UNESP - UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

CAMPUS DE ARARAQUARA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

Avaliação da tolerância de leveduras a um coquetel de inibidores que simule um hidrolisado de bagaço de cana quando adicionado a um meio sintético

MARIA OLIVIA CAMPOS MASIERO

Dissertação de Mestrado

2011

MARIA OLIVIA C. MASIERO

Avaliação da tolerância de leveduras a um coquetel de inibidores que simule um hidrolisado de bagaço de cana quando adicionado a um meio sintético

Dissertação apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

Orientadora: **Profa. Dra. Cecilia Laluce**
Co-orientadora: Dra. Karen F. de Oliveira

Araraquara

MARIA OLIVIA CAMPOS MASIERO

Dissertação apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Araraquara, 25 de fevereiro de 2011.

BANCA EXAMINADORA

Profª Drª Cecilia Laluce (Orientadora)
Instituto de Química – UNESP, Araraquara

Profª Drª Sandra Regina Pombeiro Sponchiado
Instituto de Química – UNESP, Araraquara

Profª Drª Nilce Maria Martinez Rossi
Faculdade de Medicina – USP, Ribeirão Preto

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a minha família e a todos aqueles que acreditam, que têm fé.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por ter me dado força e saúde para concluir esta jornada.

A minha orientadora Dra. Cecilia Laluce, por ter me aceito em sua equipe de trabalho, pelo aprendizado, paciência e dedicação.

A Dra. Karen F. de Oliveira, minha co-orientadora, pelo convívio e aprendizado.

Agradeço a toda equipe do laboratório: Jéssica, Meline, Leonardo, Luiz Fernando, Ismael, Daniel e Fernando Delfino pela boa convivência e pelas boas estórias pra gente se lembrar...

Agradeço a participação de Vinícius (bolsita TT3 da FAPESP) e Daniel (bolsita TT3 da FAPESP) pelo empenho, dedicação e carinho.

Ao prof. Dr. João Olímpio Tognolli, Diretor do Departamento de Serviço Técnico de Informática (STI) pela ajuda no desenvolvimento da parte estatística deste trabalho.

A minha amiga Jéssica, que tanto me ouviu e me aconselhou. Por ter encontrado esta grande amizade no ambiente de trabalho. Valeu amiga.

As minhas irmãs, Mari, Manu, Leka, por estarem comigo antes, durante e depois de tudo isso.

Aos meus pais, minha mãe profa. Nely, que tanto me ajudou no desenvolvimento deste dentre outros trabalhos, pela sua maturidade, carinho e ensinamento. Ao meu pai, Kuty, que tanto me ouviu, me aconselhou e me ensinou sobre as coisas da vida. Amo vocês.

Ao Guilherme, pelo amor, compreensão e confiança.

Agradeço por viver esta grande experiência onde não só a pesquisa foi o meu maior conhecimento, mas sim o conhecimento das diferenças dentro de um grupo.

Nada mais e dá fé.....

Resumo

RESUMO

A biomassa lignocelulósica contém quantidades significativas de fontes de carbono, sendo assim uma fonte de energia renovável. O presente trabalho teve como objetivo estabelecer meios líquidos e sólidos para o estudo dos efeitos dos inibidores presentes nos hidrolisados do bagaço de cana-de-açúcar e, por fim, estabelecer um coquetel de inibidores que permitisse o crescimento e a fermentação da levedura *Saccharomyces cerevisiae* no meio líquido estabelecido. Por esta razão, o conjunto de resultados deste trabalho compreende três partes. A primeira parte foi dedicada ao estabelecimento de meios sólidos e líquidos para comparação de leveduras na presença do inibidor mais abundante do hidrolisado do bagaço de cana, o ácido acético. No meio sólido YPD, as diferentes linhagens de leveduras ensaiadas sofreram menos os efeitos inibitórios deste ácido do que o meio sintético solidificado. Em meio líquido, foi necessário adicionar 2% de extrato de levedura para ativar o crescimento da levedura 63M, mas este efeito foi suprimido em presença de ácido acético. As variações em pH inicial (3,5 – 5,5) afetaram mais a produção de etanol do que a biomassa, ao passo que a viabilidade não variou. A segunda parte deste trabalho foi dedicada ao estabelecimento de um meio sintético que permitisse o crescimento e fermentação da linhagem 63M em presença de ácido acético. O aumento de 33% em biomassa na presença de 83 mmol/L de ácido acético foi devido à elevação da glicose (10-18%) e do inóculo (5-10 mg/mL). As concentrações crescentes e variadas de ácido acético em meio sintético foi utilizado para estudar seus efeitos sobre o crescimento (inibição acima de 50 mmol/L), a viabilidade (acima de 250 mmol/L) e a produção de etanol (acima de 83 mmol/L). As concentrações de outros inibidores apresentaram diferentes limites de tolerância da levedura 63M quando comparados ao ácido acético usando-se o mesmo meio. Os limites de tolerância dos inibidores após 6 horas de fermentação, quanto à produção de biomassa e etanol foram: vanilina > ácido fórmico > ácido acético = furfural (inibições de 15 mmol/L até 58 mmol/L para biomassa e de 41 mmol/L até 155 mmol/L para o etanol final) > ácido levulínico (inibição em 330 mmol/L). Quanto à viabilidade a inibição foi da seguinte ordem: fórmico > vanilina > furfural> ácido acético> ácido levulinico. Quanto as variações em pH os decréscimos foram maiores com fórmico> acético e levulínico > furfural. Por fim, técnicas estatísticas foram utilizadas para determinar as concentrações de coquetel de inibidores que permitisse o crescimento e a produção de etanol da linhagem 63M no meio sintético. Um planejamento fatorial fracionado 2^{5-2} foi realizado com o objetivo de se estudar os efeitos principais destes cinco inibidores sobre o crescimento e fermentação da levedura 63M, tendo como objetivo selecionar os três inibidores com maiores efeitos sobre a fermentação, e estes foram o ácido fórmico, levulínico e furfural. As concentrações dos inibidores foram geradas pelo programa estatístico Minitab 14.1, e as concentrações utilizadas para a formação do coquetel foram: 20 mmol/L de ácido acético; 5 mmol/L de vanilina, 3,3 mmol/L de ácido fórmico, 21,6 mmol/L de ácido levulínico e 6,6 mmol/L de furfural. Estes valores máximos de etanol e biomassa foram confirmados através do experimento de validação onde se obteve 13,2 ± 0,1 mg/mL de biomassa e uma produção de 72,6 ± 1,0 g/L de etanol produzido.

Palavras-chave: lignocelulose, bagaço de cana-de-açúcar, hidrólise ácida, hidrólise enzimática, etanol de segunda geração.

Abstract

ABSTRACT

Lignocellulosic biomass contains significant quantities of carbon sources, being a renewable energy source. The aim of the present work was to determine liquid and solid media for the study of the effects of inhibitors present in hydrolysates of sugarcane bagasse, and to establish a cocktail of inhibitors that allow the growth and the fermentation of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* in the liquid medium established. Thus, the results of this work consist of three parts. The first part was dedicated to establishing solid and liquid media in order to compare different yeast strains in the presence of the most abundant inhibitor found in hydrolysates of sugarcane bagasse, the acetic acid. On YPD solid medium, this acid had less inhibitory effect on the different yeast strains tested than on the synthetic solid medium. In liquid medium, it was necessary to add 2% yeast extract to activate the growth of the strain 63M, but this effect was abolished in the presence of acetic acid. Variations in the initial pH (3.5 - 5.5) affected more the ethanol production than the biomass, while the viability was not influenced. The second part of this work was dedicated to establishing a synthetic medium that allows the growth and fermentation of the strain 63M in the presence of acetic acid. The 33% increase in biomass in the presence of 83 mmol/L acetic acid was due to the high glucose concentration (10-18%) and inoculum (5-10 mg/mL) used. The increasing concentrations of acetic acid in the synthetic medium were used to study its effects on growth (inhibition above 50 mmol/L), viability (over 250 mmol/L) and ethanol production (above 83 mmol/L). The concentrations of the other inhibitors had different limits of tolerance by the yeast 63M when compared to acetic acid using the same synthetic medium. The tolerance limits of the inhibitors after 6 hours of fermentation for the production of biomass and ethanol were: vanillin > formic acid > acetic acid = furfural (inhibitions of 15 mmol/L to 58 mmol/L for biomass and 41 mmol/L up to 155 mmol/L for final ethanol) > Levulinic acid (inhibition at 330 mmol/L). For viability the inhibition followed this order: formic > vanillin > furfural > acetic acid >levulinic acid. Regarding the pH variations, the decreases were greater with formic acid > acetic and levulinic acid > furfural. Finally, statistical techniques were used to determine the concentration of the inhibitors to allow the growth and the ethanol production by the strain 63M in synthetic medium. A 2^{5-2} fractional factorial design was performed with the aim of studying the main effects of these five inhibitors on growth and fermentation, aiming to select the three inhibitors with greater effects on fermentation, which were the formic acid, levulinic acid and furfural. The inhibitor concentrations were generated by the statistical program Minitab 14.1, and the concentrations used for the establishment of the cocktail were: 20 mmol/L acetic acid, 5 mmol/L of vanillin, 3.3 mmol/L formic acid, 21,6 levulinic acid and 6,6 mmol/L furfural. These maximum amounts of ethanol and biomass were confirmed through the validation experiment which revealed 13.2±0.1 mg/mL of biomass production and 72.6±1.0 g/L of ethanol produced.

Keywords: lignocellulose, sugarcane bagasse, acid hydrolysis, enzymatic hydrolysis, second-generation ethanol.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Estrutura da celulose 19
Figura 2. Monossacarídeos constituintes das hemiceluloses. (1) D-glicose, (1) D-galactose, (3) L-arabinose, (4) D-xilose, (5) 4-*O*-metil-D-glucurônico, (6) L-ramnose (SJÖSTRÖM, 1992) 20
Figura 3. Estrutura dos principais monômeros da lignina (KLINKE *et al*., 2004) 20
Figura 4. Esquema do pré-tratamento do material lignocelulósico (adaptado de MOSIER *et al*., 2005) 21
Figura 5. Composição média da biomassa lignocelulósica e os principais produtos derivados de hidrólise (ALMEIDA *et al*., 2007) 22
Figura 6. Fórmula estrutural dos principais furanos presentes no hidrolisado hemicelulósico 27
Figura 7. Fórmula estrutural dos principais ácidos alifáticos presentes no hidrolisado hemicelulósico 28
Figura 8. Fórmula estrutural dos principais compostos fenólicos presentes no hidrolisado hemicelulósico 29
Figura 9. Sistema utilizado nas fermentações em batelada simples, conforme sugerido por Trevisan H. C. (SOUZA *et al*., 2007) 40
Figura 10. Analise sequêncial estatística 44
Figura 11: Direção dos aumentos dos fatores em um planejamento fatorial completo: X1 (altura), X2 (largura), X3 (profundidade) na disposição cúbica das variáveis independentes utilizadas para o tratamento estatístico dos dados segundo o programa 47
Figura 12. Diagrama do planejamento compsoto central gerado de dois fatores 49
Figura 13. Planejamento composto central para três fatores (ácido fórmico, levulinico, furfural) de variáveis independentes 52
Figura 14. Efeito do aumento da concentração de ácido acético sobre o crescimento de linhagens de leveduras em meios sintético contendo 2% de extrato de levedura e YPD sólidos ambos contendo 2% de glicose. **A=** meio sintético contendo 83 mmol/L de ácido acético, **B=** meio YPD contendo 83 mmol/L de ácido acético, **C=** meio sintético contendo 104 mmol/L de ácido acético, **D=** meio YPD contendo 104 mmol/L de ácido acético. **Linhagens:** (1) 63M, (2) IZ-1904, (3) LTU, (4) FFB15, (5) FBB36, (6) FBB74, (7) FBB10, (8) FBB90, (9) FBB88 e (10) ACA-174 57

Figura 15. Efeito do aumento da concentração de ácido acético sobre o crescimento de linhagens de leveduras em meios sintético contendo 2% de extrato de levedura e YPD sólidos ambos contendo 8% de glicose. A= meio sintético sem ácido acético, B= meio YPD sem ácido acético, **C=** meio sintético contendo 83 mmol/L de ácido acético, **D=** meio YPD contendo 83 mmol/L de ácido acético, **E=** meio sintético contendo 104 mmol/L de ácido acético, **F=** meio YPD contendo 104 mmol/L de ácido acético. **Linhagens:** (1) 63M, (2) IZ-1904, (3) LTU, (4) FFB15, (5) FBB36, (6) FBB74, (7) FBB10, (8) FBB90, (9) FBB88 e (10) ACA-174 59

Figura 16. Efeito da adição do ácido acético (83 mmol/L) e do extrato de levedura (2%) sobre a produção de biomassa da levedura 63M em meio sintético contendo 10% de glicose, 5,0 mg/mL de inóculo, pH 4,5 a 34°C. **Parte A:** meio sintético contendo 2% de extrato de levedura controle (-■-, sem adição de ácido acético) e contendo 83 mmol/L de ácido acético (-●-). **Parte B:** meio sintético controle (-■-, sem adição de ácido acético) e contendo 83 mmol/L de ácido acético (-●-) 61

Figura 17. Efeito da concentração crescente de ácido acético adicionado em meio sintético contendo 2% de extrato de levedura, 10% de glicose, inóculo inicial de 5 mg/mL, pH 4,5 a 34°C, sobre o crescimento (-□-) e a viabilidade pelo método do azul de metileno (-●-) e por plaqueamento (-▲-) da levedura 63 M após 6h de propagação 63

Figura 18. Efeito do pH inicial do meio sintético sobre a produção da biomassa (**parte A**), etanol (**parte B**) e viabilidade (**parte C**) de linhagens de levedura 63M, ACA-174, e IZ-1904 após 6 horas de propagação em meio sintético líquido contendo 2% de extrato de levedura, 83 mmol/L de ácido acético, 10% de glicose, inóculo inicial de 5 mg/mL, pH 3,5-4,5-5,5 a 34°C 64

Figura 19. Curvas de tempo do efeito do aumento das concentrações de inóculo e açúcar sobre o crescimento da levedura 63M em meio sintético contendo 2% de extrato de levedura, pH 4,5 a 34°C. Parte **A**= meio sintético contendo 10% de glicose e inóculo inicial de 5 mg/mL controle (-■-) e contendo 83 mmol/L de ácido acético(-●-). Parte **B**= meio sintético contendo 18% de glicose e inóculo inicial de 10 mg/mL controle (-■-) e contendo 83 mmol/L de ácido acético(-●-) 67

Figura 20. Efeito do aumento das concentrações dos inibidores de fermentação sobre a produção de biomassa da levedura 63M após 6h de fermentação em meio sintético contendo 18% de glicose, 2% de extrato de levedura e inoculo

inicial de células de 10 mg/mL a 34ºC. (-■-) ácido acético, (-○-) ácido fórmico, (-▷-) ácido levulínico, (-◀-) furfural e (-◆-) vanilina 68

Figura 21. Efeito do aumento das concentrações dos inibidores de fermentação sobre o etanol produzido da levedura 63M após 6h de fermentação em meio sintético contendo 18% de glicose, 2% de extrato de levedura e inóculo inicial de células de 10 mg/mL a 34ºC. (-■-) ácido acético, (-○-) ácido fórmico, (-▷-) ácido levulínico, (-◀-) furfural e (-◆-) vanilina 70

Figura 22. Efeito do aumento das concentrações dos inibidores de fermentação sobre a viabilidade da levedura 63M após 6h em meio sintético 18% de glicose, 2% de extrato de levedura e inóculo inicial de células de 10 mg/mL a 34ºC. (-■-) ácido acético, (-○-) ácido fórmico, (-▷-) ácido levulínico, (-◀-) furfural e (-◆-) vanilina 71

Figura 23. Efeito do aumento das concentrações dos inibidores de fermentação sobre o pH da levedura 63M após 6h em meio sintético 18% de glicose, 2% de extrato de levedura e inóculo inicial de células de 10 mg/mL a 34ºC. (-■-) ácido acético, (-○-) ácido fórmico, (-▷-) ácido levulínico, (-◀-) furfural e (-◆-) vanilina 73

Figura 24. Gráficos de Pareto mostrando os efeitos máximos dos inibidores e suas combinações em relação a uma escala de valores (eixo X) sobre a produção de etanol pela levedura 63M após 6h de fermentação a 34°C. X_1=ácido acético, X_2=ácido fórmico, X_3=ácido levulínico, X_4= furfural, X_5=vanilina 76

Figura 25. Gráficos dos efeitos principais dos inibidores (ácidos acético, fórmico e levulínico, furfural e vanilina) sobre a produção de biomassa da levedura 63M após 6h de fermentação a 34°C 76

Figura 26. Curva de calibração para análise de biomassa. A equação da reta $y = a + b.x$ mostrou o seguinte: coeficiente angular b=2,44503, fator de correlação R^2=0,996 e fator de conversão de absorbância em biomassa seca *f*=0,409 para o espectrofotômetro Bioespectro modelo SP-22 97

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Concentração dos inibidores mais abundantes presentes no hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana 31
Tabela 2: Combinações dos fatores em um planejamento 2^{5-2} 47
Tabela 3. Niveis e faixas de concentrações dos inibores de fermentação selecionados para o primeiro planejamento fatorial fracionado 51
Tabela 4: Níveis e faixas de concentrações das variáveis independentes selecionadas para o segundo planejamento de superfície de resposta 53
Tabela 5. Produção de biomassa e etanol em presença dos inibidores de fermentação e resultantes dos experimentos do planejamento fatorial fracionado 2^{5-2} (1/4 de fracionamento) 75
Tabela 6. Experimentos do planejamento 2^3 composto central completo de superfície de resposta para determinar os efeitos dos inibidores de fermentação sobre a produção de biomassa, etanol e viabilidade pela levedura 63M contendo 6 replicatas do ponto central 78
Tabela 7. Análise de variância para a produção de etanol da levedura 63M em meio sintético contendo 2% de extrato de levedura, 18% de glicose e 10 mg/mL de inóculo inicial após 6h a 34°C 79
Tabela 8. Coeficientes estimados para a produção de etanol pela levedura 63M em meio sintético contendo 2% de extrato de levedura, 18% de glicose e 10 mg/mL de inóculo inicial após 6h a 34°C 80
Tabela 9. Coeficientes estimados para a produção de biomassa pela levedura 63M em meio sintético contendo 2% de extrato de levedura, 18% de glicose e 10 mg/mL de inóculo inicial após 6h a 34°C 81
Tabela 10. Coeficientes estimados para a produção de biomassa da levedura 63M em meio sintético contendo 2% de extrato de levedura, 18% de glicose e 10 mg/mL de inóculo inicial após 6h a 34°C 82
Tabela 11. Aplicação do 'Response Optimizer' na otimização dos resultados obtidos para a produção de etanol e biomassa pela levedura 63M após 6h em meio sintético contendo 18% de glicose, 2% de extrato de levedura, 10 mg/mL de inóculo inicial e na presença de inibidores de fermentação utilizados no planejamento de superfície de resposta 83

SUMÁRIO

1- INTRODUÇÃO 17
1.1- ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO 18
1.2- COMPOSIÇÃO DAS FIBRAS DO BAGAÇO DE CANA 18
1.3- PRÉ-TRATAMENTO DO MATERIAL LIGNOCELULÓSICO 21
1.4- HIDRÓLISE ÁCIDA DO BAGAÇO DE CANA 22
1.5- HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DO BAGAÇO DE CANA 24
1.6- INIBIDORES DOS HIDROLISADOS E MECANISMOS DE INIBIÇÃO MICROBIANA 25
1.6.1- Derivados furânicos 25
1.6.2- Ácidos alifáticos 27
1.6.3- Compostos fenólicos 28
1.7- INTERAÇÕES ENTRE OS INIBIDORES DURANTE A FERMENTAÇÃO 30
1.8- CONCENTRAÇÃO DE INIBIDORES ENCONTRADOS NOS HIDROLISADOS DE BAGAÇO DE CANA 31
1.9- PLANEJAMENTO FATORIAL COMO FERRAMENTA PARA A OTIMIZAÇÃO DE PROCESSOS 32
2- OBJETIVOS 33
2.1- OBJETIVO GERAL 34
2.2- OBJETIVOS ESPECÍFICOS 34
3- MATERIAL E MÉTODOS 35
3.1- LINHAGENS DE LEVEDURAS 36
3.2- MEIOS DE CULTURA UTILIZADOS 36
3.2.1- Meio YPD 36
3.2.2- Meio sintético 37
3.3- MEIOS SÓLIDOS YPD E SINTÉTICO CONTENDO ÁCIDO ACÉTICO INOCULADOS POR REPLICAÇÃO 38
3.3.1- Meio sintético líquido para avaliação de crescimento e fermentação em presença de ácido acético 38
3.3.2- Meios sintéticos líquidos contendo inibidores de fermentação 39
3.4- FERMENTAÇÃO EM BATELADA SIMPLES 39
3.4.1- Propagação do inoculo para cultivos em Erlenmeyers agitados 40
3.5- MÉTODOS ANALÍTICOS 41

3.5.1- Biomassa celular 41
3.5.2- Viabilidade celular 41
3.5.3- Medidas de etanol 42
3.5.4- Medidas de pH 43
3.6- MÉTODOS ESTATÍSTICOS 43
3.6.1- Planejamento fatorial 44
3.6.2- “Plots” dos efeitos principais 45
3.6.3- Gráficos de pareto 45
3.6.4- Planejamento fatorial completo e fraccionado 46
3.6.5- Planejamento composto central (CCD) 48
3.6.6- Análise de variância (ANOVA) para seleção do modelo matemático 49
3.6.7- Teste *t* de s*tudent* 49
3.6.8- p-VALOR 50
3.6.9- Planejamento fatorial fracionado 50
3.6.10- Segundo planejamento composto central completo 51
3.6.11- Validação do planejamento composto central completo 53
4- RESULTADOS E DISCUSSÃO 54
4.1- ESTABELECIMENTO DE MEIOS CONTENDO ÁCIDO ACÉTICO PARA SELEÇÃO E COMPARAÇÃO DE LEVEDURAS 55
4.1.1- Meios seletivos sólidos 55
4.1.2-. Comparção do efeito do ácido acético em meios sintético e YPD contendo 2% de glicose 56
4.1.3- Efeito do aumento da glicose sobre o crescimento de leveduras em meios sintético e YPD acrescidos de ácido acético 58
4.2- Meios seletivos líquidos 60
4.2.1- Efeito do aumento da concentração de inoculo e açúcar sobre o crescimento da levedura 63M 65
4.3- EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DOS INIBIDORES SOBRE O CRESCIMENTO E FERMENTAÇÃO DA LEVEDURA 63M EM MEIO SINTÉTICO LÍQUIDO CONTENDO ALTA DENSIDADE DE CÉLULAS E ALTA CONCENTRAÇÃO DE AÇÚCAR 66
4.3.1- Efeito da presença de inibidores de hidrolisados sobre o crescimento, produção de etanol, viabilidade e pH pela levedura 63M 67

4.4– ESTABELECIMENTO DE UM COQUETEL DE INIBIDORES A SER ADICIONADO AO MEIO SINTÉTICO PARA ESTUDOS DE CRESCIMENTO E FERMENTAÇÃO DA LEVEDURA 63M 73
4.4.1- Primeiro planejamento fatorial fracionado 74
4.4.2– Formulação de um coquetel de inibidores de hidrolisados sobre o crescimento e otimização estatística da concentração de seus componentes sobre a fermentação da levedura 63M em meio sintético 77
4.5- VALIDAÇÃO ESTATÍSTICA E EXPERIMENTAL DOS MODELOS DE PRODUÇÃO DE ETANOL E BIOMASSA 83
5- CONCLUSÕES 84
6- REFERÊNCIAS 87
7-APÊNDICE 96

Introdução

1.1- ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO

Etanol de segunda geração é o etanol produzido por fermentação de biomassa lignocelulósica, de sub-produtos agrícolas, resíduos de madeira ou de biomassa vegetal (OLOFSSON *et al*., 2008). Recentemente no Brasil, a produção de etanol de segunda geração tem tido um grande destaque quando comparado com a produção de etanol de primeira geração devido à grande demanda do etanol no mercado internacional (GRAY *et al*., 2006).

