

Avaliação da adaptação de *Spathaspora passalidarum* na fermentação de frações hemicelulósicas

Breno R. Machado^{2*}, Sílvia B. Gonçalves¹, João Ricardo M. de Almeida¹ e Thályta F. Pacheco^{1**}

Introdução

A viabilidade do etanol lignocelulósico depende também do aproveitamento eficiente da fração hemicelulósica da biomassa que, em base seca, corresponde de 20 a 40% do material. Esta fração é constituída de diferentes carboidratos, majoritariamente pentoses (xilose em sua maior parte) e pequena fração de hexoses. A levedura *Saccharomyces cerevisiae*, utilizada na produção comercial de etanol, não é capaz de consumir pentoses. Esses açúcares são fermentados por outras espécies de leveduras. *Spathaspora passalidarum*, avaliada neste trabalho, apresenta rápido crescimento e habilidade de consumir xilose após completo consumo da glicose do meio. Assim, a utilização da *S. passalidarum* se torna promissora para a produção de etanol a partir de fração hemicelulósica (NGUYEN et al., 2006). A utilização da fração hemicelulósica da biomassa para fermentação está condicionada ao uso de estratégias que superem o efeito de inibição de seus compostos tóxicos. A técnica escolhida foi a aclimação do microrganismo, que se baseia no cultivo sucessivo do microrganismo em concentrações crescentes dos compostos tóxicos (PROMPT, 2012; CARNEIRO, 2011). Neste contexto, o trabalho tem como objetivo avaliar e melhorar o desempenho da produção de etanol empregando *S. passalidarum* em hidrolisados hemicelulósicos de bagaço de cana-de-açúcar, obtidos por pré-tratamento ácido e por explosão a vapor. Foi utilizada estratégia de aclimação da levedura.

Métodos

Pré-tratamento: O pré-tratamento ácido do bagaço de cana-de-açúcar foi feito com ácido sulfúrico, em condições previamente estabelecidas. A fração líquida, contendo as pentoses recuperadas, teve o pH ajustado até 4,7 foi centrifugada e autoclavada. A fração hemicelulósica, obtida por explosão a vapor, foi cedida pelo CTBE e diluída 2,5 vezes para obtenção da mesma concentração de ácido acético do pré-tratamento ácido (3,75 g/L). Ambos foram suplementados com 6,7 g/L de YNB e até 50 g/L de xilose.

1 Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa Agroenergia, PqEB, Av. W3 Norte (final), Brasília/DF, Brasil, 70770-901;

2 Universidade de Brasília – UnB, Departamento de Engenharia Química

*breno.celestino@colaborador.embrapa.br; **thalyta.pacheco@embrapa.br

Fermentação sem adaptação da levedura: *S. passalidarum* propagada em meio rico (YPX 10%) foi inoculada, numa concentração de 15 g/L, nas frações hemicelulósicas.

Adaptação da levedura: uma colônia foi inoculada em meio rico. Antes que ocorresse todo o consumo de xilose do meio, a levedura foi centrifugada e inoculada em um meio com 20% de fração hemicelulósica e 80% de YPX. Foram feitas transferências sucessivas das células para meios com concentrações crescentes de hidrolisado, até que o último meio tivesse 80% de hidrolisado e 20% de YPX. Todo o procedimento de aclimação ocorreu em 5 ciclos, para os quais foram monitoradas as concentrações de células, açúcares e produtos. O procedimento foi realizado separadamente para o hidrolisado de pré-tratamento ácido e de explosão a vapor.

Fermentação das frações hemicelulósicas com as leveduras adaptadas: A levedura aclimatada foi inoculada nos hidrolisados, numa concentração de 15 g/L. Para a verificação da adaptação, para o caso do pré-tratamento ácido, a cepa fermentada foi plaqueada, propagada em meio rico e inoculada novamente em meio hidrolisado. Todas as fermentações foram conduzidas em triplicata, em shaker rotativo, a 30°C e 150 rpm, com retirada periódica de alíquotas. As concentrações de açúcares e produtos foram determinadas por cromatografia líquida em coluna Aminex HPX 87H.

Resultados e Conclusões

Fermentação sem adaptação da levedura: Para o hidrolisado de pré-tratamento ácido, até 120 horas de fermentação, foram consumidos 0,4 g/L de glicose e 2,5 g/L de xilose, sem formação de etanol. Para o hidrolisado de explosão a vapor, não houve consumo de nenhum dos açúcares do meio, indicando que a levedura não está adaptada às condições dos hidrolisados.

Fermentação das frações hemicelulósicas com as leveduras adaptadas: para o hidrolisado de pré-tratamento ácido, a glicose foi consumida em 4 horas de fermentação e a xilose em 48 horas. Foram produzidos 19,64 g/L de etanol, correspondente a um fator de conversão de substrato em etanol de 0,404 g de etanol/g de açúcar, produtividade de 0,357 g de etanol/L.h e velocidade de consumo de substrato de 0,884 g de açúcar/h. A levedura apresentou ligeiro crescimento e viabilidade final de 76,3%. Na verificação da aclimação, após propagação em meio rico, o consumo de açúcares fermentescíveis do meio ocorreu após 110 horas. Nas primeiras 48 horas de fermentação foram produzidos, 12,38 g/L de etanol, o que corresponde a um fator de conversão de substrato em etanol de 0,302 g de etanol/g de açúcar, produtividade de 0,208 g de etanol/L.h e velocidade de consumo de substrato de 0,689 g de açúcar/h. Verificou-se que o aumento da tolerância aos compostos tóxicos ocorreu parcialmente em razão da aclimação ter tornado a cepa mais tolerante aos inibidores presentes no meio de fermentação, visto que estas foram capazes de manter parte de suas características após propagação em meio rico. Porém, como o

desempenho da fermentação com levedura propagada em meio rico foi menor em termos de rendimento, produtividade e velocidade de consumo do substrato, há indicação de que parte das características observadas na cepa aclimatada não foram propagadas para as novas células.

Para o hidrolisado de explosão a vapor houve, em 8 horas, completo consumo da glicose (aproximadamente 10 g/L) e de apenas 5 g/L de xilose em 48 horas. Neste tempo, a viabilidade da cepa era de 20%, ou seja, esta ainda não se mostrou adaptada às drásticas condições do hidrolisado. Pode-se concluir que a estratégia de adaptação da cepa *S. passalidarum* melhorou o seu desempenho na fermentação de meio hidrolisado de pré-tratamento ácido. Para o hidrolisado de explosão a vapor, a estratégia empregada ainda não se mostrou eficaz.

Apoio Financeiro

Este trabalho foi financiado com recursos proveniente do Sistema Embrapa de Gestão (Projeto SUPERMICRO)

Referências

CARNEIRO, L. M. **Avaliação de estratégias de cultivo da levedura *Pichia stipitis* em hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz visando a produção de etanol.** 2011. Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo, Escola de Engenharia de Lorena, Lorena, São Paulo.

NGUYEN, N. H.; SUH, S. O.; MARSHALL, C. J.; BLACKWELL, M. Morphological and ecological similarities: wood-boring beetles associated with novel xylose-fermenting yeasts, *Spathaspora passalidarum* gen. sp. nov. and *Candida jeffriesii* sp. nov. **Mycological Research**, v. 110, n. 10, p. 1232 – 1241, 2006.

PROMPT, A. H. **Análise da fermentação de glicose e xilose por leveduras *Spathaspora* isoladas de madeira em decomposição.** 2012. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC.