



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
PRODUÇÃO VEGETAL E BIOPROCESSOS ASSOCIADOS

EFEITO DO ÁCIDO ACÉTICO SOBRE O CRESCIMENTO E FERMENTAÇÃO DA
LEVEDURA *Meyerozyma guilliermondii*

MICHELLE DOS SANTOS CORDEIRO PERNA

Araras
2016



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
PRODUÇÃO VEGETAL E BIOPROCESSOS ASSOCIADOS**

**EFEITO DO ÁCIDO ACÉTICO SOBRE O CRESCIMENTO E FERMENTAÇÃO DA
LEVEDURA *Meyerozyma guilliermondii***

MICHELLE DOS SANTOS CORDEIRO PERNA

ORIENTADOR: PROFa. Dra. SANDRA REGINA CECCATO ANTONINI

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal e Bioprocessos Associados como requisito parcial à obtenção do título de MESTRE EM PRODUÇÃO VEGETAL E BIOPROCESSOS ASSOCIADOS

Araras
2016

Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da Biblioteca Comunitária UFSCar
Processamento Técnico
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

P452e Perna, Michelle dos Santos Cordeiro
Efeito do ácido acético sobre o crescimento e
fermentação da levedura *Meyerozyma guilliermondii* /
Michelle dos Santos Cordeiro Perna. -- São Carlos :
UFSCar, 2016.
80 p.

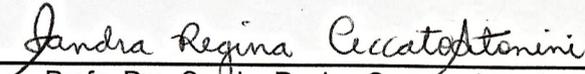
Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de
São Carlos, 2016.

1. Fermentação. 2. Leveduras. 3. Ácido acético. 4.
Meyerozyma guilliermondii. 5. Etanol. I. Título.

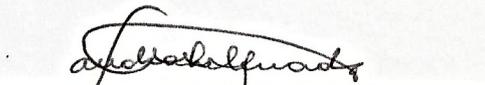


Folha de Aprovação

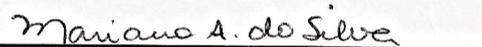
Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Michelle dos Santos Cordeiro Perna, realizada em 26/08/2016:



Profa. Dra. Sandra Regina Ceccato Antonini
UFSCar



Profa. Dra. Sandra Helena da Cruz
ESALQ-USP



Profa. Dra. Mariana Altenhofen da Silva
UFSCar

Ao meu querido marido André, meus pais Sandra e Marcos (*in memoriam*), meus irmãos Kléber, Tiago e Eduardo, às minhas irmãs Tatiane e Josiane, a todos com amor, sinceridade e gratidão, dedico.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por iluminar o meu caminho e permitir perseverar sobre cada obstáculo enfrentado.

À Profa. Dra. Sandra Regina Ceccato Antonini, pela oportunidade, exemplo, orientação, fé e paciência, os quais foram imprescindíveis para meu crescimento científico, intelectual e, sobretudo, pessoal.

À Universidade Federal de São Carlos – Centro de Ciências Agrárias - *Campus* de Araras, pela oportunidade de realização do curso de mestrado.

Ao Prof. Dr. Reinaldo Gaspar Bastos, por todo apoio, atenção, conhecimentos compartilhados e realização das análises cromatográficas.

Aos professores do Programa de Pós Graduação em Produção Vegetal e Bioprocessos Associados, pelos conhecimentos compartilhados.

Ao diretor da escola SENAI “Ettore Zanini”, Sr. Luiz Zambon Neto, e ao Coordenador de Atividades Técnicas, Sr. Julio César Melli, por todo o apoio e incentivo imprescindíveis ao sucesso desta realização.

À toda a equipe do Laboratório de Microbiologia Agrícola e Molecular – LAMAM, pelo apoio e amizade, e em especial à amiga Dra. Ana Paula Guarnieri Bassi, por todo incentivo, amizade e pelos conhecimentos compartilhados.

Às amigas Renata Rocha, Ana Carolina Arantes e Thaís Borges de Oliveira, agradeço o apoio, amizade e carinho.

Ao meu amado marido André Luís Perna, pelo apoio incondicional durante os muitos fins de semana e madrugadas que passei me dedicando a este projeto.

À toda minha família, por acreditarem em mim, pela compreensão em todos os momentos em que estive ausente e pelo carinho e apoio de sempre.

SUMÁRIO

ÍNDICE DE TABELAS	1
ÍNDICE DE FIGURAS	3
RESUMO.....	6
ABSTRACT	7
INTRODUÇÃO	8
OBJETIVOS	11
1 Objetivo geral	11
2 Objetivos específicos.....	11
REVISÃO DA LITERATURA	13
1 Etanol de segunda geração.....	13
2 Hidrólise da biomassa lignocelulósica	16
3 Detoxificação biológica	18
LITERATURA CITADA.....	21
CAPÍTULO 1. Efeito da concentração do ácido acético, pH e concentração celular sobre o crescimento da levedura <i>M. guilliermondii</i> em meio sintético contendo ácido acético como única fonte de carbono	24
1 Resumo	24
2 Introdução	25
3 Materiais e Métodos	27
3.1 Preparo do inóculo	27
3.2 Preparo do meio de crescimento	27
3.3 Ensaio de cultivo	28
3.3.1 Efeito da concentração de ácido acético sobre o crescimento de <i>M. guilliermondii</i> em meio semi-sintético contendo ácido acético como única fonte de carbono.....	28

3.3.2 Efeito do pH inicial e da concentração inicial de células sobre o crescimento de <i>M. guilliermondii</i> em meio sintético contendo ácido acético como única fonte de carbono	29
4 Resultados e Discussão	32
4.1 Efeito do ácido acético sobre o crescimento de <i>M. guilliermondii</i> em meio sintético.....	32
4.2 Efeito do pH inicial e da concentração inicial de células sobre o crescimento de <i>M. guilliermondii</i> em meio sintético contendo ácido acético como única fonte de carbono	41
5 Conclusões.....	49
6 Literatura citada.....	49
CAPÍTULO 2 – Efeito da concentração do ácido acético e furfural sobre o crescimento e produção de etanol de <i>M. guilliermondii</i> em meio sintético contendo pentoses e hexoses	53
1 Resumo	53
2 Introdução	54
3 Materiais e Métodos	56
3.1 Preparo do inóculo	56
3.2 Preparo do meio de crescimento	56
3.3 Montagem do experimento.....	57
3.4 Análises físico-químicas e instrumentais.....	58
3.5 Análises cinéticas e estatísticas	59
4 Resultados e Discussão	60
4.1 Efeito do furfural e ácido acético sobre o crescimento de <i>M. guilliermondii</i> em meio sintético contendo pentoses e glicose	60
4.2 Efeito do furfural no consumo de pentoses, glicose e ácido acético	66
4.3 Efeito do furfural e ácido acético na produção de etanol e produtividade de biomassa	72
5 Conclusões.....	76

6 Literatura citada.....	76
CONSIDERAÇÕES FINAIS	79

ÍNDICE DE TABELAS

Capítulo 1

Tabela 1. Análise de variância dos resultados da velocidade específica de crescimento da levedura *M. guilliermondii* cultivada em meio sintético contendo diferentes concentrações de ácido acético como única fonte de carbono, a 30°C, 160 rpm, pH 5,5, em 96 h de incubação.39

Tabela 2. Comparação de médias pelo Teste de Tukey (a 5% de significância) da velocidade específica de crescimento da levedura *M. guilliermondii* cultivada em meio sintético contendo diferentes concentrações de ácido acético como única fonte de carbono, a 30°C, 160 rpm, pH 5,5, em 96 h de incubação.....39

Tabela 3. Valores de velocidade específica de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$, h^{-1}) dos cultivos realizados com a levedura *M. guilliermondii* em meio sintético contendo ácido acético (10,5 g/L) como única fonte de carbono, em concentrações iniciais de massa seca de 0,2, 0,5 e 2,5 g/L, pH 5,5, a 30°C, 160 rpm.45

Tabela 4. Análise de variância das velocidades específicas de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$) da levedura *M. guilliermondii* crescida em meio sintético contendo ácido acético (10,5 g/L) como única fonte de carbono, em concentrações iniciais de massa seca de 0,2, 0,5 e 2,5 g/L, pH 3,5 e 5,5, a 30°C, 160 rpm.46

Capítulo 2

Tabela 1. Valores médios das velocidades específicas máximas de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$, h^{-1}) dos experimentos realizados com a levedura *M. guilliermondii* crescida em meio sintético contendo 3 g/L de glicose, 3 g/L de arabinose, 25 g/L de xilose nas concentrações de 0 mg/L, 20 mg/L e 40 mg/L de furfural (FF) e 0 g/L, 5 g/L e 10 g/L de ácido acético (AA) a 30°C, 160 rpm, pH 5,5 e 96 h de incubação.....62

Tabela 2. Análise de variância das velocidades específicas máximas de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$, h^{-1}) dos experimentos realizados com a levedura *M. guilliermondii* crescida em meio sintético contendo 3 g/L de glicose, 3 g/L de arabinose, 25 g/L de xilose nas concentrações de 0 mg/L, 20 mg/L e 40 mg/L de furfural (FF) e 0 g/L, 5 g/L e 10 g/L de ácido acético (AA), a 30°C, 160 rpm, pH 5,5 e 96 h de incubação.....63

Tabela 3. Teste de Tukey das médias das velocidades específicas máximas de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$, h^{-1}) dos experimentos realizados com a levedura *M. guilliermondii* crescida em meio sintético contendo 3 g/L de glicose, 3 g/L de arabinose, 25 g/L de xilose nas concentrações de 0 mg/L, 20 mg/L e 40 mg/L de furfural e 0 g/L, 5 g/L e 10 g/L de ácido acético, a 30°C, 160 rpm, pH 5,5 em 96 h de incubação.....64

Tabela 4. Velocidade de consumo de ácido acético dos experimentos realizados com a levedura *M. guilliermondii* crescida em meio sintético contendo 3 g/L de glicose, 3 g/L de arabinose, 25 g/L de xilose nas concentrações de 0 mg/L, 20 mg/L e 40 mg/L de furfural (FF) e 5 g/L e 10 g/L de ácido acético (AA) a 30°C, 160 rpm, pH 5,5 e 96 h de incubação.71

Tabela 5. Resultados obtidos quanto aos substratos, produtos, residual e inibidor no cultivo de *M. guilliermondii* em hidrolisado ácido não-detoxificado de bagaço de cana-de-açúcar, suplementado com 3 g/L de extrato de levedura, a 30°C, 160 rpm, pH 5,5, conforme Martini et al. (2016), em comparação com os resultados obtidos em meio sintético, a 30°C, 160 rpm, pH 5,5, no presente trabalho.75

ÍNDICE DE FIGURAS

Revisão da literatura

Figura 1. Parede celular da cana-de-açúcar	16
Figura 2. Principais vias metabólicas do metabolismo oxidativo e gluconeogênico em <i>S. cerevisiae</i>	20

Capítulo 1

Figura 1. Massa seca (g/L) de <i>M. guilliermondii</i> em meio sintético contendo diferentes concentrações de ácido acético (1,5 a 19,5 g/L) em comparação com meio sintético contendo glicose como única fonte de carbono, a 30°C, 160 rpm, pH 5,5.	33
Figura 2. Variação do consumo de ácido acético (g/L) e da concentração celular (g/L) de <i>M. guilliermondii</i> em meio sintético contendo concentrações crescentes de ácido acético (1,5 a 19,5 g/L) como única fonte de carbono, a 30°C, 160 rpm, pH 5,5 em 96 h de incubação.	34
Figura 3. Valores de pH dos cultivos de <i>M. guilliermondii</i> em meio sintético contendo ácido acético como única fonte de carbono em concentrações variando de 1,5 a 19,5 g/L, a 30°C, 160 rpm.	35
Figura 4. Variação da concentração de ácido acético (g/L) dos cultivos de <i>M. guilliermondii</i> em meio sintético contendo diferentes concentrações de ácido acético (1,5 a 19,5 g/L) como única fonte de carbono, a 30°C, 160 rpm, pH 5,5.	35
Figura 5. Concentração de ácido acético em função da velocidade específica de crescimento dos cultivos de <i>M. guilliermondii</i> em meio sintético contendo diferentes concentrações de ácido acético como única fonte de carbono, a 30°C, 160 rpm, pH 5,5 em 96 h de incubação.	40
Figura 6. Curvas de crescimento (g/L) de <i>M. guilliermondii</i> em meio sintético contendo ácido acético (10,5 g/L) como única fonte de carbono, em concentrações iniciais de massa celular de 0,2, 0,5 e 2,5 g/L, pH 5,5, a 30°C, 160 rpm.	41
Figura 7. Massa celular (g/L) de <i>M. guilliermondii</i> em meio sintético contendo ácido acético (10,5 g/L) como única fonte de carbono, em concentrações iniciais de massa celular de 0,5 e 2,5 g/L, pH 3,5, a 30°C, 160 rpm.	42
Figura 8. Concentração de ácido acético (g/L) nos cultivos de <i>M. guilliermondii</i> em meio sintético contendo ácido acético (10,5 g/L) como única fonte de carbono, em concentrações iniciais de massa celular de 0,5 e 2,5 g/L, pH 3,5 e 5,5 a 30°C, 160 rpm.....	44

Figura 9. Valores de pH dos cultivos de *M. guilliermondii* em meio sintético contendo ácido acético (10,5 g/L) como única fonte de carbono, em concentrações iniciais de massa seca de 0,2, 0,5 e 2,5 g/L, pH 5,5, a 30°C, 160 rpm.....47

Figura 10. Valores de pH dos cultivos de *M. guilliermondii* em meio sintético contendo ácido acético (10,5 g/L) como única fonte de carbono, em concentrações iniciais de massa seca de 0,2, 0,5 e 2,5 g/L, pH 3,5, a 30°C, 160 rpm.47

Capítulo 2

Figura 1. Curvas de crescimento (g/L) de *M. guilliermondii* em meio sintético contendo 3 g/L de glicose, 3 g/L de arabinose, 25 g/L de xilose nas concentrações de 0 mg/L, 20 mg/L e 40 mg/L de furfural (FF) e 0 g/L, 5 g/L e 10 g/L de ácido acético (AA) a 30°C, 160 rpm, pH 5,5 e 96 h de incubação.61

Figura 2. Efeito da interação entre os inibidores ácido acético e furfural sobre a velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$, h⁻¹) nos experimentos realizados com a levedura *M. guilliermondii* crescida em meio sintético contendo 3 g/L de glicose, 3 g/L de arabinose, 25 g/L de xilose, nas concentrações de 0 mg/L, 20 mg/L e 40 mg/L de furfural e 0 g/L, 5 g/L e 10 g/L de ácido acético, a 30°C, 160 rpm, pH 5,5 em 96 h de incubação.66

Figura 3. Concentração de glicose (g/L), pentoses (g/L), ácido acético (g/L) e furfural dos cultivos da levedura *M. guilliermondii* em meio sintético contendo 3 g/L de glicose, 3 g/L de arabinose, 25 g/L de xilose nas concentrações de 0 mg/L, 20 mg/L e 40 mg/L de furfural e 0 g/L, 5 g/L e 10 g/L de ácido acético a 30°C, 160 rpm, pH 5,5 em 96 h de incubação.67

Figura 4. Variação da concentração de ácido acético (g/L) nos cultivos da levedura *M. guilliermondii* em meio sintético contendo 3 g/L de glicose, 3 g/L de arabinose, 25 g/L de xilose nas concentrações de 0 mg/L, 20 mg/L e 40 mg/L de furfural (FF) e 0 g/L, 5 g/L e 10 g/L de ácido acético (AA) a 30°C, 160 rpm, pH 5,5 em 96 h de incubação.....70

Figura 5. Variação de pH dos cultivos da levedura *M. guilliermondii* em meio sintético contendo 3 g/L de glicose, 3 g/L de arabinose, 25 g/L de xilose nas concentrações de 0 mg/L, 20 mg/L e 40 mg/L de furfural (FF) e 0 g/L, 5 g/L e 10 g/L de ácido acético (AA), a 30°C, 160 rpm, pH 5,5 em 96 h de incubação.72

Figura 6. Produção de etanol (g/L) pela levedura *M. guilliermondii* em meio sintético contendo 3 g/L de glicose, 3 g/L de arabinose, 25 g/L de xilose nas concentrações de 0 mg/L, 20 mg/L e 40 mg/L de furfural (FF) e 0 g/L, 5 g/L e 10 g/L de ácido acético (AA), a 30°C, 160 rpm, pH 5,5 em 96 h de incubação.73

Figura 7. Rendimento de etanol (Y_p/s , em %) e produtividade de biomassa (Y_x/s , em %) apresentados pela levedura *M. guilliermondii* em meio sintético contendo 3 g/L de glicose, 3 g/L de arabinose, 25 g/L de xilose nas concentrações de 0 mg/L, 20 mg/L e 40 mg/L de furfural (FF) e 0 g/L, 5 g/L e 10 g/L de ácido acético (AA), a 30°C, 160 rpm, pH 5,5 em 96 h de incubação.74

EFEITO DO ÁCIDO ACÉTICO SOBRE O CRESCIMENTO E FERMENTAÇÃO DA LEVEDURA *Meyerozyma guilliermondii*

Autor: MICHELLE DOS SANTOS CORDEIRO PERNA

Orientador: Profa. Dra. SANDRA REGINA CECCATO ANTONINI

RESUMO

A viabilidade de tecnologias que aproveitem ao máximo toda a biomassa vegetal disponível, como a produção de etanol lignocelulósico, enfrenta desafios como a busca por micro-organismos capazes de fermentar pentoses, com alta tolerância aos inibidores liberados na etapa de hidrólise da biomassa, como o ácido acético e o furfural. O presente trabalho objetivou avaliar a capacidade de metabolização de pentoses e glicose por uma linhagem da levedura *Meyerozyma guilliermondii* (CCT7783), na presença de furfural e ácido acético. A primeira fase experimental consistiu da avaliação do crescimento celular em meio sintético contendo ácido acético como única fonte de carbono nas concentrações de 1,5; 2,5; 4,5; 10,5; 13,5; 16,5 e 19,5 g/L, a 30°C, 160 rpm, pH 5,5, com concentração inicial de 0,2 g/L de massa seca durante um período de incubação de 96 h. Avaliou-se ainda nesta etapa a influência do pH (3,5 e 5,5) e concentração inicial de massa seca (0,2; 0,5 e 2,5 g/L). A segunda fase consistiu na avaliação do efeito do furfural (20 e 40 mg/L) e ácido acético (5 e 10 g/L) na fermentação de pentoses (arabinose e xilose) e glicose, produção de biomassa e etanol. A levedura *M. guilliermondii* foi capaz de crescer em meio sintético em todas as concentrações de ácido acético testadas, em pH 5,5, sendo essas concentrações muito acima daquelas normalmente encontradas em hidrolisados hemicelulósicos. A concentração a partir da qual ocorreu inibição do crescimento foi 10,5 g/L. O pH inicial teve influência no consumo do ácido acético e crescimento assim como a concentração celular inicial. Em meio sintético contendo glicose, pentoses e ácido acético como fontes de carbono, a maior velocidade específica de crescimento foi obtida no tratamento com adição de 5 g/L de ácido acético, o qual foi consumido concomitantemente com as pentoses e glicose em todos os tratamentos, porém o ácido acético atuou como inibidor na concentração de 10 g/L. O furfural inibiu o crescimento da levedura na concentração de 40 mg/L. A produção de etanol (g/L) foi baixa em relação aos micro-organismos comumente aplicados no processo de fermentação, porém a levedura foi capaz de crescer e promover a detoxificação biológica mesmo na presença de inibidores como ácido acético e furfural, denotando que o processo requer otimização e que a levedura *M. guilliermondii* pode ser aplicada em rotas biotecnológicas de produção de etanol de segunda geração.

EFFECT OF THE ACETIC ACID ON THE GROWTH AND FERMENTATION OF THE YEAST *Meyerozyma guilliermondii*

Author: MICHELLE DOS SANTOS CORDEIRO PERNA

Adviser: Prof Dr SANDRA REGINA CECCATO ANTONINI

ABSTRACT

The viability of technologies that make possible to use all available plant biomass, such as the production of lignocellulosic ethanol, faces challenges as the search for microorganisms capable of fermenting pentoses with high tolerance to inhibitors released in the biomass hydrolysis step, such as acetic acid and furfural. This study aimed to evaluate the metabolizing capacity of pentoses and glucose by a yeast strain of *Meyerozyma guilliermondii* (CCT7783) in the presence of furfural and acetic acid. The first set of experiments comprised the evaluation of cell growth in a synthetic medium containing acetic acid as the sole carbon source at concentrations of 1.5; 2.5; 4.5; 10.5; 13.5; 16.5 and 19.5 g/L at 30°C, 160 rpm, pH 5.5, with initial concentration of 0.2 g/L of dry mass for a period of 96 hours of incubation. It was also evaluated the effect of pH (3.5 and 5.5) and the initial concentration of dry mass (0.2, 0.5 and 2.5 g/L). The second set of experiments consisted in the evaluation of the effect of furfural (20 and 40 mg/L) and acetic acid (5 and 10 g/L) in the fermentation of pentoses (arabinose and xylose) and glucose, biomass and ethanol production. The yeast *M. guilliermondii* was able to grow in synthetic medium in all the acetic acid concentrations tested, at pH 5.5. The concentrations of acetic acid evaluated were much higher than those commonly found in hemicellulosic hydrolysates. Growth inhibition occurred in concentrations of acetic acid beyond 10.5 g/L. The initial pH and the initial cell concentration influenced the growth and the acetic acid consumption. In synthetic medium containing glucose, pentoses and acetic acid as carbon sources, the highest specific growth rate was obtained in the treatment with the addition of 5 g/L of acetic acid, which was consumed concomitantly with the pentoses and glucose in all treatments, however the acetic acid was an inhibitor at the concentration of 10 g/L. Furfural inhibited the growth of the yeast in the concentration of 40 mg/L. The ethanol production by *M. guilliermondii* was lower comparing to the micro-organisms commonly utilized in the fermentation process. The yeast was able to grow and promote the biological detoxification even in the presence of the inhibitors like acetic acid and furfural, showing that the process requires optimization and that the yeast *M. guilliermondii* may be applied in biotechnological routes for the production of second generation ethanol.

INTRODUÇÃO

A produção de biocombustíveis para a substituição de combustíveis fósseis destacou-se nos últimos anos devido a necessidade de diminuir o consumo dos derivados de petróleo em função de fatores econômicos e ambientais. Neste contexto, o Brasil ocupa a posição de maior produtor de etanol oriundo da cana-de-açúcar.

As primeiras tentativas de inserção de etanol na matriz energética brasileira datam do início do século XX, porém foi a partir da década de 70 que o Brasil teve grande estímulo com o Programa Nacional do Alcool (PROALCOOL), o qual impulsionou o surgimento de destilarias, sobretudo nas usinas que já produziam açúcar. Contudo, foi no início do século XXI, com a inserção no mercado brasileiro de veículos com motores de ciclo Otto equipados com a tecnologia *flexfuel*, que o etanol teve sua maior ascensão no mercado brasileiro.

Com o aumento da frota houve também uma grande expansão das áreas de plantio de cana-de-açúcar, pois além do etanol as usinas remetem parte da matéria prima para a produção de açúcar. Entretanto, o etanol produzido hoje no país não atende a demanda do mercado interno sendo necessário complementar com a importação de combustíveis fósseis, como a gasolina. Este cenário tem fomentado a busca pelo aumento na produção de etanol sem comprometer áreas de plantio

destinadas à produção de alimentos. Desta forma, é essencial o desenvolvimento de tecnologias que aproveitem ao máximo toda a biomassa produzida pela cana-de-açúcar, como por exemplo, a produção de etanol celulósico, também denominado etanol de segunda geração.

