Ciência & Tecnologia
Fatec-JB

ISSN: 2178-9436

LEVEDURA DO GÊNERO *PICHIA* SPP. EXIBE POTENCIAL PARA A PRODUÇÃO DE ETANOL 2G

PICHIA SPP. GENUS YEAST HAS POTENTIAL FOR 2G ETHANOL PRODUCTION

Kátia Gabriela de Natale[I]
Natália Novais Ribeiro[II]
Márcia Justino Rossini Mutton[III]
Mateus Felipe Grigoletto[IV]

RESUMO

Durante o pré-tratamento da biomassa lignocelulósica para a produção do Etanol de Segunda Geração (E2G) pode haver a formação de substâncias que inibem o processo fermentativo. A destoxificação do hidrolisado hemicelulósico visa remover os inibidores; porém é um procedimento oneroso. Assim, faz-se necessário o uso de microrganismos tolerantes aos compostos tóxicos. A presente pesquisa teve como objetivo estudar como diferentes doses dos inibidores furfural, hidroximetilfurfural (HMF) e ácido fênico afetam o processo fermentativo, as células microbianas e a produção de etanol por *Pichia kudriavzevii* LJ03. O delineamento experimental empregado nessa pesquisa foi inteiramente casualizado, avaliando-se as doses de 0,2 $g.L^{-1}$; 0,5 $g.L^{-1}$; 1,0 $g.L^{-1}$; 1,5 $g.L^{-1}$ e 2,0 $g.L^{-1}$ para cada inibidor. Os resultados mostraram que a viabilidade celular média na presença de HMF (93,68%) foi superior aos tratamentos com furfural (44,87%) e ácido fênico (67,95%). A levedura produziu elevadas concentrações de etanol em todas as doses de HMF, enquanto na presença de furfural e ácido fênico a produção ocorreu até 0,5 $g.L^{-1}$ e 1,0 $g.L^{-1}$, respectivamente. Portanto, esta pesquisa demonstrou a capacidade de *P. kudriavzevii* LJ03 em tolerar a presença dos inibidores da fermentação e produzir etanol. Estes resultados sugerem que a levedura apresenta potencial para ser utilizada para a produção de E2G a partir de hidrolisados hemicelulósicos sem destoxificação.

Palavras-chave: biocombustíveis; fermentação alcoólica; destoxificação; inibidores; biomassa lignocelulósica.

ABSTRACT

During the pretreatment of lignocellulosic biomass for the production of Second-Generation Ethanol (E2G) substances that inhibit the fermentation process may be formed. The detoxification of the hemicellulosic hydrolysate aims to remove the inhibitors; however, it is an expensive process. Therefore, it is necessary to use microorganisms that are tolerant to the toxic compounds. The present research aimed to study how different concentrations of the inhibitors furfural, hydroxymethylfurfural (HMF) and phenic acid affect the fermentation process, microbial cells and ethanol production by *Pichia kudriavzevii* LJ03. The experimental design was completely randomized, evaluating the

[I]Mestre em Microbiologia Agropecuária, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (UNESP), Campus de Jaboticabal, katia.natale@unesp.br.
[II]Doutora em Microbiologia Agropecuária, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (UNESP), Campus de Jaboticabal, natalia.novais@unesp.br.
[III]Professora Doutora do Departamento de Biotecnologia Agropecuária e Ambiental, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (UNESP), Campus de Jaboticabal, mjr.mutton@unesp.br.
[IV]Bacharel em Ciências Biológicas, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (UNESP), Campus de Jaboticabal, mateus.grigoletto@unesp.br.

Ciência & Tecnologia
Fatec-JB

ISSN: 2178-9436

concentrations of 0,2 $g.L^{-1}$; 0,5 $g.L^{-1}$; 1,0 $g.L^{-1}$; 1,5 $g.L^{-1}$ and 2,0 $g.L^{-1}$ for each inhibitor. The results showed that the mean cell viability in the presence of HMF (93.68%) was higher than in the treatments with furfural (44.87%) and phenic acid (67.95%). The yeast produced high concentrations of ethanol at all concentrations of HMF, while in the presence of furfural and phenic acid the production occurred up to 0.5 $g.L^{-1}$ and 1.0 $g.L^{-1}$, respectively. Therefore, this research demonstrated the ability of *P. kudriavzevii* LJ03 to tolerate the presence of fermentation inhibitors and produce ethanol. These results suggest that the yeast has the potential to be used for the production of E2G from hemicellulosic hydrolysates without detoxification.

Keywords: biofuels; alcoholic fermentation; detoxification; inhibitors; lignocellulosic biomass.

Data de submissão do artigo: 07/10/2024.
Data de aprovação do artigo: 29/11/2024.
DOI: 10.52138/citec.v16i1.396

1 INTRODUÇÃO

O Etanol de Segunda Geração (E2G) é tecnologia promissora para o aumento da oferta de biocombustíveis ao redor do mundo. Originado a partir do processamento da biomassa lignocelulósica, o E2G não compete com o setor alimentício, além de dispensar a necessidade de expansão da área plantada (Althuri; Mohan, 2022).

Independentemente da matéria-prima utilizada na produção, é fundamental que o material lignocelulósico seja submetido à etapa de pré-tratamento, visando romper a complexa estrutura composta pela celulose, hemicelulose e lignina. O pré-tratamento da biomassa utiliza processos físicos, químicos, físico-químicos e/ou biológicos, permitindo a disponibilização de açúcares simples (pentoses e hexoses) que podem ser efetivamente transformados em bioetanol pela atividade microbiana (Bezerra *et al*., 2021; Ashokkumar *et al*., 2022).

Durante o pré-tratamento pode haver a formação de substâncias tóxicas conhecidas como inibidores da fermentação, os quais são capazes de inibir o processo fermentativo em decorrência dos danos que causam aos microrganismos. Estes compostos são divididos em três categorias principais: ácidos fracos, derivados de furanos (furfural e hidroximetilfurfural, principalmente) e compostos fenólicos (Sjulander; Kikas, 2020; Periyasamy *et al*., 2023). A destoxificação do hidrolisado hemicelulósico tem como objetivo remover, reduzir a concentração ou converter os inibidores em substâncias menos tóxicas; porém eleva os custos de produção, devido ao consumo de energia, água e produtos químicos, além da perda de açúcares (Kumar *et al*., 2022).

