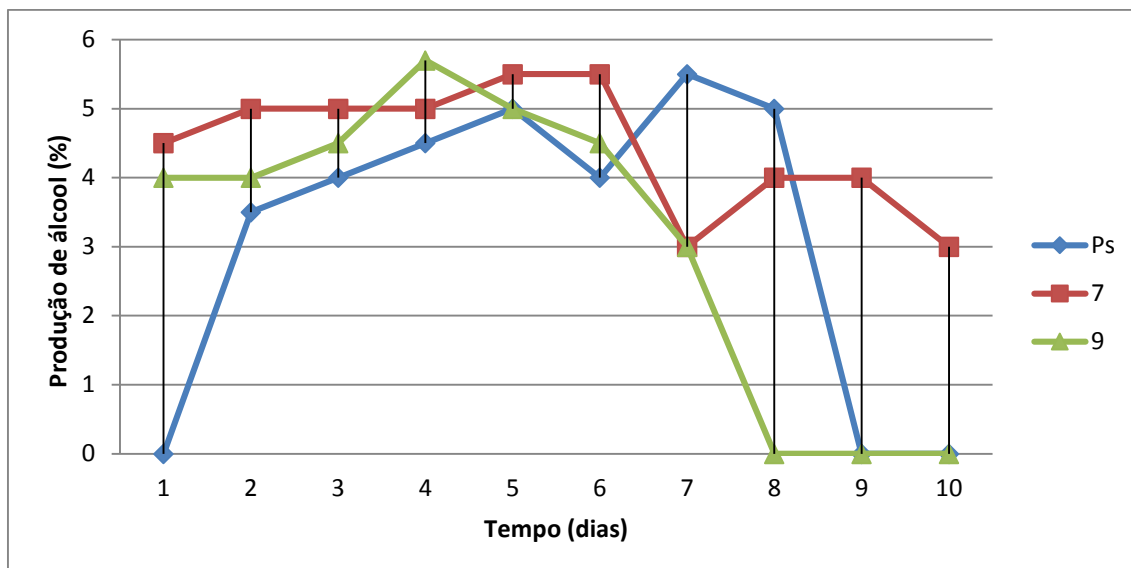


Fig. 4. Produção de álcool no período de 10 dias pelas leveduras Ps (*Pichia stipitis*), 7 (CBAFB07) e 9 (CBAFB09).

Na produção de etanol se verificou que desde o primeiro dia foi obtido o álcool, a levedura CBAFB09 se manteve estável na produção com 4% inicialmente, e apresentou maior produção no quarto dia com 5,7%, diminuindo nos dias subsequentes até chegar a 3% e não produzindo mais nos 3 dias restantes, já a levedura CBAFB07 iniciou com 4,5% de álcool e no quinto e no sexto dia teve os maiores picos de crescimento no com 5,5% de etanol produzido em ambos, caindo para 3% de produção nos dias restantes. A *Pichia stipitis* não teve produção alcoólica no primeiro dia, no segundo dia teve 3,5% de resultado, aumentando gradativamente nos dias seguintes até a sua maior produção no sétimo dia com 5,5% de etanol produzido, no dia seguinte produziu 5% de álcool, e não apresentou resultado nos dois dias finais de experimento.

A busca por mais alternativas de produção de biocombustíveis é primordial, uma vez que o uso exclusivo de combustíveis fósseis é arriscado para a população mundial, uma vez que não é um recurso renovável. A utilização do meio hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar propiciou o carbono necessário para o crescimento das cepas de leveduras e produção do álcool.

A reutilização deste resíduo é viável economicamente, desde que se tenha bastante material disponível. A busca por leveduras selvagens é de fundamental importância para a descoberta de mais espécies com potencial biotecnológico. A metodologia utilizada

visou a melhor produção de etanol sob as condições testadas. A temperatura ótima de fermentação das leveduras é em torno de 25 a 33 °C e o pH ótimo está entre 4,5 e 5,5 (du Preez *et al.* 1985) estando os experimentos dentro desta faixa de pH e temperatura para obtenção de melhores resultados.

