

INFLUÊNCIA DE INIBIDORES NO PROCESSO DE FERMENTAÇÃO ETANÓLICA DE XILOSE POR *PACHYSOLEN TANNOPHILUS*

A. S. SILVA¹, A. M. OLIVEIRA Jr¹ e A. K. S. ABUD¹

¹ Universidade Federal de Sergipe, Departamento de Tecnologia de Alimentos
E-mail para contato: ana.abud@gmail.com

RESUMO – Nos processos de produção de etanol de segunda geração fazem-se necessárias etapas de pré-tratamento para a quebra da lignina e da hemicelulose, redução da cristalinidade da celulose e aumento da porosidade da biomassa. Estes pré-tratamentos liberam não apenas hexoses, mas também pentoses e outros açúcares, além de inibidores. Avalia-se neste trabalho o efeito dos inibidores ácido acético, furfural e hidroximetilfurfural na cinética de produção de etanol pela levedura *Pachysolen tannophilus*, à temperatura ambiente, durante 120 h, tendo como substrato a xilose comercial. A adição de hidroximetilfurfural não influenciou o processo fermentativo e, apesar de geração de biomassa inferior ao processo sem adição de inibidores, foi a que obteve maior eficiência na conversão de xilose a etanol (22,9%). Os resultados mostraram que a levedura *Pachysolen tannophilus* é inibida pela presença de ácido acético e furfural, indicando que a levedura pode não ser eficiente em amostras de pré-tratamento da biomassa lignocelulósica que contenham uma mistura destes inibidores.

1. INTRODUÇÃO

A demanda brasileira e mundial por combustíveis renováveis tem aumentado consideravelmente nos últimos anos, tanto por questões econômicas (alto preço dos combustíveis fósseis) quanto por socioambientais, reduzindo a emissão de gases de efeito estufa que contribuem para o aquecimento global (Demirbas, 2005 citado por Cabral *et al.*, 2009).

Para suprir esta demanda, buscam-se processos industriais economicamente viáveis e sustentáveis, sendo um dos focos de intensa pesquisa e desenvolvimento os processos de produção de bioetanol a partir de biomassas alternativas, a exemplo do material lignocelulósico, que somente no Brasil totaliza 350 milhões de toneladas por ano e englobam resíduos agroindustriais, lixo urbano, resíduos florestais, entre outros, participando em aproximadamente 50% da biomassa terrestre (Ballesteros, 2001; Pereira Jr, 2007; Hayes, 2009).

A biomassa lignocelulósica é constituída de celulose, hemicelulose e lignina que, quando hidrolisados, disponibilizam uma fração de hexoses resultante da celulose, facilmente fermentescível, e uma fração de pentoses, resultante das hemiceluloses, que são carboidratos não diretamente fermentescíveis pelas leveduras industriais, tradicionalmente utilizadas na conversão de bioetanol

(Machado, 2013). As hemiceluloses são heteropolímeros de pentoses e hexoses e a hidrólise das hemiceluloses fornece, principalmente, pentoses, onde a xilose é o açúcar predominante, compreendendo 20 a 40% do total de carboidratos dos resíduos agrícolas (Gírio *et al.*, 2010; Moraes *et al.*, 2010). Para a utilização eficaz da biomassa lignocelulósica, não se deve levar em conta apenas a fermentação de hexoses, mas, também, a de pentoses, atualmente considerado um dos desafios mais importantes a ser resolvido no âmbito científico e tecnológico (Gírio *et al.*, 2010; Rossell, 2008; Silva *et al.*, 2011).

Diferentes espécies de leveduras e microrganismos geneticamente modificados têm sido analisadas para a produção de etanol, com rendimento suficiente para tornar o processo economicamente atrativo (Fugita, 2010; Almeida, 2011), destacando-se as leveduras *Pichia stipitis*, *Candida shehatae* e *Pachysolen tannophilus* e as bactérias *Zymomonas mobilis* e *Escherichia coli*, cada uma apresentando seus aspectos positivos e negativos na produção de bioetanol (Gírio *et al.*, 2010; Machado, 2013).

