



Avaliação do Processo de Bioprodução de Etanol a partir de Xilose pela Levedura *Pichia stipitis* NRRL Y-7124 em Reator de Bancada

João Paulo A. Silva^{1*}, Solange I. Mussatto², Inês C. Roberto¹, José A. Teixeira²

¹Departamento de Biotecnologia, Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, 12607-030, Lorena, SP, Brasil. ²Instituto de Biotecnologia e Bioengenharia, Centro de Engenharia Biológica, Universidade do Minho, Campus de Gualtar, 4710-057, Braga, Portugal. *E-mail: joapaulovalvessilva@gmail.com

RESUMO

*A produção de etanol pela levedura *Pichia stipitis* foi avaliada em reator de bancada sob diferentes condições de aeração e agitação em meio semi-sintético contendo xilose (90,0 g/L) como principal fonte de carbono. Os ensaios foram realizados segundo um planejamento fatorial 2² variando-se a aeração (0,25 a 0,75 vvm) e a agitação (150 a 250 rpm). Dentro da região de transferência de oxigênio estudada, o fator de conversão de substrato em produto ($Y_{P/S}$) e a produtividade volumétrica em etanol (Q_P) sofreram pouca influência das variáveis avaliadas. Diante disto, a máxima concentração de etanol acumulada foi o parâmetro adotado como principal critério de seleção das condições de processo. A máxima concentração de etanol, cerca de 27 g/L, foi obtida a 250 rpm de agitação e aeração de 0,25 vvm ($k_{La} = 4,9 \text{ h}^{-1}$). Nestas condições, a conversão de substrato em produto ($Y_{P/S}$), eficiência (η) e produtividade em etanol (Q_P) foram de 0,32 g/g, 63 % e 0,32 g/L.h, respectivamente.*

Palavras-chave: etanol, *Pichia stipitis*, xilose, biorreator, transferência de oxigênio.

INTRODUÇÃO

O estudo da fermentação de etanol tem ganhado importância devido ao aumento na demanda nos últimos anos como combustível automotivo e como complemento para gasolina (Ratnam et al., 2005; Sun e Cheng, 2005). Além de ser uma fonte de energia renovável, o etanol apresenta outras vantagens sobre a gasolina, por ser um combustível oxigenado que contém 35% de oxigênio, o que reduz a emissão de NO_x e materiais particulados oriundos da combustão. O uso de etanol produzido por fermentação como combustível não contribui para o aumento líquido de dióxido de carbono na atmosfera, já que é produzido a partir de matérias primas renováveis que sequestram CO_2 da atmosfera (Demirbas, 2005; Nilsson, 2005).

Os materiais lignocelulósicos têm sido apontados como uma promissora fonte de matéria prima para processos de bioconversão, dentre eles a produção de etanol (Lin e Tanaka, 2006). A xilose é o principal açúcar obtido na hidrólise da fração hemicelulósica de resíduos agrícolas e madeira duras, sendo sua bioconversão um passo importante na utilização destes materiais (Nakamura; Sawada; Inoue, 2001; Guo et al., 2008).

A capacidade de microrganismos em produzir etanol a partir de xilose tem sido investigada por muitos pesquisadores (Sanchez, 2004; Millati; Edebo; Taherzadeh, 2005; Hahn-Hägerdal, 1994). Em diversos trabalhos, *Pichia stipitis* tem apresentado resultados promissores na



conversão de xilose em etanol a partir de hidrolisados de biomassa lignocelulósica (Nigam, 2001; Agbogbo, 2008).

As condições ambientais do processo (pH, temperatura, oxigênio, entre outras) e a composição do meio de cultura são fatores importantes, capazes de influenciar fortemente a produtividade de qualquer processo de bioconversão (Sunitha et al., 1999). Dentre estes fatores, a disponibilidade de oxigênio destaca-se como um dos mais importantes (Furlan et al, 1994). Segundo du-Preez (1994) a aeração é um fator de grande importância na fermentação de xilose por leveduras, visto que o nível de aeração determina a divisão do fluxo de carbono da xilose entre o crescimento e a formação de produto, sendo, portanto, capaz de afetar drasticamente os parâmetros fermentativos.

O oxigênio possui uma baixa solubilidade em água quando comparado com fontes de carbono, nitrogênio, fósforo e demais nutrientes. Por este motivo, em fermentações submersas nas quais ele se faz necessário a transferência de oxigênio ao meio de fermentação deve ser realizada durante todo o decorrer do processo. Esta transferência de oxigênio para o meio pode ser realizada de diferentes formas, sendo os reatores dotados de agitação mecânica com dispersão de bolhas de ar no meio as formas mais utilizadas industrialmente, responsáveis por cerca de 93 % das aplicações (Schmidell, 2001).