O bagaço de cana-de-açúcar é um material lignocelulósico resultante da extração do caldo após esmagamento da cana em moendas resultando em um resíduo agrícola abundante. Embora o bagaço possa ser utilizado para a geração de energia elétrica, térmica (vapor) e como suplemento em alimentação animal, resta ainda um excedente não utilizável (PANDEY *et al*., 2000). Esta fonte renovável de celulose e hemicelulose podem potencialmente servir como substrato para processos biotecnológicos como a conversão do material lignocelulósico do bagaço de cana em etanol de segunda geração (ALMEIDA *et al.*, 2007).

1.2- COMPOSIÇÃO DAS FIBRAS DO BAGAÇO DE CANA

Os principais componentes dos materiais lignocelulósicos são a celulose, a hemicelulose e a lignina, apresentando composições e porcentuais que variam de uma espécie de planta para a outra. Este material é constituído por fibras do material celulolítico. Cada microfibrila apresenta cerca de 10-20 nm de diâmetro e pode conter até cerca de 40 cadeias de celulose. As microfibrilas de celulose estão envoltas por hemicelulose e estas se encontram covalentemente ligadas à lignina, um polímero aromático rígido. (MOROHOSHI, 1991). O termo celulose foi reportado pela primeira vez no século XIX pelo químico francês Anselm Payen (KLEMM *et al.,* 2005). De uma forma geral a celulose é uma das mais comuns cadeias poliméricas, representando uma produção anual de aproximadamente 1,5 $\times 10^{12}$ toneladas,

resultando em uma inesgotável fonte de matéria-prima para o desenvolvimento sustentável (KLEMM *et al.,* 2005).

A celulose (Fig. 1) é o principal componente da parede celular da fibra vegetal. É um homopolissacarídeo linear formado por unidades de D-glicose unidas entre si através de ligações glicosídicas do tipo β(1→4), formando cadeias longas e paralelas. Este polissacarídeo apresenta uma estrutura micro-cristalina que dificilmente se dissolve ou se hidrolisa sob condições naturais (KLEMM *et al*., 2005). A celulose envolve as células vegetais em forma de arranjos paralelos regulares mantidos unidos e fixos por uma matriz de outro material polimérico, denominado de hemicelulose (LYND, 1996; VAN MARIS *et al*.,2006).

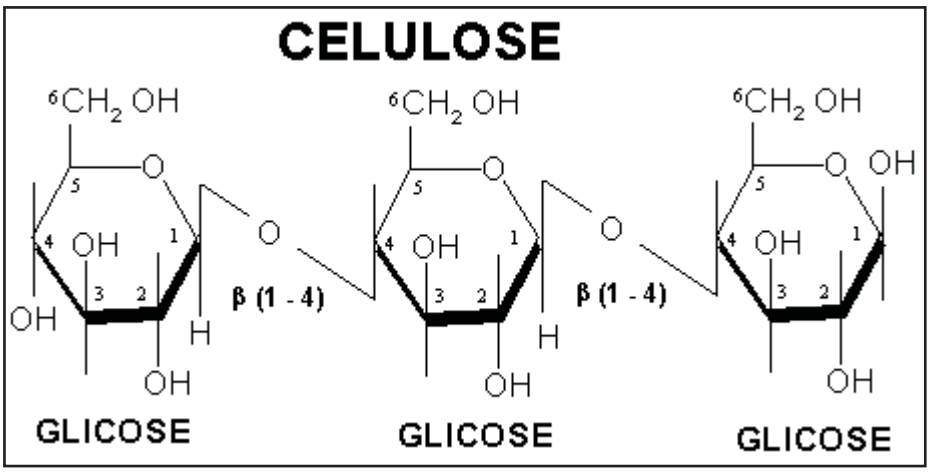

Figura 1. Estrutura da celulose.
(http://reocities.com/CapeCanaveral/launchpad/9071/celulose.gif)

A hemicelulose (Fig. 2) compreende um grupo heterogêneo de polissacarídeos ramificados, que se ligam, firmemente entre si e à superfície das microfibrilas de celulose. A hemicelulose se difere da celulose em relação à composição química (VAN MARIS *et al*., 2006). A celulose é constituída apenas por unidades de glicose para a formação do polímero (homopolissacarídeo), enquanto que na hemicelulose aparecem composições variadas de açúcares (heteropolissacarídeo) contendo hexoses D-glicose, D-manose e D-galactose e as pentoses, D-xilose e D-arabinose. A composição

da hemicelulose varia amplamente, dependendo da espécie considerada podendo preencher até 39% do material da parede celular da fibra vegetal (OLSSON; HAHN-HÄRGERDAL, 1996).

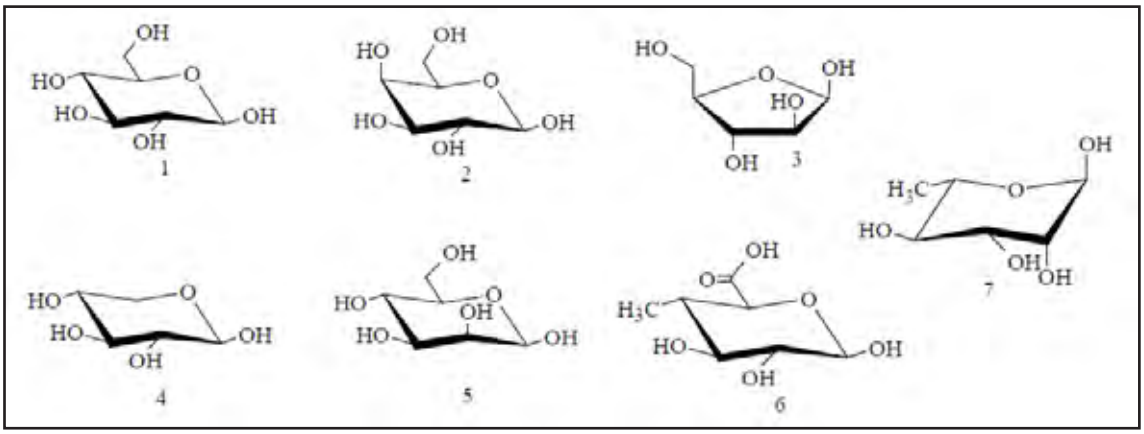

Figura 2. Monossacarídeos constituintes das hemiceluloses. (1) D-glicose, (1) D-galactose, (3) L-arabinose, (4) D-xilose, (5) 4-*O*-metil-D-glucurônico, (6) L-ramnose (SJÖSTRÖM, 1992).

As ligninas são as substâncias orgânicas naturais mais abundantes do complexo lignocelulósico representando a maior fonte de carbono aromático. A lignina é um constituinte da parede vegetal presente em todas as plantas vasculares, constituindo-se em um polímero aromático sintetizado através de precursores de fenilpropano (Fig. 3). A lignina está dividida em duas classes denominadas de lignina-guaiacila e liginina-guaiacila-siringila, que se diferem apenas pela substituição do esqueleto do fenilpropano (PALMQVIST; HAHN-HÄGERDAL, 2000).

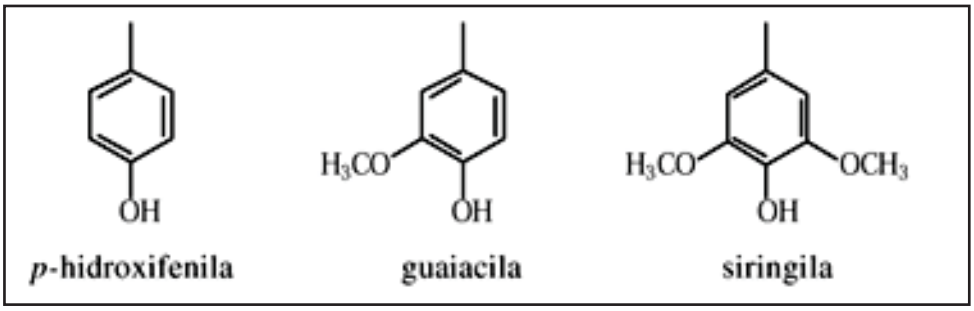

Figura 3. Estrutura dos principais monômeros da lignina (KLINKE *et al*., 2004).

1.3- PRÉ-TRATAMENTO DO MATERIAL LIGNOCELULÓSICO

A biomassa lignocelulósica é a fonte constituída de matéria-prima para a produção de etanol combustível apresentando uma susceptibilidade baixa a ação hidrolítica de enzimas e ácidos e, assim, devido a sua estrutura necessita de um pré-tratamento antes da hidrólise (MOSIER *et al*., 2005).

O pré-tratamento (Fig. 4) do material lignocelulósico tem por objetivo aumentar a porosidade da hemicelulose, reduzir a cristalinidade da celulose, separar a lignina da hemicelulose, além de minimizar a quebra de açúcares fermentescíveis por hidrólise, aumentando, desta forma, a velocidade das hidrólises tanto ácida quanto da enzimática (OLOFSSON *et al*., 2008).

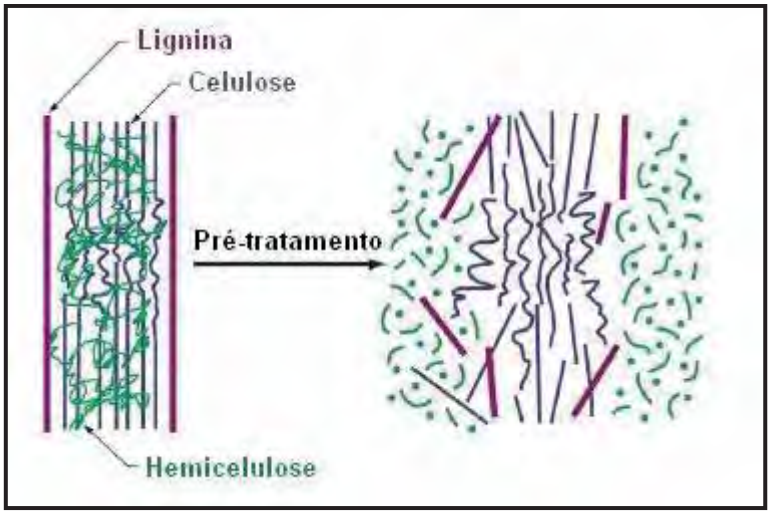

Figura 4. Esquema do pré-tratamento do material lignocelulósico (adaptado de MOSIER *et al*., 2005).

Diversos pré-tratamentos têm sido desenvolvidos para materiais lignocelulósicos, incluindo os métodos de uso comerciais tais como o uso de ácidos diluídos, oxidação úmida e explosão a vapor (KLINKE *et al*., 2004). No entanto, uma fermentação rápida e eficiente do hidrolisado é limitada devido à formação de compostos tóxicos que são gerados durante o pré-tratamento e hidrólise do material lignocelulósico (PALMQVIST; HAHN-HÄGERDAL, 2000).

Estes compostos, que são potenciais inibidores de fermentação, estão divididos em três grandes grupos (Fig. 5) constituídos por ácidos fracos (ácido acético, ácido fórmico e ácido levulínico), derivados furânicos (2-furaldeído e 5-hidroximetilfurfural) e compostos fenólicos (ALMEIDA *et al*., 2007).

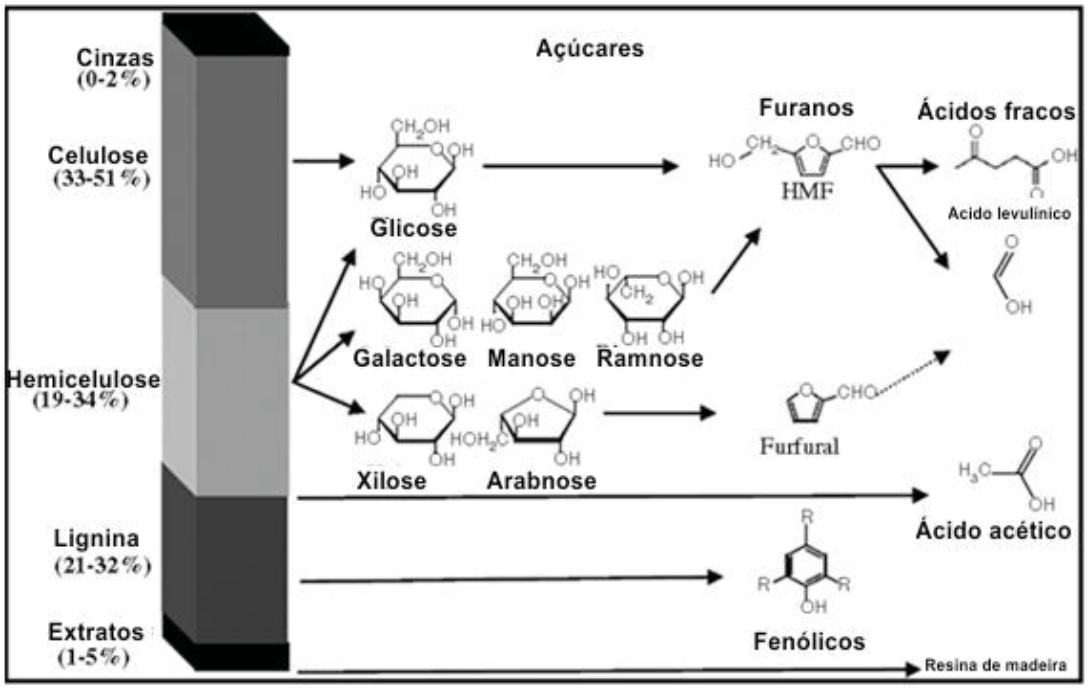

Figura 5. Composição média da biomassa lignocelulósica e os principais produtos derivados de hidrólise (adaptado de ALMEIDA *et al*., 2007).

A literatura descreve vários métodos de hidrólise de materiais lignocelulósicos para a produção de etanol (OLSSON; HAHN-HÄRGERDAL, 1996) sendo que os principais tipos de hidrólises deste material dividem-se em hidrólise ácida e hidrólise enzimática.

1.4- HIDRÓLISE ÁCIDA DO BAGAÇO DE CANA

No processo de transformação do material lignocelulósico em etanol, a hidrólise é o um passo indispensável na conversão de polissacarídeos em

monossacarídeos para a posterior fermentação por leveduras ou bactérias para a produção de etanol (MARTÍN *et al*., 2003).

A hidrólise ácida dos materiais lignocelulósicos é um processo conhecido desde o começo do século 19 (LARSSON, 1999), atingindo avanços durante as duas Guerras Mundiais (JONES; SEMRAU, 1984). A hidrólise ácida é um processo químico que utiliza catalisadores ácidos para converter as cadeias de polissacarídeos (celulose e hemicelulose) em monossacarídeos (TAHERZADEH; KARIMI, 2005).

A hidrólise ácida pode ser feita com vários tipos de ácidos, incluindo ácidos sulfurosos, sulfúrico, fluorídrico, clorídrico, ácido fosfórico, nítrico e ácido fórmico (GALBE; ZACCHI, 2002). Os principais processos de hidrólise ácida do mateiral lignocelulósico dividem-se em dois grupos: processos que utilizam ácido concentrado e processos que utilizam ácido diluído. Além disto, a hidrólise com ácido diluído é mais rápida e mais fácil de ser realizada, mas ela é prejudicada pela formação de sub-produtos não-seletivos (TAHERZADEH; KARIMI, 2008).

Nos processos que envolvem ácidos concentrados, a hidrólise ocorre em baixa temperatura resultando em um alto rendimento da hidrólise (por exemplo, 90% de rendimento em glicose), porém as grandes quantidades de ácidos utilizados para a realização deste tipo de hidrólise causam problemas de corrosão de equipamentos e recuperação e/ou neutralização dos ácidos empregados (JONES; SEMRAU, 1984).

O processo que utiliza ácido diluído tem como principal vantagem em relação ao processo que utiliza o ácido concentrado, o uso de uma menor quantidade do mesmo. Entretanto, temperaturas elevadas são requeridas para atingir índices aceitáveis de conversão de celulose em glicose, aumentando as taxas de decomposição dos açúcares da hemicelulose e a corrosão dos equipamentos (DHEPE; FUKUOKA, 2008). Além disto, os produtos de degradação do açúcar também podem causam inibição na fase da fermentação (LARSSON *et al*., 1999).

Processo de hidrólise de madeira com ácido sulfúrico diluído em dois estágios foi desenvolvido para diminuir a degradação dos açúcares dos hidrolisados. Em um primeiro estágio, realizado sob condições mais brandas, ocorrem às reações de hidrólise das hemiceluloses, que são retiradas do meio

reacional antes do início do segundo estágio, o qual ocorre em condições mais severas para efetivar a hidrólise da celulose. Este procedimento leva a rendimentos de 50% de glicose e de até 70%-98% para os demais açúcares, acompanhado por redução na formação de furfural, hidroximetilfurfural e de outros produtos de degradação (NGUYEN *et al*., 1999).

1.5- HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DO BAGAÇO DE CANA

A hidrólise enzimática é um processo catalisado por um grupo de enzimas denominadas genericamente por celulases que são uma mistura de enzimas distintas, cuja atividade consiste na degradação da celulose em glicose. Segundo Olofsson *et al.* (2008), este sistema enzimático representa três tipos de atividades: endoglucanases, que hidrolisam as ligações β-(1,4) enquanto que as exoglucanases ou celobiohidrolases hidrolizam glucanas liberando celobiose e, por fim, β-glicosidases que quebram o dissacarídeo celobiose em duas unidades de glicose.

A endoglucanase (EC 3.2.1.4) é a enzima do complexo celulolítico responsável pelo início da hidrólise. Tal enzima hidrolisa as regiões internas da estrutura amorfa da fibra celulósica ao acaso, liberando oligossacarídeos de diversos graus de polimerização e, consequêntemente, novos grupos de estruturas mais curtas, sendo um de caráter redutor e outro não redutor (SUN; CHENG, 2002).

O segundo grupo é constituído por enzimas denominadas de exoglucanase ou celobiohidrolase (EC 3.2.1.91) que degrada e remove unidades de celobiose das extremidades da molécula de celulose (SUN; CHENG, 2002).

O terceiro e último grande grupo de enzimas do complexo celulolítico é representado pelas β-glicosidases (EC 3.2.1.21), que hidrolisam celobiose e oligossacarídeos solúveis em glicose (SUN; CHENG, 2002).

1.6- INIBIDORES DOS HIDROLISADOS E MECANISMO DE INIBIÇÃO MICROBIANA

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é a espécie mais utilizada para a produção de etanol, pois este gênero apresenta espécies com características de alcooltolerância, osmotolerância e termotolerância, capazes de produzir um rendimento superior de etanol (ZALDIVAR *et al*., 2001).

Diversos microrganismos têm sido utilizados para produção de etanol de segunda geração (OLSSON; HAHN-HAGERDAL, 1996). No entanto, a levedura *Saccharomyces cerevisiae* tem mostrado ser mais robusta do que as bactérias por ser alcooltolerante e resistir a outros produtos presentes nos hidrolisados (OLSSON; HAHN HÄGERDAL, 1996). Por isto, o desenvolvimento de linhagens de levedura tolerantes aos inibidores do hidrolisado são altamente desejáveis.

Segundo Parajó *et al*. (1998), os inibidores contidos nos hidrolisados podem limitar o consumo da fonte de carbono reduzindo a cinética de crescimento ou, até mesmo impedindo o processo fermentativo. A tolerância dos microrganismos frente aos inibidores depende da espécie utilizada e sua adaptação ao meio, do tipo do processo de fermentação empregado, do número de inibidores presentes no meio e do efeito antagonístico entre eles (MUSSATO; ROBERTO, 2004).

1.6.1- Derivados furânicos

Os derivados furânicos (Fig. 6) são inibidores formados durante a hidrólise ácida dos materiais lignocelulósicos a partir da desidratação das hexoses e pentoses. A concentração dos furanos varia de acordo com o tipo de matéria-prima e do processo de pré-hidrólise (ALMEIDA *et al*., 2007). O 5-hidroximeltifurfural (HMF) e o furfural são os principais inibidores da fermentação, sendo o HMF formado também a partir de qualquer matéria-prima contendo açúcar durante a esterilização por calor (BHAT *et al*., 1984).

Os efeitos negativos do furfural sobre as leveduras durante a fermentação alcoólica são: diminuição da taxa específica de crescimento; diminuição da produtividade volumétrica ou específica de etanol e redução da síntese de biomassa. Além disto, os efeitos tóxicos do HMF sobre os microrganismos, geralmente, são menos intensos quando comparado ao furfural (PALMQVIST; HAHN-HÄGERDAL, 2000). No entanto, segundo Larsson *et al*. (1999), o furfural cria um aumento da fase-lag do crescimento, atrasando a produção de etanol, mas sem reduzir a produção de etanol final.

Durante a fermentação, o furfural é metabolizado pela levedura *S. cerevisiae* em condições aeróbicas, formando ácido furóico (TAHERZADEH *et al.,* 1998) sendo que e em condições anaeróbicas é formado o álcool furfurílico (PALMQVIST *et al.,* 1999). A redução do furfural é devido à ação de enzimas do metabolismo central, que minimizam o seu efeito inibitório. Essas enzimas são: desidrogenase alcoólica dependente de NADH para formar o álcool furfurílico e uma aldeído desidrogenase dependente de NAD^+ para formar o ácido furóico (MODIG *et al*., 2002).

Trabalhos da literatura têm descrito a adaptação de leveduras *S. cerevisiae* ao furfural em batelada (BANERGEE *et al*., 1981), batelada alimentada (VILLA, 1992) e em processo contínuo (FIREOVED; MUTHARASAN, 1986), com o aumento de crescimento celular e produtividade volumétrica do etanol. Esta adaptação da levedura a presença de furfural pode ocorrer devido à síntese de novas enzimas ou co-enzimas para a redução de furfural (BOYER *et al*., 1992).