De acordo com Zhao *et al.* (2008), a levedura *Pachysolen tannophilus* é um dos maiores produtores de etanol a partir de xilose, apesar de não tolerar altas concentrações deste produto. A fermentação contendo mistura de glicose e xilose mostra a preferência da levedura pela hexose, enquanto que na fermentação apenas com xilose observa-se maior formação de biomassa e menor produção de etanol.

Em estratos do pré-tratamento da biomassa lignocelulósica, a fermentação costuma ser lenta e de baixo rendimento, o que provavelmente deve estar relacionado à baixa resistência dos microrganismos a altas concentrações de etanol, além de haver a geração de vários co-produtos, tais como ácido acético e ácido lático, considerados produtos de degradação. Além destes, o ácido fórmico, o furfural, o hidroximetilfurfural e fenóis podem, também, ser produzidos durante o processo, inibindo a fermentação e afetando o rendimento de produção do etanol, devendo, assim, serem removidos ou suavizados (Fugita, 2010).

Este trabalho analisa a influência dos principais inibidores formados no pré-tratamento da biomassa lignocelulósica, ácido acético, furfural e hidroximetilfurfural, no processo de fermentação etanólica em meio sintético, com a levedura *Pachysolen tannophilus*, contendo xilose única fonte de carboidrato.

2. METODOLOGIA

2.1. Microrganismo e inóculo

Utilizou-se nos experimentos a levedura *Pachysolen tannophilus* NRRL Y-2460, gentilmente cedida pela Embrapa Agroenergia. A manutenção da linhagem foi realizada a partir de repiques contínuos em meio YPX (20 g/L de extrato de levedura; 10 g/L de peptona e 20 g/L de xilose), sendo a cultura mantida em tubo inclinado contendo meio YPXA (20 g/L de extrato de levedura; 10 g/L de peptona; 20 g/L de xilose e 20 g/L de ágar bacteriológico).

O meio de cultura sintético foi composto por 20 g/L xilose, 3 g/L extrato de levedura, 5 g/L peptona bacteriológica, 1 g/L sulfato de magnésio (MgSO_4), 5 g/L fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4) e 3 g/L sulfato de amônio $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$. O pH do foi corrigido para 4,5 e, em seguida, esterilizado em autoclave à 121° e 1 atm por 15 min, sendo a xilose esterilizada em separado.

Para o preparo do inóculo, alçadas da levedura foram transferidas assepticamente para frasco Erlenmeyer de 500 mL contendo 250 mL de meio de cultura e incubado à temperatura ambiente e sob agitação de 150 rpm por 24 h (fase exponencial de crescimento). Depois deste tempo, foi realizada a contagem de células em câmara de Neubauer para determinar o volume necessário para inocular 2.10^7 cél/mL. Com o volume definido, as células foram recuperadas por centrifugação a 3750 rpm e 10 min, sendo posteriormente ressuspensas no meio de fermentação.

2.2. Processo fermentativo

Para os testes fermentativos foi utilizado o meio contendo 20 g/L xilose; 3 g/L extrato de levedura; 5 g/L peptona bacteriológica; 1 g/L sulfato de magnésio (MgSO_4); 5 g/L fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4); 3 g/L sulfato de amônio $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$. Para o teste de inibição foram adicionadas quantidades determinadas dos inibidores ácido acético (1,75 g/L), furfural (1,25 g/L) e hidroximetil furfural (0,40 g/L). O pH do meio foi ajustado para 4,5, com solução de ácido sulfúrico 1,5 M ou hidróxido de sódio 2 M. Os experimentos foram conduzidos frascos Erlenmeyer de 250 mL, à temperatura ambiente por 120 h, sem controle de pH. Durante os experimentos, amostras foram retiradas a cada 24 h para determinação do crescimento celular, consumo de xilose e produção de etanol. As fermentações foram realizadas em duplicata.

2.3. Determinações analíticas

O acompanhamento do crescimento celular foi feito através da medida de absorbância a 600 nm, tendo água destilada como branco. Os valores de concentração foram calculados através de equação de curva de calibração entre o peso e a absorbância. A concentração de xilose foi determinada pelo método colorimétrico do ácido 3,5-dinitrossalicílico (DNS), após fervura por 5 min e leitura em espectrofotômetro a 540 nm, de acordo com metodologia proposta por Miller (1959), tendo como curva padrão soluções de concentração conhecida de xilose. A concentração de etanol foi determinada por cromatografia gasosa, em detector de ionização de chama (FID), com coluna Restek RT-Q-Bond, isoterma a 150°C, injeção split 60 mL/min, temperatura do injetor e do detector a 250°C e tempo de análise de 3 min. As medidas foram realizadas em triplicata.