Há vários desafios a serem vencidos no contexto da produção de etanol de segunda geração, especialmente na etapa de hidrólise da parede celular vegetal. Os tratamentos físico-químicos convencionalmente aplicados liberam compostos que podem afetar o crescimento e fermentação das leveduras selecionadas. As linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* comumente empregadas nas usinas e destilarias para a fermentação de mostos oriundos do caldo da cana de açúcar, melaços e outras fontes de dissacarídeos como a sacarose, são incapazes de metabolizar pentoses, açúcares liberados durante a hidrólise das hemiceluloses.

Muitas pesquisas têm sido realizadas com a finalidade de se encontrar micro-organismos naturalmente capazes de fermentar pentoses e hexoses, sendo que leveduras como *Candida* e *Pichia* têm sido citadas por apresentar tal característica. São poucos os micro-organismos capazes de fermentar pentoses em etanol, e as linhagens naturais ou modificadas apresentam baixo rendimento se comparadas a *S. cerevisiae* em substratos a base de hexoses. No entanto, além da capacidade fermentativa, as leveduras precisam apresentar tolerância aos agentes inibidores presentes nos hidrolisados, destacando-se ainda que a viabilidade do processo depende da capacidade de conversão de todas as fontes disponíveis de carbono em etanol. Entre os inibidores presentes em hidrolisados ácidos, destacam-se o furfural, hidroximetilfurfural e ácido acético.

Em vista da complexidade dos hidrolisados no tocante à sua composição química, não somente o etanol deve ser considerado como produto final do processo, mas também outros produtos de importante valor agregado. Da mesma forma, não somente os açúcares como glicose e xilose devem ser levados em consideração no cálculo de rendimento do processo, pois outras substâncias presentes nos hidrolisados podem também ser metabolizadas pelas leveduras e transformadas em produtos de interesse econômico. A possibilidade de utilização de ácido acético pela levedura *Meyerozyma guilliermondii* em estudo anteriormente realizado (MARTINI et al., 2016) visando a produção de etanol e xilitol a partir de hidrolisados, merece uma avaliação mais pormenorizada, uma vez que o ácido acético é considerado tóxico para as leveduras de uma forma geral. É neste

contexto que o presente trabalho visou contribuir para a produção biotecnológica de etanol de segunda geração, ao avaliar alguns fatores que afetam a assimilação de ácido acético por uma linhagem de *M. guilliermondii* em meio sintético na presença e ausência de açúcares e furfural.

OBJETIVOS

1 Objetivo geral

Avaliar o efeito do ácido acético sobre o crescimento e produção de etanol por uma linhagem de *M. guilliermondii*.

2 Objetivos específicos

- ✓ Avaliar o crescimento de uma linhagem da levedura *M. guilliermondii* em concentrações crescentes de ácido acético (1,5 a 19,5 g/L), em meio sintético contendo ácido acético como única fonte de carbono;
- ✓ Avaliar o efeito do pH (3,5 e 5,5) e da concentração inicial de células (0,2 g/L, 0,5 g/L e 2,5 g/L) sobre o crescimento de *M. guilliermondii* em meio sintético contendo ácido acético como única fonte de carbono;

- ✓ Avaliar o efeito do ácido acético (0, 5 e 10 g/L) e do furfural (0, 20 e 40 mg/L) em meio sintético contendo xilose, arabinose e glicose sobre o crescimento, consumo de açúcares e produção de etanol por *M. guilliermondii*.

REVISÃO DA LITERATURA

1 Etanol de segunda geração

A busca pela produção de energias renováveis tem crescido muito nos últimos anos fomentando a necessidade de aproveitamento das diversas fontes de biomassa disponíveis, sobretudo devido a abundância destas fontes e considerando ainda os fatores ambientais e de desenvolvimento tecnológico. O aproveitamento de resíduos lignocelulósicos para produção de bioetanol é uma tendência mundial, pois tais resíduos apresentam inúmeras vantagens, como alta disponibilidade e baixo custo (WEI et al., 2013).

No Brasil, o bagaço gerado na produção de açúcar e etanol pelas usinas é um dos resíduos agrícolas mais abundantes. O bagaço é uma fonte de biomassa oriunda da parte sólida fibrosa da planta, que é constituída principalmente de polissacarídeos como a celulose e a hemicelulose, compostos que são comumente encontrados nas paredes celulares das células vegetais. As hemiceluloses são heteropolímeros de pentoses e hexoses que podem ser fracionadas liberando estes açúcares para a produção do etanol de segunda geração (RAELE et al., 2014).

De acordo com Louime e Uckelmann (2008), o potencial e as perspectivas do etanol celulósico no mundo dependem de uma drástica redução de custos para as

principais etapas produtivas, que só poderão ser alcançados através de investimentos em inovações tecnológicas significativas. Macedo (2007) comenta que as perspectivas de aumento do consumo de biocombustíveis, sobretudo nos países desenvolvidos, requerem uma iniciativa mais ousada de modificação do processo industrial visando a construção de biorrefinarias integradas com potencial para conversão de toda a matéria prima em biocombustíveis e outros produtos de maior valor agregado.

A demanda futura por etanol com alta eficiência e sustentabilidade projeta a necessidade de aumentar significativamente sua produção nos próximos anos. Esse aumento poderá ser alcançado pela introdução de novas variedades de cana-de-açúcar e pelo aproveitamento integral da cana, incluindo a palha e o bagaço, para produção de etanol e outros combustíveis renováveis, ou mesmo por meio da biorrefinaria (SANTOS et al., 2012).

Segundo Cardona, Quintero e Paz (2010), uma maior utilização de biocombustíveis contribuiria para um desenvolvimento sustentável através da redução das emissões de gases de efeito estufa e do uso de recursos não renováveis. Nos últimos anos tem sido sugerido que, além das matérias-primas tradicionais, a biomassa lignocelulósica (celulose e hemicelulose), incluindo o bagaço de cana-de-açúcar, poderia ser utilizada como uma fonte abundante de açúcares fermentescíveis.

Para a conversão de toda a biomassa lignocelulósica em etanol, é necessária a aplicação de micro-organismos capazes de metabolizar pentoses (xilose e arabinose), que são carboidratos não diretamente fermentescíveis por leveduras industriais da espécie *S. cerevisiae*, sendo a biotransformação destas pentoses a etanol um dos desafios mais importantes a ser resolvido no âmbito científico e tecnológico atual (EMBRAPA, 2014).

A busca pela produção em escala industrial de etanol de segunda geração enfrenta grandes paradigmas devido a necessidade da quebra da matriz lignocelulósica, a qual libera compostos inibidores da fermentação, e açúcares que não são metabolizados pelos principais micro-organismos aplicados neste processo, inviabilizando a produção em larga escala até o momento. Todavia é um desafio que muitos pesquisadores têm buscado vencer, uma vez que é possível alcançar um grande aumento de produtividade com a utilização do bagaço e palha permitindo duplicar a quantidade de litros de etanol por hectare (RAELE et al., 2014).

A produção industrial de etanol celulósico encontra-se em estágio de plantas comerciais e o Brasil conta com um potencial instalado de 140 milhões de litros por ano, porém este aumento ainda é muito baixo para abranger a demanda interna de combustíveis, que hoje é suprida com combustíveis fósseis, sendo que no ano de 2012 o Brasil importou 2,2 bilhões de gasolina. O impacto da produção de etanol de segunda geração pode significar um aumento de até 50% na produtividade atual de etanol no Brasil, porém sua viabilidade ainda demanda avanços tecnológicos afim de minimizar os custos de produção, que estão em torno de R\$ 1,50 por litro, frente ao etanol de primeira geração, que custa R\$ 1,15 por litro produzido atualmente (MILANEZ et al., 2015).

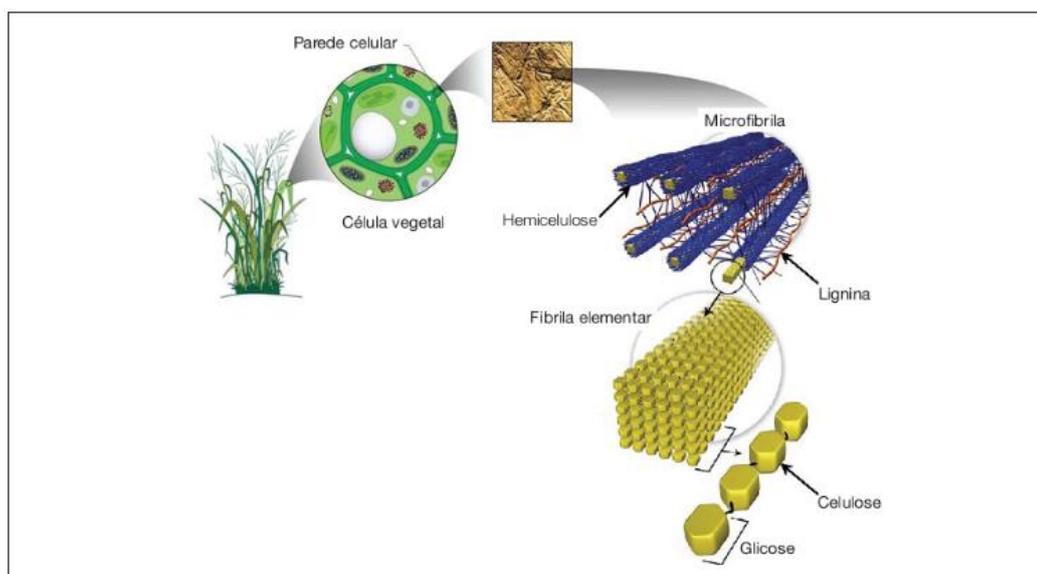
A levedura *M. guilliermondii* tem sido objeto de pesquisas com a finalidade de avaliar o potencial deste micro-organismo na produção de etanol e xilitol a partir de resíduos vegetais de diversas origens. Neste contexto, Matos et al. (2014) avaliaram o potencial biotecnológico de uma linhagem selvagem de *M. guilliermondii* isolada de cupins da Amazônia para aplicação em processos biotecnológicos, utilizando hidrolisado de bagaço de cana. Essa levedura demonstrou capacidade de crescer em D-xilose, termotolerância e sacarificação do substrato, aumentando os açúcares redutores disponíveis, além da neutralização do pH do meio. A eficiência de conversão de xilose em etanol foi baixa, requerendo otimização dos parâmetros fermentativos.

Uma linhagem de *M. guilliermondii* (CCT7783) isolada de caldo de cana-de-açúcar também apresentou baixos rendimentos em etanol a partir de hidrolisados de bagaço de cana, porém a capacidade de fermentar tanto xilose quanto arabinose e de crescer na presença de inibidores são características importantes desta linhagem em particular (MARTINI et al., 2016). É nesse contexto que o presente trabalho pretende contribuir, estudando a capacidade de assimilação de ácido acético da linhagem em referência em meios sintéticos otimizando parâmetros fermentativos.

2 Hidrólise da biomassa lignocelulósica

A biomassa lignocelulósica é uma das mais abundantes fontes de matéria prima para produção de biocombustíveis do planeta, porém os açúcares contidos em sua estrutura encontram-se na forma de polímeros de glicose e pentoses recobertos por uma macromolécula aromática complexa (lignina), formando uma microfibrila que constitui a parede vegetal (Figura 1). No interior da fração celulósica ocorrem ligações de hidrogênio inter-moleculares que conferem uma macroestrutura cristalina de alta recalcitrância e de difícil dissociação para obtenção dos açúcares fermentescíveis (CANILHA et al., 2010).

Figura 1. Parede celular da cana-de-açúcar



Fonte: Canilha et al. (2010)

Diversas técnicas têm sido estudadas para o tratamento da biomassa lignocelulósica a fim de promover o rompimento da macroestrutura fibrosa que envolve as pentoses e hexoses. Destacam-se neste contexto os tratamentos via hidrólise enzimática e físico-química. Na hidrólise enzimática é necessário um pré-tratamento com a finalidade de remover a lignina e modificar a estrutura da hemicelulose e celulose para posterior digestibilidade enzimática. Para isto é necessária a aplicação de reagentes ácidos ou alcalinos diluídos em condições brandas de temperatura e pressão que reagem com a fibra, solubilizando a lignina e

a hemicelulose e reduzindo a recalcitrância da matriz cristalina da celulose, permitindo assim a hidrólise desta por ação de celulases (SANTOS et al., 2012).

O pré-tratamento ácido têm se mostrado uma alternativa interessante, pois a hidrólise ácida da celulose tem como objetivo converter a celulose em glicose, após a quebra das ligações glicosídicas (MORAES; BROETTO, 2012). De acordo com Gonçalves et al. (2013), o pré-tratamento ácido é o mais empregado para liberar as pentoses e hexoses contidas na fração celulósica e hemicelulósica, devido ao baixo custo e velocidade de conversão, porém este apresenta como desvantagem a geração de compostos inibitórios que são tóxicos para os micro-organismos fermentadores, sendo necessária a eliminação destes antes da etapa de fermentação.

Vários autores comentam sobre a eficiência dos diversos tratamentos de hidrólise utilizando ácidos inorgânicos diluídos em condições físicas específicas (alta pressão e temperatura) que otimizam a solubilização dos açúcares polimerizados na fibra em seus monômeros constituintes. Este tratamento tem a vantagem de não apenas solubilizar a hemicelulose, mas também de convertê-la em açúcares fermentescíveis, o que elimina ou reduz a necessidade de se utilizar hemicelulases nos complexos enzimáticos durante a etapa de hidrólise enzimática (SANTOS et al., 2012).

Laopaiboon et al. (2010) analisaram a eficiência catalítica da hidrólise ácida em diversas condições de variação de temperatura, concentração de ácido (HCl e H₂SO₄) e tempo de reação. Os autores discorrem em seu trabalho que ao tratar a biomassa com ácidos diluídos (faixa de concentração dos ácidos entre 0,5 a 5 %), o açúcar liberado em maior quantidade foi a xilose, utilizando temperaturas de 90 a 110°C, sendo que acima destas condições, pode haver perda de xilose, pois esta poderá se decompor em furfural.

Segundo Cardona, Quintero e Paz (2010), o pré-tratamento continua sendo a etapa mais importante na produção de etanol a partir do bagaço da cana-de-açúcar, impactando diretamente na produção de etanol de segunda geração, não só do ponto de vista ambiental, mas também econômico. Além disso, os autores comentam que embora a tecnologia para este fim esteja em constante desenvolvimento, ainda há desafios que necessitam de mais pesquisas visando a obtenção de pré-tratamentos mais eficientes, e permitindo integrar os componentes

ideais em um sistema de produção de bioetanol com aproveitamento máximo do potencial da biomassa.

3 Detoxificação biológica

A hidrólise da biomassa lignocelulósica resulta na liberação dos açúcares e de compostos tóxicos oriundos da fração correspondente à lignina e hemicelulose. Tais compostos podem ser classificados em três grupos: derivados do furano (furfural e hidroximetilfurfural), derivados da lignina (compostos fenólicos) e ácidos orgânicos fracos (levulínico e acético). Estes subprodutos afetam o metabolismo dos micro-organismos, prejudicando a conversão dos açúcares nos produtos de interesse durante a fermentação. Isto ocorre não só pela presença e concentração destes inibidores, mas também pela atuação sinérgica entre eles, por isso diferentes métodos químicos, físicos e biológicos têm sido avaliados pela eficiência quanto à remoção destes compostos (ARRUDA et al., 2008).

Dentre os inibidores destaca-se a presença de ácidos alifáticos como o ácido acético, que é formado a partir dos radicais acetil presentes na estrutura da hemicelulose. Este ácido promove a redução do pH intracelular dos micro-organismos, e para evitar esta acidificação, a célula consome moléculas de ATP que seriam destinadas à produção da biomassa ou conversão em produtos de interesse. Lastauskiene et al. (2014) avaliaram os efeitos antimicrobianos do ácido acético em três diferentes linhagens de *Candida* sp comprovando que após 6h de incubação, em uma concentração mínima de 0,3% do ácido no meio de cultura, todas as células foram eliminadas. De acordo com Silva et al. (2004), o efeito inibitório do ácido acético no metabolismo da levedura *Candida guilliermondii* tem uma dependência do tempo de fermentação. Os autores observaram que ao adicionar o ácido ao meio após 12 h de fermentação, este provocou um decréscimo no consumo de xilose de 23,22% e reduziu em 11,24% o crescimento celular.

A detoxificação de hidrolisados de materiais lignocelulósicos empregando micro-organismos capazes de metabolizar ácidos alifáticos é um bioprocessos que vem se destacando, visto que não gera resíduos tóxicos ao meio ambiente. Diferentemente dos métodos físico-químicos, não promove perdas de açúcares fermentescíveis, podendo ainda ser parte integrante de uma rota de produção mais

econômica de etanol celulósico, sem perdas de volume do hidrolisado, como parte de um processo de eliminação seletiva de inibidores (FONSECA, 2009). Uma linhagem de *M. guilliermondii*, isolada de caldo de cana-de-açúcar e capaz de fermentar pentoses, assimilou ácido acético durante a fermentação de hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar (MARTINI et al., 2016).

Gonçalves et al. (2013) avaliaram a influência da concentração celular no metabolismo de açúcares e ácido acético pela levedura *Issatchenkia occidentalis* durante o processo de detoxificação de hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar. 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 detoxificação.

O estudo da metabolização de ácido acético por micro-organismos torna-se importante tendo em vista que o ácido acético é potencialmente tóxico para leveduras amplamente aplicadas na produção de etanol como *S. cerevisiae*. Pode-se verificar na Figura 2 que a utilização de ácido acético como fonte de carbono pode tanto levar à produção de biomassa quanto à produção de etanol em *S. cerevisiae*. Nessa última situação, o ácido acético é convertido a acetil coenzima A, em seguida à acetaldeído, o qual é reduzido a etanol (WEI et al., 2013).

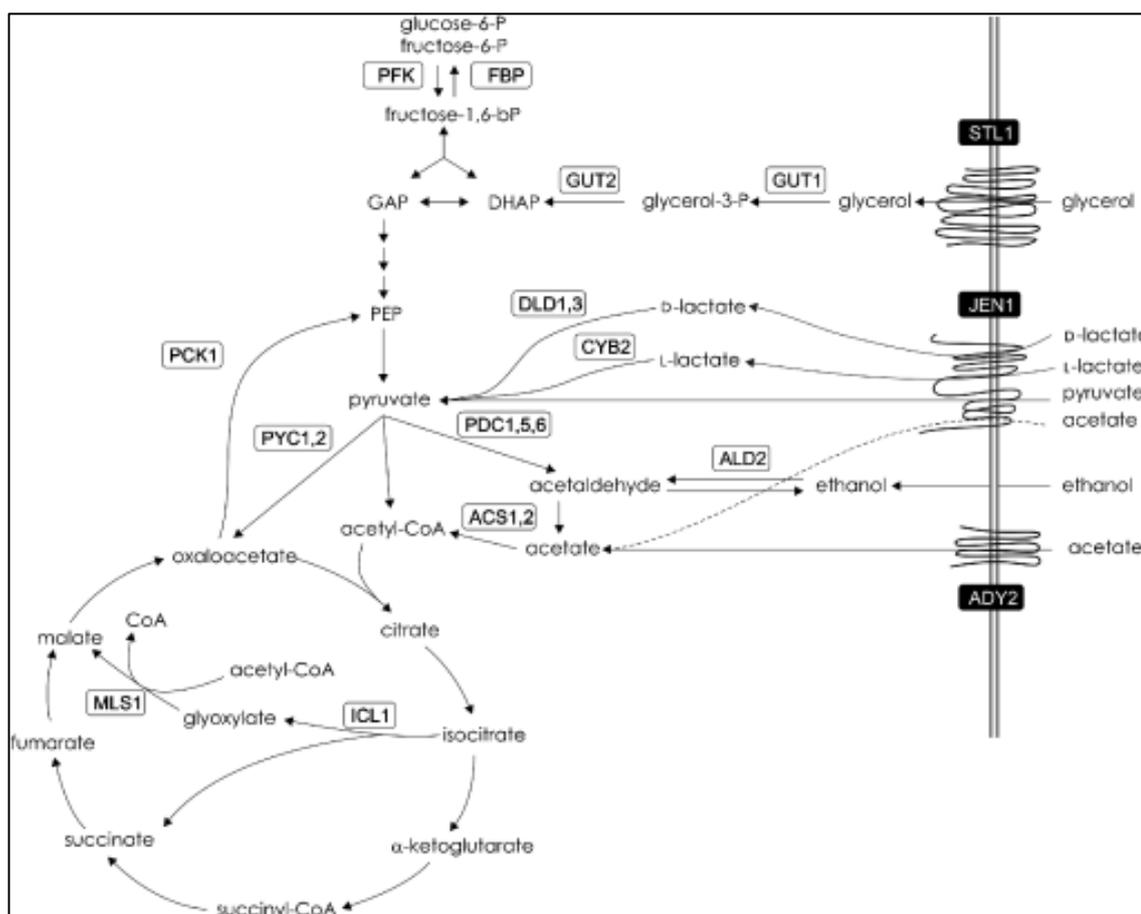
Martinez et al. (2003) avaliaram que a capacidade de metabolização de ácido por *C. guilliermondii* merece mais estudos por apresentar uma dependência da concentração deste ácido não dissociado, o que é, portanto, dependente do pH, e da disponibilidade de oxigênio. Esta capacidade de *C. guilliermondii* sugere que esta levedura pode atuar em processos de detoxificação biológica, aumentando a atividade fermentativa de hidrolisados de hemicelulose.

De acordo com Chandel, Silva e Singh (2012), a detoxificação empregando micro-organismos desperta o interesse devido à sua simplicidade em relação aos processos químicos, pois estes não geram resíduos e subprodutos e consomem menos energia. Porém, tal processo ainda é inviável para a indústria, devido a limitações no tempo reacional e a busca por micro-organismos que detoxificam seletivamente o hidrolisado sem reduzir as fontes de açúcares disponíveis.

Uma outra questão importante é avaliar a capacidade de remoção de um inibidor na presença de outro inibidor, uma vez que pode ocorrer um sinergismo de forma a comprometer a assimilação da substância pelo micro-organismo. Nesse

contexto, o presente trabalho pretende avaliar a assimilação de ácido acético na presença de furfural, outro importante inibidor gerado durante a hidrólise da biomassa hemicelulósica.

Figura 2. Principais vias metabólicas do metabolismo oxidativo e gluconeogênico em *S. cerevisiae*.



Fonte: CASAL et al. (2008)

LITERATURA CITADA

ARRUDA, P. V. et al. Efeito da destoxificação do hidrolisado de bagaço de cana sobre a remoção de fenóis, a perda de açúcares ea bioconversão de xilose em xilitol. **Revista Nucleus**, v. 5, n. 1, p. 166-182, 2008.

CANILHA, L. et al. Sacarificação da biomassa lignocelulósica através de pré-hidrólise ácida seguida por hidrólise enzimática uma estratégia de “desconstrução” da fibra. **Revista Analytica**, n. 44, p. 48-54, 2010.

CARDONA, C. A.; QUINTERO, J. A; PAZ, I. C. Production of bioethanol from sugarcane bagasse: status and perspectives. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 13, p. 4754-4766, 2010.

CASAL, M. et al. Transport of carboxylic acids in yeasts. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 32, p. 974-994, 2008.

CHANDEL, A. K.; SILVA, S. S.; SINGH, O. V. Detoxification of lignocellulose hydrolysates: biochemical and metabolic engineering toward white biotechnology. **Revista BioEnergy Research**, v. 6, n. 1, p. 388-401, 2012.

EMBRAPA. EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUARIA. Etanol lignocelulósico. Disponível em: <<http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/handle/doc/887226>>. Acesso em: 15/05/2014.

FONSECA, B.G. **Destoxificação biológica de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar empregando as leveduras *Issatchenkia occidentalis* e *Issatchenkia orientalis***. 111 f. Dissertação (Mestrado) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, 2009.

GONÇALVES, B. C. M. et al. Consumo de açúcares e ácido acético durante a destoxificação biológica de hidrolisado hemicelulósico pela levedura *Issatchenkia occidentalis* M1. **BBR – Biochemistry and Biotechnology Reports**, v. 2, n. 3, p. 372–375, 2013.

