

Consumo de açúcares e ácido acético durante a destoxificação biológica de hidrolisado hemicelulósico pela levedura *Issatchenkia occidentalis* M1

Bruna Caroline Marques Gonçalves¹, Jéssica Yumi Ferreira Murakami de Jesus¹, Luiz Henrique Bordini Peron¹, Wagner Luiz da Costa Freitas¹, Fernando Carlos Pagnocca², Silvio Silvério da Silva¹

¹ Escola de Engenharia de Lorena/Universidade de São Paulo – Departamento de Biotecnologia
Endereço: Rodovia Itajubá-Lorena, Km 74,5, Campinho – Caixa Postal 116 CEP 12602-810 Lorena – SP
E-mail: (brunacaroline@usp.br)

² Universidade Estadual Paulista Júlio Mesquita – Centro de Estudos de Insetos Sociais
Caixa Postal 199, CEP 13506-900 Rio Claro – SP

RESUMO

*O pré-tratamento ácido da biomassa lignocelulósica é uma etapa fundamental para a obtenção do hidrolisado hemicelulósico, rico em pentoses. Neste processo são gerados compostos inibidores do metabolismo microbiano, como o ácido acético, que devem ser removidos do hidrolisado para melhorar a sua fermentabilidade. Foi avaliada a influência da concentração celular no metabolismo de açúcares e ácido acético pela levedura *I. occidentalis* M1 durante o processo de destoxificação. Foram realizados quatro cultivos variando a concentração do inóculo de 0,1 a 1,5 g/L, a 30 °C e 300 rpm durante 96 h. Houve um consumo total de glicose e de ácido acético, parcial de xilose (30%) e produção de xilitol até o final do processo de destoxificação. Pode-se concluir que esta levedura apresenta potencial aplicação no processo de destoxificação biológica, uma vez que metabolizou totalmente o ácido acético presente no hidrolisado hemicelulósico com baixo consumo de xilose.*

Palavras-chave: inibidores, biodestoxificação, bagaço de cana-de-açúcar, glicose.

INTRODUÇÃO

O etanol de segunda geração é uma alternativa promissora para a substituição de combustíveis fósseis, devido a problemas ambientais relacionados ao uso de derivados do petróleo. Para tanto, materiais lignocelulósicos, como o bagaço de cana-de-açúcar, têm sido utilizados para a obtenção deste álcool e de outros produtos de alto valor agregado ¹.

Uma etapa fundamental para a obtenção de etanol de biomassa é o pré-tratamento, no qual geralmente é gerado um hidrolisado rico em pentoses e um sólido contendo celulignina². A hidrólise ácida é o pré-tratamento mais empregado, embora apresente como desvantagem a geração de compostos de degradação, como o ácido acético, um ácido alifático formado a partir dos radicais acetil presentes na estrutura da hemicelulose, e que promove a redução do pH intracelular. Para evitar esta acidificação a célula consome moléculas de ATP que seriam destinadas à proliferação da biomassa ³.

A destoxificação do hidrolisado é um processo fundamental na conversão de açúcares a etanol. Embora métodos físicos e químicos possam ser utilizados, a destoxificação biológica, realizada por leveduras capazes de metabolizar os inibidores vem atraindo a atenção de

pesquisadores pela ausência do emprego de produtos químicos tóxicos e corrosivos, pela baixa demanda energética requerida e por ser considerada uma tecnologia limpa ^{4,5}. O consumo de açúcares por estes microrganismos deve ser baixo, assegurando altos rendimentos de etanol em um pequeno tempo de fermentação.

Este trabalho teve como objetivo a avaliação do consumo dos açúcares glicose, arabinose e xilose e acompanhamento do consumo de ácido acético pela levedura *I. occidentalis* M1 durante a destoxificação biológica de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar (HHBCA).

MATERIAL E MÉTODOS

O bagaço de cana-de-açúcar com 10% de umidade foi pré-tratado com ácido sulfúrico diluído em reator tipo tambor rotativo vertical a 121°C durante 10 min para a obtenção do HHBCA que, após filtração foi concentrado cinco vezes em evaporador à vácuo a 70°C, para aumentar a concentração total de açúcares.

