



FERMENTAÇÃO ALCÓOLICA DE HIDROLISADO HEMICELULÓSICO DE TORTA DO CAROÇO DE ALGODÃO POR *Galactomyces geotrichum* UFVJM-R10

C. T. R. GARCIA¹, J. P. MATOS², B. T. RIBEIRO¹, A. S. DOS SANTOS³ e L. A. PANTOJA^{1 e 3}

¹ Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Instituto de Ciência e Tecnologia

² Universidade Federal de Ouro Preto, Núcleo de Pesquisa em Ciências Biológicas

³ Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Departamento de Ciências Básicas

E-mail para contato: camilateles13@hotmail.com.br

RESUMO – O uso da fração hemicelulósica de alguns resíduos agroindustriais para a produção de bioetanol de segunda geração (2G) depende de micro-organismos capazes de fermentar pentoses e hexoses. Buscando atingir elevados valores de eficiência fermentativa e viabilizar a produção de bioetanol 2G, o presente estudo avaliou a eficiência da produção de bioetanol a partir da fração hemicelulósica da torta do caroço de algodão utilizando a linhagem *Galactomyces geotrichum* UFVJM-R10. A hidrólise da biomassa foi realizada a uma razão sólido/liquido (m/v) de 31% empregando uma solução de H₂SO₄ 8% a 120°C e 1 atm de pressão por 38 minutos. Os melhores resultados de rendimento em produto (1,16 g g⁻¹), eficiência fermentativa (>100%) e produtividade volumétrica (0,05 g L⁻¹ h⁻¹) foram observados no meio suplementado com sais minerais e nitrogênio. A partir da análise dos resultados, pode-se inferir que a linhagem *G. geotrichum* UFVJM-R10 possui potencial para a produção de bioetanol a partir da assimilação de glicose e xilose, sob tudo, a utilização de uma solução de nitrogênio e sais minerais deve ser levada em consideração para obter melhores resultados na produção de bioetanol 2G.

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, a crescente preocupação com o meio ambiente e as oscilações no preço do petróleo estão impulsionando o interesse mundial no desenvolvimento de tecnologias sustentáveis para a produção de biocombustíveis líquidos renováveis semelhantes aos combustíveis fósseis existentes (AMARI & KARIMI, 2018). Visando essa produção, o bioetanol lignocelulósico tem atraído a atenção da sociedade acadêmica e industrial, principalmente devido às suas vantagens econômicas e ambientais sobre outros bioprodutos orgânicos existentes (FARMANBORDAR *et al.*, 2018). O bioetanol lignocelulósico possui um alto calor de vaporização sendo capaz de substituir a gasolina e proporcionar uma redução em até 65% da emissão dos gases de efeito estufa (DUTTA *et al.*, 2014). Outra vantagem atribuída a este biocombustível é a sua matéria-prima, a qual é proveniente de resíduos

agroindustriais, o que evita a utilização de culturas alimentícias para a produção de energia (MATOS *et al.*, 2018).

As biomassas lignocelulósicas são conhecidas por serem ricas em açúcares fermentescíveis, como pentoses e hexoses. Esses carboidratos podem sofrer fermentação alcoólica por ação de micro-organismos e apresentar o bioetanol como produto principal (AGUILAR-REYNOSA *et al.*, 2017). A fermentação das pentoses disponibilizadas após a hidrólise da biomassa lignocelulósica, caracteriza um dos maiores desafios para a produção do bioetanol 2G, visto que, contrariamente às hexoses, poucos micro-organismos de ocorrência natural são conhecidos como eficientes fermentadores de xilose (CADETE *et al.*, 2016).

Em conjunto com as linhagens fermentadoras de pentoses, alguns resíduos lignocelulósicos, como a torta do caroço de algodão, foram registrados como potenciais matérias-primas para a produção do bioetanol 2G (BONISSATTO *et al.*, 2015). Diante do potencial apresentado pela biomassa do algodoeiro na produção do bioetanol 2G e devido à escassez de registros do uso de *G. geotrichum* na fermentação alcoólica de hidrolisados hemicelulósicos, esse estudo teve por objetivo avaliar a eficiência fermentativa dessa linhagem leveduriforme na produção de bioetanol 2G a partir da torta do caroço de algodão.