Para avaliar a influência da inibição da levedura em estudo pela presença dos inibidores, foram calculados o rendimento em etanol ($Y_{P/S}$, g/g), definido pela razão entre a concentração de etanol (g/L) e a xilose consumida (g/L), a conversão de substrato em células ($Y_{X/S}$, g/g), como a razão entre a variação do crescimento celular e a xilose consumida, a produtividade em etanol (Q_P , g/L.h), pela razão entre a variação máxima da concentração de etanol (g/L) e o tempo desta fermentação

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para entender o comportamento da levedura frente à presença dos principais inibidores do pré-tratamento da biomassa lignocelulósica, do qual se extrai a hemicelulose, foram realizados estudos de fermentação em xilose comercial na ausência, na mistura e na presença de cada inibidor, cuja concentração foi definida com base em experimentos conduzidos por García-Cubero *et al.* (2011) com a levedura *Pichia stipitis*.

Os perfis das cinéticas de fermentação são apresentados na Figura 1. Pode-se observar que a *Pachysolen tannophilus* se mostrou capaz de crescer na presença apenas do hidroximetilfurfural (HMF), gerando produção máxima de etanol. A adição de ácido acético (HAc) inibiu o processo fermentativo, não chegando a consumir metade da xilose adicionada. A adição de furfural (F) inibiu o crescimento nas primeiras 96 h de fermentação, ainda que praticamente toda a xilose fosse consumida. O processo sem adição de inibidores apresentou maior formação de biomassa, porém produção de etanol inferior ao processo com adição de HMF.

