

# ESTUDO DA SACARIFICAÇÃO E FERMENTAÇÃO SIMULTÂNEAS DE CELULOSE MICROCRISTALINA

Stephanie Costamagna Pellin<sup>1</sup> e Adriana Célia Lucarini<sup>3</sup>  
<sup>1,3</sup> Departamento de Engenharia Química, Centro Universitário FEI

E-mail: stephaniecp\_@hotmail.com e lucarini@fei.edu.br

**Resumo:** Devido ao crescente interesse na produção de biocombustíveis, este projeto estuda o processo SSF - Sacarificação e Fermentação Simultâneas, na produção de etanol a partir de substratos lignocelulósicos. Foram estudados os parâmetros de eficiência da hidrólise enzimática da celulose microcristalina, utilizando-se a celulase CellicCtec2®, para em seguida estudar a hidrólise em conjunto com a fermentação. Foi determinado o pH 5 e um teor de 20% de substrato como a condição mais eficiente para a hidrólise.

## 1. Introdução

O etanol, atualmente é um dos biocombustíveis mais importantes na matriz energética brasileira, sendo usado em larga escala mundialmente. Devido à demanda mundial por combustíveis produzido a partir de diversas biomassas, a biomassa lignocelulósica (celulose/hemicelulose/lignina) tem enorme interesse para ampliar o potencial de produção de etanol.

Neste caso, a matéria-prima utilizada não é diretamente fermentescível e precisa ser transformada em açúcares fermentescíveis (preferencialmente hexoses) através de um processo de hidrólise, seguido de fermentação alcoólica por leveduras *Saccharomyces cerevisiae*, para a obtenção do etanol [1].

As celulases são enzimas que hidrolisam as ligações glicosídicas  $\beta$ -(1,4) da celulose e atuam como um sistema multicomponente na sua degradação. O conjunto enzimático é formado, basicamente, por endoglucanases, exoglucanases e celobiasas. As endoglucanases agem diretamente sobre a celulose amorfa produzindo, aleatoriamente, oligômeros de até 6 unidades de glicose. As exoglucanases ou celobiodrolases atuam sobre os extremos da celulose cristalina produzindo, principalmente, celobiose e glicose. Finalmente, a celobiose formada é hidrolisada à glicose pela ação das celobiasas ou  $\beta$ -glucosidases [2].

Através da hidrólise enzimática é possível obter alto teor de conversão da celulose em açúcares fermentescíveis, porém, um problema presente nesse processo é o fato do produto da hidrólise (glicose) ser um inibidor da reação, abaixando seu rendimento. Na tentativa de contornar esse problema, o processo de Sacarificação e Fermentação Simultânea (SSF) é uma alternativa, pois o açúcar é consumido pelos microorganismos presentes no meio logo que é formado, gerando, simultaneamente à hidrólise o etanol. Isso faz com que o equilíbrio da reação enzimática se desloque a favor da formação de produto, hidrolisando quase 100% da celulose [2].

O objetivo deste projeto é estudar uma estratégia de processo SSF. Estuda-se neste trabalho especificamente

a ação simultânea da celulase comercial Cellic Ctec2® e células de *Saccharomyces cerevisiae* na conversão simultânea de celulose microcristalina em etanol. Até o presente momento, foram determinados: a atividade enzimática da celulase comercial Cellic Ctec2® e parâmetros (pH e teor de sólidos) que promovessem a melhor transformação da celulose em açúcares fermentescíveis. Na continuidade será estudada a influência da concentração de inóculo (suspensão de microorganismos) e tempo de reação no processo SSF.

## 2. Metodologia

Com o intuito de verificar o comportamento da hidrólise enzimática da celulose microcristalina, foram realizados ensaios para o estudo da reação em diferentes valores de pH e diferentes concentrações de substrato.

Neste trabalho foi utilizado a celulase comercial CellicCTec2® cedidas pela Novozymes Brasil. O valor de atividade enzimática foi determinado através do método do FPU (*Filter Paper Unit*), sendo que 1 FPU corresponde à uma Unidade de Papel de Filtro (*Filter Paper Unit*), como descrito por Ghose [3].

Foram feitas as hidrólises da celulose microcristalina nas seguintes condições, para o estudo do pH: 40°C; 2% (w/w) substrato; 150 rpm de agitação e 48h de reação. Para o estudo da porcentagem de substrato mantiveram-se as seguintes condições: 40°C; pH 5; 150 rpm de agitação e 48h de reação. Para todos os experimentos a carga enzimática utilizada foi de 20 FPU/g de substrato.

Após as hidrólises foram feitas análises para determinação do teor de glicose pelo método enzimático GOD-POD (Kit LABTEST Glicose Liquiform Ref.:133) e determinação do teor de açúcares redutores totais pelo método do DNS [4].

## 3. Resultados

O estudo da influência do pH na hidrólise da celulose microcristalina foi realizado variando-se os valores do pH de 2 a 6. A influência do pH na hidrólise por enzimas é grande e no caso da celulase em uso o maior rendimento de hidrólise ocorre entre pH 5 e 6, porém o valor do pH ótimo varia com o substrato [5]. A fermentação alcoólica por leveduras ocorre eficientemente do pH neutro ao levemente ácido, finalizando por volta de pH 3 [1]. O pH ácido nas fermentações também é útil para minimizar a contaminação bacteriana [1]. A Figura 1 apresenta os dados obtidos de concentração de açúcares fermentescíveis e glicose em função do pH.