LAOPAIBOON, P. et. al. Acid hydrolysis of sugarcane bagasse for lactic acid production. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 1036-1043, 2010.

LASTAUSKIENE, E. et al. Formic acid and acetic acid induce a programmed cell death in pathogenic *Candida* species. **Current Microbiology**, v. 69, n. 3, p. 303-310, 2014.

LOUIME, C.; UCKELMANN, H. Potential and prospects of cellulosic ethanol in the world. **Current Science**, v. 94, n. 12, p. 1567-1568, 2008.

MACEDO, I. C. Situação atual e perspectivas do etanol. **Revista Estudos Avançados**, v. 21, n. 59, p. 157-165, 2007.

MARTINEZ, E. A. et al. The influence of pH and dilution rate on continuous production of xylitol from sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate by. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 1677-1683, 2003.

MARTINI, C. et al. A strain of *Meyerozyma guilliermondii* isolated from sugarcane juice is able to grow and ferment pentoses in synthetic and bagasse hydrolysate media. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 32, p. 1–9, 2016.

- MATOS, I. et al. Isolation, taxonomic identification and investigation of the biotechnological potential of wild-type *Meyerozyma guilliermondii* associated with Amazonian termites able to ferment D-xylose. **Bioscience Journal**, v. 30, n. 1, p. 260–266, 2014.
- MILANEZ, A. Y. et al. De promessa a realidade: como o etanol celulósico pode revolucionar a indústria da cana-de-açúcar - uma avaliação do potencial competitivo e sugestões de política pública. **BNDES setorial**, n. 41, p. 237-294, 2015.
- MORAES, A.S.; BROETTO, F. Pré-hidrólise ácida de bagaço de cana-de-açúcar e sua caracterização físico-química. **Revista Energia na Agricultura**, v. 27, n. 4, p. 1-12, 2012.
- RAELE, R. et al. Scenarios for the second generation ethanol in Brazil. **Technological Forecasting and Social Change**, v. 87, p. 205–223, 2014.
- SANTOS, F.; QUEIRÓZ, J.; COLODETTE, J. Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol. **Química Nova**, v. 35, n. 5, p. 1004-1010, 2012.
- SILVA, D. D. V. et al. Inhibitory effect of acetic acid on bioconversion of xylose in xylitol by *Candida guilliermondii* in sugarcane bagasse hydrolysate. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, p. 248–254, 2004.
- WEI, N. et al. Enhanced biofuel production through coupled acetic acid and xylose consumption by engineered yeast. **Nature Communications**, v. 4, 2013. doi:10.1038/ncomms3580.

CAPÍTULO 1. Efeito da concentração do ácido acético, pH e concentração celular sobre o crescimento da levedura *M. guilliermondii* em meio sintético contendo ácido acético como única fonte de carbono

1 Resumo

Na produção de etanol de segunda geração emprega-se a hidrólise ácida das fibras vegetais, devido ao baixo custo e eficiência na liberação dos açúcares, todavia ocorre a liberação de compostos tóxicos como o ácido acético, cuja remoção físico-química onera o processo inviabilizando a produção. Neste contexto, a detoxificação biológica desperta interesse. O presente trabalho objetivou avaliar a capacidade de metabolização de ácido acético por uma linhagem da levedura *Meyerozyma guilliermondii* (CCT7783), nas concentrações de 1,5; 2,5; 4,5; 10,5; 13,5; 16,5 e 19,5 g/L, a 30° C, 160 rpm, pH 5,5, com concentração inicial de 0,2 g/L de massa seca durante um período de incubação de 96 h. Em seguida, avaliou-se o efeito do pH inicial e da concentração inicial de massa celular sobre o crescimento da levedura, sendo que para faixa de pH 3,5 as concentrações de massa seca testadas foram de 0,5 e 2,5 g/L e para o pH 5,5, as concentrações foram 0,2; 0,5 e 2,5 g/L, nas mesmas condições de cultivo da primeira fase. Os resultados mostraram que a

levedura *M. guilliermondii* foi capaz de crescer e consumir ácido acético nas diferentes concentrações testadas, em pH 5,5 com melhor desempenho em 10,5 g/L de ácido acético. Não houve crescimento em pH 3,5. A forma não dissociada do ácido acético é o que causou inibição do crescimento celular. Em pH 5,5, a maior variação de massa seca ocorreu em meio inoculado com 2,5 g/L de massa seca inicial. Nessas condições, com 10,5 g/L de ácido acético, houve uma produção máxima de apenas 1,47 g/L de etanol. A velocidade específica de crescimento máxima foi de 0,023 h⁻¹ e a constante de saturação (K_s) foi 0,75 g/L de ácido acético. Os resultados obtidos denotam a importância de avaliar a capacidade de metabolização do ácido acético na presença de substratos e inibidores presentes em hidrolisados hemicelulósicos.

2 Introdução

A viabilidade da produção de etanol de segunda geração a partir de resíduos lignocelulósicos industriais, que é uma das matérias primas mais abundantes no mundo, enfrenta hoje inúmeros desafios tais como a eliminação dos compostos tóxicos liberados na etapa de hidrólise ácida da fibra vegetal.

O processo de hidrólise ácida é o mais empregado, devido ao baixo custo e eficiência na conversão da celulose e hemicelulose em seus açúcares constituintes. Todavia, a não seletividade dos reagentes químicos empregados, em condições elevadas de pressão e temperatura, favorecem a liberação de compostos que inibem o metabolismo dos principais micro-organismos fermentadores aplicados no processo industrial, como *S. cerevisiae*.

Os compostos inibidores são oriundos da decomposição da lignina, hemicelulose e polissacarídeos que compõe a biomassa lignocelulósica, sendo classificados como compostos furanos, fenólicos e ácidos orgânicos fracos. (PALMQVIST; HAHN-HÄGERDAL, 2000). Dentre os compostos inibidores, o ácido acético salienta-se como um importante agente tóxico, pois afeta negativamente as vias metabólicas das leveduras. Como agente estressante este pode atuar de várias formas, como por exemplo, ativar vias metabólicas que promovem a sobrevivência, nas condições de estresse, ou até causar morte celular programada (SILVA et al., 2013).

O ácido acético, também conhecido como ácido etanóico, é um ácido carboxílico alifático presente na hemicelulose e, por isso, apresenta-se em quantidades notáveis nos hidrolisados ácidos de biomassa lignocelulósica, sendo necessária a sua remoção em uma etapa de pré-tratamento antes do início da fermentação. Tal etapa onera o processo devido ao alto custo com reagentes químicos, processos de filtração e tratamento dos resíduos gerados (HAMELINCK; HOOIJDONK; FAAIJ, 2005).

A metabolização do ácido acético por alguns micro-organismos tem despertado interesse, uma vez que estes micro-organismos podem ser empregados no tratamento dos hidrolisados ácidos de bagaço de cana de açúcar em um processo de detoxificação biológica. Esta é uma rota alternativa para eliminação dos compostos inibidores que apresenta como principais vantagens a redução de custos com o emprego de reagentes químicos e tratamento dos resíduos, contribuindo ainda para a sustentabilidade do processo, minimizando os impactos que estes resíduos causam ao meio ambiente. Contudo são necessários estudos que comprovem a eficácia dos processos de detoxificação biológica, uma vez que a grande maioria dos micro-organismos é afetada negativamente por inibidores como o ácido acético.

Martini et al. (2016) observaram a redução da concentração de ácido acético em hidrolisados ácidos de bagaço de cana-de-açúcar em pH 5,5 e, aproximadamente, 5 g/L de ácido acético, nos cultivos com a levedura *M. guilliermondii*, isolada de caldo de cana-de-açúcar. Sendo esta uma característica importante, denota-se a necessidade de um estudo mais detalhado sobre a capacidade de assimilação deste ácido pela levedura *M. guilliermondii*, pois tal estudo poderá contribuir significativamente para a implementação de rotas mais eficientes de produção de etanol de segunda geração. Neste contexto, o presente trabalho visou avaliar o crescimento de uma linhagem de *M. guilliermondii*, a mesma utilizada por Martini et al. (2016), em meio sintético contendo concentrações crescentes de ácido acético (de 0 a 19,5 g/L), bem como avaliar o efeito da variação de pH (3,5 e 5,5) e concentração celular (0,2; 0,5 e 2,5 g/L) no crescimento da levedura tendo o ácido acético como única fonte de carbono.

3 Materiais e Métodos

3.1 Preparo do inóculo

Utilizou-se uma linhagem de *M. guilliermondii*(código 311, depositada sob número CCT7783 na coleção de culturas da Fundação André Toselo, Campinas, SP). Os procedimentos de isolamento, identificação e caracterização estão descritos em Martini et al. (2016). A linhagem tem sido mantida em tubos contendo YPD (10 g/L extrato de levedura, 10 g/L peptona, 20 g/L glicose, 20 g/L ágar, em água destilada), sob refrigeração, no Laboratório de Microbiologia Agrícola e Molecular (LAMAM), CCA-UFSCar – *Campus* de Araras.

Para obtenção da massa celular necessária aos experimentos, a levedura foi reativada em placas de Petri contendo meio YPD. As placas foram incubadas a 30°C e após três dias de crescimento, foram retiradas duas alçadas e inoculadas em 50 mL de YPD líquido em Erlenmeyers de 125 mL. A incubação foi feita a 30°C, por 12-18 h, sob agitação de 160 rpm, em incubadora Tecnal (modelo TE-421). Em seguida, as células foram centrifugadas e lavadas com água destilada estéril, ressuspensas em YPD e inoculadas novamente em 150 mL de YPD em Erlenmeyers de 500 mL, sendo estes incubados sob as mesmas condições de agitação e temperatura. As células foram então centrifugadas e lavadas em água estéril, sendo este procedimento repetido por duas vezes. Ao final, a massa celular foi ressuspensa em água estéril, constituindo-se o inóculo para as etapas seguintes.

3.2 Preparo do meio de crescimento

O meio de crescimento consistiu de uma solução de sais e nutrientes com a seguinte constituição: 5 g/L de fosfato hidrogenado de potássio; 1 g/L de cloreto de potássio; 1,5 g/L de cloreto de amônio; 1 g/L de sulfato de magnésio heptahidratado; 6 g/L de extrato de levedura; e água destilada. Foram distribuídos 85 mL do meio de crescimento para Erlenmeyers de 500 mL, os quais foram autoclavados a 120°C e 1atm por 20 minutos.

3.3 Ensaio de cultivo

3.3.1 Efeito da concentração de ácido acético sobre o crescimento de *M. guilliermondii* em meio semi-sintético contendo ácido acético como única fonte de carbono

Aos frascos contendo o meio de crescimento adicionou-se, em condições assépticas, um volume de ácido acético glacial para a obtenção de concentrações finais de 1,5; 4,5; 10,5; 13,5; 16,5 e 19,5 g/L de ácido acético. Em seguida foi adicionado o inóculo para uma concentração final de 0,2 g/L de massa seca. O volume final dos frascos foi acertado para 100 mL com água destilada estéril. A padronização de biomassa foi realizada por meio da leitura da absorbância a 600 nm em espectrofotômetro Thermo® Biomate 3, considerando-se a conversão dos valores de absorbância em massa seca pela utilização de uma curva-padrão “Absorbância X Massa seca”, com a seguinte equação:

$$\text{Massa seca em g/L} = [(\text{Absorbância} - 0,119)/1,6927] \times \text{Diluição}. \quad (1)$$

O pH do meio de crescimento foi acertado para 5,5 com a adição de solução de NaOH (12 mol/L) em gotas com agitação, em condições assépticas. Os frascos, em duplicata para cada tratamento, foram mantidos em incubadora, a 160 rpm, a 30°C, por 96 h, retirando-se amostras de 5 mL a cada 12 h.

Como controle do crescimento da levedura, foram preparados dois frascos com meio de crescimento adicionado de 20 g/L de glicose como fonte de carbono, nas mesmas condições de pH, inóculo e incubação.

No total, foram preparados 14 frascos, dois frascos para cada concentração de ácido acético (6 no total) e 2 frascos controle (com glicose).

3.3.2 Efeito do pH inicial e da concentração inicial de células sobre o crescimento de *M. guilliermondii* em meio sintético contendo ácido acético como única fonte de carbono

Aos frascos contendo o meio de crescimento foi adicionado o ácido acético, assepticamente, na concentração final de 10,5 g/L. Em seguida adicionou-se o inóculo para concentrações finais de 0,5 e 2,5 g/L de massa seca. O volume final dos frascos foi acertado para 100 mL com água destilada estéril. A padronização foi realizada por meio da leitura da absorbância a 600 nm em espectrofotômetro Thermo® Biomate 3, considerando-se a conversão dos valores de absorbância em massa seca pela utilização da equação (1). O pH do meio de crescimento foi acertado para 3,5 e 5,5 com solução de NaOH (12 mol/L), em gotas, com agitação, em condições assépticas. Os frascos, em duplicata para cada tratamento, foram mantidos em incubadora, a 160 rpm, a 30°C, por 96 h, retirando-se amostras de 5 mL a cada 12 h.

No total, foram preparados 8 frascos, dois frascos para cada valor de pH do meio de crescimento (pH 3,5 e 5,5), em cada concentração inicial de células (0,5 e 2,5 g/L de massa seca).

3.3.1 Análises físico-químicas e instrumentais

Inicialmente, foi analisada a produção de massa seca (g/L) por meio da leitura da absorbância das amostras a 600 nm em espectrofotômetro Thermo® Biomate 3, considerando-se a conversão dos valores de absorbância em massa seca pela utilização de uma curva-padrão, conforme descrito no item 3.1.3.

As amostras foram centrifugadas a 3600 rpm por 5 minutos em centrífuga refrigerada Eppendorf®, sendo os sobrenadantes armazenados a -15°C para as análises de pH, teor de açúcares e cromatográficas.

Os valores de pH foram medidos em pH-metro digital MS TECNOPON modelo mPA210.

Para as análises cromatográficas, inicialmente as amostras foram filtradas em membrana de PTFE hidrofílico da marca Analítica, porosidade 0,45 μm . Etanol e ácido acético foram quantificados por cromatografia em fase gasosa com detector de ionização de chama (FID) GC-2010 Plus da marca SHIMADZU[®], e coluna Restek Stabilwax-DA (30m x 0,25mm x 0,25mm) nas seguintes condições: Temperatura do injetor: 220°C; gás de arraste: Hélio; velocidade linear do gás de arraste: 20 cm/seg; taxa de *split*: sem *split*; temperatura do FID: 280°C; temperatura da coluna: 30°C por 5 minutos, incremento de 12°C/min até 100°C, seguido de incremento de 15°C/min até 165°C, seguido de incremento de 80°C até 230°C mantendo esta temperatura por 6 minutos.

3.3.2 Análises cinéticas e estatísticas

A velocidade específica máxima de crescimento (μ_{max} , h^{-1}) foi calculada por meio da regressão linear do logaritmo neperiano (\ln) da concentração de massa seca da levedura *M. guilliermondii* (X , g/L) em função do tempo, na fase exponencial de acordo com a equação proposta por Pirt (1985) citado por Ribeiro e Horii (1999):

$$\ln[X]=\mu_{(\text{max})}.t + b \quad (2)$$

Onde:

[X]= concentração de leveduras na fase exponencial de crescimento (g/L);

$\mu_{(\text{max})}$ = velocidade específica máxima de crescimento (h^{-1});

b = coeficiente linear da curva de \ln da concentração de *M. guilliermondii* em função do tempo de fermentação, na fase exponencial de crescimento (g/L).

Os resultados obtidos foram submetidos à análise estatística, aplicando-se inicialmente análise de variância e em seguida a comparação de médias pelo teste de Tukey, a 5% de significância. Foi utilizado o *software* R para os testes estatísticos, considerando-se delineamento inteiramente casualizado.

A partir da concentração inicial de ácido acético (g/L) e das velocidades específicas de crescimento (μ , h^{-1}), em cada tratamento, calculou-se a constante de

saturação do substrato (K_s , g/L) e a velocidade máxima de crescimento (μ_m , h^{-1}) aplicando a equação de Monod linearizada:

$$1/\mu = k_s/\mu_{max} \cdot 1/S + 1/\mu_{max} \quad (3)$$

3.3.3 Análises físico-químicas e instrumentais

Foram analisadas a produção de massa seca (g/L) por meio da leitura da absorbância das amostras a 600 nm em espectrofotômetro Thermo® Biomate 3, considerando-se a conversão dos valores de absorbância em massa seca pela utilização de uma curva-padrão, conforme descrito no item 3.1.3. Os valores de pH foram medidos em pH-metro digital MS TECNOPON modelo mPA210.

Etanol e ácido acético foram quantificados por cromatografia em fase gasosa conforme descrito no item 3.1.4

3.3.4 Análises cinéticas e estatísticas

Foi calculada a velocidade específica máxima de crescimento (μ_m , h^{-1}) por meio da regressão dos dados de ln massa seca X tempo, considerando-se o coeficiente angular como a velocidade específica máxima de crescimento. Os resultados obtidos foram submetidos à análise estatística, aplicando-se inicialmente análise de variância e em seguida a comparação de médias pelo teste de Tukey, a 5% de significância. Foi utilizado o *software* R para os testes estatísticos aplicados, considerando-se um delineamento experimental fatorial 2 X 3 incompleto, sendo dois níveis de pH inicial (3,5 e 5,5) e três níveis de concentração inicial de células (0,2, 0,5 e 2,5 g/L). Para o tratamento com pH inicial de 5,5 e concentração inicial de 0,2 g/L de massa seca, considerou-se aqueles obtidos no experimento anterior cuja metodologia de análise está descrita no item 3.1.4.

4 Resultados e Discussão

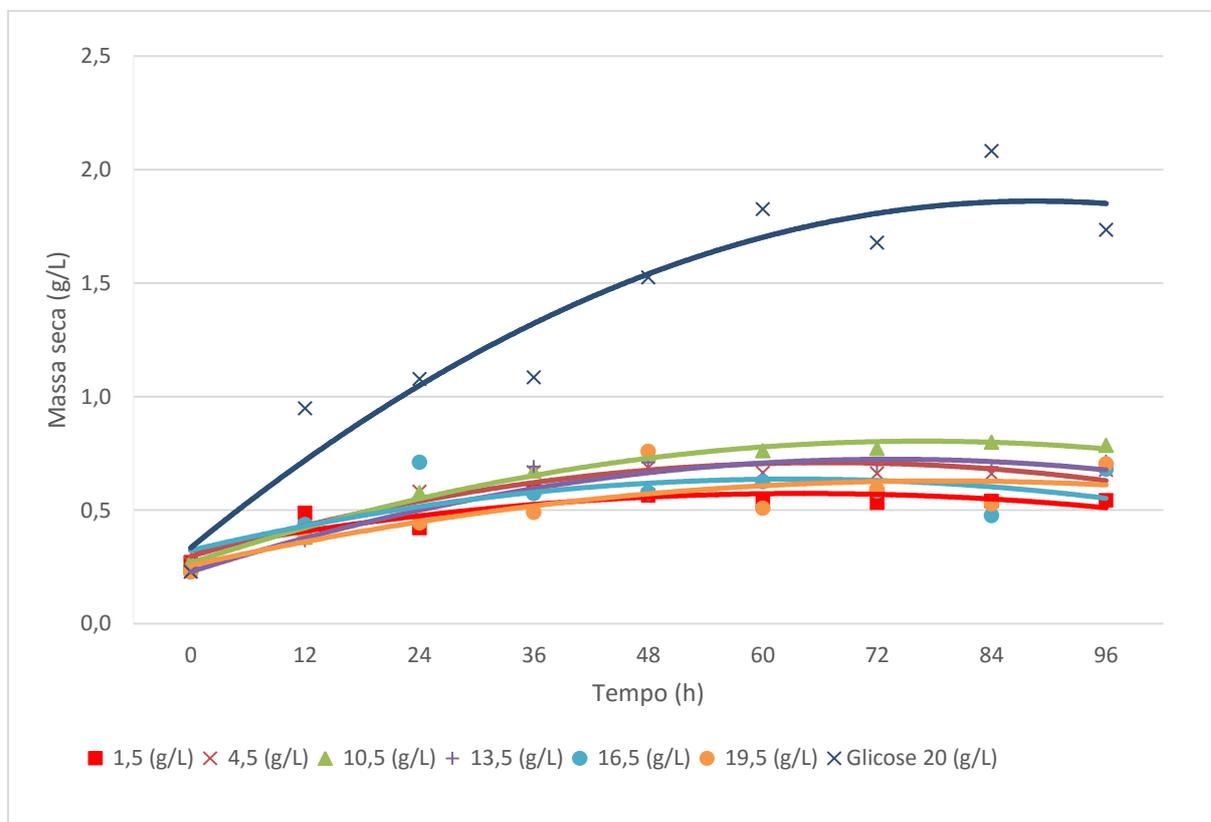
4.1 Efeito do ácido acético sobre o crescimento de *M. guilliermondii* em meio sintético

Os resultados do crescimento celular (g/L) de *M. guilliermondii* durante as 96 h de incubação em meio sintético contendo ácido acético como única fonte de carbono, estão representados na Figura 1. Houve crescimento da levedura em todas as concentrações testadas (1,5 a 19,5 g/L de ácido acético), confirmando a observação de Martini et al. (2016). No referido trabalho, a autora verificou uma variação na concentração de ácido acético evidenciando um possível consumo deste inibidor pela linhagem de levedura em estudo, dentro de um período de 144 h de fermentação. A concentração de ácido acético no hidrolisado era por volta de 4 g/L.

As curvas apresentadas na Figura 1 demonstram que mesmo para o tratamento em que o crescimento foi menos expressivo (1,5 g/L de ácido acético), houve um aumento maior que 100% de biomassa ao final do período experimental. Para os tratamentos com 10,5 e 13,5 g/L de ácido acético, as concentrações celulares ao final do cultivo foram 3 vezes maiores que a concentração inicial. Destaca-se ainda o tratamento com concentração inicial de 10,5 g/L de ácido acético como sendo a maior concentração de ácido acético em que não houve inibição do crescimento, sendo este um parâmetro importante na aplicação de processos de detoxificação biológica. Aguilar et al. (2002) verificaram uma concentração máxima de 5,1 g/L de ácido acético em hidrolisados obtidos a partir de hidrólise de biomassa lignocelulósica utilizando ácido sulfúrico diluído como catalisador.

Em meio sintético contendo glicose como única fonte de carbono (20 g/L), o crescimento da levedura foi expressivamente maior que nos meios contendo ácido acético, chegando a 2,082 g/L em 84 h de incubação (Figura 1), mesmo comparando-se as curvas de crescimento em que as fontes de carbono estavam na mesma faixa de concentração (20 g/L glicose e ácido acético na concentração de 19,5 g/L).

Figura 1. Massa seca (g/L) de *M. guilliermondii* em meio sintético contendo diferentes concentrações de ácido acético (1,5 a 19,5 g/L) em comparação com meio sintético contendo glicose como única fonte de carbono, a 30°C, 160 rpm, pH 5,5.



