

PRODUÇÃO DE ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO UTILIZANDO RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS NA PRESENÇA DE INIBIDORES

Caroline Dalastra¹, Thamarys Scapini², Charline Bonatto³, Suzana Fátima Bazoti³, Helen Treichel^{4*}

1. Graduada em Engenharia Ambiental e Sanitária, Universidade Federal da Fronteira Sul

2. Doutoranda em Biotecnologia, Universidade Federal de Santa Catarina

3. Mestre em Engenharia Química, Universidade Federal da Fronteira Sul

4. Doutora em Engenharia de Alimentos, Universidade Federal da Fronteira Sul/Orientador

*helentreichel@gmail.com

Resumo

Anualmente a indústria de produção de sucos de uva gera 10 milhões de toneladas de resíduo ricos em carboidratos e bioativos, que são destinados para a fertilização e alimentação animal. Pouco se tem relatado sobre a aplicação destes resíduos para produção de biocombustíveis. Assim, o objetivo deste estudo é a aplicação de resíduos de uva para produção de etanol de segunda geração, como meio diluente de hidrolisado de cana-de-açúcar. Conduziu-se dois processos fermentativos com a levedura *Saccharomyces cerevisiae* CAT-1: (i) utilizando como meio fermentativo o líquido da lavagem do resíduo; (ii) utilizando o líquido da lavagem como meio diluente do hidrolisado de cana-de-açúcar. Os ensaios foram quantificados por meio de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) durante 24 horas. Os resultados sugerem o potencial para a produção de etanol de um resíduo pouco explorado para esse fim, com concentrações de 2,54 g L⁻¹ e 9,21 g L⁻¹ nos processos (i) e (ii), respectivamente.

Palavras-chave: resíduo de uva; fermentação alcoólica; hidrolisado de cana-de-açúcar.

Apoio financeiro: PROBIC – FAPERGS, UFFS.

Trabalho selecionado para a JNIC: UFFS.

Introdução

Um dos grandes desafios da atualidade é a busca de fontes alternativas de energia limpa e sustentável. O interesse na produção e valoração de processos biotecnológicos para produção de combustíveis amplia a busca por novos substratos a partir de resíduos agroindustriais como resíduos lignocelulósicos, resíduos agrícolas, entre outros, devido principalmente à disponibilidade de biomassa (SRITRAKUL; NITISINPRASERT; KEAWSOMPONG, 2017; CARDONA et al., 2018).

Apesar da biomassa lignocelulósica ser uma matéria-prima promissora e abundante, pouco se tem explorado outros resíduos agroindustriais potenciais, como por exemplo, os resíduos de frutas. Os resíduos de uva são frequentemente estudados para a extração de compostos fenólicos por possuírem capacidade antioxidante e benéficas para a saúde humana (CASTELLO et al., 2018; PEIXOTO et al., 2018), porém ainda há poucos estudos sobre a aplicação desses resíduos para a produção de etanol, podendo ser uma biomassa alternativa nos processos fermentativos. Haas (2015) realizou um estudo das características do resíduo do processamento do suco de uva, e determinou concentrações elevadas de glicose e xilose, sugerindo um alto percentual de celulose e hemicelulose no resíduo, além da ausência de pectina no meio.

O etanol de segunda geração é obtido geralmente pela fermentação do bagaço de cana-de-açúcar, após o pré-tratamento da biomassa. Nesta etapa, além do aumento das concentrações de açúcares, ocorre a produção de compostos inibitórios, como ácido acético e hidroximetilfurfural. O uso de leveduras como a *Saccharomyces cerevisiae*, pode levar a um rendimento reduzido de etanol, devido à presença desses inibidores (SRITRAKUL; NITISINPRASERT; KEAWSOMPONG, 2017; BAZOTI et al., 2017). Uma alternativa a este desafio seria a diluição do hidrolisado de cana-de-açúcar em caldos de lavagem de resíduos com alta concentração de açúcares livres, que poderia aumentar a eficiência do processo e valorizar outros resíduos agroindustriais.

Este estudo tem por objetivo avaliar a produção de etanol de segunda geração a partir de resíduos agroindustriais provenientes de indústrias produtoras de suco de uva como meio diluente de hidrolisado de cana-de-açúcar, utilizando a levedura *Saccharomyces cerevisiae* CAT-1.

