



19 a 22 de outubro de 2014
Florianópolis/SC

Estudo da inibição de HMF e furfural na fermentação do hidrolisado de madeira de *Eucalyptus urophylla*

S. T. ALVES¹, T. F. PACHECO², C. M. M. MACHADO², BRENNO. A. D. NETO¹ e S. B. GONÇALVES²

¹ Universidade de Brasília, Instituto de Química

² Empresa Brasileira Pesquisa Agropecuária – Agroenergia, Laboratório de Processos Bioquímicos
E-mail para contato: suteixeira76@yahoo.com.br

RESUMO – Os resíduos de madeira têm se mostrado promissores para a produção de etanol lignocelulósico. Observa-se que há uma gama de estudos enfocando as etapas de pré-tratamento e hidrólise enzimática nesta área, contudo não se observa a mesma preocupação com a fermentação. Neste trabalho foi avaliada a fermentação do hidrolisado de *Eucalyptus urophylla*, obtido através de pré-tratamento físico-químico e hidrólise enzimática (Cellic® CTec2). As fermentações foram realizadas utilizando a levedura (*Saccharomyces cerevisiae*) CAT-1. Os resultados mostraram que para o meio sintético (YPG) obteve-se a eficiência máxima para a produção de etanol, contudo para o hidrolisado a eficiência foi de aproximadamente 84% e para o meio sintético com quantidades de HMF e furfural de 7×10^{-3} g/L e $2,6 \times 10^{-2}$ g/L respectivamente, foi de 91,6%. Demonstrou-se que estes inibidores reduzem a eficiência, mas que não são os únicos responsáveis pela baixa eficiência na fermentação do hidrolisado.

1. INTRODUÇÃO

A produção de etanol lignocelulósico é considerada um marco para o desenvolvimento sustentável. Embora a produção de etanol a partir da cana-de-açúcar e do amido de milho sejam tecnologias bem desenvolvidas, a biomassa lignocelulósica, como resíduos agrícolas, resíduos florestais e resíduos sólidos urbanos, representa uma fonte em potencial de matéria-prima para a produção de etanol, uma vez que é uma matéria-prima barata, abundante e sustentável, que está disponível em todo o mundo e ocorre como um subproduto, sem usos competitivos (Yanase et al., 2012).

Um dos entraves do uso destes materiais é a necessidade de um pré-tratamento que disponibilize a celulose para que a hidrólise enzimática seja efetiva. Isso se dá pela rigidez estrutural conferida pela lignina, grau de acetilação da hemicelulose e o próprio grau de polimerização e cristalinidade da celulose, que atuam como bloqueio, impedindo o acesso das enzimas celulasas (Sun e Cheng, 2002).

No entanto, estes pré-tratamentos além de formarem açúcares derivados da hidrólise e da

degradação da celulose e hemicelulose, formam, também, compostos que podem atuar como inibidores na fermentação. A natureza e concentração destes compostos dependem do tipo de biomassa pré-tratada, assim como das condições do processo (Caetano e Madaleno, 2011). Estes produtos de degradação, que são potenciais inibidores da fermentação, se agrupam em três classes: os derivados do furano; ácidos alifáticos de baixa massa molecular; e derivados fenólicos (Moon e Liu, 2012). Em função das elevadas temperaturas aplicadas nos pré-tratamentos, os açúcares produzidos na hidrólise, principalmente da hemicelulose, se degradam gerando os compostos derivados do furano: o furfural, formado a partir da degradação das pentoses (xilose e arabinose) e o 5-hidroximetilfurfural (HMF), formado como consequência da degradação das hexoses (glicose, manose e galactose) (Moon e Liu, 2012). Estes compostos derivados do furano se comportam como inibidores dos microrganismos, danificando as paredes e membranas celulares, inibindo o crescimento celular, reduzindo as atividades enzimáticas e conseqüentemente a produção de etanol (Olea et al., 2012). O presente trabalho tem como objetivo avaliar a inibição da levedura em função da presença de inibidores HMF e furfural, formados/provenientes da etapa de pré-tratamento.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Material

Para a produção dos hidrolisados lignocelulósicos foi utilizada a espécie de eucalipto *Eucalyptus urophylla*. Na hidrólise enzimática utilizou-se o complexo enzimático Cellic®CTec2, da Novozymes. A fermentação alcoólica foi realizada utilizando-se a levedura CAT-1.