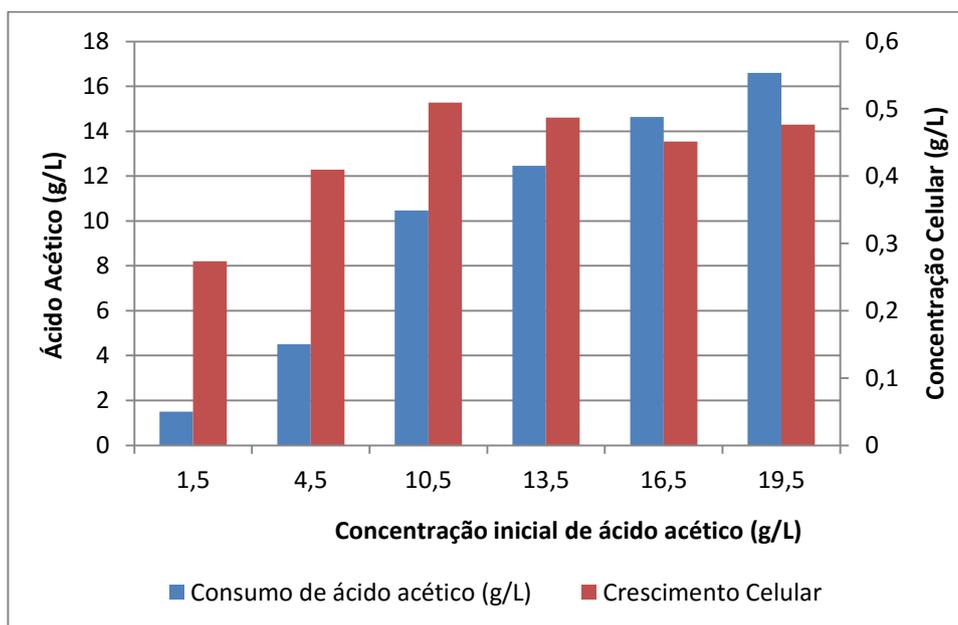
Felipe et al. (1997) verificaram o consumo de ácido acético por uma linhagem de *C. guilliermondii* em meio contendo 4,5 g/L de ácido acético, em um período de incubação de 48 h.

A análise por cromatografia gasosa permitiu avaliar a variação da concentração de ácido acético e comparar com a produção de biomassa (Figura 2), sendo possível verificar que o aumento do consumo de ácido acético favoreceu a produção de biomassa de forma crescente, até aproximadamente 10,5 g/L de ácido acético inicial corroborando com os resultados apresentados na Figura 1.

Para as tratamentos com valores iniciais de ácido acético acima de 10,5 g/L verificou-se ainda uma variação grande na concentração de ácido acético, porém houve um efeito inibitório sobre o crescimento celular. Fonseca et al. (2011) avaliaram a concentração de ácido acético presente em hidrolisados de casca de café, bagaço de cana-de-açúcar e fibra de milho encontrando um máximo de 3,79

g/L do inibidor nestes resíduos. Além disso, os autores avaliaram ainda a capacidade de detoxificação biológica de uma linhagem de *I. occidentalis*, verificando que após 72 h de incubação a linhagem em questão promoveu uma detoxificação de apenas 6,1% em meio concentrado de hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar, cuja concentração de ácido acético não excedeu 3,3 g/L. No tratamento com concentração inicial de 19,5 g/L de ácido acético, a levedura aqui avaliada promoveu uma remoção máxima de 16,60 g/L de ácido acético em 96 h de incubação (Figura 2), denotando uma importante característica da linhagem de levedura aqui empregada.

Figura 2. Variação do consumo de ácido acético (g/L) e da concentração celular (g/L) de *M. guilliermondii* em meio sintético contendo concentrações crescentes de ácido acético (1,5 a 19,5 g/L) como única fonte de carbono, a 30°C, 160 rpm, pH 5,5 em 96 h de incubação.



Os resultados da variação de pH ao longo do período de incubação demonstram que nos tratamentos de até 10,5 g/L de concentração de ácido acético, o pH variou bruscamente nas 12 h de incubação (Figura 3), sobretudo para os tratamentos de 1,5 e 4,5 g/L, nos quais o pH do meio subiu 2,65 e 2,07 pontos, respectivamente. Tal variação está de acordo com o crescimento celular dos tratamentos neste período (Figura 1) e com a diminuição na concentração de ácido

acético no meio (Figura 4), demonstrando que a levedura *M. guilliermondii* foi capaz de eliminar a maior parte do ácido acético disponível nas primeiras 12h de incubação.

Figura 3. Valores de pH dos cultivos de *M. guilliermondii* em meio sintético contendo ácido acético como única fonte de carbono em concentrações variando de 1,5 a 19,5 g/L, a 30°C, 160 rpm.

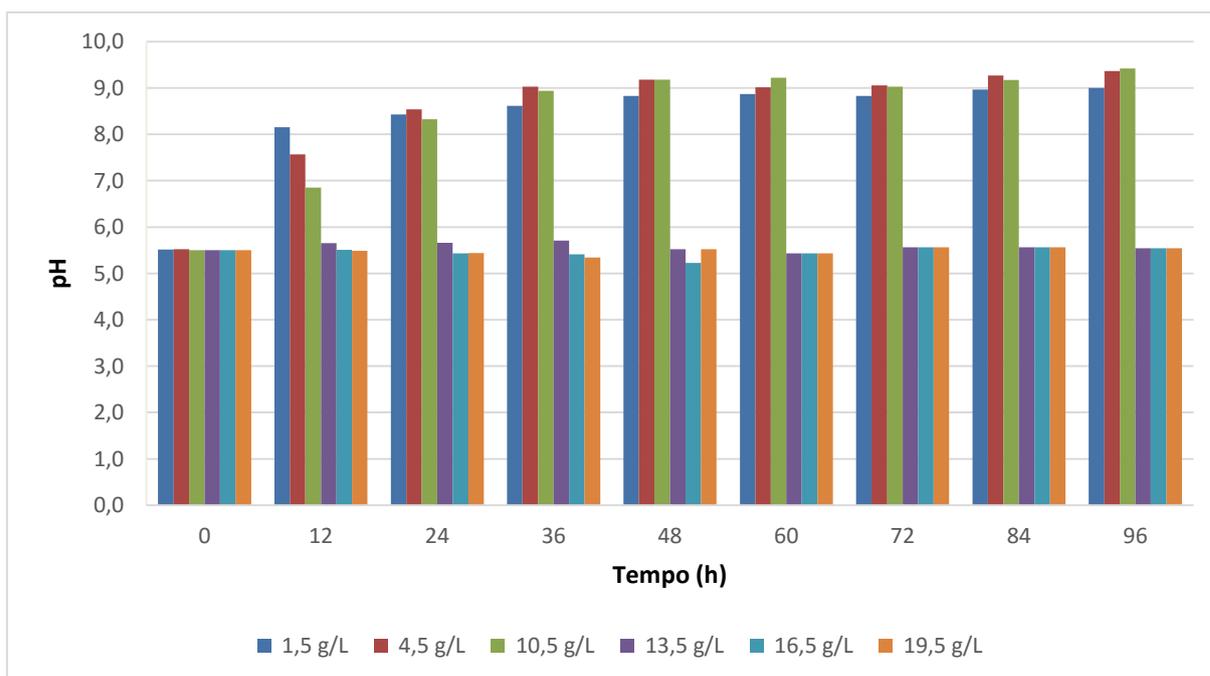
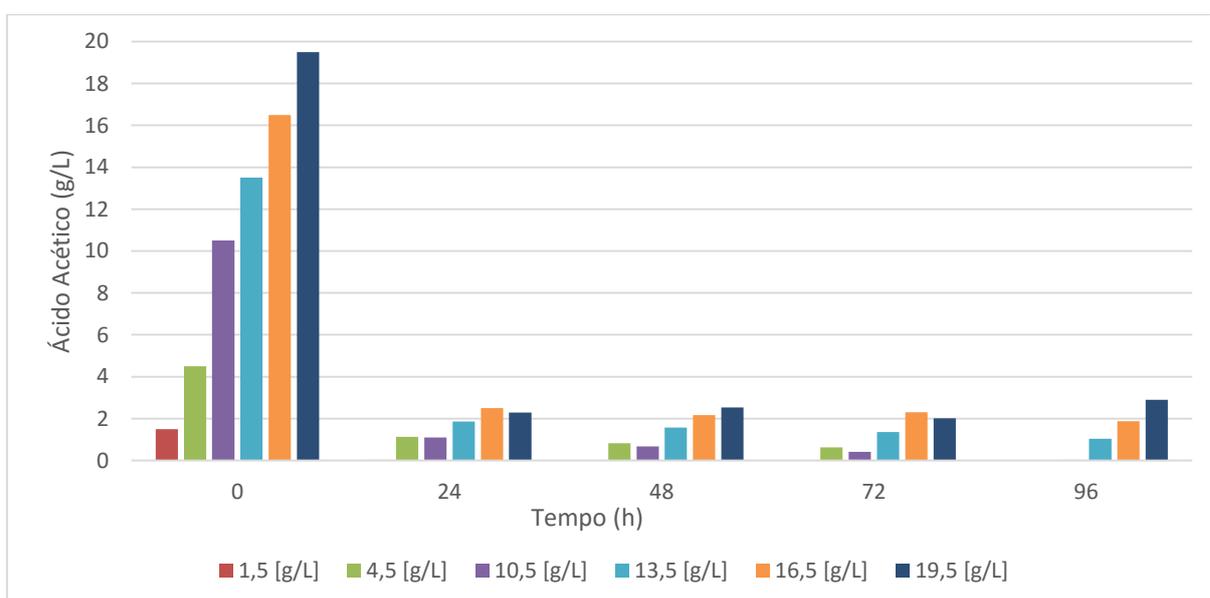


Figura 4. Variação da concentração de ácido acético (g/L) dos cultivos de *M. guilliermondii* em meio sintético contendo diferentes concentrações de ácido acético (1,5 a 19,5 g/L) como única fonte de carbono, a 30°C, 160 rpm, pH 5,5.



No tratamento com 10,5 g/L de ácido acético, houve maior alcalinização do meio ao final das 96 h de incubação (Figura 3). Tais resultados corroboram com aqueles observados quanto ao crescimento celular (Figura 1). Além disso, para os tratamentos acima de 10,5 g/L de ácido acético, o pH teve uma faixa de variação muito pequena em relação ao pH inicial (Figura 3), sendo estas as concentrações em que observou-se um decréscimo no crescimento celular em relação ao aumento de ácido acético no meio (Figura 2). Rodriguez-Chong et al. (2004) verificaram que concentrações de ácido acético acima de 4 g/L podem inibir o crescimento celular de leveduras pela redução do pH intracelular devido a um consumo energético da célula para manutenção do mesmo, sendo este efeito observado neste experimento para os tratamentos cujas concentrações foram acima de 10,5 g/L de ácido acético (Figura 2).

Rodrigues et al. (2006) verificaram um consumo expressivo de ácido acético por *C. guilliermondii* com uma variação muito pequena no pH durante a fermentação em hidrolisados ácidos de bagaço de cana-de-açúcar. Tal efeito foi apontado pelos autores como tamponamento do meio de crescimento, onde ocorreu o consumo do ácido sem alterar bruscamente o pH. Este efeito pôde também ser observado neste experimento para concentrações de ácido acético de 13,5; 16,5 e 19,5g/L (Figura 3). Pereira, Mussatto e Roberto (2011) também observaram efeito similar, relatando uma variação pequena do pH na presença de ácido acético durante o cultivo de *S. cerevisiae* em meio definido, onde foi verificada uma redução de 2,8 unidades de pH em meios sem ácido acético, enquanto que na presença deste ácido, a variação observada foi menor que 1,0 unidade. De acordo com Palmqvist e Hähn-Hägerdal (2000), a dissociação parcial de ácidos alifáticos pode favorecer o tamponamento em valores próximos a sua faixa de pka, que é de 4,76 para o ácido acético.

Thomas, Hynes e Ingledew (2002) avaliaram o efeito do tamponamento de meio sintético a partir da adição de ácido acético na faixa de pH 4,5, observando a formação de um efeito tamponante ao adicionar 10g/L de extrato de levedura em meios fermentativos com adição de ácido acético e lático. Os autores justificaram que os aminoácidos nestes suplementos sequestram os prótons mantendo um equilíbrio entre ácido dissociado e não dissociado, pois com a adição de 167 mM (10,02 g/L) de ácido acético, os autores detectaram a presença de 102 mM (6,02 g/L) de acetato. Salienta-se ainda que no presente trabalho adicionou-se ácido

acético como única fonte de carbono presente no meio e que a suplementação de extrato de levedura foi de 6 g/L, porém mesmo trabalhando em faixa de pH (5,5) próximo ao pKa (4,7), o efeito do tamponamento foi evidenciado apenas nos tratamentos em que não houve o consumo total do ácido acético, corroborando assim com os resultados das análises da concentração de ácido acético (Figura 4) e os resultados da variação de pH (Figura 3).

Além disso, a análise da variação da concentração de ácido acético (Figura 4) permitiu verificar que nas primeiras 24 h de incubação houve um decréscimo acentuado do ácido em todos os tratamentos. Tais resultados estão de acordo com aqueles apresentados na análise de crescimento celular (Figura 1), em que verificou-se o período de maior incremento de biomassa nas primeiras 24 h de incubação.

Vilela-Moura et al. (2011) verificaram que o metabolismo do ácido acético por leveduras, em meios sintéticos, tendo este como única fonte de carbono, envolve a proteína Ady2p, que é responsável pela capacidade de transportar acetato, o qual será metabolizado em acetil coenzima A e em seguida, oxidado no ciclo do ácido tricarboxílico. Os autores comentam ainda que quando o crescimento ocorre em meios tendo o ácido acético como única fonte de carbono, a acetil coenzima A também é utilizada para produzir succinato e, portanto, reconstituir a célula com precursores biossintéticos através do ciclo do glioxilato, que envolve as enzimas isocitrato liase e malato sintetase. Nessa situação, a célula obtém ATP para crescimento pela via oxidativa. Ylivero, Fràzen e Taherzadeh (2014) avaliaram os efeitos de altas concentrações de ácido acético (2,5 a 20 g/L) em processo de fermentação contínua, com alta concentração celular de *S. cerevisiae* imobilizada e pH 5,0. Os autores avaliaram que, mesmo mantendo condições de alto rendimento neste processo, houve uma queda de 20 a 30% nas densidades celulares para todos os tratamentos quando a concentração subiu de 2,5 para 20 g/L na alimentação do meio. Tais efeitos são apontados pelos autores como morte celular por estresse devido às altas concentrações de ácido acético.

Os resultados apresentados acima comprovam que *M. guilliermondii* foi capaz de assimilar ácido acético, que é um dos inibidores presentes em hidrolisados hemicelulósicos. Sua eliminação é um dos problemas que dificulta a viabilização do aproveitamento da biomassa lignocelulósica para produção de bioetanol e outros produtos de maior valor agregado. Tais avaliações denotam uma importante

característica deste micro-organismo, devido a possibilidade de aplicação na detoxificação de ácido acético em processos biotecnológicos. Luján-Rhenals, Moraw e Ricke (2014) comprovaram que concentrações acima de 2 g/L de ácido acético inibem a atividade de micro-organismos fermentadores amplamente aplicados na indústria, como *Zymomonas mobilis* e *S. cerevisiae*.

Esta característica é bastante interessante para a aplicação deste micro-organismo em etapas de detoxificação de hidrolisados ácidos de biomassa lignocelulósica, além do fato dessa levedura ser capaz também de fermentar xilose e arabinose em meios sintéticos e hidrolisados (MARTINI et al., 2016). Gonçalves et al. (2013) verificaram o consumo total de ácido acético pela levedura *I. occidentalis* M1, ao avaliar a capacidade desta levedura para processos biotecnológicos de produção de xilitol a partir de hidrolisados ácidos de bagaço de cana-de-açúcar. Os autores afirmam que esta é uma característica muito importante, podendo estas leveduras serem parte de uma via de produção econômica e eficiente.

Os resultados da análise estatística mostraram que houve diferença mínima significativa, ao nível de 5%, na velocidade específica máxima de crescimento da levedura *M. guilliermondii* nas diferentes concentrações de ácido acético testadas (Tabela 1). Os tratamentos com 1,5 g/L e 19,5 g/L foram aqueles que apresentaram as menores médias significativas (Tabela 2), o primeiro devido a menor disponibilidade da fonte de carbono, visto que não foi detectado a presença de ácido acético já nas primeiras 24 h de incubação (Figura 4) e o segundo devido a um possível efeito de inibição no crescimento observado a partir da adição de ácido acético acima de 10 g/L, corroborando com os resultados apresentados na Figura 2. Nestas condições observa-se que, provavelmente, ocorre um gasto de energia para manutenção do pH intracelular devido a alta concentração de ácido acético que está sendo metabolizado pela levedura, com conseqüente redução na taxa de conversão de biomassa.

Arneborg, Majbritt e Mogens (1995) avaliaram os parâmetros de crescimento de *S. cerevisiae* em meio contendo glicose com e sem ácido acético, verificando que a adição de 2 g/L de ácido acético ocasionou uma redução no rendimento de 0,076 g de massa seca/g de glicose para 0,055 g de massa seca/g de glicose e que tal efeito é devido à redução de energia disponível para conversão em biomassa, causada por distúrbios ocasionados pela alta concentração de ácido acético no meio extracelular.

Moktaduzzaman et al. (2016) analisaram o efeito da concentração de ácido acético sobre a velocidade específica de crescimento em três linhagens de *D. bruxellensis*, em meio YPD. Os autores obtiveram uma velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$) de $0,07 \text{ h}^{-1}$ em YPD suplementado com 120 mM de ácido acético (7,2 g/L). A adição de ácido acético ocasionou um decréscimo de 61% na velocidade específica de crescimento. Matos et al. (2014) avaliaram o crescimento de uma linhagem de *M. guilliermondii*, isolada de cupins da Amazônia e verificaram uma velocidade específica de crescimento média de $0,0369 \text{ h}^{-1}$ em meio contendo hidrolisados de bagaço de cana de açúcar, cuja concentração de ácido acético não foi avaliada.

Tabela 1. Análise de variância dos resultados da velocidade específica de crescimento da levedura *M. guilliermondii* cultivada em meio sintético contendo diferentes concentrações de ácido acético como única fonte de carbono, a 30°C, 160 rpm, pH 5,5, em 96 h de incubação.

Fonte variação	Graus liberdade	Soma quadrados	Quadrado médio	F	Pr(>F)
Tratamentos	6	0,00030594	$5,0989 \cdot 10^{-5}$	1.595,7	$1,303 \cdot 10^{-10*}$
Resíduo	7	0,000000224	$3,2000 \cdot 10^{-08}$		
Total	13				

*Significativo a 5%

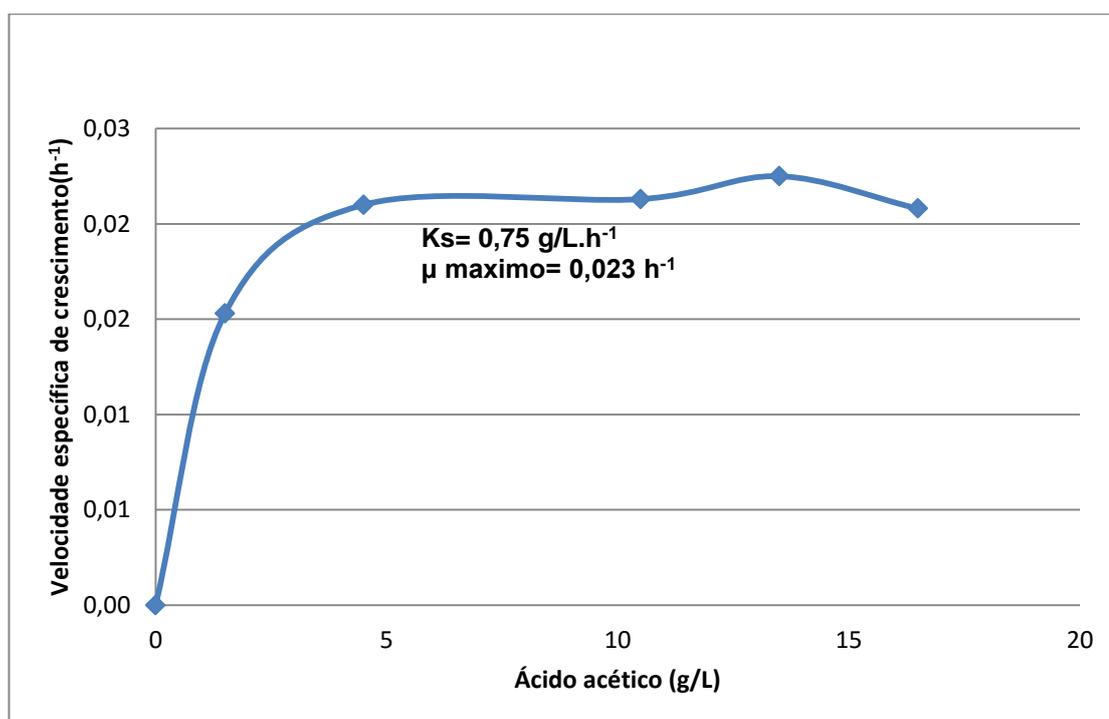
Tabela 2. Comparação de médias pelo Teste de Tukey (a 5% de significância) da velocidade específica de crescimento da levedura *M. guilliermondii* cultivada em meio sintético contendo diferentes concentrações de ácido acético como única fonte de carbono, a 30°C, 160 rpm, pH 5,5, em 96 h de incubação.

Fonte de carbono	Médias das velocidades específicas ¹ ($\mu_{\text{máx}}, \text{h}^{-1}$)
Ácido acético 13,5 (g/L)	0,0225 a
Ácido acético 10,5 (g/L)	0,0213 b
Ácido acético 16,5 (g/L)	0,0207 bc
Ácido acético 4,5 (g/L)	0,0205 c
Ácido acético 1,5 (g/L)	0,0153 d
Glicose 20 (g/L)	0,0138 e
Ácido acético 19,5 (g/L)	0,0088 f

¹ Letras diferentes na coluna indicam diferença significativa a 5%

A velocidade de crescimento da levedura pode ser limitada pela escassez de substrato disponível no meio. Para avaliar esta relação funcional, determinou-se a concentração mínima de ácido acético que limita a velocidade específica de crescimento, que foi de 0,75 g/L, também chamada de constante de saturação ou K_s , a qual foi obtida a partir da equação (3) (KUMAR et al., 2013), conforme Figura 5. Foram utilizadas as concentrações de ácido acético na faixa de 1,5 a 16,5 g/L, não considerando o valor de velocidade específica de crescimento em concentração de 19,5 g/L, na qual houve efeito no crescimento devido a inibição. O valor baixo de K_s evidencia uma alta afinidade da levedura pelo ácido acético como substrato, sendo que nestas condições a velocidade específica máxima de crescimento obtida foi de $0,023 \text{ h}^{-1}$. O comportamento cinético para a maioria dos tratamentos aqui testados demonstrou ausência de fase de adaptação, com fases exponenciais curtas e iniciais, denotando que as vias de metabólicas de *M. guilliermondii*, bem como o efeito de inibição causado pelo ácido acético, sobretudo em concentrações elevadas, requerem estudos mais detalhados.

Figura 5. Concentração de ácido acético em função da velocidade específica de crescimento dos cultivos de *M. guilliermondii* em meio sintético contendo diferentes concentrações de ácido acético como única fonte de carbono, a 30°C , 160 rpm, pH 5,5 em 96 h de incubação.



Os resultados obtidos até agora permitem definir que, para a próxima etapa experimental, poderá ser aplicada uma concentração inicial de 10,5 g/L de ácido acético, sendo esta a condição na qual verificou-se uma máxima variação da produção de massa celular pela levedura *M. guilliermondii*, denotando um efeito inibitório em concentrações superiores de ácido acético (Figura 1).

4.2 Efeito do pH inicial e da concentração inicial de células sobre o crescimento de *M. guilliermondii* em meio sintético contendo ácido acético como única fonte de carbono

Os resultados do crescimento celular (g/L) de *M. guilliermondii* durante 96 h de incubação em meio sintético contendo ácido acético como única fonte de carbono, com variação de pH e concentração inicial de massa seca, estão representados nas Figuras 6 e 7.

Figura 6. Curvas de crescimento (g/L) de *M. guilliermondii* em meio sintético contendo ácido acético (10,5 g/L) como única fonte de carbono, em concentrações iniciais de massa celular de 0,2, 0,5 e 2,5 g/L, pH 5,5, a 30°C, 160 rpm.