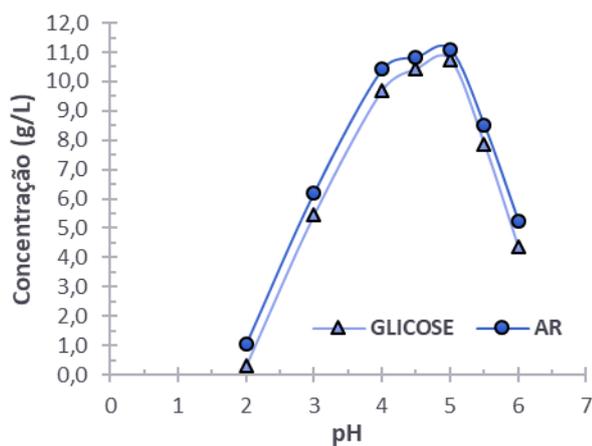


Figura 1 – Influência do pH na hidrólise da celulose microcristalina.

Através da Figura 1, pode-se notar que o pH 5 é que libera a maior quantidade de açúcares redutores, em média 11,1 g/L, sendo 10,7 g/L destes açúcares glicose. Portanto, o pH 5 mostra-se adequado para os estudos de fermentação e sacarificação simultâneas, pois é adequado tanto para a hidrólise como para a fermentação. Na tentativa de aumentar a concentração de açúcares redutores liberada ao meio, uma vez que seria adequado ter uma quantidade mínima de 5° BRUX (5% em massa ou cerca de 50g/L) de açúcares totais para viabilizar o estudo de fermentação sem a necessidade de concentração do meio por evaporação e para se ter uma concentração de álcool detectável durante a fermentação, estudou-se a influência da porcentagem de celulose no meio reacional. Variou-se o substrato entre 2 e 20% de sólidos na hidrólise, e os resultados obtidos de açúcares redutores e glicose obtidos estão apresentados na Figura 2.

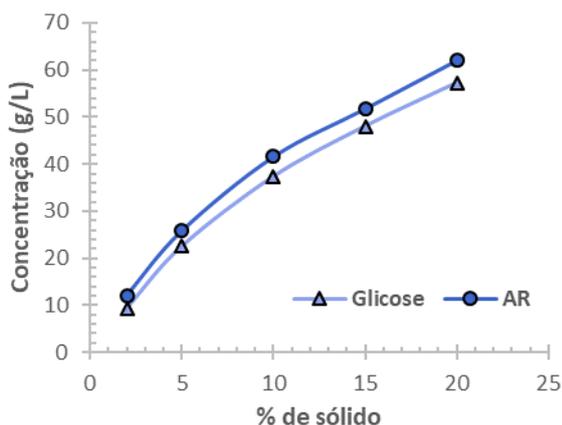


Figura 2 – Influência da porcentagem de sólidos na hidrólise da celulose microcristalina.

Observou-se na Figura 2 que com um teor de 20% de substrato no meio reacional, a concentração de açúcares redutores obtida foi de 62,1 g/L, sendo 57,3 g/L destes açúcares glicose. Verificou-se o aumento da concentração de açúcares redutores e glicose conforme

aumentou-se a porcentagem de sólido presente na reação, mas ao efetuar o cálculo da eficiência de hidrólise (EH), através da relação entre a massa de glicose obtida e a massa de celulose utilizada, observou-se que a EH cai com o aumento da quantidade de celulose na reação, como mostra a Tabela 1.

Tabela I – Eficiência de Hidrólise.

| % sólidos | EH<br>(g glicose / g celulose) |
|-----------|--------------------------------|
| 2         | 0,471                          |
| 5         | 0,452                          |
| 10        | 0,374                          |
| 15        | 0,321                          |
| 20        | 0,286                          |

#### 4. Conclusões

Até o presente momento, com os resultados obtidos, pode-se concluir que as melhores condições para a hidrólise enzimática são utilizando um meio reacional com pH 5 e um teor de sólidos de 20%. Embora estas condições sejam ideais para a hidrólise enzimática, ao ser realizada simultaneamente com a fermentação, elas podem se alterar, sendo necessário o estudo destes e outros parâmetros dentro do processo SSF. Nas próximas etapas será estudado a concentração de inóculo (suspensão de microorganismos) e o tempo de fermentação no processo, com determinação do teor de etanol formado, concentração de glicose e açúcares redutores totais no meio.

#### 5. Referências

- [1] U. A. Lima et al., *Biotechnologia Industrial: processos fermentativos e enzimáticos*, Edgard Blücher, 2001
- [2] M. J. Taherzadeh; K. Karimi, *Bioresources*, **2** (2007) 707-738
- [3] T. K. Ghose, *International Union of Pure and Applied Chemistry: Applied Chemistry Division Commission of Biotechnology*, **59** (1987) 257 – 268
- [4] G. L. Miller, *Analytical Chemistry* (1959) 426-428
- [5] E. P. S. Bon et al., *Enzimas em Biotechnologia*, Interciência, 2008

#### Agradecimentos

Ao Centro Universitário FEI pelo apoio ao desenvolvimento desta pesquisa e pelo uso dos laboratórios do CLQ. À Novozymes Brasil pelo fornecimento da CellicCTec2®.

<sup>1</sup> Aluna de IC do Centro Universitário FEI. Projeto PBIC 162/16 com vigência de 10/16 a 09/17.