A realização de estudos em reatores de bancada permite avaliar parâmetros de fermentação que não podem ser bem controlados em incubadoras de movimento rotatório, além de proporcionar condições mais próximas às empregadas em maior escala. Para o desenvolvimento de uma tecnologia eficiente para bioconversão de xilose a etanol em grande escala, é de fundamental importância compreender a influência desses fatores sobre os processos conduzidos em reatores operados em condições controladas.

MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Fermentação do Departamento de Engenharia Biológica do Instituto de Biotecnologia e Bioengenharia da Universidade do Minho, em Braga, Portugal.

Processo Fermentativo: O microrganismo utilizado para a bioprodução de etanol foi a levedura *Pichia stipitis* NRRL Y-7124. Os inóculos foram preparados em frascos Erlenmeyer de 500 mL de capacidade, contendo 100 mL do meio composto por (g/L): xilose (30,0); glicose (5,0); arabinose (5,0); uréia (2,3); MgSO₄ · 7H₂O (1,0); Extrato de levedura (3,0). Os frascos inoculados foram incubados em agitador rotatório a 30°C, sob agitação de 200 rpm, por 24 horas. O meio de fermentação foi composto por (g/L): xilose (90,0); glicose (15,0); arabinose (15,0); uréia (2,3); MgSO₄ · 7H₂O (1,0); Extrato de levedura (3,0). A fermentação foi realizada em um biorreator de 1,6 L de capacidade tipo tanque agitado, com uma concentração inicial de células de cerca de 1,0 g/L, temperatura de 30 °C e diferentes condições de aeração (0,25 a 0,75 vvm) e agitação (de 150 a 250 rpm), que foram determinadas segundo um planejamento experimental (Tabela 1).

Acompanhamento Analítico dos Processos: O acompanhamento analítico das fermentações foi realizado retirando-se amostras periodicamente para determinação de açúcares (glicose, xilose, arabinose e etanol), e determinação da concentração celular.

A concentração celular foi determinada pela medida das absorbâncias das amostras diluídas em espectrofotômetro Beckmen, a 600 nm tendo água destilada como branco. Os valores de



concentração foram calculados através da equação das curvas de calibração entre o peso seco e absorvância, obtidas para o microrganismo em questão.

As concentrações de glicose, xilose, arabinose e etanol foram determinadas por Cromatografia Líquida de Alto Desempenho (HPLC), em equipamento JASCO equipado com detector de índice de refração e coluna BIO-RAD Aminex HPX-87H (300 X 7,8 mm), nas seguintes condições: temperatura de 60 °C; eluente: ácido sulfúrico 0,005 M; fluxo de 0,7 mL/min; volume de amostra de 20 µL.

Análise Estatística: A análise estatística dos experimentos foi realizada utilizando-se os programas STATGRAFICS versão 6,0, Design-Expert versão 5.0 e Statistica versão 6.0.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Na Figura 1 são mostradas as cinéticas de fermentação de cada ensaio do planejamento fatorial. Em nenhuma condição estudada houve consumo de arabinose, sendo assim nas cinéticas de fermentação foi considerado apenas glicose e xilose.

Os resultados dos ensaios do planejamento mostraram que a levedura foi capaz de acumular etanol em todas as condições de aeração estudadas. A concentração celular final observada nos diferentes ensaios variou de 11 a 17 g/L, sendo estes limites observados nos ensaios de menor ($k_{La} = 0,7 \text{ h}^{-1}$) e maior aeração ($k_{La} = 12,1 \text{ h}^{-1}$), respectivamente. No ensaio 3, em que houve maior acúmulo de etanol, realizado em uma condição intermediária de aeração ($k_{La} = 4,9 \text{ h}^{-1}$), foi observada uma concentração celular de cerca de 15 g/L após as 96 horas de fermentação.

Em todos os ensaios a glicose foi consumida nas primeiras 12 horas, com exceção do ponto de menor aeração, no qual o consumo de substrato foi mais lento que nas demais condições avaliadas, levando cerca de 24 horas para consumir totalmente a glicose e consumindo cerca de 65 % da xilose até o tempo final de fermentação. A condição de fermentação na qual ocorreu o maior consumo de substrato, cerca de 90% (100 % da glicose e 87 % xilose), não foi as que proporcionaram maior transferência de oxigênio ao meio, mas sim uma condição intermediária ($k_{La} = 4,9 \text{ h}^{-1}$), sendo esta a mesma em que ocorreu maior acúmulo de etanol, cerca de 27 g/L em 84 horas de fermentação (ensaio 3). O menor acúmulo de etanol foi obtido nas condições de maior aeração (ensaios 4 e 5), sendo observado uma concentração máxima, de 16 g/L, em tempos próximos a 48 horas de fermentação, havendo após este período uma ligeira redução na concentração do mesmo.