Em geral, os efeitos inibitórios dos furanos podem ser explicados por um redirecionamento de fluxo de energia da levedura causado por uma redução no nível de ATP intracelular e de NADPH devido ao consumo e/ou regeneração de cofatores levando a inibição enzimática. Em *S. cerevisiae,* o furfural gera o “ROS” espécies de oxigênio reativas, danificando os vacúolos, a membrana mitocondrial, a actina e a cromatina (ALMEIDA *et al*., 2007).

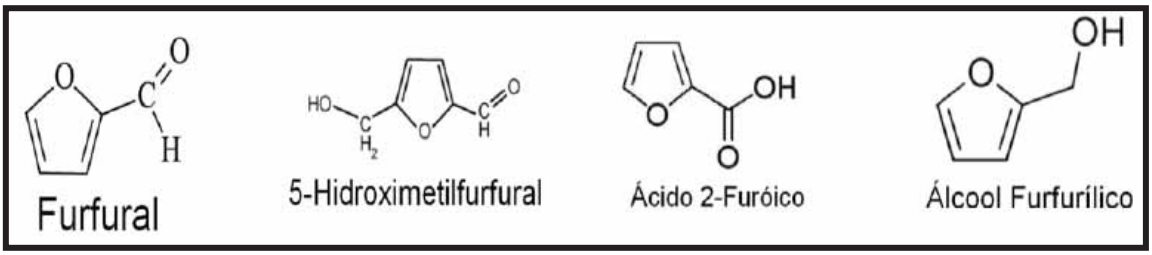

Figura 6. Fórmula estrutural dos principais furanos presentes no hidrolisado hemicelulósico.

1.6.2- Ácidos alifáticos

Os principais ácidos alifáticos presentes nos hidrolisados hemicelulósicos são: os ácidos acético, fórmico e levulínico (Fig. 7), sendo o ácido acético o ácido mais abundante nos hidrólisados de bagaço. O ácido acético é derivado dos grupos acetila liberados das xilanas acetiladas, enquanto que os ácidos levulínico e fórmico são produtos da degradação dos furanos (LUO *et al*., 2002).

A literatura descreve que os ácidos alifáticos fracos reduzem o rendimento alcoólico (PAMPULHA; LOUREIRO-DIAS, 2000) e a produção de biomassa (TAHERZADEH *et al*., 2000). Mecanismos têm sido propostos para explicar o efeito inibitório dos ácidos fracos, tais como o desacoplamento e o acúmulo de íons extracelulares (ALMEIDA *et al*., 2007). Outros efeitos inibitórios dos ácidos alifáticos estão associados a toxicidade dos seus ânions, ou seja, enquanto os prótons são excretados para fora da célula, ânions são acumulados na célula, e isto causa morte celular (TAHERZADEH *et al*., 1999).

A forma não ionizada dos ácidos atravessam a membrana plasmática por difusão passiva liberando prótons no citoplasma, e consequêntemente, queda do pH intracelular (PALMQVIST; HAHN-HÄGERDAL, 2000). Para manter a homeostase intracelular, os prótons devem ser transportados para fora da membrana plasmática através da ação da enzima ATPase que utiliza ATP para a sua atividade (HOLYOAK *et al*., 1996). O consumo excessivo desta forma de energia pode levar a perdas em crescimento celular e outras atividades metabólicas essenciais, tais como a respiração e a fermentação

(BRUL; COOTE, 1999). Em situação de estresse ácido, a célula perde a sua capacidade de manter seu pH interno e suas atividades fisiológicas, e isto leva a inibição do crescimento e finalmente à morte celular das leveduras por necrose e apoptose (LUDOVICO *et al*., 2001).

O ácido fórmico é mais tóxico do que o ácido levulínico, que por sua vez, é mais tóxico do que o ácido acético. Isto ocorre, pois o ácido fórmico tem um pKa mais baixo (3,75 a 20°C) do que o do ácido acético (4,75 a 25°C) e do ácido levulínico (4,66 a 25°C). Por isto, a forma não ionizada do ácido acético deve ser encontrada numa menor concentração em um mesmo valor de pH interno, quando se compara com os ácidos fórmico e levulínico. O aumento da toxicidade do ácido fórmico parece estar relacionado com o pequeno tamanho desta molécula, que por ser tão pequena, difundi-se facilmente através da membrana plasmática. A alta toxicidade do ácido levulínico, quando comparada com o ácido acético, pode estar relacionada com a alta hidrofobicidade do ácido levulínico, o qual se difunde mais facilmente para dentro da membrana da célula da levedura (LARSSON *et al*., 1999).

$HCOOH$	$CH_3 - COOH$	$CH_3 – CO – CH_2 - COOH$
Ácido Fórmico	Ácido Acético	Ácido Levulínico

Figura 7. Fórmula estrutural dos principais ácidos alifáticos presentes no hidrolisado hemicelulósico.

1.6.3- Compostos fenólicos

A geração de grande variedade de compostos fenólicos (Fig. 8) é devido à degradação da lignina durante a hidrólise ácida. A quantidade e o tipo de compostos fenólicos dependem da fonte de biomassa, uma vez que matérias-primas diferentes apresentam diferentes graus de associação da hemicelulose com a celulose na parede das células vegetais (ALMEIDA *et al*., 2007).

Segundo a literatura, compostos fenólicos são conhecidos por exercer um efeito inibitório significativo sobre a fermentação de hidrolisados lignocelulósicos. Além disto, quanto menor o peso molecular destes compostos, mais tóxicos estes inibidores serão para as leveduras (ALMEIDA *et al*., 2007).

Segundo Kinkle *et al*. (2004), os furanos e os fenóis são compostos aromáticos que têm diferentes grupos funcionais (por exemplo, grupos ácidos, cetônicos, ou aldeídicos) e, portanto, exibe diferentes atividades inibitórias.

O efeito tóxico dos aldeídos aromáticos pode estar relacionado à interação com determinadas regiões hidrofóbicas da parede celular, causando perda da integridade da membrana e, assim, a capacidade da membrana em agir como uma barreira seletiva é prejudicada (ALMEIDA *et al*., 2007).

A literatura reporta que os compostos aromáticos causam a partição das membranas biológicas, inativação de sistemas enzimáticos ou enzimas essenciais envolvidos com o processo de produção de energia e síntese de componentes estruturais da célula ou inativação funcional do material genético (ALMEIDA *et al*., 2007). Embora a vanilina seja mais abundante no hidrolisado de bagaço de cana, o ácido 4-hidrobenzóico é o composto fenólico mais tóxico para os microrganismos (PALMQVIST; HÄHN-HÄGERDAL, 2000).

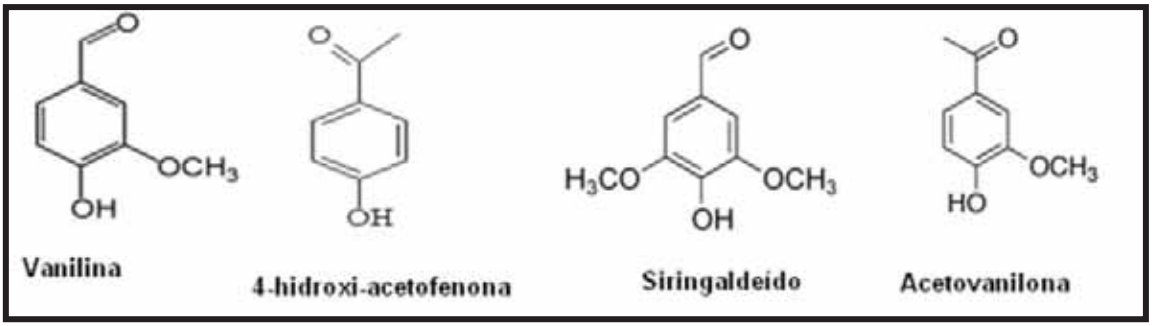

Figura 8. Fórmula estrutural dos principais compostos fenólicos presentes no hidrolisado hemicelulósico.

1.7- INTERAÇÕES ENTRE OS INIBIDORES DURANTE A FERMENTAÇÃO

A literatura descreve poucos trabalhos sobre o efeito de inibidores de fermentação sobre a produção de etanol pelas leveduras *S. cerevisiae*. Palmqvist *et al*. (1999) estudaram o efeito do ácido acético, do furfural e do ácido *p*-hidroxibenzóico sobre a velocidade específica de crescimento (μ), o rendimento do crescimento (Y_X), a produtividade inicial de etanol (Q_{EtOH}) e o rendimento da produção de etanol (Y_{EtOH}) de uma linhagem de levedura de panificação (ATCC 96581) cultivada em meio sintético. Neste trabalho, a velocidade específica de crescimento (μ) não foi afetada pelo ácido acético isoladamente (até 10,0 mg/mL ou 165 mmol/L), enquanto o furfural fez decrescer esta variável (0,0 a 3,0 mg/mL ou 31 mmol/L). O efeito da interação entre o ácido acético e o furfural sobre o μ também foi negativo. No entanto, o efeito do furfural sobre o rendimento de biomassa foi observado de forma positiva até uma concentração de 2,0 mg/mL (21 mmol/L) e negativo na faixa de 2,0 mg/mL (21 mmol/L) até 3,0 mg/mL (31 mmol/L), o ácido acético não teve efeito sobre estes mesmos parâmetros cinéticos. Por fim, o ácido *p*-hidróxibenzóico não teve efeito sobre todas as respostas estudadas neste trabalho da literatura (PALMQVIST *et al*., 1999). Neste mesmo trabalho, a literatura descreve que na presença de 10,0 mg/mL de ácido acético (1,6 mol/L) associada a presença de 3,0 mg/mL de fufural (310 mmol/L) mostraram um efeito antagônico sobre o crescimento (diminuição na velocidade específica de crescimento na presença de ambos os compostos foi maior do que as causadas pelos compostos individuais) em experimentos iniciados com 0,2 mg/mL de inóculo (PALMQVIST *et al*., 1999).

Segundo Klinke *et al.* (2004) os furanos e os compostos fenólicos geralmente inibem o crescimento e a velocidade de produção de etanol (Q_{EtOH}), mas não especificamente o rendimento em etanol (Y_{EtOH}). O efeito biológico de alguns inibidores podem ser intensificada pela presença de outros inibidores.

1.8- CONCENTRAÇÃO DE INIBIDORES ENCONTRADOS NOS HIDROLISADOS DE BAGAÇO DE CANA

Diversos trabalhos descrevem os principais inibidores de fermentação presentes no hidrolisado do bagaço de cana. A quantidade de inibidores varia com a variedade da cana, do cultivo e das condições de hidrólise do bagaço (MARTINEZ *et al*., 2000). Segundo Martinez *et al*. (2000), os principais inibidores presentes em um hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana e suas quantidades estão descritas na Tabela abaixo. Para a obtenção do hidrolisado hemicelulósico este autor utilizou um tratamento químico com ácido sulfúrico diluído, sendo as medidas das concentrações dos inibidores do hidrolisado determinadas utilizando-se um HPLC com um detector a 270 nm.

Tabela 1. Concentração dos inibidores mais abundantes presentes no hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana (MARTINEZ *et al*., 2000)

Inibidores	**Concentração**	
	(mg/mL)	**mmol/L**
Ácido acético	12,5	200
Ácido levulínico	5,5	47
Ácido fórmico	1,5	33
Furfural	0,6	6
Fenólicos solúveis	0,7	-

Em outro trabalho mais recente, Almeida *et al*. (2007) descreveu os principais inibidores encontrados nos hidrolisados de bagaço de cana e estes foram: 4,4 mg/mL de ácido acético (73 mmol/L), 1,4 mg/mL de ácido fórmico (30 mmol/L) e 4,5 mg/mL de compostos fenólicos totais. O tipo de tratamento empregado para o hidrolisado de bagaço de cana foi o explosão a vapor.

Por fim, Rodrigues *et al*. (2010) também quantificaram a composição parcial dos inibidores presentes em hidrolisados ácidos hemicelulósicos de bagaço de cana, que resultou de um tratamento com ácido sulfúrico diluído do

qual foi gerado as seguintes concentrações de inibidores: 3,49 mg/mL de ácido acético (58 mmol/L), 0,082 mg/mL de furfural (0,01 mmol/L) e 0,0079 mg/mL de vanilina (0,052 mmol/L).

1.9- PLANEJAMENTO FATORIAL COMO FERRAMENTA PARA A OTIMIZAÇÃO DE PROCESSOS

O planejamento fatorial pode ser uma alternativa para reduzir o tempo e o custo da otimização de sistemas microbianos (DUFF apud, AMBATI; AYYANA, 2001). Este planejamento tem sido utilizado há muitas décadas e pode ser adaptado a diversas etapas de uma estratégia de otimização (KIM *et al*., 2005).

Os estudos clássicos de otimização de um processo de fermentação tem sido realizado de modo a fixar um fator de cada vez ou metodologia “OFAT (one-factor-at-a-time)”. Este método envolve a mudança de uma variável independente, enquanto se fixa as outras variáveis em certos níveis (XU *et al*., 2003). É um processo laborioso que consome muito tempo, envolvendo um grande número de variáveis. Estas limitações de um simples processo de fermentação podem ser resolvidas através de metodologias estatísticas usando-se um planejamento fatorial fracionado, o qual considera todos os efeitos de interações entre os fatores (KUMAR; SATYANARAYANA, 2007).

O planejamento fatorial completo tem sido geralmente usado como uma etapa importante para se obter os efeitos e interações significativas entre as variáveis estudadas, bem como para o direcionamento de experimentos futuros em busca de melhores respostas para os processos fermentativos. Uma forma de reduzir o número de experimentos exigidos no planejamento fatorial completo é a aplicação de um planejamento fatorial fracionado antes do planejamento fatorial completo (KENNEDY; KROUSE, 1999). Além disto, a metodologia de superfície de resposta tem sido utilizada para identificar e quantificar uma grande variedade de interações diferentes entre os parâmetros fermentativos, resultando em uma redução na variabilidade operacional e em custos operacionais.

Objetivos

2.1- OBJETIVO GERAL

O presente trabalho teve como objetivo propor meios sintéticos sólidos e líquidos para o estudo dos inibidores derivados da hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar sobre o crescimento e produção de etanol de leveduras e a formulação de um coquetel destes inibidores a ser adicionado no meio líquido para permitir crescimento e produção de etanol da levedura 63M, com o objetivo de simular um hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar.

2.2- OBJETIVOS ESPECÍFICOS

A) Estabelecimento de meios sólidos para uma rápida seleção (“screening”) e comparação de leveduras tolerantes a acidez acética;

B) Estabelecimento de um meio líquido sintético para a diferenciação de leveduras quanto ao crescimento e retenção da viabilidade tendo o ácido acético como inibidor de referência;

C) Estabelecimento das concentrações dos inibidores do hidrolisado do bagaço de cana-de-açúcar individualmente a ser adicionado ao meio sintético referencial;

D) Formulação de um coquetel de inibidores e seus efeitos sobre a fermentação da levedura 63M usando-se técnicas de planejamento fatorial fracionado e planejamento de superfície de resposta.

Material e Métodos

3.1- LINHAGENS DE LEVEDURAS

As linhagens utilizadas no presente trabalho foram:

A) Linhagens termotolerantes híbridas (63M, FBB10, FBB15, FBB36, FBB74, FBB88, FBB90) da coleção de cultura obtidas no nosso laboratório em trabalhos anteriores;

B) Linhagem LTU, isolado obtido de fermento de pão comercial Fleischmann & Royal em nosso laboratório;

C) Linhagem IZ-1904, gentilmente doada pelo Instituto Zimotécnico de Piracicaba, S. Paulo, Brasil;

D) Linhagem ACA-174, gentilmente doada por R. Lagunas da "Faculdade de Medicina da Universidade Autônoma de Madrid", Spain.

3.2- MEIOS DE CULTURA UTILIZADOS

3.2.1- Meio YPD (SHERMAN; HICKS, 1991)

Este meio foi utilizado para manutenção de culturas, para o estudo do efeito do ácido acético e do aumento da concentração de glicose sobre o crescimento de leveduras, apresentando a seguinte composição:

2% de peptona, 2% de glicose, 1% de extrato de levedura. Para o meio sólido acrescentou-se 2% de agar

Procedimento: os componentes do meio foram dissolvidos em água destilada. O meio foi esterilizado em autoclave a 121°C durante 20 min. a 1 atm

e ainda quente foi distribuído em placas de Petri que foram mantidas em fluxo laminar para resfriamento e solidificação dos meios.

3.2.2- Meio Sintético (THOMAS *et al.,* 1998)

Este meio foi utilizado para os ensaios fermentativos, tendo em sua composição os seguintes reagentes

10 mmol/L de $(NH_4)_2SO_4$; 0,86 mmol/L de K_2HPO_4; 6,25 mmol/L de KH_2PO_4; 2,03 mmol/L de $MgSO_4$, 0,68 mmol/L de $CaCl_2$; 1,7 mmol/L de NaCl. Os sais minerais com a seguinte composição: 100 µmol/L de $ZnSO_4$; 24,0 µmol/L de H_3BO_3, 1,8 µmol/L de KI; 20 µmol/L de $MnSO_4$; 10,0 µmol/L de $CuSO_4$; 1,As vitaminas com a seguinte composição: 5 µmol/L de Na_2MoO_4; 1,5 µmol/L de $CoCl_2$; 1,23 µmol/L de $FeCl_3$. : 20 µg/L de biotina, 2,0 mg/L de pantotenato de cálcio, 20 µg/L de ácido fólico, 10 mg/L de myo-inositol, 400 µg/L de niacina, 200 µg/L de ácido *p*-aminobenzóico, 400 µg/L de cloreto de piridoxina, 200 µg/L de riboflavina e 200 µg/L de cloreto de tiamina. .Os sais e as vitaminas foram esterilizados por filtração realizada através de uma membrana de éster de celulose Millipore de 25 mm de diâmetro e 0,22 µm de porosidade (Millipore, DAWP 02500). A concentração final de ergosterol foi de 0,004% e de Tween 80 foi de 0,4% no meio. As concentrações de glicose no meio sólido foram de 2% e 8%, e no meio líquido foram de 10% e 18%. O pH do meio foi ajustado para 3,5, 4,5 e 5,5 antes da esterilização com soluções de HCl 3 mol/L ou NaOH 3 mol/L, dependendo do experimento. Para o meio sólido acrescentou-se 2% de agar.

3.3- MEIOS SÓLIDOS YPD E SINTÉTICO CONTENDO ÁCIDO ACÉTICO INOCULADOS POR REPLICAÇÃO

Os meios sólidos YPD e o meio sintético enriquecido com 2% de extrato de levedura foram preparados contendo 2% e 8% de glicose com a adição de 83 mmol/L a 104 mmol/L de ácido acético. Durante o preparo, os meios foram divididos em duas partes: uma parte contendo solução de glicose e agar, e a outra parte constituída pelos reagentes dos meios descritos nos itens 3.2.1 e 3.2.2. Ambas as partes foram concentradas duas vezes. Após a esterilização em autoclave e o resfriamento parcial da parte do meio que não contem agar, foi adicionado ácido acético. O pH do meio foi ajustado, quando necessário, para 4,0 com solução esterilizada de 3 mol/L de NaOH. O meio foi misturado para perfazer o volume final desejado.

Os meios solidificados foram inoculados por diferentes linhagens de levedura por replicação. Suspensões de células de levedura fresca foram obtidas com a adição de uma alça da cultura estoque suspensas em porções de 0,5 mL de água esterilizada contidos nos poços do replicador. Estas suspensões foram replicadas nos meios sólidos e as placas foram incubadas por um período de 24h a 30°C para posterior análise dos resultados.

3.3.1- Meio sintético líquido para avaliação de crescimento e fermentação em presença de ácido acético

O meio sintético utilizado de composição descrita no item 3.2.2 foi enriquecido com a adição de 2% de extrato de levedura e pH ajustado para 4,5 antes da esterilização. Após a esterilização em autoclave, adicionou-se o ácido acético na concentração desejada e o pH do meio foi reajustado, quando necessário, para 4,5 com solução esterilizada de 3 mol/L de NaOH. A concentração inicial de glicose foi de 10% e de inoculo foi de 5 mg/mL.

3.3.2- Meios sintéticos líquidos contendo inibidores de fermentação

O meio sintético utilizado para o estudo dos inibidores do hidrolisado foi enriquecido com 2% de extrato de levedura como descrito acima (3.2.2). Este meio recebeu concentrações variáveis (0-330 mmol/L) dos seguintes inibidores: ácido acético, ácido fórmico, ácido levulínico e furfural. Estes volumes foram pipetados diretamente dos reagentes concentrados (sem esterilização). A exceção foi para a vanilina, que é um reagente sólido, no qual se preparou uma solução estoque de 100 mmol/L, sendo que esta solução foi esterilizada por filtração (ver item 3.2.2). A vanilina foi adicionada a uma concentração mais baixa (0-50 mmol/L) devido à sua baixa solubilidade em meio aquoso. O pH do meio sintético foi ajustado antes da esterilização para 4,5 com solução de 3 mol/L de HCl. Após a esterilização, os inibidores foram adicionados ao meio sintético individualmente e o pH do meio foi reajustado para 4,5 com solução esterilizada de 3 mol/L de NaOH, quando necessário, antes de perfazer o volume final do meio para 100 mL com água destilada esterilizada. A densidade inicial de células foi de 10 mg/mL (p/v) e de 18%.(p/v) de glicose. Os frascos foram cultivados em mesa agitadora operando a 125 rpm durante 6h a 8h a 34ºC.

3.4- FERMENTAÇÃO EM BATELADA SIMPLES

Os Erlenmeyers de 250 mL foram vedados por meio de uma rolha de borracha perfurada por dois tubos de vidro vedados com algodão: um para permitir a amostragem e o outro para a saída de CO_2 durante a fermentação (Fig. 9). A fermentação foi conduzida a uma temperatura de 34°C sob agitação de 125 rpm por um período de 6h a 8h.

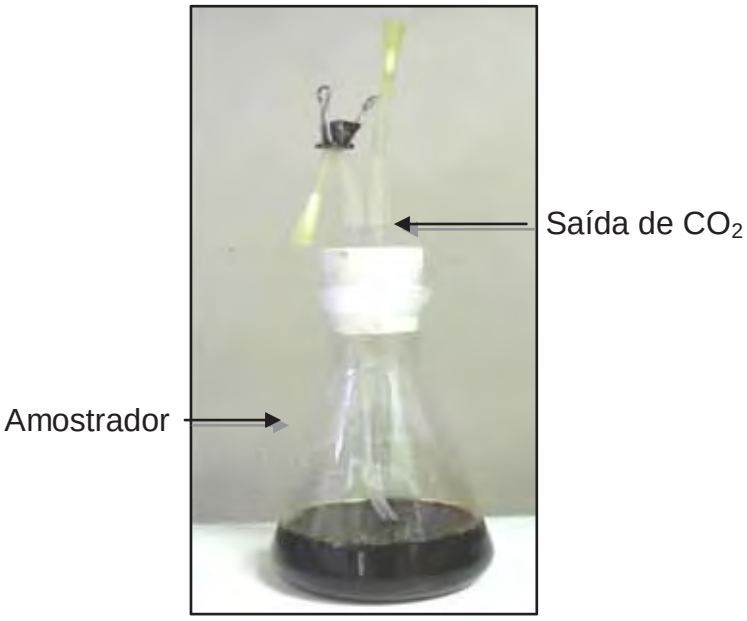

Figura 9. Sistema utilizado nas fermentações em batelada simples, conforme sugerido por Trevisan, H. C. (SOUZA *et al*., 2007).

