

INFLUÊNCIA DE INIBIDORES NA FERMENTAÇÃO ETANÓLICA DE XILOSE POR *PICHIA STIPITIS*

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 – A biomassa agroindustrial é uma promissora alternativa energética. Contudo, para sua conversão em açúcares, necessita de pré-tratamentos, os quais liberam não apenas hexoses, mas também pentoses e outros açúcares, além de inibidores. O efeito dos inibidores ácido acético, furfural e hidroximetilfurfural na cinética de produção de etanol pela levedura *Pichia stipitis*, tendo como substrato xilose comercial, é avaliado neste trabalho. As fermentações ocorreram em frascos Erlenmeyer de 250 mL, à temperatura ambiente, 150 rpm, durante 72 h e sem controle de pH, tendo a concentração inicial de $2 \cdot 10^7$ cél/mL. A mistura dos inibidores influenciou negativamente o processo, não se observando crescimento celular, apesar de consumo de 30% da xilose, enquanto que a adição de 0,4 g/L de hidroximetilfurfural se mostrou benéfica ao processo fermentativo, com conversão quase que completa da xilose à etanol e produtividade em etanol de 0,19 g/L h. Apesar de crescimento semelhante ao processo sem adição de inibidores, a adição de furfural e de ácido acético gerou, após 48 h, menor taxa de conversão de xilose em células e em etanol, com menor produtividade e taxa de crescimento celular, respectivamente.

1. INTRODUÇÃO

O Brasil produziu 23,54 milhões de m³ de etanol em 2012 (ANP, 2013) com base na conversão da sacarose da cana-de-açúcar, o chamado etanol de primeira geração. Neste processo, a cana-de-açúcar é esmagada e o caldo extraído, rico em sacarose, é convertido em etanol pela fermentação alcoólica. Apesar da grande produção, a demanda brasileira e mundial por combustíveis renováveis tem aumentado consideravelmente nos últimos anos, tanto por razões econômicas (alto preço dos combustíveis fósseis) quanto por questões socioambientais, devido ao fato de o etanol combustível produzido por fermentação não contribuir para o aumento líquido de dióxido de carbono (CO₂) para a atmosfera, pois é produzido por matérias-primas renováveis, as quais seqüestram o CO₂ da mesma (Demirbas, 2005 citado por Cabral *et al.*, 2009).

Para suprir a demanda de etanol, grandes esforços têm sido feitos para o desenvolvimento de processos de produção a partir de biomassas alternativas, incluindo biomassa lignocelulósica, a qual engloba resíduos agroindustriais, lixo urbano, resíduos florestais, etc, que participam em aproximadamente 50% da biomassa terrestre e somam, somente no Brasil, 350 milhões de toneladas destes resíduos por ano (Ballesteros, 2001; Pereira Jr, 2007).

Na conversão da biomassa lignocelulósica à etanol são necessárias 5 operações unitárias. (1) Redução do tamanho da biomassa para aumentar a área superficial e uniformidade; (2) pré-tratamento para romper estrutura da lignina e da hemicelulose, reduzindo a cristalinidade da celulose e aumentando a porosidade da biomassa; (3) hidrólise enzimática para converter açúcares poliméricos em açúcares monoméricos; (4) fermentação para produzir etanol a partir dos açúcares monoméricos. (5) recuperação do etanol por destilação ou outra tecnologia de separação (García-Cubero *et al.*, 2011).

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 (Moraes *et al.*, 2010). Todavia, os carboidratos oriundos das pentoses (xilose e arabinose) não são diretamente fermentescíveis por leveduras industriais (*Saccharomyces cerevisiae*), sendo a biotransformação destas pentoses a etanol um dos desafios mais importantes a ser resolvido no âmbito científico e tecnológico (Rossell, 2008; Silva *et al.*, 2011). Devido a isto, outras 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).

Entre os microrganismos fermentadores de pentoses, a levedura *Pichia stipitis* aparece como capaz de fermentar xilose e outras importantes hexoses a etanol a partir do hidrolisado da biomassa lignocelulósica, sendo condições como pH, temperatura, oxigênio, agitação e composição do meio fatores importantes no processo de bioconversão (Sunitha *et al.*, 1999; Nigan, 2001; Cabral, 2005; Agbogbo *et al.*, 2008; Farias *et al.*, 2012). A *Pichia stipitis*, também, não requer a adição de vitaminas para a fermentação de xilose e é capaz de utilizar uma ampla variedade de açúcares como substrato, a exemplo de glicose e celobiose (Agbogbo e Wenger, 2006 citado por García-Cubero *et al.*, 2011).

Entretanto, 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 rico, com a levedura *Pichia stipitis*, contendo xilose única fonte de carboidrato.