Na Tabela 1 são apresentadas as condições de agitação e aeração empregadas em cada ensaio bem como os resultados referentes ao acúmulo máximo de etanol, consumo de substrato e parâmetros fermentativos ($Y_{P/S}$ e Q_P). Para o cálculo de $Y_{P/S}$, foram considerados apenas a glicose e a xilose, visto que não houve consumo de arabinose. A produtividade volumétrica em etanol foi calculada nos tempos em que se observou maior acúmulo de etanol, independente de açúcares residual. Apesar dos diferentes níveis de transferência de oxigênio observados nos ensaios, não foram notadas grandes variações entre o valor dos fatores de conversão observados, estando estes entre 0,29 e 0,33 g/g, o que dificulta uma análise direta dos dados, sendo mais adequado uma interpretação estatística para uma melhor compreensão.

Com exceção do Ensaio 1, onde se observou a menor produtividade volumétrica em etanol ($Q_P = 0,24 \text{ g/L.h}$), os valores deste parâmetro nos demais ensaios situaram-se em torno de 0,30 g/L.h. Isto se deve ao fato de que, nos pontos que apresentaram um menor acúmulo de etanol, a sua máxima concentração ocorreu em tempos mais curtos, o que resultou em valores

de Q_p semelhantes aos obtidos nos ensaios que tiveram um acúmulo muito maior de etanol, porém em tempos mais longos de fermentação.

Nos gráficos de Pareto (Figura 2 a e b), são mostradas as estimativas dos efeitos das variáveis agitação e aeração sobre os parâmetros fermentativos. Com relação ao parâmetro ($Y_{P/S}$), nota-se que na região experimental avaliada, as variáveis agitação e aeração, não apresentaram influência sobre a conversão de substrato em produto. Entretanto, para a resposta Q_p , observa-se que a variável agitação (B) foi a única que apresentou efeito significativo ao nível de 90 % de confiança. Nota-se ainda, que a influência da agitação foi positiva sobre este parâmetro, proporcionando uma elevação média nos valores de produtividade volumétrica de etanol de 0,27 para 0,33 g/L.h, quando a agitação foi elevada de 150 para 250 rpm.

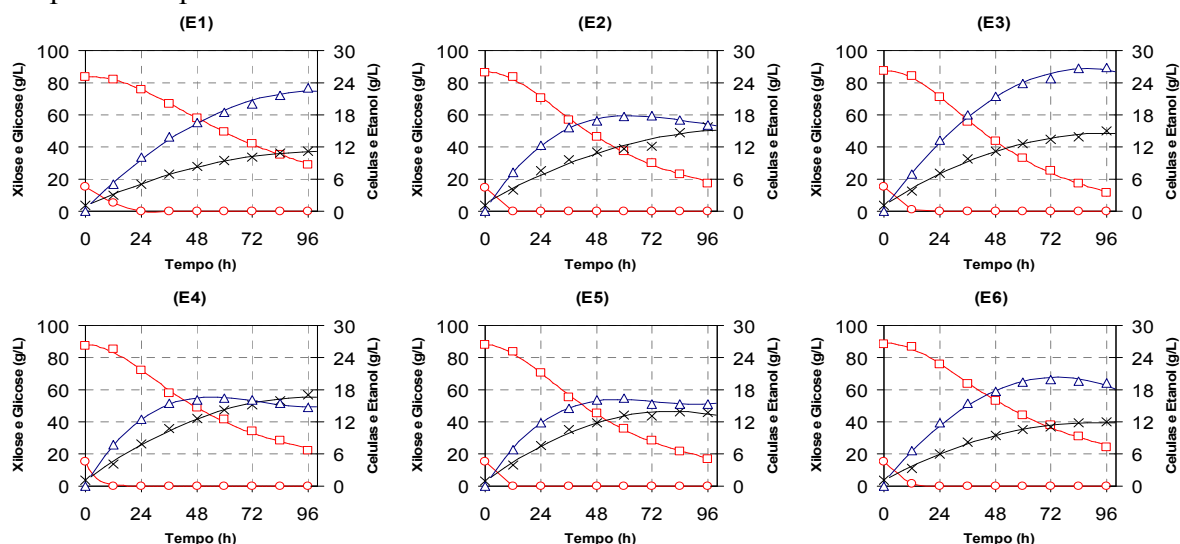


Figura 1 - Acompanhamento cinético do crescimento de células (-x-), consumo de xilose (-□-) consumo de glicose (-o-) e produção de etanol (-Δ-), nos ensaios fermentativos do planejamento fatorial para estudo da influência da agitação e aeração.