3.4.1 - Propagação do inóculo para cultivos em Erlenmeyers agitados

O pré-inóculo foi propagado em meio YPD (2% de glicose), com a adição de uma alça cheia de células de cultura fresca, em mesa agitadora operando 125 rpm a 30°C durante 16h. As células foram coletadas por centrifugação a 5000 rpm (por 6 min. a 4°C) e lavadas uma vez com água destilada esterilizada. Em seguida, 0,9 mg/mL destas suspensões de células foram inoculadas no meio sintético (THOMAS *et al.,* 1998) enriquecido com 2% de extrato de levedura para a propagação das células em mesa agitadora operando a 125 rpm durante 16 h e 30°C. Após a propagação, as células foram coletadas por centrifugação (5000 rpm), lavadas uma vez com água destilada esterilizada e finalmente suspensas em água destilada para formar o leite de levedura utilizado como inóculo das fermentações. A proporção do volume de meio em relação ao volume do frasco Erlenmeyer foi de 2:5 tanto na propagação quanto na fermentação.

3.5- MÉTODOS ANALÍTICOS

3.5.1- Biomassa celular

Uma curva analítica foi feita para relacionar as medidas de turbidimetria (absorbância a 570 nm) com a biomassa da levedura. Os valores de absorbância foram determinados por medidas no espectrofotômetro FEMTO modelo 432 C. Além disto, as medidas de massa seca foram feitas com suspensões de células de levedura que foram propagadas em meio sintético (THOMAS *et al*., 1998) contendo 10% de glicose e enriquecido com 2% de extrato de levedura. As células foram lavadas com água destilada em membranas de éster de celulose com 25 mm de diâmetro e 0,65 µm de porosidade (Millipore, DAWP 02500). Após secagem das células, as medidas de massa seca foram determinadas numa balança analítica. O cálculo para a conversão das medidas de densidade ótica em valores de massa seca (mg/mL) foi realizado pela seguinte fórmula:

$$mg/mL = Abs_{570nm} \times dil \times f$$

O fator '*f*' de conversão de absorbância em biomassa seca foi obtido pela curva padrão da suspensão de células (ver figura 26 no apêndice).

3.5.2- Viabilidade celular

A viabilidade celular foi determinada pelo método do azul de metileno (LEE *et al.*, 1981). As células viáveis permaneceram incolores enquanto que as células mortas tornaram-se azuis. A viabilidade foi expressa em valores de porcentagem e calculada pela seguinte relação:

$$\%\ Células\ viáveis = \frac{n°\,células\ vivas}{n°\ células\ totais} \times 100$$

Composição do reagente azul de metileno:

Glicose	5,0 g
KCl	0,21 g
$CaCl_2.6H_2O$	0,24 g
$NaHCO_3$	0,1 g
NaCl	4,5 g
Azul de metileno	0,125 g
Água destilada	q.s.p. 500 mL

Os componentes foram dissolvidos em água destilada. O reagente foi estocado à temperatura ambiente.

Procedimento: a suspensão de células foi diluída 30-50 vezes no reagente azul de metileno, após 5 minutos de contato com o corante, realizou-se a contagem das células utilizando para isto a câmara de Neubauer e microscópio com aumento de 40X (Microscópio Carl Zeiss, West Germany).

3.5.3- Medidas de etanol

As medidas de etanol foram determinadas utilizando um cromatógrafo a gás (Modelo CG-37; Instrumentos Científicos, São Paulo, Brasil), operando com um detector de ionização de chama e calibrado com soluções padrões de etanol de concentração 0,5% e 1,0% (v/v). As concentrações de etanol foram expressas em g/L.

Procedimento: o sobrenadante das amostras dos experimentos foram diluídas 10 vezes em água destilada sendo 4μL desta solução injetadas no cromatógrafo para obter as medidas de concentração de etanol.

3.5.4 - Medidas de pH

As medidas de pH foram determinadas com o uso de um pHmetro (pHmetro Hanna Instruments).

3.6- MÉTODOS ESTATÍSTICOS

O meio sintético (THOMAS *et al*., 1998) contendo 18% (p/v) de glicose e enriquecido com a adição de 2% (p/v) de extrato de levedura foi usado tanto no planejamento fatorial fracionado quanto no planejamento de superfície de resposta. Uma densidade inicial de 10 mg/mL de células da levedura 63M foi adicionada ao meio sintético, o qual foi cultivado por 6h sob agitação de 125 rpm a 34°C.

O tratamento estátítico deste trabalho envolveu diversas técnicas sendo:

A) Planejamento fatorial fracionado (1/4 de fracionamento 2^{5-2}) do qual derivaram:
   - O gráfico dos efeitos principais;
   - O gráfico de Pareto.

B) Planejamento fatorial completo do tipo CCD (planejamento composto central), que exigem as subetapas:
   - Análise de variância (ANOVA) para obtenção dos modelos matemáticos;
   - Análise de superfície de respostas;
   - Otimização pelo “Response Optimizer”.

C) Validação estatística

O programa estatístico MINITAB 14.0 foi utilizado para realizar estes dois planejamentos experimentais, e as análises estatísticas e otimização das concentrações dos inibidores através do “Response Optimizer”. As medidas das respostas foram o etanol produzido e a biomassa, enquanto as variáveis independentes foram as concentrações dos inibidores (ácidos acético, fórmico, levulínico; furfural e vanilina) que variaram conforme o planejamento estatístico.

3.6.1- Planejamento fatorial

O planejamento experimental baseado na análise multivariada resulta na formulação de modelos de um fenômeno com um número mínimo de experimentos. Com um determinado número de ensaios, informações podem ser obtidas e relacionadas com a importância de cada variável e suas interações.

O planejamento experimental relaciona as variáveis em estudo de maneira sistemática, proporcionando a obtenção das respostas desejadas com um mínimo de tempo, sendo isto um fator imprescindível para o bom andamento da pesquisa. Além disto, as interações qualitativas entre fatores podem ser obtidas com gráfico dos efeitos principais e gráfico de Pareto. A figura 10 ilustra a sequência de uma experimentação interativa.

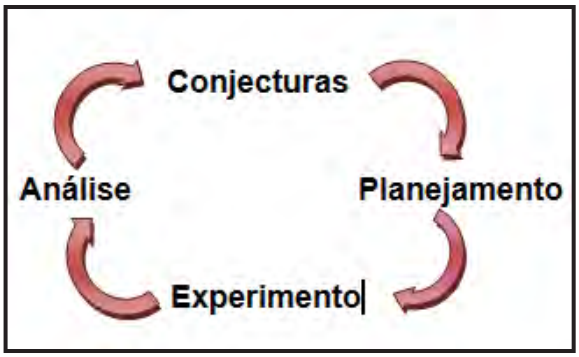

Figura 10. Análise sequencial estatística.

Dentre os planejamentos experimentais existentes destacam-se os planejamentos fatoriais, os quais são amplamente utilizados em experimentos para estudar os efeitos de interações de fatores sobre uma determinada resposta. Como o próprio nome indica, essa técnica exige um planejamento prévio dos experimentos, que inclui a escolha das variáveis independentes (fatores) e dos valores que estas assumirão nas corridas experimentais (níveis).

3.6.2- “PLOTS” dos efeitos principais

Uma situação de efeito principal é quando existe uma considerável diferença entre os diferentes níveis de um fator (variável independente). O “Plot” representa o efeito de cada variável sobre cada resposta. Este tipo de representação mostra a contribuição das variáveis escolhidas sobre cada resposta. Aumentando-se o nível de cada variável independente observam-se os seus efeitos positivos ou negativos sobre a resposta.

3.6.3- Gráficos de pareto

Gráficos de Pareto são usados para tirar conclusões sobre quais das variáveis e interações são as mais importantes. A análise estatística usando-se o programa MINITAB, baseado no método de Lenth, (1989), fornece uma análise rápida e fácil de fatores (variáveis independentes). Os valores absolutos dos efeitos são representados em ordenadas. Recomenda-se realizar este estudo no intervalo de confiança de 90-95%. No gráfico de Pareto, há uma linha de referência (uma linha vertical) e qualquer efeito que passar desta linha é um efeito potencialmente importante.

O planejamento fatorial fracionado tem sido usado para “screening” de fatores a fim de eliminar os fatores que apresentam pouco efeito sobre as respostas. Seguindo o “screening”, os experimentos são usados em otimização

ou determinação de conjuntos de variáveis importantes ao processo que levam ao melhor desempenho do mesmo.

3.6.4- Planejamento fatorial completo e fracionado

Um planejamento fatorial completo é aquele no qual todos os conjuntos de fatores são fixos em dois níveis, ou seja, -1 e + 1 (fator 2 exigindo 4 experimentos, 8 experimentos para 3 fatores, 16 para 4 fatores, 32 para 5 fatores). Quando o número de fatores é maior do que 5, o número de experimentos torna-se muito alto. Um planejamento fatorial fracionado ou um planejamento de Plankett- Burmman é constituído por uma escolha cuidadosa de um subconjunto de experimentos (fração) de um planejamento fatorial completo. Assim, informações sobre a importância dos fatores poderá ser obtida com um número reduzido de experimentos.

Os planejamentos fatorais fracionados são expressos usando-se a notação l^{k-p}, onde l é o número de níveis de cada fator, k é o número de fatores, e p descreve o tamanho da fração do planejamento fatorial completo. Por exemplo, um planejamento 2^{5-2} trabalha com 1/4 dos fatores de cada nível (mínimo e máximo). Assim, ao invéz dos 32 experimentos exigidos pelo planejamento 2^5, apenas 8 experimentos são suficientes.

O planejamento fatorial fracionado é gerado de um planejamento fatorial completo (Tab. 2) com o uso de apenas três fatores (A, B, C) nos quais os fatores C e D terão interações estimadas do tipo D = AB e C= AC (gerados no planejamento). As correlações do planejamento fatorial são I= ABD= ACE= BCED.

A resolução de um planejamento fatorial fracionado é sua capacidade de separar os efeitos principais (maiores efeitos sobre as respostas) e interações de baixa ordem entre eles. As resoluções podem ser do tipo I, II (2^{2-1}), III (2^{3-1}), IV (2^{4-1}) e V (2^{5-1}), IV (2^{6-1}) sendo que as resoluções acima de V indicam interações de alta ordem que dificilmente ocorrem na prática (BOX, *et al.*, 2005). O planejamento fatorial 2^{5-2} como apresentado na tabela 2 apresenta uma resolução tipo III.

Tabela 2. Combinações dos fatores em um planejamento 2^{5-2}.

Combinações de fatores	Iª (relação definida para o planejamento)	Fatores e suas interações				
		A	B	C	D=AB	C=AC
DE	+	-	-	+	+	+
A	+	+	-	-	-	-
BE	+	-	+	-	-	+
ABD	+	+	+	+	+	-
CD	+	-	-	+	+	-
ACE	+	+	-	-	-	+
BC	+	-	+	-	-	-
ABCDE	+	+	+	+	+	+

Iª representa a matriz de interação positiva.

A figura 11 ilustra um planejamento completo 2^3, onde os fatores A, B, e C estão indicados pelas setas da figura indicando as direções dos aumentos dos fatores.

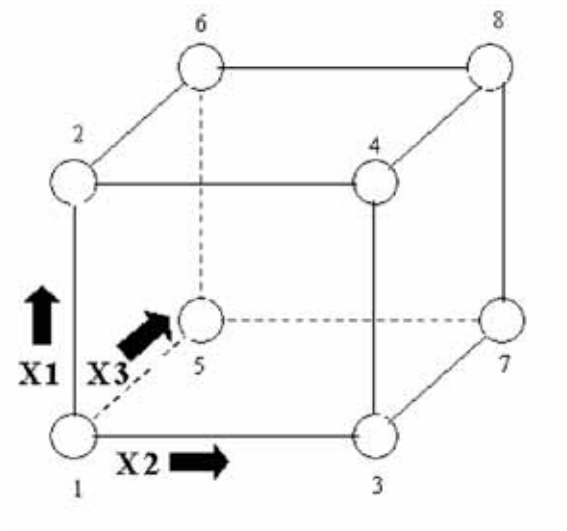

Figura 11. Direção dos aumentos dos fatores em um planejamento fatorial completo: X1 (altura), X2 (largura), X3 (profundidade) na disposição cúbica das variáveis independentes utilizados para o tratamento estatístico dos dados segundo o programa.

Há três tipos de interações principais, três tipos de interações de 2ª ordem e interações de 3ª ordem que aparece no modelo gerado para a resposta Y, a qual contém os coeficientes β:

$$
\begin{aligned}
Y \;=\; & \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \\
& \beta_{12} X_1 * X_2 + \beta_{23} * X_2 * X_3 + \beta_{13} X_1 * X_3 + \\
& \beta_{123} X_1 * X_2 * X_3
\end{aligned}
$$

As etapas de um planejamento fatorial são:

- Planejar uma série de experimentos para as medidas adequadas e confiáveis das respostas de interesse;
- Desenvolver modelos matemáticos de segunda ordem para as respostas e melhor ajuste e que leve a valores máximos e mínimos de respostas;
- Representar efeitos diretos e interativos do processo através de gráficos bidimensionais e tridimensionais. Os gráficos são úteis para mostrar as formas das superfícies, colinas, vales e linhas rígidas. Num gráfico deste tipo, cada valor de X_1 ou X_2 gera um valor de Y. O gráfico tridimensional é chamado de “response surface plot”. Os “contour plots” são planares.

3.6.5- Planejamento composto central (CCD)

O planejamento CCD (um planejamento de Box-Wilson) inicia com um planejamento fatorial com ponto central e adicionados de pontos de estrelas para estimativa de curvatura. Se a distância entre o ponto mínimo do planejamento for ±1 unidade para cada fator, a distância entre o centro do espaço do planejamento a um ponto estrela é de ±α com |α| > 1. O valor preciso de α depende de certas propriedades desejadas para cada um dos números dos fatores envolvidos.

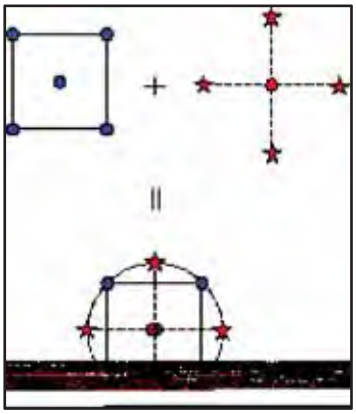

Figura 12. Diagrama do planejamento composto central gerado de dois fatores.

3.6.6- Análise de variância (ANOVA) para seleção do modelo matemático

ANOVA, assim como outros testes estatísticos, os dados obtidos são supostos e representam uma população que segue uma distribuição gaussiana. Este tipo de análise fornece diversos valores que indicam um melhor ajuste do modelo matemático obtido. Um teste de ANOVA é usado para encontrar diferenças entre médias de três ou mais grupos, porém ANOVA simplesmente indica que há diferenças entre médias de dois ou mais grupos, mas não diz qual a média apresenta diferenças significativas. Para determinar qual média é significativa um teste “post hock” que deve ser realizado.

3.6.7- Teste *t* de *student*

O teste *t* de “student” é utilizado para comparar médias de duas populações quanto a uma variável quantitativa. Por exemplo, muitos experimentos biológicos e da área de saúde são realizados com duas amostras independentes, denominadas grupo-experimental e grupo-controle. Outro objetivo seria comparar médias populacionais, quando estas médias são desconhecidas (CALLEGARI-JACQUES, 2003).

3.6.8- p-valor

Indica a probabilidade de se obter uma diferença de média entre dois grupos que possa ser maior que a não observada ao acaso. Quanto menor o valor de p mais significativa será a diferença entre os grupos.

3.6.9- Planejamento fatorial fracionado

É um conjunto de técnicas úteis para a modelagem e análise, nas quais as respostas de interesse são influenciadas pelas diversas variáveis.

O planejamento fatorial fracionado 2^{5-2} foi utilizado para estudar os principais efeitos dos cinco inibidores do hidrolisado do bagaço de cana-de-açúcar sobre a fermentação, ou seja, os efeitos das variáveis independentes: o ácido acético, ácido fórmico, ácido levulínico, furfural e vanilina (Tab.3). Com isto, selecionar três inibidores que tiveram efeitos mais significativos sobre a formação de biomassa. O método do planejamento fatorial pode avaliar os principais efeitos dos fatores independentes (COCHRAN; COX, 1957). A tabela 3 indica os níveis e faixas de concentrações dos inibidores estudados neste planejamento. Este planejamento gerou um total de 8 experimentos, os quais foram realizados em duplicata. O nível de significância admitido para a análise dos resultados deste planejamento foi de 5% (p=0,05), e os experimentos foram executados de forma aleatória.

Tabela 3: Níveis e faixas de concentrações dos inibidores de fermentação selecionados para o primeiro planejamento fatorial fracionado 2^{5-2}.

Variáveis independentes	Símbolo	Níveis e faixas	
		(-1)	(+1)
Ácido acético (mmol/L)	X_1	5	20
Ácido fórmico (mmol/L)	X_2	5	15
Ácido levulínico (mmol/L)	X_3	10	35
Furfural (mmol/L)	X_4	10	30
Vanilina (mmol/L)	X_5	5	10

3.6.10- Segundo planejamento composto central completo

O segundo planejamento fatorial 2^3 de composto central completo foi utilizado para definir a concentração dos três inibidores (ácidos fórmico, levulínico e furfural) que tiveram um maior efeito sobre a biomassa da levedura 63M. Este planejamento constituiu de seis experimentos ao redor dos pontos axiais ($=\sqrt{3}$, ver Fig. 13) somados a 6 experimentos relativos ao ponto central, os quais geraram um total de 20 experimentos, que foram realizados em duplicata e de forma aleatória. O nível de significância admitido para a análise dos resultados deste planejamento foi de 5% (p=0,05). Estes inibidores foram adicionados em meio sintético contendo 18% de glicose, 20 mmol/L de ácido acético, 5 mmol/L de vanilina e enriquecido com 2% de extrato de levedura e com um pH inicial ajustado para 4,5. A tabela 4 descreve os níveis e faixas de concentração dos três inibidores utilizados neste planejamento de superfície de resposta. Polinômios de segundo grau foram gerados com o uso do programa MINITAB 14.0 para estimar a resposta das variáveis dependentes (biomassa e etanol).

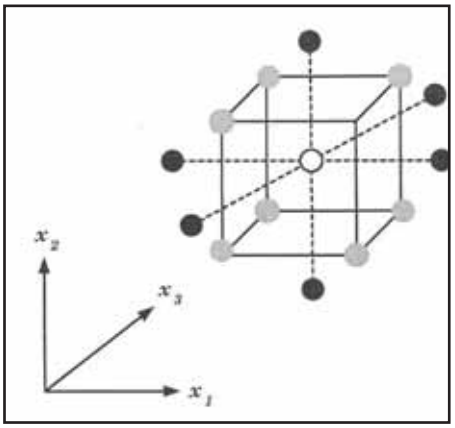

Figura 13. Planejamento fatorial de composto central para três fatores (ácido fórmico, ácido levulínico e furfural) de variáveis independentes.

O formato de estrela é gerado pelo programa e representa níveis de concentrações (bolas pretas dispostas de forma axial em relação à face do cubo de cor cinza) enquanto que o cubo é delimitado por bolas cinza que representam níveis inferiores ou superiores máximos e mínimos (BARROS-NETO; SCARMINIO, 2003). No ensaio do presente trabalho utilizou-se um fatorial do tipo 2^3 envolvendo as três variáveis independentes (Tab. 4), sendo os valores mínimos e máximos fornecidos ao programa (considerando-se cada aresta, o ponto mínimo está próximo a zero e o ponto máximo ao lado oposto no cubo).

$$Yi = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_3 + b_{11}X_{12} + b_{22}X_{22} + b_{33}X_{32} + b_{12}X_1X_2 + b_{23}X_2X_3 + b_{13}X_1X_3$$

Onde, Yi é a resposta prevista (biomassa e etanol); X_1, X_2, X_3 são as variáveis independentes; b a constante; b_1, b_2, b_3 são os termos lineares; b_{11}, b_{22}, b_{33} são os termos quadráticos; b_{11}, b_{23}, b_{13} são os termos de interação.

Os gráficos de superfície de resposta serão gerados para a publicação. A presença deles não foi necessária para formulação do coquetel devido à otimização pelo “Response Optimizer”.

Tabela 4: Níveis e faixas de concentrações das variáveis independentes selecionadas para o segundo planejamento de superfície de resposta 2^3.

Variáveis independentes	Símbolo	Níveis e faixas	
		(-1)	(+1)
Ácido fórmico (mmol/L)	X_1	5	10
Ácido levulínico (mmol/L)	X_2	25	35
Furfural (mmol/L)	X_3	10	20

3.6.11- Validação do planejamento composto central completo

Para verificar a precisão dos modelos quanto à formação de etanol e de biomassa na presença de inibidores, o “Response Optimizer” do programa MINITAB 14.0 foi aplicado utilizando os resultados obtidos no planejamento de superfície de resposta (Tab. 4). As concentrações dos inibidores calculadas pelo “Response Optimizer” foram: 3,3 mmol/L de ácido fórmico, 21,6 mmol/L de ácido levulínico e 6,6 mmol/L de furfural. As concentrações de 20 mmol/L de ácido acético e 5 mmol/L de vanilina, fixadas no primeiro planejamento fatorial fracionado (descrito no item 3.6.9), também foram adicionadas ao meio sintético As medidas de etanol e biomassa foram feitas após 6h de fermentação. Estes experimentos foram realizados em quintuplicata para confirmar as concentrações de 13,1 mg/mL prevista para a biomassa e 70,1 g/L para o etanol aplicando-se o “Response Optimizer” do programa MINITAB 14.0.

Resultados e Discussão

4.1- ESTABELECIMENTO DE MEIOS DE CULTURA CONTENDO ÁCIDO ACÉTICO PARA SELEÇÃO E COMPARAÇÃO DE LEVEDURAS

SUMÁRIO

O objetivo desta parte do trabalho consistiu em estabelecer meios sólidos e líquidos para a comparação de linhagens de leveduras quanto à tolerância ao ácido acético em meios sólidos YPD e sintético e meio sintético líquido (THOMAS *et al*., 1998). O crescimento da levedura 63M em meio sintético contendo ácido acético dependeu da adição de 2% de extrato de levedura. O meio sintético enriquecido com extrato de levedura apresentou vantagens em relação ao meio YPD, pois foi possível observar intensidades de crescimento diferentes no meio sintético quanto ao crescimento de leveduras destinadas ao uso industrial. Em meio líquido sintético, a adição de 2% de extrato de levedura deixou de ter efeito sobre o crescimento da levedura 63M quando concentrações superiores a 83 mmol/L de ácido acético foram utilizadas. Além disto, concentrações crescentes de ácido acético inibiram mais o crescimento do que a viabilidade da levedura 63M em meio sintético líquido. A produção de biomassa e o etanol foram dependentes da levedura e do pH em meio sintético líquido. Por outro lado, as variações no pH inicial do meio sintético líquido (3,5 a 5,5) afetaram mais a produção de etanol do que a biomassa das três linhagens de leveduras, ao passo que a viabilidade não variou.