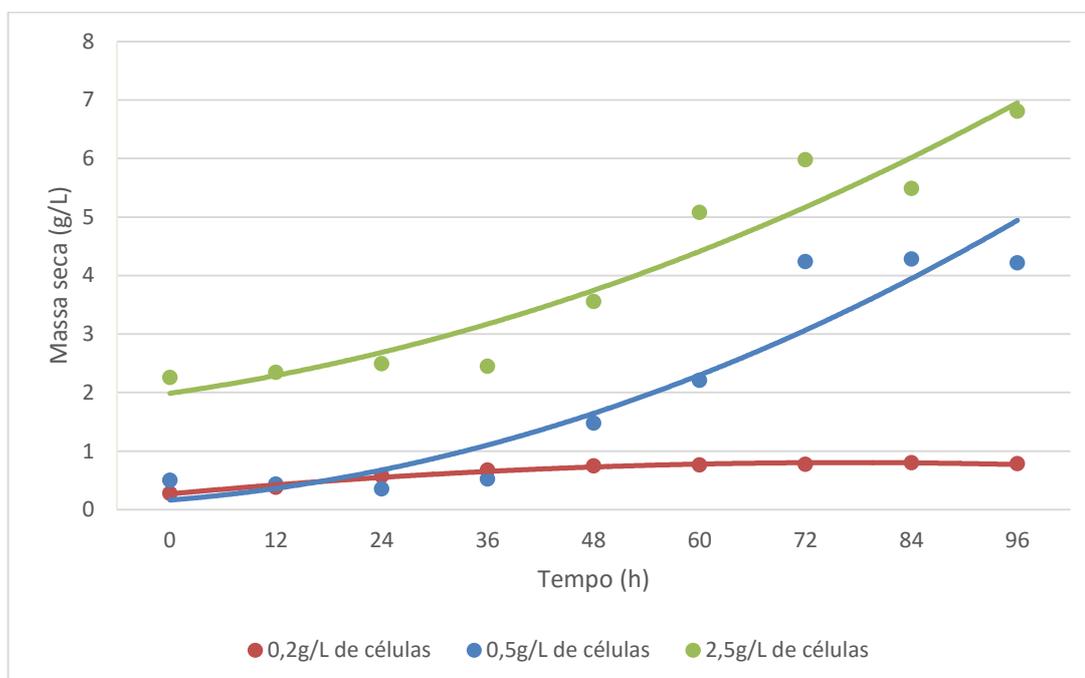
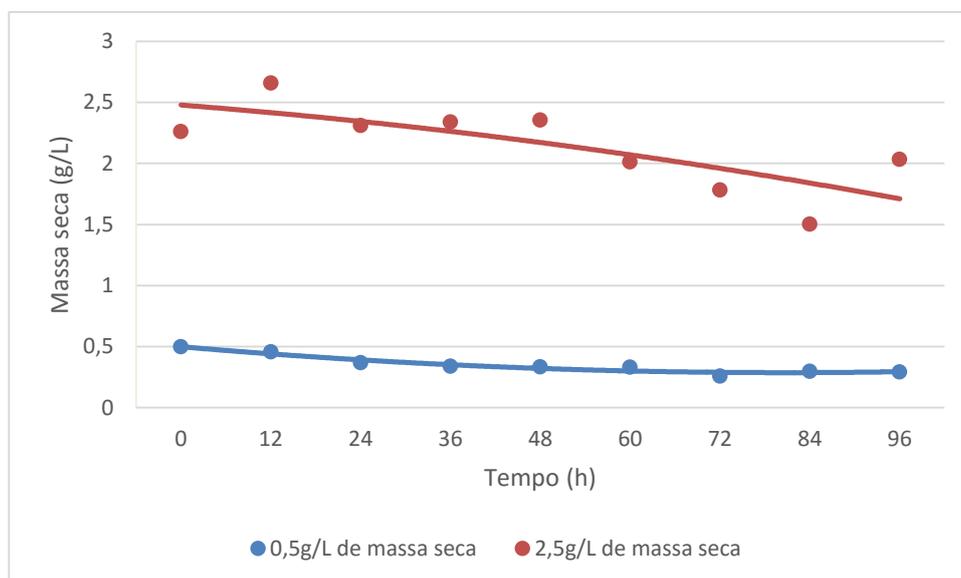


Figura 7. Massa celular (g/L) de *M. guilliermondii* em meio sintético contendo ácido acético (10,5 g/L) como única fonte de carbono, em concentrações iniciais de massa celular de 0,5 e 2,5 g/L, pH 3,5, a 30°C, 160 rpm.



Houve diferença na produção de massa seca da levedura, a qual foi dependente do pH, para todas as concentrações iniciais de massa celular, sendo que para os tratamentos de concentração inicial 0,5 e 2,5 g/L, o aumento da biomassa foi bastante acentuado no pH 5,5 (Figura 6), porém para as mesmas concentrações, em pH 3,5, não houve crescimento (Figura 7).

A queda na produção de biomassa para leveduras em faixas de pH baixo e meios contendo ácido acético foi avaliada também por Chandel, Silva e Singh (2012). Os autores verificaram que em pH baixo, o ácido acético torna-se lipossolúvel e se difunde através da membrana plasmática, em seguida, dissocia-se funcionalmente devido ao pH neutro, no interior da célula, e acumula-se no citoplasma. Os prótons (H^+), que são liberados no citoplasma, iniciam um processo de redução do pH da célula causando uma inibição da atividade levando a morte celular. Para a levedura aqui estudada, tal efeito deve ter ocorrido para todos os tratamentos realizados em pH 3,5. Tal efeito evidenciou um gasto energético da célula para manutenção de sua sobrevivência, devido à alta concentração de ácido acético não dissociado no meio, pois nesta forma o ácido acético pode se difundir através da membrana celular e dentro da célula provocar efeitos tóxicos (MEINANDER et al., 1994). De acordo com Sousa et al. (2012), o ácido acético,

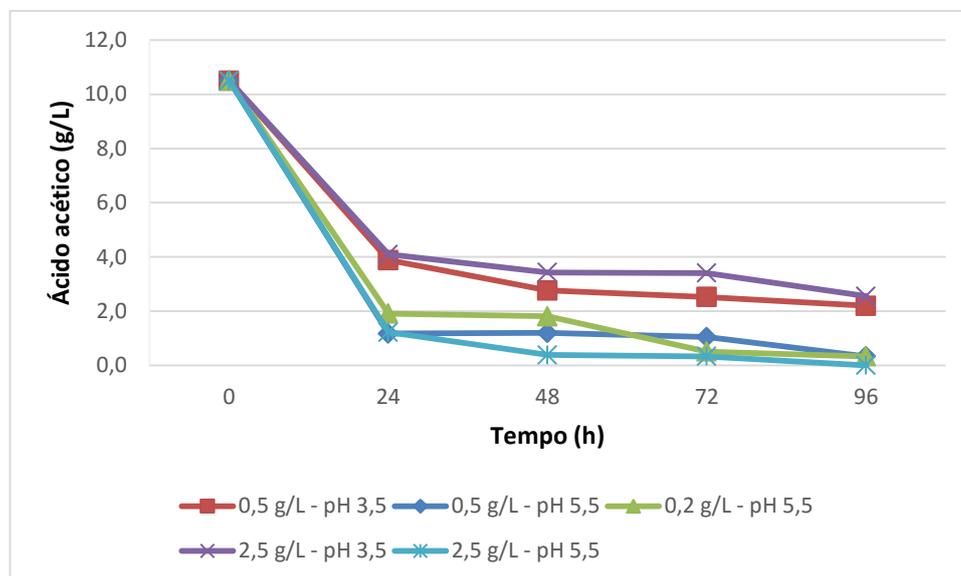
como um ácido monocarboxílico fraco com um pKa de 4,76, tem a sua toxicidade fortemente aumentada, exercendo um efeito antimicrobiano, em valores de pH abaixo de seu pKa.

A maior variação de crescimento celular foi obtida no tratamento cuja concentração inicial foi de 2,5 g/L de massa celular em pH 5,5, (Figura 6), porém em pH 3,5 e com esta concentração inicial de massa, não houve crescimento (Figura 7).

Os resultados da variação da concentração de ácido acético estão demonstrados na Figura 8, onde é possível verificar que houve uma maior diminuição da concentração do ácido no meio para os tratamentos em que o pH inicial era de 5,5. Tais condições apresentam uma redução drástica do ácido no meio ocorrendo concentrações muito próximas de zero ao final das 96 h de incubação, sobretudo para o tratamento com 2,5 g/L de concentração inicial de células.

Para os tratamentos cujo valor de pH inicial era de 3,5, verificou-se ainda um consumo do ácido acético (Figura 8) mesmo não havendo crescimento celular (Figura 7). Tal efeito pode ser explicado porque em pH abaixo de seu pKa (4,76) a forma não dissociada do ácido acético entra nas células por difusão simples, e uma vez dentro da célula o ácido acético se dissocia e se o pH extracelular é menor do que o pH intracelular isso irá conduzir à acumulação de acetato e a acidificação do ambiente intracelular. Os efeitos promovidos por esses eventos são diversos, destacando-se a inibição dos mecanismos de captação de aminoácidos e metabolismo de carboidratos (SOUSA et al., 2012). Lima et al. (2004) explicaram que uma vez dentro do citoplasma, o ácido acético molecular se dissocia em cátion hidrogênio e ânion acetato que reduzem o pH intracelular e como consequência, várias vias metabólicas importantes são afetadas. Estes autores observaram ainda que as leveduras tem um sistema para manter a homeostasia de pH, que é dependente de uma enzima responsável pelo bombeamento de prótons através da membrana plasmática (H^+ -ATPase). Na presença de ácido acético, as leveduras podem desviar ATP para o transporte de prótons, restringindo assim, a disponibilidade de energia para o crescimento. Estes autores verificaram uma redução de 46% na produção de biomassa em meios sintéticos contendo ácido acético (5 g/L).

Figura 8. Concentração de ácido acético (g/L) nos cultivos de *M. guilliermondii* em meio sintético contendo ácido acético (10,5 g/L) como única fonte de carbono, em concentrações iniciais de massa celular de 0,5 e 2,5 g/L, pH 3,5 e 5,5 a 30°C, 160 rpm



Os resultados quanto à velocidade específica máxima de crescimento estão apresentados na Tabela 3, na qual se pode verificar que os melhores resultados para este parâmetro foram obtidos com a concentração de massa celular inicial de 0,5 g/L ($0,04 \text{ h}^{-1}$), entretanto um maior incremento de biomassa celular e maior remoção de ácido acético do meio foram obtidos para o tratamento em que se iniciou o cultivo com 2,5 g/L de massa celular inicial (Figuras 6 e 8), cuja velocidade específica máxima de crescimento foi $0,0127 \text{ h}^{-1}$. Preez, Meyer e Kilian (1991) encontraram uma velocidade máxima de crescimento de aproximadamente $0,06 \text{ h}^{-1}$ para a levedura *Candida blankii* em meios sintéticos contendo ácido acético (4 g/L). Rodrigues et al. (2003) avaliaram as velocidades de crescimento e taxa de consumo de ácido acético de uma linhagem de *C. guilliermondii* em hidrolisados e verificaram que melhores desempenhos foram obtidos quando o crescimento do inóculo ocorreu no mesmo meio em que ocorreu a fermentação. Tal procedimento pode trazer uma melhoria nas taxas obtidas neste experimento na aplicação desta levedura em processos de detoxificação biológica de hidrolisados de bagaço de cana-de-açúcar.

Rodrigues et al. (2012) observaram uma diminuição de 23% na velocidade de crescimento de uma linhagem de *Zygosaccharomyces bailii* em meio sintético contendo ácido acético com variação de pH de 5,0 para 3,0. Os autores comentaram

que o ácido acético afetou a eficiência de crescimento, expressa pela velocidade específica de crescimento, podendo ser explicado pelo aumento na energia gasta para reduzir a acidificação intracelular associada com a dissociação do ácido no citosol neste pH, quando comparado com o pH 5,0. Ainda segundo os autores, este efeito é também evidenciado quando se comparam os valores da taxa de crescimento específico e rendimentos. Além disso, Piper et al. (2001) afirmaram que em pH baixo, ácidos orgânicos fracos promovem o acúmulo de seus ânions no citosol, os quais não podem difundir-se facilmente pela membrana, provocando uma série de efeitos inibitórios como aumento da pressão hidrostática e da produção de radicais livres, causando um estresse oxidativo que pode afetar vários parâmetros cinéticos.

Tabela 3. Valores de velocidade específica de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$, h^{-1}) dos cultivos realizados com a levedura *M. guilliermondii* em meio sintético contendo ácido acético (10,5 g/L) como única fonte de carbono, em concentrações iniciais de massa seca de 0,2, 0,5 e 2,5 g/L, pH 5,5, a 30°C, 160 rpm.

Concentração inicial de massa celular (g/L)	$\mu_{\text{máx}}(\text{h}^{-1})$
0,2	0,0213
0,5	0,0457
2,5	0,0127

A análise estatística mostrou que houve diferença significativa nas velocidades máximas específicas ao nível de 5% entre os valores de pH e entre as concentrações de massa celular (Tabela 4). Houve também interação significativa entre os parâmetros pH e concentração de massa celular, ou seja, para cada faixa de pH avaliada existe uma concentração que resulta em uma velocidade específica diferente (Tabela 4). Para tal análise, foram considerados os resultados dos cálculos das velocidades específicas de cada repetição, tendo sido realizada uma análise fatorial (2x3) incompleta, pois para o valor de pH de 3,5 foram avaliados somente dois níveis de concentração de massa celular (0,5 e 2,5 g/L).

Tabela 4. Análise de variância das velocidades específicas de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$) da levedura *M. guilliermondii* crescida em meio sintético contendo ácido acético (10,5 g/L) como única fonte de carbono, em concentrações iniciais de massa seca de 0,2, 0,5 e 2,5 g/L, pH 3,5 e 5,5, a 30°C, 160 rpm.

Fonte variação	Graus liberdade	Soma quadrados	Quadrado médio	F
pH	1	0,00237699	0,00237699	5697,9*
Concentração massa	2	0,00055217	0,00027608	661,8*
pH X Concentração massa	1	0,00059673	0,00059673	1430,4*
Resíduo	5	0,00000209	0,00000042	
Total	9			

* Significativo a 5%

A variação de pH avaliada para todos os tratamentos ao longo do período experimental pode ser analisada nas Figuras 9 e 10. Pode-se verificar que para os tratamentos que apresentaram um maior crescimento celular (pH 5,5, Figura 9), ocorreu a alcalinização do meio, e para os tratamentos que não promoveram crescimento celular (pH 3,5, Figura 10), o pH apresentou uma variação muito pequena, em torno do pH inicial de 3,5, demonstrando que não houve variação na concentração de próton (H^+) ao longo do período experimental. Isto deve ter ocorrido devido à alta concentração desta espécie química que é bombeada pela célula de dentro do citosol para o meio extracelular a fim de manter o pH intracelular, fazendo com que haja um gasto energético e reduzindo o metabolismo celular. Rodrigues et al.(2003) verificaram que em pH 3,5, a levedura *C. guilliermondii* apresentou baixa capacidade fermentativa que pode ser atribuída às altas concentrações de ácido acético não dissociado no hidrolisado (4,74 g/L), o que prejudicou a atividade celular, comprometendo as vias metabólicas.

Figura 9. Valores de pH dos cultivos de *M. guilliermondii* em meio sintético contendo ácido acético (10,5 g/L) como única fonte de carbono, em concentrações iniciais de massa seca de 0,2, 0,5 e 2,5 g/L, pH 5,5, a 30°C, 160 rpm.

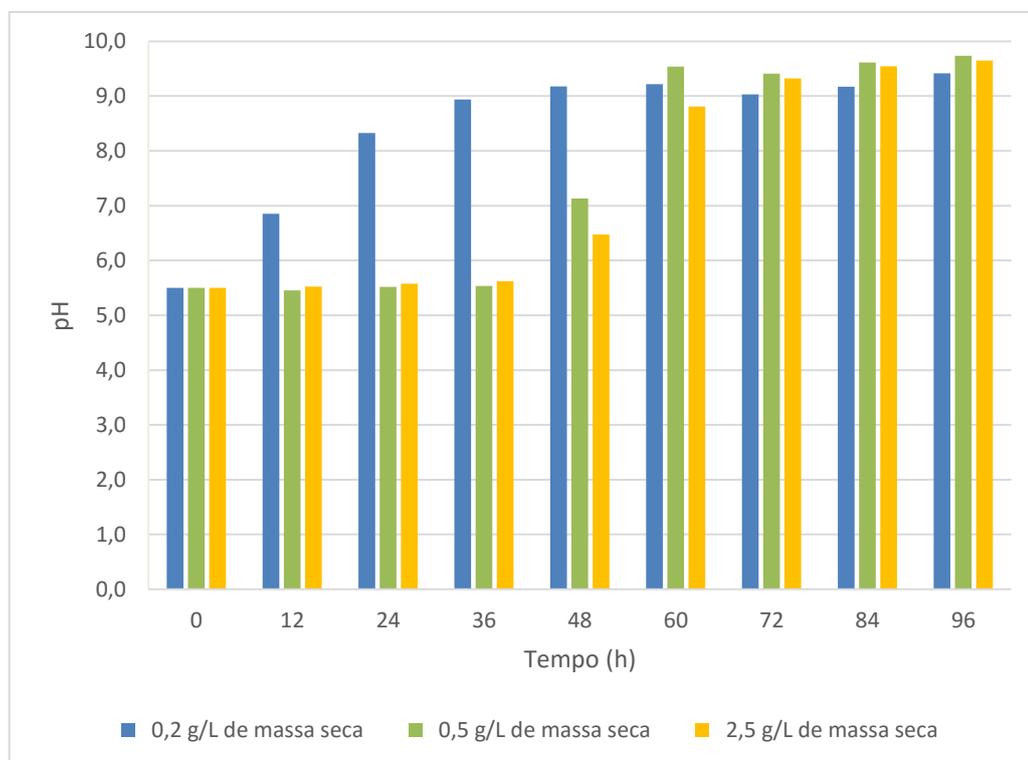
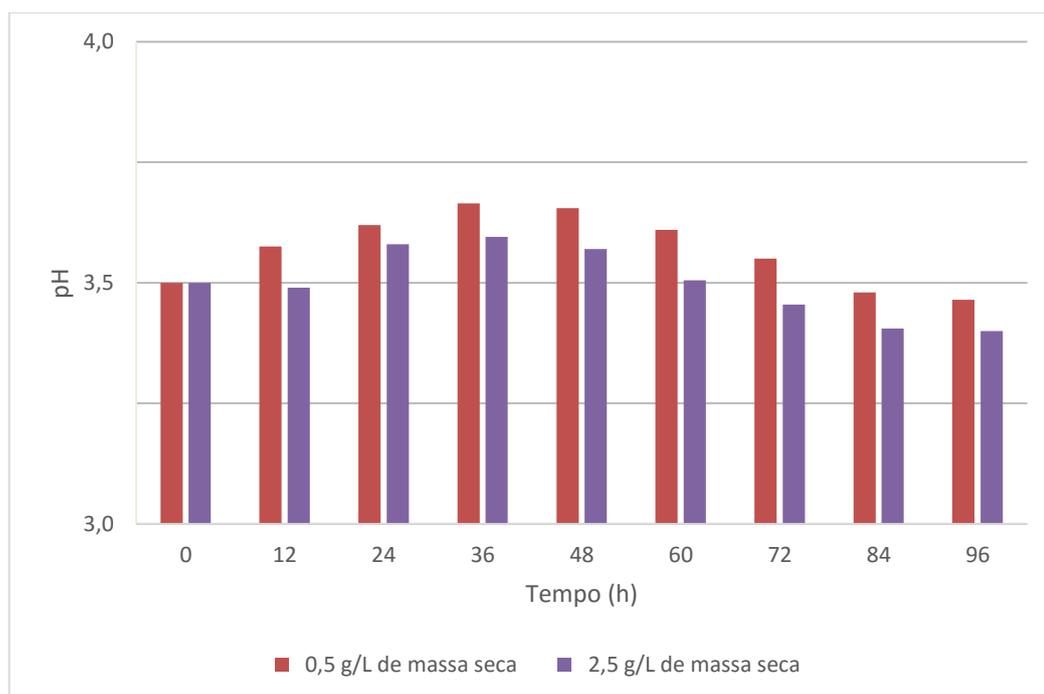


Figura 10. Valores de pH dos cultivos de *M. guilliermondii* em meio sintético contendo ácido acético (10,5 g/L) como única fonte de carbono, em concentrações iniciais de massa seca de 0,2, 0,5 e 2,5 g/L, pH 3,5, a 30°C, 160 rpm.



Os resultados obtidos neste experimento corroboram aqueles encontrados por Felipe et al. (1997), ao avaliar o efeito do pH sobre o crescimento e metabolização das fontes de carbono em hidrolisados de bagaço de cana-de-açúcar por uma linhagem da levedura *C. guilliermondii*. Os autores verificaram que em valores de pH abaixo de 4,5, o consumo das fontes de carbono foi fortemente inibido e que acima deste pH, a maior parte das fontes de carbono foram consumidas e convertidas em xilitol. Verificou-se nestas condições, alterações morfológicas na membrana celular, e como resultado do mecanismo de inibição, os autores apontam como principais efeitos os distúrbios causados no transporte ativo da membrana devido a alterações no pH e competição por sítios ativos entre as moléculas de açúcar e ácido acético.

A pesquisa com uma levedura como *M. guilliermondii* quanto à sua habilidade em assimilar ácido acético e converter em biomassa e etanol, além da fermentação de pentoses, torna-se importante em vista de recente trabalho focando na engenharia genética de *S. cerevisiae* para co-consumo de xilose e ácido acético (WEI et al., 2013). A linhagem de *M. guilliermondii* em estudo pode ser um importante micro-organismo a ser empregado na fermentação de hidrolisados.

Para os tratamentos avaliados nesta etapa experimental, as concentrações de etanol obtidas apresentaram valores muito baixos. A concentração máxima de etanol obtida foi de 1,47 g/L com parâmetros iniciais de 10,5 g/L de ácido acético em pH 5,5 e 2,5 g/L de concentração de inóculo. Tais resultados evidenciam a necessidade de estudos que avaliem os demais parâmetros fermentativos, tais como a influência da aeração durante o período de incubação, visando melhores resultados em produção de etanol e outros produtos de maior valor agregado.

Os resultados obtidos até agora permitem estipular o pH 5,5 e concentração inicial de massa celular de 2,5 g/L, devido ao melhor desempenho em crescimento celular, maior remoção de ácido acético do meio e produção de etanol para a próxima etapa experimental, visando avaliar estes parâmetros em meio sintético constituído de pentoses e hexose e do inibidor furfural, comumente encontrado em hidrolisados de bagaço de cana-de-açúcar.

5 Conclusões

A linhagem da levedura *M. guilliermondii* foi capaz de crescer em meio sintético contendo ácido acético como única fonte de carbono, em todas as concentrações avaliadas, apresentando um melhor desempenho em produção de massa seca no tratamento com 10,5 g/L de ácido acético. A velocidade máxima de crescimento foi de 0,023 h⁻¹ e a constante de saturação pelo substrato (K_s) foi de 0,75 g/L. Houve efeito do pH inicial e da concentração de massa celular sobre o crescimento da levedura em meio sintético contendo ácido acético como única fonte de carbono. Os resultados indicaram a concentração de 2,5 g/L de massa celular, pH inicial 5,5 e 10,5 g/L de ácido acético para os testes posteriores de avaliação da capacidade de metabolização do ácido acético na presença de açúcares e inibidores comumente presentes em hidrolisados hemicelulósicos.

6 Literatura citada

- AGUILAR, R. et al. Kinetic study of the acid hydrolysis of sugar cane bagasse. **Journal of Food Engineering**, v. 55, n. 4, p. 309–318, 2002.
- ARNEBORG, N.; MAJBRIIT, K. M.; MOGENS, J. The effect of acetic acid and specific growth rate on acetic acid tolerance and trehalose content of *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology Letters**, v. 17, n. 12, p. 1299-1304, 1995.
- CHANDEL, A. K.; SILVA, S. S.; SINGH, O. V. Detoxification of lignocellulose hydrolysates: biochemical and metabolic engineering toward white biotechnology. **Revista BioEnergy Research**, v. 6, n. 1, p. 388-401, 2012.
- FELIPE, M. G. A. et al. Fermentation of sugar cane bagasse hemicellulosic hydrolysate for xylitol production: effect of pH. **Biomass and Bioenergy**, v. 13, n. 1/2, p. 11–14, 1997.

