

PRODUÇÃO DE H₂ POR FERMENTAÇÃO EM PRESENÇA DE SUBPRODUTOS DE HIDRÓLISE DE MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS.

M. R. SIQUEIRA¹, V. REGINATTO¹

¹Universidade de São Paulo, Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto – SP.
Departamento de Química
E-mail para contato: M.rechi@usp.br

RESUMO – Os hidrolisados de materiais lignocelulósicos podem ser usados para a produção fermentativa de H₂. Durante a hidrólise desses materiais há liberação de substâncias potencialmente inibidoras de fermentação. Neste trabalho foram estudados 3 grupos de compostos inibidores: o ácido acético; derivados de furano, como o furfural e o 5-hidroximetilfurfural (HMF); e monômeros fenólicos, tais como a vanilina, o siringaldeído e o ácido 4-hidroxibenzóico (AHB). Foram realizados ensaios cinéticos em batelada com glicose, adicionando diferentes concentrações destes compostos, sendo avaliados os seus efeitos sobre os parâmetros cinéticos do modelo de Gompertz: produção máxima de H₂ (P), a velocidade de produção (R_m) e fase de latência (λ). Concentrações de 0,35 g.L⁻¹ de furfural e 0,54 g.L⁻¹ de HMF reduziram em 50% a velocidade de produção de H₂, parâmetro denominado C_{L50}. A mesma inibição com o ácido acético só ocorre em concentrações próximas a 3,75 g.L⁻¹. Para o AHB, siringaldeído e vanilina, 50% da atividade é inibida por aproximadamente 0,25; 1,2 e 0,62 g.L⁻¹, respectivamente. Portanto, a utilização de matérias lignocelulósicos como substrato para a produção de H₂ depende de métodos de hidrólise que reduzam as concentrações destes compostos nos hidrolisados.

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos os processos biológicos de produção de H₂ têm chamado à atenção, pois na maioria das vezes, são operados à temperatura e pressão ambiente, e possibilitam o uso de matérias-primas renováveis (Li *et al*, 2012). Dentre os métodos biológicos destaca-se a produção de H₂ por fermentação a partir de materiais orgânicos, tais como resíduos agroindustriais com elevada concentração de carboidratos (Wang e Wan, 2008).

Neste contexto, os materiais lignocelulósicos têm sido vistos com grande interesse para serem utilizados, após a sua hidrólise, como substrato na produção fermentativa de H₂ (Ren *et al*, 2009). Estes materiais têm uma estrutura química complexa e muitas vezes requerem um pré-tratamento químico e/ou hidrólise à elevadas temperaturas para servirem como substrato para a fermentação.

Os pré-tratamentos ou hidrólise tornam os carboidratos mais biodisponíveis, mas também geram subprodutos, que podem interferir negativamente na fermentação (Jonsson *et al.* 2013). Três principais grupos de compostos têm sido estudados como potenciais inibidores da fermentação formados durante as hidrólises de materiais lignocelulósicos: (1) os ácidos orgânicos, tais como o ácido acético, gerado a partir da hidrólise dos grupos acetil da hemicelulose; (2) derivados de furano, tais como o furfural ou 5-hidroximetilfurfural (HMF); produtos da desidratação de pentoses e hexoses, respectivamente; e (3) monômeros fenólicos, tais como, vanilina, siringaldeído e ácido 4-hidroxibenzóico (AHB), provenientes da decomposição da lignina (Ren *et al.*, 2009; Jonsson *et al.* 2013).

Neste sentido, o presente trabalho estudou o efeito de compostos pertencentes às três diferentes classes de subprodutos de hidrólise de materiais lignocelulósicos (ácidos orgânicos, derivados de furanos e compostos fenólicos) sobre a produção biológica de H_2 por cultura mista de microorganismos. Os efeitos destes compostos sobre culturas mistas ainda não foram devidamente investigados, pois são limitados ou no número de inibidores investigados ou nas concentrações estudadas. Neste trabalho foi possível calcular a concentração dos inibidores necessária para causar 50 % de inibição da produção biológica de H_2 pela cultura mista estudada. Essas investigações abrem caminho para a utilização de materiais lignocelulósicos na produção biológica de H_2 .