Metodologia

O resíduo de uva, constituído de cascas e engaço, foi obtido ao final do processamento do suco de uva produzido em uma indústria, localizada na Serra Gaúcha – RS/Brasil. O hidrolisado de cana-de-açúcar foi doado pelo Centro de Tecnologia Canavieira (CTC) de São Paulo/Brasil, sendo obtido a partir do pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar por meio de explosão a vapor, seguido de hidrólise enzimática pela enzima Cellic Ctec3 (Novozymes). O hidrolisado foi caracterizado quanto as concentrações de glicose, xilose, celobiose, arabinose, ácido acético e etanol por meio de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC).

O resíduo inteiro foi submetido a um processo de lavagem para a remoção dos açúcares livres, na

proporção de 12% (g massa seca v^{-1}), acrescidos de 100 mL destilada. As amostras foram mantidas em banho de agitação orbital por 5 min, 25 °C a 100 rpm. Ao fim do processo, o líquido foi separado do sólido por meio de filtração em papel filtro Whatman nº 1 (ZANIVAN et al., 2021).

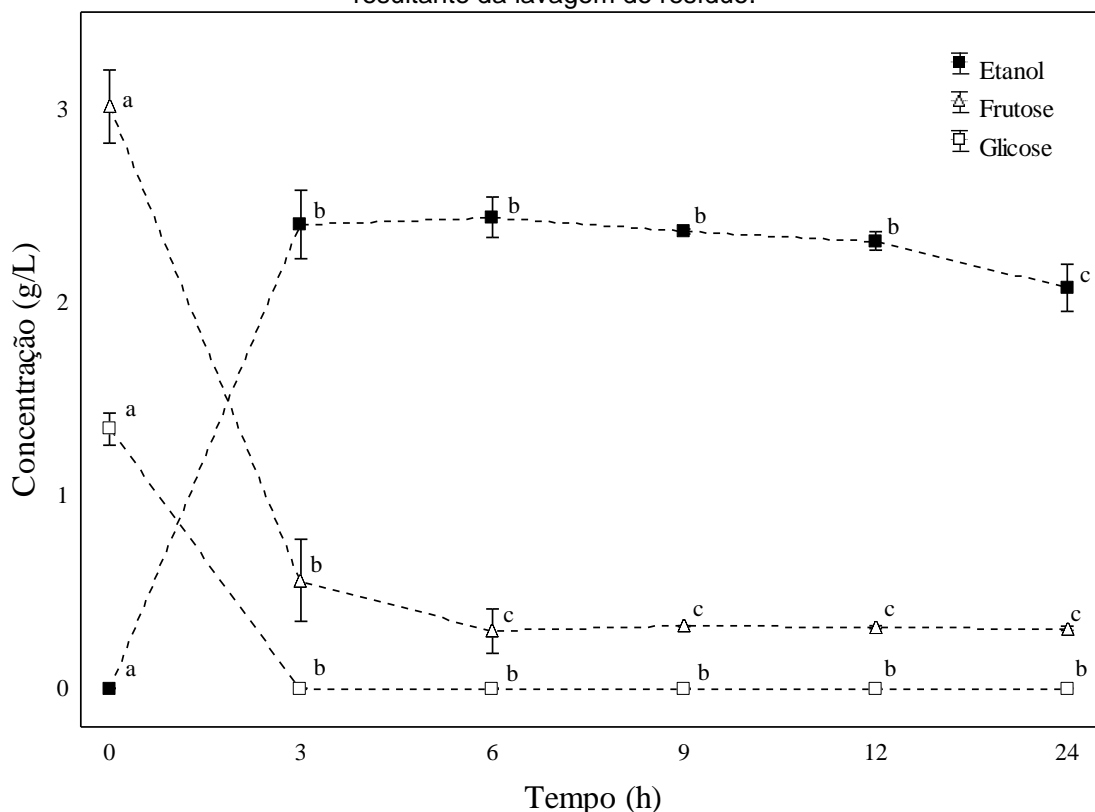
Dois processos fermentativos foram conduzidos: (i) o primeiro utilizando como meio fermentativo o líquido resultante do processo de lavagem do resíduo de uva; (ii) o segundo utilizando o líquido da lavagem como meio diluente do hidrolisado de cana-de-açúcar na proporção de 1:3 ($v v^{-1}$). A diluição do hidrolisado de cana é necessária devido à alta concentração de ácido acético (BAZOTI et al., 2017). Os meios foram esterilizados e inoculados com as células da levedura *S. cerevisiae* CAT-1, correspondendo a um inóculo inicial de 10^6 células mL^{-1} . A contagem de células foi realizada no início da fermentação alcoólica por microscopia ótica em câmara de Neubauer (40 x) por meio da estimativa de células viáveis utilizando corante azul de metileno.