4.1.1-Meios seletivos sólidos

Primeiramente, procurou-se estabelecer um meio sólido para selecionar linhagens de levedura resistentes a acidez acética. A seguir, estudou-se o efeito do ácido acético em presença de altas concentrações de glicose (8%) sobre o crescimento destas linhagens. Um bom meio sólido deve ser aquele que melhor diferencie as leveduras resistentes à acidez e que forneça resultados que possam ser validados quando avaliados em meio líquido. Além

disto, um meio ideal seria aquele em que há maiores diferenças no crescimento entre as leveduras. Assim, os resultados obtidos em meio líquido devem ser aproximadamente proporcionais aos dados de crescimento obtidos em meio sólido, pois a disponibilidade de nutrientes para a população de leveduras de uma colônia é menor em meio sólido.

4.1.2- Comparação do efeito do ácido acético em meios sintético e YPD contendo 2% de glicose

No estudo do estabelecimento de um meio sólido para selecionar leveduras resistentes a acidez acética, dois meios de cultura foram ensaiados e estes foram o meio YPD e o meio sintético (THOMAS *et al*., 1998) contendo 2% de extrato de levedura (Fig. 14). O efeito do aumento da concentração de ácido acético (na faixa de 83 mmol/L a 104 mmol/L) sobre o crescimento de linhagens de levedura foi feito tanto em meio sintético quanto em meio YPD, ambos contendo 2% de glicose como ilustra a figura 14. Todas as 10 linhagens de leveduras (63M, IZ-1904, LTU, FFB15, FBB36, FBB74, FBB10, FBB90, FBB88 e ACA-174) cresceram tanto nos meios controles (sem ácido acético, dados não mostrados) quanto nos meios contendo 83 mmol/L de ácido acético (Fig. 14A e 14B). Em meio sintético contendo 104 mmol/L de ácido acético (Fig. 14C e 14D), apenas a linhagem de levedura IZ-1904 cresceu no meio sintético (Fig. 14C), enquanto que 7 linhagens (63M, IZ-1904, FFB15, FBB36, FBB74, FBB1e FBB90) cresceram em meio YPD (Fig. 14D). O meio sintético foi mais inibitório que o meio YPD em presença de 104 mmol/L de ácido acético. Assim, a tolerância destas leveduras frente à acidez acética foi maior em meio rico. O meio YPD permitiu uma melhor diferenciação entre as leveduras sem suprimir o crescimento de quase todas as linhagens. O meio YPD contendo ácido acético foi também utilizado por outros autores (MOLLAPOUR; PIPER, 2007) para avaliação do crescimento das linhagens de levedura. Lewis *et al*. (1997) usaram o meio YEPNG agar contendo 0,4% (v/v) de ácido acético para estudar o estresse de leveduras de panificação frente a este ácido. Ludovico *et al*. (2001) também estudaram a resistência da linhagem *S. cerevisiae* em meio

YPD líquido contendo 20 mmol/L a 80 mmol/L de ácido acético a pH 3,0, o qual induziu a mortalidade exponencial desta levedura. Em outro trabalho recente, testes de sensibilidade e resistência a acidez acética foi realizado por linhagens mutantes da levedura *S. cerevisiae* em meio YPD sólido contendo de 0,3% (50 mmol/L, pH 4,4) 0,5% (83 mmol/L, pH 4,2) de ácido acético após 3 dias de crescimento (KAWAHATA *et al*., 2006). A inovação obtida com os dados deste trabalho consistiu em mostrar que o meio sintético contendo ácido acético (104 mmol/L a pH 4) é mais apropriado para comparar linhagens pois permitiu uma melhor diferenciação entre as cepas de leveduras do que o meio YPD.

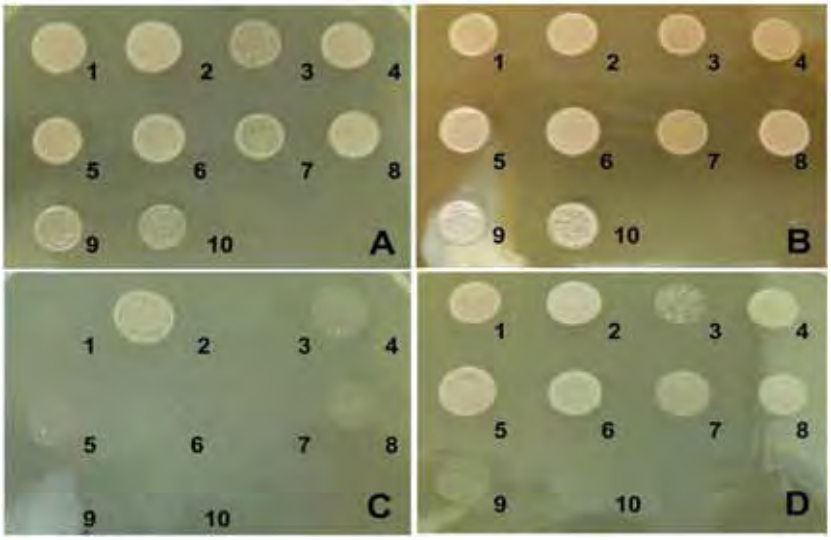

Figura 14. Efeito do aumento da concentração de ácido acético sobre o crescimento de linhagens de leveduras em meios sintético contendo 2% de extrato de levedura e YPD sólidos ambos contendo 2% de glicose. **A=** meio sintético contendo 83 mmol/L de ácido acético, **B=** meio YPD contendo 83 mmol/L de ácido acético, **C=** meio sintético contendo 104 mmol/L de ácido acético, **D=** meio YPD contendo 104 mmol/L de ácido acético. **Linhagens:** (1) 63M, (2) IZ-1904, (3) LTU, (4) FFB15, (5) FBB36, (6) FBB74, (7) FBB10, (8) FBB90, (9) FBB88 e (10) ACA-174.

4.1.3- Efeito do aumento da concentração da glicose sobre o crescimento de leveduras em meios sintético e YPD acrescidos de ácido acético

Nas fermentações industriais a concentração de açúcar é elevada e por isto decidiu-se elevar a concentração de glicose de 2% para 8% como fonte de carbono no meio sólido. O efeito do aumento da concentração de ácido acético (83 mmol/L para 104 mmol/L) sobre o crescimento de 10 linhagens de leveduras (63M, IZ-1904, LTU, FFB15, FBB36, FBB74, FBB10, FBB90, FBB88 e ACA-174) foi estudado em meios sólidos tanto sintético contendo 2% de extrato de levedura quanto em YPD ambos contendo 8% de glicose como fonte de carbono (Fig. 15). O aumento da concentração de glicose de 2% para 8% (comparar com Fig. 14) causou apenas a inibição do crescimento da linhagem ACA-174 em meio YPD contendo 83 mmol/L de ácido acético (Fig. 15D), enquanto que em meio sintético (Fig. 15C), o crescimento de três linhagens (LTU, FBB88 e ACA-174) em presença de ácido foi inibido. Em presença de 104 mmol/L de ácido acético, apenas a linhagem IZ-1904 cresceu em meio sintético (Fig. 15E), enquanto cinco linhagens (IZ-1904, FFB15, FBB74, FBB10 e FBB90) cresceram em meio YPD (Fig. 15F) contendo a mesma concentração de ácido (104 mmol/L). Comparando-se a figura 14 com a figura 15, foi possível observar que o ácido acético tornou-se mais inibitório com a elevação da concentração de glicose de 2% para 8% em ambos os meios. O efeito inibitório do ácido acético em meio sintético tornou-se tão acentuado a ponto de deixar o YPD mais seletivo. Assim, as leveduras que cresceram no meio YPD contendo 104 mmol/L de ácido acético (IZ-1904, FFB15, FBB74, FBB10, FBB90) seriam as linhagens mais apropriadas para fermentações industriais em condições de altas pressões osmóticas e na presença de ácido acético (tolerantes tanto a acidez quanto a elevação da concentração da glicose). Em fermentações indústrias, somente leveduras tolerantes a presença de concentrações de ácido e de açúcar resistem às condições do processo. A literatura descreve que altas concentrações de açúcar (“high gravity fermentation”) induzem a apoptose em células de levedura em meio sólido, principalmente na presença de ácido acético (GRANOT *et al*., 2003). Além disto, a glicose ao ser esterilizada em

altas temperaturas forma derivados furânicos como o furfural que afeta o crescimento das leveduras (BHAT *et al*., 1984).

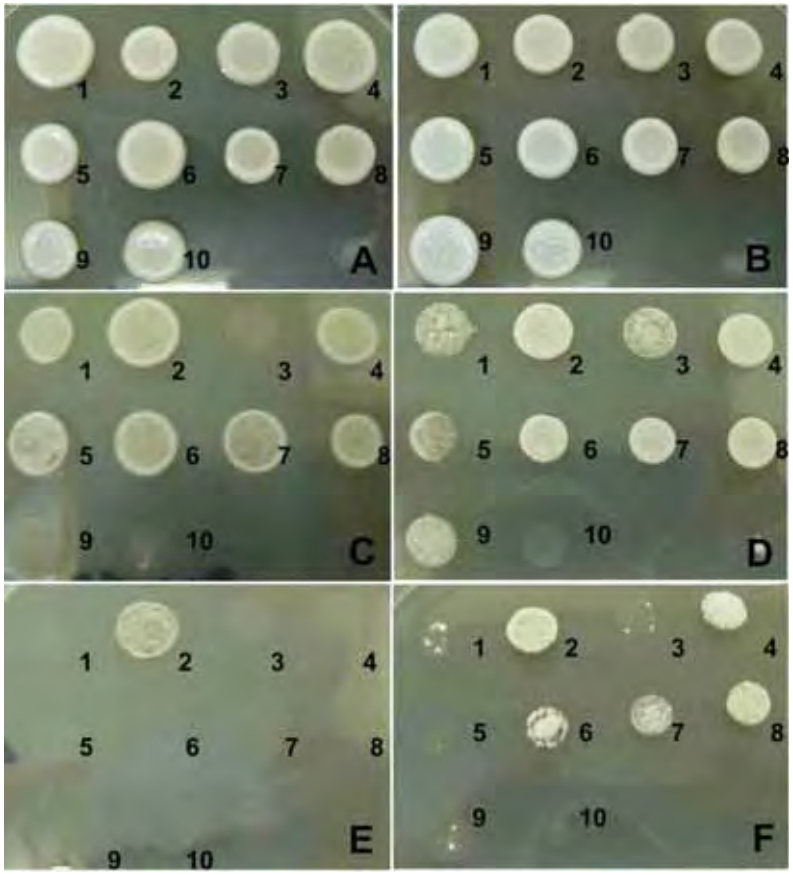

Figura 15: Efeito do aumento da concentração da glicose e de ácido acético sobre o crescimento de linhagens de leveduras em meios sintético contendo 2% de extrato de levedura e YPD sólidos ambos contendo 8% de glicose. A= meio sintético sem ácido acético, B= meio YPD sem ácido acético, **C=** meio sintético contendo 83 mmol/L de ácido acético, **D=** meio YPD contendo 83 mmol/L de ácido acético, **E=** meio sintético contendo 104 mmol/L de ácido acético, **F=** meio YPD contendo 104 mmol/L de ácido acético. **Linhagens:** (1) 63M, (2) IZ-1904, (3) LTU, (4) FFB15, (5) FBB36, (6) FBB74, (7) FBB10, (8) FBB90, (9) FBB88 e (10) ACA-174.

4.2-MEIOS SELETIVOS LÍQUIDOS

Devido a dificuldades quanto ao crescimento de leveduras em meio sintético, decidiu-se adicionar 2% de extrato de levedura a este meio para o estudo do crescimento das leveduras em meio líquido. Assim, um experimento foi realizado para comprovar a eficiência deste aditivo como um estimulante do aumento em biomassa da levedura 63M em meio sintético contendo 10% de glicose (Fig 16). Neste experimento foi observada uma grande diferença no acúmulo de biomassa após 6h de crescimento tanto em ausência quanto em presença de extrato de levedura**.** A maior produção de biomassa (8,4 mg/mL) foi obtida no meio sintético sem ácido acético, mas contendo extrato de levedura. A adição de 83mmol/L de ácido acético causou uma variação na biomassa final pouco significante (0,9 mg/mL) como ilustra a Figura 16A. No meio sem adição de extrato de levedura, a biomassa final foi menor (2,3 mg/mL) do que no meio contendo extrato de levedura. A presença de ácido acético apresentou uma menor variação no crescimento (0,4 mg/mL, Fig. 16B). No entanto, a viabilidade foi mantida estável em torno de 95% (dados não mostrados) tanto no experimento contendo aditivo (2% de extrato de levedura) quanto no experimento sem extrato de levedura independentemente da presença de ácido. Em presença de ácido o crescimento foi maior no meio contendo extrato de levedura (0,9 mg/mL) do que no meio sem este aditivo (0,4 mg/mL, redução de duas vezes na biomassa final), por esta razão optou-se pela adição de 2% de extrato de levedura nos meios destinados ao estudo do efeito dos inibidores de fermentação. O estímulo do crescimento pelo extrato de levedura (THOMAS *et al*., 2002) foi estudado no mesmo meio, mostrando as reduções de crescimento com adição tanto de ácido lático quanto de acético usando-se um inóculo bem menor do que o utilizado no presente trabalho. Por outro lado, o presente estudo visa fermentações da alta densidade de células a qual deixa o crescimento mais lento com menor acúmulo de biomassa.

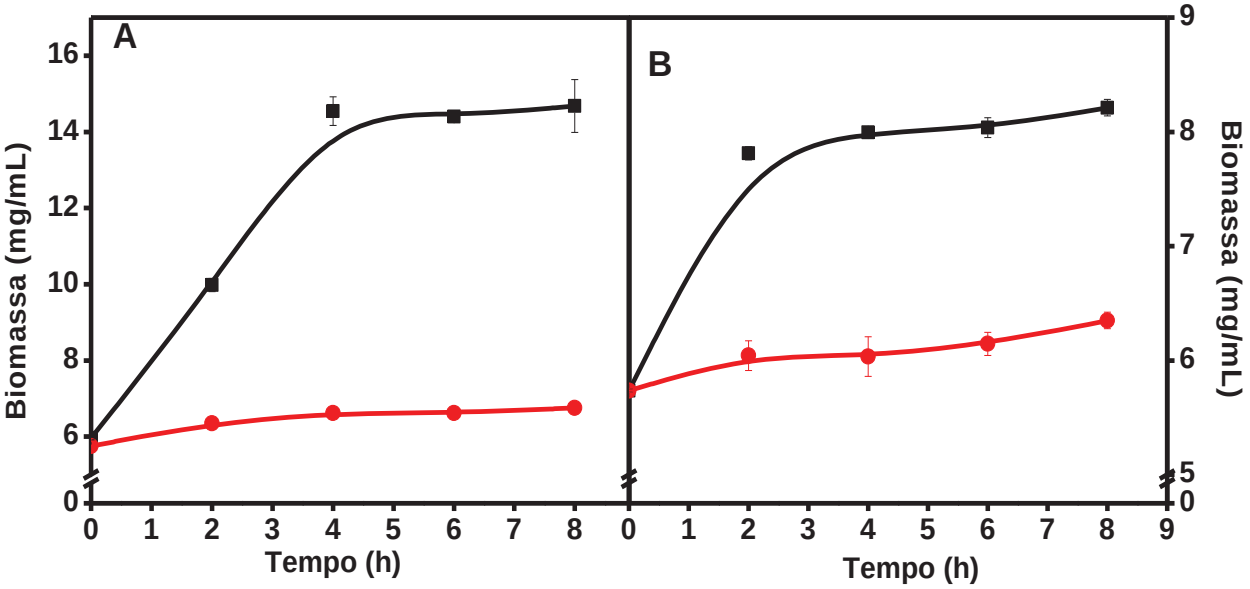

Figura 16. Efeito da adição do ácido acético (83 mmol/L) e do extrato de levedura (2%) sobre a produção de biomassa da levedura 63M em meio sintético contendo 10% de glicose, 5,0 mg/mL de inóculo, pH 4,5 a 34°C. **Parte A:** meio sintético contendo 2% de extrato de levedura controle (-■-, sem adição de ácido acético) e contendo 83 mmol/L de ácido acético (-●-). **Parte B:** (-■-, sem adição de ácido acético) e contendo 83 mmol/L de ácido acético (-●-).

A literatura descreve que o ácido acético é o inibidor mais abundante nos hidrolisados do bagaço de cana (MARTINEZ *et al*., 2000; ALMEIDA *et al*., 2007). Além disto, o ácido acético é encontrado tanto em hidrolisados enzimáticos (2,1 g/L ou 347 mmol/L) quanto em hidrolisados ácidos (2,4 g/L ou 397 mmol/L) de bagaço de cana (RUMBOLD *et al*., 2009). A figura 17 ilustra os efeitos do aumento da concentração de ácido (0 para 330 mmol/L) sobre o acúmulo da biomassa e a viabilidade final da levedura 63M propagada em meio sintético enriquecido com 2% de extrato de levedura, contendo 10% de glicose e uma densidade inicial de células de 5 mg/mL. O efeito inibitório sobre a viabilidade da levedura 63M só foi observado em concentrações acima de 165 mmol/L de ácido acético, sendo que a presença de 330 mmol/L de ácido acético a viabilidade tornou-se nula. O aumento da biomassa no experimento sem adição de ácido acético foi 2,8 vezes maior em relação à biomassa inicial. Assim, a levedura 63M tolera até 165 mmol/L de ácido acético sem sofrer perdas em viabilidade, mas acumula biomassa até uma concentração máxima

de 83 mmol/L de ácido acético acima da qual a biomassa tornou-se praticamente constante. Com base no mecanismo de resistência de leveduras a acidez do meio (NARENDRANATH *et al*., 2001), pode-se dizer que o equilíbrio entre as formas não ionizadas do ácido acético que penetram no interior das célula e a quantidade de prótons que saem permanece constantes em concentração de ácido acético da ordem de 75 mmol/L garantindo, assim, um crescimento baixo e constante nas condições do experimento (inóculo de 5mg/mL e 10% de glicose). Além disto, uma concentração de 41 mmol/L de ácido acético foi a concentração limite para inibir o crescimento da levedura *Saccharomyces cerevisiae* a pH 4,5*,* pois a literatura descreve que o pH interno desta levedura não foi afetado. Pampulha e Loureiro-Dias (2000) também observaram que concentrações crescentes de ácido acético (0 a 170 mmol/L) reduziram a velocidade máxima de crescimento da uma linhagem de levedura *S. cerevisiae* durante fermentações em meio YPD contendo 2% de glicose. No presente trabalho, as concentrações crescentes de ácido acético deixaram de ter efeito sobre o acúmulo de biomassa quando esta atingiu a concentração limite de 75 mmol/L. Os dados obtidos demonstraram que a tolerância da levedura ao ácido acético aumenta no meio rico.

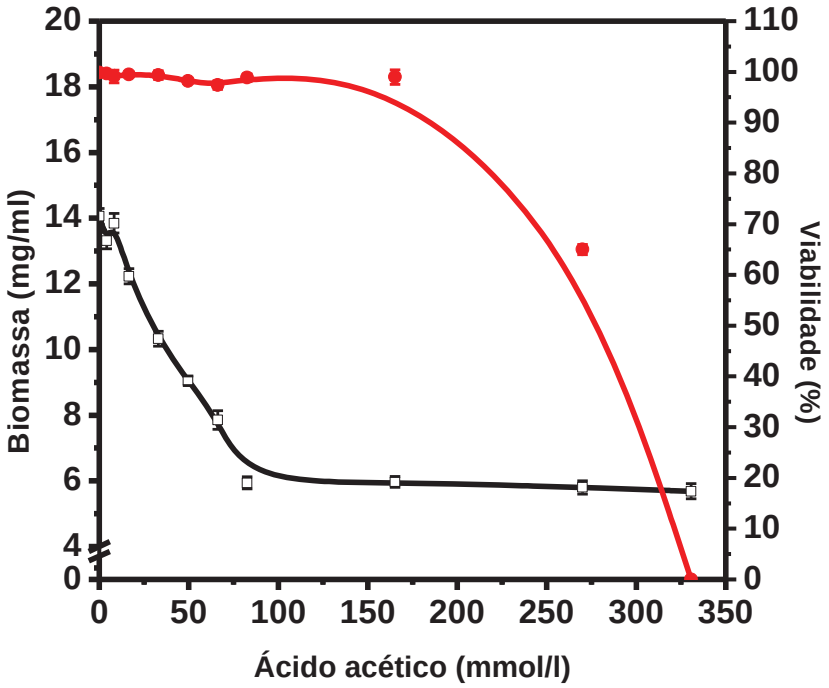

Figura 17. Efeito da concentração crescente de ácido acético adicionado em meio sintético contendo 2% de extrato de levedura, 10% de glicose, inóculo inicial de 5 mg/mL, pH 4,5 a 34°C, sobre o crescimento (-□-) e a viabilidade (-•-) da levedura 63 M após 6h de propagação.

No presente trabalho, três linhagens de leveduras 63M, ACA-174 e IZ-1904 foram cultivadas em meios sintéticos contendo 2% de extrato de levedura com valores de pH iniciais ajustados na faixa de 3,5 a 5,5 onde foram ensaiadas quanto ao crescimento (Fig. 18A) viabilidade (Fig. 18C) e produção de etanol (Fig. 18B) após 6 h de fermentação.

O efeito inibitório do ácido acético sobre o crescimento da levedura depende do pH do meio, da constante de dissociação do ácido e da sua concentração molar (PALMQVIST; HAHN-HAGERDAL, 2000). As três leveduras ensaiadas no presente trabalho produziram uma biomassa final (após 6h) equivalente nos dois meios com pH ajustados para 3,5 e 4,5 (Fig. 18A). Um aumento significativo da biomassa foi observado em pH acima de 4,5 mas com decréscimos em pH inferior a este valor na presença de ácido acético. Isto foi descrito por Taherzadeh *et al*. (1997). Segundo estes autores o ácido acético eleva o valor de pH mínimo de crescimento de 2,5 para 4,5, com consequente efeito inibitório sobre o crescimento**.** Por fim, uma possível

explicação para a sensibilidade da levedura ACA-174 quanto ao crescimento em presença de ácido acético estaria relacionada com a concentração da forma não ionizada do ácido acético, o qual penetra mais facilmente através da membrana de células de leveduras. Considerando-se a produção de etanol, esta foi reduzida no presente trabalho com a redução de pH em presença de ácido acético como descrito por Graves *et al*. (2006). Considerando-se separadamente a produção de etanol, o presente trabalho (Fig. 18B) ilustra uma baixa produção de etanol em meios cuja fermentação foi iniciada em valores de pH 3,5 e 4,5 quando comparadas com o meio ajustado para pH 5,5 no caso das três leveduras ensaiadas em presença de 83 mmol/L de ácido acético. Os aumentos do crescimento e produção de etanol em pH 5,5 foram devidos ao aumento na concentração da forma ionizada do ácido acético o qual não penetra na célula e assim não perturba o catabolismo celular. No presente trabalho (Fig. 18B) a levedura 63M foi a linhagem que mais produziu etanol no meio em pH 4,5, que é o pH utilizado em fermentações industriais e por isto esta linhagem foi selecionada para o estudo dos inibidores do hidrolisado de bagaço de cana.