- FONSECA, B. G. et al. Biological detoxification of different hemicellulosic hydrolysates using *Issatchenkia occidentalis* CCTCC M 206097 yeast. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 38, n. 1, p. 199–207, 2011.
- GONÇALVES, B. C. M. et al. Consumo de açúcares e ácido acético durante a destoxificação biológica de hidrolisado hemicelulósico pela levedura *Issatchenkia occidentalis* M1. **BBR – Biochemistry and Biotechnology Reports**, v. 2, n. 3, p. 372–375, 2013.
- HAMELINCK, C. N.; HOOIJDONK, G. V.; FAAIJ, A. P. C. Ethanol from lignocellulosic biomass: techno-economic performance in short-, middle- and long-term. **Biomass and Bioenergy**, 2005.
- KUMAR, S. et al. Kinetic studies of ethanol fermentation using *Kluyveromyces sp.* IIPE453. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 88, n. 10, p. 1874–1884, 2013.
- LIMA, L. H. A. et al. Effect of acetic acid present in bagasse hydrolysate on the activities of xylose reductase and xylitol dehydrogenase in *Candida guilliermondii*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 65, n. 6, p. 734-738, 2004.
- LUJÁN-RHENALS, E.D.; MORAW, R.O.; RICKE, S.C. Tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* and *Zymomonas mobilis* to inhibitors produced during dilute acid hydrolysis of soybean meal. **Journal of Environmental Science and Health**, n. 49, p. 305-311, 2014.
- MARTINI, C. et al. A strain of *Meyerozyma guilliermondii* isolated from sugarcane juice is able to grow and ferment pentoses in synthetic and bagasse hydrolysate media. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 32, p. 1–9, 2016.
- MATOS, I. et al. Isolation, taxonomic identification and investigation of the biotechnological potential of wild-type *Meyerozyma guilliermondii* associated with Amazonian termites able to ferment D-xylose. **Bioscience Journal**, v. 30, n. 1, p. 260–266, 2014.

- MEINANDER, N. et al. Fed-batch xylitol production with recombinant XYL-1-expressing *Saccharomyces cerevisiae* using ethanol as co-substrate. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 42, p. 334-339, 1994.
- MOKTADUZZAMAN, M. et al. Strain-dependent tolerance to acetic in *Dekkera bruxellensis*. **Annals of Microbiology**, v. 66, n.1, p. 351–359, 2016.
- PALMQVIST, E.; HAHN-HÄGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: Inhibitors and mechanisms of inhibition. **Bioresource Technology**, v. 74, n. 1, p. 25–33, 2000.
- PEREIRA, R. S.; MUSSATTO, S. I.; ROBERTO, I. C. Inhibitory action of toxic compounds present in lignocellulosic hydrolysates on xylose to xylitol bioconversion by *Candida guilliermondii*. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 38, n. 1, p. 71–8, 2011.
- PIPER, P. et al. Weak acid adaptation: the stress response that confers yeasts with resistance to organic acid food preservatives. **Molecular Microbiology**, v. 147, p. 2635–2642, 2001.
- PIRT, S.J. **Principles of microbe and cell cultivation**. Oxford: Blackwell, 1985. 274p
- PREEZ, J. C. DU; MEYER, P. S.; KILIAN, S. G. The effect os mixtures of acetic acid and D-xilose onthe growth rate of *Candida blankii*. **Biotechnology Letters**, v. 13, n. 11, p. 827-832, 1991.
- RIBEIRO, C. A. F.; HORII, J. Potencialidades de linhagens de levedura *Saccharomyces cerevisiae* para a fermentação do caldo de cana. **Scientia Agricola**, v. 56, n. 2, p. 255–263, 1999.
- RODRIGUES, F. et al. The fate of acetic acid during glucose co-metabolism by the spoilage yeast *Zygosaccharomyces bailii*. **PLoS ONE**, v. 7, n. 12, p. 1–8, 2012.
- RODRIGUES, R. C. L. B. et al. Batch xylitol production by *Candida guilliermondii* FTI 20037 from sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolyzate at controlled pH values. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 26, n. 2, p. 103–107, 2003.

- RODRIGUES, R. C. L. B. et al. Enhanced xylitol production by precultivation of *Candida guilliermondii* cells in sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate. **Current Microbiology**, v. 53, n. 1, p. 53–59, 2006
- RODRIGUEZ-CHONG, A. et al. Hydrolysis of sugar cane bagasse using nitric acid: A kinetic assessment. **Journal of Food Engineering**, v. 61, p. 143-152 , 2004.
- SILVA, A. et al. Involvement of yeast HSP90 isoforms in response to stress and cell death induced by acetic acid. **PLoS ONE**, v. 8, n. 8, p. 1–11, 2013.
- SOUSA, M. J. et al. Stress and cell death in yeast induced by acetic acid. In: BUBULYA, P. (Ed.). **Cell metabolism - Cell homeostasis and stress response**. Rijeka: InTech, 2012. p. 73–100. Disponível em: <<http://www.intechopen.com/books/cell-metabolism-cell-homeostasis-and-stress-response>>. Acesso em:24 jul. 2016
- THOMAS, K. C.; HYNES, S. H.; INGLEDEW, W. M. Influence of medium buffering capacity on inhibition of *Saccharomyces cerevisiae* growth by acetic and lactic acids. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 4, p. 1616–1623, 2002.
- VILELA-MOURA, A. et al. The impact of acetate metabolism on yeast fermentative performance and wine quality: reduction of volatile acidity of grape musts and wines. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 89, p. 217-280, 2011.
- YLITERVO, P.; FRÀZEN, C. J.; TAHERZADEH, M. J. Continuous ethanol production with a membrane bioreactor at high acetic acid concentrations. **Membranes**, v. 4, p. 372-387, 2014.
- WEI, N. et al. Enhanced biofuel production through coupled acetic acid and xylose consumption by engineered yeast. **Nature Communications**, v. 4, 2013. doi:10.1038/ncomms3580.

CAPÍTULO 2 – Efeito da concentração do ácido acético e furfural sobre o crescimento e produção de etanol de *M. guilliermondii* em meio sintético contendo pentoses e hexoses

1 Resumo

A produção de etanol de segunda geração depende da implementação de rotas biotecnológicas que possibilitem a fermentação de todos os açúcares oriundos da hidrólise da biomassa lignocelulósica, na maioria pentoses. Além disso, uma grande parte dos micro-organismos é inibida por compostos como o furfural e o ácido acético gerados durante a etapa de hidrólise ácida. A avaliação do efeito tóxico sinérgico destes compostos na fermentabilidade das fontes de carbono disponíveis no hidrolisados é de suma importância para a viabilidade deste processo no cenário atual. O presente trabalho objetivou avaliar a capacidade de metabolização de pentoses (arabinose e xilose) e glicose, produção de biomassa e de etanol por uma linhagem da levedura *M. guilliermondii* (CCT7783), na presença de furfural (20 e 40 mg/L) e ácido acético (5 e 10 g/L), em meio sintético. Os resultados mostraram que a levedura foi capaz de crescer e assimilar ácido acético,

promovendo a detoxificação biológica, com concomitante fermentação de pentoses e glicose, em todos os tratamentos avaliados. A maior velocidade específica de crescimento foi verificada com a adição de 5 g/L de ácido acético, tendo sido o crescimento inibido na concentração de 10 g/L desse ácido. O furfural inibiu o crescimento da levedura na concentração de 40 mg/L. Houve um baixo rendimento em etanol, sendo necessária a otimização de parâmetros para sua aplicação na produção de etanol lignocelulósico.

2 Introdução

A viabilidade da produção de etanol de segunda geração tem como um dos principais desafios tornar possível a fermentação de todos os açúcares oriundos da hidrólise da biomassa lignocelulósica, que em sua maioria trata-se de pentoses, açúcares com cadeias de cinco carbonos, que não podem ser fermentados pelos micro-organismos aplicados no processo de produção de etanol de primeira geração, como *S. cerevisiae*. Além disso, a maioria dos micro-organismos são inibidos por compostos como o furfural e o ácido acético gerados durante a etapa de hidrólise ácida, exigindo assim uma etapa prévia de tratamento visando a redução destas espécies químicas tóxicas.

O furfural, também conhecido como aldeído furano, é um dos subprodutos gerados nas principais rotas de sacarificação da biomassa lignocelulósica. Trata-se de um aldeído heterocíclico aromático, oriundo da desidratação de pentoses durante o pré-tratamento com ácidos diluídos e aquecimento (HANLY; HENSON, 2014). Este composto orgânico tem sido apontado como um importante inibidor do processo fermentativo, sendo que o efeito tóxico para alguns micro-organismos tem sido reportado como uma relação de dependência entre a concentração do furfural no meio e a presença de outros inibidores em potencial, como o ácido acético (PALMQVIST; HAHN-HÄGERDAL, 2000)

Os efeitos de inibição do crescimento e fermentação provocados pelo furfural no metabolismo de leveduras tem sido reportado em muitos estudos (HORVÁTH et al., 2001). Algumas leveduras reduzem o furfural a álcool furfurílico, menos tóxico, por uma via que compromete a formação de NADH (ZHAO et al., 2005). Que é um importante co-fator utilizado para proteger as células contra os danos causados por

espécies reativas como peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e ânions superóxido (O_2^-) e hidróxido (OH^-). Estas espécies químicas são geradas nos diversos processos metabólicos e, uma vez que a via de tolerância ao furfural exige uma via funcional de pentoses que diminui a disponibilidade de NADH, tais espécies se acumulam na célula podendo acelerar o envelhecimento celular, causar mutações genéticas, danos ao citoesqueleto, proteínas, lipídeos e induzir a morte celular programada (PERRONE, TAN e DAWES, 2008).

Os danos causados pelo furfural estão relacionados à concentração do mesmo, podendo ocorrer um atraso ou uma completa inibição no crescimento dependendo da concentração deste no meio (ALLEN et al., 2010)

A busca por micro-organismos capazes de fermentar os açúcares liberados na hidrólise da biomassa lignocelulósica, sobretudo na presença de compostos inibidores, como o furfural e o ácido acético, torna-se hoje objeto de estudo de suma relevância para o avanço tecnológico da produção de etanol de segunda geração, uma vez que se trata de um dos pontos que limitam a eficiência do processo no cenário atual.

Uma linhagem da levedura *M. guilliermondii* foi isolada e caracterizada por Martini et al. (2016) devido a sua capacidade de fermentação de pentoses, e comprovou-se no Capítulo 1 deste trabalho que esta linhagem é capaz de metabolizar ácido acético em quantidades superiores às encontradas nos hidrolisados, promovendo a detoxificação biológica. Todavia se faz necessário avaliar o potencial de metabolização de pentoses e hexoses na presença de ácido acético e inibidores como o furfural, bem como a capacidade de conversão destas fontes de carbono em etanol com vistas a contribuir para os avanços científicos e tecnológicos que propiciarão a viabilidade da produção de etanol de segunda geração. Esses são, portanto, os objetivos do presente trabalho.

3 Materiais e Métodos

3.1 Preparo do inóculo

Utilizou-se uma linhagem de *M. guilliermondii* (código 311, depositada sob número CCT7783 na coleção de culturas da Fundação André Toselo, Campinas, SP). Os procedimentos de isolamento, identificação e caracterização estão descritos em Martini (2014). A linhagem tem sido mantida em tubos contendo YPD (10 g/L extrato de levedura, 10 g/L peptona, 20 g/L glicose, 20 g/L ágar, água destilada), sob refrigeração, no Laboratório de Microbiologia Agrícola e Molecular (LAMAM), CCA-UFSCar – *Campus* de Araras.

Para a obtenção da massa celular necessária aos experimentos, a levedura foi reativada em placas de Petri contendo meio YPD. As placas foram incubadas a 30°C e após três dias de crescimento, foram retiradas duas alçadas e inoculadas em 50 mL de YPD líquido (10 g/L extrato de levedura, 10 g/L peptona, 20 g/L glicose, água destilada) em Erlenmeyers de 125mL. A incubação foi feita a 30°C, por 12-18 h, sob agitação de 160 rpm, em incubadora Tecnal (modelo TE-421). Em seguida, as células foram centrifugadas e lavadas com água destilada estéril e ressuspensas em YPD e inoculadas novamente em 150 mL de YPD em Erlenmeyers de 500 mL, sendo estes incubados sob as mesmas condições de agitação e temperatura. As células foram então centrifugadas e lavadas em água estéril, sendo este procedimento repetido por duas vezes. Ao final, a massa celular foi ressuspensa em água estéril, constituindo-se o inóculo para as etapas seguintes.

3.2 Preparo do meio de crescimento

O meio de crescimento consistiu de solução sintética de sais, pentoses e glicose de acordo com Noronha et al. (2010), com modificações. com a seguinte composição: 3 g/L glicose, 3 g/L arabinose, 25 g/L xilose, 5 g/L de fosfato hidrogenado de potássio, 1 g/L de cloreto de potássio, 1,5 g/L de cloreto de amônio, 1 g/L de sulfato de magnésio heptahidratado e 6 g/L de extrato de levedura, em

água destilada. Cada Erlenmeyer de 500 mL recebeu 85 mL de uma solução concentrada do meio de cultura que permitiu obter ao final da montagem 200 mL de meio nas concentrações descritas acima. Em seguida procedeu-se a adição de furfural nos frascos dos tratamentos em concentrações finais de 20 e 40 mg/L. Todos os frascos foram autoclavados a 120°C e 1 atm por 20 minutos.

3.3 Montagem do experimento

Aos frascos contendo o meio de crescimento adicionou-se ácido acético glacial, em condições assépticas, nas concentrações finais de 5 e 10g/L. Em seguida foi adicionado o inóculo para uma concentração final de 2,5 g/L de massa seca. O volume final dos frascos foi acertado para 200 mL com água destilada estéril. A padronização de biomassa foi realizada por meio da leitura da absorbância a 600 nm em espectrofotômetro Thermo® Biomate 3, considerando-se a conversão dos valores de absorbância em massa seca pela utilização de uma curva-padrão “Absorbância X Massa seca”, com a seguinte equação:

$$\text{Massa seca em g/L} = [(\text{Absorbância} - 0,119)/1,6927] \times \text{Diluição}. \quad (1)$$

O pH do meio de crescimento foi acertado para 5,5 com a adição de solução de NaOH (12 mol/L) em gotas com agitação, em condições assépticas. Os frascos, em triplicata para cada tratamento, foram mantidos em incubadora, a 160 rpm, a 30°C, por 96 h, retirando-se amostras de 10mL a cada 12 h.

Como controle do consumo e perdas de ácido acético por volatilização, foram preparados frascos para cada variação de tratamento, nas mesmas condições de pH e incubação sem adição de inóculo.

No total, foram preparados 33 frascos, sendo 3 concentrações de ácido acético (0, 5 e 10 g/L) e para cada tratamento com ácido acético variou-se 3 concentrações de furfural (0, 20 e 40 mg/L) totalizando 9 tratamentos em três repetições (27 frascos), sendo necessário ainda 6 frascos de controle para os tratamentos com concentração de 5 e 10 g/L de ácido acético.

3.4 Análises físico-químicas e instrumentais

Inicialmente, foi analisada a produção de massa seca (g/L) por meio da leitura da absorbância das amostras a 600 nm em espectrofotômetro Thermo® Biomate 3, considerando-se a conversão dos valores de absorbância em massa seca pela utilização de uma curva-padrão, conforme descrito acima.

As amostras foram centrifugadas a 3600 rpm por 5 minutos em centrífuga refrigerada Eppendorf®, sendo os sobrenadantes armazenados a -15°C para as análises de pH, teor de açúcares e cromatográficas.

A concentração de açúcares nos sobrenadantes foi determinada pela análise do teor de açúcar redutor pelo método do ácido 3,5-dinitrossalicílico (ADNS), segundo metodologia de Miller (1959) modificada. Diluiu-se as amostras (sobrenadantes) e transferiu-se 1 mL de cada amostra diluída para tubo de ensaio, e neste adicionou-se 1 mL da solução estoque de ADNS e 1 mL de água destilada, totalizando um volume de 3 mL. As amostras foram submetidas ao banho térmico (água fervente) por 5 minutos, os tubos em seguida foram resfriados em água corrente e receberam 5 mL de água destilada, perfazendo um total de 8 mL. Homogeneizou-se por exatos 5 segundos em vórtex e realizou-se a leitura da absorbância a 540 nm em espectrofotômetro digital Analytikjena Specord 210 plus, considerando-se a conversão dos valores de absorbância pela utilização de uma curva-padrão “Absorbância X Concentração de Xilose”, com a seguinte equação:

$$\text{Concentração de açúcar redutor em g/L} = \frac{[\text{Absorbância} + 0,0490]}{0,8061} \times \text{Diluição} \quad (2)$$

O mesmo procedimento foi feito utilizando-se água ao invés da amostra para se obter o branco da reação, que foi utilizado como referência para calibrar o aparelho. A curva padrão foi elaborada a partir da leitura da absorbância de 10 soluções com concentrações equidistantes de 0,15 a 1,5 g/L de xilose, obtendo-se a regressão linear com um R^2 igual a 0,9998.

A concentração de glicose nos sobrenadantes foi analisada por meio da leitura da absorbância das amostras a 500 nm em espectrofotômetro Analytikjena Specord

210 plus, através da reação da glicose por metodologia enzimática-colorimétrica empregando-se kit enzimático GOD-PAP, do fabricante Laborlab.

A partir dos valores da concentração de açúcares redutores e glicose, obtidos conforme descrito acima, determinou-se a concentração de pentoses (xilose + arabinose) pela diferença entre a concentração de açúcares totais e glicose.

Os valores de pH foram medidos em pH-metro digital MS TECNOPON modelo mPA210.

Para as análises cromatográficas, inicialmente as amostras foram filtradas em membrana de PTFE hidrofílico da marca Analítica®, porosidade 0,45 μm . Etanol, furfural e ácido acético foram quantificados por cromatografia em fase gasosa com detector de ionização de chama (FID) GC-2010 Plus da marca SHIMADZU® e coluna Restek Stabilwax-DA (30m x 0,25mm x 0,25mm) nas seguintes condições: Temperatura do injetor: 220°C; gás de arraste: Hélio; velocidade linear do gás de arraste: 20 cm/seg; taxa de *split*: sem *split*; temperatura do FID: 280°C; temperatura da coluna: 30°C por 5 minutos, incremento de 12°C/min até 100°C, seguido de incremento de 15°C/min até 165°C, seguido de incremento de 80°C até 230°C mantendo esta temperatura por 6 minutos.

3.5 Análises cinéticas e estatísticas

Foi calculada a velocidade específica máxima de crescimento (μ_m, h^{-1}) por meio da regressão dos dados de ln massa seca X tempo, considerando-se o coeficiente angular como a velocidade específica máxima de crescimento.

O rendimento em etanol (Y_p/s) e biomassa (Y_x/s) foram calculados com base na razão entre a concentração de produto por substrato consumido, sendo os valores obtidos convertidos em %.

Os resultados obtidos foram submetidos à análise estatística, aplicando-se inicialmente análise de variância e em seguida a comparação de médias pelo teste de Tukey, a 5% de significância. Foi utilizado o *software* R para os testes estatísticos aplicados, considerando-se delineamento fatorial 3x3.

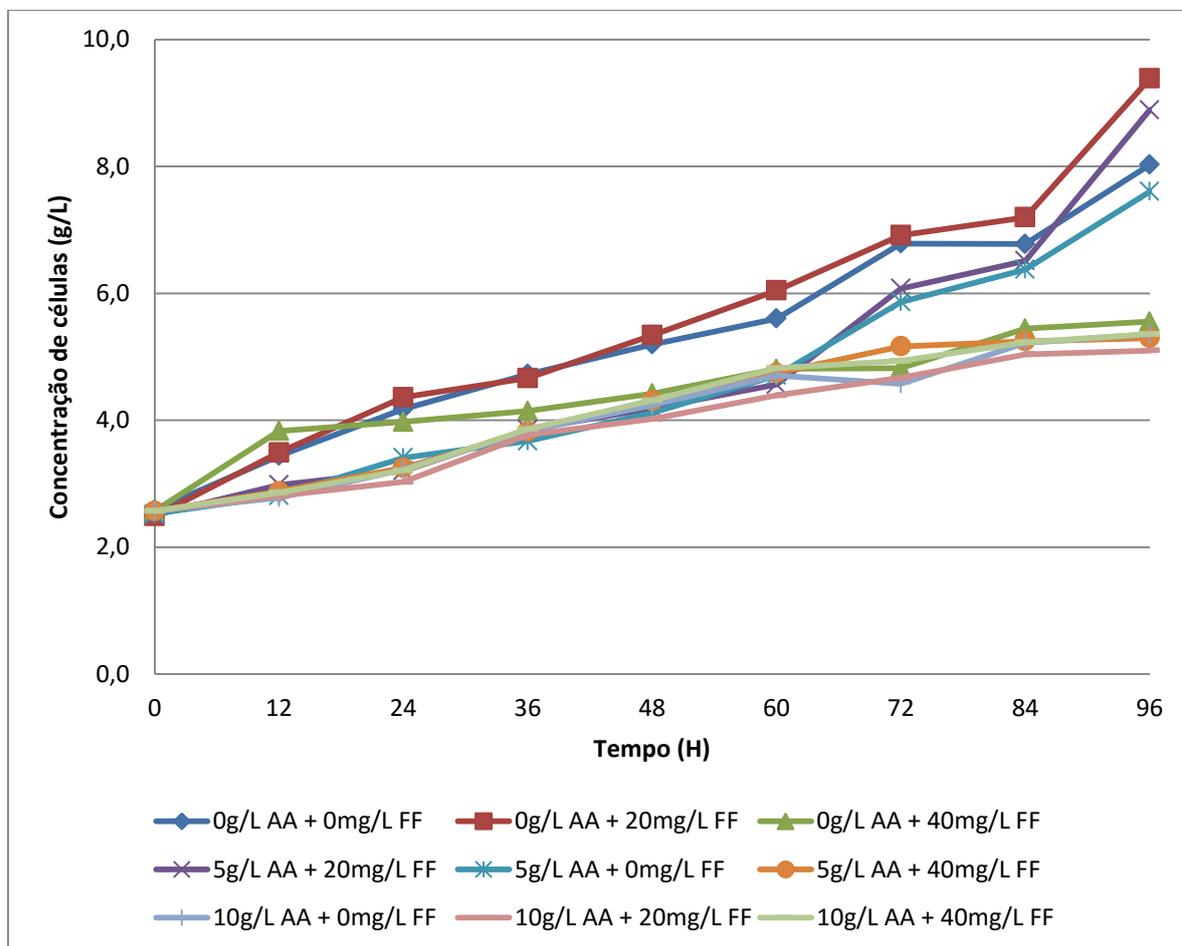
4 Resultados e Discussão

4.1 Efeito do furfural e ácido acético sobre o crescimento de *M. guilliermondii* em meio sintético contendo pentoses e glicose

Para avaliar o efeito do furfural e ácido acético no crescimento e parâmetros fermentativos da levedura *M. guilliermondii* foram utilizadas concentrações dos inibidores (ácido acético e furfural) e açúcares redutores (xilose, arabinose e glicose) próximas àsquelas encontradas por Martini et al. (2016) ao caracterizar hidrolisados ácidos de bagaço de cana-de-açúcar.