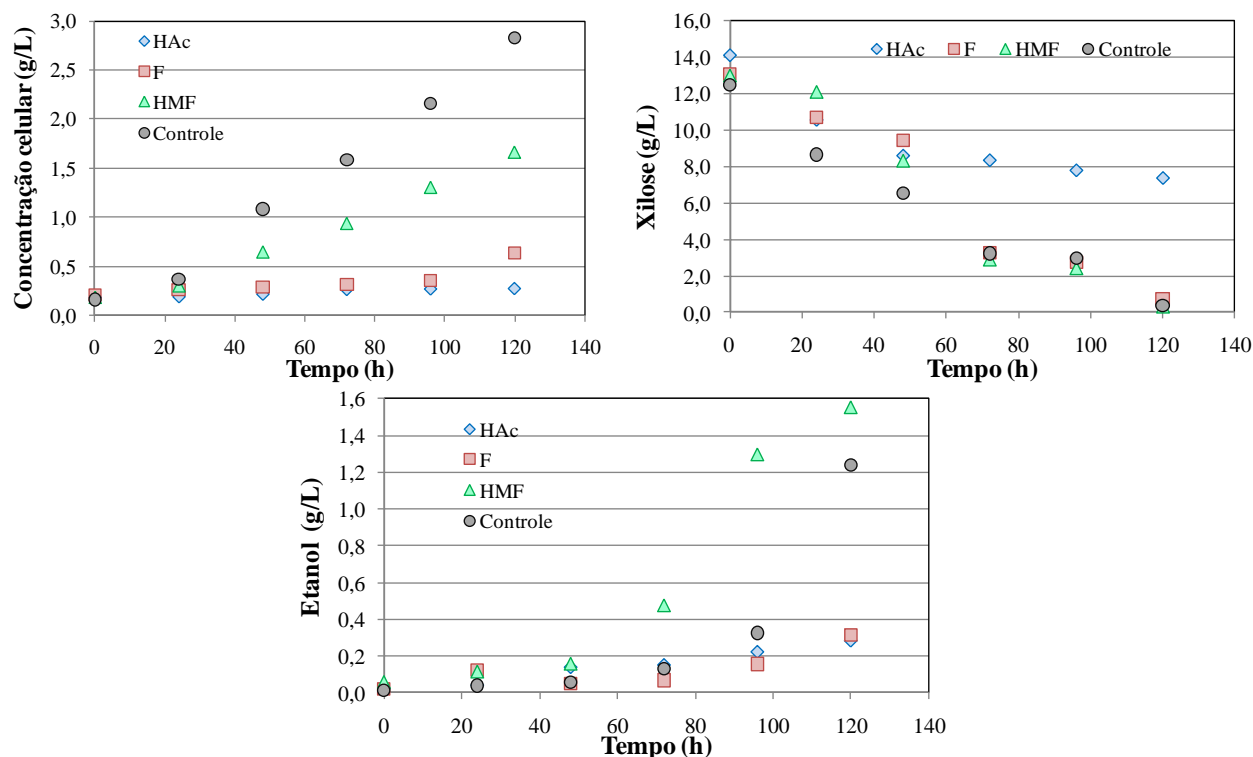


Figura 1 – Comportamento cinético das variáveis de fermentação.

A Tabela 1 apresenta as variações de crescimento celular (ΔX), consumo de substrato (ΔS) e produção de etanol (ΔP) após 120 h de fermentação, bem como os valores encontrados para os parâmetros $Y_{P/S}$, $Y_{X/S}$, μ_{max} , Q_P e eficiência da conversão de xilose à etanol ($\eta\%$), utilizando-se 0,511

g/g como valor teórico da conversão de açúcar em etanol.

Tabela 1 – Parâmetros cinéticos e de conversão obtidos nos ensaios realizados.

	ΔX (g/L)	ΔS (g/L)	ΔP (g/L)	$Y_{X/S}$ (g/g)	$Y_{P/S}$ (g/g)	μ_{max} (h ⁻¹)	Q_X (g/L.h)	Q_P (g/L.h)	η (%)
Controle	2,67	12,10	1,23	0,220	0,101	0,028	0,022	0,010	19,82
HAc	0,09	6,75	0,26	0,013	0,038	0,004	0,001	0,002	7,53
F	0,43	12,34	0,29	0,035	0,024	0,006	0,004	0,002	4,62
HMF	1,48	12,74	1,49	0,116	0,117	0,020	0,002	0,012	22,90

A maior conversão de xilose em células ($Y_{X/S}$) ocorreu nos experimentos sem adição de inibidores (0,22 g/g), tendo a adição de HMF um efeito 50% inferior. Avaliando-se a produtividade de biomassa, o experimento controle (0,022 g/L.h) obteve resultados semelhantes ao encontrado por Sánchez *et al.* (2002) com 25 g/L de xilose (0,023 g/L.h).

Nos ensaios sem adição de inibidores (controle) e com adição de HMF foram obtidos rendimentos em etanol em torno de 10%, resultados próximos ao encontrado por Sánchez *et al.* (2002) (9,4%), enquanto que com a adição de furfural e ácido acético não se chegou a 4%. Todavia, a produtividade em etanol foi significativamente inferior, mostrando eficiências de conversão da xilose em etanol abaixo de 23%.

Os valores da determinação da velocidade específica máxima de crescimento (μ_{max}) foram obtidos pelo ajuste linear dos valores experimentais de $\ln(X/X_0)$ em função do tempo. Esta determinação permitiu comprovar a inibição do processo pela adição ácido acético e de furfural, além de verificar no experimento controle e com adição de HMF taxas de crescimento de 0,03 e 0,02 h⁻¹, respectivamente.

Os resultados mostram que a levedura *Pachysolen tannophilus* é inibida pela presença de ácido acético e furfural, indicando que o microrganismo pode não ser eficiente em amostras de pré-tratamento da biomassa lignocelulósica, em especial oriundas de pré-tratamento químico, que contêm uma mistura destes inibidores.

4. CONCLUSÕES

A levedura *Pachysolen tannophilus* se mostrou capaz de crescer na presença isolada hidrozimetilfurfural, mas apresentou inibição quase que completa na presença de ácido acético e de furfural. A presença apenas de hidroximetilfurfural, na concentração de 0,40 g/L, mostrou efeito positivo na fermentação etanólica, gerando maior eficiência do processo fermentativo (22,9%). A influência dos principais inibidores obtidos do pré-tratamento químico da biomassa lignocelulósica indicam que esta levedura pode não ser o microrganismo adequado para a produção de etanol de segunda geração.