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Inóculo e Meio de Fermentação

A cultura mista (lodo) utilizada como inóculo foi coletada de um reator anaeróbio de fluxo ascendente para o tratamento de efluentes de uma usina de açúcar e etanol (vinhaça), localizada na Região de Ribeirão Preto - SP. O lodo foi mantido em laboratório pela sua alimentação com meio de cultura contendo glicose como fonte de carbono, e a composição de nutrientes adaptado de González-Gil *et al.* (2002). Todos os produtos químicos eram de grau analítico. Antes dos ensaios de produção de H_2 , o lodo foi seco em estufa a 105°C por 12 h para o enriquecimento em bactérias produtoras de H_2 . Após o tratamento térmico, o lodo foi macerado em almofariz, peneirado em malha de 35 # (500 μm) e armazenado a temperatura ambiente (25°C) em frasco escuro. Para a caracterização do inóculo foi realizada a análise de sólidos voláteis (SV) no lodo seco, de acordo com APHA *et al.* (1995).

2.2. Ensaios de Produção de Hidrogênio por Fermentação com Cultura Mista

Foram realizados ensaios em batelada para a produção de H_2 com cultura mista de microorganismos (lodo). Os ensaios foram realizados em reatores de 125 mL de volume útil, aos quais foi adicionado o 1,5 g lodo seco (contendo em média 40 % de SV), 120 mL de solução de glicose (40 g.L^{-1}), suplementada 1 mL de solução de nutrientes, conforme composição do meio de González-Gil (2002). A concentração de glicose utilizada nos ensaios foi calculada de forma a obter uma relação inicial de substrato (glicose)/microorganismo (SV) de 8. Em testes preliminares observou-se que esta relação substrato/microorganismo promovia a máxima velocidade de produção de H_2 .

O efeito dos subprodutos de hidrólise de materiais lignocelulósicos sobre a produção de H_2 por

fermentação foi avaliado adicionando, em diferentes concentrações os compostos inibidores, aos biorreatores contendo glicose, nutrientes e lodo. Os compostos inibidores foram introduzidos nos biorreatores pela adição de um determinado volume de solução estoque ou adicionada no biorreator quantidade suficiente para perfazer as concentrações desejadas. Os compostos inibidores estudados representaram as três classes de subprodutos de hidrólise, todos da marca Sigma-Aldrich (Estados Unidos), quais sejam: 1) ácidos orgânicos - ácido acético (98 %) em concentração de 0,5 a 10 g/L; 2) derivados de furanos – furfural (99 %) de 0,2 a 2,0 g/L e HMF (99 %) entre 0,1 e 1,0 g/L, e, 3) monômeros fenólicos – vanilina (99%) entre 0,5 e 2,0 g/L, siringaldeído (99%) entre 0,25 e 2,00 (%) e ácido 4 hidróxibenzóico (99%) entre 0,15 e 1,0 g/L.

Em todos os ensaios o pH inicial foi ajustado em 6,0 e gás argônio foi borbulhado a fim de manter a anaerobiose do sistema. Todos os testes foram incubados à temperatura de 37 °C em banho termostatzado e realizados no mínimo em duplicata.

Para a quantificação do volume total de gás produzido no biorreator durante os ensaios foi utilizado o sistema de frasco invertido, representado na Figura 1.

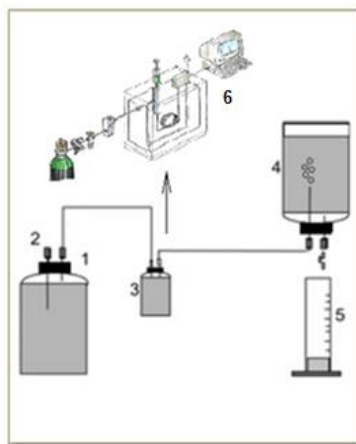


Figura 1. Sistema para a realização de ensaios cinéticos em batelada para a produção de H_2 por fermentação: 1- Biorreator, 2- Ponto de borbulhamento de gás argônio, 3- Frasco de segurança e de amostragem de gás, 4-Frasco invertido contendo solução de NaOH 5%, 5- Frasco graduado para recolher o volume de NaOH 5 % deslocado, 6- cromatógrafo a gás.

A determinação da composição dos gases do *headspace* dos biorreatores foi realizada por cromatografia a gás (CG). Uma alíquota de 50 μ L do *headspace* do reator era retirada regularmente, utilizando-se uma seringa tipo *gás tight* para a injeção no CG. A análise foi realizada em cromatógrafo a gás CG 2014 da Shimadzu (Japão), equipado com detector de condutividade térmica (TCD). A coluna utilizada foi a peneira molecular 5A 2m x 4,7mm, sendo o gás de arraste argônio sob vazão de 30 mL/min. As temperaturas do injetor, da coluna e do detector foram 80°C, 50°C e 100°C, respectivamente.