As amostras foram vedadas, a fim de manter o meio em condições anaeróbicas, e incubadas em agitador orbital a 30 °C, 80 rpm durante 24 horas (BAZOTI et al., 2017). Ao longo deste período, as amostras foram quantificadas em relação a concentração de etanol e açúcares por meio de HPLC em intervalos de 3 horas até às 12 horas de fermentação. Os experimentos foram realizados em triplicata. Os resultados são expressos como média \pm desvio padrão. Análise de variância (ANOVA) e comparação de médias (Teste de Tukey) foram realizados utilizando o *software* Statística com nível de confiança de 95% ($p_{valor} < 0,05$).

Resultados e Discussão

A partir do processo de lavagem do resíduo de uva, obteve-se uma concentração de açúcares de 0,4 % $m v^{-1}$. O perfil fermentativo da levedura utilizando como meio fermentativo o líquido da lavagem do resíduo, pode ser analisado na Figura 1. A maior produtividade de etanol nesse sistema foi alcançada em 3 horas ($0,85 g L^{-1} h^{-1}$) de fermentação, com uma concentração de $2,54 \pm 0,11 g L^{-1}$. O metabolismo dos açúcares pela levedura ocorreu em 3 horas de fermentação devido a menor concentração de açúcares, não havendo diferença estatística nas concentrações de glicose e etanol a partir das 3 horas, onde obteve-se a maior produção de etanol ($2,54 g L^{-1}$). As concentrações de celobiose, arabinose, xilose, ácido galacturônico, ácido acético e ácido fórmico detectadas nas análises foram menores que $0,1 g L^{-1}$.

Figura 1. Produção de etanol e consumo de açúcares por *Saccharomyces cerevisiae* CAT-1 utilizando o líquido resultante da lavagem do resíduo.



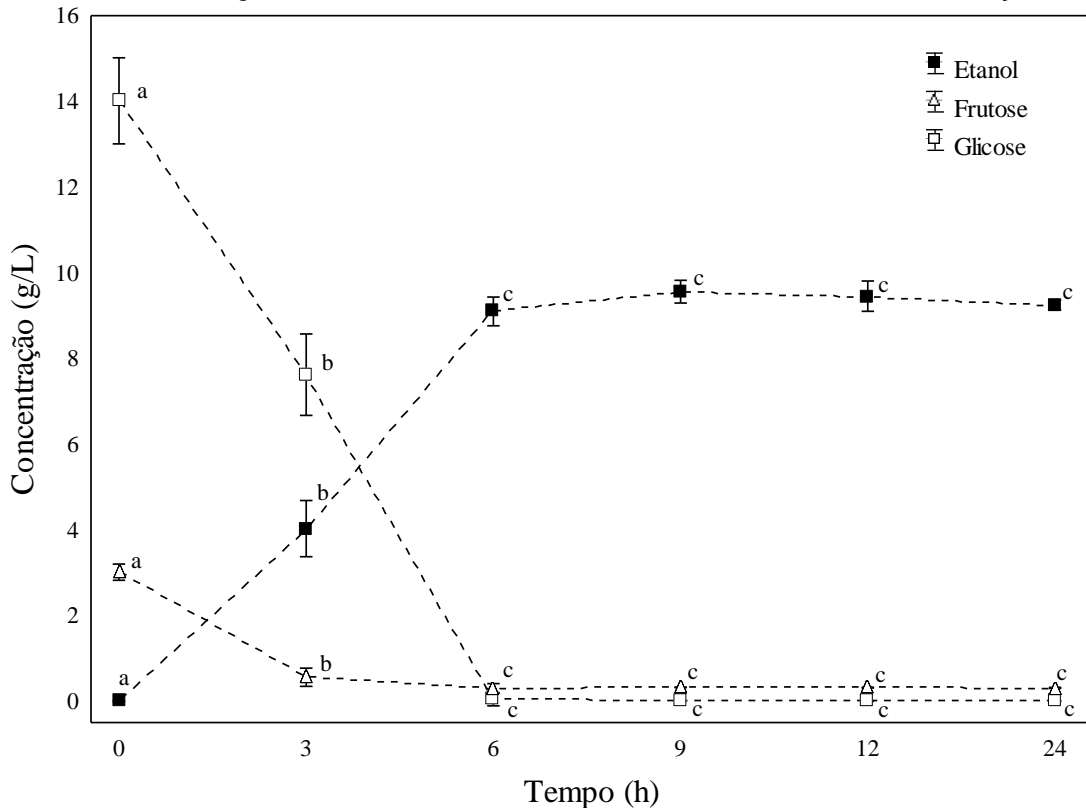
*Letras minúsculas iguais em mesmo composto não apresentam diferença estatística pelo teste de Tukey com 95% de confiança ($p < 0,05$).
Fonte: a autora.