2.2 Métodos

Preparo da biomassa: O material lignocelulósico que se encontrava em forma de cavacos foi processado em moinho de facas tipo Willey, modelo Macor Star FT-60, da marca Fortinox., até granulometria máxima de 3 mm.

Pré-tratamento: O material seco e moído foi pré-tratado adicionando-se ácido sulfúrico 1,5% (v/v) à biomassa, numa razão sólido/líquido de 1/10. Esta suspensão foi mantida por 30 minutos em autoclave a 121 °C. Este material foi filtrado e o sólido lavado com água. Ao sólido lavado, adicionou-se hidróxido de sódio 4% (m/v), na razão sólido/líquido de 1/10. Esta suspensão foi autoclavada por 30 minutos a 121 °C. Este material foi filtrado e o sólido retirado deste pré-tratamento lavado com água fervente. Parte da fração sólida de ambas as etapas foi reservada para a determinação de umidade do material em estufa de secagem a 105 °C e caracterização quanto ao teor de celulose e hemicelulose.

Caracterização da biomassa: O material bruto e frações sólidas obtidas nos pré-tratamentos ácido e alcalino (após secagem) passaram por caracterização química para determinar o teor de celulose e hemicelulose, segundo metodologia de hidrólise ácida adaptada de Gouveia *et al.*, 2009. As amostras foram diluídas e clarificadas em cartuchos C18 e em seguida analisadas utilizando coluna Aminex HPX 87 H e detector de índice de refração no cromatógrafo líquido de alta

eficiência – CLAE, modelo 1260 Infinity, da marca Agilent Technology.

Hidrólise enzimática: O material pré-tratado foi submetido à hidrólise enzimática empregando 15 FPU do extrato enzimático comercial Cellic®CTec2 por grama de substrato seco em tampão citrato de sódio/ácido cítrico 0,1 mol/L e pH 5,0 numa razão sólido/líquido de 1/10. A hidrólise foi realizada em Shaker orbital de bancada com incubação e refrigeração, modelo Max 4000, da marca Thermo Scientific, a 50 °C e 200 rpm por 24 horas.

Fermentação: Meio sintético: Foi utilizado o meio de cultura YPG, nas concentrações de 1, 0,5 e 10% para extrato de levedura, peptona bacteriologia e glicose respectivamente. Para o isolamento da colônia de levedura fez-se o plaqueamento com meio sólido YPG 2%. O meio de cultura e todo o material usado na fermentação foram autoclavados por 30 minutos a 121 °C. Com a técnica de plaqueamento a levedura foi isolada em colônias. Colônias isoladas de *S. cerevisiae* (CAT-1) foram inoculadas em meio rico e mantidas em shaker a 30°C e 150 rpm para propagação por 12 horas. A fermentação em meio sintético e o crescimento da levedura foram realizados em Shaker a 30 °C e 150 rpm, com inóculo de 10%. Meio hidrolisado: Após análise para obtenção da concentração de glicose presente no hidrolisado, adicionou-se glicose até que a concentração final do meio alcançasse 100 g/L. O meio hidrolisado foi inoculado com 10 g/L de levedura (CAT-1) crescida anteriormente no meio sintético e a fermentação ocorreu conforme descrito anteriormente. Meio sintético com inibidores: Com as concentrações dos inibidores furfural e HMF encontradas no hidrolisado, adicionou-se, em quantidades equivalentes, as substâncias ao meio sintético e verificou-se o comportamento da levedura. A fermentação ocorreu de forma semelhante às anteriores.

Análises: Após as etapas de pré-tratamento e da hidrólise enzimática foram feitas análises, em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), para a quantificação de inibidores e açúcares, bem como as alíquotas retiradas em cada etapa dos processos de hidrólise enzimática e de fermentação também foram analisadas pela mesma técnica. A concentração de células foi determinada através de leitura da densidade ótica em espectrofotômetro multimodal com absorvância UV/VIS, modelo Spectramax, da marca Molecular Devices, a 650 nm utilizando-se uma relação pré-estabelecida entre a concentração de células e a absorvância.