O uso de microrganismos dotados não somente da habilidade de consumir e fermentar açúcares de cinco e seis carbonos, mas também capazes de sobreviver e tolerar a presença dos inibidores é alterativa em potencial para reduzir os custos do E2G ao dispensar a destoxificação (Ndubuisi *et al*., 2023). Uma espécie que tem se destacado é a levedura não-convencional *Pichia kudriavzevii*, a qual exibe tolerância a situações de estresse, sendo capaz de se multiplicar, crescer e produzir etanol em condições de altas concentrações de sais, baixo pH e temperaturas elevadas (Li *et al*., 2021; Sunkar; Bhukya, 2021).

A presente pesquisa teve como objetivo avaliar como diferentes doses de furfural, hidroximetilfurfural (HMF) e ácido fênico (composto fenólico) afetam o processo fermentativo, as células microbianas e a produção de etanol pela levedura *Pichia kudriavzevii* LJ03 em mosto sintético, visando determinar o potencial para a produção de E2G de modo a dispensar a etapa de destoxificação.

Ciência & Tecnologia
Fatec-JB
ISSN: 2178-9436

2 MATERIAL E MÉTODOS

As subseções a seguir apresentarão os materiais e métodos utilizados na pesquisa.

2.1 Microrganismo e preparo do inóculo

O microrganismo utilizado foi a levedura *Pichia kudriavzevii* LJ03, uma cepa isolada. Para garantir o crescimento celular de cultura pura (livre de contaminantes), a levedura foi inoculada pelo método de semeadura por estrias em placas de Petri contendo meio do tipo Yeast Extract-Peptone-Xylose-Dextrose (YPXD), o qual é compreende 20 $g.L^{-1}$ de peptona, 10 $g.L^{-1}$ de extrato de levedura, 10 $g.L^{-1}$ de glicose, 10 $g.L^{-1}$ de xilose e 15 $g.L^{-1}$ de ágar microbiológico. Em seguida, para obter a massa celular necessária para o experimento, a cepa LJ03 foi inoculada em 500 mL de meio YPXD líquido (sem ágar). Os frascos Erlenmeyer foram incubados por 72 horas à 32ºC sob agitação orbital de 125 rpm (Incubadora com Agitação Orbital Marconi). Ao final desse período, o meio de cultura foi centrifugado (Centrífuga Himac CR 21G) e a fração líquida descartada. A massa celular obtida foi suspendida em solução salina (NaCl 0,85%) e armazenada à 4°C. Desse modo, todos os procedimentos foram repetidos até se obter a quantidade suficiente de material para realizar o processo fermentativo com concentração celular de 10^8 células.mL^{-1} (Govindaswamy; Vane, 2007).

2.2 Delineamento experimental

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado em esquema de parcelas sub-subdivididas com 3 repetições. Os tratamentos principais caracterizaram-se pelas substâncias inibitórias (furfural, hidroximetilfurfural e ácido fênico), os tratamentos secundários pelas doses (0,2; 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0 $g.L^{-1}$) e os tratamentos terciários pelos tempos (0, 12 e 24 horas). As doses foram determinadas com base nos estudos de Díaz-Nava *et al*., (2017) e Ndubuisi *et al*., (2020).

2.3 Preparo do mosto sintético

Para a realização dos ensaios fermentativos foram diluídos 47 $g.L^{-1}$ de xilose e 18 $g.L^{-1}$ de glicose, sendo o mosto posteriormente suplementado com sulfato de amônio, fosfato de sódio, sulfato de potássio, sulfato de magnésio, sulfato de manganês, sulfato de zinco (Ribeiro *et al*., 2019) e 1,2 $g.L^{-1}$ de extrato de levedura. Os reagentes foram adicionados proporcionalmente para obtenção de 0,3 $g.L^{-1}$ de Nitrogênio, 0,3 $g.L^{-1}$ de Fósforo, 0,3 $g.L^{-1}$ de Potássio, 0,05 $g.L^{-1}$ de Magnésio, 0,01 $g.L^{-1}$ de Manganês e 0,01 $g.L^{-1}$ de Zinco. Em seguida, utilizou-se solução de H_2SO_4 1N para adequar o pH do meio para 3.5, uma vez que este é o valor ideal para a fermentação com *Pichia kudriavzevii* LJ03 (Tralli, 2019).

2.4 Processo fermentativo

O inóculo foi adicionado à *Erlenmeyers* de 100 mL, sendo realizadas duas alimentações de 25 mL de mosto sintético a cada 40 minutos para permitir a aclimatação da levedura, obtendo-se volume final de 50 mL. Os frascos foram mantidos em mesa agitadora (Incubadora com Agitação Orbital Marconi) com controle de temperatura à 37ºC e rotação de 125 rpm por 24 horas. Alíquotas de 2 mL foram coletadas de cada repetição para realização das análises microbiológicas nos tempos 0, 12 e 24 horas e para determinação da concentração de etanol às 12 e 24 horas.

Ciência & Tecnologia
Fatec-JB
ISSN: 2178-9436

2.5 Determinação da viabilidade celular

A determinação da viabilidade celular da levedura foi realizada com o auxílio de câmara de Neubauer (Lee; Robinson; Wang, 1981), verificando-se a viabilidade celular, a viabilidade dos brotos e o índice de brotamento nos intervalos de tempo de 0 horas, 12 horas e 24 horas. Em seguida, foram realizados os cálculos utilizando-se as seguintes fórmulas:

$$Viabilidade\ celular\ (\%) = \frac{Células\ vivas\ x\ 100}{Células\ vivas + Células\ mortas}$$

$$Índice\ de\ brotamento\ (\%) = \frac{Brotos\ vivos\ x\ 100}{Células\ vivas + Células\ mortas}$$

$$Viabilidade\ dos\ brotos\ (\%) = \frac{Brotos\ vivos\ x\ 100}{Brotos\ vivos + Células\ mortas}$$

2.6 Análise da concentração de etanol

As amostras das fermentações foram filtradas em membrana filtrante estéril PVDF (45 mm) com poro de 0,2 ųm. Posteriormente, o teor alcoólico foi analisado por leitura direta em densímetro portátil (Anton Paar, DMA 35). O resultado obtido em v/v à 20ºC foi convertido em $g.L^{-1}$.