2. METODOLOGIA

Obtenção e preparo da torta do caroço de algodão: A torta obtida junto à Indústria de Óleo, Rações e Plásticos Montes Claros LTDA – MG, Brasil; foi submetida à secagem em estufa com circulação forçada de ar a 60°C por 48 horas. Em seguida foi cominuída em moinhos de facas, peneirada em malha de 1,0 mm, acondicionada em potes de plástico (25±2°C) e reservada para uso posterior. **Obtenção da fração hemicelulósica por hidrólise química:** A hidrólise química foi realizada empregando uma solução de ácido sulfúrico (H₂SO₄) a 8% e razão sólido-líquido (S/L) de 31%. O ensaio foi conduzido em autoclave à 120°C, 1 atm de pressão, por 38 minutos. Na sequência, o hidrolisado foi filtrado a vácuo sobre papel de filtro e foram recuperadas as frações insolúvel e solúvel. A fração solúvel foi neutralizado com Ca(OH)₂ P.A e reservada para os processos fermentativos, enquanto que, a fração sólida remanescente foi submetida a sucessivas lavagens com água destilada sob filtração a vácuo em papel de filtro até pH neutro, seguida de secagem em estufa com circulação de ar forçada a 65°C por 24 horas e reservada para posterior caracterização físico-química. **Preparo do inóculo:** A linhagem leveduriforme *G. geotrichum* UFVJM-R10 foi obtida no banco de linhagens microbianas do Laboratório de Bioprocessos e Biotransformação da UFVJM. A linhagem foi reativada em meio YMPD (*Yeast Malt Peptone Dextrose*), e incubadas a 28 °C por 48 horas. O inóculo foi preparado a partir de uma alçada da linhagem reativada em 100 mL do meio descrito por Toquero e Bolado (2014). As culturas cresceram em frascos cônicos de 250 mL incubados a 28°C sob agitação de 150 rpm por tempo suficiente para se atingir 1 unidade de densidade óptica (D.O) com leitura espectrofotométrica a 600 nm. Após o período de crescimento, o meio foi centrifugado por 15 minutos a 4000 rpm e o sobrenadante foi descartado. As células foram lavadas com água destilada estéril, ressuspensas finalmente em 100 mL de água estéril e, nessa forma, usadas como inóculo na proporção de 10% v/v. **Fermentação alcoólica:** O ensaio fermentativo foi conduzido em frascos cônicos de 50 mL contendo o hidrolisado hemicelulósico com e sem

suplementação de sais minerais. O hidrolisado suplementado recebeu a adição do mesmo meio de cultivo usado para o preparo do inóculo, sem a presença de glicose e xilose, na proporção de 1:1. Alíquotas de 1 mL foram colhidas a intervalos de 4 horas e centrifugadas a 15.000 rpm por 5 minutos. Os sobrenadantes foram armazenados a -20°C para determinações analíticas posteriores e as células foram resuspensas a 1 mL com água destilada para determinação da $\text{D.O}_{600\text{nm}}$. Os processos fermentativos foram avaliados ainda, quanto aos parâmetros de rendimento em etanol; produtividade volumétrica de etanol e eficiência fermentativa (HISS, 2013). **Caracterização físico-química da torta antes e após o pré-tratamento ácido:** A torta foi caracterizada quanto aos teores de fibra em detergente neutro – FDN, fibra em detergente ácido – FDA, celulose, lignina, hemiceluloses (AOAC, 1992) e teor de amido (McCREADY *et al.*, 1950). Todas as análises foram realizadas em triplicata.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A torta do caroço de algodão analisada nesse estudo apresentou 11% de hemiceluloses, 23% de celulose e 4,5% de amido (Tabela 1). Esses carboidratos em conjunto somam 38,5% do peso seco da torta do caroço de algodão, o que revela o seu potencial para a produção de bioetanol.