Cálculos dos parâmetros de fermentação: Os parâmetros cinéticos da fermentação foram obtidos através da utilização dos cálculos da taxa específica máxima de crescimento, dos fatores de conversão de substrato em células e em produto e da eficiência de fermentação.

Taxa específica máxima de crescimento (μ_{max}): A taxa específica de crescimento celular (μ) foi calculada pela Equação 1.

$$\mu = \frac{1}{X} \cdot \frac{dX}{dt} \quad (1)$$

Onde X é a concentração celular (g/L) e t é o tempo (minutos).

Fator de conversão de substrato em produto ($Y_{P/S}$): O fator de conversão de substrato em produto foi expresso em $g_{\text{etanol}}/g_{\text{glicose}}$, sendo calculado através da Equação 2.

$$Y_{P/S} = \frac{dP}{-dS} \quad (2)$$

Onde P é a concentração do produto (g/L) e S é a concentração de substrato (g/L).

Fator de conversão de substrato em células ($Y_{X/S}$): O fator de conversão de substrato em células foi expresso em $g_{\text{células}}/g_{\text{glicose}}$, sendo calculado através da Equação 3.

$$Y_{X/S} = \frac{dX}{-dS} \quad (3)$$

Eficiência de fermentação (E): Foi calculada com base no rendimento teórico proveniente da equação de Gay-Lussac ($51,1 g_{\text{etanol}}/100g_{\text{glicose}}$) (Ilha *et al.*, 2008), segundo a Equação 4.

$$E = Y_{P/S} \cdot 100 / 0,511 \quad (4)$$

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Caracterização química do material bruto e pré-tratado: os resultados da caracterização química da madeira em seu estado natural (bruta) e depois de passar pelas etapas de pré-tratamento ácido e do ácido seguido do alcalino são discutidos para a quantidade de celulose e hemicelulose disponibilizada após a etapa de pré-tratamento.

Na caracterização do eucalipto da espécie *Eucalyptus urophylla*, a quantidade de celulose verificada, dada pela média das análises realizadas, foi de 28%. Este valor não é compatível ao encontrado na literatura, na qual, para a mesma espécie, está na faixa de 35 a 50% (Gomide *et al.*, 2010). Para a hemicelulose, o valor encontrado foi de 8% e na literatura o valor está na faixa de 17 a 19%. Esta diferença ocorre, possivelmente, pela diferença no método utilizado na caracterização e nas variáveis como concentração do ácido sulfúrico e temperatura (Mokfienski e Gomide, 2003). Após o pré-tratamento ácido, o percentual de celulose disponibilizada foi de 32% e da hemicelulose 6%. Na etapa seguinte, alcalina, o percentual de celulose foi de 40% e a de hemicelulose de 2%.

Hidrólise enzimática: nesta etapa os resultados são restritos aos pontos inicial e final, uma vez que este estudo tem como foco principal o processo de fermentação. Por meio da curva padrão obtida no CLAE, pôde-se quantificar a glicose formada durante o processo. Obteve-se, com 24 horas de hidrólise enzimática, 20,7 g/L de glicose no meio. De acordo com a metodologia de

caracterização, o rendimento máximo esperado seria de 40,0 g/L, com isso foi observado que o rendimento médio da hidrólise foi de 59% com o pré-tratamento aplicado. Esta conversão já era esperada visto que a madeira é um material muito recalcitrante quando comparado com outras biomassas. Soma-se a isso o fato de que a proporção sólido/líquido em todas as etapas dos processos é 1:10, o que normalmente não é encontrado na literatura, que, em geral, é de 1:30 (referências). Esta proporção foi utilizada visando-se um processo em escala industrial.

Fermentação: As fermentações foram conduzidas seguindo o procedimento descrito na metodologia e apresentaram resultados muito diferentes. O comportamento quanto ao crescimento da levedura no meio sintético foi o esperado, já que é um meio rico e contém todos os nutrientes necessários para o seu desenvolvimento. O resultado do meio sintético foi usado como meio de comparação com os outros dois meios analisados, como mostra a Figura 1.