2.3. Modelagem dos resultados experimentais de produção de H_2

O modelo utilizado para o ajuste dos resultados experimentais dos ensaios cinéticos de produção de H₂ foi o modelo de Gompertz modificado, (Ning *et al.*, 2012), o qual relaciona três parâmetros R_m, P e λ, conforme Equação 1. Os resultados de volume de H₂ acumulado em função do tempo foram colocados no programa Statistica 7 e modelados pela equação 1.

$$P = H_{max} \cdot \exp \left\{ -\exp \left[\frac{R_m \cdot e}{P} (\lambda - t) + 1 \right] \right\} \quad (1)$$

Onde: P: representa a produção de H₂ acumulado (mL); H_{max}: potencial máximo de produção de H₂ (mL); R_m: velocidade máxima de produção de H₂ (mL/h); λ: tempo da fase lag (h) ou tempo para o início da produção de H₂; t: tempo do experimento (h).

As atividades de produção de H₂ (velocidade máxima de produção – R_m) foram normalizadas em função da atividade do controle (ensaio sem o inibidor), ou seja, foi calculada a razão entre as atividades de produção de H₂ na presença de diferentes concentrações de inibidores e a atividade do controle. A partir destes dados foi feito um gráfico da velocidade de produção de H₂ (normalizada) pela concentração dos inibidores e por interpolação foi estimada a concentração do inibidor que inibe 50% da velocidade máxima de produção, expresso como C_{I,50}.

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

A partir dos resultados dos ensaios cinéticos de volume de produção de H₂ em função do tempo foram obtidas as constantes cinéticas do modelo de Gompertz modificado (Eq. 1). Nas Figuras 2 (A) a (F) se encontram os valores dos parâmetros P (mL), R_m (mL/h) e λ-tempo da fase lag (h) na presença de diferentes concentrações de inibidores.

Como pode ser observado nas Figuras 2 de (A) a (F), de maneira geral, o H_{max} (potencial máximo de produção de H₂) e o R_m (velocidade de produção de H₂) diminuiram pela adição de concentrações crescentes dos compostos inibidores. Com relação à fase lag (λ) foi observada que a adição dos compostos inibidores ocasionou um aumento desta em relação ao controle, ou seja, o início da produção de H₂ foi retardado nos ensaios contendo os inibidores, quando comparado ao controle. Entretanto, este efeito não foi constatado de maneira significativa para os ensaios realizados com ácido acético (Figura 2-A) e HMF (Figura 2-C).

Na Figura 2A pode ser observado o efeito da adição de diferentes concentrações de ácido acético sobre os parâmetros do modelo de Gompertz. Os resultados revelaram que a adição de 1,0; 2,5 e 5,0 g.L⁻¹ acarreta numa diminuição na produção de H₂ na ordem de 30, 43 e 69 %, respectivamente. A fase de latência não aumentou até a concentração de 5g.L⁻¹, resultado este que se assemelha aos encontrados por Wang *et al.* (2008)