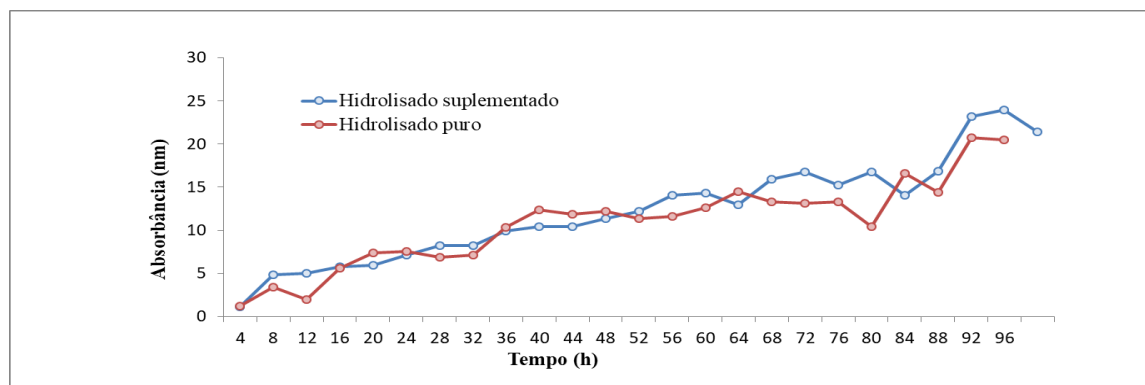
Tabela 1 - Composição química da torta do caroço de algodão antes e após tratamento químico com H_2SO_4 a 8%

Frações (%)	Biomassa	
	Antes do pré-tratamento	Após o pré-tratamento
Amido	4,50±0,74	ND
Celulose	23,36 ± 1,23	42,98 ± 2,67
Hemicelulose	11,26 ± 0,31	4,78 ± 1,14
Lignina	6,94 ± 1,58	28,96 ± 1,44

O valor de 6,9% de lignina encontrado na torta estudada (Tabela 1) pode ser considerado baixo para biomassas lignocelulósicas. Os baixos teores de lignina favorecem o uso da biomassa para produção de etanol 2G, uma vez que a lignina tem a função de aumentar a resistência da estrutura lignocelulósica a ataques químicos e enzimáticos, por consequência, quanto menor teor desse componente, menor será a resistência para liberação dos açúcares passíveis para a fermentação (SANNIGRAHI *et al.*, 2011). A lignina (28%) e a celulose (42%) após o pré-tratamento ácido foram concentradas no resíduo sólido remanescente (Tabela 1). As taxas relativamente mais elevadas desses carboidratos, em biomassas pré-tratadas com ácido sulfúrico, podem estar relacionadas à perda concomitante de polissacarídeos (hemiceluloses), que ao serem removidos pelo reagente utilizado, promove o aumento da concentração da fração que fica retida no resíduo sólido restante (MATOS, 2018).

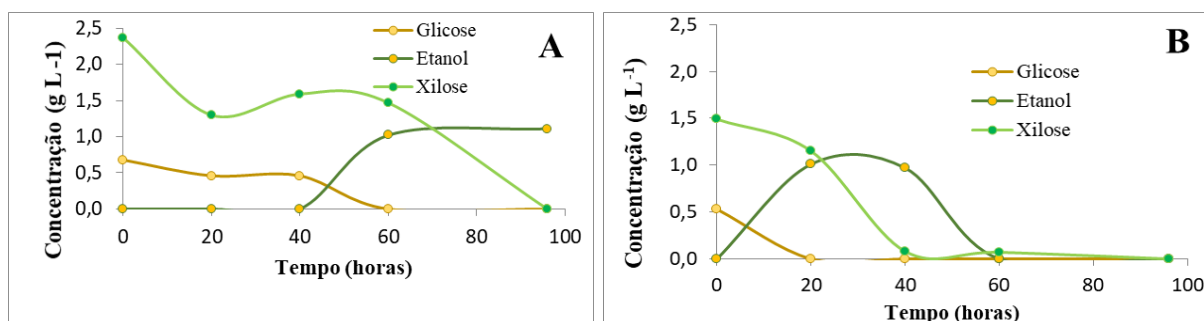
Quanto ao perfil de crescimento, *G. geotrichum* obteve valores iniciais de aproximadamente 1 unidade até valores próximos entre 20 e 24 unidades de $\text{D.O}_{600\text{nm}}$ no hidrolisado puro e suplementado, respectivamente, em 96 horas de fermentação (Figura 1). Em ambos os meios, o micro-organismo apresentou um perfil de crescimento semelhante, indicando que a suplementação com sais e nitrogênio não interferiu no desenvolvimento da levedura.