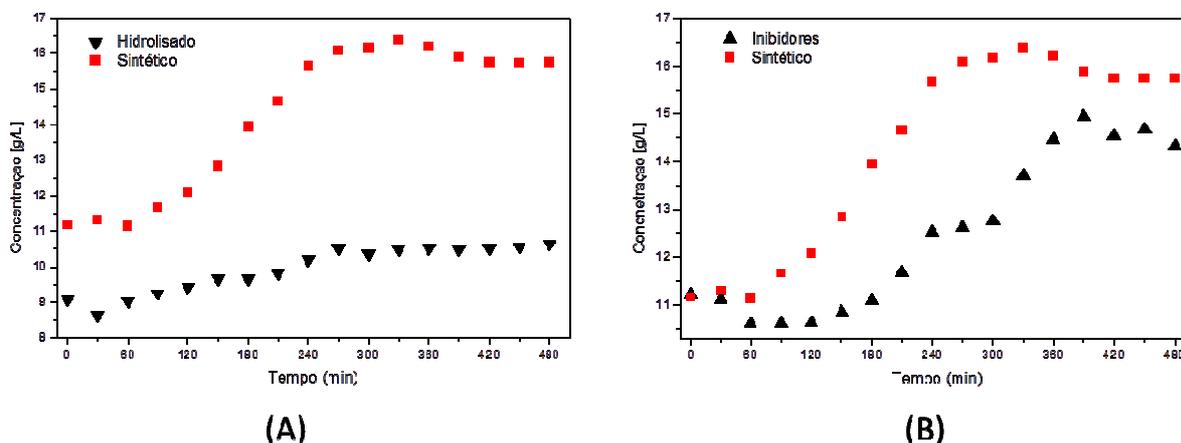


Figura 1 – Crescimento da levedura: (A) Comparação do meio sintético com o meio hidrolisado; (B) Comparação do meio sintético com o meio sintético com inibidores.

No meio sintético a fase Lag pode ser considerada curta, o que indica uma rápida adaptação dos microrganismos ao meio. Já no meio hidrolisado observa-se a não adaptação e um crescimento muito lento da levedura, Figura 1 (A). Isso fica evidente ao se comparar os fatores de conversão de substratos em células ($Y_{X/S}$) nos dois meios. No meio sintético a levedura apresentou o fator de conversão de 0,051 $g_{célula}/g_{glicose}$ com um desvio padrão médio de $\pm 0,005$ e no meio hidrolisado apresentou 0,023 $g_{célula}/g_{glicose}$ com desvio padrão de $\pm 0,003$, em valores absolutos podemos afirmar que o fator de conversão no meio hidrolisado é quase metade do meio sintético, mostrando realmente que a levedura não se adaptou ao meio hidrolisado. Diante destes resultados foi analisada a presença dos inibidores furfural e HMF no hidrolisado, e encontrou-se concentrações de 0,026 g/L para o furfural e 0,007 g/L para o HMF. De posse destas concentrações, estes compostos foram adicionados ao meio sintético e verificou-se que a levedura não se desenvolveu como no meio sintético sem inibidores, conforme mostra a Figura 1 (B). Ao compararmos os fatores de conversão do meio sintético ($Y_{X/S} = 0,051 g_{célula}/g_{glicose}$) e do meio

hidrolisado ($Y_{X/S} = 0,023 \text{ g}_{\text{célula}}/\text{g}_{\text{glicose}}$) com o meio contendo inibidores, $Y_{X/S} = 0,033 \pm 0,007 \text{ g}_{\text{célula}}/\text{g}_{\text{glicose}}$, verificou-se que o aumento na concentração de células no meio sintético com a presença de inibidores foi de 28%, e se compararmos com o meio sintético puro que foi de 41% e com o meio hidrolisado que foi de 17% constatamos que houve uma queda em relação ao meio padrão, mas um aumento em relação ao meio hidrolisado.