Os resultados de concentração de células (g/L) ao longo das 96 h de incubação estão representados na Figura 1. Pode-se verificar que houve crescimento em todas as condições testadas, destacando-se os tratamentos em que as fontes de carbono foram somente as pentoses e glicose com concentração de 0 e 20 mg/L de furfural. Considerando apenas o efeito isolado do furfural, o mesmo não promoveu redução no crescimento da levedura *M. guilliermondii* na concentração de 20 mg/L, mesmo com 5 g/L de ácido acético. No entanto, o crescimento celular foi bastante inferior nos tratamentos em que a concentração do furfural foi de 40 mg/L, denotando um efeito inibidor do furfural nesta concentração para o crescimento celular da levedura *M. guilliermondii*, com ou sem ácido acético. Dentre os efeitos tóxicos causados pelo furfural nas células dos micro-organismos, salienta-se a diminuição de produção de NADH devido a produção de álcool furfurílico, menos tóxico, com conseqüente redução de ATP e da atividade redox intracelular (ZHAO et al., 2005). De acordo com Nilsson et al. (2005), o efeito da inibição no crescimento é dependente da concentração, pois a metabolização destes compostos compete por co-fatores associados ao crescimento celular como NADH e NADPH.

Figura 1. Curvas de crescimento (g/L) de *M. guilliermondii* em meio sintético contendo 3 g/L de glicose, 3 g/L de arabinose, 25 g/L de xilose nas concentrações de 0 mg/L, 20 mg/L e 40 mg/L de furfural (FF) e 0 g/L, 5 g/L e 10 g/L de ácido acético (AA) a 30°C, 160 rpm, pH 5,5 e 96 h de incubação.



Os resultados das velocidades específicas de crescimento (Tabela 1) corroboram aqueles apresentados na Figura 1, salientando-se a condição fermentativa em que havia 0 g/L de ácido acético e 40 mg/L de furfural, o qual apresentou a menor velocidade específica de crescimento, comprovando o efeito inibitório do furfural para a levedura *M. guilliermondii* nesta condição. A maior velocidade específica de crescimento ocorreu para o meio em que a concentração de furfural foi de 0 mg/L com 5 g/L de ácido acético, denotando que nestas condições o ácido acético contribuiu com o aumento das fontes de carbono disponíveis promovendo um melhor desempenho no parâmetro cinético avaliado. Destaca-se ainda da Tabela 1, que para a concentração de ácido acético que promoveu um aumento na velocidade específica máxima de crescimento (5 g/L), ocorreu uma queda bastante acentuada neste parâmetro ao adicionar 40 mg/L de

furfural, diminuindo a velocidade específica máxima de crescimento de $0,01214 \text{ h}^{-1}$ para $0,00949 \text{ h}^{-1}$. Verifica-se, nestas condições um aumento na toxicidade do furfural para a levedura *M. guilliermondii*.

Tabela 1. Valores médios das velocidades específicas máximas de crescimento ($\mu_{\text{máx}}, \text{h}^{-1}$) dos experimentos realizados com a levedura *M. guilliermondii* crescida em meio sintético contendo 3 g/L de glicose, 3 g/L de arabinose, 25 g/L de xilose nas concentrações de 0 mg/L, 20 mg/L e 40 mg/L de furfural (FF) e 0 g/L, 5 g/L e 10 g/L de ácido acético (AA) a 30°C , 160 rpm, pH 5,5 e 96 h de incubação.

Composição do meio de cultura	$\mu_{\text{máx}} (\text{h}^{-1})$	Desvio padrão (h^{-1})
0 g/L AA + 0 g/L FF	0,01067	0,00082
0 g/L AA + 20 mg/L FF	0,01203	0,00064
0 g/L AA + 40 mg/L FF	0,00766	0,00016
5 g/L AA + 0 mg/L FF	0,01214	0,00029
5 g/L AA + 20 mg/L FF	0,01139	0,00107
5 g/L AA + 40 mg/L FF	0,00949	0,00154
10 g/L AA + 0 mg/L FF	0,00856	0,00091
10 g/L AA + 20 mg/L FF	0,00846	0,00006
10 g/L AA + 40 mg/L FF	0,00875	0,00106

A análise estatística demonstrou que houve diferença significativa nas velocidades máximas específicas ao nível de 5% entre os tratamentos. Houve também interação significativa entre concentração de ácido acético e concentração de furfural (Tabela 2).

Tabela 2. Análise de variância das velocidades específicas máximas de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$, h^{-1}) dos experimentos realizados com a levedura *M. guilliermondii* crescida em meio sintético contendo 3 g/L de glicose, 3 g/L de arabinose, 25 g/L de xilose nas concentrações de 0 mg/L, 20 mg/L e 40 mg/L de furfural (FF) e 0 g/L, 5 g/L e 10 g/L de ácido acético (AA), a 30°C, 160 rpm, pH 5,5 e 96 h de incubação.

Fonte variação	Graus liberdade	Soma quadrados	Quadrado médio	F
AA	2	$2,68202 \cdot 10^{-05}$	$1,34101 \cdot 10^{-05}$	17,95722937*
FF	2	$2,19455 \cdot 10^{-05}$	$1,09728 \cdot 10^{-05}$	14,69344542*
AA X FF	4	$1,93481 \cdot 10^{-05}$	$4,83703 \cdot 10^{-06}$	6,477189211*
Resíduo	18	$1,3442 \cdot 10^{-05}$	$7,46779 \cdot 10^{-07}$	
Total	26			

* Significativo a 5%

Na Tabela 3 encontram-se os resultados estatísticos obtidos através do teste de Tukey, onde pode-se verificar que, considerando o efeito individual de cada fator, não há diferença significativa nas médias dos tratamentos com 0 e 20 mg/L de furfural, sendo que estas são superiores e se diferenciam daqueles tratamentos com 40 mg/L do inibidor. Allen et. al (2010) verificaram que os danos induzidos por furfural são menos graves quando a levedura *S. cerevisiae* é cultivada em concentrações menores de furfural 2,4 g/L (25 mM). Os autores comentam que baixas concentrações permitem crescimento após um atraso prolongado (fase estacionária) em comparação com uma concentração alta de furfural 4,8 g/L (50 mM), que impediu totalmente o crescimento ocasionando morte celular.

Tabela 3. Teste de Tukey das médias das velocidades específicas máximas de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$, h^{-1}) dos experimentos realizados com a levedura *M. guilliermondii* crescida em meio sintético contendo 3 g/L de glicose, 3 g/L de arabinose, 25 g/L de xilose nas concentrações de 0 mg/L, 20 mg/L e 40 mg/L de furfural e 0 g/L, 5 g/L e 10 g/L de ácido acético, a 30°C, 160 rpm, pH 5,5 em 96 h de incubação.

Concentração de ácido acético	Média de $\mu_{\text{máx}}$ (h^{-1})
5 g/L	0,01101 a
0 g/L	0,01012 a
10 g/L	0,00859 b

Concentração de furfural	Média de $\mu_{\text{máx}}$ (h^{-1})
20 mg/L	0,01063 a
0 mg/L	0,01046 a
40 mg/L	0,00864 b

*Letras diferentes indicam diferença significativa a 5%.

Para os tratamentos com ácido acético, pode-se verificar que ocorre o mesmo efeito ao se aumentar a concentração, não havendo diferença significativa entre as médias dos tratamentos com 0 e 5 g/L de ácido acético, os quais são superiores e diferem das médias obtidas nos tratamentos com 10 g/L de ácido acético (Tabela 3), permitindo verificar que para o ácido acético o efeito inibitório na velocidade específica máxima específica de crescimento ocorre na concentração de 10 g/L e para o furfural em 40 mg/L.

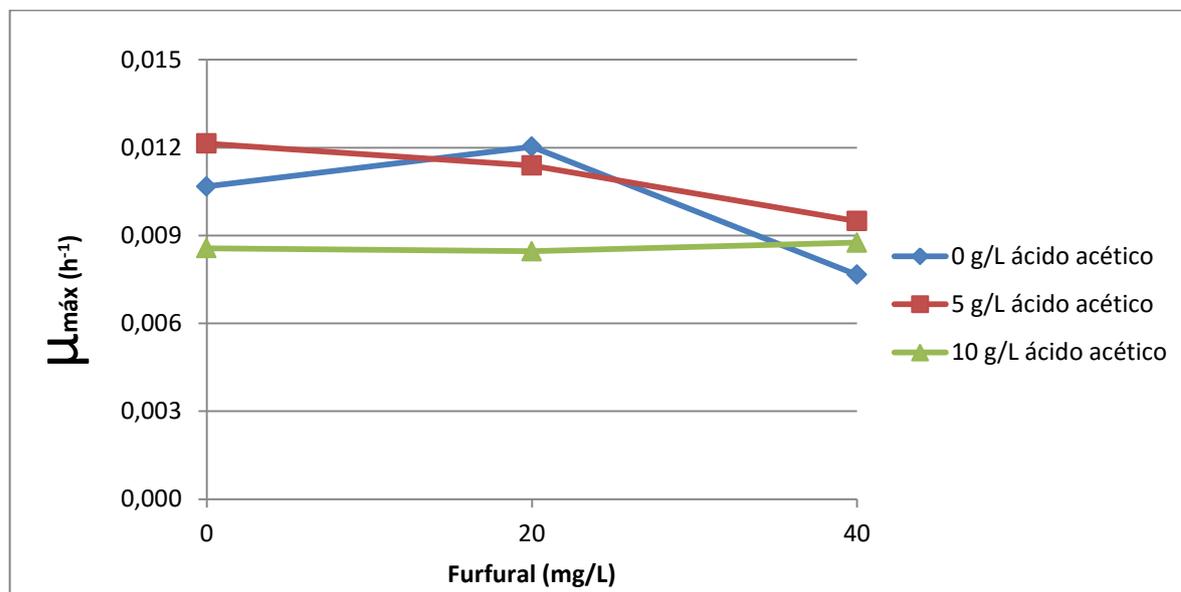
Palmqvist et al. (1999) avaliaram os efeitos do ácido acético e furfural sobre a velocidade específica máxima de crescimento de diferentes linhagens de *S. cerevisiae* e *C. shehatae*, verificando que a velocidade específica de crescimento não foi significativamente influenciada pelo ácido acético sozinho (até 10 g/L), porém o furfural causou uma redução no parâmetro em toda faixa testada (0 a 3 g/L), sendo que ácido acético e furfural interagiram negativamente na velocidade específica máxima de crescimento. A levedura aqui avaliada não apresentou um efeito negativo neste parâmetro para os tratamentos em que o ácido acético e o furfural estavam presentes nas concentrações de 5 g/L e 20 mg/L, respectivamente, mesmo em tratamentos em que ambos os inibidores estavam presentes (Tabela 1), sendo que o tratamento com 5g/L de ácido acético e 0 mg/L de furfural apresentou a maior velocidade específica máxima de crescimento (Tabela 1). Tais resultados denotam

uma importante característica da levedura *M. guilliermondii*, uma vez que não ocorre inibição na velocidade de crescimento pelo furfural em concentrações mais baixas e as concentrações de 5g/L de ácido acético promovem um efeito de aumento neste parâmetro cinético. As concentrações de ácido acético e furfural caracterizadas por Noronha et al. (2010) nos hidrolisados de bagaço de cana-de-açúcar foram de, respectivamente, 0,02 g/L e 3,24 g/L.

O furfural é um aldeído que pode reagir quimicamente com moléculas biológicas podendo causar danos às membranas celulares (PALMQVIST; HAHN-HÄGERDAL, 2000). Além disso, pode ser degradado em acetaldeído, que se acumula intracelularmente ocasionando um aumento da fase lag de alguns micro-organismos (SANCHEZ; BAUTISTA, 1988). Tal efeito não foi observado para a levedura em questão, pois para todos os tratamentos a fase log começou nas primeiras 12 h, denotando que o mecanismo de inibição de crescimento provocado pelo furfural na levedura *M. guilliermondii* requer estudos mais detalhados, pois não afeta a fase de adaptação como para os outros micro-organismos encontrados na literatura.

Além disso, é possível ainda que ocorreu um efeito sinérgico entre o ácido acético e furfural sobre a velocidade máxima específica de crescimento (Figura 2), de onde podemos inferir que cada concentração de ácido acético e furfural promove um efeito diferente na velocidade específica máxima de crescimento. Ding et al. (2011) avaliaram os efeitos interativos de furfural, fenol e ácido acético no metabolismo de *S. cerevisiae* durante a fermentação de hidrolisados lignocelulósicos verificando que os efeitos sinérgicos afetaram significativamente o crescimento, produção de etanol e metabólitos. Os autores comentam ainda que os efeitos inibitórios do ácido acético foram aumentados pela presença de furfural e fenol, porém algumas combinações de concentrações dos inibidores exibiram um efeito antagônico devido a um potencial aumento nos danos sofridos pela célula em relação aos efeitos individuais, gerando uma resposta diferente que enfraquece o efeito individual. Este efeito pode ser observado para o tratamento de 10 g/L de ácido acético e 40mg/L de furfural (Figura 2), onde observa-se um aumento na velocidade específica com o aumento da concentração do furfural de 20 para 40 mg/L. Tal efeito resultou em um comportamento antagônico aos demais tratamentos para esta concentração de furfural.

Figura 2. Efeito da interação entre os inibidores ácido acético e furfural sobre a velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$, h^{-1}) nos experimentos realizados com a levedura *M. guilliermondii* crescida em meio sintético contendo 3 g/L de glicose, 3 g/L de arabinose, 25 g/L de xilose, nas concentrações de 0 mg/L, 20 mg/L e 40 mg/L de furfural e 0 g/L, 5 g/L e 10 g/L de ácido acético, a 30°C, 160 rpm, pH 5,5 em 96 h de incubação.

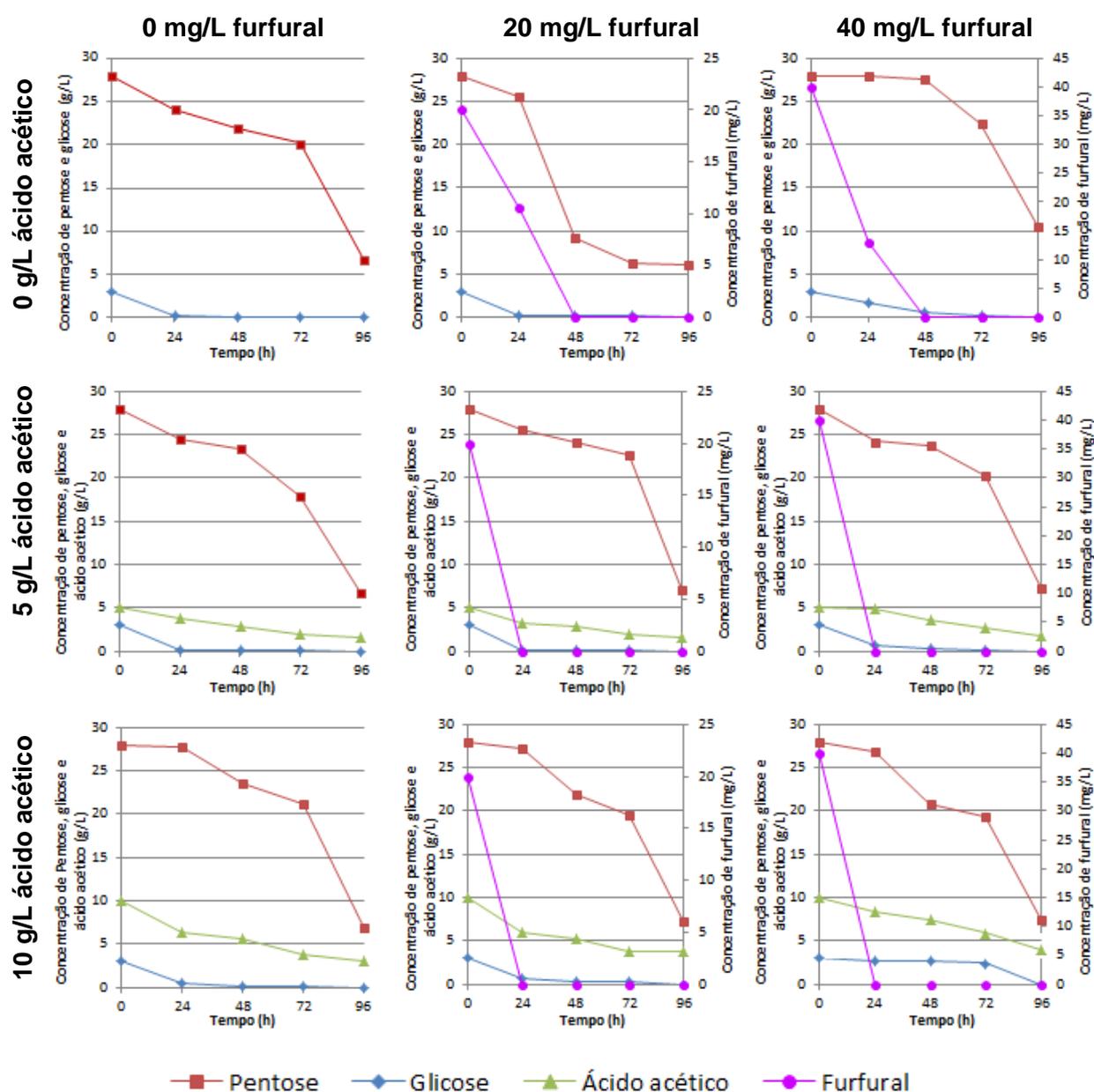


4.2 Efeito do furfural no consumo de pentoses, glicose e ácido acético

O consumo de glicose, pentoses e ácido acético pela levedura *M. guilliermondii* está representado na Figura 3, sendo possível inferir do gráfico que a levedura foi capaz de assimilar pentoses, glicose e ácido acético em todos os tratamentos avaliados. Para os tratamentos em que as fontes de carbono disponíveis foram somente as pentoses e glicose (Figura 3), houve um consumo mais lento da glicose pela adição de 40mg/L de furfural (Figura 3), porém um efeito antagônico foi observado para a assimilação de pentoses ao se adicionar 20 mg/L do inibidor, promovendo um aumento acentuado no consumo a partir de 48 h (Figura 3). Esta é uma importante característica, uma vez que o furfural apresenta um efeito de inibição nesta via de assimilação para a maioria das leveduras que fermentam pentoses. Converti et al. (2000) avaliaram os efeitos de inibição promovidos individualmente pelo ácido acético (0,2 a 1,3 g/L), furfural (0,1 a 0,7 g/L) e metanol (10 a 100 g/L) na conversão de xilose em xilitol por uma linhagem de *C.*

guilliermondii, verificando que dentre os três inibidores, o furfural foi mais tóxico para a fermentação de xilose seguido pelo ácido acético e metanol.

Figura 3. Concentração de glicose (g/L), pentoses (g/L), ácido acético (g/L) e furfural dos cultivos da levedura *M. guilliermondii* em meio sintético contendo 3 g/L de glicose, 3 g/L de arabinose, 25 g/L de xilose nas concentrações de 0 mg/L, 20 mg/L e 40 mg/L de furfural e 0 g/L, 5 g/L e 10 g/L de ácido acético a 30°C, 160 rpm, pH 5,5 em 96 h de incubação.



A adição de 20 mg/L de furfural não afetou o consumo de glicose nos tratamentos com 5 g/L de ácido acético, mas nos tratamentos com 40 mg/L de furfural (Figura 3), houve uma variação acentuada demonstrando que o furfural, na concentração de 40 mg/L, promoveu um efeito de inibição interferindo mais drasticamente na principal via, ou seja, a de assimilação das hexoses, sendo o consumo de glicose bastante afetado ocorrendo de forma lenta em relação às outras fontes de carbono e aos outros tratamentos.

Para os tratamentos com 0 e 5 g/L de ácido acético e 0 e 20 mg/L de furfural, a glicose foi rapidamente consumida nas primeiras 24 h do período de incubação (Figura 3), denotando que não houve inibição desta via pela levedura *M. guilliermondii* nestas concentrações dos inibidores, independente da atuação sinérgica entre eles, sendo este um aspecto vantajoso desta levedura para aplicação em processos de fermentação de hidrolisados de biomassa lignocelulósica. A capacidade de assimilar pentoses e glicose na presença de inibidores comumente encontrados em hidrolisados hemicelulósicos, é uma importante característica apresentada pela levedura *M. guilliermondii*. Gonçalves et al. (2013) verificaram um consumo de apenas 30% das pentoses existentes em hidrolisados hemicelulósicos na presença de inibidores por uma linhagem de *I. occidentalis* M1, durante a avaliação de detoxificação biológica. A levedura *M. guilliermondii* foi capaz de assimilar cerca de 80% das pentoses existentes no meio de cultura para a maioria dos tratamentos avaliados, demonstrando uma característica vantajosa em relação à levedura citada.

Além disso, observa-se que a levedura consumiu ácido acético a partir das primeiras horas de incubação, ou seja, o processo de detoxificação não foi afetado pela presença de outras fontes de carbono, sendo que a glicose foi consumida quase que totalmente, concomitantemente ao ácido acético, nas primeiras 24 h de fermentação (Figura 3). Nos tratamentos com 10 g/L de ácido acético na ausência e presença de 20 mg/L furfural, verificou-se que a levedura consumiu glicose e ácido acético nas 24 h iniciais de cultivo, passando a consumir as pentoses a seguir. Na concentração de 40 mg/L de furfural, as pentoses e ácido acético foram consumidos prioritariamente.

Os efeitos provocados pelo furfural no metabolismo da levedura *M. guilliermondii* requerem maiores estudos a fim de elucidar o mecanismo de interação da levedura com o inibidor, uma vez que para todos os tratamentos em que houve a

adição de furfural (20 mg/L e 40 mg/L) não foi verificada a presença deste, demonstrando que o inibidor pode ter sido assimilado, pois algumas leveduras podem converter o furfural em ácido furfúrico e em álcool furfurílico por serem menos tóxicos (HORVÁTH et al.; 2003; NILSSON et al., 2005; ZHAO et al., 2005), entretanto são necessários estudos que avaliem esta característica, visto que a presença de álcool furfurílico e ácido furfúrico não foram analisadas.

Fonseca et al. (2011) avaliaram a metabolização de furfural, hidroximetilfurfural e ácido acético em processo de detoxificação biológica empregando *I. occidentalis* observando 54,2% de remoção de furfural e hidroximetilfurfural, porém a levedura foi capaz de metabolizar apenas 1,99 g/L de ácido acético na presença dos outros inibidores. A levedura avaliada neste trabalho promoveu a remoção de 5,97 g/L de ácido acético na presença de 40 mg/L de furfural e 6,30 g/L de ácido acético com 20 mg/L de furfural. Os autores comentam ainda sobre a necessidade de estudos que avaliem o efeito dos inibidores sobre a fermentabilidade de pentoses por outros micro-organismos de interesse industrial.

Pode ser inferido da Figura 4 que a concentração de ácido acético (g/L) apresenta um perfil linear de variação devido ao consumo pela levedura *M. guilliermondii*, em todas as condições aqui avaliadas, denotando que o ácido acético não atuou como inibidor e sim como substrato para a esta levedura. Além disso, verifica-se que o ácido acético foi assimilado concomitantemente às pentoses e glicose, mesmo na presença de furfural no meio. O consumo de ácido acético, pentoses e glicose foi observado por Wei et al. (2013) no cultivo de uma linhagem de *S. cerevisiae* modificada geneticamente em meio sintético contendo açúcares (xilose e glicose) e ácido acético. Os autores verificaram que a glicose foi consumida rapidamente seguida pelo consumo simultâneo de xilose e de ácido acético em 88 h de fermentação. Tais resultados corroboram aqueles obtidos neste experimento, porém a linhagem utilizada pelos autores foi modificada geneticamente para possibilitar o aproveitamento de uma mesma via de metabolização de pentoses e acetato com vistas a obter melhores resultados no aproveitamento das fontes de carbono disponíveis em hidrolisados. Salienta-se ainda que a linhagem avaliada no presente trabalho foi capaz de metabolizar ácido acético como fonte de carbono mesmo na presença de inibidores como o furfural e concomitantemente com outras fontes de carbono (pentoses e glicose).