2. METODOLOGIA

2.1. Microrganismo e inóculo

Foi utilizada a levedura *Pichia stipitis* NRRL Y-7124, 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 foi composto de 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 [$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$]. 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 de 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 $2 \cdot 10^7$ 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 contendo 100 mL de meio de cultivo, à temperatura ambiente e 150 rpm por 72 h, sem controle de pH e em condições microaeróbias (frascos fechados com tampão de algodão). Durante os experimentos, amostras foram retiradas a cada 24 h para determinação do crescimento celular, consumo de xilose e produção de etanol. As fermentações sem adição de inibidores (controle) e mistura foram realizadas em triplicata, enquanto que as de adição de inibidores isoladamente, em duplicata.

2.3. Determinações analíticas

O acompanhamento do crescimento celular foi feito através da medida de absorvância 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 absorvância. 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 detetor 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).

Os perfis das cinéticas de fermentação são apresentados na Figura 1. Pode-se observar que a *Pichia stipitis* se mostrou capaz de crescer na presença isolada destes inibidores, sendo a adição do hidroximetilfurfural (HMF), na quantidade em estudo (0,4 g/L), benéfica para o processo fermentativo, com maior crescimento celular, consumo de substrato em 48 h de fermentação e produção máxima de etanol. A mistura dos inibidores influenciou significativamente o processo fermentativo, não apresentando crescimento celular e formação de etanol, apesar do lento consumo de 30% da xilose inicial nas primeiras 48 h de fermentação.

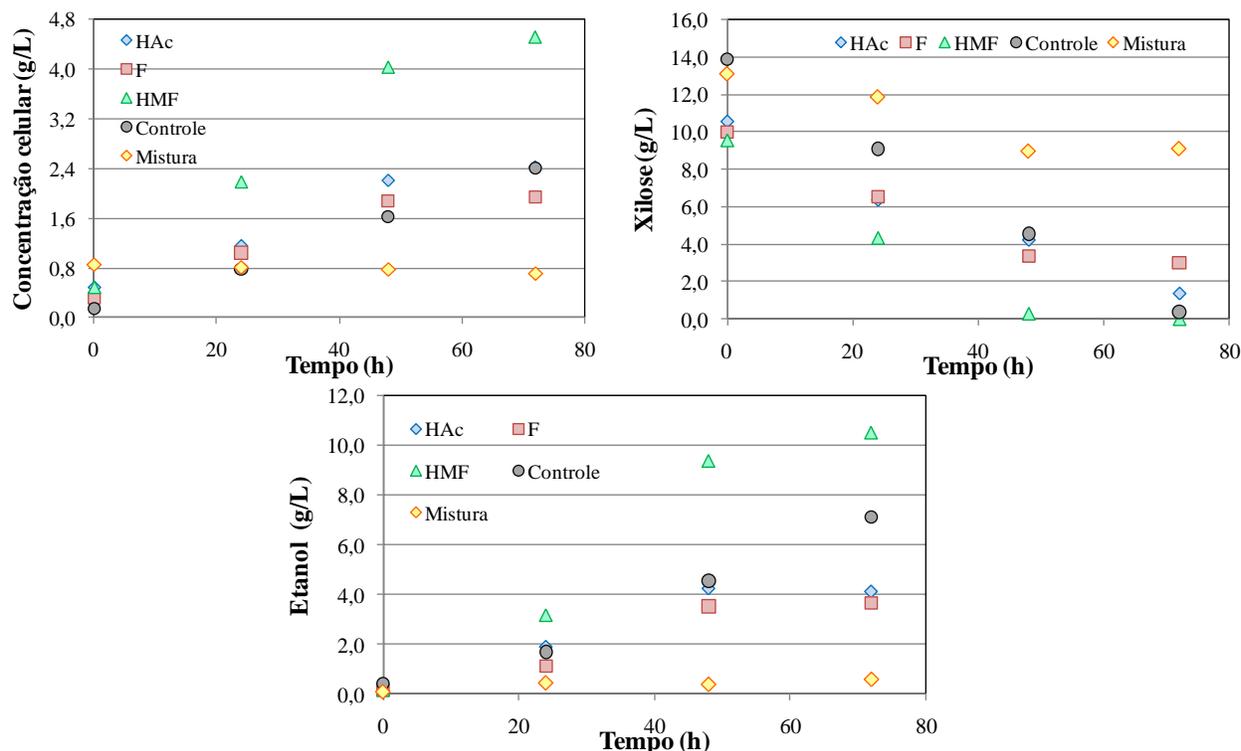


Figura 1 – Comportamento cinético das variáveis de fermentação.