2.7 Análise estatística

Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância (teste F) e teste de comparação de médias (Tukey 5%) utilizando o Sistema para Análises Estatísticas de Ensaios Agronômicos - AgroEstat (Barbosa; Maldonado Junior, 2015).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Essa seção apresentará os resultados da pesquisa, assim como a discussão.

3.1 Viabilidade celular

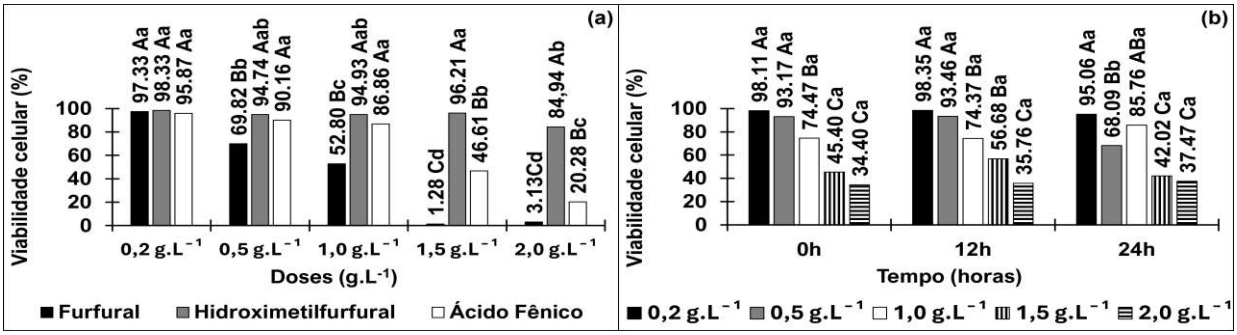
Para que o processo fermentativo se desenvolva de forma eficiente é recomendado que a viabilidade inicial seja igual ou superior à 85% quando se utiliza leveduras convencionais como *Saccharomyces cerevisiae* (Amorim, 2005). Considerando-se a cepa LJ03, observou-se que na concentração de 0,2 $g.L^{-1}$ de furfural a viabilidade era de 97,33%, muito próxima a 100%. Contudo, a partir de 0,5 $g.L^{-1}$ do inibidor houve o declínio de células viáveis (Figura 1a).

De acordo com Taherzadeh e Karimi (2011), a presença de furfural acima de 1,0 $g.L^{-1}$ apresenta efeitos negativos na viabilidade de leveduras. Este comportamento foi observado para *P. kudriavzevii* LJ03, uma vez que nas dosagens de 1,5 $g.L^{-1}$ e 2,0 $g.L^{-1}$ a porcentagem de células vivas mostrou-se extremamente baixa, indicando que nestas doses o crescimento da levedura é inibido. Ndubuisi *et al*. (2020) e Díaz-Nava *et al*. (2017) obtiveram resultados semelhantes ao reportarem que outras cepas desta levedura também tiveram a viabilidade prejudicada a partir de 1,0 $g.L^{-1}$ de furfural.

Em contraste, este parâmetro manteve-se elevado em todas as doses de HMF (Figura 1a). Assim como para o furfural, a literatura aponta que acima de 1,0 $g.L^{-1}$ de HMF a viabilidade das células é afetada negativamente (Taherzadeh; Karimi, 2011). Paes *et al*. (2021) demonstraram que *Pichia pastoris* teve o crescimento fortemente reduzido em apenas 0,25 $g.L^{-1}$ de HMF. Entretanto, *P. kudriavzevii* LJ03 se manteve viável até a dose de 2,0 $g.L^{-1}$ (Figura 1a).

Ciência & Tecnologia
Fatec-JB
ISSN: 2178-9436

Figura 1 - Viabilidade celular de *Pichia kudriavzevii* LJ03 em fermentações contendo furfural, hidroximetilfurfural e ácido fênico ao longo de 24 horas.



(a) Desdobramento da interação entre inibidores e doses. Letras minúsculas comparam doses dentro de cada inibidor e letras maiúsculas comparam inibidores dentro de cada dose. (b) Desdobramento da interação entre doses e tempos. Letras minúsculas comparam tempo dentro de cada dose e letras maiúsculas comparam doses dentro de cada tempo. Observação: A interação entre inibidores e tempos é não significativa.
Fonte: autoria própria (2024)

Nos ensaios com ácido fênico, a viabilidade celular foi preservada até a concentração de 1,0 g.L^{-1}, sendo esta a dosagem média suportada por células microbianas quando na presença de compostos fenólicos (Cho *et al*., 2009). No entanto, outras espécies do gênero *Pichia* mostraram-se menos tolerantes aos efeitos destas substâncias, uma vez que em apenas 0,2 g.L^{-1} dos fenóis ácido cumárico e ácido ferúlico a porcentagem de células danificadas de *Pichia stipitis* foi de 62,8% e 49,0% (Wang *et al*., 2017). O crescimento de LJ03 começa a ser inibido nas doses de 1,5 e 2,0 g.L^{-1} (Figura 1a).

Conforme a Figura 1b, observou-se que na concentração de 0,2 g.L^{-1} dos inibidores a viabilidade celular se manteve elevada durante todo o processo fermentativo. A partir de 2,0 g.L^{-1} a viabilidade celular apresentou valores abaixo de 40% nos três períodos considerados, sugerindo que nesta dosagem os inibidores afetam negativamente o crescimento da levedura.