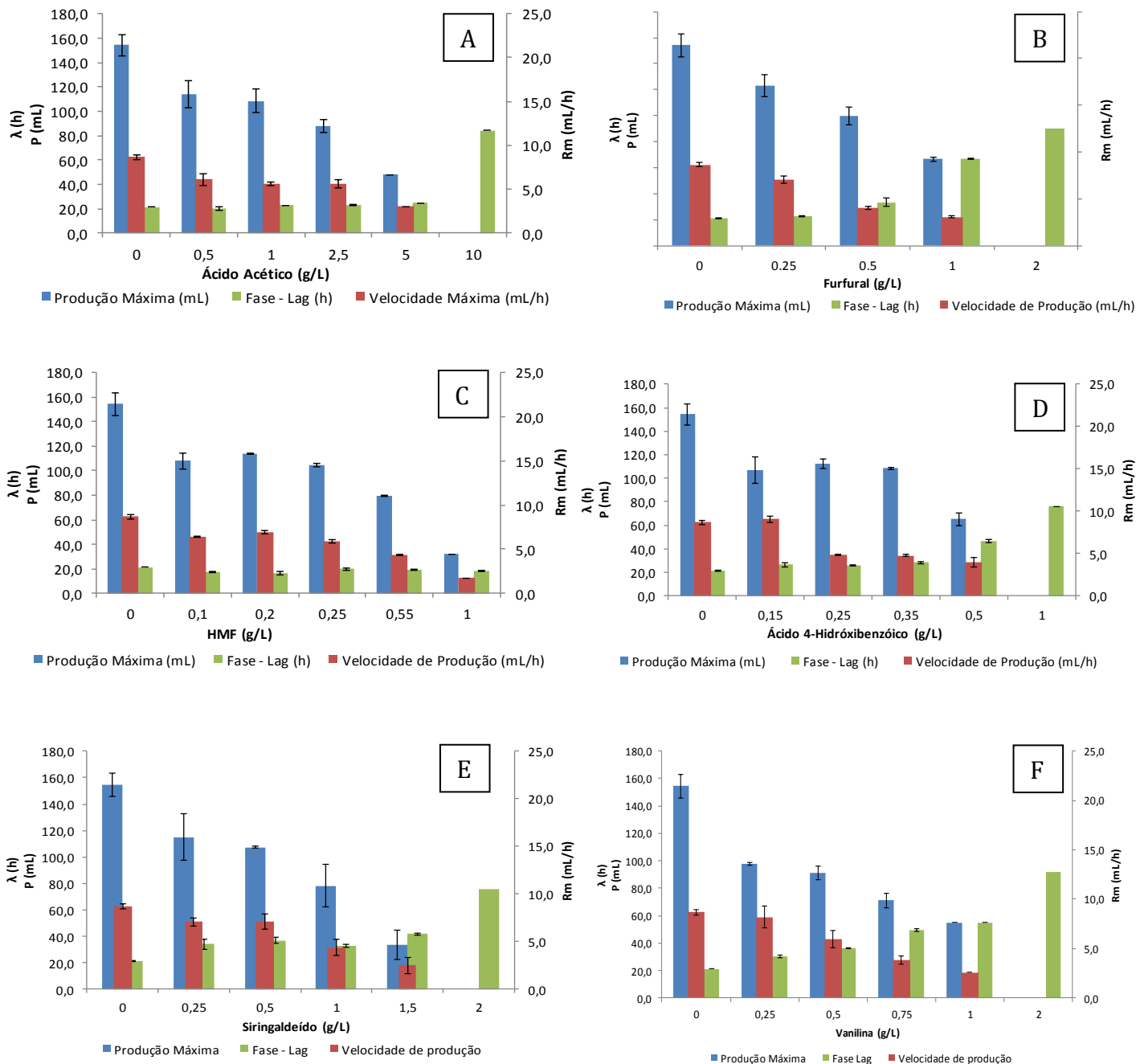


Figura 2. Constantes cinéticas do modelo de Gompertz modificado (H_{max} - potencial de produção máxima de H_2 , R_m -velocidade máxima de produção e λ -fase lag) obtidos em ensaios com a adição de diferentes concentrações de subprodutos da hidrólise de materiais lignocelulósicos. (A) Ácido Acético, (B) Furfural, (C) Hidroximetilfurfural - HMF, (D) Ácido 4 – hidroxibenzóico, (E) Siringaldeído, (F) Vanilina.

Os ensaios com a adição de 0,25, 0,5 e 1,0 g.L⁻¹ de Furfural (Figura 2-B) e HMF (Figura 2-C) causaram uma diminuição de 20, 35 e 57% na produção acumulada de H_2 e de 18, 53 e 64 % na velocidade de produção de H_2 em relação ao controle em concentrações para o furfural e uma

diminuição de 32, 48 e 72% e 32, 50 e 80% na produção máxima acumulada e velocidade de produção, respectivamente, de HMF. Em relação à fase lag houve um aumento de 12 e 45 horas pela adição de 0,5 e 1 g.L⁻¹ de furfural em relação ao controle, porém, para todas concentrações de HMF não houve significativa alteração na fase lag. Em concentração de furfural superiores a 2 g.L⁻¹ não foi observada produção de H₂. Em estudos com leveduras o furfural apresentou maior inibição da fermentação quando comparado ao HMF (Sakai *et al.*, 2007). Em contrapartida Cao *et al.* (2010) utilizando cultura pura *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* W16 observou de 50,2 e de 17,9% na produção de H₂ na presença de 1 g.L⁻¹ furfural e HMF, respectivamente. Para cultura mistas Quéméneur *et al.* (2011) encontrou diminuições similares a 70 e 76% no de produção de H₂ para concentração de 1 g.L⁻¹ de furfural e HMF, respectivamente, usando solução de xilose como substrato.