Figura 1 - Perfil do crescimento celular da linhagem *Galactomyces geotrichum* UFVJM-R10



O perfil do consumo de glicose por *G. geotrichum* UFVJM-R10 no meio suplementado com a solução de sais minerais e nitrogênio (Figura 2A) foi observado em 20 horas de fermentação, entretanto, no meio não suplementado (Figura 2B) a glicose foi totalmente consumida a partir das 60 horas de fermentação e assim como a glicose, no meio suplementado, o consumo total de xilose foi mais rápido quando comparado ao consumo desse mesmo açúcar no meio não suplementado, cujo carboidrato manteve-se presente até o fim da fermentação.

Figura 2 - Perfil do consumo de açúcares e produção de etanol por *G. geotrichum* UFVJM-R10 em hidrolisado puro (A) e suplementado com sais minerais (B)



A suplementação de um meio fermentativo tem por objetivo melhorar o desempenho de leveduras e aumentar a sua produtividade volumétrica (DANESI, 2009). E nesse estudo, pode-se observar que a suplementação proporcionou um melhor desempenho da levedura quanto à metabolização dos açúcares presentes no meio. Além disso, sabe-se que açúcares de cinco carbonos, como a xilose, não são facilmente fermentados por qualquer linhagem de micro-organismos e muitas vezes quando são assimilados, ocorre de forma mais lenta que a glicose (BERŁOWSKA *et al.*, 2016), o que pode explicar o consumo mais acelerado da glicose em relação ao de xilose nos dois meios estudados.

Os parâmetros fermentativos do processo foram calculados considerando os tempos onde houve a melhor produção de etanol (Tabela 2), porém, a xilose, no meio não suplementado, não havia sido consumida por completo. A maior produção de etanol obtida pela levedura estudada no meio não suplementado ($1,11 \text{ g L}^{-1}$) e suplementado ($1,01 \text{ g L}^{-1}$) ocorreu após 96 e 20 horas de fermentação, respectivamente (Tabela 2). Em ambos os casos, a maior concentração de etanol presente nos meios adveio após o consumo total da glicose. Os



intervalos de tempo observados para o maior rendimento em etanol em ambos os meios analisados, mostram que a suplementação, além de aumentar a produção, o faz em menos horas quando comparado ao meio sem suplementação. Industrialmente, a otimização em relação ao tempo de produção pode significar economia e elevação de lucro e produção.

Em relação ao rendimento em produto e eficiência fermentativa os valores no meio suplementado foram mais expressivos ($1,16 \text{ g g}^{-1}$) e ($>100\%$), respectivamente, quando comparados ao meio sem suplementação ($0,36 \text{ g g}^{-1}$) e ($71,22\%$), respectivamente. Além disso, a suplementação de sais ao ensaio contribuiu para o aumento da produtividade volumétrica ($0,05 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$) (Tabela 2). Esses valores mostram que a adição de fontes de sais e nitrogênio ao meio acelera a produção máxima de etanol por *G. geotrichum* UFVJM-R10, bem como, favorece a elevação da produtividade e eficiência fermentativa.

Tabela 2 - Processos fermentativos conduzidos com *G. geotrichum* UFVJM-R10 no hidrolisado hemicelulósico suplementado e não suplementado

Parâmetros de Processo	Hidrolisado	
	Não suplementado (96h)	Suplementado com sais minerais (20h)
Etanol (g L^{-1})	1,11	1,01
$Y_{P/S}$ (g g^{-1})	0,36	1,16
Q_p ($\text{g.L}^{-1} \text{h}^{-1}$)	0,01	0,05
E_f (%)	71,22	>100

4. CONCLUSÃO

A levedura *Galactomyces geotrichum* UFVJM-R10 apresentou capacidade de produção de etanol a partir do hidrolisado hemicelulósico da torta do caroço de algodão, assimilando tanto glicose como xilose. A suplementação, de sais minerais e nitrogênio no meio fermentativo, possibilitou uma elevada eficiência ($>100\%$) fermentativa e reduziu o tempo de fermentação (em 76 horas). Os resultados obtidos mostram que a linhagem *G. geotrichum* possui potencial para a produção de bioetanol. No entanto, há necessidade de otimização dos processos para melhorar a produção de etanol e aumentar a produção do produto de interesse.