A levedura *I. occidentalis* M1 foi crescida em meio Ágar Sabouraud 2% (Labsynth) pelo método Ágar Plate e incubada em estufa incubadora a 30°C durante 48 h. O inóculo foi crescido em meio YPD contendo (g/L): extrato de levedura, 10; peptona, 20 e glicose, 20 ⁵. A água destilada, a solução de peptona, a solução de glicose e a de extrato de levedura foram autoclavadas separadamente a 110°C durante 15 min, misturadas assepticamente em 1 frasco Erlenmeyer de 1000 mL, com volume de trabalho de 400 mL onde as células foram acrescidas. O cultivo foi realizado a 30°C e 200 rpm durante 48 h em agitador rotatório (New Brunswick Scientific – Edison, N.J., U.S.A.). Após este tempo, o cultivo foi interrompido e submetido à centrifugação a 2600 x g durante 20 min. O sobrenadante foi descartado e as células foram lavadas com solução salina estéril (NaCl 0,9%). A concentração celular foi determinada por leituras de absorvância a 600 nm em espectrofotômetro (Biospectro SP-220) e os valores obtidos foram relacionados com a respectiva curva padrão, previamente estabelecida.

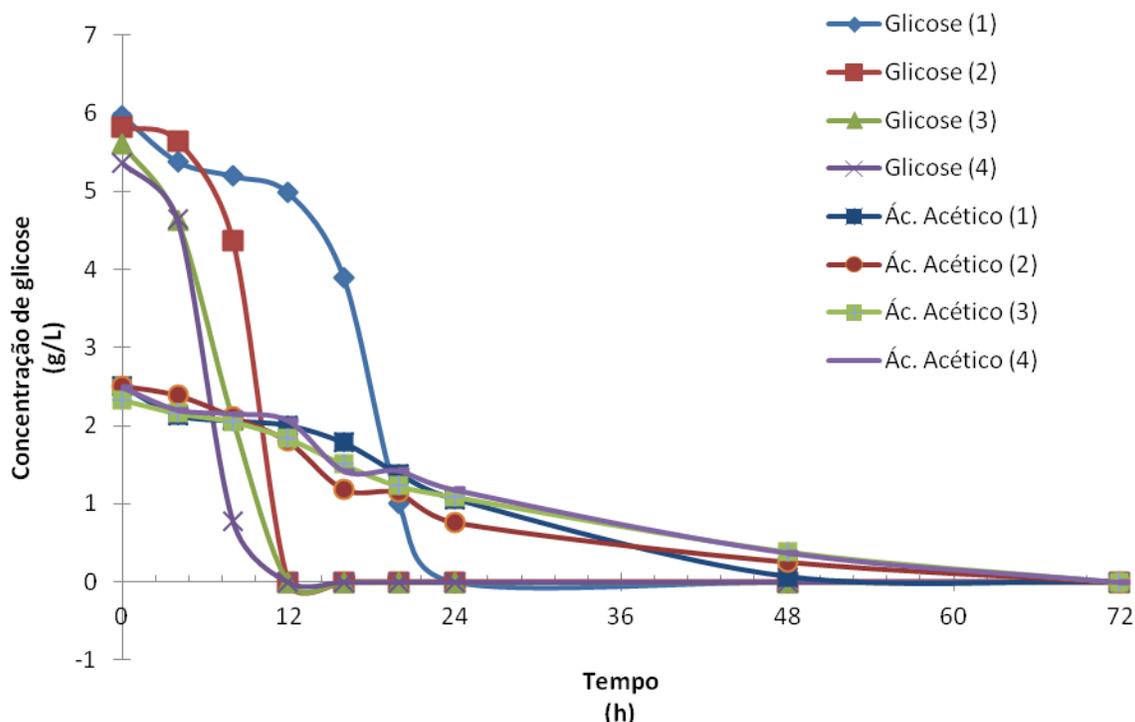
O pH do HHBCA concentrado foi ajustado com NaOH para 4,7 e então autoclavado a 110°C durante 15 min, centrifugado a 2600 x g por 20 min para remoção dos sólidos suspensos, suplementado com extrato de levedura (20 g/L) e peptona (20g/L) e então o mesmo foi distribuído em frascos Erlenmeyers de 125 mL, com volume de trabalho de 55 mL. Foram realizados quatro cultivos com diferentes concentrações de inóculo (0,1; 0,5; 1,0 e 1,5 g/L de células). Os testes de destoxificação biológica foram conduzidos a 30°C e 300 rpm, durante 96 h com retirada periódica de amostra.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com os resultados, de uma forma geral, a concentração do inóculo não influenciou o comportamento da levedura. Foi observado que a glicose e o ácido acético foram rapidamente consumidos durante as primeiras 12 h e 48 h de fermentação, respectivamente (Figura 1). Por outro lado houve consumo de apenas 30 % de xilose ao final do processo em todas as fermentações. Não foi observado consumo de arabinose e houve produção de xilitol após 72 h, que variou nos ensaios entre 6,05 a 7,04 g/L ao final de 96 h. A produção de xilitol é uma possível característica desta linhagem nas condições de aeração empregadas.