Apesar de crescimento semelhante ao processo sem adição de inibidores (controle), a adição de furfural (F) e de ácido acético (HAc) gerou, após 48 h, menor taxa de conversão de substrato e parada

da produção de etanol, sendo a condição empregada de concentração de furfural aquela que mais interferiu no processo fermentativo, atingindo a fase estacionária de crescimento em 48 h e permanecendo no meio, sem consumo, 30% da quantidade inicial de xilose. A maior inibição causada pelo furfural à fermentação com xilose está em consonância com a literatura, onde Limayem e Ricke (2012) citam que, durante a degradação dos açúcares nos pré-tratamentos ácidos, há a formação de inibidores como o furfural, oriundo, principalmente, da desidratação das pentoses, e hidroximetilfurfural (HMF), a partir da desidratação das hexoses, além de compostos fenólicos e ácido acético. Estes compostos causam danos ao microrganismo, reduzindo as atividades biológica e enzimática, quebrando o DNA e inibindo a síntese de RNA e proteína (Ra *et al.*, 2013).

A Tabela 1 apresenta as variações de crescimento celular (ΔX), consumo de substrato (ΔS) e produção de etanol (ΔP) após 72 h de fermentação, bem como os valores encontrados para os parâmetros $Y_{P/S}$, $Y_{X/S}$, μ_{max} e Q_P obtidos em cada experimento.

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_P (g/L.h)
Controle	2,26	11,43	6,71	0,197	0,587	0,053	0,093
HAc	1,94	9,17	4,01	0,212	0,438	0,033	0,056
F	1,63	7,00	3,54	0,233	0,505	0,040	0,049
HMF	3,54	9,26	9,24	0,383	0,998	0,048	0,192

À exceção do processo fermentativo com adição de HMF, a conversão de xilose em células ($Y_{X/S}$) foi próxima a 0,2 g/g, com rendimentos próximos ao apresentado na literatura em estudos com adição de glicose e xilose como substratos, sem adição de inibidores (Cabral *et al.*, 2005; Silva *et al.*, 2011; Farias *et al.*, 2012). Para o ensaio sem adição de inibidores (controle) o rendimento da conversão de xilose a etanol foi 0,587 g/g.

Garcia (2012) cita que fatores como pH, temperatura, aeração, adição de nutrientes e concentrações iniciais de substrato e de inóculo podem influenciar a bioconversão de açúcares a etanol. A composição do meio de cultura, por exemplo, pode não apenas suprir as necessidades nutricionais do microrganismo, como também promover ou aumentar a tolerância da *Pichia* aos compostos inibidores presentes no hidrolisado. Também, maiores concentrações celulares podem conduzir a maior viabilidade celular e, conseqüentemente, maior formação de biomassa e produto, tornando-se uma estratégia para amenizar o efeito tóxico dos inibidores (Agbogbo *et al.*, 2007).

A escolha das condições do processo tem efeito direto na resposta metabólica, tornando-se difícil uma única explicação para a resposta fisiológica. García-Cubero *et al.* (2011), em fermentações com a mistura de glicose e xilose, citam que o consumo de xilose foi inibido em 0,5 g/L de HMF, porém com efeito não tão significativo quanto ao das fermentações com os inibidores ácido acético e furfural, enquanto a adição de 0,1 g/L de HMF teve um efeito positivo no crescimento celular, o qual foi ligeiramente maior do que o experimento controle tendo, ao final do processo de fermentação, semelhante produção de etanol. Ask *et al.* (2013), em cultivo anaeróbio da levedura *Saccharomyces*

cerevisiae em meio contendo glicose, xilose e 2 g/L de HMF, observaram redução na taxa de consumo de glicose e maiores absorção de xilose e produção de etanol, glicerol e xilitol.

O que ocorreu nos experimentos com HMF e apenas xilose foi um crescimento celular 40% superior ao ensaio controle, consumo quase que completo do substrato e grande formação de etanol em ambas fermentações com este inibidor. A literatura considera estabelecido o mecanismo de conversão do furfural em álcool furfurílico e indica que, pela estrutura semelhante do HMF e do furfural, pode haver a conversão do HMF em um composto denominado 2,5-bis-hidroximetilfurano, identificado em espectro UV/Vis a 222 nm (Ra *et al.*, 2013). Assim, há a necessidade de estudos mais detalhados quanto a esta fermentação, seja no que diz respeito à viabilidade celular, utilização da fonte de carbono, realizando estudos com meio sintético, determinação da concentração de HMF e de etanol.