O fato de a levedura ter se desenvolvido, mesmo que precariamente, na presença de inibidores deve-se as concentrações dos compostos inibidores presentes no hidrolisado serem muito baixas, pois na literatura a concentração para inibir o crescimento de microrganismos pode variar, dependendo da biomassa e do pré-tratamento que foi empregado (Almeida *et al*, 2009). Para o furfural, a concentração encontrada foi de 0,4 g/L para o Abeto (árvore conífera do gênero *Abies* da família *Pinaceae*) (Rudolf *et al*, 2004), enquanto que para a cana-de-açúcar e bagaço de cana-de-açúcar 2,22 g/L (Neureiter *et al*, 2002). Para o HMF a menor concentração encontrada foi de 0,06 g/L para a palha de milho (Öhgren *et al*, 2005) e a maior foi de 3,0 g/L para o abeto (Rudolf *et al*, 2005).

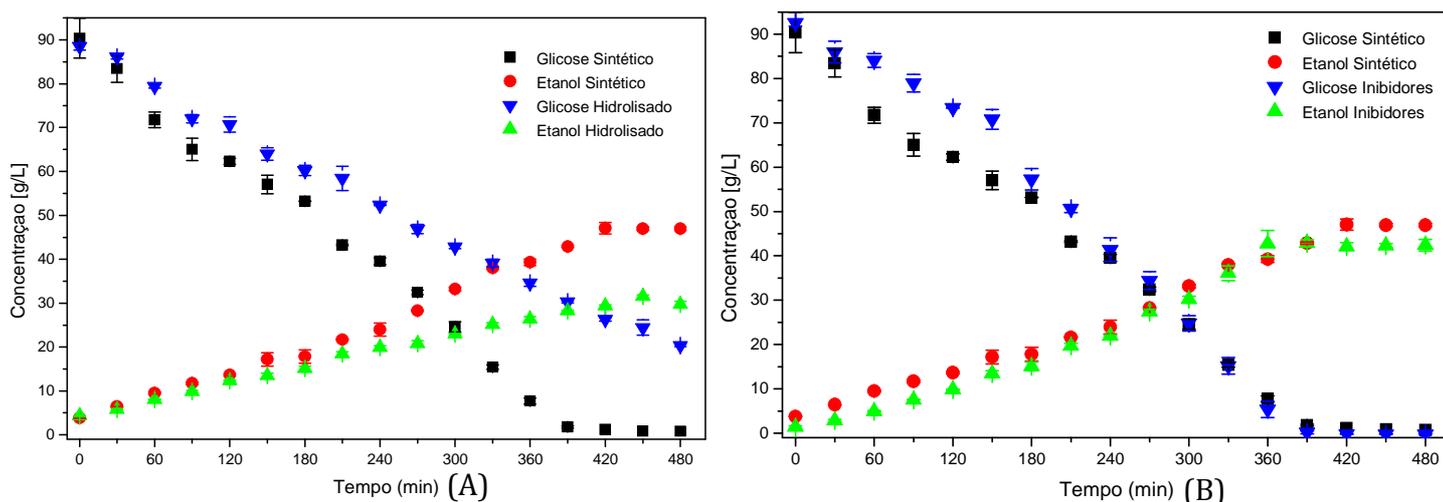


Figura 2 – Produção de etanol: (A) Comparação do meio sintético com o meio hidrolisado; (B) Comparação do meio sintético com o meio sintético com inibidores.

Os resultados apresentados na Figura 2 nos permitem os cálculos dos parâmetros cinéticos da fermentação, comprovando a diferença no comportamento da levedura nos meios analisados. Para a taxa específica máxima de crescimento microbiano (μ_{max}) encontraram-se os seguintes resultados no meio sintético, hidrolisado e sintético com inibidores, respectivamente: $1,7 \times 10^{-3} \text{ g/h}^{-1}$, $0,5 \times 10^{-3} \text{ g/h}^{-1}$ e $1,1 \times 10^{-3} \text{ g/h}^{-1}$. Já o fator de conversão de substrato em produto ($Y_{P/S}$) os resultados foram, respectivamente, $0,48 \text{ g}_{\text{etanol}}/\text{g}_{\text{glicose}}$, $0,37 \text{ g}_{\text{etanol}}/\text{g}_{\text{glicose}}$ e $0,44 \text{ g}_{\text{etanol}}/\text{g}_{\text{glicose}}$, e por último, a eficiência da fermentação (E) foi de 94%, 72% e 86%.