Tabela 1 - Planejamento fatorial do tipo 2^2 , para a avaliação do efeito da agitação e da aeração na produção de etanol em biorreator de bancada.

Ensaio	Aeração		Agitação		$k_L a$ (h^{-1})	$E_{máximo}$ (g/L)	$S_{consumido}$ (%)	$Y_{P/S}$ (g/g)	Q_p ($g.L^{-1}.h^{-1}$)
	vvm	Níveis	rpm	Níveis					
E1	0,25	-1	150	-1	0,7	23,0	70	0,33	0,24
E2	0,75	1	150	-1	3,2	17,7	63	0,29	0,30
E3	0,25	-1	250	1	4,9	26,7	83	0,32	0,32
E4	0,75	1	250	1	12,1	16,2	52	0,31	0,34
E5	0,75	1	250	1	11,7	16,1	56	0,30	0,33
E6	0,50	0	200	0	2,15	19,4	58	0,33	0,32

Como já mencionado anteriormente, nos diferentes ensaios do planejamento foram obtidos valores muito próximos de Q_p e $Y_{P/S}$, assim sendo, a máxima concentração de etanol acumulada em cada ensaio torna-se importante informação a ser considerada.

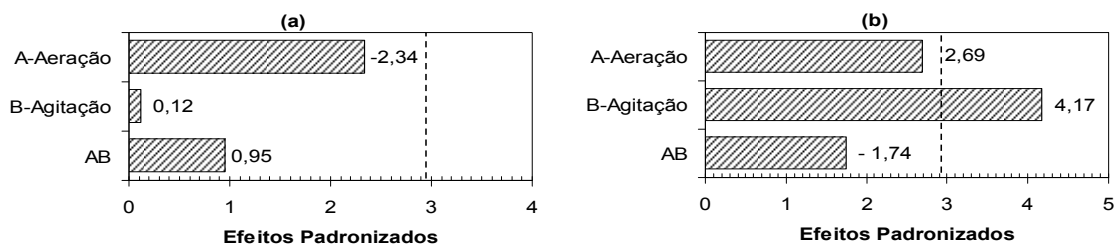


Figura 2 - Estimativa dos efeitos (ao nível de 90 % de confiança) através dos gráficos de Pareto das variáveis respostas: conversão em produto (a) e produtividade em etanol (b).

Na representação geométrica mostrada na figura 3, estão dispostas as máximas concentrações de etanol acumuladas em cada ensaio, em função das variáveis aeração e agitação, sendo representados por vetores os sentidos crescentes da concentração de etanol acumulado. Neste diagrama é possível notar que, dentro da faixa de variação estudada, o acúmulo de etanol foi favorecido em condições de menor aeração (0,25 vvm), para qualquer nível de agitação empregado. Entretanto, o aumento na agitação só teve influência positiva para aeração em seu nível mais baixo, havendo pouca influencia da agitação sobre o acúmulo de etanol quando empregados níveis mais elevados de aeração (0,75 vvm). O maior acúmulo de etanol, ≈ 27 g/L, foi obtido com 250 rpm de agitação e 0,25 vvm de aeração, o que representa um valor de k_{La} de aproximadamente $4,9$ h⁻¹.

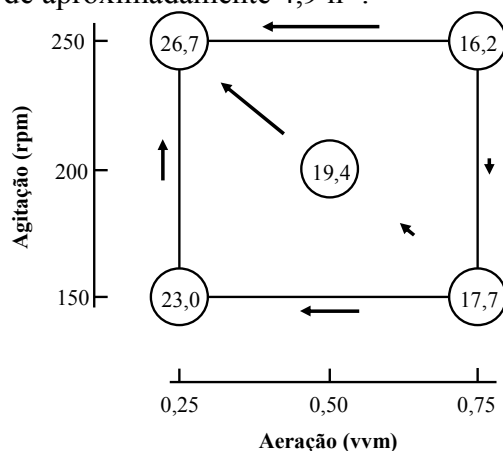


Figura 3 – Representação geométrica da máxima concentração de etanol acumulada (g/L) nos diferentes ensaios do planejamento fatorial, em função das variáveis aeração (vvm) e agitação (rpm).