Embora a glicose tenha sido totalmente consumida durante as primeiras 24 h de destoxificação, a concentração celular influenciou a velocidade do consumo, que foi proporcional à concentração de células (Figura 1). No meio de cultivo inoculado com 0,1 g/L a glicose foi lentamente consumida durante 24 h, enquanto nos demais ensaios o consumo foi observado durante as primeiras 12 h de destoxificação, com variações da proporção em função da quantidade de células, de modo que no tempo 8 h a concentração de glicose observada para os meios contendo 0,5; 1,0 e 1,5 g/L de células foi 4,37; 2,08 e 0,78 g/L respectivamente. A velocidade do consumo de xilose não foi acentuada, variando entre 23,30 a 30,02% ao final de 96 h, e nas primeiras 24 h o consumo médio deste açúcar foi de 15%.

Figura 1. Perfil do consumo de glicose e ácido acético durante o processo de destoxificação biológica de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar inoculado com diferentes concentrações de levedura *Issatchenkia occidentalis* M1.



* (1): meio de cultivo inoculado com 0,1 g/L de células; (2): meio de cultivo inoculado com 0,5 g/L de células; (3): meio de cultivo inoculado com 1,0 g/L de células; (4): meio de cultivo inoculado com 1,5 g/L de células.

Estes resultados tornam esta cepa interessante para a aplicação na destoxificação biológica de hidrolisado hemicelulósico, pois mantém a xilose disponível para a fermentação alcoólica após o metabolismo do ácido acético. Estes resultados corroboram com os de Soares, 2012⁶, entretanto pequenas diferenças são observadas no consumo de açúcares em função das diferentes condições nutricionais empregadas.

CONCLUSÕES

A análise dos dados permite concluir que a levedura *I. occidentalis* M1 é uma cepa promissora para o uso em processos de destoxificação biológica de hidrolisado hemicelulósico, uma vez que apresentou baixo consumo de açúcares e assimilou compostos inibidores.

Considerando o desempenho da levedura, a variação da concentração celular não foi efetiva durante o processo de destoxificação, desta forma indica-se a concentração de 0,5 g/L de células, uma vez que apresentou boa velocidade de proliferação celular com o mesmo desempenho dos inóculos mais concentrados.

AGRADECIMENTOS

Os autores deste trabalho agradecem o apoio financeiro das agencias de fomento CAPES e FAPESP.

REFERÊNCIAS

- (1) CARDONA, C. A.; QUINTERO, J. A.; PAZ, I. C. Production of bioethanol from sugarcane bagasse: Status and perspectives. **Bioresource Technology**, v. 101, p.4754-4766, 2010. SILVA, R. M.; ALVES, R. N. **Fermentação Alcoólica**, Editora Novo Mundo, Brasil, 1997.
- (2) DEMIRBAS, A. Bioethanol from Cellulosic Materials: A Renewable Motor Fuel from Biomass. **Energy Sources**, v.27, p.327-337, 2005.
- (3) HOLYOAK, C. D.; STRATFORD, M.; McMULLIN, Z.; COLE, M. B.; CRIMMINS, K.; BROWN, A. J. P.; COOTE, P. J. Activity of the Plasma Membrane H⁺-ATPase and Optimal Glycolytic Flux Are Required for Rapid Adaptation and Growth of *Saccharomyces cerevisiae* in the Presence of the Weak-Acid Preservative Sorbic Acid. **Applied and Environmental Microbiology**, v.62, n.9, p.3158-3164, 1996.
- (4) PARAWIRA, W.; TEKERE, M. Biotechnological strategies to overcome inhibitors in lignocellulose hydrolysates for ethanol production: review. **Critical Reviews in Biotechnology**, p.1-12, 2010.
- (5) LÓPEZ, M. J.; NICHOLS, N. N.; DIEN, B. S.; MORENO, J. BOTHAST, R. J. Isolation of microorganisms for biological detoxification of lignocellulosic hydrolysates. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 64, p. 125-131, 2004.
- (6) SOARES, L. C. S. R. Destoxificação biológica do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar para utilização em processos fermentativos. **Dissertação de mestrado**, Universidade de São Paulo, Lorena, Brasil, 2012.