Os resultados do meio sintético com a presença dos compostos furfural e HMF foram bem próximos aos resultados do meio sintético puro. Contudo, é notável que a levedura não tenha apresentado a sua melhor conversão como no meio sintético puro e isso pode ser atribuído ao

estresse que foi submetido pela presença destes compostos. E verificou-se que houve uma diminuição na via metabólica da levedura, o que acarretou uma queda na concentração final do produto no meio.

4. CONCLUSÃO

Os resultados mostram que a fermentação do hidrolisado de eucalipto apresenta eficiência muito aquém do desejado, contudo foi observado que o meio sintético com inibidores apresenta eficiência muito próxima ao meio sintético, demonstrando que a presença dos inibidores, HMF e furfural, alteram o metabolismo da levedura, mas que não são os únicos responsáveis pela baixa eficiência na fermentação do hidrolisado de madeira.

5. REFERÊNCIAS

ALMEIDA, J. RM.; BERLILSSON, M.; GORWA-GRAUSLUND, M. F.; GORSICH, S.; LIDÉN, G. Metabolic effects of furaldehydes and impacts on biotechnological processes. *Appl Microbiol Biotechnol.*, v. 82, p. 625-638, 2009.

CAETANO, A.C.G.; MADALENO, L.L. Controle de contaminantes bacterianos na fermentação alcoólica com a aplicação de biocidas naturais. *Ciência & Tecnologia*, v. 2, p. 27-37, 2011.

GOMIDE, J. L.; NETO, H. F.; REGAZZI, A. J. Análise de critérios de qualidade da madeira de eucalipto para produção de celulose kraft. *R. Árvore.*, v. 34, p. 339-344, 2010.

MOKFIENSKI, A.; GOMIDE, J. L. Colóquio Internacional sobre Celulose Kraft de Eucalipto. v. *único*, 5, 2003.

MOON, J.; LIU, Z.L. Engineered NADH-dependent GRE2 from *Saccharomyces cerevisiae* by directed enzyme evolution enhances HMF reduction using additional cofactor NADPH. *Enz. and Microbial Technol.*, v. 50, p. 115-120, 2012.

NEUREITER, M.; DANNER, H.; THOMASSER, C.; SAIDI, B.; BRAUN, R. Dilute-acid hydrolysis of sugarcane bagasse at varying conditions. *Appl Biochem Biotechnol.*, v. 98, p. 49-58, 2002.

ÖHGREN, K.; GALBE, M.; ZACCHI, G. Optimization of steam pretreatment of SO₂-impregnated corn for fuel ethanol production. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, v. 124, p. 1055-1067, 2005.

OLEA, E.H.; CARRILLO, E.P.; SALDÍVAR, S.O.S. Effects of different acid hydrolyses on the conversion of sweet sorghum bagasse into C5 and C6 sugars and yeast inhibitors using response surface methodology. *Bioresour. Technol.*, v. 119, p. 216-223, 2012.

RUDOLF, A.; ALKASRAWI, M.; ZACCHI, G.; LIDÉN, G. A comparison between batch and fed-batch simultaneous saccharification and fermentation of steam pretreated spruce. *Enz. Microb. Technol.*, v. 37, p. 195-204, 2005.

RUDOLF, A.; GALBE, M.; LIDÉN, G. Controlled fed-batch fermentations of dilute-acid

hydrolysate in pilot development unit scale. *Appl Biochem Biotechnol.*, v. 114, p. 601-617, 2004.

SUN, Y.; CHENG, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresour. Technol.*, v. 83, p. 1-11, 2002.

YANASE, H.; MITSUGU, H.; SAKURAI, M.; KAWAKAMI, A.; MATSUMOTO, M.; HAGA, K.; KOJIMA, M.; OKAMOTO, K. Ethanol production from wood hydrolysate using genetically engineered *Zymomonas mobilis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v. 94, p. 1667-1678, 2012.

ZHAO, H.; JONES, C. L.; BAKER, G. A.; XIA, S.; OLUBAJO, O.; PERSON, V. N. Regenerating cellulose from ionic liquids for an accelerated enzymatic hydrolysis. *J. Biotechnol.*, v. 139, p. 47-54, 2009.