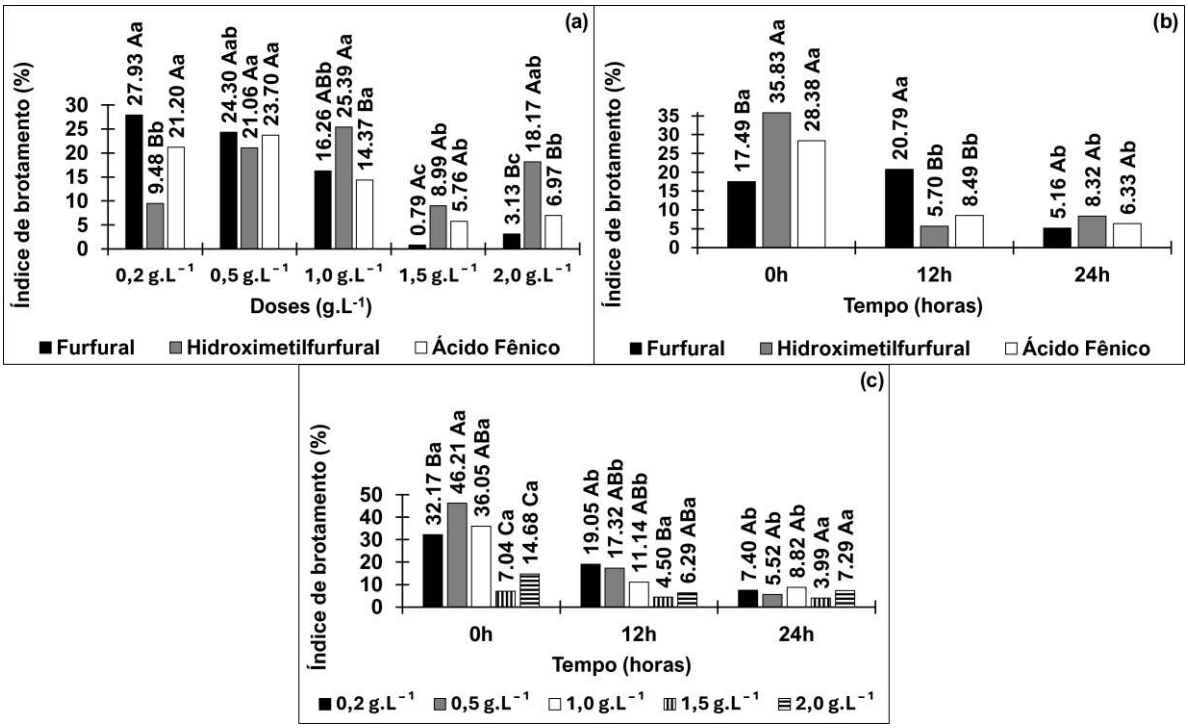
Dionísio *et al*., (2021) obtiveram que hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar pode apresentar 0,45 g.L^{-1} de furfural, 0,05 g.L^{-1} de HMF e 0,29 g.L^{-1} de compostos fenólicos. Tais resultados destacam o potencial da cepa LJ03 em ser aplicada em hidrolisados hemicelulósicos sem destoxificação, uma vez que é capaz de tolerar até 0,5 g.L^{-1} de furfural, 2,0 g.L^{-1} de HMF e 1,0 g.L^{-1} de ácido fênico.

3.2 Índice de brotamento

De acordo com Amorim (2005), é fundamental que o índice de brotamento seja em torno de 5 a 15% para garantir a eficiência do processo fermentativo com *S. cerevisiae*. Em vista disso, verificou-se que de 0,2 a 1,0 g.L^{-1} a taxa de brotamento alcançou valores acima de 20% para os três compostos avaliados, ou seja, valores superiores ao recomendado para leveduras convencionais. Enquanto nos tratamentos com HMF e ácido fênico o índice de brotamento permaneceu acima do valor mínimo de 5% para todas as dosagens (Figura 2a).

Ciência & Tecnologia
Fatec-JB
ISSN: 2178-9436

Figura 2 - Índice de brotamento de *Pichia kudriavzevii* LJ03 em fermentações contendo furfural, hidroximetilfurfural e ácido fênico ao longo de 24 horas.



(a) Desdobramento da interação entre inibidores e doses. Letras minúsculas comparam doses dentro de cada inibidor e letras maiúsculas comparam inibidores dentro de cada dose. (b) Desdobramento da interação entre doses e tempos. Letras minúsculas comparam tempo dentro de cada dose e letras maiúsculas comparam doses dentro de cada tempo. (c) Desdobramento da interação entre doses e tempos para o parâmetro de índice de brotamento. Letras minúsculas comparam tempos dentro de cada dose e letras maiúsculas comparam doses dentro de cada tempo.
Fonte: autoria própria (2024)

Considerando-se o exposto na Figura 2b, observou-se que na presença de furfural a taxa de brotamento aumentou no intervalo de 12 horas. Contudo, sofreu redução significativa após 24 horas. De modo contrário, diminuiu significativamente a partir de 12 horas nos tratamentos com HMF, verificando-se novo aumento às 24 horas. Nos ensaios com ácido fênico, a taxa de brotamento exibiu decréscimo ao longo do tempo, denotando que quanto maior o período na presença de fenol, menor a capacidade da levedura em se reproduzir.

De modo geral, o índice de brotamento decaiu com o passar do tempo. Apesar disso, é possível notar que exceto na dose de 1,5 g.L^{-1}, a taxa de brotamento se manteve acima de 5% para as demais concentrações ao final das 24 horas do processo fermentativo (Figura 2c).

Esta pesquisa é um estudo inicial para avaliar a tolerância da cepa LJ03 aos inibidores e, por esta razão, o processo fermentativo teve duração de 24 horas. Contudo, para a produção de E2G, podem ser encontradas fermentações mais longas na literatura, com duração de até 96 horas. Dessa forma, recomenda-se a realização de novos estudos empregando-se fermentações de maior duração.