Para uma análise mais detalhada do consumo do ácido acético pela levedura *M. guilliermondii* foram calculadas as velocidades de consumo de ácido acético (g/L.h^{-1}), realizando-se a regressão linear dos dados representados na Figura 4. Foram obtidas equações de primeira ordem cujos coeficientes angulares correspondem às velocidades de variação da concentração de ácido acético apresentadas na Tabela 4. Foi possível verificar que para a maioria dos tratamentos, o coeficiente de determinação R^2 foi maior que 0,9, corroborando os resultados apresentados nas Figuras 3 e 4, onde foi possível verificar que houve um consumo constante de ácido acético para a maioria dos tratamentos, denotando que o ácido acético é fonte de substrato para a levedura em todos os tratamentos, mesmo na presença de furfural e açúcares.

Figura 4. Variação da concentração de ácido acético (g/L) nos cultivos da levedura *M. guilliermondii* em meio sintético contendo 3 g/L de glicose, 3 g/L de arabinose, 25 g/L de xilose nas concentrações de 0 mg/L, 20 mg/L e 40 mg/L de furfural (FF) e 0 g/L, 5 g/L e 10 g/L de ácido acético (AA) a 30°C, 160 rpm, pH 5,5 em 96 h de incubação.

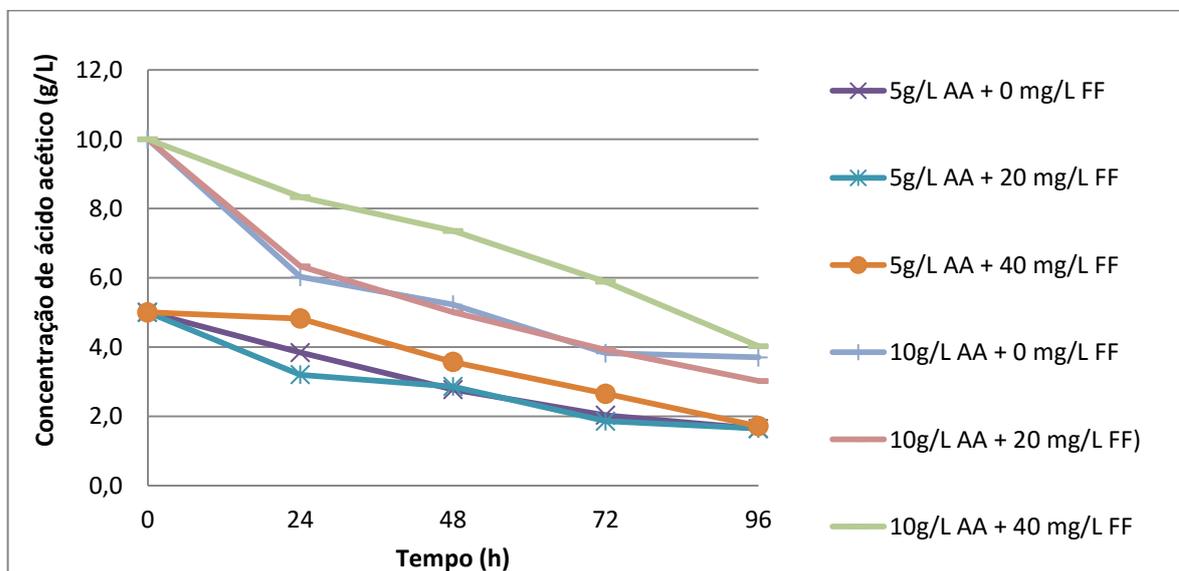


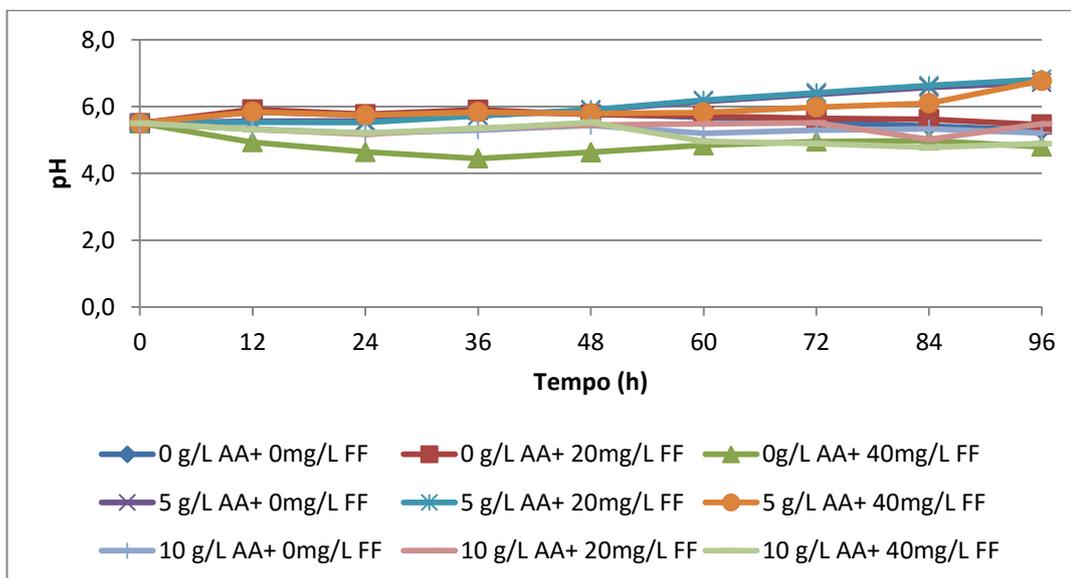
Tabela 4. Velocidade de consumo de ácido acético dos experimentos realizados com a levedura *M. guilliermondii* crescida em meio sintético contendo 3 g/L de glicose, 3 g/L de arabinose, 25 g/L de xilose nas concentrações de 0 mg/L, 20 mg/L e 40 mg/L de furfural (FF) e 5 g/L e 10 g/L de ácido acético (AA) a 30°C, 160 rpm, pH 5,5 e 96 h de incubação.

Tratamento	Velocidade de consumo de ácido acético (g/L.h⁻¹)	R²
5 g/L AA + 0 mg/L FF	0,0355	0,9659
5 g/L AA + 20 mg/L FF	0,0336	0,9056
5 g/L AA + 40 mg/L FF	0,0364	0,9677
10 g/L AA + 0 mg/L FF	0,0617	0,8318
10 g/L AA + 20 mg/L FF	0,0682	0,9018
10 g/L AA + 40 mg/L FF	0,0600	0,9907

Salienta-se que os resultados da variação de ácido acético, apresentados nas Figuras 3 e 4, foram obtidos com referência aos valores encontrados nos controles de cada tratamento e não na concentração inicial, permitindo assim que os resultados possam representar as concentrações reais de ácido assimilado pela levedura *M. guilliermondii*. Tal correção se fez necessária devido a possíveis perdas por volatilização do ácido acético.

Pode-se verificar através dos dados de variação do pH (Figura 5) que ocorreu um aumento nos valores de pH do meio de cultura para os tratamentos cuja concentração de ácido acético inicial era de 5 g/L, com valores próximos de 7 ao final das 96 h de incubação, sendo que para o tratamento com 40 mg/L de furfural, a variação do pH do meio ocorreu de forma mais lenta que nos tratamentos com 0 e 20 mg/L de furfural. Tais resultados confirmam aqueles apresentados para a variação de ácido acético no meio (Figura 4). Para os tratamentos com concentração inicial de 10g/L de ácido acético, o pH sofreu variação pouco acentuada (Figura 5), devido a concentração de ácido acético no meio de cultivo ser de no mínimo 3 g/L ao final das 96 h de incubação (Figura 4).

Figura 5. Variação de pH dos cultivos da levedura *M. guilliermondii* em meio sintético contendo 3 g/L de glicose, 3 g/L de arabinose, 25 g/L de xilose nas concentrações de 0 mg/L, 20 mg/L e 40 mg/L de furfural (FF) e 0 g/L, 5 g/L e 10 g/L de ácido acético (AA), a 30°C, 160 rpm, pH 5,5 em 96 h de incubação.



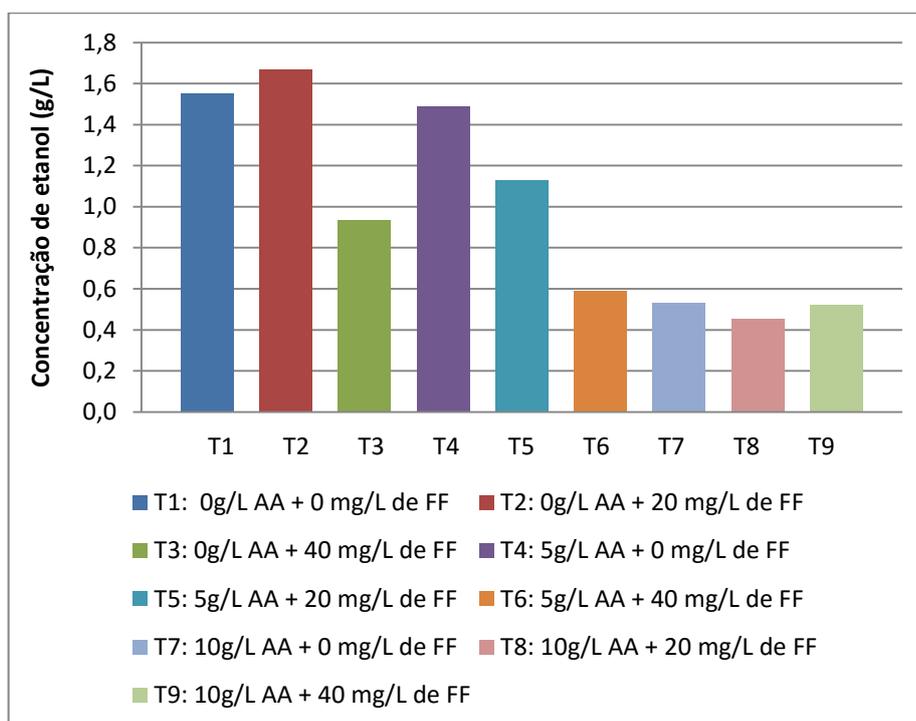
4.3 Efeito do furfural e ácido acético na produção de etanol e produtividade de biomassa

A produção de etanol (g/L) pela levedura *M. guilliermondii*, nas diferentes concentrações de ácido acético e furfural, pode ser observada na Figura 6, e o rendimento e a produtividade na Figura 7. Tais resultados permitem inferir que a adição de ácido acético (5 e 10g/L) não provocou um aumento significativo na concentração de etanol, ocasionando uma diminuição no rendimento total (Figura 7), o que permite avaliar que, nestas condições, o ácido acético, provavelmente não foi convertido a etanol, sugerindo que o mesmo pode ter sido direcionado para a produção de biomassa, manutenção ou outros produtos.

A adição de 20 mg/L de furfural provocou um aumento no consumo de pentoses reduzindo drasticamente o rendimento total (Figura 7), o que permite inferir que, provavelmente, estes açúcares contribuíram para a via de produção de etanol na presença do furfural. Tais resultados confirmam aqueles apresentados na Figura 3, onde verificou-se um efeito inibitório principalmente na assimilação de glicose, que contribuiu para a diminuição no rendimento. Para os tratamentos com 40 mg/L

de furfural no meio de cultivo, houve uma inibição na via de metabolização de pentoses no período de 24 h (Figura 3), sendo este o intervalo de tempo em que se observou a produção de etanol apresentada na Figura 6, permitindo inferir que houve uma baixa conversão de pentoses em etanol nestas condições. Converti et al. (2000) verificaram um forte efeito de inibição na metabolização de pentoses em xilitol na presença de 0,62 g/L de furfural e 0,71 g/L de ácido acético. Os autores comentaram que nestas condições a produtividade do processo fermentativo foi reduzida pela metade.

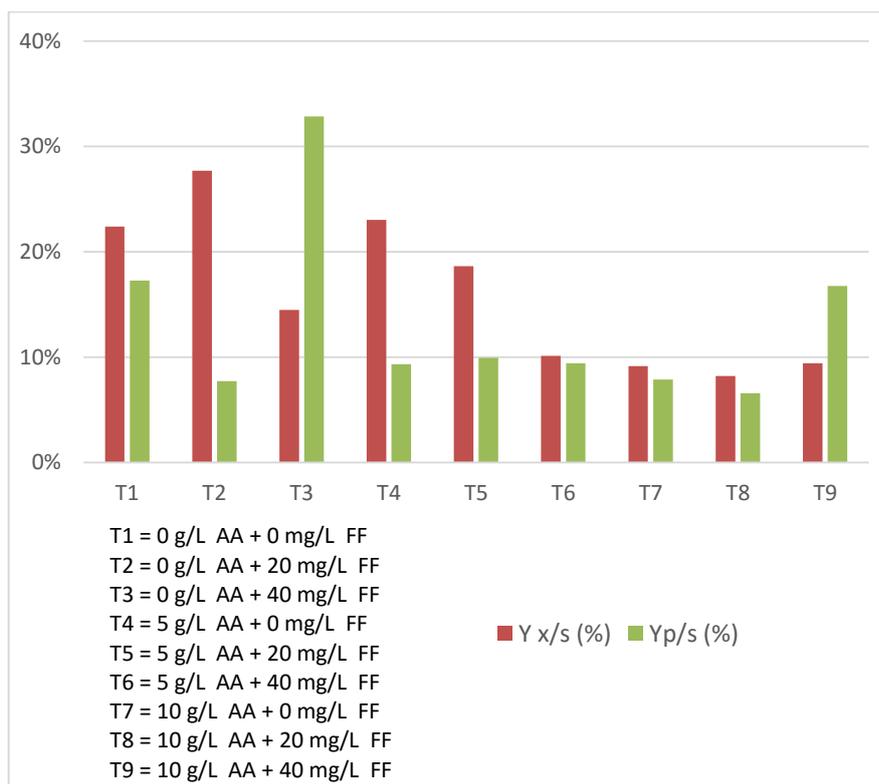
Figura 6. Produção de etanol (g/L) pela levedura *M. guilliermondii* em meio sintético contendo 3 g/L de glicose, 3 g/L de arabinose, 25 g/L de xilose nas concentrações de 0 mg/L, 20 mg/L e 40 mg/L de furfural (FF) e 0 g/L, 5 g/L e 10 g/L de ácido acético (AA), a 30°C, 160 rpm, pH 5,5 em 96 h de incubação.



O efeito combinado da adição de 40 mg/L de furfural em tratamento com 5 g/L de ácido acético promoveu uma inibição no consumo de ácido acético sem alterar o rendimento total (Figura 7), demonstrando que o ácido acético, nestas condições não foi convertido a etanol. Entretanto, para o tratamento com 40 mg/L de furfural e 10 g/L de ácido acético, o consumo de glicose foi reduzido (Figura 3), com conseqüente aumento no rendimento (Figura 7) e no consumo de ácido acético

(Figura 3), demonstrando que, nestas condições, o ácido acético pode ser convertido a etanol.

Figura 7. Rendimento de etanol (Y_p/s , em %) e produtividade de biomassa (Y_x/s , em %) apresentados pela levedura *M. guilliermondii* em meio sintético contendo 3 g/L de glicose, 3 g/L de arabinose, 25 g/L de xilose nas concentrações de 0 mg/L, 20 mg/L e 40 mg/L de furfural (FF) e 0 g/L, 5 g/L e 10 g/L de ácido acético (AA), a 30°C, 160 rpm, pH 5,5 em 96 h de incubação.



Palmqvist et al. (1999) avaliaram os efeitos do ácido acético e furfural na produção de etanol por linhagens de *S. cerevisiae* e *C. shehatae*, verificando que os dois compostos interagiram negativamente sobre o rendimento em etanol e a produtividade de biomassa. Os autores demonstraram que o rendimento em etanol foi estimulado pela concentração de 10 g/L de ácido acético e que na presença de furfural (0 - 2 g/L), o rendimento aumentou ligeiramente na ausência de ácido acético, porém em concentrações mais elevadas causou inibição, corroborando os resultados obtidos neste experimento (Figura 7).

Os valores de produção de etanol apresentados na Figura 6 mostraram baixa produção frente aos valores apresentados por micro-organismos comumente

aplicados no processo de fermentação alcoólica industrial, mostrando a necessidade de avaliar outros parâmetros importantes como a aeração do meio fermentativo, uma vez que a via de obtenção de etanol é afetada pela presença de oxigênio para a maioria dos micro-organismos fermentadores. Alguns autores têm reportado um melhor desempenho de linhagens de *M. guilliermondii* na produção de xilitol, no entanto, tal capacidade não foi avaliada neste trabalho.

Martini et al. (2016) avaliaram os parâmetros fermentativos da levedura *M. guilliermondii* em hidrolisados ácidos de bagaço de cana-de-açúcar, e seus resultados, em condições semelhantes, foram comparados com aqueles obtidos no presente trabalho (Tabela 5). O rendimento em etanol e a produção de biomassa aqui obtidos foram inferiores, porém em tempo menor ao otimizado por Martini et al. (2016). Salienta-se que aqui a levedura foi capaz de remover de forma eficiente ácido acético e possivelmente furfural em concentrações mais elevadas que aquelas caracterizadas pelos autores, denotando uma importante característica na aplicabilidade desta levedura em processos de produção de etanol de segunda geração.

Tabela 5. Resultados obtidos quanto aos substratos, produtos, residual e inibidor no cultivo de *M. guilliermondii* em hidrolisado ácido não-detoxificado de bagaço de cana-de-açúcar, suplementado com 3 g/L de extrato de levedura, a 30°C, 160 rpm, pH 5,5, conforme Martini et al. (2016), em comparação com os resultados obtidos em meio sintético, a 30°C, 160 rpm, pH 5,5, no presente trabalho.

Trabalho	Tempo (h)	Inibidor (mg/L)	Substratos (g/L)				Produtos		Residual (g/L)	
		Furfural	Glicose	Xilose	Arabinose	Ácido acético	Biomassa (g/L)	$Y_{P/S}$ (g etanol/g substrato)	Pentoses + glicose	Ácido acético
Martini et al. (2016)	144	6,5	2,9	28,9	2,5	3,8	6,1	0,14	2,5	0,7
Presente trabalho	96	20,0	3,0	25,0	3,0	5,0	5,1	0,10	7,1	1,6

5 Conclusões

A linhagem da levedura *M. guilliermondii* foi capaz de crescer em meio sintético contendo glicose, pentoses e ácido acético como fontes de carbono, em todos os tratamentos avaliados, apresentando maior velocidade específica de crescimento no tratamento com adição de 5 g/L de ácido acético, que foi consumido concomitantemente com as pentoses e glicose em todos os tratamentos, porém este atuou como inibidor na velocidade específica de crescimento na concentração de 10 g/L. O furfural inibiu o crescimento da levedura na concentração de 40 mg/L. A produção de etanol por *M. guilliermondii* foi baixa em relação aos micro-organismos comumente aplicados no processo de fermentação, porém a levedura foi capaz de crescer e promover a detoxificação biológica mesmo na presença de inibidores como ácido acético e furfural, denotando que o processo requer otimização e que a levedura *M. guilliermondii* pode ser aplicada em rotas biotecnológicas de produção de etanol de segunda geração.

6 Literatura citada

- ALLEN, S. A. et al. Furfural induces reactive oxygen species accumulation and cellular damage in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology for Biofuels**, v. 3, p. 1–10, 2010.
- CONVERTI, A. et al. Mixed inhibitions by methanol, furfural and acetic acid on xylitol production by *Candida guilliermondii*. **Biotechnology Letters**, v. 22, p. 1861–1865, 2000.
- DING, M. Z. et al. Metabolomic study of interactive effects of phenol, furfural, and acetic acid on *Saccharomyces cerevisiae*. **Omics**, v. 15, n. 10, p. 647–653, 2011.
- FONSECA, B. G. et al. Biological detoxification of different hemicellulosic hydrolysates using *Issatchenkia occidentalis* CCTCC M 206097 yeast. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 38, n. 1, p. 199–207, 2011.

- GONÇALVES, B. C. M. et al. Consumo de açúcares e ácido acético durante a destoxificação biológica de hidrolizado hemicelulósico pela levedura *Issatchenkia occidentalis* M1. **BBR – Biochemistry and Biotechnology Reports**, v. 2, n. 3, p. 372–375, 2013.
- HANLY, T. J.; HENSON, M. A. Dynamic model-based analysis of furfural and HMF detoxification by pure and mixed batch cultures of *S. cerevisiae* and *S. stipitis*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 111, n. 2, p. 272–284, 2014.
- HORVÁTH, I. S. et al. Effects of furfural on anaerobic continuous cultivation of *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 75, n. 5, p. 540–549, 2001.
- HORVÁTH, I. S. et al. Effects of furfural on the respiratory metabolism of *Saccharomyces cerevisiae* in limited chemostats. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 7, p. 4076–4086, 2003.
- MARTINI, C. et al. A strain of *Meyerozyma guilliermondii* isolated from sugarcane juice is able to grow and ferment pentoses in synthetic and bagasse hydrolysate media. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 32, p. 1–9, 2016.
- MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426–428, 1959.
- NILSSON, A. et al. Cofactor dependence in furan reduction by *Saccharomyces cerevisiae* in fermentation of acid-hydrolyzed lignocellulose. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 12, p. 7866–7871, 2005.
- NORONHA, L. D. L. et al. Utilização de diferentes tipos de policloreto de alumínio para purificação de hidrolizado de bagaço de cana através da técnica de coagulação e floculação. **Química Nova**, v. 33, n. 8, p. 1698–1702, 2010.
- PALMQVIST, E. et al. Main and interaction effects of acetic acid, furfural, and p-hydroxybenzoic acid on growth and ethanol productivity of yeasts. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 63, n. 1, p. 46–55, 1999.

- PALMQVIST, E.; HAHN-HÄGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: Inhibitors and mechanisms of inhibition. **Bioresource Technology**, v. 74, n. 1, p. 25–33, 2000.
- PERRONE, G. G.; TAN, S. X.; DAWES, I. W. Reactive oxygen species and yeast apoptosis. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1783, n. 7, p. 1354–1368, 2008.
- SANCHEZ, B.; BAUTISTA, J. Effects of furfural and 5-hydroxymethylfurfural on the fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* and biomass production from *Candida guilliermondii*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 10, n. 5, p. 315–318, 1988.
- WEI, N. et al. Enhanced biofuel production through coupled acetic acid and xylose consumption by engineered yeast. **Nature Communications**, v.4:2580doi: 10.1038/ncomms3580 (2013).
- ZHAO, J. et al. Mediated electrochemical measurement of the inhibitory effects of furfural and acetic acid on *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida shehatae*. **Biotechnology Letters**, v. 27, p. 207–211, 2005.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A levedura *M. guilliermondii* foi capaz de crescer em meio sintético contendo ácido acético como única fonte de carbono, em concentrações variando de 1,5 a 19,5 g/L, em pH 5,5, sendo essas concentrações muito acima daquelas normalmente encontradas em hidrolisados. A levedura mostrou alta afinidade pelo substrato ácido acético ($K_s = 0,75$ g/L), sendo que a concentração a partir da qual ocorreu inibição do crescimento foi 10,5 g/L. O pH inicial teve influência no consumo do ácido acético assim como a concentração celular inicial.

A velocidade específica de crescimento nos cultivos em que o ácido acético era a única fonte de carbono foi maior comparativamente aos cultivos contendo também glicose, xilose e arabinose. A presença de açúcares no meio fermentativo (glicose e pentoses) também reduziu o consumo de ácido acético e permitiu uma maior produção de etanol, porém com valores ainda pouco expressivos. A adição de furfural não afetou o consumo de ácido acético pela levedura, porém com 40 mg/L a maioria dos parâmetros fermentativos sofreu inibição.

A linhagem de *M. guilliermondii* testada foi capaz de assimilar ácido acético e promover a detoxificação do meio de cultivo, sendo indicada para utilização em processos de fermentação de hidrolisados ácidos hemicelulósicos visando a produção de etanol de segunda geração, uma vez que consome os açúcares disponíveis e converte em etanol com concomitante detoxificação do meio, mesmo

na presença de furfural. Contudo, se faz necessária a otimização de parâmetros fermentativos com vistas a obtenção de melhores resultados em termos de rendimento em etanol e produtividade.