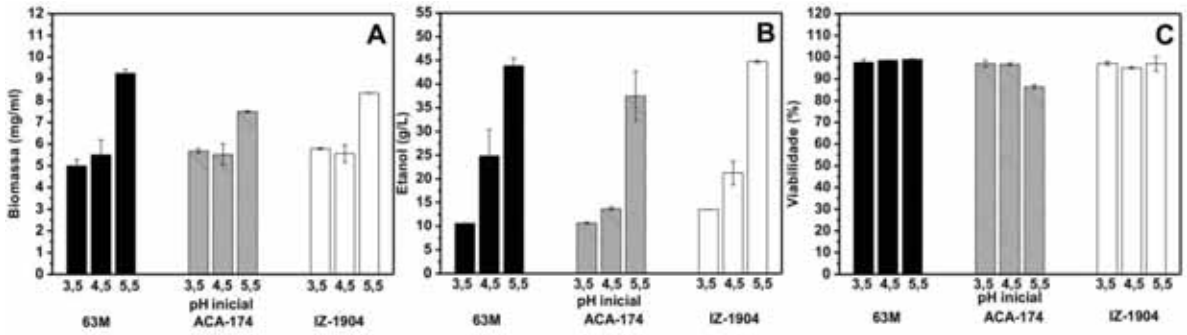

Figura 18. Efeito do ajuste do pH inicial sobre a produção da biomassa (**parte A**), etanol (**parte B**) e viabilidade (**parte C**) de linhagens de levedura 63M, ACA-174, e IZ-1904 após 6 horas de propagação em meio sintético líquido contendo 2% de extrato de levedura contendo 83 mmol/L de ácido acético, 10% de glicose, inóculo inicial de 5 mg/mL, pH 3,5-4,5-5,5 a 34°C.

4.2.1- Efeito do aumento da concentração de inóculo e açúcar sobre o crescimento da levedura 63M

Aumentos na concentração de inóculo e glicose foram realizados com o objetivo de se acumular biomassa em meio sintético contendo 2% de extrato de levedura na presença de 83 mmol/L de ácido acético (Fig. 19). Um acúmulo de 8,4 mg/mL de biomassa foi obtido após 6 h de fermentação em meio sintético contendo 10% de glicose quando a densidade inicial de células foi de 5 mg/mL (ver Fig. 19A). Um acúmulo de 12,5 mg/mL foi observado em meio sintético contendo 18% de glicose quando iniciado com 10 mg/mL de inóculo no mesmo tempo de fermentação (Fig. 19B). Por isto, este meio foi selecionado para o estudo do efeito da presença de inibidores de fermentação sobre o crescimento e fermentação da levedura 63M e assim, o tempo de fermentação foi fixado em 6h para os seguintes experimentos. A literatura descreve que a levedura *S. cerevisiae* consome ácido acético em meio contendo baixas concentrações de açúcar fermentescíveis o qual é metabolizado a acetil-coenzima A, que entra no ciclo do glioxilato para satisfazer a necessidade bioenergética dos metabólitos biossintéticos (KAWAHATA *et al*., 2006). No entanto, quando a levedura *S. cerevisiae* produz ácidos orgânicos em anaerobiose, ela produz NADH que é reoxidado com a produção de glicerol. Granot e Snyder (1993) observaram que a glicose (fonte de carbono) é um nutriente crítico para o crescimento da levedura, pois induz eventos relacionados com o crescimento na fase estacionária destas células e seus esporos na ausência de outros nutrientes essenciais ao crescimento.

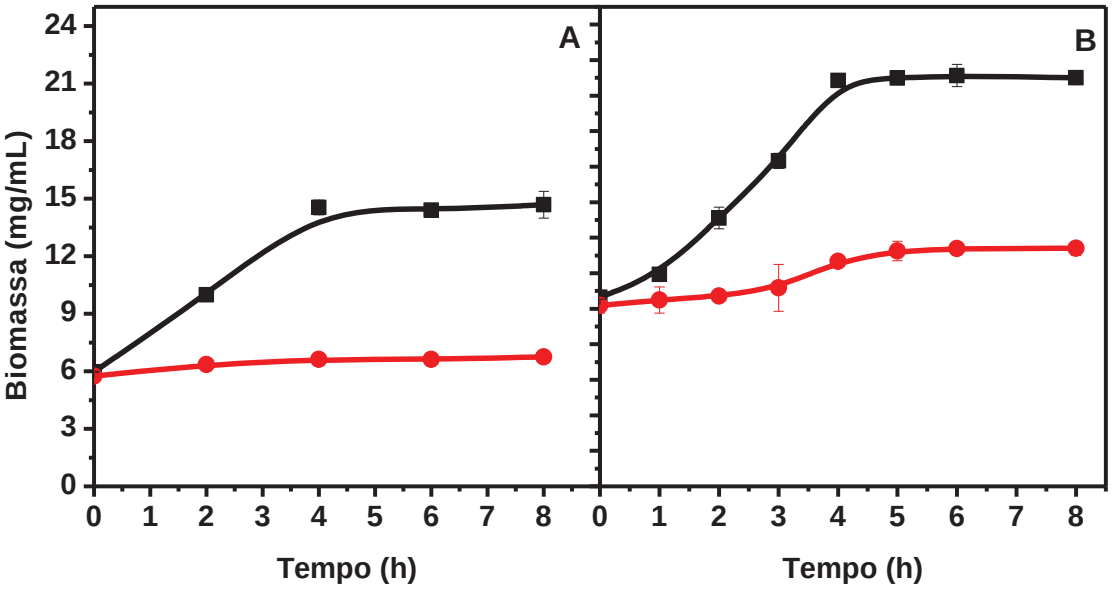

Figura 19. Curvas de tempo do efeito do aumento das concentrações de inóculo e açúcar sobre o crescimento da levedura 63M em meio sintético contendo 2% de extrato de levedura, pH 4,5 a 34°C. Parte **A**= meio sintético contendo 10% de glicose e inóculo inicial de 5 mg/mL controle (-■-) e contendo 83 mmol/L de ácido acético(-●-). Parte **B**= meio sintético contendo 18% de glicose e inóculo inicial de 10 mg/mL controle (-■-) e contendo 83 mmol/L de ácido acético(-●-).

4.3 – EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DOS INIBIDORES SOBRE O CRESCIMENTO E FERMENTAÇÃO DA LEVEDURA 63M EM MEIO SINTÉTICO LÍQUIDO CONTENDO ALTA DENSIDADE DE CÉLULAS E ALTA CONCENTRAÇÃO DE AÇÚCAR

SUMÁRIO

O objetivo desta parte do trabalho consistiu em estudar os efeitos individuais dos inibidores (acético, levulínico, fórmico, furfural e vanilina) em meio sintético contendo alta densidade de células (10 mg/mL) e alta concentração de açúcar (18%, p/v). Incialmente, elevou-se a concentração de glicose de 10% para 18% e a concentração inicial de inóculo de 5 mg/mL para 10 mg/mL em ausência em presença de 83 mmol/L de ácido acético. Um

aumento de 33% de biomassa em relação ao experimento controle foi observado na presença de 83 mmol/L de ácido acético. Assim, decidiu-se utilizar este meio com maior concentração de açúcar e de inóculo para o estudo dos efeitos individuais dos inibidores. Incialmente utilizou-se este meio para estudos dos efeitos de concentrações crescentes de ácido acético (ver Fig. 17).

Concentrações crescentes dos inibidores foram utilizadas no presente trabalho (até 330 mmol/L). As concentrações de inibidores apresentaram limites de tolerância diferentes após 6 horas de fermentação: a) quanto a produção de etanol e biomassa com inibição por vanilina > ácido fórmico > ácido acético = furfural (inibições forte até 52 mmol/L para biomassa e até 155 mmol/L para etanol final) > ácido levulínico (inibição fraca até a concentração de 330 mmol/L); b) quanto a viabilidade: ácido fórmico (nula em 86,9 mmol/L) > vanilina > furfural (46% em 330 mmol/L) > ácido acético (18% em 330 mmol/L) > ácido levulínico (83% em 330 mmol/L; b) quanto as variações em pH os decréscimos foram maiores com fórmico > acético e levulínico > furfural.

4.3.1- Efeito da presença de inibidores de hidrolisados sobre o crescimento, produção de etanol, viabilidade e pH da levedura 63M

No presente trabalho, cinco inibidores de fermentação (ácidos acético, fórmico, levulínico; furfural e vanilina) foram adicionados em concentrações crescentes (até 330 mmol/L) e estudados separadamente em meio sintético contendo 18% de glicose, 2% de extrato de levedura e densidade inicial de células de 10 mg/mL de inóculo. Devido à insolubilidade da vanilina em meio aquoso, este inibidor foi adicionado até uma concentração de 50 mmol/L. Estudos do efeito do aumento da concentração dos inibidores sobre a levedura 63M foram realizados através de medidas de biomassa (Fig. 20), etanol (Fig. 21) viabilidade (Fig. 22) e pH (Fig. 23) obtidas após 6h de fermentação.

O tipo da hidrólise ácida e as condições operacionais empregada são os fatores que determinam a composição dos inibidores e suas concentrações nos hidrolisados de bagaço (TAHERZADEH *et al*., 2000). Dada a diversidade de

compostos fenólicos que apresentam em sua estrutura um anel e um radical carbonado contendo número de carbono variável, os compostos aromáticos presentes nos hidrolisados são descritos como fenóis totais nas publicações. A vanilina constitui um dos derivados fenólicos mais abundante de hidrolisados, atingindo valores ao redor 0,032 mg/mL em hidrolisados de material celulósico de trigo e 0,12 mg/mL em hidrolisado de madeira. O siringaldeído é um outro composto derivado de compostos fenólicos bastante frequente em hidrolisados (ALMEIDA *et al*., 2007). A figura 20 ilustra o inibidor que mais reduziu o crescimento da levedura 63M foi a vanilina, seguido pelo ácido fórmico, ácido acético e furfural. O ácido levulínico foi o inibidor que menos reduziu o crescimento da levedura 63M.

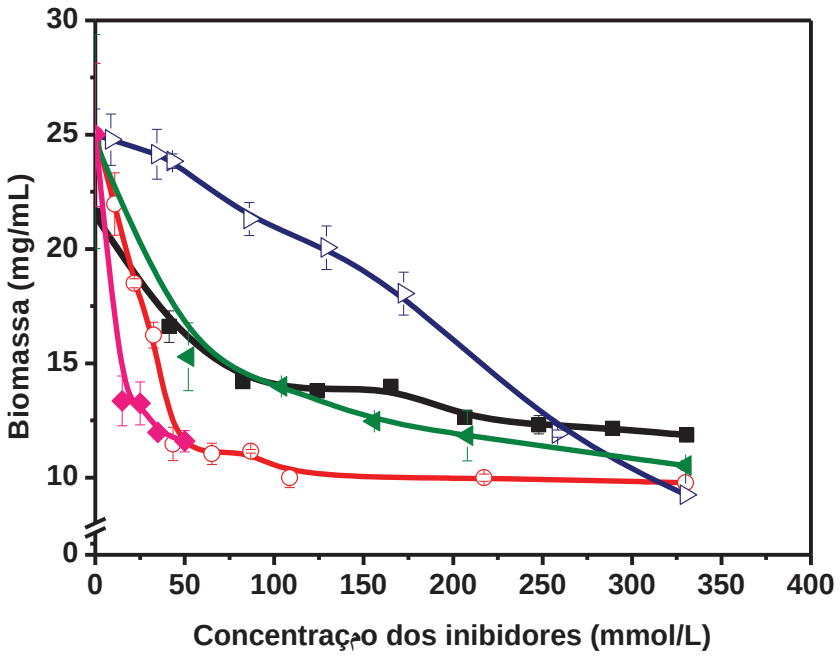

Figura 20. Efeito do aumento das concentrações dos inibidores de fermentação sobre a produção de biomassa da levedura 63M após 6h de fermentação em meio sintético contendo 2% de extrato de levedura, 18% de glicose e inoculo inicial de células de 10 mg/mL a 34ºC. (-■-) ácido acético, (-○-) ácido fórmico, (-▷-) ácido levulínico, (-◀-) furfural e (-◆-) vanilina.

De uma maneira geral, os inibidores reduziram de forma mais drástica a produção de etanol pela levedura 63M do que a produção de biomassa após 6h de fermentação (Fig. 21). No entanto, a ordem de inibição dos inibidores sobre a produção de etanol foi semelhante ao da produção de biomassa. O inibidor que mais reduziu a produção de etanol pela levedura 63M também foi a vanilina, seguido pelo ácido fórmico, furfural, ácido acético e o ácido levulínico que apresentou o menor efeito inibitório (Fig. 21). Um artigo recente descreve que há 60% de perdas na produção de etanol em presença de 1,5% (248 mmol/L) de ácido acético (KEATING *et al*., 2006), enquanto que neste mesmo trabalho o nível de inibição pelo acético foi equivalente em presença de 45 mmol/L. Isto significa que em concentração muito mais baixa de ácido o efeito inibitório sobre a levedura estudada foi maior. Ando *et al*. (1986) observaram que 7 mmol/L de vanilina diminuiu em 25% a produção de etanol, enquanto que o mesmo grau de inibição foi no presente trabalho com 25 mmol/L de vanilina.

Larsson *et al*. (1999) estudaram os efeitos de concentrações crescentes do ácido fórmico, ácido levulínico e ácido acético sobre as fermentações de levedura de panificação em meio sintético contendo 0,1% de extrato de levedura. Estes autores observaram que o ácido fórmico, em altas concentrações (acima de 100 mmol/L), foi mais inibitório do que o ácido levulínico para a produção de etanol, enquanto que o ácido acético mostrou a menor inibição. Ao contrário, o ácido levulínico foi menos inibitório para a produção de etanol do que o ácido acético no presente trabalho. Palmqvist *et al*. (1999) observaram que o furfural afeta mais o crescimento do que a produção de etanol. Num trabalho recente, Keating *et al*. (2006) observaram que em presença de 0,08% (8 mmol/L) e 0,16% (17 mmol/L) de furfural ocorreu pouco efeito sobre a produção de etanol em meio YPD em relação ao meio controle. No presente trabalho, o furfural inibiu da mesma forma tanto o crescimento (Fig. 20) quanto à produção de etanol em meio sintético (Fig. 21).

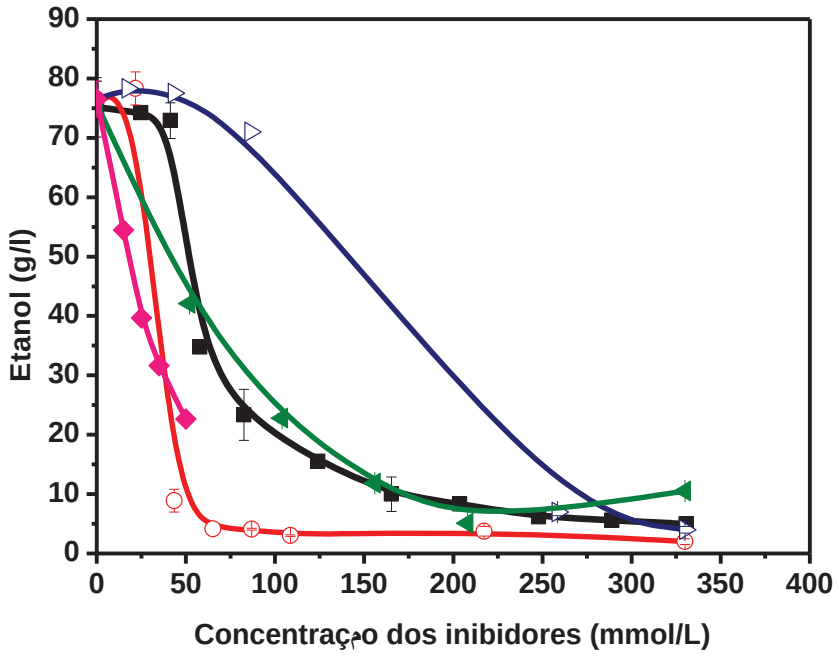

Figura 21. Efeito do aumento das concentrações dos inibidores de fermentação sobre o etanol produzido da levedura 63M após 6h de fermentação em meio sintético contendo 2% de extrato de levedura, 18% de glicose e inóculo inicial de células de 10 mg/mL a 34ºC. (-■-) ácido acético, (-○-) ácido fórmico, (-▷-) ácido levulínico, (-◀-) furfural e (-◆-) vanilina.

Os inibidores de fermentação tiveram menor efeito sobre a viabilidade da levedura 63M após 6h de fermentação (Fig. 22) do que sobre as produções de biomassa (Fig. 20) e etanol (Fig. 21). O ácido fórmico foi o inibidor que mais reduziu a viabilidade, seguido pela vanilina, furfural e ácido levulínico o qual reduziu em 15% a viabilidade numa concentração de 330 mmol/L (Fig. 22). Além disto, o ácido fórmico é tão tóxico que a presença de 70 mmol/L deste inibidor foi suficiente para anular a viabilidade da levedura 63M após 6h de fermentação (Fig. 22). Abbott *et al*. (2005) mostrou que em destilarias o decréscimo em rendimento do etanol, lentidão ou parada no processo de fermentação alcoólica pode ser devido as elevadas quantidades de ácido acético produzido pelas bactérias. Uma explicação para a toxicidade do ácido fórmico é atribuída ao seu baixo valor de pKa (3,75), ao passo que valores maiores de pKa (4,74) obtidos para o ácido acético e 4,66 para o ácido

levulínico (SONI *et al*., 1982) seriam a razão do menor grau de inibição. Compostos furânicos inibem enzimas do metabolismo central, tais como piruvato desidrogenase (PDH), acetaldeído desidrogenase (ALDH) e álcool desidrogenase (MODIG *et al*., 2002) quando células são expostas a altos níveis de furfural que pode causar uma perturbação exercida sobre a estrutura da membrana celular. A redução de furanos por leveduras também resultam no esgotamento de NADH e NADPH (PALMQVIST *et al*., 1999). Em leveduras, o furfural pode ser reduzido ao seu álcool correspondente, pela ação da enzima álcool desidrogenase (ADH), que é menos inibitório às células (VILLA *et al*., 1992). No presente trabalho, a alta viabilidade da levedura 63M na presença de furfural pode ser explicada pela ação da enzima álcool desidrogenase que converte o furfural em álcool furfurílico ou a ação da enzima aldeído desidrogenase que forma o ácido furóico, como descrito por Modig *et al*. (2002).

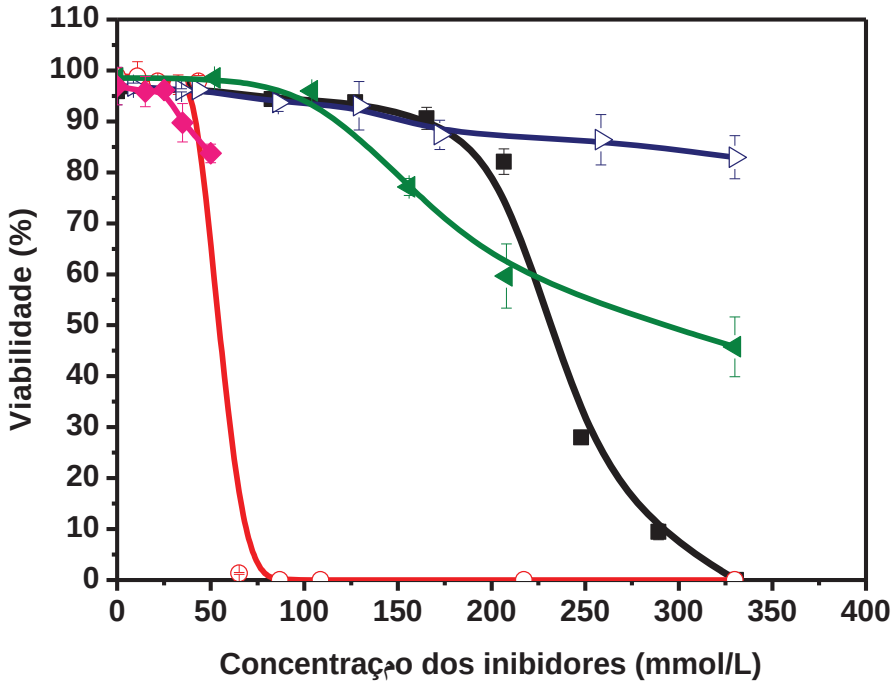

Figura 22. Efeito do aumento das concentrações dos inibidores de fermentação sobre viabilidade da levedura 63M após 6h de fermentação em meio sintético contendo 2% de extrato de levedura, 18% de glicose e inóculo inicial de células de 10 mg/mL a 34ºC. (-■-) ácido acético, (-○-) ácido fórmico, (-▷-) ácido levulínico, (-◀-) furfural e (-◆-) vanilina.

O pH de um meio de cultura é de suma importância para o desenvolvimento do microrganismo. As leveduras apresentam uma faixa de crescimento ótimo de pH na faixa de 4,5 a 6,5 porém, algumas espécies são capazes de se desenvolver em meio ácido ou alcalino (pH 3 ou pH 8 respectivamente) (WALKER, 1998). A figura 23 ilustra os valores individuais de pH dos inibidores após 6h de fermentação em meio sintético contendo 18% de glicose e densidade inicial de 10 mg/mL de célula. A maior queda de pH do meio foi obtida com concentrações acima de 50 mmol/L de ácido fórmico, seguido pelo acético, e levulínino. O furfural e a vanilina tiveram pouco efeito sobre o pH do meio após 6h de fermentação. O efeito inibitório dos ácidos fracos depende do pH do meio, da constante de dissociação do ácido e da sua concentração molar. Em meio líquido, o pH dos ácidos fracos é dependente do equilíbrio entra as formas ionizadas e não-ionizadas (NARENDRANATH *et al*., 2001). Uma explicação para a queda do pH causada pelos ácidos orgânicos fracos pode estar relacionada com a forma não-ionizada destes inibidores. Esta forma atravessa a membrana da levedura dissociando-se no interior das células diminuindo o pH intracelular (PAMPULHA; LOUREIRO-DIAS, 1989). As células utilizam o ATP para expulsar os prótons para fora da célula para manter a homeostase intracelular (HOLYOAK *et al*., 1996), podendo acidificar desta maneira o meio externo. A literatura descreve que o efeito do pH do furfural é perceptível em concentrações maiores do que 0,3 mg/mL (3 mmol/L) (PARAJÓ *et al*., 1998). No presente trabalho, concentrações elevadas de furfural (até 330 mmol/L) apresentaram pouco efeito sobre o pH final do meio. Quanto a vanilina, este inibidor apresentou um comportamento oposto ao dos ácidos fracos, aumentando o pH final do meio suavemente com o aumento da sua concentração no mesmo.