O hidrolisado de cana-de-açúcar foi caracterizado e constatou-se a presença de $45,71 g L^{-1}$ de glicose, $28,50 g L^{-1}$ de xilose, $6,32 g L^{-1}$ de arabinose, $9,18 g L^{-1}$ de ácido acético, $0,36 g L^{-1}$ de furfural e $0,17 g L^{-1}$ de hidroximetilfurfural, com pH inicial em 4,85. A presença de inibidores, como ácido acético e hidroximetilfurfural, no hidrolisado bruto é evidente e estudos comprovam que tais compostos podem prolongar a fase de latência da levedura, bem como causar rompimento celular e inibição de seu crescimento, inibindo o processo fermentativo. Sendo assim, é necessária a diluição do resíduo, de forma a reduzir a concentração desses compostos e viabilizar a capacidade fermentativa da levedura (ALMEIDA et al., 2007; GU; ZHANG; BAO, 2014;

BAZOTI et al., 2017).

Com concentrações de açúcares suficientes para realizar o processo fermentativo e considerando a necessidade de diluição do hidrolisado de cana-de-açúcar, o líquido da lavagem do resíduo de uva foi inserido em outro sistema, como meio diluente do hidrolisado, na proporção de 1:3 (v v⁻¹) (BAZOTI et al., 2017). O perfil fermentativo da levedura nesse sistema pode ser analisado na Figura 2.

Figura 2. Produção de etanol e consumo de açúcares por *Saccharomyces cerevisiae* CAT-1 utilizando o líquido resultante da lavagem do resíduo como meio diluente do hidrolisado de cana-de-açúcar.



*Letras minúsculas iguais em mesmo composto não apresentam diferença estatística pelo teste de Tukey com 95% de confiança ($p < 0,05$).
Fonte: a autora.

O sistema onde a água de lavagem foi utilizada como diluente de hidrolisado de cana-de-açúcar obteve maior produtividade em 6 horas ($1,53 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$), com concentração de $9,21 \pm 0,18 \text{ g L}^{-1}$, devido a presença de maiores concentrações de açúcares. Não houve diferença estatística nas concentrações de açúcares e de etanol a partir das 6 horas de fermentação, sendo este o ponto de maior produção de etanol ($9,21 \text{ g L}^{-1}$). As concentrações de celobiose, arabinose, xilose, ácido galacturônico, ácido acético e ácido fórmico detectadas nas análises foram constantes nesse sistema durante todo o processo fermentativo.

Historicamente utilizada para a produção de bioetanol devido as suas propriedades e alta tolerância a compostos inibidores, ao ser aplicada para a produção de etanol de segunda geração, a levedura *S. cerevisiae* CAT-1 foi incapaz de fermentar todos os açúcares presentes na biomassa lignocelulósica, como por exemplo a xilose e arabinose (GONG et al., 1983; NAGHSHBANDI et al., 2019). Vale ressaltar que não houve produção significativa de glicerol ($\leq 0,5 \text{ g L}^{-1}$) em ambos os processos fermentativos, sendo uma vantagem para a produção industrial de etanol. A produção deste composto é indesejável pois pode reduzir a eficiência do processo e aumentar o gasto econômico de sistemas de destilação de álcool (GUTIERREZ, 1991).