A Figura 2(D), (E) e (F) mostra o efeito da adição dos derivados da lignina, ou seja, do ácido 4-hidroxibenzoico, do siringaldeído e da vanilina, sobre os parâmetros cinéticos de produção de H₂, respectivamente. Como pode ser observada na Figura 2(E), a adição de 0,5; 1,0 e 1,5 g.L⁻¹ de siringaldeído promoveu uma inibição de 30, 50 e 78% do potencial máximo de produção de H₂ em relação ao controle. A inibição observada neste estudo para a concentração de 1 g.L⁻¹ de siringaldeído foi superior à relatada por Quéméneur *et al.* (2011), Cao *et al.* (2010) e Tai *et al.* (2010), de 22,9; 23,1 e 34,8%, respectivamente, para esta mesma concentração do inibidor. Porém, este valor é similar ao reportado por Ezeji *et al.* (2007) que observou uma inibição de 33% pela adição de 0,6 g.L⁻¹. A vanilina (Figura 2F) apresentou uma inibição maior do que o siringaldeído, pois em concentrações de 0,5; 0,75 e 1 g.L⁻¹ a inibição do potencial máximo de produção de H₂ foi de 41, 54 e 64%, respectivamente. Em concentrações superiores a 1,0 g.L⁻¹ de vanilina foi observado 100% de inibição. Com relação à fase lag a mesma concentração de 1 g.L⁻¹ de siringaldeído e vanilina causaram um aumento de 11 e 34 h, em relação ao controle, respectivamente. Há pouca informação na literatura sobre os efeitos inibitórios do ácido 4-hidroxibenzoico (Figura 2D), mas nesse estudo fica evidente a sua importância como inibidor dentre os compostos fenólicos derivados de material lignocelulósicos. A Figura 1D mostra que a adição de baixas concentrações deste composto, 0,35 e 0,5 g.L⁻¹, ocasionou a diminuição do P em 30% e 58%, respectivamente. Para a velocidade de produção a concentração de 0,5 g.L⁻¹ ocasionou a diminuição de 54% em relação ao controle. Concentrações acima de 1 g.L⁻¹ inibiram completamente a produção de H₂.

A atividade relativa é normalmente utilizada para quantificar a inibição causada por algum composto em relação ao controle. Essa inibição pode ser expressa por um índice denominado C_{I,50}, que representa a concentração de inibidor na qual a velocidade máxima de produção é reduzida em 50%. A Tabela 1 apresenta os valores de C_{I,50} dos subprodutos da hidrólise de materiais lignocelulósicos na produção de H₂ por fermentação.

Tabela 1. Valores de C_{I,50} para os diferentes subprodutos da hidrólise de materiais lignocelulósicos sobre a produção de H₂ pela cultura mista estudada.

C _{I,50}	Ácido acético	Furfural	HMF	Ácido 4-hidroxibenzoico	Siringaldeído	Vanilina
(g.L ⁻¹)	3,75	0,35	0,54	0,25	1,2	0,62

A presença de ácidos orgânicos no meio causa dificuldades na manutenção do pH, levando a diminuição do pH intracelular, principalmente se o ácido se encontrar na forma não ionizada. A $C_{1,50}$ para o ácido acético encontrada neste trabalho foi de $3,75 \text{ g.L}^{-1}$, a qual é cerca de 5 vezes menor do que a relatada por Xian-Jun e Yu (2004) e aproximadamente 3 vezes menor do que a encontrada por Wang et al (2008) para culturas mistas.

Os compostos fenólicos são conhecidos por perturbarem a integridade da membrana celular, alterando sua permeabilidade. Segundo Clark e Mackie (1984) propõem que a toxicidade dos compostos fenólicos sobre a fermentação (alcoólica) tem relação com a massa molecular, de maneira que os compostos de menor massa possuem maior permeabilidade, logo, são mais tóxicos. Segundo os valores de $C_{1,50}$ da Tabela 1 a ordem crescente de inibição dos compostos fenólicos é siringaldeído < vanilina < 4-hidroxibenzóico, os quais possuem massas moleculares de 182,17; 152,15 e 138,12 g.mol^{-1} , respectivamente, validando a hipótese proposta pelos autores anteriormente citados.