CONCLUSÕES

A levedura *Pichia stipitis* NRRL Y 7124 foi capaz de produzir etanol em todas as condições experimentais avaliadas no planejamento (k_{La} entre 0,7 e $12,1$ h⁻¹).

O fator de conversão de substrato em produto foi muito próximo nas várias condições de fermentação avaliadas, não sendo observado influência significativa da agitação e da aeração sobre este parâmetro, dentro da região de estudada. De maneira semelhante, os valores de produtividade volumétrica em etanol foram muito próximos, entretanto, este parâmetro apresentou influencia significativa da variável agitação.



A máxima concentração de etanol, cerca de 27 g/L, foi obtida após 84 horas de fermentação sob condições de transferência de oxigênio correspondente ao $k_L a = 4,9 \text{ h}^{-1}$. Nestas condições, os valores de ($Y_{P/S}$), (η) e (Q_P) foram de 0,32 g/g, 63 % e 0,32 g/L.h, respectivamente.

AGRADECIMENTOS

SANTANDER, FAPESP, CAPES e CNPq.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agbogbo, F. K.; Haagensen, F. D.; Milam, D.; Wenger, K. S. (2008). Fermentation of Acid-pretreated Corn Stover to Ethanol Without Detoxification Using *Pichia stipitis*. *Appl Biochem Biotechnol*, v. 145, p. 53–58.
- Demirbas, A. (2005), Bioethanol from Cellulosic Materials: A renewable motor fuel from biomass. *Energy Sources*, v. 27, p. 327-337.
- du Preez, J. C. (1994), Process parameters and environmental factors affecting D-xylose fermentation by yeasts. *Enzyme Microb. Technol.*, v. 16, p. 944-952.
- Furlan, S. A.; Bouilloud, P.; Castro, H. F. (1994) Influence of Oxygenation on Ethanol and Xylitol Production by Fermenting Yeasts. *Process Biochemistry*, v. 29, p. 657-662.
- Guo, GL; Chen, WH; Chen, WH; Men, LC; Hwang, WS. (2008). Characterization of dilute acid pretreatment of silvergrass for ethanol production, *Bioresource Technology*. V. 14, p. 6046-53.
- Hahn-Hagerdal, B.; Jeppsson, H.; Skoog, K.; Prior, B. A. (1994), Biochemistry and physiology of xylose fermentation by yeasts. *Enzyme Microbiology and technol*, v. 16, p. 933-942.
- Lin, Y; Tanaka, S. (2006) Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospects. *Appl Microbiology Biotechnology*, v. 69, p. 627-642.
- Millati, R.; Edebo, L.; Taherzadeh, M. J. (2005), Performance of *Rhizomucor*, and *Mucor* in ethanol production from glucose, xilose, and wood hydrolyzates. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 35, p. 294-300.
- Nakamura, Y.; Sawada, T.; Inoue, E. (2001). Mathematical model for ethanol production from mixed sugars by *Pichia stipitis*. *J. of Chemical Technol. and Biotechnol*, v. 76, p. 586-592.
- Nigam, J. N. (2001), Ethanol production from wheat straw hemicellulose hydrolysate by *Pichia stipitis*. *Journal of Biotechnology*, v. 87, p. 17-27.
- Nilsson, A. (2005), *Control of fermentation of lignocellulosic hydrolysate*. Disponível em: <www.chemeng.lth.se/exjobb/010.pdf>. Acesso em: novembro de 2005.
- Ratnam, B.V.V.; Rao, S.S.; Rao, M. D.; Rao, M. N.; Ayyanna, C. (2005), Optimization of medium constituents and fermentation conditions for the production of ethanol from palmyra jaggery using response surface methodology. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, v. 21, p. 399-404.
- Sanchez G.; Pilcher, L.; Roslander, C.; Modig, T.; Galbe, M.; Linden, G. (2004), Dilute-acid hydrolysis for fermentation of the Bolivian straw material Paja Brava. *Bioresource Technology*, v. 93, p. 249-256.
- Schmidell, W.; Lima, U. A; Aquarone, E; Borzani, W. (2001) *Biotechnologia industrial: Engenharia Bioquímica*. São Paulo: Blucher, 541 p.
- Sun, Y.; Cheng, J.J. (2005), Dilute acid pretreatment of rye straw and bermudagrass for ethanol production. *Bioresource Technology*, v. 96, p. 1599-1606.
- Sunitha, K.; Lee, J. K.; Oh, T. K. (1999), Optimization of medium components for phytase production by *E. coli* using response surface methodology. *Bioprocess Engineering*. v. 21, p. 477-481.