Conclusões

Pouco explorado e gerado em grandes quantidades por indústrias produtoras de suco, os resíduos de uva apresentaram grande potencial e viabilidade para a produção de etanol de segunda geração. Com base nos resultados desse estudo, a água proveniente do processo de lavagem pode ser aplicada para a diluição de um segundo resíduo, o hidrolisado de cana-de-açúcar, que apresenta alto teor de inibidores. Se fermentada com o hidrolisado bruto, *S. cerevisiae* CAT-1 não é capaz de associar todos os açúcares devido a alta concentração de ácido acético e hidroximetilfurfural no resíduo. Entretanto, devido à diluição com a água de lavagem, não houve inibição da levedura e, em decorrência do incremento das concentrações de açúcares no meio, houve um aumento da produtividade de etanol ($1,53 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$). Além disso, os resíduos de uva, após a extração de açúcares livres, podem ser utilizados para outros fins, como produção de biogás por exemplo. A inserção desta biomassa em outro processo é uma alternativa promissora e sustentável, agregando valor ao resíduo dentro do conceito de economia circular.

Referências bibliográficas

ALMEIDA, J.R.N.; MODIG, T.; PETERSSON, A.; HÄHN-HÄGERDAL, B.; LIDÉN, G.; GORWA-GRAUSLUND, M.F.

- Increased tolerance and conversion of inhibitors in lignocellulosic hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 82, p. 340-349, 2007.
- BAZOTI, S. F. et al. Second-generation ethanol from non-detoxified sugarcane hydrolysate by a rotting wood isolated yeast strain. **Bioresource Technology**, v. 244, p. 582–587, 1 nov. 2017.
- CARDONA, E.; LLANO, B.; PEÑUELA, M.; PEÑA, J.; RIOS, L. A. Liquid-hot-water pretreatment of palm-oil residues for ethanol production: An economic approach to the selection of the processing conditions. **Energy**, v. 160, p.441-451, 2018.
- CASTELLO, F. et al. Bioavailability and pharmacokinetic profile of grape pomace phenolic compounds in humans. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 646, p.1-9, 2018.
- GONG, C. -S et al. Conversion of pentoses by yeasts. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 25, n. 1, p. 85–102, 1 jan. 1983.
- GU, H.; ZHANG, J.; BAO, J. Inhibitor analysis and adaptive evolution of *Saccharomyces cerevisiae* for simultaneous saccharification and ethanol fermentation from industrial waste corncob residues. **Bioresource Technology**, v. 157, p. 6-13, 2014.
- GUTIERREZ, L. E. Produção de glicerol por linhagens de *Saccharomyces* durante fermentação alcoólica. **ESALQ**, v. 48, p. 55–69, 1991.
- HAAS, I. C. da S. **Resíduo obtido do processamento do suco de uva: caracterização e cinética de secagem**. 2015. 124 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciência de Alimentos, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2015. Cap. 2.
- NAGHSHBANDI, M. P. et al. Progress toward improving ethanol production through decreased glycerol generation in *Saccharomyces cerevisiae* by metabolic and genetic engineering approaches. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. Elsevier Ltd, 1 nov. 2019.
- PEIXOTO, C. M.; DIAS, M. L.; ALVES, M. J.; CALHELHA, R. C.; BARROS, L.; PINHO, S. P.; FERREIRA, I. C. F. R. Grape pomace as a source of phenolic compounds and diverse bioactive properties. **Food Chemistry**, v. 253, p.132-138, 2018.
- SRITRAKUL, N.; NITISINPRASERT, S.; KEAWSOMPONG, S. Evaluation of dilute acid pretreatment for bioethanol fermentation from sugarcane bagasse pith. **Agriculture and Natural Resources**, v. 51, n. 6, p. 512–519, 1 dez. 2017.
- ZANIVAN, J.; BONATTO, C.; SCAPINI, T.; DALASTRA, C.; BAZOTI, S.F.; JÚNIOR, S.L.A; FONGARO, G.; TREICHEL, H. Evaluation of Bioethanol Production from a Mixed Fruit Waste by *Wickerhamomyces* sp. UFFS-CE-3.1.2. **BioEnergy Research**, 2021.