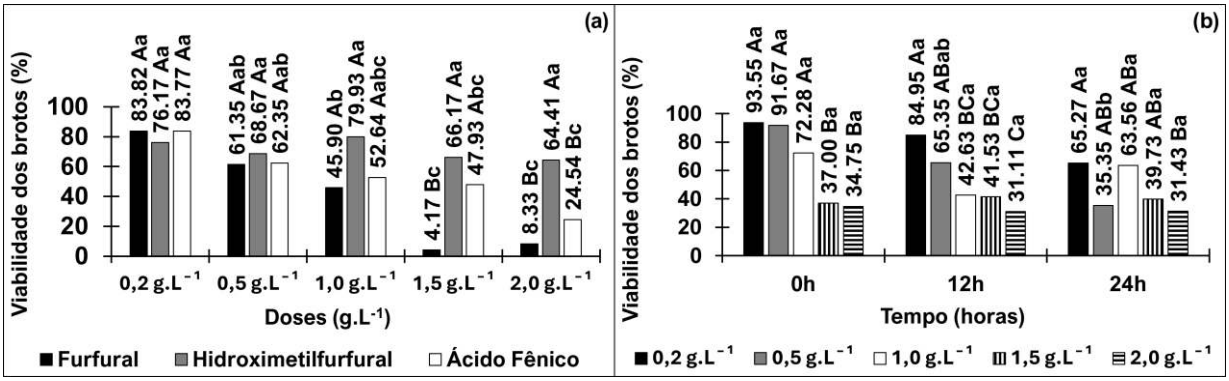
3.3 Viabilidade dos brotos

A Figura 3a demonstra que tanto para o furfural quanto para o ácido fênico o número de brotos viáveis decaiu conforme as concentrações de inibidores aumentaram. É importante destacar que a redução significativa na viabilidade dos brotos quando em 1,5 e 2,0 g.L^{-1} de furfural pode estar relacionado ao fato de que estas mesmas doses afetam significativamente a

Ciência & Tecnologia
Fatec-JB
ISSN: 2178-9436

viabilidade celular da cepa LJ03 (Figura 1a). Por outro lado, não houve diferenças significativas entre as concentrações de HMF testadas, indicando que os brotos foram capazes de se manter viáveis em todos os tratamentos. Este comportamento demonstra mais uma vez o potencial de *P. kudriavzevii* LJ03 em tolerar altas concentrações de HMF. Em geral, a viabilidade dos brotos diminuiu de acordo com o aumento das concentrações de inibidores nos três tempos considerados (Figura 3b).

Figura 3 - Viabilidade dos brotos de *Pichia kudriavzevii* LJ03 em fermentações contendo furfural, hidroximetilfurfural e ácido fênico ao longo de 24 horas



(a) Desdobramento da interação entre inibidores e doses. Letras minúsculas comparam doses dentro de cada inibidor e letras maiúsculas comparam inibidores dentro de cada dose. (b) Desdobramento da interação entre doses e tempos. Letras minúsculas comparam tempo dentro de cada dose e letras maiúsculas comparam doses dentro de cada tempo. Observação: A interação entre inibidores e tempos é não significativa.
Fonte: autoria própria (2024)

Tralli (2019) obteve que a viabilidade dos brotos de *P. kudriavzevii* LJ03 em hidrolisado hemicelulósico com destoxificação foi acima de 70%. De modo semelhante, o presente estudo obteve valor de 71,07% para este mesmo parâmetro na presença de HMF. Isto sugere que a levedura é capaz de resistir a concentrações de HMF mais elevadas do que as de furfural e fenol. De acordo com Díaz-Nava *et al*. (2017) e Yuan, Guo e Hwang (2017) é possível que a resistência de determinados microrganismos aos compostos derivados de furano esteja relacionada à sua capacidade de sintetizar mais NADH, o cofator utilizado pela enzima álcool desidrogenase (ADH), a qual é responsável pelo metabolismo do furfural e do HMF (Díaz-Nava *et al*., 2017).

3.4 Produção de etanol

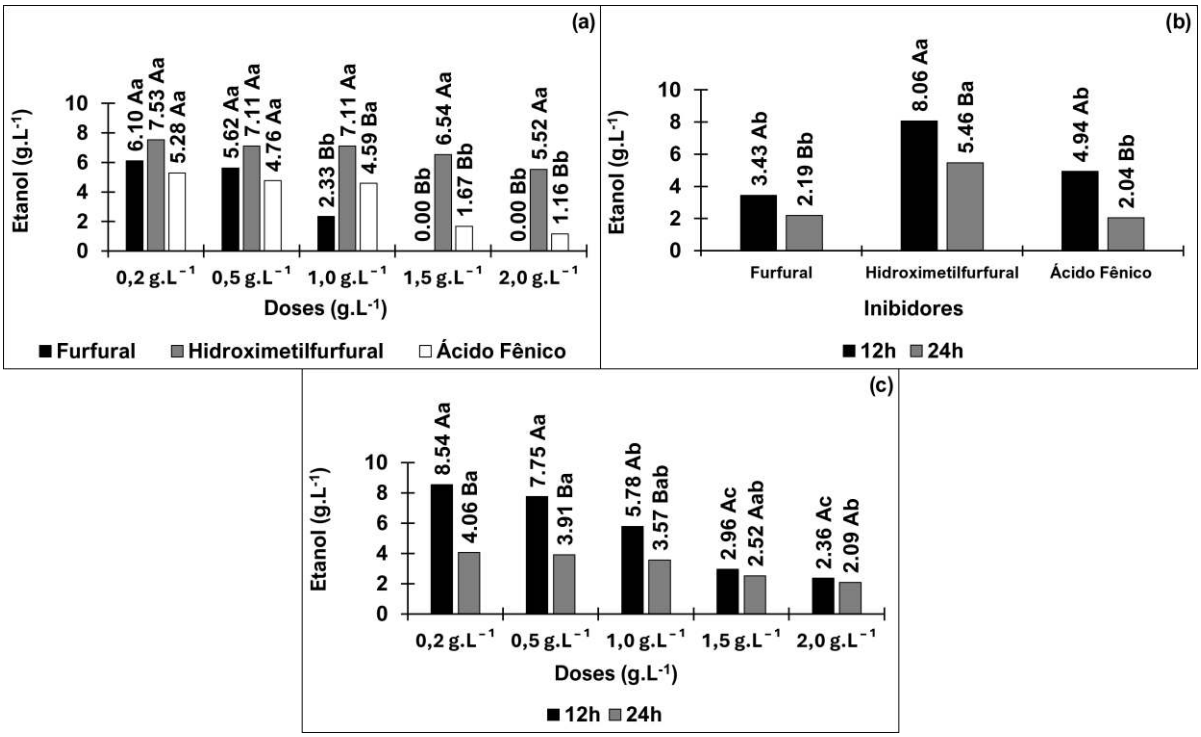
De acordo com a Figura 4, é possível observar que a concentração média de etanol foi significativamente maior nos tratamentos contendo HMF (8,06 $g.L^{-1}$). A produção máxima de etanol foi nas primeiras 12 horas para todos os inibidores e doses (Figura 4b e 4c), havendo queda na concentração alcoólica ao final do processo fermentativo. A partir do tratamento com 1,0 $g.L^{-1}$ de furfural a concentração de etanol reduziu significativamente, em que nas doses de 1,5 e 2,0 $g.L^{-1}$ os níveis alcoólicos foram muito baixos para serem detectados (Figura 4a). Ndubuisi *et al*. (2020) demonstraram baixa produção alcoólica quando em quantidades acima de 2,0 $g.L^{-1}$ de furfural.