5. REFERÊNCIAS

- AGUILAR-REYNOSA, A.; ROMANÍ, A.; RODRÍGUEZ-JASSO, R. M.; AGUILAR, C. N., GARROTE, G.; RUIZ, H. A. Microwave heating processing as alternative of pretreatment in second-generation biorefinery: An overview. *Energ Convers Manage*, v. 136, p. 50-65, 2017.
- AMARI, H. & KARIMI, K. Pretreatment and hydrolysis of lignocellulosic wastes for butanol production: Challenges and perspectives. *Bioresource Technol.*, 2018.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTRY – AOAC. Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemistry. Washington: AOAC, 1992.



- BERŁOWSKA, J.; PIELECH-PRZYBYLSKA, K.; BALCEREK, M.; DZIEKOŃSKA-KUBCZAK, U.; PATELESKI, P.; DZIUGAN, P.; KREGIEL, D. Simultaneous saccharification and fermentation of sugar beet pulp for efficient bioethanol production. *BioMed res int*, v. 2016, 2016.
- BONISSATTO, R. C.; D.J. SILVA, J. M. de A.; RODRIGUES, F. A.; RESENDE, S. T.; de MENDONÇA NETO, A. B. Processo de produção de etanol a partir da hidrólise ácida de biomassa lignocelulósicas. *Blucher Chem. Engi. Proceedings*, v. 1, n. 2, p. 2370-2377, 2015.
- CADETE, R. M.; ALEJANDRO, M.; SANDSTRÖM, A. G.; FERREIRA, C.; GÍRIO, F.; GORWA-GRAUSLUND, M. F.; ROSA, C. A. FONSECA, C. Exploring xylose metabolism in *Spathaspora* species: XYL1. 2 from *Spathaspora passalidarum* as the key for efficient anaerobic xylose fermentation in metabolic engineered *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Biofuels*, v. 9, n. 1, p. 167, 2016.
- DANESI, E.D.G.; MIGUEL, A.S.M.; RANGEL-YAGUI, C.O.; CARVALHO, J.C.M.; PESSOA Jr., A. (2006). Effect of C:N ratio and substrate source on glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) production by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *J Food Eng.*, v. 75, p. 96-103, 2009.
- DUTTA, K.; DAVEREY, A.; LIN, J. Evolution retrospective for alternative fuels: First to fourth generation. *Renew Energ*, v. 69, p.114-122, set. 2014.
- FARMANBORDAR, S.; KARIMI, K.; AMIRI, H. Municipal solid waste as a suitable substrate for butanol production as an advanced biofuel. *Energy Conversion and Management*, v. 157, p. 396-408, 2018.
- HISS, H. (Ed.). Cinética de Fermentações: Uma análise matemática da atividade microbiana. São Paulo: Edição do Autor, 2013. 654p. ISBN 98785915695.
- MATOS, J. P.; SOUZA, K. R.; SANTOS, A. S.; PANTOJA, L. A. FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA DE HIDROLISADO HEMICELULÓSICO DE TORTA DE GIRASSOL POR *Galactomyces geotrichum* UFVJM-R10 E *Candida akabanensis* UFVJM-R131. *Quím Nova*, v. 41, n. 1, p.23-2018.
- MCCREADY, R. M., GUGGOLZ, J., SILVIERA, V., & OWENS, H. S. Determination of starch and amylose in vegetables. *Application to pear. Anal Chem.*, v.22, p. 1156, 1950.
- SANNIGRAHI, P., KIM, D. H., JUNG, S., & RAGAUSKAS, A. Pseudo-lignin and pretreatment chemistry. *Energ Environ Sci.*, v. 4, n. 4, p. 1306-1310, 2011.
- TOQUERO, C. & BOLADO, S. Effect of four pretreatments on enzymatic hydrolysis and ethanol fermentation of wheat straw. Influence of inhibitors and washing. *Bioresource Technol*, v. 157, p. 69-76, 2014.