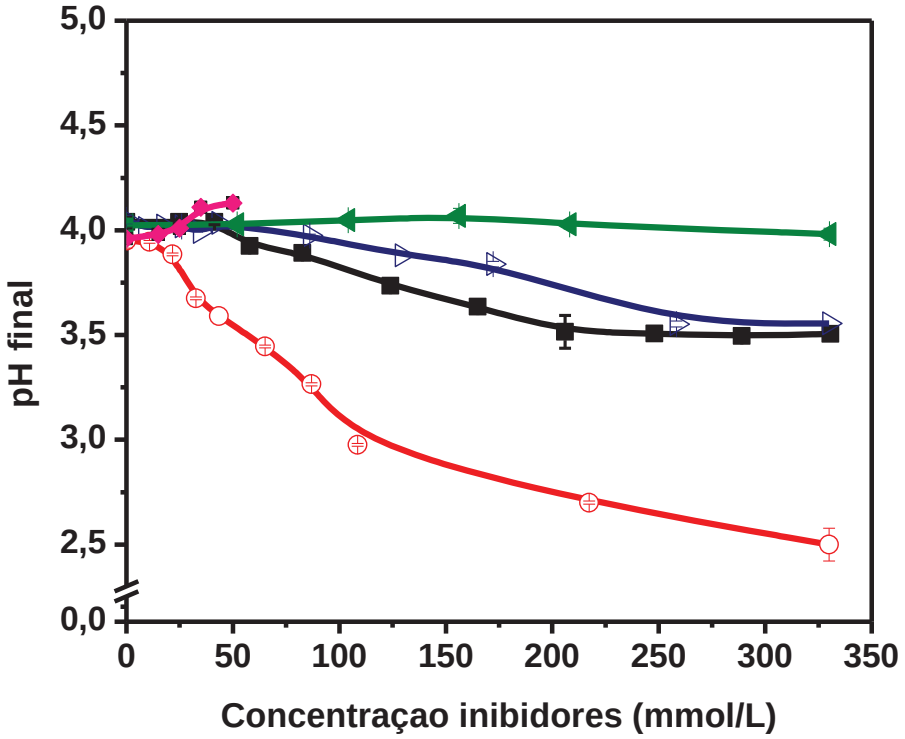

Figura 23. Efeito do aumento das concentrações dos inibidores de fermentação sobre o pH da levedura 63M após 6h em meio sintético contendo 2% de extrato de levedura, 18% de glicose e inóculo inicial de células de 10 mg/mL a 34ºC. (-■-) ácido acético, (-○-) ácido fórmico, (-▷-) ácido levulínico, (-◀-) furfural e (-◆-) vanilina.

4.4– ESTABELECIMENTO DE UM COQUETEL DE INIBIDORES A SER ADICIONADO AO MEIO SINTÉTICO PARA ESTUDOS DE CRESCIMENTO E FERMENTAÇÃO DA LEVEDURA 63M

SUMÁRIO

O objetivo desta parte do trabalho consistiu na formulação de um coquetel contendo os inibidores presentes em hidrolisados de bagaço-de-cana a ser adicionado ao meio sintético descrito acima (ver item 4.3.2). Este tipo de coquetel é de suma importância para estudos da resistência de leveduras a

mistura de inibidores presente em hidrolisados destinados a produção de álcool de segunda geração. Outra relevância seria a avaliação do nível de toxidez de hidrolisados. Um planejamento fatorial fracionado 2^{5-2} foi realizado para estudar os efeitos principais dos cinco inibidores (ácido acético, ácido fórmico, ácido levulínico, furfural e vanilina) sobre o crescimento e fermentação da levedura 63M em meio sintético contendo 2% de extrato de levedura. Os resultados obtidos mostraram que os ácidos fórmicos, levulínico e furfural tiveram os maiores efeitos sobre a produção de biomassa. O ácido levulinico mostrou efeito positivo enquanto que os outros mostraram efeitos negativos sobre a biomassa. Não foi possível obter modelos bem ajustados para a viabilidade e pH final após 6 horas de fermentação. Quanto a produção de etanol, esta foi negativamente afetada pelos cinco inibidores. Baseando-se nestes efeitos, decidiu-se fixar as concentrações dos inibidores (20 mmol/L de ácido acético e 5 mmol/L de vanilina) que tiveram menor efeito sobre a produção de biomassa pela levedura 63M após 6h de fermentação. Os outros inibidores (ácido fórmico, ácido levulínico e furfural) foram ensaiados para definir as concentrações sobre a produção de etanol usando-se planejamento composto central. A otimização das concentrações que permitissem a maior produção de etanol com formação de biomassa foi de 3,3 mmol/L de ácido fórmico, 21,6 mmol/L de ácido levulínico e 6,6 mmol/L de furfural. Nestas condições a formação de biomassa calculada pelo programa foi de 13,1 mg/mL e o etanol foi de 70,1 g/L. Estes valores máximos de etanol e biomassa foram confirmados através de um experimento de validação onde se obteve 13,2 ± 0,1 mg/mL de biomassa, 72,6 ± 1,0 g/L de etanol e uma viabilidade de 96,8%±04.

4.4.1- Primeiro planejamento fatorial fracionado

O primeiro planejamento fatorial fracionado foi realizado com vários experimentos de fermentação (8 experimentos) nos quais a levedura 63M foi cultivada em meio sintético contendo 18% de glicose, 2% de extrato de levedura e 10 mg/mL de inóculo inicial a 34°C. As variáveis independentes dos 8 experimentos consistiram na variação das concentrações dos cinco inibidores

em um mesmo experimento. As medidas de biomassa e etanol produzido foram obtidas após 6h de fermentação (Tab. 5). O gráfico de Pareto ilustra que todos os inibidores estudados tiveram efeitos significativos sobre a produção de etanol ($p < 0,050$, Fig. 24). O gráfico dos efeitos principais dos inibidores sobre a produção de biomassa foi escolhido para se fixar as concentrações de dois inibidores quando houve maior produção de biomassa. As concentrações destes inibidores foram de 20 mmol/L de ácido acético e 5 mmol/L de vanilina (maior biomassa, Fig. 25).

Tabela 5. Produção de biomassa e etanol em presença dos inibidores de fermentação resultantes dos experimentos do planejamento fatorial fracionado 2^{5-2} (1/4 de fracionamento)[a].

Exp.	X_1	X_2	X_3	X_4	X_5	Biomassa (mg/mL)	Etanol (g/L)
						Valores experimentais	
1	20	5	35	10	10	15,2±0,8	18,9±0,5
2	5	15	10	10	10	13,4±0,1	45,4±0,4
3	5	5	35	30	5	14,2±0,5	34,4±1,0
4	5	15	35	10	5	14,7±2,2	23,2±0,7
5	20	5	10	10	5	15,3±2,4	70,9±3,1
6	20	15	10	30	5	13,1±0,7	27,7±1,4
7	20	15	35	30	10	13,6±1,4	0,0±0,0
8	5	5	10	30	10	13,8±0,1	33,7±1,2

Onde Exp.= experimentos, X_1= ácido acético (mmol/L), X_2= ácido fórmico (mmol/L), X_3= ácido levulínico (mmol/L), X_4= furfural (mmol/L) e X_5= vanilina (mmol/L). [a] Experimentos realizados e analisados em duplicata.

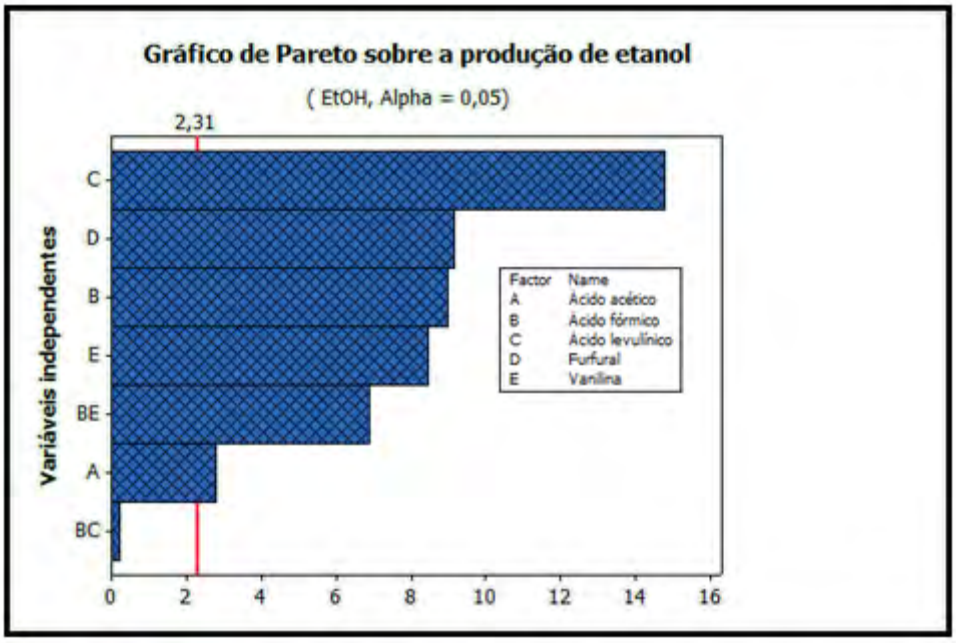

Figura 24. Gráficos de Pareto mostrando os efeitos máximos dos inibidores e suas combinações em relação a uma escala de valores (eixo X) sobre a produção de etanol pela levedura 63M após 6h de fermentação a 34°C. X_1=ácido acético, X_2=ácido fórmico, X_3=ácido levulínico, X_4= furfural, X_5=vanilina.

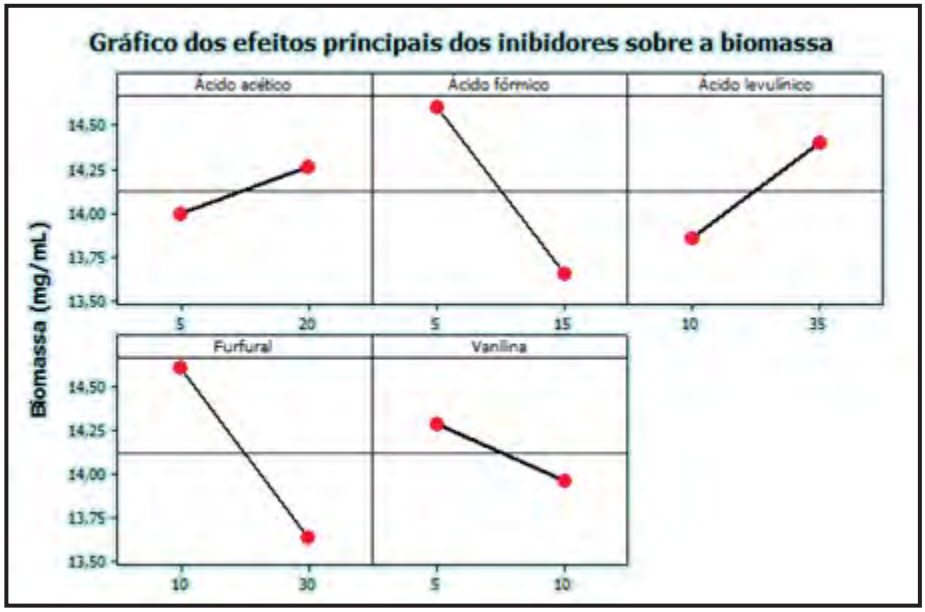

Figura 25. Gráficos dos efeitos principais dos inibidores (ácidos acético, fórmico e levulínico, furfural e vanilina) sobre a produção de biomassa da levedura 63M após 6h de fermentação a 34°C.

4.4.2– Formulação de um coquetel de inibidores de hidrolisados sobre o crescimento e otimização estatística da concentração de seus componentes sobre a fermentação da levedura 63M em meio sintético

O segundo planejamento de superfície de resposta foi realizado para definir as menores concentrações dos inibidores (ácido fórmico, ácido levulínico e furfural) para uma máxima produção de etanol e biomassa da levedura 63M após 6h de fermentação em meio sintético contendo 18% de glicose, 2% de extrato de levedura e 10 mg/mL de inóculo. Os resultados destes experimentos foram analisados pela análise de variância, que gerou equações e modelos para a produção de biomassa e de etanol. A tabela 6 mostra os resultados dos 20 experimentos resultantes do segundo planejamento de superfície de resposta 2^3 de composto central completo. Os valores da viabilidade fornecidos nesta tabela reafirmaram que os inibidores pouco afetaram a viabilidade da levedura 63M, (ver Fig. 22) onde os efeitos foram menos drásticos quando comparados quanto à produção de biomassa (Fig. 20) e produção de etanol (Fig. 21). Além do mais, a viabilidade apresentou um coeficiente de determinação (R^2) de 0,874 para o modelo da viabilidade e isto significa que o modelo não foi bom (dados não mostrados). A viabilidade máxima obtida no modelo experimental foi de 99,0±1,4 (experimento 9, Tab. 6) porém, o valor da viabilidade do experimento 1 da tabela 6 (97,5±0,4) foi correspondente a maior produção de etanol e a segunda maior produção de biomassa. Estes experimentos também foram realizados de forma aleatória em relação à ordem padrão fornecida pelo programa conforme mostra a tabela 5.

Tabela 6. Experimentos do planejamento 2^3 composto central completo de superfície de resposta para determinar os efeitos dos inibidores de fermentação sobre a produção de biomassa, etanol e viabilidade pela levedura 63M contendo 6 replicatas do ponto central.

Exp.	X_1	X_2	X_3	Biomassa (mg/mL)		Etanol (g/L)		Viabilidade (%)
				V. Exp.	V. Ajust.	V. Exp.	V. Ajust.	
1	5,0	25,0	10,0	12,4±0,6	12,4	61,1±1,5	60,7	97,5±0,4
2	10,	25,0	10,0	11,6±0,6	11,6	49,8±4,9	51,9	94,5±2,1
3	5,0	35,0	10,0	11,8±0,1	11,9	51,2±2,2	49,4	97,4±1,1
4	10,	35,0	10,0	11,2±0,3	11,2	33,1±3,6	37,2	96,7±0,5
5	5,0	25,0	20,0	12,2±0,5	12,2	44,3±2,5	41,4	95,5±1,1
6	10,	25,0	20,0	11,2±0,8	11,1	31,9±2,8	34,7	93,8±5,3
7	5,0	35,0	20,0	11,3±0,1	11,3	41,9±5,3	40,8	96,6±3,1
8	10,	35,0	20,0	10,3±0,1	10,6	29,1±2,6	30,7	93,7±3,3
9	3,3	30,0	15,0	12,7±0,7	12,6	46,7±2,5	50,9	99,0±1,4
10	11,	30,0	15,0	11,1±0,5	11,1	40,9±4,1	35,1	95,7±4,5
11	7,5	21,6	15,0	11,9±0,5	11,9	52,1±1,7	51,7	92,3±1,0
12	7,5	38,4	15,0	11,0±0,4	10,9	39,9±2,3	38,8	97,3±0,6
13	7,5	30,0	6,6	11,7±0,8	11,7	52,8±3,3	50,9	95,1±1,6
14	7,5	30,0	23,4	10,8±0,2	10,8	28,9±1,9	29,2	91,7±0,5
15	7,5	30,0	15,0	10,7±0,2	11,0	37,0±2,2	33,2	96,1±1,6
16	7,5	30,0	15,0	11,2±0,5	11,0	34,2±1,4	33,2	95,3±2,8
17	7,5	30,0	15,0	11,2±0,2	11,0	32,7±1,0	33,2	95,9±0,8
18	7,5	30,0	15,0	10,6±0,3	11,0	32,4±1,1	33,2	89,0±3,4
19	7,5	30,0	15,0	11,5±0,7	11,0	29,2±0,4	33,2	96,0±2,0
20	7,5	30,0	15,0	11,0±0,1	11,0	33,1±0,1	33,2	96,5±3,5

Onde Exp= experimentos, V. Exp= valores do experimento, V. Ajust.= valores ajustados, X_1= ácido fórmico (mmol/L), X_2= ácido levulínico (mmol/L) e X_3= furfural (mmol/L).Por exemplo considerando o ácido fórmico, tem-se ponto central (a), pontos axiais (b), pontos cúbicos mínimos e máximos (c) e (d) como indicado na Fig. 13.

A análise de variância (ANOVA) para a produção de etanol foi feita com base nos dados da tabela 6 e descritos na tabela 7. Este tipo de análise fornece diversos valores que indicam um melhor ajuste do modelo matemático obtido para a produção de etanol. Para cada valor de F (teste F de Fisher para comparar as variações entre médias) foi calculado um valor absoluto de probabilidade (p-valor) que permite comparar os dados da análise de variância. O p-valor para a regressão quadrática relativa à produção de etanol foi significativa ($p<0,050$, ver Tabela 7). O modelo para a produção de etanol foi mais bem representado também por uma regressão quadrática ($p<0,050$). Além disto, tanto as interações quanto a falta de ajuste do modelo de produção de etanol não foram significantes ($p>0,050$ para ambos), mas estes resultados indicam que as variáveis independentes estudadas (ácidos acético fórmico e furfural) podem satisfatoriamente explicar as variações em produção de etanol pela linhagem 63M através de um modelo de equação matemática.

Tabela 7. Análise de variância para a produção de etanol da levedura 63M em meio sintético contendo 2% de extrato de levedura, 18% de glicose e 10 mg/mL de inóculo inicial após 6h a 34°C.

Fonte	GL	SQ Seq	SQ Adj	MQ Adj	F	p-valor
Regressão	9	1530,06	1530,06	170,006	11,35	0,001
Linear	3	1072,07	366,27	122,088	8,15	0,006
Quadrática	3	392,06	392,06	130,686	8,72	0,005
Interação	3	65,93	65,93	21,977	1,47	0,288
Erro residual	9	134,83	134,83	14,981		
Falta de ajuste	5	101,89	101,89	20,378	2,47	0,200
Erro puro	4	32,94	32,94	8,234		
Total	18	1664,88				

GL= graus de liberdade; SQ= soma dos quadrados; MQ=médias dos quadrados; Adj=ajustado.

A tabela 8 mostra que o coeficiente de determinação (R^2) para o modelo de produção de etanol foi de 0,919. Este valor indica que 91,9% da variação observada para a produção de etanol foi atribuída aos inibidores estudados. Os termos significativos do modelo para a produção de etanol são: a) o valor da constante (p>0,050); b) os termos lineares do ácido levulínico e furfural (p<0,050 para ambos); c) os termos quadráticos dos ácidos fórmico e levulínico, além do furfural (p<0,050 para os três termos). Os efeitos das interações entre os três inibidores não foram significativos (p>0,050 para as três interações). Diante destes resultados, a equação matemática que descreve o modelo para produção de etanol (Y_1 pela levedura 63M é a seguinte:

$$Y_1 = 333,6 - 12,1\ X_2 - 7,8\ X_3 + 0,6\ X_1^2 + 0,2\ X_2^2 + 0,1 X_3^2$$

Tabela 8. Coeficientes estimados para a produção de etanol pela levedura 63M em meio sintético contendo 2% de extrato de levedura, 18% de glicose e 10 mg/mL de inóculo inicial após 6h a 34°C.

Termos	Coeficientes	Coeficientes padrão	T	p-valor[(a)]
Constante	333,644	56,1446	5,943	0,000
X_1	-8,757	4,4698	-1,959	0,082
X_2	-12,080	2,7773	-4,350	0,002
X_3	-7,759	2,2349	-3,472	0,007
$X_1 * X_1$	0,557	0,1676	3,325	0,009
$X_2 * X_2$	0,171	0,0419	4,069	0,003
$X_3 * X_3$	0,098	0,0419	2,338	0,044
$X_1 * X_2$	-0,070	0,1095	-0,642	0,537
$X_1 * X_3$	0,041	0,1095	0,377	0,715
$X_2 * X_3$	0,107	0,0547	1,961	0,081

R^2 (coeficiente de determinação do modelo indicando o grau de variabilidade do modelo)= 91,9%; R^2 (adj) = coeficiente de determinação do modelo ajustado = 83,8%

Onde X_1= ácido fórmico, X_2= ácido levulínico e X_3= furfural.

A análise de variância (ANOVA) para a produção de biomassa está descrita na tabela 9. Este tipo de análise fornece diversos valores que indicam um melhor ajuste do modelo matemático obtido para a produção de biomassa. Para cada valor de F foi calculado um valor absoluto de probabilidade (p-valor) que permite comparar os dados da análise de variância. O p-valor para a regressão relativa à produção de biomassa foi significativa ($p<0,050$). O modelo para a produção de biomassa também foi melhor representada por uma regressão quadrática ($p<0,050$). Além disto, tanto a interação quanto a falta de ajuste do modelo de produção de biomassa não foram significativos ($p>0,050$ para ambas), mas estes resultados indicam que as variáveis independentes estudadas (ácidos acético fórmico e furfural) podem satisfatoriamente explicar a produção de biomassa pela linhagem 63M através de um modelo de equação matemática.

Tabela 9. Coeficientes estimados para a produção de biomassa pela levedura 63M em meio sintético contendo 2% de extrato de levedura, 18% de glicose e 10 mg/mL de inóculo inicial após 6h a 34°C.

Fonte	DF	SQ Seq	SQ Adj	MQ Adj	F	p-valor
Regressão	9	6,37607	6,37607	0,708452	10,25	0,001
Linear	3	4,98295	0,68524	0,228413	3,31	0,071
Quadrática	3	1,26312	1,26312	0,421040	6,09	0,015
Interação	3	0,13000	0,13000	0,043333	0,63	0,615
Erro residual	9	0,62183	0,62183	0,069092		
Falta de ajuste	5	0,04983	0,04983	0,009965	0,07	0,994
Erro puro	4	0,57200	0,57200	0,143000		
Total	18	6,99789				

GL= graus de liberdade; SQ= soma dos quadrados; MQ=médias dos quadrados; Adj=ajustado.

A Tabela 10 mostra que o coeficiente de determinação (R^2) para o modelo de produção de biomassa foi de 0,911. Este valor indica que 91,1% da variação observada para a produção de biomassa foi atribuída aos inibidores

estudados. Apenas o ácido fórmico teve efeito sobre a produção de biomassa, por isto os termos do modelo para a produção de biomassa são: a) constante da equação da biomassa ($p>0,050$); b) os termos lineares e quadráticos do ácido fórmico ($p<0,050$ para ambos os termos). Tanto os termos quadráticos quanto os termos lineares do ácido levulínico e furfural não foram significativos ($p>0,050$ para os quatro termos). Além disto, os efeitos das interações entre os três inibidores também não foram significativos ($p>0,050$ para as três interações). Estes resultados indicam que a produção de biomassa (Y_2) pode ser explicada por uma equação matemática que é a seguinte:

$$Y_2 = 20,92 – 0,85\ X_1 -0,05\ X_1^2$$

Não foi possível obter modelos bem ajustados para viabilidade e pH final após 6 horas de fermentação (dados não mostrados).

Tabela 10. Coeficientes estimados para a produção de biomassa da levedura 63M em meio sintético contendo 2% de extrato de levedura, 18% de glicose e 10 mg/mL de inóculo inicial após 6h a 34°C.

Termos	**Coeficientes**	**Coeficientes padrão**	**T**	**p-valor**
Constante	20,9172	3,81290	5,486	0,000
X_1	-0,8458	0,30356	-2,786	0,021
X_2	-0,3337	0,18861	-1,769	0,111
X_3	0,0406	0,15178	0,268	0,795
$X_1 * X_1$	0,0465	0,01138	4,084	0,003
$X_2 * X_2$	0,0053	0,00285	1,848	0,098
$X_3 * X_3$	0,0024	0,00285	0,854	0,415
$X_1 * X_2$	0,0020	0,00743	0,269	0,794
$X_1 * X_3$	-0,0060	0,00743	-0,807	0,440
$X_2 l * X_3$	-0,0040	0,00372	-1,076	0,310
R^2 = 91,1% R^2 (adj) = 82,2%				

Onde X_1= ácido fórmico, X_2= ácido levulínico e X_3= furfural.

4.5- VALIDAÇÃO ESTATÍSTICA E EXPERIMENTAL DOS MODELOS DE PRODUÇÃO DE ETANOL E BIOMASSA

A tabela 11 mostra os resultados estatísticos prévios da otimização da produção de etanol e de biomassa em meio sintético pela levedura 63M em presença dos três inibidores usados no planejamento 2^3 (Tab. 5). Este programa mostrou que as concentrações dos inibidores que fornece as concentrações máximas de etanol (70,1 g/L) e biomassa (13,1 mg/mL) no coquetel foram: 3,3 mmol/L de ácido fórmico, 21,6 mmol/L de ácido levulínico e 6,6 mmol/L de furfural.

A seguir confirmou-se experimentalmente (cinco repetições) os efeitos do coquetel sobre a fermentação, obtendo-se os seguintes dados de fermentação após 6 horas: etanol final de 72,6 ±1,0 g/L e biomassa final de 13,2 ± 0,1 mg/mL) com uma viabilidade final de 96,8%±0,4. O pH inicial de 4,5 decresceu até 3,95 ao final de 6 horas.

Tabela 11. Aplicação do 'Response Optimizer' na otimização dos resultados obtidos para a produção de etanol e biomassa pela levedura 63M após 6h em meio sintético contendo 18% de glicose, 2% de extrato de levedura, 10 mg/mL de inóculo inicial e na presença de inibidores de fermentação utilizados no planejamento de superfície de resposta.

Parâmetros	Meta	Mínimo	Médio	Máximo
Etanol (g/L)	Máxima	50	65	65
Biomassa (mg/mL)	Máxima	12	13	13
Solução Global (valores mínimos dos inibidores)				
Ácido fórmico= 3,3 mmol/L				
Ácido levulínico = 21,6 mmol/L				
Furfural = 6,6 mmol/L				
Respostas previstas			**Respostas obtidas**	
Etanol = 70,1 g/L; desejabilidade= 1,000			Etanol = 72,6 ± 1,0 g/L	
Biomassa = 13,1 mg/mL; desejabilidade=1,000			Biomassa = 13,2 ± 0,1mg/mL	
Desejabilidade global= 1,000				

Conclusões

As conclusões principais foram:

1- Em relação ao estabelecimento de meios sólidos para estudos de seleção de leveduras resistentes a acidez acética:

- Algumas leveduras (total de dez linhagens) cresceram em pH baixo no meio sintético contendo ácido acético adicionado mostrando intensidades de crescimento dependentes da linhagem de levedura;
- Algumas linhagens de levedura tiveram seu crescimento inibido quando a concentração de açúcar se elevou de 2% para 8% no meio sintético contendo ácido acético adicionado;
- O meio sintético, contendo altas concentrações de açúcar, foi o melhor meio para a seleção de leveduras quanto à resistência ao ácido acético, pois tanto o açúcar elevado quanto o ácido acético induzem apoptose.

2- Estabelecimento de meio líquido para crescimento em concentrações crescentes de ácido acético:

- O meio sintético líquido contendo alta concentração de açúcar e inóculo permitiu um bom crescimento e produção de etanol pela levedura 63M. No entanto, o crescimento desta levedura dependeu da adição do extrato de levedura ao meio sintético;
- Com o meio sintético estabelecido, avaliou-se a toxidez individual dos inibidores sobre o processo que foi da seguinte ordem: Vanilina > Fórmico > Acético = Furfural > Levulínico quanto ao crescimento e produção de etanol;
- Fórmico > Vanilina > Furfural > Acético > Levulínico quanto à viabilidade.
- Fórmico> Acético = Levulínico > Furfural > Vanilina quanto o pH do meio sintético;
- Os inibidores isoladamente pouco afetaram a viabilidade e o pH, mas apresentaram efeitos significativos sobre a produção de biomassa e etanol pela levedura 63M.

3- Formulação de um coquetel de inibidores para permitir o crescimento da levedura 63M no meio sintético estabelecido:

- As análises estatísticas mostraram que as concentrações dos inibidores, a ser adicionadas em meio sintético contendo altas concentrações de inóculo e açúcar, foram: 20 mmol/L de ácido acético, 3,3 mmol/L de ácido fórmico, 21,6 mmol/L de ácido levulínico, 6,6 mmol/L de furfural e 5,0 mmol/L de vanilina para máximo crescimento (13,2 ± 0,1 mg/mL, biomassa final) e produção de etanol (72,6 ± 1,0 g/l, etanol final) como confirmado na validação dos resultados de biomassa e etanol após 6h de fermentação.

Referências

Referências

ABBOTT, D. A.; INGLEDEW, W. M. Buffering capacity of whole corn mash alters concentrations of organic acids required to inhibit growth of *Saccharomyces cerevisiae* and ethanol production. **Biotechnol. Lett.**, v. 26, p.1313-1316, 2004.

ALMEIDA, J. R. M. et al. Increased tolerance and conversion of inhibitors and lignocellulosic hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Chem. Technol. Biotechnol.**, v. 82, p. 340-349, 2007.

AMBATI, P.; AYYANNA, C. Optimizing medium constituents and fermentation conditions for citric production from palmyra jiggery using response surface method. **Word J. Microbiol. Biotechnol.**, v. 17, p. 331-335, 2001.

BANERJEE, N.; BHATNAGAR, R.; VISWANATHAN, L. Inhibition of glycolysis by furfural in *Saccharomyces cerevisiae*. **Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 11, p. 226-228, 1981.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S. **Como fazer experimentos**. 2. ed. Campinas: Ed. UNICAMP, 2003.

BHAT, H. K.; QAZI, G. N.; CHOPRA, C. L. Effectof 5-hydroxymethylfurfural on production of citric acid by *Aspergillus niger.* **Indian J. Exp. Biol.**, v. 22, p. 37-38, 1984.

BOX, G. E. et al. **Statistics for experimenters**: design, innovation, and discovery. 2nd ed. New Jersey: Wiley, 2005.

BOYER, L. J. et al. The effects of furfural on ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae*. **Biomass Bioeng.**, v. 3, n. 1, p. 41-48, 1992.

BRUL, S.; COOTE, P. Preservative agents in foods: mode of action and microbial resistance mechanisms. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 50, p. 1-17, 1999.

CALLEGARI-JACQUES, S. M. **Bioestatística**. São Paulo: Artmed, 2003.

COCHRAN, W. G.; COX, G. M. **Experimental designs**. 2nd ed. New York: John Wiley & Sons, 1957.

CURRELI, N. et al. A. Complete and efficient enzymic hydrolysis of pretreated wheat straw. **Process Biochem.**, v. 37, p. 937-941, 2002.

DHEPE, P. L.; FUKUOKA, A. Conversion under heterogeneous catalysis. **Chemsuschem**, v. 1, p. 969-975, 2008.

FIREOVED, R. I.; MUTHARASAN, R. Effect of furfural and ethanol on the growth and energetics of yeast under microaerobic conditions. **Ann. N. Y. Ac. Sci.**,v. 469, p. 433-447, 1986.

GALBE, M.; ZACCHI, G. A review of the production of ethanol from softwood. **Appl. Microbiol Biotchenol.**, v. 59, p. 618-628, 2002.

GRANOT, D.; SNYDER, M. Carbon source induces growth of stationary phase yeast cells, independent of carbon source metabolism. **Yeast**, v. 9, p. 465-479, 1993.

GRANOT, D.; LEVINE, A.; DOR-HEFETZ, E. Sugar-induced apoptosis in yeast cells. **FEMS Yeast Res.**, v. 4, p. 7-13, 2003.

GRAVES, T. et al. Effect of pH and lactic or acetic acid on ethanol productivity by *Saccharomyces cerevisiae* in corn mash. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.**, v. 33, n. 6, p. 469-474, 2006.

GRAY, K. A.; ZHAO, L.; EMPTAGE, M. Bioethanol. **Curr. Opin. Chem. Biol.**, v. 10, n. 2, p. 141-146, 2006.

HOLYOAK, C. D. et al. Activity of the plasma membrane H1-ATPase and optimal glycolytic flux are required for rapid adaptation and growth of *Saccharomyces cerevisiae* in the presence of the weak-acid preservative sorbic acid. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 62, p. 3158-3164, 1996.

JONES, J. L.; SEMRAU, K. T. Wood hydrolysis for ethanol production previous experience and the economics of selected processes. **Biomass**, v. 5, n. 2, p. 109 - 135, 1984.

KAWAHATA, M. et al. Yeast genes involved in response to lactic acid and acetic acid: acidic conditions caused by the organic acids in *Saccharomyces cerevisiae* cultures induce expression of intracellular metalmetabolism genes regulated by Aft1p. **FEMS Yeast Res.**, v. 6, p. 924-936, 2006.

KEATING, J. D.; PANGANIBAN, C.; MANSFIELD, S. D. Tolerance and adaptation of ethanologenic yeasts to lignocellulosic inhibitory compounds. **Biotechnol. Bioeng.,** v. 93, p. 1196-1206, 2006.

KENNED, M.; KROUSE, D. Strategies for improving fermentation medium performance: a review. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.**, v. 23, p. 456-475, 1999.

KIM, H. M. et al. Optimization of submerged culture condition for the production of mycelial biomass and exopolysaccharides by *Agrocybe cylindracea*. **Bioresour. Technol.**, v. 96, n. 10, p. 1175-1182, 2005.

KLEMM, D. et al. Cellulose: fascinating biopolymer and sustainable raw material. **Angew. Chem.**, v. 44, n. 22, p. 3358 - 3393, 2005.

KLINKE, H. B.; THOMSEN, A. B.; AHRING, B. K. Inhibition of ethanol-producing yeast and bacteria by degradation products produced during pre-treatment of biomass. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 66, p. 10-26, 2004.

KUMAR, P.; SATYANARAYANA, T. Optimization of culture variables for improving glucoamylase production by alginate-entrapped *Thermomucor indicaeseudaticae* using statistical methods. **Bioresour. Technol.**, v. 98, p. 1252-1259, 2007.

LARSSON, S.; PALMQVIST, E.; HAHN-HÄGERDAL, B. The generation of fermentation inhibitors during dilute acid hydrolysis of softwood. **Enzyme Microb.Technol.**, v. 24, p. 151-159, 1999.

LEE, S. S.; ROBINSON, F.M.; WANG, H.Y. Rapid-d**e**termination of yeast viability. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 11, n. 3, p. 641-649, 1981.

LENTH, R. V. Quick and easy analysis of unreplicated factorials. **Technometrics**, v. 31, n. 4, p. 469-472, 1989.

LEWIS, J. G. et al. Stress co-tolerance and trehalose content in baking strains of *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.**, v. 18, p. 30-36, 1997.

LUDOVICO, P. et al. *Saccharomyces cerevisiae* commits to a programmed cell death process in response to acetic acid. **Microbiology**, v. 147, p. 2409-2415, 2001.

LUO, C.; BRINK, D.; BLANCH, H. W. Identification of potential inhibitors in conversion of hybrid poplar hydrolyzate to ethanol. **Biomass Bioenergy.**, v. 22, p. 125-138, 2002.

LYND, L. R.; ELANDER, R. T.; WYMAN, C. E. Likely features and costs of mature biomass ethanol technology. **Appl. Biochem. Biotechnol.**,v. 57, n. 8, p. 741-761, 1996.

MARTIN, C.; JONSSON, L. J. Comparison of the resistance of industrial and laboratory strains of *Saccharomyces* and *Zygosaccharomyces* to lignocellulose-derived fermentation inhibitors. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 32, p. 386-395, 2003.

MARTINEZ, A. et al. O. Effects of Ca(OH)2 treatments (“overliming”) on the composition and toxicity of bagasse hemicellulose hydrolysates. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 69, p. 526-536, 2000.

MODIG, T.; LIDE, G.; TAHERZADEH, M. J. Inhibition effects of furfural on alcohol dehydrogenase, aldehyde dehydrogenase and pyruvate dehydrogenase. **Biochem. J.**, v. 363, p. 769-776, 2002.

MOLLAPOUR, M.; PIPER, P. W. Hog1 mitogen-activated protein kinase phosphorylation targets the yeast fps1 aquaglyceroporin for endocytosis, thereby rendering cells resistant to acetic acid. **Mol. Cellular Biology.**, v. 27, n. 18, p. 6446-6456, 2007.

MOROHOSHI, N. Chemical characterization of wood and its components. In: HON, D. N. S.; SHIRAISHI, N. (Ed.). **Wood and cellulosic chemistry**. New York: Marcel Dekker, 1991. p. 331-392.

MOSIER, N. et al. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. **Bioresour. Technol.**, v. 96, p. 673-686, 2005.

MUSSATTO, S. L.; ROBERTO, I. Optimal experimental condition for hemicellulosic hydrolyzate treatment with activated charcoal for xylitol production. **Biotechnol. Prog.**, v. 20, p 134-139, 2004.

NARENDRANATH, N. V.; THOMAS, K. C.; INGLEDEW, W. M. Effects of acid acetic and latic acid on the growth of *Saccharomyces cerevisiae* in a minimal medium. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.**, v. 26, p. 171-177, 2001.

NGUYEN, Q. A.; TUCKER, M. P.; KELLER, F. A. Dilute acid hydrolysis of softwoods. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, v. 77, n. 9, p. 133-142, 1999.

OLOFSSON, K.; BERTILSSON, M.; LINDEN, G. A short review on SSF-an interesting process option for ethanol production form lingnocellulosic feedstocks. **Biotechnol. Biofuels**, v. 1, p. 1-14, 2008.

OLSSON, L.; HAHN-HAGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates for ethanol production. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 18, p. 312-331, 1996.

PALMQVIST, E.; HAHN-HÄGERDAL, B. Influence of furfural on anaerobic glycolytic kinetics of *Sacharomyces cerevisiae* in batch culture. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 62, p. 447-454, 1999.

PALMQVIST, E.; HAHN-HÄGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II Inhibitors and mechanisms of inhibition. **Bioresour. Technolol.**,v. 74, p. 25-33, 2000.

PALMQVIST, E.; GLABE, M.; HAHN-HÄNGERDAL, B. Evaluation of cell recycling in continuous fermentation of enzymatic hydrolysates of spruce with *Saccharomyces cerevisiae* and on-line monitoring of glucose and ethanol. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 50, p. 545-551, 1998.

PALMQVIST, E. et al. Main and interaction effects of acetic acid, furfuran and p-hydroxybenzoic acid on growth and ethanol productivity of yeasts. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 63, p. 46-55, 1999.

PAMPULHA, M. E.; LOUREIRO-DIAS, M. C. Energetics of the effect of acetic acid on growth of *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 184, p. 69-72, 2000.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P. Biotechnological potential of agro-industrial residues. I: sugarcane bagasse. **Bioresour. Technol.**, v. 74, p. 69-80, 2000.

PARAJÓ, J. C.; DOMINGUEZ, H.; DOMINGUEZ, J. M. Biotechnological production of xylitol. Part 3: operation in culture media made from lignocellulose hydrolysates. **Bioresour. Technol.**, v. 66, p. 25-40, 1998.

PESSOA JUNIOR, A.; MANCILHA, I. M.; SATO, S. Acid hydrolysis of hemicellulose from sugarcane bagasse. **Braz. J. Chem. Eng.**, v. 14, n. 3, 1997.

RODRIGUES, R. C. L. B. et al. RScale-up of diluted sulfuric acid hydrolysis for producing sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate (SBHH). **Bioresour. Technol.**, v.101, p. 1247-1253, 2010.

RUMBOLD, K. et al. Microbial production host selection for converting second-generation feedstocks into bioproducts. **Microbial Cell Factories**, v. 8, p. 1-11, 2009.

SHERMAN, F.; HICKS, J. Micromanipulation and dissection of asci. In: GUTHRIE, G.; FINK, G. R. (Ed.). **Methods enzymol**. New York: Academic Press, 1991. v. 194, p. 21-37.

SJÖTRÖM, E. **Wood chemistry**: fundamentals and aplications. 2nd ed. San Diego: Academic Press. 1992.

SONI, M. L.; MEEHROTRA, R. N.; KAPOOR, R. C. Dissociation constant and some thermodynamic parameters of levulinic acid. **Indian J. Chem. A.**, v. 21, p. 196-197, 1982.

SOUZA, C. S. et al. A strategy to compare yeast strains and improve cell survival in ethanol production processes above 30°C. In: MENDES VILAS, A. (Ed.). **Communicating current research and educational topics and trends in applied microbiology**. Badjoz: Formatex, 2007. v. 1, p. 410-417.

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

TAHERZADEH, M. J.; KARIMI, K. Acid-based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials: a review. **BioResources**, v. 2, n. 3, p. 472-499, 2005.

TAHERZADEH, M. J.; KARIMI, K. Pretreatement of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: a review. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 9, p. 1621-1651, 2008.

TAHERZADEH, M. J.; NIKLASSON, C.; LIDÉN, G. Acetic acid-friend or foe in anaerobic batch conversion of glucose to ethanol by *Saccharomyces cerevisiae*. **Chem. Eng. Sci.**, v. 52, n. 15, p. 2653-2659, 1997.

TAHERZADEH, M. J. et al. Conversion of furfural in aerobic and anaerobic batch fermentation of glucose by *Saccharomyces cerevisiae.* **J. Bioscience Bioengineering**, v. 87, n. 2, p. 169-174, 1999.

TAHERZADEH, M. J. et al. Physiological effects of 5-hydroxymethylfurfural on *Saccharomyces cerevisiae*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 53, p. 701-708, 2000.

THOMAS, K. C.; HYNES, S. H.; INGLEDEW, W. M. Effects of particulate materials and osmoprotectants on very-high-gravity ethanolic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. **Appl. Env. Microbiol.**, v. 60, n. 5, p. 1519-1524, 1994.

THOMAS, K. C.; HYNES, S. H.; INGLEDEW, W. M. Initiation of anaerobic growth of *Saccharomyces cerevisiae* by amino acids or nucleic acid bases: ergosterol and unsaturated fatty acids cannot replace oxygen in minimal media. **J. Ind. Microbiol. Biotech.**, v. 21, n. 4-5, p. 247-253, 1998

VAN MARIS, A. J. A. et al. Alcoholic fermentation of carbon sources in biomass hydrolysates by Saccharomyces cerevisiae: current status. **Antonie van Leeuwenhoek,** v. 90, p. 391-418, 2006.

VILLA, G. P. Microbial transformation of furfural to furfuryl alcohol by *Saccharomyces cerevisiae*. **Acta Biotechnol.**,v. 12, p. 509-512, 1992.

WALKER M. W. **Yeast Growth**. London**:** John Wiley & Sons, 1998.

XU, C. P. et al. Optimization of submerged culture conditions form mycelia growth and exo-biopolymer production by *Paecilomyces tenuipes* C240. **Process Biochem.**, v. 38, p. 1025-1030, 2003.

ZALDIVAR, J.; NIELSEN, J.; OLSSON, L. Fuel ethanol production from lignocellulose: a challenge for metabolic engineering and process integration. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 56, n. 1-2, p. 17-34, 2001.

Apêndice

Apêncice I

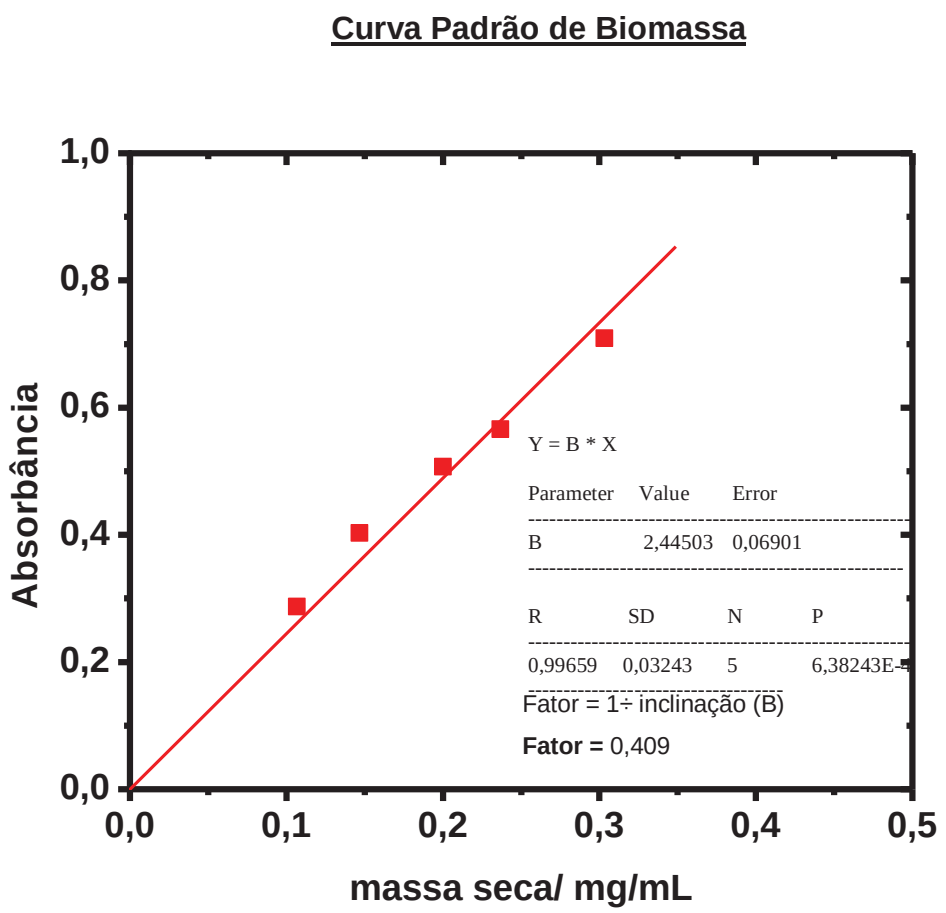

Figura 26. Curva de calibração para análise de biomassa. A equação da reta $y = a + b.x$ mostrou o seguinte: coeficiente angular b=2,44503, fator de correlação R^2=0,996 e fator de conversão de absorbância em biomassa seca *f*=0,409 para o espectrofotômetro Bioespectro modelo SP-22.