Entretanto, nos ensaios com HMF os níveis de álcool etílico mostraram-se elevados para todas as dosagens (Figura 4a). Este comportamento pode estar relacionado com os resultados obtidos para viabilidade celular, índice de brotamento e viabilidade dos brotos, uma vez que estes parâmetros foram maiores para o HMF do que para o furfural e para o ácido fênico. Assim como para o furfural, a concentração de 1,0 $g.L^{-1}$ é tida como o valor médio de HMF a partir do qual a produção de etanol pelas células microbianas pode ser

Ciência & Tecnologia
Fatec-JB
ISSN: 2178-9436

negativamente afetada (Taherzadeh; Karimi, 2011). No entanto, *P. kudriavzevii* LJ03 foi capaz de gerar elevados níveis alcoólicos até a dosagem máxima de 2,0 g.L^{-1} de HMF.

Figura 4 - Produção de etanol por *Pichia kudriavzevii* LJ03 em fermentações contendo furfural, hidroximetilfurfural e ácido fênico ao longo de 24 horas



(a) Desdobramento da interação entre inibidores e doses. Letras minúsculas comparam doses dentro de cada inibidor e letras maiúsculas comparam inibidores dentro de cada dose. (b) Desdobramento da interação entre doses e tempos. Letras minúsculas comparam tempo dentro de cada dose e letras maiúsculas comparam doses dentro de cada tempo. (c) Desdobramento da interação entre doses e tempos para o parâmetro de índice de brotamento. Letras minúsculas comparam tempos dentro de cada dose e letras maiúsculas comparam doses dentro de cada tempo.
Fonte: autoria própria (2024)

Nos tratamentos com ácido fênico, a concentração alcoólica se manteve relativamente elevada até 1,0 g.L^{-1} (Figura 4a). Wang *et al*. (2017) observaram que na dose de apenas 0,2 g.L^{-1} dos fenóis ácidos cumárico e ferúlico a produção de etanol foi extremamente afetada para *P. stipitis*. Os resultados obtidos no presente trabalho demonstram a capacidade de *P. kudriavzevii* LJ03 em produzir etanol mesmo na presença de compostos fenólicos.

A produção máxima de etanol foi em até 12 horas de fermentação para todos os inibidores. Porém, ao final das 24 horas houve queda nos níveis alcoólicos (Figura 4b). Comportamentos semelhantes foram observados por Oberoi *et al*. (2012) ao apresentar maior produção de etanol no período de 6 a 12 horas, enquanto Tralli (2019) obteve produção máxima nas primeiras 6 horas, com posterior queda ao final de 24 horas, em que ambos utilizaram hidrolisado hemicelulósico com destoxificação.

Considerando as condições ideais de fermentação para a cepa LJ03, isto é, pH 3,5 e temperatura de 37°C, Tralli (2019) obteve 8,30 g.L^{-1} de etanol em 6 horas de fermentação em mosto destoxificado. O presente trabalho obteve nas mesmas condições produção máxima de 8,06 g.L^{-1} na presença de HMF em 12 horas, em que a levedura foi capaz de produzir etanol mesmo na concentração de 2,0 g.L^{-1} deste inibidor (Figura 4b).

Ciência & Tecnologia
Fatec-JB
ISSN: 2178-9436

Além disso, tanto em 12 horas quanto ao final das 24 horas os níveis de etanol diminuíram com o aumento das doses de inibidores (Figura 4c). Assim, os resultados apontam que a concentração máxima suportada por *P. kudriavzevii* LJ03 para produção de etanol foi de 0,5 $g.L^{-1}$ para furfural e 1,0 $g.L^{-1}$ para ácido fênico, enquanto na presença de HMF a concentração alcoólica manteve-se elevada até a dose de 2,0 $g.L^{-1}$.

Chandel *et al*. (2007) analisaram os efeitos de diferentes métodos de destoxificação para a produção de etanol utilizando o bagaço da cana-de-açúcar. Assim, a partir do uso do pré-tratamento de hidrólise ácida houve a formação de 1,89 $g.L^{-1}$ de furfural e HMF, além de 2,75 $g.L^{-1}$ de compostos fenólicos. Em seguida, realizou-se a destoxificação do hidrolisado, em que a produção máxima de etanol foi de 8,67 $g.L^{-1}$. Neste sentido, o presente trabalho ao utilizar mosto sintético obteve valores semelhantes com produção máxima de etanol igual a 8,06 $g.L^{-1}$ na presença de HMF em concentrações de até 2,0 $g.L^{-1}$, indicando o potencial de *P. kudriavzevii* LJ03 em permanecer produzindo etanol em meio não destoxificado.