5. AGRADECIMENTOS

À Embrapa Agroenergia, pelo auxílio à pesquisa e doação da levedura.

6. REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, J. R. M.; FÁVARO, L. C. L. Leveduras para produção de etanol de sorgo sacarino. *Agroenergia em Revista*, ed. 3, ago. 2011.
- BALLESTEROS, M. Estado del desarrollo tecnológico del aprovechamiento de biomasa: biocombustibles para el sector del transporte. *Energía*, v.161, p. 29-34, 2001.
- CABRAL, J.C.A.; SILVA, J.P.A.; ROBERTO, I.C. Influência do pH na produção de etanol por *Pichia stipitis*. In: *Encontro Latino Americano de Pós-Graduação*, 9º, 2005, Lorena-SP.
- DEMIRBAS, A. Bioethanol from cellulosic materials: a renewable motor fuel from biomass. *Energy Sources*, v. 27, p. 327-337, 2005.
- FUGITA, T. *Desempenho de leveduras que metabolizam xilose para produção de etanol em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana*. 2010. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Universidade Estadual Paulista.
- GARCÍA-CUBERO, M. T.; BELLIDO, C.; BOLADO, S.; COCA, M.; LUCAS, S.; GONZÁLEZ-BENITO, G. Effect of inhibitors formed during wheat straw pretreatment on ethanol fermentation by *Pichia stipitis*. *Bioresource Technology*, v. 102, p. 10868-10874, 2011.
- GÍRIO, F. M.; FONSECA, C.; CARVALHEIRO, F.; DUARTE, L. C.; MARQUES, S. BOGEL-LUKASIK, R. Hemicelluloses for fuel ethanol: a review. *Bioresource Technology*, Oxon, v. 101, n. 13, p. 4775-4800, 2010.
- HAYES, D. J. An examination of biorefining processes, catalysts and challenges. *Catalysis Today*, v; 145, p. 138-151, 2009.
- MACHADO, C. M. M. *Microrganismos na produção de biocombustíveis líquidos*. Editora Técnica. Brasília – DF. Embrapa, 2013. 319 p.
- MILLER, G. L., Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, v.31, n. 3, p. 426-428, 1959.
- MORAES, D. C.; MURARI, C. S.; AQUINO, P. L. M.; BUENO, G. F.; DEL BIANCHI, V. L. Avaliação da fermentação aeróbia para produção de etanol a partir da xilose por linhagens de leveduras isoladas da casca de uva (*Vitis spp*). *Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais*, v. 15, n. 2, p. 117-122, 2013.
- MORAES, D. C.; PEREZ, C. A.; DORTA, C. Seleção de microrganismos fermentadores de xilose. *Revista Analytica*, ano 8, n. 47, p. 59-67, jun/jul 2010.
- PEREIRA Jr., N. *Biomassas residuais de composição lignocelulósica para a produção de etanol e o contexto de refinaria*, 2007.
- ROSSELL, C.E.V. Evolução tecnológica da produção de etanol. Expectativas futuras: destilarias

otimizadas, etanol da hidrólise de bagaço. In: *Reunião Anual da SBPC*, 60^a, 2008, Campinas-SP.

SÁNCHEZ, S.; BRAVO, V.; CASTRO, E.; MOYA, A. J.; CAMACHO, F. The fermentation of mixtures of D-glucose and D-xylose by *Candida shehatae*, *Pichia stipitis* and *Pachysolen tannophilus* to produce ethanol. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, v. 77, p. 641-648, 2002.

SILVA, J. P. A.; MUSSATTO, S. I.; ROBERTO, I. C.; TEIXEIRA, J. A. Ethanol production from xylose by *Pichia stipitis* NRRL Y-7124 in a stirred tank bioreactor. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, v. 28, n. 1, p. 151-156, jan-mar 2011.

ZHAO, L.; ZHANG, X.; TAN, T. Influence of various glucose/xylose mixtures on ethanol production by *Pachysolen tannophilus*. *Biomass and Bioenergy*, v. 32, n. 12, p. 1156-1161, 2008