De acordo com Agbogbo e Coward-Kelly (2008), a levedura *Pichia stipitis* tem sido usada na fermentação de vários tipos de biomassa pré-tratadas como, sabugo de milho, palha de arroz, bagaço de cana-de-açúcar, entre outras. Delgenes *et al.* (1988), mostrou que a levedura produziu 50 g/L de etanol inicialmente, ou seja 5%, o que corrobora com os resultados obtidos, onde se chegou à máxima de 5,7% com a levedura CBAFB09.

Estudos com a *Pichia stipitis* mostraram que o meio de cultura e seus nutrientes influenciaram o crescimento e a produção de etanol (Slininger *et al.* 2006). O crescimento das leveduras no meio de cultura ágar sabouraud, nas 96 horas de incubação foram ideais apenas para *Pichia stipitis* e a CBAFB09, sendo que a levedura CBAFB07 não obteve tanto sucesso em seu desenvolvimento, apresentando um pico em 24 horas. Este resultado nos mostra que novas análises devem ser feitas, variando a composição do meio e as influências físicas, como temperatura, pH e tempo de incubação.

Conclusão

Os problemas ambientais e de escassez de reservas energéticas no mundo mostram que soluções alternativas devem ser buscadas, e uma delas é o etanol, álcool produzido através de fermentação de açúcares por leveduras, portanto tecnologias capazes de melhorar o desempenho da produção etanólica ganham importância no país. O setor de cana-de-açúcar brasileiro é um dos maiores produtores de álcool combustível, gerando muitos resíduos da planta, o que pode ser utilizado como fonte de carbono para fermentação e produção alcoólica por micro-organismos. Dessa forma, o presente trabalho buscou avaliar a produção de etanol pelas leveduras selvagens e de uma levedura padrão na fermentação do bagaço de cana-de-açúcar, além do seu crescimento microbiano. Os resultados de produção alcoólica com as leveduras selvagens foram concernentes com as referências citadas, o que nos mostra que mais estudos nesta abordagem devem ser feitos, como análises cromatográficas, por exemplo.

Referências

- Agbogbo FK, Wenger KS (2008) Cellulosic ethanol production using the naturally occurring xylose-fermenting yeast, *Pichia stipitis*. *Biotechnol Lett* 30:1515–1524.
- Bruce T, Castro A, Kruger R, Thompson CC, Thompson FL (2012) Microbial diversity of Brazilian biomes. *Genom Appl Dev World* 217-247.
- Delgenes JP, Moletta R, Navarro JM (1988) The ethanol tolerance of *Pichia stipitis* Y7124 grown on a D-xylose, Dglucose and L-arabinose mixture. *J Ferment Technol* 66(4):417–422.
- Du Preez JC, Bosch M, Prior BA (1985) Xylose fermentation by *Candida shehatae* and *Pichia stipitis*: effects of pH, temperature and substrate concentration. *Enzyme Microb Technol* 8:360–364.
- Rodrigues JLM, Pellizari VH, Mueller R, Baek K, Jesus EC, Paula FS, Mirza B, Hamaoui Jr GS, Tsai SM, Feigi B, Tiedje JM, Bohannan BJM, Nusslein K (2013) Conversion of the Amazon rainforest to agriculture results in biotic homogenization of soil bacterial communities. *Proc Natl Acad Sci U S A*.110(3): 988-93.
- Sarrouh BF, Santos JC, Cunha MAA, Franco RF (2014) Potential biomass resources for cellulosic ethanol production in Brazil: availability, feedstock analysis, feedstock composition, and conversion yields. *Biof. Braz.* 97-123.
- Slininger PJ, Dien BS, Gorsick SW, Liu ZL (2006) Nitrogen source and mineral optimization enhances D-xylose conversion to ethanol by the yeast *Pichia stipitis* NRRL Y- 7124. *Appl Microbial Cell Physiol* 72(6):1285–1296.