É importante destacar que os inibidores se encontram em sinergia no hidrolisado hemicelulósico e que a interação entre estes compostos aumenta a toxicidade no mosto e, consequentemente, os danos causados às células microbianas, reduzindo o rendimento alcoólico. Neste sentido, recomenda-se a realização de estudos posteriores de forma a avaliar o desempenho fermentativo da cepa LJ03 em hidrolisados hemicelulósicos reais e a tolerância da levedura a múltiplos inibidores.

Os resultados obtidos em trabalhos futuros serão fundamentais para definir o potencial de *P. kudriavzevii* LJ03 para a produção de E2G, uma vez que o uso de leveduras fermentadoras de xilose e tolerantes aos inibidores pode dispensar a etapa de destoxificação, reduzindo os custos de produção deste biocombustível.

4 CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos, pode-se concluir que a levedura não-convencional *Pichia kudriavzevii* LJ03 apresenta a capacidade de tolerar os inibidores da fermentação, mantendo células viáveis e produzindo etanol mesmo em doses elevadas dos compostos tóxicos, especialmente na presença de HMF. Portanto, os resultados sugerem que a levedura possui potencial para ser utilizada para a produção de E2G a partir de hidrolisados hemicelulósicos sem destoxificação. Recomenda-se a realização de estudos posteriores considerando a aplicação da levedura em hidrolisados hemicelulósicos reais, bem como a avaliação da tolerância deste microrganismo a múltiplos inibidores.

REFERÊNCIAS

ALTHURI, A.; MOHAN, V. Emerging innovations for sustainable production of bioethanol and other mercantile products from circular economy perspective. **Bioresource Technology**, v. 363, n. 128013, 2022. DOI: https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.128013. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0960852422013463?via%3Dihub. Acesso em: 20 set. 2024.

AMORIM, H. V. **Fermentação alcoólica**: ciência & tecnologia. Fermentec: Piracicaba, 448 p, 2005.

ASHOKKUMAR, V.; VENKATKARTHICK, R.; JAYASHREE, S.; CHUETOR, S.; DHARMARAJ, S.; KUMAR, G.; CHEN, W. H.; NGAMCHARUSSRIVICHAI, C. Recent

Ciência & Tecnologia
Fatec-JB
ISSN: 2178-9436

advances in lignocellulosic biomass for biofuels and value-added bioproducts - A critical review. **Bioresource Technology**, v. 344, p. 126195, 2022. DOI: https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126195. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0960852421015376. Acesso em: 20 set. 2024.

BARBOSA, J.C.; MALDONADO JUNIOR, W. Experimentação Agronômica & AgroEstat – **Sistema para Análises Estatísticas de Ensaios Agronômicos**. FUNEP: Jaboticabal, 2015.

BEZERRA, P. X. O.; SILVA, C. E. F.; SOLETTI, J. I.; CARVALHO, S. H. V. Cellulosic ethanol from sugarcane straw: A discussion based on industrial experience in the Northeast of Brazil. **BioEnergy Research**, v. 14, p. 761–773, 2021. DOI: https://doi.org/10.1007/s12155-020-10169-w. Disponível em: https://link-springer-com-443.webvpn.synu.edu.cn/article/10.1007/s12155-020-10169-w. Acesso em: 20 set. 2024.

CHANDEL, A. K.; KAPOOR, K. R.; SINGH, A.; KUHAD, R. C. Detoxification of sugarcane bagasse hydrolysate improves ethanol production by *Candida shehatae* NCIM 3501. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v. 98, n.10, p. 1947-1950, 2007. DOI: https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.07.047. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0960852406003889?via%3Dihub. Acesso em: 20 set. 2024.

CHO, D. H.; LEE, Y-J.; UM, Y.; SANG, B-I.; KIM, Y. H. Detoxification of model phenolic compounds in lignocellulosichydrolysates with peroxidase for butanol production from *Clostridium beijerinckii*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 83, p. 1035-1043, 2009. DOI: https://doi.org/10.1007/s00253-009-1925-8. Disponível em: https://link.springer.com/article/10.1007/s00253-009-1925-8. Acesso em: 20 set. 2024.

DÍAZ-NAVA, L. E.; MONTES-GARCIA, N.; DOMÍNGUEZ, J. M.; AGUILAR-USCANGA, M. G. Effect of carbon sources on the growth and ethanol production of native yeast *Pichia kudriavzevii* ITV-S42 isolated from sweet sorghum juice. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 40, p. 1069-1077, 2017. DOI: https://doi.org/10.1007/s00449-017-1769-z. Disponível em: https://link.springer.com/article/10.1007/s00449-017-1769-z. Acesso em: 20 set. 2024.

DIONÍSIO, S.R.; SANTORO, D. C. J.; BONAN, C. I. D. G.; SOARES, L. B.; BIAZI, L. E.; RABELO, S. C.; IENCZAK, J. L.Second-generation ethanol process for integral use of hemicellulosic and cellulosic hydrolysates from diluted sulfuric acid pretreatment of sugarcane bagasse. **Fuel**, v. 304, n. 2, 2021. Disponível em: https://repositorio.unesp.br/items/c76edfbb-91ba-4e46-9655-fc734676a4d2. Acesso em: 20 set. 2024.

GOVINDASWAMY, S.; VANE, L. M. Kinetics of growth and ethanol production on different carbon substrates using genetically engineered xylose-fermenting yeast. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 677-685, 2007. DOI: https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.02.012. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0960852406000617. Acesso em: 20 set. 2024.

KUMAR, A.; INGLE, A.; SHENDE, D. Z.; WASEWAR, K. L. Perspective of reactive separation of levulinic acid in conceptual mixer settler reactor. **Environmental Science and Pollution Research**, 2022. DOI: https://doi.org/10.1007/s11356-022-18794-y. Disponível em: https://link.springer.com/article/10.1007/s11356-022-18794-y. Acesso em: 20 set. 2024.