HMF e furfural tem ação citotóxica, causando inativação da replicação celular, morte ou podem induzir uma fase de latência prolongada (Heer e Sauer, 2008). Os ensaios mostraram uma $C_{1,50}$ menor para o furfural do que para o HMF (Tabela 1), revelando ser este um inibidor mais potente do que o HMF sobre a produção de H_2 por fermentação pela cultura mista estudada. Segundo Mills *et al.*, 2009 a taxa de difusão celular, ou seja, a lipoficidade dos derivados de furano é inversamente relacionada com a o peso molecular, ou seja, menor para o furfural do que para o HMF, o que explicaria menor inibição observada para o HMF.

4. CONCLUSÕES

Esse trabalho revela que os compostos derivados de materiais lignocelulósicos inibem a produção de H_2 por fermentação pela cultura mista estudada. Dentre todos os inibidores testados o ácido 4-hidroxibenzóico foi o mais tóxico, seguido pelo furfural, HMF, vanilina, siringaldeído e o ácido acético. Assim, pode-se concluir que a produção de H_2 utilizando hidrolisados de materiais lignocelulósicos como substrato, pode ser inibida pela presença dos subprodutos gerados na hidrólise.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

APHA, AWWA, WEF. Standard methods for the examination of water and wastewater. 19th. edn. *American Public Health Association*. Washington, DC, 1995.

CAO, G.L.; REN, N.Q.; WANG, A.J.; GUO, W.Q.; XU J.F.; LIU B.F. Effect of lignocellulose-derived inhibitors on growth and hydrogen production by *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* W16. *Int J Hydrogen Energy* 2010.

CLARK, T., MACKIE, K.L. Fermentation inhibitors in wood hydrolysates derived from the softwood *Pinus radiata*. *J. Chem. Biotechnol* 1984.

DAS, D.; VERZIROGLU, T.N. Hydrogen production by biological processes: a survey of literature. *International Journal of Hydrogen Energy*, 26(1): 13-28, 2008.

EZEJI, T.; QURESHI, N.; BLASCHEK H.P.; Butanol production from agricultural residues: impact of degradation products on *Clostridium beijerinckii* growth and butanol fermentation. *Biotechnol Bioeng* 2007.

GONZALEZ-GIL, G.; KLEEREBEZEM, R.; LETTINGA, G. Assessment of metabolic properties and kinetic parameters of methanogenic sludge by on-line methane production rate measurements. *Appl Microbiol Biotechnol* 58: 248–254,2002.

LI, C.L. E FANG H.H.P. “Fermentative hydrogen production from wastewater and solid wastes by mixed cultures.” *Environmental Science Technology*, 2007: 1-39.

MILLS, T.Y.; SANDOVAL, N.R.; GILL, R.T.; Cellulosic hydrolysate toxicity and tolerance mechanisms in *Escherichia coli*. *Biotechnol Biofuels* 2009.

QI, Z.; PENGFEI, Z.J. PEI.; D.W. Relationships between cellulosic biomass particle size and enzymatic hydrolysis sugar yield: Analysis of inconsistent reports in the literature. *Renewable Energy* 60 (2013).

LI, Q.; LIU, C. Co-culture of *Clostridium thermocellum* and *Clostridium thermosaccharolyticum* for enhancing hydrogen production via thermophilic fermentation of cornstalk waste. *International Journal of Hydrogen Energy*

SAKAI, S.; TSUCHIDA, Y.; OKINO, S.; ICHIHASHI, O.; KAWAGUCHI, H.; WATANABE T. Effect of lignocellulose-derived inhibitors on growth of and ethanol production by growth-arrested *Corynebacterium glutamicum* R. *Appl Environ Microbiol* 2007.

REN N.Q, WANG A.J, CAO G.L, XU J.F, GAO L.F. Bioconversion of lignocellulosic biomass to hydrogen: potential and challenges. **Biotechnol Adv**, 2009.

TAI, J.; ADAV, S.S.; SU, A.; LEE D.J. Biological hydrogen production from phenol-containing wastewater using *Clostridium butyricum*. *Int J Hydrogen Energy* 2010.

ZHENG, X. J.; YU, H. G. Inhibitory effects of butyrate on biological hydrogen production with mixed anaerobic cultures. *Journal of Environmental Management* 2005.

WANG, Y.; ZHAOA, Q. B.; YANG, M.; YUA, H.Q.; HARADAB, H.; LIB, Y.Y. Biohydrogen production with mixed anaerobic cultures in the presence of high-concentration acetate. *Int J Hydrogen Energy* 2008