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. As menores taxas de crescimento foram obtidas com a adição de ácido acético ($0,033\text{ h}^{-1}$), enquanto as maiores no processo sem adição de inibidores ($0,053\text{ h}^{-1}$). Estes valores foram inferiores aos obtidos por Farias *et al.* (2012), comprovando a necessidade de aeração do meio de cultivo ao longo do processo fermentativo.

As produtividades em etanol na presença de ácido acético (HAc) e furfural (F) foram baixas em relação aos experimentos com adição de hidroximetilfurfural (HMF) e sem adição de inibidores, os quais obtiveram valores próximos aos obtidos por García-Cubero *et al.* (2011).

Os resultados obtidos levam à necessidade de estudos da concentração destes inibidores no caldo extraído do pré-tratamento da biomassa lignocelulósica, em especial no pré-tratamento químico, onde uma maior quantidade destes componentes é gerada, de forma a se conduzir estudos mais específicos sobre a influência da mistura dos inibidores na fermentação etanólica pela levedura *Pichia stipitis*.

4. CONCLUSÕES

A levedura *Pichia stipitis* se mostrou capaz de crescer na presença isolada dos principais inibidores do pré-tratamento da biomassa lignocelulósica, mas mostrou que a mistura destes componentes é capaz de inibir completamente o processo fermentativo. A presença apenas de hidroximetilfurfural, na concentração de 0,40 g/L, mostrou efeito positivo na fermentação etanólica, diferente ao obtidos nos experimentos com glicose e xilose, enquanto que a presença de 1,75 g/L de ácido acético promoveu menor taxa de crescimento celular e conversão do substrato xilose em etanol. A presença de 1,25 g/L de furfural levou à inibição no crescimento e no consumo de xilose, chegando à fase estacionária após 48 h de fermentação.

5. AGRADECIMENTOS

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

6. REFERÊNCIAS

- AGBOGBO, F. K.; WENGER, K. S. Production of ethanol from corn stover hemicellulose hydrolyzate using *Pichia stipitis*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, v. 34, p. 723-727, 2007.
- AGBOGBO, F. K.; HAAGENSEN, F. D.; MILAM, D.; WENGER, K. S. Fermentation of acidpretreated corn stover to ethanol without detoxification using *Pichia stipitis*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 145, p. 53-58, 2008.
- AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS (Brasil). *Anuário estatístico brasileiro do petróleo, gás natural e biocombustíveis: 2013*. Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis - Rio de Janeiro: ANP, 2013
- ALMEIDA, J. R. M.; FÁVARO, L. C. L. Leveduras para produção de etanol de sorgo sacarino. *Agroenergia em Revista*, ed. 3, ago. 2011.
- ASK, M.; BETTIGA, M.; MAPELLI, V.; OLSSON, L. The influence of HMF and furfural on redox-balance and energy-state of xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology for Biofuels*, v. 6, n. 22, p. 1-13, 2013.
- 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.
- FARIAS, D.; ATALA, D. I. P.; MAUGERI, F. Modelagem cinética da fermentação de xilose por *Pichia stipitis*. In: *XIX Congresso Brasileiro de Engenharia Química*. Búzios, RJ, 2012.
- 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.
- GARCIA, D. *Estudo da produção de etanol pela levedura *Pichia stipitis* a partir do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de malte*. 2012. Tese (Doutorado em Ciências) – Escola de Engenharia de Lorena – Universidade de São Paulo.
- 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.
- LEE, T.Y.; KIM, M. D.; KIM, K. Y.; PARK, K.; RYU, Y. W.; SEO, J. W. A parametric study on ethanol production from xylose by *Pichia stipitis*. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, v. 5, p. 27-3, 2000.
- LIMAYEM, A.; RICKE, S. C. Lignocellulosic biomass for bioethanol production: Current perspectives, potential issues and future prospects. *Progress in Energy and Combustion Science*, v.

38, p. 449-467, 2012

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.

NIGAM, J. N., Ethanol production from wheat straw hemicellulose hydrolysate by *Pichia stipitis*. *Journal of Biotechnology*, v. 87, p. 17-27, 2001

PEREIRA Jr., N. *Biomassas residuais de composição lignocelulósica para a produção de etanol e o contexto de refinaria*, 2007.

RA, C. H.; JEONG, G. T.; SHIN, M. K.; KIM, S. K. Biotransformation of 5-hydroxymethylfurfural (HMF) by *Scheffersomyces stipitis* during ethanol fermentation of hydrolysate of the seaweed *Gelidium amansii*. *Bioresource Technology*, v. 140, p. 421-425, 2013.

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.

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.

SUNITHA, K.; LEE, J. K.; OH, T. K. Optimization of medium components for phytase production by *E. coli* using response surface methodology. *Bioprocess Engineering*. v. 21, p. 477-481, 1999.