Ciência & Tecnologia
Fatec-JB
ISSN: 2178-9436

LEE, S. S.; ROBINSON, F. M.; WANG, H. Y. Rapid determination of yeast viability. **Biotechnology and Bioengineering Symposium**, v. 11, p. 641-649, 1981.

LI, C.; LIU, Q.; WANG, Y.; YANG, X.; CHEN, S.; ZHAO, Y.; WU, Y.; LI, L. Salt stress improves thermotolerance and high-temperature bioethanol production of multi-stress-tolerant *Pichia kudriavzevii* by stimulating intracellular metabolism and inhibiting oxidative damage. **Biotechnology for Biofuels**, v. 14, n. 222, 2021. DOI: https://doi.org/10.1186/s13068-021-02071-0. Disponível em: https://biotechnologyforbiofuels.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13068-021-02071-0. Acesso em: 20 set. 2024.

NDUBUISI, I. A.; AMADI, C. O.; NWAGU, T. N.; MURATA, Y.; OGBONNA, J. C. Non-conventional yeast strains: Unexploited resources for effective commercialization of second generation bioetanol. **Biotechnology Advances**, v. 63, n. 108100, 2023. DOI: https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2023.108100. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0734975023000071?via%3Dihub. Acesso em: 20 set. 2024.

NDUBUISI, I. A.; QIN, Q.; LIAO, G.; WANG, B.; MONEKE, A. N.; OGBONNA, J. C.; JIN, C.; FANG, W. Effects of various inhibitory substances and immobilization on ethanol production efficiency of a thermotolerant *Pichia kudriavzevii*. **Biotechnology for Biofuels**, v. 13, p. 91, 2020. DOI: https://doi.org/10.1186/s13068-020-01729-5. Disponível em: https://biotechnologyforbiofuels.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13068-020-01729-5. Acesso em: 20 set. 2024.

OBEROI, H. S.; BABBAR, N.; SANDHU, S. K.; DHALIWAL, S. S.; KAUR, U.; CHADHA, B. S.; BHARGAV, K. V. Ethanol production from alkali-treated rice straw via simultaneous saccharification and fermentation using newly isolated thermotolerant *Pichia kudriavzevii* HOP-1. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 39, p.557-566, 2012. DOI: https://doi.org/10.1007/s10295-011-1060-2. Disponível em: https://academic.oup.com/jimb/article/39/4/557/5994519?login=false. Acesso em: 20 set. 2024.

PAES, B. G.; STEINDORFF, A. S.; FORMIGHIERI, E. F.; PEREIRA, I. S.; ALMEIDA, J. R. M. Physiological characterization and transcriptome analysis of *Pichia pastoris* reveals its response to lignocellulose-derived inhibitors. **AMB Express**, v. 11, n. 2, 2021. DOI: https://doi.org/10.1186/s13568-020-01170-9. Disponível em: https://amb-express.springeropen.com/articles/10.1186/s13568-020-01170-9. Acesso em: 20 set. 2024.

PERIYASAMY, S.; ISABEL, J. B.; KAVITHA, S.; KARTHIK, V.; MOHAMED, B. A.; GIZAW, D. G.; SIVASHANMUGAM, P.; AMINABHAVI, T. M. Recent advances in consolidated bioprocessing for conversion of lignocellulosic biomass into bioethanol – A review. **Chemical Engineering Journal**, v. 453, n. 139783, 2023. DOI: https://doi.org/10.1016/j.cej.2022.139783. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1385894722052627. Acesso em: 20 set. 2024.

RIBEIRO, N. N. **Caracterização das condições fermentativas da *levedura Pichia membranifaciens* para produção de etanol de segunda geração**. 2019. 57 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agropecuária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista (Unesp), Jaboticabal, 2019.

Ciência & Tecnologia
Fatec-JB
ISSN: 2178-9436

SJULANDER, N.; KIKAS, T. Origin, Impact and Control of Lignocellulosic Inhibitors in Bioethanol Production – A Review. **Energies**, v. 13, p. 4751, 2020. DOI: https://doi.org/10.3390/en13184751. Disponível em: https://www.mdpi.com/1996-1073/13/18/4751. Acesso em: 20 set. 2024.

SUNKAR, B.; BHUKYA, B. Bi-phasic hydrolysis of corncobs for the extraction of total sugars and ethanol production using inhibitor resistant and thermotolerant yeast, *Pichia kudriavzevii*. **Biomass and Bioenergy**, v. 153, p. 106230, 2021. DOI: https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2021.106230. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S096195342100266X. Acesso em: 20 set. 2024.

TAHERZADEH, M. J.; KARIMI, K. Fermentation inhibitors in ethanol processes and different strategies to reduce their effects, in: PANDEY, A.; LARROCHE, C.; RICKE, S. C.; DUSSAP, C. G.; GNANSOUNOU, (Eds.), **Biofuels**, Academic Press, 2011, p. 287-311. DOI: https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385099-7.00012-7. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/B9780123850997000127. Acesso em: 20 set. 2024.

TRALLI, L. F. **Fermentação de mosto obtido da hidrólise de sorgo sacarino para produção de etanol por *Pichia kudriavzevii*.** 2019. 89 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agropecuária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista (Unesp), Jaboticabal, 2019.

WANG, X.; TSANG, Y. F.; LI, Y.; MA, X.; CUI, S.; ZHANG, T-A.; HU, J.; GAO, M-T. Inhibitory effects of phenolic compounds of rice straw formed by saccharification during ethanol fermentation by *Pichia stipitis*. **Bioresource Technology**, v. 244, p. 1059-1067, 2017. DOI: https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.08.096. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0960852417314013?via%3Dihub. Acesso em: 20 set. 2024.

YUAN, S.; GUO, G.; HWANG, W. Ethanol production from dilute-acid steam exploded lignocellulosic feedstocks using an isolated multistress-tolerant *Pichia kudriavzevii* strain. **Microbial Biotechnology**, v. 10, n. 6, p. 1581-1590, 2017. DOI: https://doi.org/10.1111/1751-7915.12712. Disponível em: https://enviromicro-journals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/1751-7915.12712. Acesso em: 20 set. 2024.